HOÀNG TRỌNG PHÁN (chủ biên)
TRƯƠNG THỊ BÍCH PHƯỢNG

GIÁO TRÌNH

# DI TRUYỀN HỌC VI SINH VẬT VÀ ỨNG DỤNG

NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC HUẾ

HOÀNG TRỌNG PHÁN (Chủ biên)
TRƯƠNG THỊ BÍCH PHƯỢNG

# Giáo trình

# DI TRUYỀN HỌC VI SINH VẬT VÀ ỨNG DỤNG

**NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC HUẾ**

**Huế - 2008**

# Lời nói đầu

*Đến nay, di truyền học ra đời chỉ mới hơn một trăm năm song nó đã phát triển với một tốc độ hết sức nhanh chóng. Đặc biệt là, trong vòng 50 năm lại đây kể từ ngày James Watson và Francis Crick khám phá ra cấu trúc phân tử DNA, 25/4/1953. Sự hoàn thành việc* Giải mã di truyền *bởi hai nhóm nghiên cứu của Marshall Nirenberg và Gobind Khorana vào tháng 6 năm 1966, và sự ra đời của* Kỹ thuật di truyền *vào giữa thập niên 1970 là hai sự kiện nổi bật nhất kể từ sau khi* Sinh học phân tử *ra đời. Sự phát triển cùng với những thành tựu đạt được của di truyền học trong thời gian qua quả là vô cùng to lớn!*

*Để góp phần đổi mới nội dung giáo trình* Di truyền học Vi sinh vật và Ứng dụng *theo hướng cập nhật kiến thức cũng như phương pháp dạy và học bộ môn ở bậc Đại học, chúng tôi đã tham cứu nhiều tài liệu khác nhau và nỗ lực biên soạn giáo trình trên tinh thần ấy. Chúng tôi hy vọng rằng giáo trình này sẽ đáp ứng được phần nào nhu cầu giảng dạy và học tập của giảng viên và sinh viên, và cũng có thể sử dụng như một tài liệu tham khảo bổ ích cho giáo viên Sinh học các trường THPT trong bối cảnh đổi mới giáo dục hiện nay.*

*Nội dung giáo trình gồm Bài mở đầu và 8 chương: Chương 1 giới thiệu* các đặc điểm của di truyền học vi sinh vật. *Chương 2* - Cơ sở phân tử của tính di truyền - *trình bày khái quát về cấu trúc và tổ chức của các bộ gene vi sinh vật và các cơ chế truyền thông tin di truyền chủ yếu là ở sinh vật tiền nhân (prokaryote). Chương 3 đi sâu phân tích các khía cạnh của các nguyên lý điều hoà biểu hiện gene ở vi khuẩn. Chương 4* - Biến dị ở vi sinh vật - *đề cập đến các quá trình biến đổi của vật chất di truyền ở các vi sinh vật (đột biến gene, sửa chữa DNA và các yếu tố di truyền vận động). Chương 5 tập trung vào lĩnh vực di truyền học của các virus. Chương 6 trình bày các nguyên lý của di truyền học vi khuẩn - tiếp hợp, biến nạp và tải nạp. Chương 7 giới thiệu những hiểu biết mới có tính chất đại cương về di truyền vi nấm và vi tảo. Và chương 8 tập trung trình bày các khái niệm, phương pháp và thành tựu của lĩnh vực công nghệ DNA tái tổ hợp - tạo dòng gene ở vi sinh vật, cũng như các ứng dụng của nguyên lý kỹ thuật di truyền liên quan vi sinh vật trong việc tạo ra các sinh vật biến đổi gene (genetically modified organisms = GMOs) và phóng thích chúng*

*vào môi trường.*

*Cuối mỗi chương đều có các phần* Câu hỏi và Bài tập *và* Tài liệu tham khảo *để bạn đọc tiện ôn tập và tra cứu. Và, trong chừng mực có thể, các thuật ngữ khoa học thông dụng được sử dụng bằng tiếng Anh hoặc chú thích trong ngoặc đơn để giúp người học dễ dàng hơn trong việc tiếp cận thông tin qua sách báo nước ngoài hoặc internet.*

Giáo trình Di truyền Vi sinh vật và Ứng dụng *do ThS. Hoàng Trọng Phán và TS. Trương Thị Bích Phượng - các giảng viên đang công tác tại Khoa Sinh học các trường Đại học Sư phạm và Đại học Khoa học, Đại học Huế - biên soạn, với sự phân công như sau:*

*ThS. Hoàng Trọng Phán chủ biên với Bài mở đầu và các chương 1, 2, 3, 6, và 8; TS. Trương Thị Bích Phượng biên soạn các chương 4, 5 và 7.*

*Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn Dự án Giáo dục Đại học Huế đã tài trợ cho việc biên soạn giáo trình trong khuôn khổ của Dự án Giáo dục Đại học mức B.*

*Chúng tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn đặc biệt đến PGS. TS. Phạm Thành Hổ - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Tp. Hồ Chí Minh đã dày công đọc bản thảo và cho nhiều ý kiến quý báu.*

*Do khả năng còn hạn chế, chắc chắn giáo trình còn nhiều thiếu sót. Chúng tôi rất mong nhận được sự phê bình và chỉ bảo của các đồng nghiệp và bạn đọc để giáo trình được hoàn chỉnh hơn trong lần in sau.*

*Xin trân trọng cảm ơn!*

*Huế, ngày 10 tháng 5 năm 2006*
*Các tác giả,*
*HOÀNG TRỌNG PHÁN*
*TRƯƠNG THỊ BÍCH PHƯỢNG*

## Bài mở đầu

# Di truyền học Vi sinh vật và Cách mạng Công nghệ Sinh học

## I. Sự ra đời và phát triển của di truyền học và công nghệ DNA tái tổ hợp

Sự ra đời và phát triển của di truyền học gắn liền với tên tuổi của Gregor Mendel năm 1865 và trải qua các giai đoạn sau đây.

*1. Sự ra đời và phát triển của di truyền Mendel*

**Hình 1** G. Mendel

Từ đậu Hà Lan (*Pisum sativum*), với ý tưởng và phương pháp nghiên cứu độc đáo, năm 1865 Gregor Mendel (Hình 1) đã phát hiện ra các quy luật di truyền cơ sở đầu tiên và qua đó suy ra sự tồn tại tất yếu của các đơn vị đi truyền đặc thù - *nhân tố di truyền* (genetic factor) - quy định các tính trạng được truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác mà sau này gọi là *gene*. Tuy nhiên, giới khoa học đương thời không hiểu và do đó không thể đánh giá tầm vóc vĩ đại của phát minh này.

Mãi đến năm 1900, ba nhà thực vật học là Carl Correns (Germany), Hugo de Vries (Netherlands) và Erich von Tschermak (Austria) độc lập nhau khám phá lại các quy luật di truyền của Mendel. Và di truyền học chính thức ra đời từ đây mà người sáng lập là Mendel.

*2. Sự ra đời và phát triển của thuyết di truyền nhiễm sắc thể*

**Hình 2** T.H.Morgan

Từ 1910, Thomas Hunt Morgan (Hình 2) cùng với ba cộng sự là Alfred H.Sturtevant, Calvin Bridges và Herman J. Muller đã xây dựng thành công *thuyết di truyền nhiễm sắc thể* (chromosome theory of inheritance) dựa trên đối tượng nghiên cứu là ruồi giấm *Drosophila melanogaster*. Học thuyết này xác nhận rằng gene là đơn vị cơ sở của tính di truyền nằm trên nhiễm sắc thể (ở trong nhân); trên đó các gene sắp xếp theo đường thẳng tạo thành nhóm liên kết. Những đóng góp đáng kể của các môn đệ xuất sắc của Morgan đó là: xây dựng bản đồ di truyền (Sturtevant 1913), chỉ ra cơ chế xác định các kiểu hình giới tính ở ruồi giấm (Bridges 1916) và phát

triển phương pháp gây đột biến bằng tia X (Muller 1927). Với đóng góp to lớn đó Morgan đã được trao giải Nobel năm 1933 và Muller năm 1946.

Năm 1931, Barbara McClintock (Hình 3) và Harriet Creighton thu được bằng chứng vật lý trực tiếp về tái tổ hợp ở ngô. Sau đó, hiện tượng này cũng được C. Stern quan sát ở *Drosophila*. Như vậy tái tổ hợp có thể được phát hiện cả về mặt vật lý lẫn di truyền ở động vật cũng như ở thực vật. Đến 1944, McClintock phát hiện các *yếu tố di truyền vận động* (transposable genetic elements), và bà đã được trao giải Nobel năm 1983 về khám phá này.

**Hình 3** B.McClintock

*3. Sự ra đời và phát triển của di truyền học phân tử*

Sự ra đời của *di truyền học phân tử* (molecular genetics) gắn liền với các khám phá về DNA (deoxyribonucleic acid) từ giữa thế kỷ XX trên đối tượng nghiên cứu chủ yếu là các vi sinh vật. Tuy nhiên, trước đó Friedrich Miescher (1869) đã khám phá ra một hỗn hợp trong nhân tế bào gọi là nuclein mà thành phần chính của nó sau này được biết là DNA.

**Hình 4** Beadle, Tatum, Jacob và Monod (từ trái sang)

Về mối quan hệ giữa gene và protein, từ 1902 Archibald Garrod qua nghiên cứu bệnh alcaptonuria ở người đã gợi ý rằng đây là một tính trạng lặn Mendel, có thể liên quan tới sự sai hỏng một enzyme. Bằng các thí nghiệm gây đột biến các gene liên quan đến các con đường sinh hóa trên nấm mốc *Neurospora*, năm 1941 George Beadle và E.L.Tatum (Hình 4) xác nhận mỗi gene kiểm soát sự tổng hợp một enzyme đặc thù. Chính *giả thuyết một gene-một enzyme* (one gene-one enzyme hypothesis) nổi tiếng này đã mở đường cho sự ra đời của di truyền hóa-sinh, và hai ông đã được trao giải Nobel cùng với Joshua Lederberg năm 1958. Về sau, giả thuyết này được chính xác hóa là một gene xác định chỉ một chuỗi polypeptid - cấu trúc sơ cấp của các protein, trong đó có các enzyme.

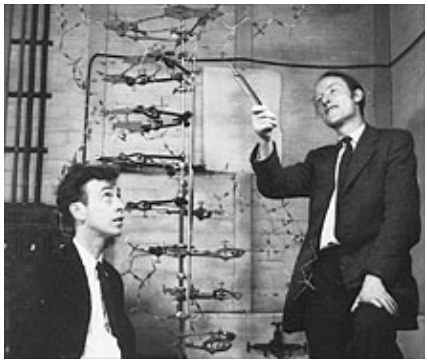
Vậy bản chất của gene là gì? Năm 1944, Oswald Avery (Hình 5) và

các cộng sự là MacLeod và McCarty bằng thí nghiệm biến nạp *in vitro* đã chứng minh rằng DNA là vật chất mang thông tin di truyền. Năm 1949, Erwin Chargaff công bố các kết quả đầu tiên về thành phần hóa học của DNA một số loài.

**Hình 5** O.T. Avery, MacLeod và McCarty (từ trái sang)

Việc nghiên cứu cấu trúc phân tử DNA được bắt đầu từ 1951 với các dẫn liệu nhiễu xạ tia X của Rosalind Franklin và Maurice Wilkins (Hình 6). Các số liệu hóa học và vật lý này là cơ sở mà từ đó James Watson và Francis Crick (Hình 7) đã xây dựng thành công mô hình cấu trúc phân tử DNA năm 1953, còn gọi là *chuỗi xoắn kép* (double helix). Phát minh vĩ đại này mở ra kỷ nguyên mới cho sự phát triển của di truyền học và sinh học nói chung. Với phát minh đó, Watson và Crick cùng với Wilkins được trao giải Nobel năm 1962 . Kể từ sau đó là sự ra đời của hàng loạt các công trình nghiên cứu trong lĩnh vực sinh học phân tử, đáng kể là việc giải mã di truyền được hoàn tất vào tháng 6 năm 1966 bởi hai nhóm nghiên cứu của M. Nirenberg và H. Khorana (giải Nobel năm 1968).

**Hình 6** R.Franklin (trái), M.Wilkins.



**Hình 7** J.D.Watson (trái) và F.H.C.Crick

*4. Sự ra đời và phát triển của công nghệ DNA tái tổ hợp*

Có thể nói, nền tảng của *công nghệ DNA tái tổ hợp* (recombinant DNA technology) được thành lập từ 1972 khi Paul Berg (Hình 8) tạo ra phân tử DNA tái tổ hợp đầu tiên trong ống nghiệm (recombinant DNA *in*

*vitro*). Một năm sau Herbert Boyer và Stanley Cohen (Hình 8) lần đầu tiên sử dụng plasmid để tạo dòng DNA. Lĩnh vực ứng dụng mới này của sinh học phân tử đã tạo ra một cuộc cách mạng mới trong sinh học. Đóng góp đáng kể trong lĩnh vực này là khám phá về các *enzyme giới hạn* (restriction enzyme) từ 1961-1969 của Werner Arber, Daniel Nathans và Hamilton Smith (giải Nobel 1978; Hình 8); đề xuất các phương pháp xác định trình tự base trong các nucleic acid năm 1977 bởi P.Berg, W.Gilbert và Frederick Sanger (giải Nobel hóa học 1980; Hình 8); sự khám phá ra các *gene phân đoạn* (split gene) năm 1977 bởi Phillip Sharp và Richard Robert (giải Nobel 1993; Hình 8); sự phát minh ra phương pháp PCR (*polymerase chain reaction*) của Kary B.Mullis năm 1985 (Hình 8) và phương pháp *gây đột biến định hướng* (site-directed mutagenesis) của Michael Smith từ 1978-1982 (giải Nobel hóa học 1993)...

**Hình 8A Các nhà khoa học đoạt giải Nobel y học liên quan kỹ thuật gene.** Từ trái sang: D.Nathans, H.Smith, W.Arber, P.Sharp và R.Robert.

**Hình 8B Các nhà khoa học đoạt giải Nobel hóa học liên quan kỹ thuật gene.** Từ trái sang: H.Boyer, S.Cohen, P.Berg, W.Gilbert, F.Sanger và K.Mullis.

Cùng với những thành tựu ứng dụng ly kỳ trong sản xuất và đời sống xã hội, như việc sản xuất các chế phẩm y-sinh học bằng công nghệ DNA tái tổ hợp, sử dụng *liệu pháp gene* (gene therapy) trong điều trị bệnh di truyền, tạo các giống sinh vật mới bằng con đường biến đổi gene (genetically modified organisms = GMOs), *dự án bộ gene người* (Human Genome Project = HGP)... gây ra không ít hoài nghi, tranh cãi xung quanh các vấn đề về *đạo lý sinh học* (bioethics) và *an toàn sinh học* (biosafety).

## II. Di truyền học vi sinh vật với cách mạng công nghệ sinh học

Cho đến đầu thập niên 1940 các vi sinh vật, bao gồm các vi khuẩn và virus của chúng và các vi sinh vật nhân chuẩn đơn bào như nấm men, nấm mốc... thực sự trở thành các đối tượng nghiên cứu chính yếu của di truyền học. Từ đây hình thành các lĩnh vực di truyền học sinh-hoá và di truyền học vi sinh vật, hai nền tảng chính cho sự ra đời của di truyền học phân tử (1953) và công nghệ ADN tái tổ hợp sau này (1978).

Ở đây vi khuẩn *E. coli* được xem là một sinh vật mô hình nhất quán tuyệt vời của di truyền học hiện đại. Nó được sử dụng một cách rộng rãi trong các thí nghiệm chứng minh các phương thức tái bản bán của DNA (Meselson và Stahl 1958; John Cairns 1961; Okazaki 1969), phân tích tái tổ hợp và lập bản đồ di truyền, nghiên cứu cấu trúc tinh vi và chức năng sinh hoá của gene (Benzer 1961; Yanofsky 1961); cơ chế điều hoà sinh tổng hợp protein (Jacob và Monod 1961) v.v. Nấm men bia *S.s cerevisiae* cũng sớm được sử dụng làm mô hình cho các nghiên cứu di truyền học eukaryote và ứng dụng rộng rãi trong công nghệ DNA tái tổ hợp sau này.

Với sự phát triển vô cùng nhanh chóng của di truyền học trong vài thập niên qua, đặc biệt là sự tiến bộ của *công nghệ sinh học* (biotechnology) nói chung đã có những tác động mạnh mẽ lên nhiều ngành khoa học và trên mọi mặt của đời sống, kinh tế, chính trị và xã hội ở phạm vi toàn cầu. Di truyền học nói chung và di truyền học vi sinh vật nói riêng được hình dung ở vị trí trung tâm và giao thoa với sinh học, hóa sinh học, kỹ nghệ, y-dược, nông nghiệp, sinh thái học, kinh tế học, luật, xã hội học và triết học (Hình 9).

**Hình 9:** Tác động của di truyền học (vi sinh vật) lên các lĩnh vực khác nhau.

Giáo sư danh dự môn hóa học ở Đại học Havard, F.H.Westheimer, bình luận về sinh học phân tử như sau:"Cuộc cách mạng trí tuệ vĩ đại nhất của 40 năm qua đã xảy ra trong sinh học. Liệu có thể tìm ra một người nào đó có học ngày nay mà không hiểu biết chút gì về sinh học phân tử?" (Weaver và Hedrick 1997, tr.15).

Các thành tựu đạt được nhờ ứng dụng di truyền học trong nông nghiệp là vô cùng to lớn, góp phần tạo nên cuộc cách mạng mới với sự ra đời của hàng loạt các giống vật nuôi-cây trồng có ưu thế vượt trội, các sinh vật biến đổi gene (GMO) mang những đặc tính hoàn toàn mới lạ.

Trong y học, đó là sự ra đời của hàng loạt các dược phẩm được sản xuất bằng kỹ thuật di truyền dùng cho điều trị bệnh và cải biến trí thông minh của con người; đó là các phương pháp chẩn đoán và điều trị bệnh ở mức phân tử v.v. Những vấn đề này sẽ được đề cập ở chương 8.

Có thể nói, sự thành công của dự án bộ gene người (HGP) vào tháng 4 năm 2003 cho phép chúng ta lần đầu tiên đọc được toàn bộ trình tự khoảng 3,2 tỷ cặp nucleotide trong bộ gene con người (*Homo sapiens*). HGP là một trong những kỳ công thám hiểm vĩ đại nhất trong lịch sử nhân loại (NHGRI 2005). Theo ước tính mới nhất được công bố ngày 21/10/2004 trên tạp chí *Nature*, bộ gene chúng ta chứa số lượng gene mã hóa protein thấp một cách đáng kinh ngạc, khoảng 20.000 đến 25.000 chứ không phải là 50.000 đến 140.000 gene như dự đoán ban đầu hoặc 35.000 theo dự đoán trong vài ba năm lại đây (NHGRI 2005).

Tuy nhiên, những thách thức cho tương lai của nghiên cứu *khoa học về các bộ gene* (genomics) đối với sinh học, vấn đề sức khỏe và xã hội cũng được đặt ra (Collins *và cs* 2003) . Sự hoàn tất của HGP tự nó không có nghĩa là đã xong mà đúng hơn là điểm khởi đầu cho công cuộc nghiên cứu thậm chí còn hứng thú hơn. Các nhà nghiên cứu hiện giờ đang cố gắng làm sáng tỏ một số quá trình phức tạp nhất của sinh học, đó là: một đứa bé phát triển từ một tế bào đơn lẻ bằng cách nào, các gene phối hợp chức năng của các mô và cơ quan như thế nào, sự tiền định bệnh tật xảy ra như thế nào và bộ não người làm việc ra sao (NHGRI 2005).

## III. Đại cương về Genomics và mối liên quan giữa nó với các lĩnh vực nghiên cứu khác

Sự tiến bộ nhanh chóng gần đây của sinh học phân tử và *công nghệ sinh học* (biotechnology), như đã nói trên, là nhờ sự phát triển mạnh mẽ của các phương pháp và kỹ thuật mới trong sinh học phân tử như: (i) Kính hiển vi điện tử; (ii) Tách chiết và phân tích định tính và định lượng thô nucleic acid; (iii) Xác định trình tự nucleic acid của gene (bằng phương

pháp hoá học của Maxam và Gilbert và bằng phương pháp didesoxy của Sanger); (iv) Lai phân tử nucleic acid; (v) Đánh dấu đồng vị phóng xạ và sử dụng các mẩu dò; (vi) PCR; (vii) Tạo dòng DNA tái tổ hợp; (viii) Gây đột biến định hướng; v.v.

Tuy nhiên, chính sự kết hợp tin học và máy tính trong nghiên cứu sinh học phân tử đã dẫn tới sự ra đời của hàng loạt các lĩnh vực nghiên cứu mới, đó là: *Tin-sinh học* (bioinformatics) cho phép thu thập, tổ chức và phân tích số lượng lớn các số liệu sinh học nhờ sử dụng mạng máy tính và các nguồn dữ liệu (databases); *Khoa học về bộ gene* hay *Bộ gen học* (*Genomics*) - phân tích toàn bộ genome của một sinh vật được chọn; *DNA microchip technology* - xác định các đột biến trong các gene; *DNA microarray technology* - nghiên cứu cách thức một số lượng lớn các gene tương tác lẫn nhau và cơ chế mạng lưới điều hòa của tế bào kiểm soát đồng thời số lượng cực kỳ lớn các gene; v.v.

Dưới đây là một số khái niệm cơ bản về Genomics và các lĩnh vực liên quan đến kỷ nguyên sau bộ gene (Post-genomic Era). Đây chính là cánh cửa mới về -OME và -OMICS hiện được phổ biến trên các trang web (-OME and -OMICS Gateway):

http://www.nature.com/omics/index.html

http://www.genomicglossaries.com/content/gloss_cat.asp

Bên cạnh sự phát triển của lĩnh vực genomics là sự ra đời của *khoa học về bộ protein* (Proteomics) và nhiều lĩnh vực *-omics* khác, như: Transcriptomics; Cellomics; Metabolomics; Ionomics v.v. Dưới đây chúng ta chỉ tìm hiểu về genomics và một số vấn đề liên quan để làm sang tỏ tốc độ phát triển chóng mặt của các ngành khoa học mới mẻ này.

### *1. Genomics*

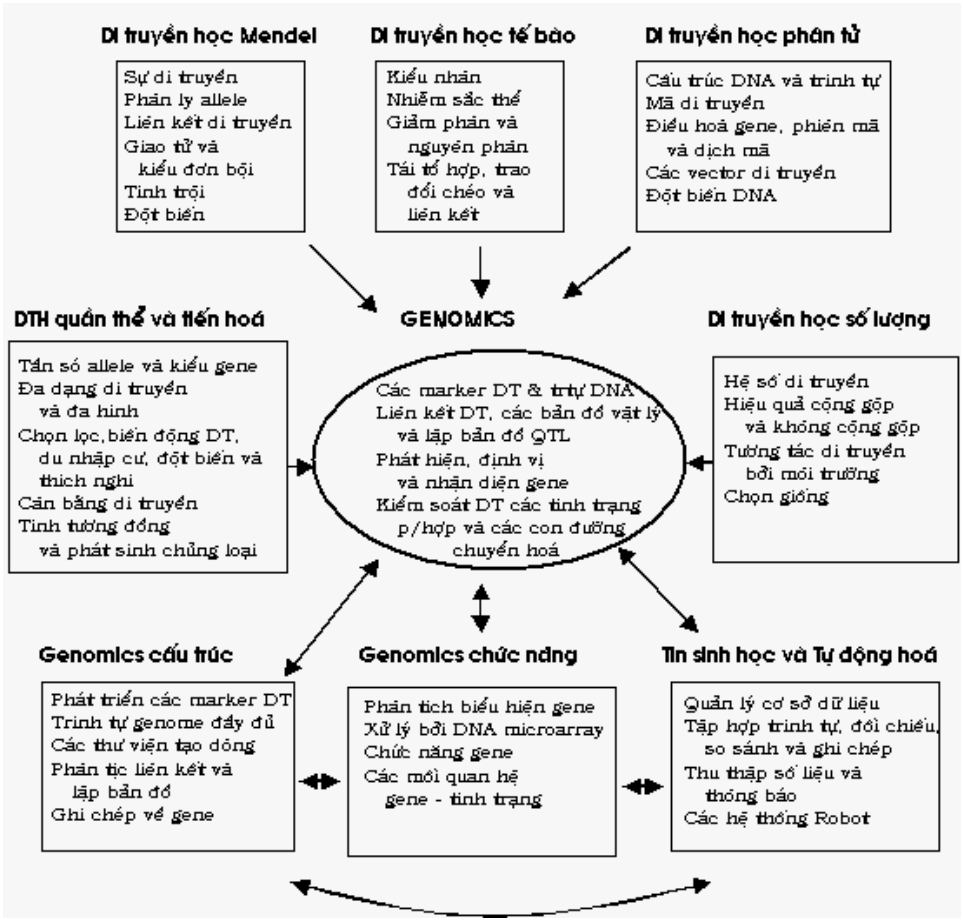
Việc giải thành công trình tự DNA của bộ gene (genome) người và của hàng loạt các sinh vật mô hình đã được tiến hành trong suốt thập niên 1990 và tiếp diễn cho đến nay. [Các kết quả này đã được công bố rộng rãi trên nhiều trang web nổi tiếng, ví dụ: http://www.genome.gov/ ]. Chính điều này dẫn đến sự ra đời của một lĩnh vực khá mới mẻ gọi là *khoa học về bộ gene* (genomics).

Các tri thức bắt nguồn từ *khoa học về bộ gene* (genomics) cho phép chúng ta không những hiểu sâu và chi tiết về các cơ chế phân tử của sự sống mà còn tạo nên cuộc cách mạng thật sự trong nông nghiệp, y-dược học và nhiều lĩnh vực kỹ thuật và công nghệ khác. Nó cũng cung cấp cho chúng ta nhiều cách tiếp cận mới nhằm phát hiện, bảo tồn và sử dụng tính đa dạng sinh học. Bên cạnh đó nó còn thúc đẩy phát triển các thế hệ máy

tính và phần mềm mới dựa trên sự mô phỏng cách thức truyền tín hiệu chính xác và tinh vi của các tế bào.

Có thể nói, sự hiểu biết chi tiết về cấu trúc và chức năng của bộ gene người và bộ gene các sinh vật khác là đỉnh cao của công nghệ gene.

Genomics đã phát sinh ra một khoa học mới nghiên cứu toàn bộ bộ gene bằng cách xâm nhập vào các môn di truyền học truyền thống như là di truyền học quần thể, số lượng và phân tử với những công nghệ mới trong sinh học phân tử, phân tích DNA, tin sinh học và các hệ thống robot tự động hoá (Hình 1.10).




**Hình 1.10** Genomics một môn học rộng lớn xâm nhập vao các khu vực truyền thống của di truyền học (phỏng theo các Hình 1.1 và 1.2 trong Liu 1998).

*Nguồn*: http://www.fao.org/DOCREP/003/X6884E/x6884e03.htm

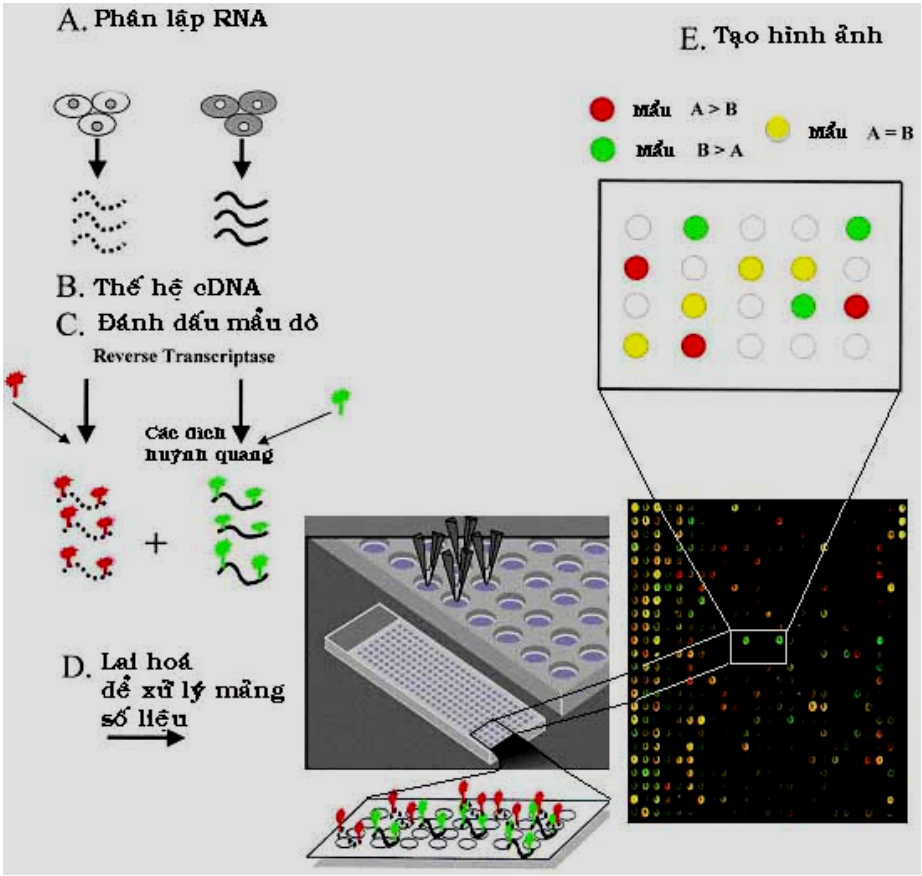
Một số lượng lớn các phân môn của genomics có thể tổ hợp lại để cung cấp một cách tiếp cận mạnh mẽ cho nghiên cứu sự biến đổi di truyền thích hợp như: *Genomics cấu trúc* (Structural genomics); *Genomics chức năng* (Functional genomics)- *Genomics so sánh* (Comparative genomics); *Genomics kết hợp* (Associative genomics); *Genomics thống kê* (Statistical genomics) v.v.

1.1. Genomics cấu trúc (Structural genomics)

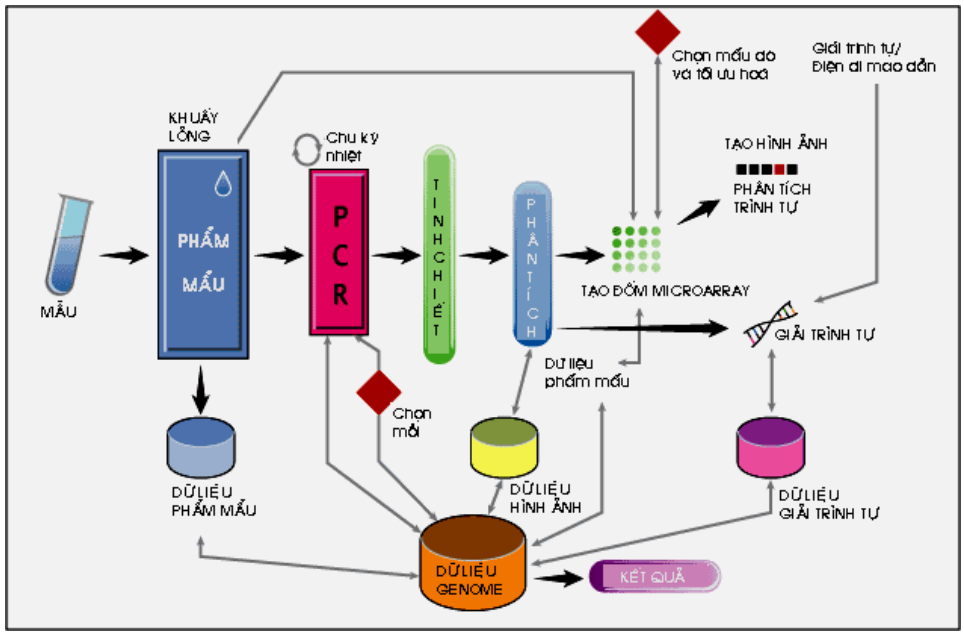
Genomics cấu trúc cố gắng hướng tới xác định toàn bộ các gene trong một bộ gene, đôi khi gọi là khám phá gene, và xác định vị trí của chúng trên các nhiễm sắc thể. Mục tiêu này đạt được bằng cách phân tích trình tự các gene riêng lẻ, các đoạn gene hoặc toàn bộ bộ gene.. Các gene riêng lẻ được xác định từ trình tự DNA thông qua các chương trình xử lý bằng máy tính (sophisticated computer algorithms). Các chức năng sinh hoá của một gene được suy diễn thông qua sự so sánh trình tự DNA đó vớitình tự của các gene có chức năng đã biết trong ngân hàng dữ liệu. Một trong các áp dụng nổi bật nhất của genomics cấu trúc là nghiên cứu sự biến đổi di truyền thích nghi là phân tích các *locus tính trạng số lượng* (quantitative trait loci = QTL) thông qua *lập bản đồ bộ gene* (genome mapping). Tuy nhiên, mục đích của cách tiếp này là nhằm giải thích cấu trúc bộ gene (enomic structure) và sự tương tác gene (gene interaction) ở mức độ bộ gene hơn là chức năng của nó, không giống như genomics chức năng.

1.2. Genomics chức năng (Functional genomics)

Genomics chức năng đi sâu tìm hiểu chức năng của các gene và cách thức chúng xác định các kiểu hình. Một trong những lợi thế chính của genomics chức năng là sử dụng các *vi mảng DNA* (DNA microarray*;* cũng gọi là các *chíp DNA* = "DNA chips") để đo sự biểu hiện đặc thù của hàng ngàn gene một cách đồng thời. DNA microarray chứa hàng ngàn mẩu DNA hoặc các trình tự oligonucleotide được in hoặc tổng hợp trên màng lọc nylon (nylon membrane filter) hoặc slide kính hiển vi trong một kiểu chính xác đã được biết và đại diện cho hàng ngàn gene trong bộ gene. Mỗi chấm DNA đại diện cho một gene duy nhất mà được dùng để đo lường định lượng sự biểu hiện của mRNA (messenger RNA) bằng cáh đem lai với mNA có đánh dấu huỳnh quang (fluorescent labelled mRNA) (Hình 1.11).




**Hình 1.11** Sử dụng các DNA microarray trong phân tích sự biểu hiện biệt hoá của các gene (Từ Albelda và Sheppard 2000). Thí nghiệm lai so sánh liên quan tới việc cách ly mRNA từ hai mẫu riêng biệt (**A**). mRNA từ mỗi mẫu được xử lý với *reverse transcriptase* (**B**) và được đánh dấu với một đích huỳnh quang riêng (**C**). Hai công cụ RNA đanh dấu được trộn lẫn, lai với nhau để cho DNA microarray có chứa một bộ đầy đủ gồm hàng ngàn hoặc hàng chục ngàn trình tự DNA dựa trên bộ gene hoặc hoặc các trình tự DNA bổ sung (cDNA), và rửa sạch (**D**). Microarray array này được quét nhờ sử dụng một máy ghi hình huỳnh quang chuyên dụng (specialised fluorimage), và màu sắc của mỗi chấm sẽ được xác định (**E**). Trong ví dụ này, các gene chỉ được biểu hiện ở Mẫu A sẽ có màu đỏ, các gene chỉ biểu hiên ở Mẫu B sẽ có màu xanh và các gene ấy được biểu hiện ngang bằng nhau trong cả hai mẫu ãe cho màu vàng. Điều này cho phép nhà nghiên cứu xác định các gene được biểu hiện một cách đặc biệtảtong việc đáp ứng với việc xử lý hoặc bệnh,hoặc các gene đặc thù cho mô được biểu hiên ở một mô, chứ không phải ở các mô khác.




**Hình 1.12**

2.1.3. Genomics so sánh (Comparative genomics)

*Genomics so sánh* sử dụng thông tin từ các loài khác nhau và trợ giúp cho việc hiểu biết tổ chức và sự biểu hiện của gene cũng như sự sai khác về mặt tiến hoá. Nó có lợi thế về sự bảo tồn cao độ của gene về cấu trúc và chức năng (nghĩa là có sai khác nhỏ ngang qua các đơn vị phân loại đa dạng) và áp dụng nguyên lý này theo cách thức giữa các loài (interspecific) trong sự tìm kiếm các gene chức năng và sự tổ chức bộ gene của chúng. Genomic so sánh còn tăng cường nghiên cứu bằng cách kiểm tra sự đa dạng của các *sinh vật mô hình* (model organisms) mà trong đó các tính trạng sinh lý, phát triển hoặc sinh hoá đã được sẵn sàng để nghiên cứu.

Đặc biệt là các nghiên cứu genomics ở các thực vật có hoa nhỏ như cây cải Brassica, *Arabidopsis thaliana,* vốn được sử dụng rộng rãi như là các loài mô hình, mà số liệu trình tự của bộ gene đã được giải xong rồi. Một trình tự bộ gene đầy đủ của cây dương (populus) chẳng bao lâu nữa cũng sẽ có sẵn cho phân tích genomics so sánh.

***2. Xác định trình tự DNA của toàn bộ các bộ gene***

Việc giải hoàn tất trình tự các bộ gene của nhiều loài quan trọng và mô hình là một thành tựu đáng kể của genomics, vốn cung cấp cơ sở cho phân tích so sánh về cấu trúc và chức năng. Các câu trả lời cho các câu hỏi

chẳng hạn như: (1) số lượng, sự định khu và phân bố của các gene trong genome; (2) tổ chức của gene và chức năng của chúng; (3) các gene nào là giống nhau hoặc được bảo tồn cao băng qua các loài khác nhau; và (4) các gene nào chịu trách nhiệm cho các loài thích nghi và tiến hoá mà có thể thu nhận được bây giờ. Các trình tự bộ gene đầy đủ đã được xác định cho nấm men bia *Saccharomyces cerevisiae* (5/1997), giun tròn *Caenorhabditis elegans* (12/1998), ruồi giấm *Drosophila melanogaster* (3/2000), thực vật có hoa hàng năm *Arabidopsis thaliana* (12/2000), con người (2/2001), và còn nhiều loài khác sos liệu giải trình tự cũng sắp hoàn thành như chuột, lúa, ngô, v.v.. Hiện giờ có thể xác định bằng thí nghiệm trình tự bộ gene đầy đủ của các cây rừng như là cây dương *Populus* (500 triệu cặp base) hay *Eucalyptus* (340-580 triệu cặp base).

Số lượng các gene trong một bộ gene là có giới hạn và không quá cao như đã được dự đoán trước đây (cụ thể, chỉ ~26,000 ở các thực vật và động vật, trong khi ~6,000 ở nấm men bánh mỳ, Bảng 1.1). Hơn nữa nhiều gene là chung cho các loài và đặc biệt là không thay đổi trong sự tiến hoá đã qua. Chẳng hạn, chỉ có 94 trong số1278 họ protein trong bộ gene người dường như là đặc trưng cho các động vật có xương sống. Chức năng cơ sở nhất trong số các chức năng của tế bào - chuyển hoá cơ sở, sự phiên mã của DNA thành RNA, sự dịch mã của RNA thành protein, sự tái bản DNA ... - chỉ tiến hoá một lúc và hầu như giữ nguyên không đổi kể từ sự tiến hoá của nấm men đơn bào và vi khuẩn.

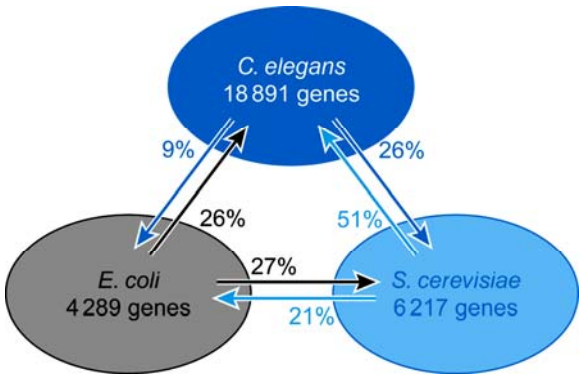
***Bảng 1.1*** *Kích thước bộ gene của nhiều loài đem so sánh*

| Phạm vi phân loại | Tên Latin | Tên chung | n | Số bp (x $10^6$) | Genes (x $10^3$) |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Prokaryote*** | | | | | |
| Vi khuẩn cổ | 12 [1] | VSV cổ | - | 1,6-3,0 | 1,5-2,7 |
| Vi khuẩn | 40 [1] | VSV vk | - | 0,6-7.0 | 0,5-6,6 |
| Vi khuẩn | *Escherichia coli* [2] | không có | - | 4,6 | 4,3 |
| ***Eukaryote*** | | | | | |
| Nấm men bia | *S. cerevisiae* [2] | men b/mỳ | 16 | 12 | 6 |
| Giun | *C.elegans* [2] | giun tròn | 5/6 | 97 | 19 |
| Côn trùng | *D.melanogaster* | ruồi giấm | 4 | 180 | 13,6 |
| TV hạt kín | *A. thaliana* [2] | arabidopsis | 5 | 125 | 25,5 |
| TV hạt kín | *Oryza sativa* [2] | lúa gạo | 12 | 400 | ? |
| TV hạt kín | *Zea mays* [2] | ngô | 10 | 2400-3200 | ? |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| TV hạt kín | *L.esculentum* | khoai tây | 12 | 900 | ? |
| TV hạt kín | *Eucalyptus* [3] | bạch đàn | 11 | 340-580 | ? |
| Cây rừng/TV hạt trần | *Thông* [3] | thông | 12 | 20.000-30.000 | ? |
| Gặm nhấm | *Mus musculus* [2] | chuột | 20 | 3.500 | 21-30 |
| Linh trưởng | *Homo sapiens* [2] | người | 23 | 3.400 | 26-31 |

[1] Số loài có các trình tự bộ gene đã được giải đầy đủ.
[2] Các loài có số liệu trình tự bộ gene đầy đủ hoặc hầu như đầy đủ.
[3] Số liệu dựa trên nhiều loài.

(Nguồn: http://www.fao.org/DOCREP/003/X6884E/x6884e03.htm)



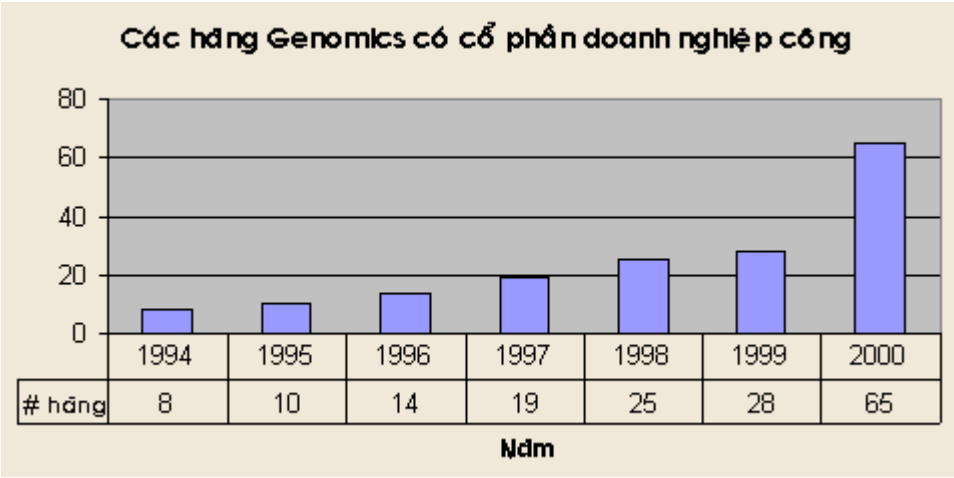

**Hình 1.13** So sánh số lượng và mật độ gene ở ba loài *E. coli*, nấm men bia nẩy chồi *S. cerevisiae* và giun tròn *C. elegans*.

*Genomics so sánh* khám phá đặc tính bảo tồn của gene như thế, đã giúp cho việc hiểu biết và suy ra chức năng của một gene cụ thể từ các số liệu thu được đối với các gene tương đồng giống nhau (similar homologous genes) đã được nghiên cứu ở các sinh vật khác. Khá nhiều chức năng của các gene cây rừng có thể học được từ các số iệu thu được ở các sinh vật khác, chẳng hạn như *Arabidopsis*. Trong số các thách thức khác nhau là tính phức tạp và kích thước lớn của các bộ gene cây cối (Bảng 1.1). Kích thước của bộ gene cây thông (20,000-30,000 triệu cặp base), chẳng hạn, là lớn gấp 6 đssen 8 lần so với bộ gene người (3,400 triệu cặp base), và 150 đến 200 lần lớn hơn bộ gen của *Arabidopsis* (125 triệu cặp base). Ngay cả kích thước vật lý tương đối nhỏ của bộ gene cây dương *Populus* (500 triệu cặp base), vốn 40 lần bé hơn loài thông *Pinus taeda* (đã được nghiên cứu rất kỹ) sẽ giống như bộ gene cây rừng đầu tiên đã được giải toàn bộ trình tự, sẽ bằng khoảng 4 lần bộ gen *Arabidopsis* (mặc dù giống với lúa và 6 lần bé hơn ngô, cả hai hầu như đều đã được giải trình tự đầy đủ).

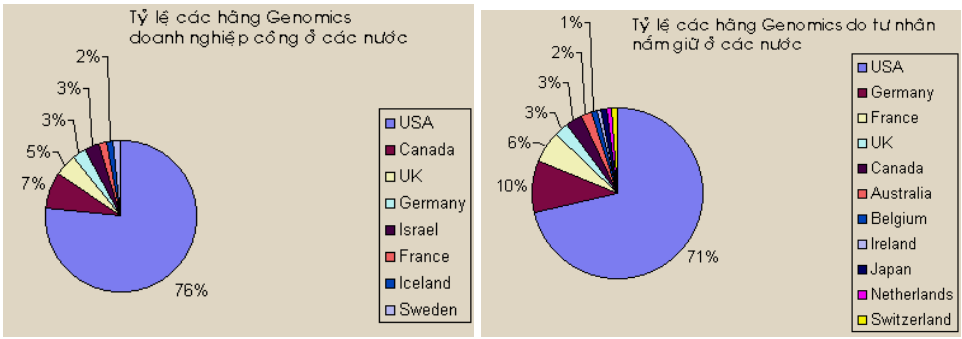
Cùng với sự phát triển nhanh chóng và vô cùng hấp dẫn như vậy của

lĩnh vực genomics, hàng loạt các công ty cổ phần doanh nghiệp nhà nước (doanh nghiệp công) và tư nhân đua nhau ra đời, đặc biệt là ở các quốc gia đi đầu trong lĩnh vực này như: Mỹ , Đức, Pháp, Anh, Canada, Bỉ , Nhật, Úc, Thuỵ Điển, v.v.

Hình 1.14 và 15 dưới đây cho thấy sự phát triển tăng tiến về số lượng của các công ty cổ phần doanh nghiệp công ở Mỹ từ năm 1994 đến 2000, cũng như tỷ trọng ưu thế của các hãng genomics ở Mỹ so với các cường quốc khác về công nghệ sinh học.




**Hình 1.14** Sự phát triển tăng tiến về số lượng của các công ty cổ phần doanh nghiệp công về genomics ở Mỹ từ năm 1994 đến năm 2000.




**Hình 1.15** Tỷ trọng ưu thế của các hãng genomics công và tư nhân ở Mỹ so với các cường quốc khác về công nghệ sinh học.

## IV. Các nguyên tắc nghiên cứu và phương pháp học tập bộ môn

*1. Các nguyên tắc nghiên cứu*

Trong nghiên cứu di truyền học vi sinh vật và sinh học nói chung có các nguyên tắc chung cần tuân thủ như là phương pháp luận, sau đây: (1)

Lấy tế bào làm đơn vị nghiên cứu; (2) Thông tin di truyền chứa trong bộ gene tế bào chi phối mọi biểu hiện sống của nó mà các gene là đơn vị di truyền cơ sở; (3) Sự hoạt động của các gene trong quá trình phát triển cá thể là đặc trưng cho từng gene ở từng giai đoạn cụ thể; (4) Các quá trình trong các hệ thống sống phải được điều hòa và kiểm soát để đảm bảo cho sự tồn tại của nó là liên tục, trong đó phổ biến là sự tự điều chỉnh bằng các *cơ chế phản hồi thông tin* (feed-back mechanism); (5) Sự thống nhất giữa cấu trúc và chức năng biểu hiện ở tất cả các mức độ tổ chức khác nhau của sự sống; (6) Tất cả các tổ chức và quá trình sống đều tuân theo các quy luật vật lý và hóa học; (7) Sự sống trên trái đất trải qua quá trình tiến hóa khoảng 3,5 tỷ năm qua, vì vậy khi so sánh, những nét tương đồng giữa chúng cho thấy tính thống nhất về mặt nguồn gốc và những nét dị biệt cho thấy tính phát triển, sự phân hóa đa dạng tất yếu của chúng.

*2. Phương pháp học tập bộ môn*

Cũng như bất kỳ môn học nào khác, việc học tập di truyền học vi sinh vật đòi hỏi phải nắm vững lịch sử môn học, đối tượng, nhiệm vụ, phương pháp nghiên cứu và hệ thống kiến thức căn bản của nó. Bên cạnh các nguyên tắc nói trên vốn rất cần cho tư duy trong học tập, ở đây xin nêu vài nét chính liên quan đến phương pháp học tập đặc thù của bộ môn.

(1) Nắm vững các kiến thức liên môn (như tế bào học, hóa sinh học, mà trên hết là di truyền học và vi sinh vật học) và liên ngành (như toán thống kê-xác suất, vật lý và hóa hữu cơ).

(2) Nắm vững hệ thống khái niệm cơ bản cũng như các thuật ngữ mới không ngừng nảy sinh. Chẳng hạn, gene là khái niệm căn bản có nội hàm không ngừng được phát triển sâu rộng. Đặc biệt, trong thời đại ngày nay, với sự mở ra một kỷ nguyên mới - *Kỷ nguyên sau bộ gene* (Post-genomic Era), hàng loạt thuật ngữ và lĩnh vực nghiên cứu mới liên quan với những cánh cửa *-ome* và *-omics* đồng loạt ra đời và gắn liền với sự phát triển của *Tin-sinh học* (Bioinformatics) như: genome với genomics, proteome với proteomics, transcriptome với transcriptomics,...

(3) Hiểu rõ bản chất của các nguyên lý di truyền trong từng chủ đề cũng như mối liên quan giữa chúng để có thể giải thích và vận dụng trong giải quyết các bài toán hoặc tình huống của đời sống và thực tiễn sản xuất.

(4) Để nắm kiến thức và phát triển các kỹ năng tư duy một cách vững chắc đòi hỏi phải biết vận dụng kiến thức vào giải bài tập cũng như các kỹ năng thực hành thí nghiệm.

(5) Di truyền học vi sinh vật là một khoa học thực nghiệm, nên thông tin thu được là nhờ các quan sát từ thế giới vi sinh vật, và phương pháp

khoa học chính là công cụ để hiểu biết các quan sát đó. Nói đến phương pháp nghiên cứu khoa học là nói đến các bước tiến hành theo một trình tự tổ chức công việc chặt chẽ sau đây: Quan sát → Giả thuyết → Dự đoán → Thực nghiệm (để kiểm tra giả thuyết đặt ra) → Đề xuất giả thuyết mới.

(6) Trong khi học giáo trình, bạn nên làm ít nhất một tiểu luận về một vấn đề cập nhật mà mình yêu thích. Công việc này đòi hỏi sự say mê tìm tòi các thông tin mới, đặc biệt là thông qua mạng internet, để viết bài tổng luận khoa học và trình bày trong một seminar. Điều quan trọng là phải tạo cho mình một hoài bão học tập, một khả năng và phương pháp tự học.

(7) Bởi di truyền học vi sinh vật và các ứng dụng của nó là một lĩnh vực khoa học non trẻ nhưng phát triển với tốc độ hết sức nhanh chóng, cho nên khối lượng kiến thức mới tích lũy được là vô cùng phong phú và đa dạng. Để có thể cập nhật thông tin về môn học đòi hỏi phải tăng cường khả năng sử dụng tiếng Anh và internet. Đáng kể là các trang web được giới thiệu sau mỗi chương, hoặc có thể sử dụng ngay các từ khóa (key words) được cho ở từng chủ đề để tìm kiếm với công cụ mạnh nhất hiện nay là *Google* (http://www.google.com/), hoặc bằng các công cụ khác như: *MSN* (http://www.msn.com/), *Yahoo* (http://www.yahoo.com/) hoặc *Wikipedia* (http://www.wikipedia.com/).

## Tài liệu Tham khảo


Phạm Thành Hổ. 2005. *Nhập môn công nghệ sinh học*. NXB Giáo Dục.

Atlas, RM. 1995. *Principles of Microbiology*. St. Louis, Missouri: Mosby.

FAO: http://www.fao.org/DOCREP/003/X6884E/x6884e03.htm

Kimball J. 2004: http://users.rcn..com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/

Madigan, MT and JM Martinko. 2006. *Brock Biololy of Microorganisms*. 11th ed. Pearson Prentice Hall, Inc. Upper Saddle River, New Jersey.

Maloy, S. 2006. *Microbial Genetics*.

http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/genetics/

Nature -OMICS Gateway:

http://www.nature.com/omics/index.html

http://www.genomicglossaries.com/content/gloss_cat.asp

TIGR Microbial Genome Database.2005.

http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbcomplete.html

DOE Microbial Genome Program Report. 2005.

http://www.www.ornl.gov/hgmis/publicat/microbial/13doeproj.html

**Chương 1**

# Các đặc điểm của Di truyền học Vi sinh vật

## I. Sơ lược lịch sử vi sinh vật học

*Vi sinh vật* (microorganisms, microbials) là tên gọi chung dùng để chỉ tất cả các sinh vật có hình thể bé nhỏ mà chỉ có thể nhìn thấy dưới kính hiển vi quang học hoặc kính hiển vi điện tử. Lĩnh vực nghiên cứu này gọi là *Vi sinh học* (microbiology), ra đời cách đây hơn 300 năm bởi Antoni van Leeuwenhoek (1676; hình 1.1) với khám phá đầu tiên các vi sinh vật bằng kính hiển vi đơn giản.

Về lịch sử phát triển của vi sinh học, các tác giả khác nhau phân chia không giống nhau (bạn đọc có thể tham khảo ở các tài liệu được giới thiệu dưới đây). Chẳng hạn:

Theo Nguyễn Thành Đạt (2005, tr.19-28), có thể chia làm 4 giai đoạn: giai đoạn sơ khai (với đại diện là A. van Leeuwenhoek), giai đoạn *Pasteur*, giai đoạn sau *Pasteur* và giai đoạn hiện tại.

Madigan và Martinko (2006, tr.9-20) xét qua 4 thời kỳ: (i) Những gốc rễ lịch sử của vi sinh học - Robert Hook, van Leeuwenhoek và Cohn; (ii) Pasteur, Koch và các kỹ thuật nuôi cấy thanh trùng; (iii) Tính đa dạng vi sinh vật và sự ra đời của vi sinh vật học đại cương; và (iv) Kỷ nguyên hiện đại của vi sinh vật học.

Ở đây, tạm xét theo quan niệm của McKane và Kandel (1996). Có thể nói rằng từ nửa sau thế kỷ XIX, sự phát triển của vi sinh học gắn liền với bốn hướng nghiên cứu chính được tóm lược như sau:

❶ *Tranh luận về thuyết tự sinh* (spontaneous generation controversy): Hàng loạt các bằng chứng và lý lẽ vượt thắng thuyết tự sinh, tiêu biểu là các công trình của Spallanzani (1765), Schroeder và von Dusch (1854), Pasteur (1861) và Tyndall (1877).

**Hình 1.1** A. van Leeuwenhoek, L. Pasteur và W. Flemming (từ trái sang).

❷ *Nghiên cứu sự lên men* (fermentation): Năm 1837 Schwann xác định nấm men *Saccharomyces cerevisiae* chịu trách nhiệm cho sự lên men cồn; đến năm 1864 Pasteur (hình 1.1) cứu vãng nền kỹ nghệ sản xuất rượu vang Pháp nhờ phát triển kỹ thuật kiểm soát sự lên men, và đây là cơ sở cho phương pháp khử trùng Pasteur hiện đại; năm 1897 Buchner khám phá ra sự lên men cồn vô bào.

❸ *Nghiên cứu di truyền học phân tử* (molecular genetics) khởi đầu từ công trình của Beadle và Tatum năm 1941 với giả thuyết một gene-một enzyme và kéo dài cho đến nay.

❹ *Nghiên cứu bệnh lây nhiễm* (infectous disease): Năm 1798 Jenner giới thiệu vaccine đầu tiên, khi sử dụng mầm bệnh đậu bò để gây miễn dịch chống lại bệnh đậu mùa. Năm 1876 Koch chứng minh bệnh nguyên học của bệnh than; chỉ ra bốn bước cho việc xác định nguyên nhân của các bệnh nhiễm trùng. Năm 1881, Pasteur điều chế vaccine chống lại bệnh than và đến năm 1886 chính ông lại điều chế vaccine chống bệnh dại. Năm 1883 Metchnicoff chứng minh vai trò của các tế bào bạch cầu. Năm 1929 Flemming (hình 1.1) khám phá ra penicillin...

Cần lưu ý rằng, chính từ nghiên cứu đầu tiên của Jenner về vaccine đã hình thành một nhánh *miễn dịch học* (immunology) mà sự phát triển của nó gắn liền với tên tuổi của Pasteur như đã đề cập. Đến năm 1954 Salk và 1955 Sabin sản xuất thành công các vaccine chống virus polio gây bệnh bại liệt. Năm 1980 Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) tuyên bố đã giải quyết xong bệnh đậu mùa, và bệnh AIDS cũng bắt đầu xuất hiện. Năm 1984 Milstein, Koeller và Jeme sản xuất các kháng thể đơn dòng; năm 1990 Murry và Johnson sử dụng các tác nhân ức chế miễn dịch để thực hiện thành công các ca ghép mô. Đến 1993 ca liệu pháp gene đầu tiên duy trì khả năng của bệnh nhân suy giảm miễn dịch chống được bệnh lây nhiễm...

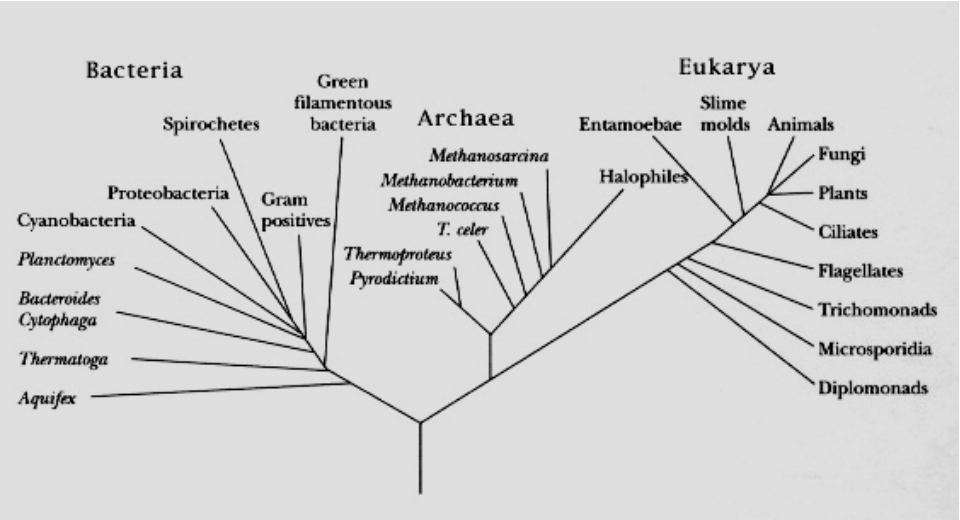
## II. Các loại tế bào vi sinh vật prokaryote và eukaryote

Các vi sinh vật không phải là một nhóm riêng biệt hoặc một đơn vị phân loại, mà thường bao gồm nhiều nhóm giới khác nhau rất đa dạng, từ các virus (xem chương 5), vi khuẩn cho đến các vi sinh vật eukaryote.

Dựa vào phân loại học phân tử, năm 1977 Carl Woese chia sinh vật nhân sơ thành 2 nhóm dựa trên trình tự 16S rRNA, gọi là nhóm hay vực (domain) v*i khuẩn thực* (Eubacteria) và *vi khuẩn cổ* (Archaebacteria). Ông lý luận rằng hai nhóm này, cùng với sinh vật nhân chuẩn, tiến hóa độc lập với nhau và vào năm 1990 nhấn mạnh thêm quan điểm này bằng cách đưa ra hệ thống phân loại 3 vực, bao gồm *vi khuẩn* (Bacteria), *vi khuẩn cổ*

(Archaea) và *sinh vật nhân chuẩn* (Eukarya). Quan điểm này nói chung được chấp nhận rộng rãi giữa các nhà sinh học phân tử.

Trước tiên, ta hãy hình dung mối quan hệ về mặt phát sinh chủng loại của các prokaryote (gồm bacteria và archaea) và các eukaryote ở Hình 1.2. Cần lưu ý rằng, về mặt tiến hóa, vi khuẩn được coi là các vi sinh vật khá cổ, xuất hiện cách đây chừng 3,7 triệu năm. Hai bào quan ty thể (mitochondrion) và lục lạp (chloroplast) có mặt trong các tế bào eukaryote được xem là bắt nguồn từ vi khuẩn bằng con đường nội cộng sinh (endosymbiotic).




**Hình 1.2** Cây phát sinh chủng loại của sự sống dựa trên so sánh trình tự RNA ribosome sợi đơn (ssrRNA). Từ gốc cây sự sống cho thấy các prokaryote phân thành nhóm (Domains) là Archaea và Bacteria. Ở mức độ phân loại, các sinh vật ở phần đỉnh của các nhánh Archaea đại diện cho các Bộ (Order); phần đỉnh của các nhánh Bacteria là các ngành (Phyla). Các nhóm vi khuẩn đa dạng và quan trọng nhất, được nghiên cứu kỹ nhất là Cyanobacteria, Proteobacteria và các vi khuẩn Gram dương. (*Nguồn*: Kenneth Todar, 2004).

*1. Tế bào và các đặc tính cơ bản của nó*

*Tế bào* (từ tiếng Latin *cella*, nghĩa là khoang nhỏ; thuật ngữ này do Robert Hooke đưa ra) là đơn vị cấu trúc và chức năng của đa số sinh vật (trừ những dạng sống tiền tế bào chẳng hạn như virus). Những sinh vật đơn bào như vi khuẩn, cơ thể chỉ gồm một tế bào. Các sinh vật đa bào cấu tạo từ nhiều tế bào.

Học thuyết tế bào được xây dựng từ thế kỷ 19 và theo quan niệm hiện nay có thể tóm tắt nội dung của nó như sau:

1. Mọi sinh vật được cấu tạo từ một hoặc nhiều tế bào.

2. Các tế bào chỉ được sinh ra từ những tế bào trước đó.

3. Mọi chức năng sống của sinh vật được diễn ra trong tế bào.

4. Các tế bào chứa các thông tin di truyền cần thiết để điều khiển các chức năng của mình, và

5. Có thể truyền vật liệu di truyền này cho các thế hệ tế bào tiếp theo.

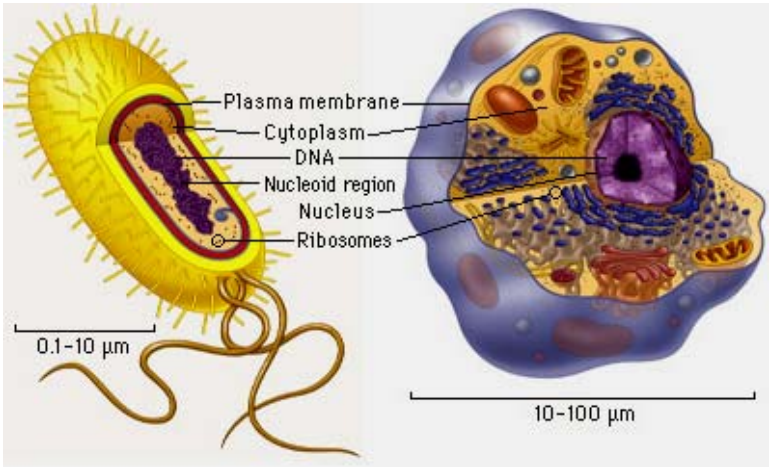
Mỗi tế bào là một hệ thống mở, tự duy trì và tự sản xuất. Mọi tế bào đều có một số khả năng như: (i) Sinh sản thông qua phân bào; (ii) Trao đổi chất và năng lượng; (iii) Tổng hợp các protein; (iv) Đáp ứng với các kích thích, hoặc thay đổi của môi trường bên trong và bên ngoài như các thay đổi về nhiệt độ, pH hoặc nguồn dinh dưỡng; (v) Di chuyển các túi tiết.

*2. Các dạng tế bào*

Người ta có thể phân loại tế bào dựa vào khả năng có thể tồn tại độc lập hay là không. Các sinh vật có thể bao gồm chỉ một tế bào (gọi là sinh vật đơn bào) thường có khả năng sống độc lập mặc dù có thể hình thành các khuẩn lạc. Ngoài ra, sinh vật cũng có thể bao gồm nhiều tế bào (sinh vật đa bào), trong đó mỗi tế bào được biệt hóa và thường không thể sống sót khi bị tách rời. Nếu xét về cấu trúc nội bào, các tế bào có thể chỉ làm 2 dạng chính (Hình 1.3) sau đây:

- ***Tế bào prokaryote*** thường có cấu trúc đơn giản, chỉ thấy ở sinh vật đơn bào hoặc tập đoàn đơn bào. Trong hệ thống phân loại 3 giới, các sinh vật prokaryote là thuộc giới Archaea và Eubacteria.

- ***Tế bào eukaryote*** thường chứa các bào quan có màng riêng. Sinh vật đơn bào eukaryote cũng rất đa dạng nhưng chủ yếu là sinh vật đa bào. Tế bào eukaryote bào gồm các sinh vật là động vật, thực vật và nấm.




**Hình 1.3** Các tế bào prokaryote (vi khuẩn) và eukaryote (động vật).

2.1. Các tế bào prokaryote

Prokaryote là nhóm tế bào không có màng nhân. Đây là đặc điểm chính để phân biệt với các tế bào eukaryote. Prokaryote cũng không có các bào quan và cấu trúc nội bào điển hình của tế bào eukaryote. Hầu hết các chức năng của các bào quan như ty thể, lục lạp, bộ máy Golgi được tiến hành trên màng sinh chất. Tế bào prokaryote có 3 vùng cấu trúc chính là:

(i) tiên mao (*flagella*), tiêm mao, hay lông nhung (*pili*) - các protein bàm trên bề mặt tế bào;

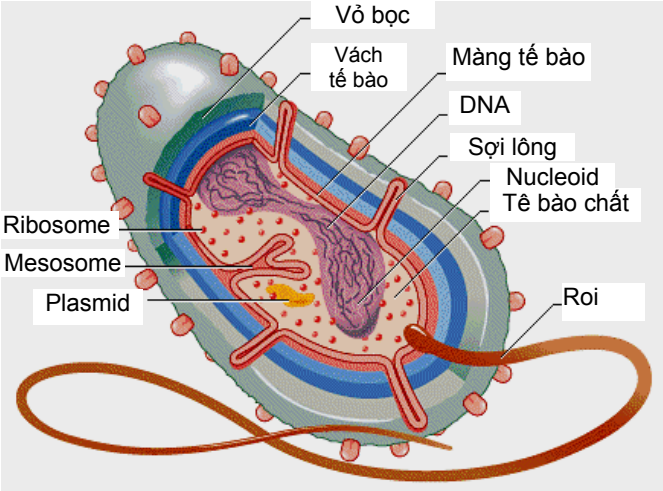
(ii) vỏ tế bào bao gồm capsule, thành tế bào và màng sinh chất;

(iii) vùng tế bào chất có chứa DNA genome, các ribosome và các thể vẩn (*inclusion body*).

Các đặc trưng của tế bào prokaryote :

- Tế bào chất là phần dịch lỏng chiếm hầu hết thể tích tế bào, khuếch tán vật chất và chứa các hạt ribosome nằm tự do trong tế bào.
- Màng sinh chất là lớp phospholipid kép phân tách phần tế bào chất với môi trường xung quanh. Màng sinh học này có tính bán thấm, hay còn gọi là thấm có chọn lọc.
- Hầu hết các tế bào prokaryote đều có thành tế bào (trừ Mycoplasma, Thermoplasma (archae) và Planctomycetales. Chúng được cấu tạo từ peptidoglycan và hoạt động như một rào cản phụ để chọn lọc những chất vào ra tế bào. Thành tế bào cũng giúp vi khuẩn giữ nguyên hình dạng và không bị tác động của áp suất thẩm thấu trong môi trường nhược trương.
- Nhiễm sắc thể của tế bào prokaryote thường là một phân tử DNA dạng vòng (trừ vi khuẩn *Borrelia burgdorferi* và một số khác; xem chương 2). Mặc dù không phải có cấu trúc nhân hoàn chỉnh, DNA được cô đặc trong vùng nhân. Tế bào prokaryote còn chứa những cấu trúc DNA ngoài nhiễm sắc thể gọi là *plasmid*, nó cũng có dạng vòng nhưng nhỏ hơn DNA nhiễm sắc thể. Trên các plasmid thường chứa các gene có chức năng bổ sung, ví dụ kháng kháng sinh.
- Tế bào prokaryote mang các tiên mao giúp tế bào di chuyển chủ động trong môi trường.

Cấu trúc tế bào của vi khuẩn được mô tả ở Hình 1.4.



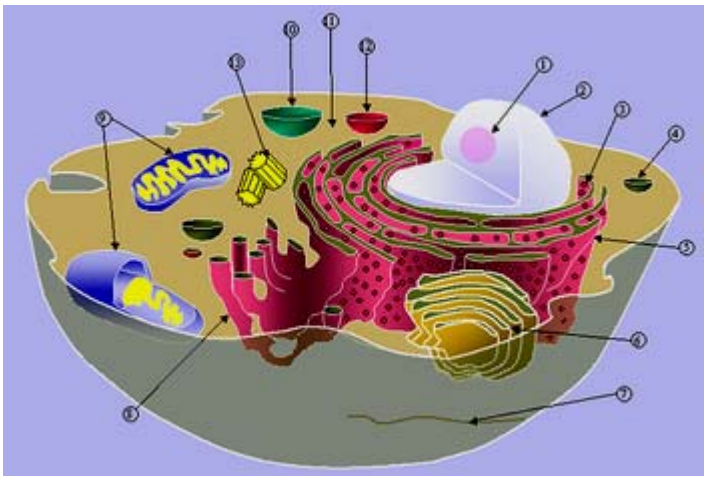

**Hình 1.4** Các thành phần cấu trúc của tế bào *E. coli*.

2.2. Các tế bào eukaryote (Hình 1.5)

Tế bào eukaryote (tiếng Latin có nghĩa là có nhân thật sự) thường lớn gấp 10 lần về kích thước so với tế bào prokaryote do đó gấp khoảng 1.000 lần về thể tích. Điểm khác biệt quan trọng giữa prokyryote và eukaryote là tế bào eukaryote có các xoang tế bào được chia nhỏ do các lớp màng tế bào để thực hiện các hoạt động trao đổi chất riêng biệt. Trong đó, điều tiến bộ nhất là việc hình thành nhân tế bào có hệ thống màng riêng để bảo vệ các phân tử DNA của tế bào. Tế bào eukaryote thường có những cấu trúc chuyên biệt để tiến hành các chức năng nhất định, gọi là các bào quan.

Các đặc trưng của tế bào eukaryote:

- Tế bào chất thường không nhìn thấy những thể hạt như ở prokaryote vì rằng phần lớn ribosome của chúng được bám trên mạng lưới nội chất.
- Màng tế bào cũng có cấu trúc tương tự như ở prokaryote tuy nhiên thành phần cấu tạo chi tiết lại khác nhau một vài điểm nhỏ. Chỉ một số tế bào eukaryote có thành tế bào.
- Vật chất di truyền trong tế bào eukaryote thường gồm một số phân tử DNA mạch kép thẳng, được cô đặc chủ yếu bởi các protein histone tạo nên cấu trúc nhiễm sắc thể. Mọi phân tử DNA được lưu giữ trong nhân tế bào với một lớp màng nhân bao bọc. Một số bào quan (ty thể và lạp thể) của eukaryote có chứa DNA mạch kép vòng riêng.
- Một số tế bào eukaryote có thể di chuyển nhờ tiêm mao hoặc tiên mao. Những tiên mao thường có cấu trúc phức tạp hơn so với prokaryote.



**Hình 1.5 Mô hình một tế bào động vật điển hình.** Các bào quan: (1)-hạch nhân; (2)- nhân; (3)- ribosome; (4)- túi tiết; (5)- lưới nội chất hạt, (6)- bộ máy Golgi, (7)- khung xương tế bào, (8)- lưới nội chất trơn, (9)- ty thể, (10)- không bào, (11)- tế bào chất, (12)- lysosome, (13)- trung thể.

*3. So sánh các tế bào eukaryote, eubacteria và archaea*

Các đặc điểm phân biệt các tế bào eukaryote, eubacteria và archaea được tóm tắt ở Bảng 1.1.

***Bảng 1.1*** *So sánh các tế bào prokaryote và eukaryote*

| | | Prokaryote | |
|---|---|---|---|
| **Đặc điểm** | **Eukaryote** | **Eubacteria** | **Archaeobacteria** |
| *** Vùng nhân** | | | |
| Màng nhân | Có | Không | Không |
| Hạch nhân | Có | Không | Không |
| Vùng nhân | Không | Có | Có |
| Số lượng nhiễm sắc thể | ≥ 2 | 1 | 1 |
| Các NST chứa histone | Có | Không | Không |
| Phân chia tế bào | Nguyên phân | Thg cắt đôi | Phân cắt đôi |
| *** Tế bào chất** | | | |
| Dòng tế bào chất | Có | Không | Không |
| Các ty thể | Có | Không | Không |
| Các lạp thể | Có ở thực vật | Không | Không |
| Các túi màng | Có | Không | Không |
| Phức hợp Golgi | Có | Không | Không |
| Lưới nội chất | Có | Không | Không |
| Kích thước ribosome | 80 S | 70 S | 70 S |
| *** Các lớp bề mặt** | | | |
| Màng sinh chất | Có | Có | Có |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Các liên kết lipid màng | Ester | Ester | Ether |
| Các sterol ở màng | Có | Hiếm khi | Không |
| Peptidoglycan ở vách tế bào | Không | Có | Không |
| Các sợi lông, nếu có | Các sợi thoi | Các lông tơ | ??? |
| Vị trí vận chuyển điện tử | Màng bào quan | Màng tế bào | Màng tế bào |
| *** Đường kính** | | | |
| Tế bào điển hình | 2-25 μm | 0,3-2 μm | 0,5-2 μm |

(*Nguồn*: dẫn theo Watson et al 1987; McKane và Kandel 1996)

## III. Đặc điểm của vi sinh vật

*1. Vài nét đại cương về đặc điểm của các vi sinh vật*

- Kích thước bé nhỏ:

Các vi sinh vật có kích thước rất bé, đo bằng đơn vị micromet (1μm = $10^{-6}$m) như các vi nấm, vi khuẩn hoặc nanomet (1nm = $10^{-9}$nm) như các virus. Ví dụ: Các tế bào nấm men có đường kính 5 -10 μm. Các vi khuẩn có đường kính × chiều dài cơ thể thay đổi trong khoảng (0,2 - 2,0) × (2,0 - 8,0) μm; hay như *E. coli* chẳng hạn rất bé: 0,5 × 2,0 μm v.v.

- Hấp thụ nhiều, chuyển hoá nhanh:

Các vi sinh vật tuy nhỏ bé nhất trong sinh giới, nhưng năng lực hấp thu và chuyển hoá của chúng có thể vượt xa các sinh vật bậc cao. Chẳng hạn, vi khuẩn lactic (*Lactobacillus*) trong 1 giờ có thể phân giải một lượng đường lactose nặng hơn 1.000-10.000 lần khối lượng cơ thể chúng...

- Khả năng sinh sản nhanh:

So với các sinh vật khác thì các vi sinh vật có tốc độ sinh trưởng và sinh sôi nảy nở cực kỳ nhanh. Chẳng hạn, ở *E. coli*, trong điều kiện thích hợp, thời gian một thế hệ kéo dài khoảng 20 phút. Nếu không bị các điều kiện tự nhiên khống chế, chỉ sau một ngày đêm từ một tế bào ban đầu sẽ sinh sản được $2^{72}$ tế bào, nặng 4.722 tấn!

- Khả năng thích ứng rất cao và phát sinh biến dị mạnh:

Nói chung, các vi sinh vật vốn có các cơ chế điều hoà chuyển hoá để thích ứng được với các điều kiện sống bất lợi. Trong một tế bào vi sinh vật, số lượng các enzyme thích ứng chiếm tới 10% hàm lượng protein. Nếu có một thay đổi chất dinh dưỡng thì chỉ sau 1/1.000 giây, chúng đã có thể thay đổi để thích ứng rồi. Một số vi khuẩn có thể tiến hành quang hợp dưới tác dụng của ánh sáng, sống không cần oxy; nhưng nếu chuyển vào trong tối lập tức chúng có thể sử dụng oxy để sống. Một số vi sinh vật khi gặp các điều kiện khắc nghiệt thì chuyển sang trạng thái bào tử, ngừng

hoạt động. Một số có thể sinh trưởng ngay cả ở nhiệt độ rất cao 250$^{o}$C, hoặc sống ở đáy sâu đại dương với áp suất khoảng 1.100 atm, v.v.

Liên quan tới khả năng thích ứng cũng như sự phong phú về chủng loại, các vi sinh vật còn có đặc tính quan trọng nữa đó là dễ phát sinh biến dị, với tần số trung bình $10^{-5}$-$10^{-10}$. Nguyên do bởi vì cơ thể chúng thường là đơn bào với bộ gene đơn bội, sinh sản nhanh, số lượng nhiều, tiếp xúc trực tiếp với môi trường sống. Hình thức biến dị thường gặp là các đột biến gene và kéo theo các biến đổi về hình thái, cấu tạo, kiểu trao đổi chất, sản phẩm trao đổi chất, tính kháng nguyên, tính đề kháng ...

- Phân bố rộng, chủng loại nhiều:

Các vi sinh vật phân bố khắp mọi nơi và phát triển nhanh chóng ở những nơi có đủ thức ăn, độ ẩm, và nhiệt độ tối ưu cho sự phân chia và lớn lên của chúng. Chúng có thể được mang đi bởi gió từ nơi này sang nơi khác. Cơ thể người là nơi cư trú của hằng tỷ vi sinh vật; chúng ở trên da, đường ruột, trong mũi, miệng và những chỗ hở khác của cơ thể. Chúng có trong không khí, nước uống và thức ăn.

Về chủng loại, ước tính có trên 100 nghìn loài, trong đó nấm chiếm khoảng 69 nghìn loài, vi tảo - 23 nghìn, vi khuẩn lam - 2,5 nghìn, vi khuẩn - 1,5 nghìn, virus và ricketsi - 1,2 nghìn...

*2. Đặc điểm của vi khuẩn*

2.1. Đặc điểm sinh sản

Vi khuẩn sinh sản bằng cách *chia đôi* (binary fission) hay *trực phân* (amitosis). Mặc dù không có hình thức sinh sản hữu tính (chỉ là *sinh sản cận hữu tính*, parasexual reproduction), các biến đổi di truyền vẫn xảy ra trong từng tế bào vi khuẩn thông qua các hoạt động tái tổ hợp di truyền. Có ba kiểu tái tổ hợp di truyền đã được phát hiện ở vi khuẩn:

+ *Biến nạp* (transformation): chuyển DNA trần từ một tế bào vi khuẩn sang tế bào khác thông qua môi trường lỏng bên ngoài, hiện tượng này gồm cả vi khuẩn chết.

+ *Tải nạp* (transduction): chuyển DNA vi khuẩn từ tế bào sang tế bào khác thông qua *thể thực khuẩn* (bacteriophage).

+ Giao nạp hay *tiếp hợp* (conjugation): chuyển DNA từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác thông qua ống tiếp hợp hay *lông giới tính* (pilus).

Sau khi nhận được DNA từ một trong những kiểu trao đổi thông tin di truyền nói trên, vi khuẩn sẽ tiến hành phân chia và truyền bộ gene tái tổ hợp cho thế hệ sau.

2.2. Các quá trình trao đổi chất

Có rất nhiều kiểu trao đổi chất khác nhau ở vi khuẩn. *Vi khuẩn dị dưỡng* (heterotroph) phải dựa vào nguồn carbon hữu cơ bên ngoài, trong khi các vi khuẩn *tự dưỡng* (autotroph) có khả năng tổng hợp chất hữu cơ từ $CO_2$ và nước. Các vi khuẩn tự dưỡng thu nhận năng lượng từ phản ứng oxy-hóa các hợp chất hóa học gọi là vi khuẩn *hóa dưỡng* (chemotroph), và những nhóm thu năng lượng từ ánh sáng thông qua quá trình quang hợp được gọi là vi khuẩn *quang dưỡng* (phototroph). Ngoài ra, các vi khuẩn còn được phân biệt nhờ vào nguồn chất khử mà chúng sử dụng. Những nhóm sử dụng hợp chất vô cơ (như nước, khí hiđrô, sulfua và ammoniac) làm chất khử được gọi là vi khuẩn vô cơ dưỡng (lithotroph) và những nhóm cần hợp chất hữu cơ (như đường, acid hữu cơ) gọi là *vi khuẩn hữu cơ dưỡng* (organotroph). Những kiểu trao đổi chất dựa vào nguồn năng lượng (quang dưỡng hay hóa dưỡng), nguồn chất khử (vô cơ dưỡng hay hữu cơ dưỡng) và nguồn carbon (tự dưỡng hay dị dưỡng) có thể được kết hợp khác nhau trong từng tế bào, và nhiều loài có thể thường xuyên chuyển từ kiểu trao đổi chất này sang kiểu trao đổi chất khác.

Những chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển bình thường gồm nitơ, lưu huỳnh, phospho, vitamin và các nguyên tố kim loại như natri, kali, canxi, ma-nhê, mangan, sắt, kẽm, côban, đồng, nikel... Một số loài cần thêm một số nguyên tố vết khác như tungsten, vanađi hay bo.

Vi khuẩn quang vô cơ tự dưỡng bao gồm *vi khuẩn lam* (cyanobacteria) là một trong những loài cổ nhất được biết đến từ hóa thạch và có lẽ đã đóng một vai trò quang trọng trong việc tạo ra nguồn oxy cho khí quyển. Chúng là những tiên phong trong việc sử dụng nước như là nguồn electron vô cơ (lithotrophic) và là sinh vật đầu tiên dùng bộ máy quang hợp để phân rã nước. Các vi khuẩn quang hợp khác dùng các nguồn electron khác nên không tạo ra oxy.

Dựa vào phản ứng với oxy, hầu hết các vi khuẩn có thể được xếp vào 3 nhóm: một số chỉ có thể mọc khi có oxy được gọi là vi khuẩn *hiếu khí* (aerobe); một số khác chỉ có thể mọc khi không có oxy được - vi khuẩn *kị khí* (anaerobe); và một số có thể mọc cả khi có hay không có oxy thì thuộc nhóm vi khuẩn *kị khí tùy ý* (facultative anaerobe). Các vi khuẩn không sử dụng oxy nhưng vẫn có thể mọc khi có ôxy - vi khuẩn *chịu oxy* (aerotolerant). Những vi khuẩn có thể mọc tốt trong môi trường khắc nghiệt đối với con người được gọi là *extremophile*. Một số vi khuẩn sống trong suối nước nóng - vi khuẩn *chịu nhiệt* (thermophile); một số khác sống trong hồ nước rất mặn - vi khuẩn *chịu mặn* (halophile); trong khi đó có loài lại sống trong môi trường acid hay kiềm - vi khuẩn *chịu axit* (acidophile) hay vi khuẩn *chịu kiềm* (alkaliphile) và còn một số sống dưới

lớp băng hà trong dãy núi Alpes - vi khuẩn *chịu hàn* (psychrophile).

2.3. Di động

Vi khuẩn di động nhờ vào *tiên mao* (flagellum), trượt (bacterial gliding) hay thay đổi sức nổi (buoyancy). Nhóm xoắn khuẩn (spirochaete) có các cấu trúc tương tự tiên mao gọi là *sợi trục* (axial filament). Chúng có một thể xoắn ốc đặc biệt quay tròn khi di chuyển.

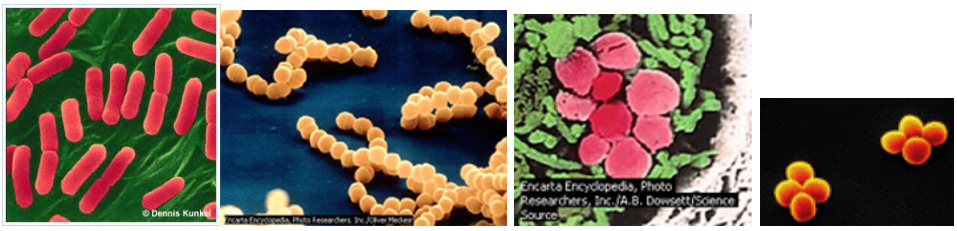
Tiên mao của vi khuẩn được sắp xếp theo nhiều cách. Vi khuẩn có thể có một tiên mao ở mỗi cực của tế bào, hay có thể có một nhóm nhiều tiên mao ở một đầu. Nhiều vi khuẩn (như *E. coli*) có hai kiểu di động khác nhau: di động tiến tới (bơi) và quay vòng.

Vi khuẩn di động khi bị thu hút hay đẩy ra bởi một số tác nhân kích thích, hoạt động này được gọi là *tính hướng động* (taxes), chẳng hạn như: *hóa hướng động* (chemotaxis), *quang hướng động* (phototaxis), *cơ hướng động* (mechanotaxis) và *từ hướng động* (magnetotaxis).

2.4. Các nhóm phân loại và đặc điểm nhận biết

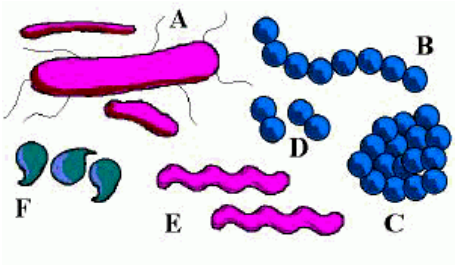
Vi khuẩn có nhiều hình dạng khác nhau (Hình 1.6 và 1.7). Đa số có hình que, hình cầu, hay hình xoắn; các vi khuẩn có hình dạng như vậy được gọi theo thứ tự là *trực khuẩn* (bacillus), *cầu khuẩn* (coccus), và *xoắn khuẩn* (spirillum). Một nhóm khác nữa là *phẩy khuẩn* (vibrio) có hình dấu phẩy. Hình dạng không còn được coi là một tiêu chuẩn định danh vi khuẩn, tuy nhiên có rất nhiều chi được đặt tên theo hình dạng (ví dụ như *Bacillus, Streptococcus, Staphylococcus*) và nó là một điểm quan trọng để nhận dạng các chi này.

Một công cụ quan trọng để nhận dạng khác là *nhuộm Gram* (mang tên của Hans Christian Gram, người phát triển kĩ thuật này). Nhuộm Gram giúp phân biệt các vi khuẩn thành 2 nhóm, dựa vào thành phần cấu tạo của vách tế bào.




(a) (b) (c) (d)

**Hình 1.6** (a) Các tế bào *E. coli* thắt đôi; (b) *Streptococcus*; (c) *Bacillus anthracis* trong một mao mạch phổi; (d) *Staphylococcus aureus*.




**Hình 1.7** Hình dạng khác nhau của các vi khuẩn.
A. Hình que - trực khuẩn (*Bacillus*)
B. Hình cầu (coccus) tạo thành chuỗi (strepto-) - liên cầu khuẩn (*Streptococcus*).
C. Hình cầu tạo đám (staphylo-) - tụ cầu khuẩn (*Staphylococcus*).
D. Hình tròn sóng đôi (diplo-) - song cầu khuẩn (*Diplococcus*).
E. Hình xoắn - xoắn khuẩn (*Spirillum, Spirochete*).
F. Hình dấu phẩy - phẩy khuẩn (*Vibrio*).

## IV. Các phương pháp nghiên cứu đặc thù của di truyền học vi sinh vật và một số phương pháp sinh học phân tử thông dụng

Đối với các vi sinh vật, phân tích di truyền học cũng là phương pháp duy nhất để nghiên cứu các đặc tính di truyền và biến dị của chúng. Do các vi sinh vật thường có bộ gene đơn bội, đặc biệt các vi khuẩn chỉ có một nhóm liên kết gene nên sơ đồ phân tích di truyền học ở chúng là đơn giản hơn các eukaryote bậc cao, gồm các giai đoạn sau: (i) Xác định các gene; (ii) Xác định trật tự của các locus trên nhiễm sắc thể; và (iii) Xác định cấu trúc tinh vi của gene.

Tổng quát, có các phương pháp cơ bản được áp dụng cho phân tích di truyền vi sinh vật như sau: phân tích đột biến, phân tích tái tổ hợp, phân tích sao chép, phân tích đoạn khuyết và phân tích bổ sung.

### *1. Phân tích đột biến*

Phân tích đột biến được áp dụng để xác định các gene và được tiến hành bằng cách đo đếm các kết quả cuối cùng của sự biểu hiện gene thành ra sự biến đổi kiểu hình (đặc điểm hình thái, hoá sinh, kháng nguyên hoặc tính mẫn cảm đối với các tác nhân hoá học, vật lý và sinh học khác nhau) của các tế bào vi khuẩn. Việc phát hiện một đột biến ngẫu nhiên hay gây tạo chỉ ra sự tồn tại của một gene cụ thể.

*Sự biến đổi hình thái* ở vi sinh vật bao gồm các biến đổi về kích thước, hình dạng và sự hình thành sắc tố của các khuẩn lạc do các tế bào bị đột biến tạo nên trên các môi trường dinh dưỡng đặc cũng như sự biến đổi của bản thân các phân tử của tế bào (ví dụ sự tăng kích thước hoặc mất lông tơ trên bề mặt màng tế bào). *Sự biến đổi hoá sinh* bao gồm các biến đổi liên

quan tới việc tế bào mất khả năng tổng hợp các amino acid và vitamin hoặc mất khả năng chuyển hoá các hợp chất hydrat carbon. *Các biến đổi về kháng nguyên* thể hiện ở chỗ vi khuẩn bị mất đi những kháng nguyên nhất định. *Các biến đổi trong tính bền vững của vi khuẩn* đối với các tác nhân khác nhau liên quan tới sự xuất hiện trong chúng các khả năng đề kháng đối với sự chiếu xạ, với các hoá chất khác nhau (kể các các loại thuốc kháng sinh) hoặc với phage v.v.

Do tần số đột biến ở vi khuẩn là rất thấp nên việc phân lập các tế bào bị đột biến chỉ có thể thực hiện được trong các thí nghiệm với các quần thể tế bào. Như thế, về nguyên tắc, trong trường hợp này có thể sử dụng bất kỳ phương pháp nào cho phép tách được các thể đột biến từ các quần thể. Việc xác định số lượng các đột biến dựa trên các phương pháp xác định tần số đột biến. Thông thường, để phân tích di truyền cần có các nòi đột biến mang các đột biến vị trí cho trước. Chẳng hạn, đối với *B. subtilis*, có thể xử lý sơ bộ DNA gây biến nạp bằng các tác nhân gây đột biến; ở *E. coli*, có thể gây các đột biến có vị trí xác định bằng cách đưa vào tế bào vi khuẩn các gene đột biến nhờ các phage tải nạp.

*2. Phân tích tái tổ hợp*

Phân tích tái tổ hợp là phương pháp đặc trưng được dùng để xác định vị trí và trật tự của các gene trên nhiễm sắc thể. Đối với vi khuẩn, việc phân tích di truyền dựa vào các quá trình trao đổi vật liệu di truyền như *biến nạp*, *tải nạp* và *tiếp hợp* hay còn gọi là *giao nạp* (chương 5 và 6). Ở các vi nấm, việc phân tích di truyền được tiến hành bằng phép phân tích bộ bốn và dựa trên chu trình cận hữu tính (chương 7).

Nói chung, sự trao đổi di truyền ở các vi khuẩn và quá trình hữu tính ở các cơ thể bậc cao là khá giống nhau. Việc truyền vật liệu di truyền từ vi khuẩn *thể cho* (donor) sang vi khuẩn *thể nhận* (recipient) có thể coi như như sự kết hợp nhân của các tế bào sinh dục (ở đây là sự tạo thành các thể lưỡng bội từng phần), còn sự sát nhập của vật liệu di truyền vào bộ gene của vi khuẩn thể nhận, và sự hình thành nhiễm sắc thể tái tổ hợp sau đó, có thể so sánh với các kết quả của giảm phân. Chính các hệ thống tái tổ hợp này là cơ sở cho phương pháp phân tích tái tổ hợp và lập bản đồ di truyền ở vi khuẩn. Ví dụ, trật tự của hầu hết các gene trên nhiễm sắc thể *E. coli* được xác định là nhờ sử dụng tiếp hợp và tải nạp; ở *B. subtilis* nhờ tải nạp và biến nạp; còn ở *Salmonella typhimurium* chủ yếu nhờ tải nạp. Ngoài ra, phép phân tích tái tổ hợp này còn được sử dụng để nghiên cứu cấu trúc tinh vi của gene.

*3. Phân tích sao chép*

Phương pháp này cho phép xác định trật tự các gene trên nhiễm sắc thể dựa trên sự tính toán các số liệu về sự bắt đầu sao chép (tái bản) của nhiễm sắc thể từ một điểm xác định. Do thời gian sao chép của một phần nhiễm sắc thể nhất định phụ thuộc vào khoảng cách từ phần đó đến khởi điểm sao chép nên thứ tự sao chép phản ảnh trình tự sắp xếp của các gene. Như vậy, bản đồ nhiễm sắc thể chỉ có thể được xây dựng dựa trên các dẫn liệu về trật tự sao chép của các phần riêng biệt của nhiễm sắc thể.

*4. Phân tích đoạn khuyết*

Phép phân tích đoạn khuyết được sử dụng để xác định vị trí của các gene trên nhiễm sắc thể cung như để nghiên cứu cấu trúc tinh vi của gene. Nó dựa trên việc tính toán các đoạn khuyết trên nhiễm sắc thể. Nhờ sự phân tích này người ta đã phát hiện được vị trí của hàng loạt gene ở *E. coli* và *S. typhimurium*, hiểu biết được cấu trúc tinh vi của các gene trên operon lactose ở *E. coli*. Phương pháp này cũng được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu cấu trúc tinh vi của gene ở phage.

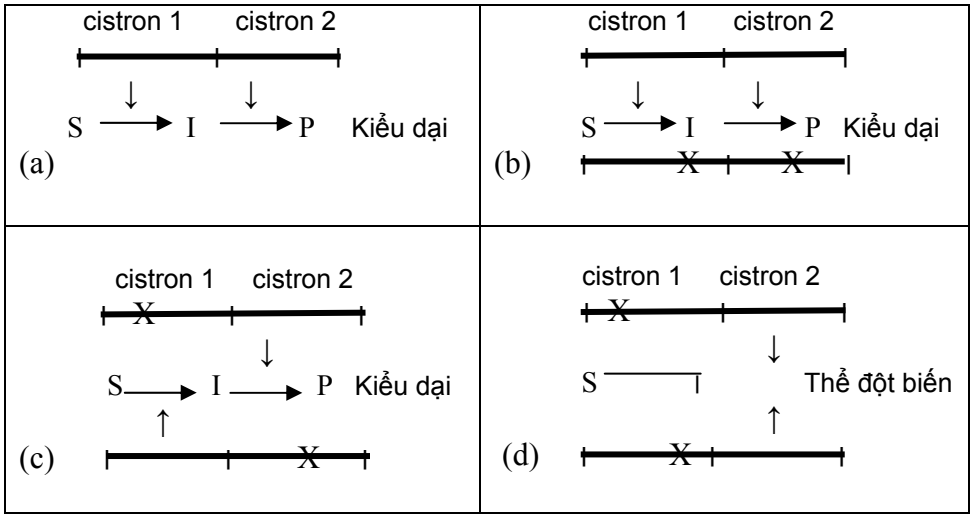
*5. Phân tích bổ sung*

Phương pháp này được sử dụng để phát hiện chức năng của các gene nhất định tham gia vào việc xác định một đặc tính nào đó của vi khuẩn, dựa trên hiện tượng bổ sung của các gene (nghĩa là sự tương tác giữa các sản phẩm gene). Phương pháp này do Lewis tìm ra năm 1951 trong khi nghiên cứu tính allele ở ruồi giấm. Dưới đây ta hãy xem xét phép thử *cis-trans* (đều-lệch) này qua công trình của Benzer.

Các công trình nghiên cứu của Seymour Benzer (từ 1957 đến 1961) về tái tổ hợp ở phage T4 đã cho thấy rằng, gene theo quan niệm của Morgan có thể chia nhỏ thành các đơn vị nhỏ hơn. Ông đã đưa ra các thuật ngữ *muton*, *recon* và *cistron* để định nghĩa các đơn vị không chia nhỏ tương ứng là đột biến, tái tổ hợp và chức năng. Bằng cách lai các thể đột biến của cùng một gene có nguồn gốc độc lập nhau trong khi cho lây nhiễm phage, đã làm xuất hiện phage kiểu dại. Điều này chỉ có thể xảy ra bởi sự *tái tổ hợp bên trong gene*, nếu như các phần nhỏ riêng biệt của gene đều bị đột biến. Điều này chứng tỏ rằng gene bị phân chia thành các đơn vị nhỏ hơn thông qua tái tổ hợp và dột biến. Tuy nhiên, vì kích thước của muton và recon được coi là tương đương với một cặp nucleotide, cho nên ngày nay tự thân hai đơn vị này không còn giá trị sử dụng nữa.

Thuật ngữ *cistron* của Benzer có nghĩa là đơn vị chức năng di truyền không chia nhỏ. Điều này có thể xác định bằng sự *phân tích bổ sung* (complementation analysis), trong đó gene mà cụ thể là sản phẩm của nó được trắc nghiệm về khả năng bù đắp cho một đột biến tại một gene tương

đồng trong cùng tế bào. Sự bổ sung liên tiếp làm phục hồi kiểu hình dại.




**Hình 1.8** Sơ đồ minh họa trắc nghiệm cis-trans: (a) con đường chuyển hóa bình thường; (b) trắc nghiệm cis; (c) và (d) trắc nghiệm trans. Chú thích: S-cơ chất (subtrate); I- sản phẩm trung gian (intermediate); P- sản phẩm cuối cùng (product), ở đây là sắc tố đặc trưng cho kiểu hình dại; các mũi tên (↓) chỉ các enzyme sản phẩm sinh ra từ các cistron 1 và cistron 2.

Cơ sở của phân tích bổ sung là trắc nghiệm *cis-trans* (*cis-trans test*), mà từ đây nảy sinh ra thuật ngữ *cistron*, trong đó các cặp đột biến bắt nguồn độc lập được xét ở các cấu hình *cis* (đều) và *trans* (lệch). Trắc nghiệm cis được dùng làm đối chứng, vì nếu như cả hai đột biến đều có mặt trong một bộ gene thì bộ gene kia phải là kiểu dại ở cả hai locus và sinh ra các sản phẩm gene bình thường, do đó cho ra kiểu hình dại (hình 1.8b). Trắc nghiệm *trans* là phép thử bổ sung và xác định gới hạn của đơn vị chức năng. Nếu như các đột biến nằm trong các gene khác nhau, khi chúng có mặt ở cấu hình *trans*, mỗi một bộ gene có thể bổ sung sản phẩm mà gene kia không tạo ra được. Khi có đủ tất cả các sản phẩm gene cần thiết thì tế bào là kiểu dại (hình 1.8c), nghĩa là có sự *bổ sung dương tính* (positive complementation). Nếu như cả hai đột biến thuộc cùng một gene, khi chúng có mặt ở cấu hình *trans*, thì mỗi một bộ gene có thể mang một bản sao đột biến của gene đó và không có sản phẩm hoạt động chức năng được tạo ra trong tế bào, nghĩa là không có sự bổ sung (hình 1.8d).

Từ các kết quả nghiên cứu của Benzer cho thấy: *Cistron* (hay gene cấu trúc) là một đoạn xác định của DNA mang thông tin cấu trúc của một polypeptide cụ thể mà giới hạn của nó được xác định bằng trắc nghiệm *cis-trans*. Theo đó, kích thước trung bình của một cistron ~1.200 cặp base.

*6. Năng suất phân giải và một số thuật ngữ của di truyền học vi sinh vật*

*Năng suất phân giải* của di tuyền học được xác định bởi khoảng cách giữa các cấu trúc di truyền (gene) cần phân tích trên nhiễm sắc thể. Đại lượng này phụ thuộc vào số lượng cá thể đời con nghiên cứu thu được từ một phép lai cụ thể; số con cháu thu được càng lớn thì khả năng phát hiện các thể tái tổ hợp hiếm càng lớn, tức năng suất phân giải của phân tích di truyền học càng cao. Theo luật số lớn này, các vi khuẩn tỏ ra rất thuận lợi trong phân tích di truyền học, vì trong một thời gian ngắn có thể thu được một số lượng cực kỳ lớn con cháu từ một tế bào vi khuẩn, cũng như có thể sử dụng các môi trường nuôi cấy khác nhau để chọn lọc các thể tái tổ hợp.

Các thuật ngữ và ký hiệu thông dụng của di truyền học vi khuẩn dựa trên đề nghị của Demerec và cộng sự đưa ra năm 1966, với ít nhiều chỉnh lý bổ sung cho đến nay (xem chương 6).

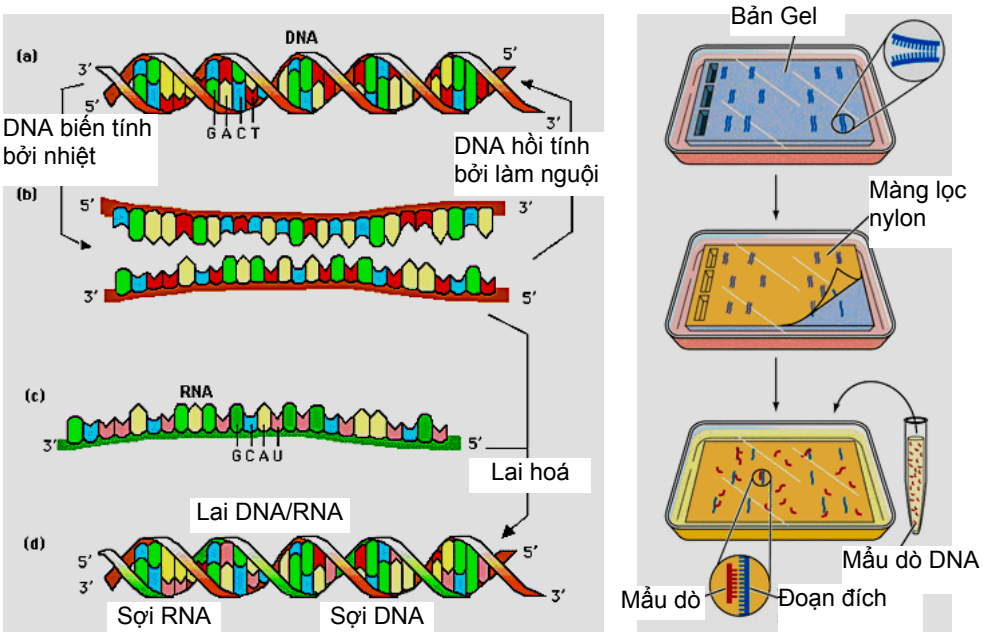
*7. Sơ lược về một số phương pháp thông dụng của sinh học phân tử*

Sự tiến bộ nhanh chóng gần đây của sinh học nói chung và *công nghệ sinh học* (biotechnology) nói riêng là nhờ sự phát triển mạnh mẽ của các phương pháp và kỹ thuật mới như: Kính hiển vi điện tử; tách chiết và phân tích định tính và định lượng thô nucleic acid; xác định trình tự nucleic acid, lai phân tử nucleic acid, đánh dấu đồng vị phóng xạ và sử dụng các mẩu dò; khuyếch đại gene hay phương pháp trùng hợp chuỗi nhờ polymerase (Polymerase Chain Reaction = PCR); xây dựng các phân tử DNA tái tổ hợp vàtạo dòng DNA tái tổ hợp; thu nhận gene bằng cách thành lập các thư viện gene, tổng hợp gene bằng con đường hoá học và ngân hàng cDNA; gây biến đổi vật liệu di truyền.

Trong khuôn khổ của chương này chúng tôi chỉ giới thiệu ba phương pháp chính: lai phân tử, xác định trình tự nucleic acid và PCR (có sử dụng một số kỹ thuật liên quan như mẩu dò và đánh dấu).

7.1. Lai phân tử (molecular hybridization)

Người ta lợi dụng sự biến tính và hồi tính của DNA để tạo ra các phân tử DNA lai bằng cách làm lạnh từ từ hỗn hợp các DNA biến tính từ hai loài khác nhau (hình 1.9). *Kỹ thuật lai phân tử* (molecular hybridization) này đã được ứng dụng rộng rãi để xác định mức độ tương đồng DNA của các nhóm phân loại khác nhau. Chẳng hạn, các thực nghiệm cho thấy có khoảng 25% tổng số DNA người và chuột có thể lai với nhau. Kỹ thuật này còn được ứng dụng rộng rãi để định vị gene bằng cách sử dụng các *vật dò có đánh dấu đồng vị phóng xạ* (radioactive probe) hoặc *lai huỳnh quang tại chỗ* (fluorescense *in situ* hybridization = FISH) v.v.

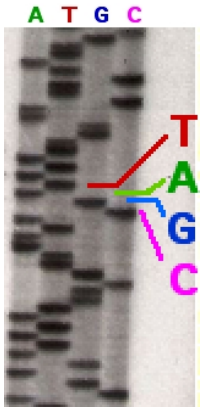



**Hình 1.9** Biến tính và hồi tính của DNA và ứng dụng trong lai phân tử nucleic acid (trái), và trong kỹ thuật sử dụng mẫu dò DNA để tìm đoạn đích.

## 7.2. Xác định trình tự (nucleic acid)

Trong di truyền học và hoá sinh, *xác định trình tự* (sequencing) có nghĩa là xác định cấu trúc chính (hay trình tự chính) của một *polymer* sinh học chưa được phân loại. Xác định trình tự cho kết quả là sự mô tả tuyến tính một cách hình ảnh hay còn gọi là "chuỗi".

Trong thuật ngữ di truyền học, xác định trình tự DNA là quá trình xác định trật tự nucleotide của một đoạn DNA. Hiện nay, hầu hết mọi xác định trình tự DNA đều được tiếnhành bằng cách sử dụng phương pháp phân tích trình tự được phát triển bởi Frederick Sanger. Kĩ thuật này dùng phân tích trình tự đặc thù (*sequence-specific termination*) của một phản ứng tổng hợp DNA trong ống nghiệm (*in vitro*) dùng chất nền nucleotide đã được chỉnh sửa.




**Hình 1.10** Một phần của bản gel phân tích trình tự có đánh dấu phóng xạ.

*Tại sao phải xác định trình tự DNA?*

Trình tự của DNA mã hóa các thông tin cần thiết để cho các cơ thể

sống có thể tồn tại và tái sản sinh. Việc xác định trình tự vì thế rất hữu ích với các nghiên cứu 'thuần túy' để lí giải tại sao và bằng cách nào mà các cơ thể tồn tại, cũng như các chủ đề mang tính ứng dụng. Vì bản chất quan trọng của DNA đối với các sinh vật sống, hiểu biết về trình tự DNA có thể trở nên hữu ích với các nghiên cứu sinh học và ứng dụng. Ví dụ, trong y khoa nó có thể được dùng để xác định, chẩn đoán và phát triển các phương pháp điều trị cho các bệnh về di truyền học. Tương tự, các nghiên cứu vào pathogens có thể giúp điều trị các bệnh lây nhiễm (*contagious diseases*). Công nghệ sinh học (*biotechnology*) là một ngành đang phát triển, với tiềm năng áp dụng cho các sản phẩm và dịch vụ hữu ích.

## 7.3. Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)

Vì mỗi kiểu sinh vật có chứa DNA đặc trưng riêng, nên có thể dùng DNA để xác định giống như một "dấu vân tay". Các thử nghiệm di truyền như thế sử dụng các đoạn đánh dấu của DNA duy nhất từ các vi sinh vật đã biết để dò tìm nhiễm sắc thể của sinh vật chưa biết. *Mẩu dò* (probe) này sẽ chỉ tổ hợp với DNA của sinh vật chưa biết nếu như nhiễm sắc thể của nó có chứa một đoạn tương đồng. Dấu (label) chỉ thị này có thể được phát hiện sau đó. Tuy nhiên, nếu mẩu dò DNA này là đặc trưng cho một sinh vật khác thì nó sẽ không phản ứng, và sẽ không phát hiện được dấu. Các mẩu dò DNA có tính đặc thù và phản ứng dương tính là bằng chứng về tính đồng nhất của vi sinh vật. Những tiến bộ của công nghệ sinh học ngày nay có thể cho một DNA của vi sinh vật "sinh trưởng" thậm chí ngay cả khi sinh vật đó khó nuôi cấy. Nhờ đó có đủ các mẩu DNA cho việc xác định hầu như bất kỳ vi sinh vật nào có thể thu được từ một mẩu tiêu bản thậm chí không phải qua nuôi cấy sinh vật đó. Đó chính là nhờ sự phát minh ra phương pháp *khuyếch đại gene* hay *PCR* (Gene amplification - Polymerase Chain Reaction; Hình 1. 11) bởi Kary Mullis năm 1985.

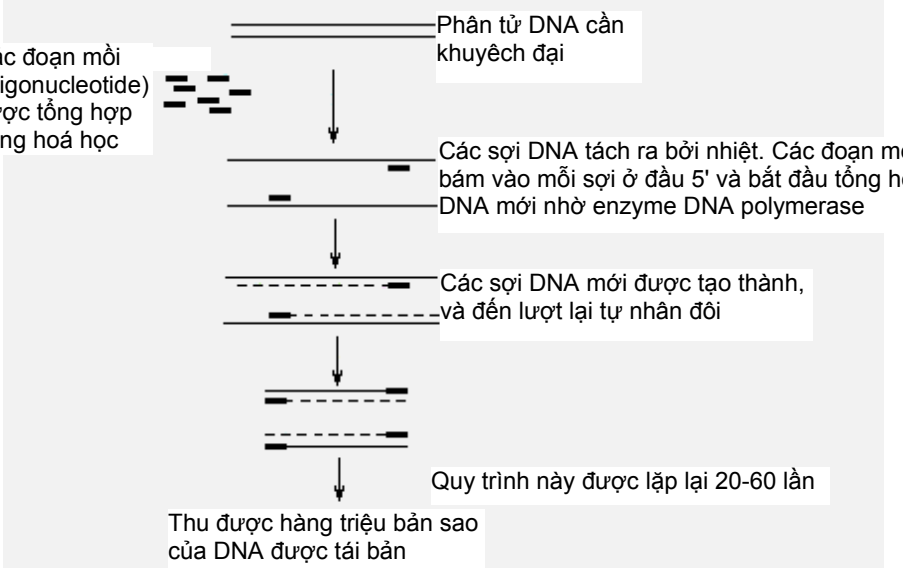
### 7.3.1. PCR là gì?

PCR là chữ viết tắt của cụm từ Polymerase Chain Reaction (tạm dịch là *phản ứng chuỗi trùng hợp nhờ polymerase*. PCR là một kỹ thuật phổ biến trong sinh học phân tử nhằm khuyếch đại (tạo ra nhiều bản sao) một đoạn DNA mà không cần sử dụng các sinh vật sống như *E. coli* hay nấm men. PCR được sử dụng trong các nghiên cứu sinh học và y học phục vụ nhiều mục đích khác nhau như: phát hiện các bệnh di truyền, nhận dạng vân tay DNA, chẩn đoán bệnh, tách dòng gene, xác định huyết thống v.v.

### 7.3.2. Nguyên tắc và quy trình

PCR là một kỹ thuật cho phép khuyếch đại nhanh một mẩu DNA cụ thể trong ống nghiệm (hơn là trong các tế bào sống như là *E. coli*). Với

quy trình này người ta có thể tạo ra vô số bản sao của một phân tử DNA đơn. Quy trình "tạo dòng *in vitro*" này được tóm tắt như sau:




**Hình 1.11** Sơ đồ minh họa quy trình kỹ thuật PCR.

- Để thực hiện một PCR, cần phải biết ít nhất một đoạn trình tự của phân tử DNA quan tâm (ví dụ một mẩu máu).

- Sau đó phải tổng hợp các *đoạn mồi* (primer), tức các oligonucleotide ngắn (chứa khoảng hai chục nucleotide) mà nó bổ sung chính xác với trình tự ở đầu 3' của mỗi một sợi của DNA cần khuyếch đại.

- Mẩu DNA được đun nóng để tách các sợi đơn (biến tính) và trộn lẫn với các đoạn mồi.

- Nếu như các đoạn mồi tìm thấy các trình tự bổ sung trong DNA, chúng sẽ kết hợp vào các sợi đó.

- Sự tổng hợp bắt đầu (bao giờ cũng theo chiều 5' → 3') bằng cách sử dụng sợi gốc làm khuôn.

- Hỗn hợp phản ứng phải chứa tất cả bốn loại deoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP và dTTP) và một DNA polymerase (loại chịu nhiệt, ví dụ *Taq polymerase* được chiết xuất từ vi khuẩn *Thermus aquaticus* sống ở suối nước nóng).

- Sự trùng hợp cứ tiếp diễn chừng nào mỗi sợi đơn được tổng hợp mới còn chứa đủ vị trí được nhận biết bởi đoạn mồi khác.

- Lúc này ta có hai phân tử DNA giống hệt phân tử ban đầu.

- Bây giờ ta lấy hai phân tử này cho biến tính và lặp lại quá trình đó.

- Sau mỗi chu kỳ số phân tử DNA lại tăng gấp đôi.

Nhờ sử dụng các thiết bị tự động, mỗi chu kỳ tái bản có thể hoàn thành chưa đầy 5 phút. Sau 30 chu kỳ, từ một phân tử DNA ban đầu được khuyếch đại lên hơn một tỷ bản sao ($2^{30}$ = 1,02 x $10^9$). Như vậy, về nguyên tắc, với phương pháp PCR ta có thể khuyếch đại đủ số DNA từ một chân tóc hay một giọt máu để xác định trình tự DNA.

7.3.3. Sự phát triển và mở rộng các ứng dụng gần đây của PCR

Từ khi ra đời đến nay, phương pháp PCR đóng vai trò cách mạng hoá trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu và ứng dụng khác nhau như: chẩn đoán nhanh, giải trình tự DNA bộ gene, gây đột biến điểm định hướng, v.v. Có thể thực hiện PCR *in situ* (ngay trong tế bào) với cả DNA và RNA.

Do phương pháp PCR đơn giản, dễ thực hiện và có nhiều ứng dụng rộng rãi nên nó được hoàn thiện không ngừng. Thật vậy, tuy chỉ trong một thời gian ngắn kể từ lúc ra đời, nhiều biến dạng của PCR mới lần lượt ra đời. Chẳng hạn:

(i) *RT- PCR* (reverse transcriptase PCR): kỹ thuật mà RNA có thể được sử dụng làm khuôn cho sự khuyếch đại PCR sau khi chuyển đổi thành cDNA, còn gọi là RNA-PCR hat RT-PCR. Kỹ thuật này tỏ ra nhạy hơn các phương pháp khác được dùng cho sự phân tích RNA.

(ii) *RT-PCR cạnh tranh* (competitive RT-PCR): kỹ thuật thường được sử dụng trong việc định lượng các loại RNA chuyên biệt.

(iii) *Real-Time PCR* là một kỹ thuật PCR định lượng, nó có thể giúp phát hiện các sản phẩm PCR tích luỹ được tại thời điểm thực tế trong quá trình khuyếch đại gene. Nhờ vậy có thể đánh giá sự tích luỹ sản phẩm và định lượng qPCR (quantitative PCR).

(iv) PCR-ELISA: sự kết hợp PCR với thử nghiệm miễn dịch liên kết enzyme (ELISA = enzyme linked immunoassay) trong chẩn đoán.

Hình 1.12 dưới đây cho thấy một máy phân tích DNA ký hiệu ***iCycler Thermal Cycler***, với các tiện ích sau:

- Cho độ chính xác cao đối với PCR định lượng thời gian thực (real-time quantitative PCR).
- Có khả năng quay vòng chu kỳ nhiệt nhanh chóng, đun nóng ở tốc độ lên tới 3,3 °C mỗi giây và làm nguội ở tốc độ lên đến 2,0 °C mỗi giây.
- Đảm bảo độ chính xác cao và nhiệt độ ổn định đồng bộ ...

(a) (b)

**Hình 1.12** (a) Máy PCR và (b) máy phân tích DNA (DNA analyzer)

*Nguồn*: (a) http://vi.wikipedia.org/; (b) http://www.bio-rad.com/

**** Lịch sử của phương pháp PCR***

Phương pháp căn bản chạy PCR được Kary Mullis phát minh, ông đã đoạt giải Nobel về Hóa học vào tháng 10 năm 1993 cho thành tựu này, chỉ sau 7 năm khi ông đưa ra ý tưởng. Ý kiến của Mullis là phát triển một quy trình mà DNA có thể nhân lên nhiều lần một cách nhân tạo qua nhiều chu kỳ sao chép bởi enzyme DNA polymerase.

DNA polymerase có tự nhiên trong sinh vật sống, nơi mà nó thực hiện chức năng nhân DNA khi tế bào phân chia. Nó làm việc bằng cách nối với sợi DNA và tạo sợi bổ sung. Theo quy trình PCR gốc của Mullis, enzyme được dùng trong phản ứng *in vitro* (điều khiển môi trường bên ngoài cơ thể sinh vật). Sợi DNA đôi bị tách thành 2 sợi đơn khi đun nóng ở 96°C. Tuy nhiên, ở nhiệt độ này DNA polymerase bị phá hủy vì vậy cần bổ sung enzyme sau mỗi giai đoạn nung nóng của mỗi chu kỳ. Quy trình PCR gốc của Mullis không có hiệu quả cao vì nó mất nhiều thời gian, cần một lượng lớn DNA polymerase, và phải liên tục lưu ý suốt trong quá trình PCR.

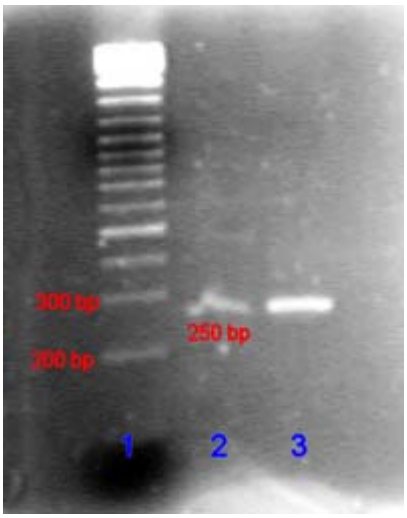
Sau đó, quy trình gốc này được phát triển bằng cách dùng DNA-Polymerase lấy từ vi khuẩn *ưa nhiệt* (thermophilic) sống trong mạch nước phun ở nhiệt độ trên 110°C. DNA polymerase từ sinh vật này là ổn định ở nhiệt độ cao (thermostable) và khi dùng trong PCR nó không bị phá vỡ khi hỗn hợp được nung nóng để tách sợi DNA. Từ đó, không cần phải them DNA-polymerase vào mỗi chu kỳ, quá trình sao chép DNA có thể đơn giản và tự động hơn.

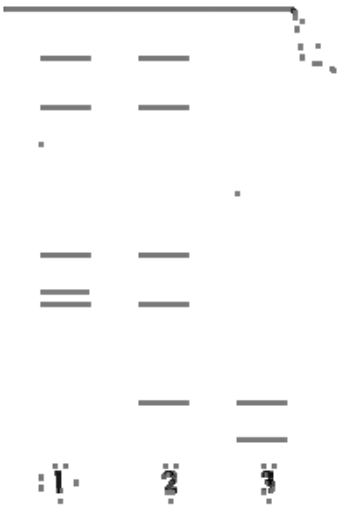
Một trong những DNA-polymerase chịu nhiệt đầu tiên được phân lập được từ *Thermus aquaticus* và được gọi là Taq. *Taq polymerase* được dùng rộng rãi trong thực nghiệm PCR (5/2004). Nhược điểm của Taq là thỉnh thoảng nó nhầm lẫn trong quá trình sao chép DNA, dẫn đến kết cặp sai trong chuỗi DNA, vì nó thiếu tính sửa sai exonuclease 3'-5'. Các polymerase như Pwo hay Pfu, được phân lập từ Archaea có cơ chế sửa sai và có thể làm giảm một cách đáng kể số đột biến xảy ra trong chuỗi DNA được sao chép. Ngày nay, sự kết hợp giữa Taq và Pfu có thể cung cấp cả độ tin cậy cao lẫn sự khuếch đại chính xác của DNA.

7.3.4. Các ứng dụng của PCR

Các ứng dụng cơ bản của PCR có thể kể là: nhận dạng *dấu vân tay di truyền* (genetic fingerprinting), chẩn đoán bệnh di truyền, kiểm tra huyết thống, tách dòng gene (cloning), *gây đột biến điểm định hướng* (site-directed mutagenesis), phân tích mẩu DNA cổ, xác định allele của đột biến hoặc đa hình có ở một cá thể thông qua sử dụng *PCR đặc thù cho allele* (allele-specific PCR), so sánh mức độ biểu hiện của gene nhờ *RT-PCR* và *Real-Time PCR*.

Sản phẩm PCR có thể được xác định thông qua kích thước của nó bằng phương pháp điện di trên bản gel agarose (agarose gel electrophoresis). Kiểu điện di này là một quy trình bao gồm việc bơm DNA lên trên bản gel agarose và sau đó cho một dòng điện chạy qua bản gel. Kết quả là các sợi DNA bé hơn sẽ di chuyển nhanh hơn các sợi lớn hơn dọc theo bản gel hướng về dòng điện dương. Kích thước của sản phẩm PCR có thể xác định bằng cách so sánh với một thang DNA (*DNA ladder)*, vốn có chứa các đoạn DNA có kích thước đã biết cũng nằm trong bản gel đó (Hình 1.13).

(A) 


(B) 


**Hình 1.13** (A) Sản phẩm PCR được đối chiếu với giếng DNA trên bản gel agarose. Thang DNA (giếng 1), sản phẩm PCR ở nồng độ thấp (giếng 2), và ở nồng độ cao (giếng 3). *Nguồn*: Helmut W. Klein, Institute of Biochemistry, University of Cologne, Germany.

(B) Điện di các đoạn DNA được khuyếch đại bằng PCR: (1)- Người cha, (2)- Người con, (3)-Người mẹ. Đứa con được di truyền một số chứ không phải tất cả dấu vân tay của mỗi một bố mẹ; ở đây cho thấy một dấu vân tay mới, độc nhất.

## V. Vai trò của vi sinh vật trong đời sống và sản xuất

*1. Vi khuẩn có ích và vi khuẩn gây hại*

Vi khuẩn có thể có ích hoặc có hại cho môi trường và động vật, kể cả con người. Vai trò của vi khuẩn trong gây bệnh và truyền bệnh rất quan trọng. Một số là tác nhân gây bệnh (pathogen) gây ra các bệnh như: uốn ván, sốt thương hàn, giang mai, tả, bệnh lây qua thực phẩm và lao. Nhiễm khuẩn huyết, là hội chứng nhiễm khuẩn toàn cơ thể gây sốc và giãn mạch, hay bộ phận gây ra bởi các vi khuẩn như streptococcus, staphylococcus hay nhiều loài Gram âm khác. Một số nhiễm khuẩn có thể lan rộng ra khắp cơ thể và trở thành toàn thân. Ở thực vật, vi khuẩn gây đốm lá, cháy lá và héo cây. Các hình thức lây nhiễm gồm qua tiếp xúc, không khí, thực phẩm, nước và côn trùng. Vật chủ (host) bị nhiễm khuẩn có thể trị bằng thuốc kháng sinh, được chia làm hai nhóm là diệt khuẩn (bacteriocide) và kìm khuẩn (bacteriostasis), với liều lượng mà khi phân tán vào dịch cơ thể có thể tiêu diệt hoặc kìm hãm sự phát triển của vi khuẩn.

Trong đất, các vi sinh vật sống trong nốt rễ (rhizosphere) biến nitơ thành ammoniac bằng các enzyme của chính mình. Một số khác lại dùng phân tử khí nitơ làm nguồn đạm cho mình, chuyển nitơ thành các hợp chất của nitơ; quá trình này gọi là quá trình cố định đạm. Nhiều vi khuẩn được tìm thấy sống cộng sinh trong cơ thể người hay các sinh vật khác. Ví dụ như sự hiện diện của các vi khuẩn cộng sinh trong ruột già giúp ngăn cản sự phát triển của các vi sinh vật có hại.

Vi khuẩn có khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ một cách đáng kinh ngạc. Một số nhóm vi sinh "chuyên hóa" đóng một vai trò rất quan trọng trong việc hình thành các khoáng chất từ một số nhóm hợp chất hữu cơ. Ví dụ, sự phân giải cellulose, một trong những thành phần chiếm đa số trong mô thực vật, được thực hiện chủ yếu bởi các vi khuẩn hiếu khí thuộc chi *Cytophaga*. Khả năng này cũng được con người ứng dụng trong công nghiệp và trong cải thiện sinh học (bioremediation). Các vi khuẩn có khả năng phân hủy hydrocarbon trong dầu mỏ thường được dùng để làm sạch các vết dầu loang v.v.

Vi khuẩn cùng với nấm men và nấm mốc được dùng để chế biến các thực phẩm lên men như phô-mai, dưa chua, nước tương, dưa cải bắp (sauerkraut), giấm, rượu, và yoghurt. Sử dụng công nghệ sinh học, các vi khuẩn có thể được "thiết kế" (bioengineer) để sản xuất thuốc trị bệnh như insulin, hay để cải thiện sinh học đối với các chất thải độc hại.

*2. Những ích lợi bắt nguồn từ các vi sinh vật và các hoạt động của chúng*

Nói chung, với năng lực chuyển hoá mạnh mẽ và khả năng sinh sản nhanh chóng của các vi sinh vật cho thấy tầm quan trọng to lớn của chúng

trong thiên nhiên cũng như trong các hoạt động cải thiện chất lượng sống của con người nhờ hiểu biết về các hoạt động sống của chúng (Bảng 1.2).

Ngoài ra, các vi sinh vật còn là đối tượng cho các nghiên cứu cơ bản của di truyền học. Từ đó dẫn tới sự hình thành các lĩnh vực di truyền học sinh-hoá và di truyền học vi sinh vật trong thập niên 1940, hai nền tảng chính cho sự ra đời của di truyền học phân tử và công nghệ DNA tái tổ hợp sau này (như đã đề cập ở Bài mở đầu).

***Bảng 1.2*** *Những ích lợi bắt nguồn từ các vi sinh vật và các hoạt động của chúng*
(Theo McKane và Kandel 1996)

***Trong các môi trường tự nhiên**

| **Hoạt động** | **Ích lợi** |
|---|---|
| Phân huỷ xác hữu cơ | Quay vòng các chất dinh dưỡng trong sinh quyển. |
| Sản xuất oxy | Các vi sinh vật (VSV) quang hợp thuỷ sinh tạo ra khoảng một nửa oxy của khí quyển. |
| Ngăn ngừa dịch bệnh | Các bệnh côn trùng có thể giúp phòng trừ các dịch bệnh phá hoại mùa màng. |
| Cố định nitơ | Một vài vi khuẩn biến đổi nitơ bầu khí quyển thành ra một dạng mà thực vật có thể dễ dàng sử dụng. |
| Sự sống sót của các loài nhai lại | Các vi sinh vật tiêu hoá cellulose trong ruột trâu bò, cừu ...cho phép động vật sử dụng thức ăn mà nó không thể tiêu hoá bằng cách khác. |
| Các chuỗi thức ăn thuỷ sinh | Các vi sinh vật quang hợp ở nước cung cấp năng lượng và dinh dưỡng để tự chúng duy trì và nuôi sống các tất cả các sinh vật tiêu thụ thuỷ sinh. |
| Các chuỗi thức ăn trong đất | Sự phân huỷ của VSV cung cấp các chất dinh dưỡng cho các sinh vật quang hợp mà nó hỗ trợ các chuỗi thức ăn thuộc đất khô. Một số động vật đất sống bằng các sinh vật thuỷ sinh, qua đó kết nối các chuỗi thức ăn ở nước và ở đất. |
| Phá huỷ các độc tố | Các sản phẩm gây độc của một số sinh vật được khử độc một cách tự nhiên nhờ hoạt động của VSV. |

***Đối với ứng dụng của con người**

| **Hoạt động** | **Ích lợi** |
|---|---|
| Lên men cồn | Sản xuất bia, rượu vang và cồn |
| Sản xuất kháng sinh | Nhiều dược phẩm được dùng để chống lại các bệnh ở |

| | |
|---|---|
| | người và các động vật khác. |
| Các thuốc diệt bệnh bằng sinh học | Các VSV có khả năng đặc biệt giết côn trùng được dùng để thay thế các hoá chất chống lại các dịch bệnh gây hại mùa màng mà không phải giết các động vật có ích hoặc làm ô nhiễm môi trường. |
| Xử lý rác thải sinh học | Các VSV được dùng để làm sạch các cặn bã dầu và phân huỷ các độc tố và các phế liệu công nghiệp. |
| Công nghệ sinh học | Cho phép các nhà khoa học tạo ra các nòi VSV mới có các đặc tính độc đáo có thể dùng trong sản xuất insulin hoặc các chế phẩm y-sinh học khác... |
| Sản xuất thực phẩm | Yaourt, phomat... và nhiều thức ăn khác được 'rippen' bằng sự lên men vi sinh vật. |
| SX hoá chất c/nghiệp | Cồn, các amino acid, vitamin, các enzyme hữu ích |
| Protein đơn bào | Bổ sung thực phẩm hứa hẹn cứu đói khắp toàn cầu. Các VSVsinh trưởng trên các hợp chất hữu cơ đơn giản (thậm chí các chất thải) có thể sản xuất nhanh thực phẩm chất lượng cao dùng trong chăn nuôi... |
| Sản xuất các vaccine | Các vật gây bệnh sinh trưởng qua nuôi cấy như là nguồn vật liệu ngoại lai được sử dụng ở dạng biến đổi (không gây bệnh) để tiêm chủng cho người và kích thích miễn dịch chống lại bệnh tương ứng. |
| Test Ames đối với các hoá chất gây ung thư | Cung cấp test xác định nhanh hàng ngàn hoá chất, nhờ sử dụng khả năng của chúng để gây các biến đổi di truyền ở vi khuẩn như là một chất chỉ thị về tiềm năng gây ung thư của chúng. |
| Khai thác mỏ đồng và uranium | Các vi khuẩn phân huỷ đá cho phép các hoạt động khai thác kim loại từ quặng mà bằng cách khác hiệu quả kinh tế rất thấp. Các vi khuẩn này cung cấp khoảng 10% lượng đồng được khai thác. |
| Xử lý nước thải | Hoạt động VSV giúp làm sạch nước thải và giết các sinh vật gây bệnh trước khi đưa trả lại môi trường. |
| Các nguồn năng lượng | Khí methane tự nhiên và ethanol là hai sản phẩm chất đốt của các VSV sinh trưởng bằng cách biến đổi sinh học biến các phế thải thành nhiên liệu. |

***Các mô hình cho nghiên cứu cơ bản**

| **Khám phá** | **Các đóng góp của vi sinh vật** |
|---|---|

| | |
|---|---|
| DNA là vật chất di truyền | Các vi khuẩn và virus đã cung cấp công cụ cho các thí nghiệm chứng minh vật chất di truyền là DNA. |
| Cơ chế biểu hiện gene | Các vi khuẩn và virus đã được dùng để tìm hiểu cách thức thông tin mã hoá trong các gene tạo ra các protein đặc thù mà từ đó hình thành nên tính trạng. |
| Mã di truyền | Các vi khuẩn cung cấp các enzyme cho các nghiên cứu dịch mã di truyền bằng cách thiết kế các trình tự RNA đặc thù và qua đó giải tất cả mã di truyền. |
| Các con đường chuyển hoá cơ bản | Nhiều con đường sinh hoá (chu trình Krebs chẳng hạn) mà đã được khám phá và tiến hành ở các vi khuẩn là trung tâm của sự chuyển hoá ở hầu hết tất cả các sinh vật (kể cả con người). |
| Enzyme phiên mã ngược | Một enzyme ở các virus gây bệnh AIDS và một số virus gây ung thư cho phép các virus RNA hợp nhất các bản sao vật chất di truyền của chúng vào DNA của các nhiễm sắc thể động vật. |
| Các enzyme giới hạn và splicing gene | Các enzyme vi khuẩn cung cấp cơ chế mà các nhà khoa học lợi dụng để chuyển các gene từ sinh vật này sang sinh vật khác, qua đó mở ra cánh cửa cho kỹ thuật di truyền và các đại lộ mới cho nghiên cứu di truyền cơ bản. |

## Câu hỏi và Bài tập

1. Hãy cho biết các đặc điểm chung trong cấu tạo và hoạt động sống của các vi sinh vật và ý nghĩa của chúng.

2. Sự khác nhau giữa các tế bào prokaryote (eubacteria và archaeobacteria) và eukaryote là gì?

3. Hãy cho biết các ích lợi của vi sinh vật đối với môi trường tự nhiên, đối với các ứng dụng của con người?

4. Chứng minh rằng các vi sinh vật là đối tượng quan trọng trong các nghiên cứu của di truyền học và sinh học phân tử.

5. Các vi sinh vật có tầm quan trọng như thế nào trong sự phát triển của kỹ thuật di truyền và công nghệ DNA tái tổ hợp?

6. Có những phương pháp nào được sử dụng trong phân tích di truyền học vi sinh vật? Thế nào là phương pháp phân tích bổ sung? Cho ví dụ và nêu các khả năng ứng dụng của chúng trong phân tích di truyền vi sinh vật.

# Tài liệu Tham khảo


**Tiếng Việt**

Nguyễn Lân Dũng (chủ biên), Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty. 1997. *Vi sinh vật học*. NXB Giáo Dục.

Nguyễn Thành Đạt. 2005. Cơ sở sinh học vi sinh vật (Tập I). NXB Đại Học Sư Phạm.

Phạm Thành Hổ. 2000. *Di truyền học*. Tái bản lần II, NXB Giáo Dục.

Phạm Thành Hổ. 2005. *Nhập môn công nghệ sinh học*. NXB Giáo Dục.

**Tiếng Anh**

Alcamo, I. Edward. 1997. *Fundamentals of Microbiology*. 5th ed. Menlo Park, California: Benjamin Cumming.

Atlas, RM. 1995. *Principles of Microbiology*. St. Louis, Missouri: Mosby.

Balows, A., HG Truper, M Dworkin, W Harder, and K-H Schleifer (eds.). 1992. The Prokaryotes, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.

Holt, John.G. 1994. Bergey's *Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins, 1994.

Kimball J. 2004: http://users.rcn..com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/

Madigan, MT and JM Martinko. 2006. *Brock Biololy of Microorganisms*. 11th ed. Pearson Prentice Hall, Inc. Upper Saddle River, New Jersey.

Maloy, S. 2006. *Microbial Genetics*.

http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/genetics/

McKane, L. and J.Kandel. 1996. *Microbiology : Essentials and Applications*. 2nd edn., McGraw-Hill, Inc., New York.

Stanier, RY, JL Ingraham, ML Wheelis, and PR Painter. 1986. *General Microbiology*. 5th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

Todar, K. 2004. *Major groups of prokaryotes*. In: Bacteriology 303, University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology.

http://www.bact.wisc.edu/Bact303/Bact303mainpage

**Một số trang web bổ sung**

http://vi.wikipedia.org/wiki/Wikipedia

http://www.kensbiorefs.com/index.html

http://www.life.uiuc.edu/micro/316/supplement.html

## Chương 2

# Cơ sở Phân tử của tính Di truyền

Vật chất di truyền có các đặc tính thiết yếu sau: (1) Chứa đựng thông tin cần thiết cho việc xác định cấu trúc của tất cả các protein đặc thù của loài và điều khiển các hoạt động sinh trưởng, phân chia và biệt hoá tế bào - các *gene cấu trúc* và *yếu tố điều hoà* ; (2) Có khả năng tự sao chép (*tái bản*) chính xác, đảm bảo thông tin di truyền của thế hệ sau giống với thế hệ trước; (3) Các gene trong bộ gene có khả năng tổng hợp ra các phân tử thực hiện các chức năng khác nhau của tế bào - *phiên mã* và *dịch mã*; (3) Có khả năng biến đổi tạo ra các nguồn biến dị phong phú cho chọn lọc và tiến hoá - *đột biến, tái tổ hợp* và *các yếu tố di truyền vận động*.

Trong chương này, chúng ta sẽ tìm hiểu: (i) Thành phần hóa học và cấu trúc của các nucleic acid; (ii) Tổ chức phân tử của các nhiễm sắc thể vi khuẩn và sinh vật nhân chuẩn; (iii) Tái bản DNA; (iv) Phiên mã và các loại RNA ở tế bào prokaryote; (v) Cơ chế dịch mã ở prokaryote; và (vi) Các phương pháp nghiên cứu chính của sinh học phân tử.

## I. Sơ lược thành phần hóa học và cấu trúc của các nucleic acid

Năm 1928, F. Griffith đặt nền tảng cho việc xác định DNA là vật chất di truyền thông qua thí nghiệm biến nạp ở *Streptococcus pneumoniae*. O.T. Avery và cs lặp lại thí nghiệm này trong điều kiện *in vitro* và đến năm 1944 họ đã chứng minh được rằng DNA là vật chất mang thông tin di truyền, chứ không phải protein. Năm 1952, A.D.Hershey và M. Chase từ nghiên cứu đánh dấu đồng vị phóng xạ ở *thể thực khuẩn* (bacteriophage, hay *phage*) T2 ký sinh ở vi khuẩn *Escherichia coli* đã xác định vật chất di truyền của T2 là DNA. Bằng chứng RNA là thành phần di truyền ở *virus đốm thuốc lá* (tobacco mosaic virus = TMV) cũng đã được A.Gierer cũng như F. Conrat và B.Singer tái xác nhận năm 1956.

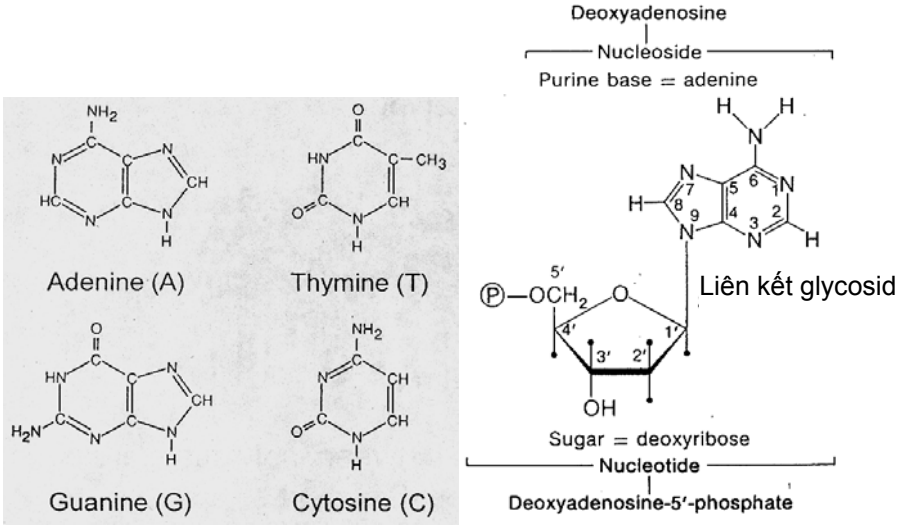
Ngày nay chúng ta đều biết rằng vật chất di truyền chính là các nucleic acid mà ở tất cả các sinh vật có cấu tạo tế bào kể cả nhiều virus là *deoxyribonucleic acid* (DNA) và ở một số virus là *ribonucleic acid* (RNA).

Các *nucleic acid* (DNA, RNA) là những polymer sinh học, có trọng lượng phân tử lớn, gồm nhiều đơn phân (monomer) là các *nucleotide* nối với nhau tạo thành các chuỗi hay mạch *polynucleotide*.

*1. Thành phần hoá học và cấu trúc của các nucleotide*

Mỗi nucleotide gồm ba thành phần kết dính với nhau như sau: một nhóm *phosphate* nối với gốc *đường pentose* tại nguyên tử carbon số 5 ($C_{5'}$)

bằng một *liên kết ester* và một *base nitơ* nối với gốc đường tại nguyên tử carbon số 1 ($C_{1'}$) bằng một *liên kết β-glycosid* (Hình 2.1).




**Hình 2.1** Bốn loại base của DNA và cấu trúc một nucleotide (dAMP).

Các base *purine* và *pyrimidine* là thành phần đặc trưng của các nucleotide. Trong DNA chứa bốn loại base cơ bản: *adenine* (A), *thymine* (T), *guanine* (G) và *cytosine* (C); trong RNA cũng chứa bốn loại base cơ bản nhưng chỉ khác là thymine được thay bởi *uracil* (U).

Đường pentose của RNA là *D-ribose* và của DNA là *2-deoxy-D-ribose*, khác nhau ở $C_{2'}$ (-OH trong ribose và H trong deoxyribose). Tính phân cực của nucleotide thể hiện ở hai vị trí chứa nhóm hydroxyl (-OH) tự do của gốc đường : $C_{5'}$ (liên kết ester với nhóm phosphate để tạo ra nucleotide) và $C_{3'}$ (liên kết phosphodiester với nucleotide khác để tạo chuỗi polynucleotide).

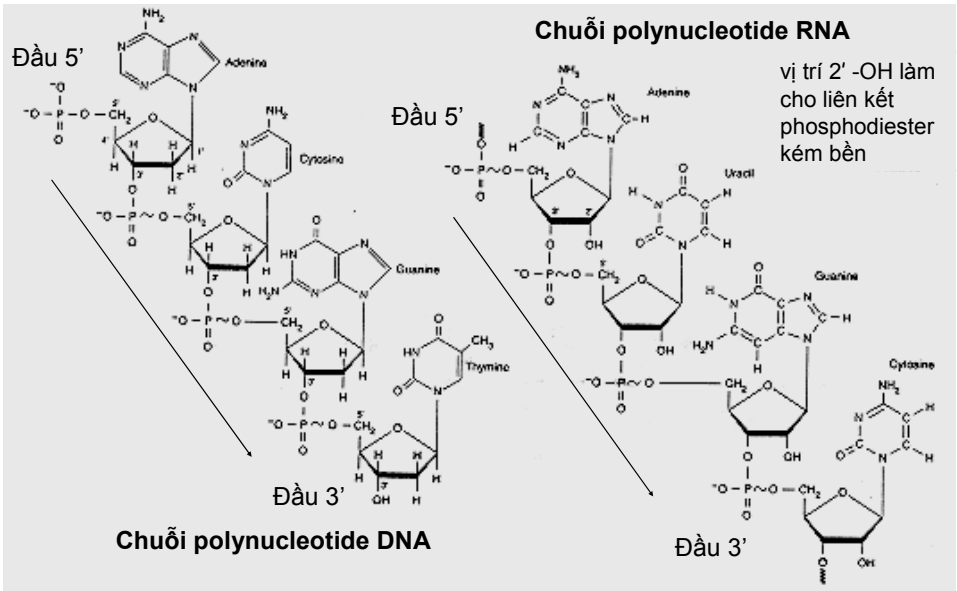
*2. Thành phần hoá học và cấu trúc các chuỗi polynucleotide*

Các nucleotide trong DNA hoặc RNA nối với nhau bằng các mối liên kết đồng hoá trị *3',5'-phosphodiester* giữa đường của nucleotide này với phosphate của nucleotide kế tiếp, tạo thành chuỗi *polynucleotide*. Vì vậy các chuỗi này bao giờ cũng sinh trưởng theo chiều 5'→3', có bộ khung gồm các gốc đường và phosphate xếp luân phiên nhau và trình tự các base được đọc theo một chiều xác định (hình 2.2).

*3. Thành phần hóa học và cấu trúc của chuỗi xoắn kép DNA*

Năm 1949, E.Chargaff qua phân tích thành phần hóa học của DNA các loài khác nhau đã kết luận: (i) Trong các mẫu DNA nghiên cứu có mối

tương quan hàm lượng (%) giữa các base như sau: A ≈ T và G ≈ C, nghĩa là (A+G)/ (T+C) ≈ 1; và (ii) Mỗi loài có một tỷ lệ (A+T)/(G+C) đặc thù.




**Hình 2.2** Cấu trúc các chuỗi polynucleotide của DNA và RNA.

Việc nghiên cứu cấu trúc tinh thể của DNA bằng phân tích nhiễu xạ Reuntgen được bắt đầu bởi Maurice Wilkins và Rosalind Franklin từ năm 1951. Các ảnh chụp gợi ý rằng DNA có cấu trúc xoắn gồm hai hoặc ba chuỗi. Tuy nhiên, giải pháp đúng đắn nhất là *chuỗi xoắn kép* do James Watson và Francis Crick đã đưa ra năm 1953 (Hình 2.3). Mô hình này phù hợp với các số liệu của Wilkins - Franklin và Chargaff.

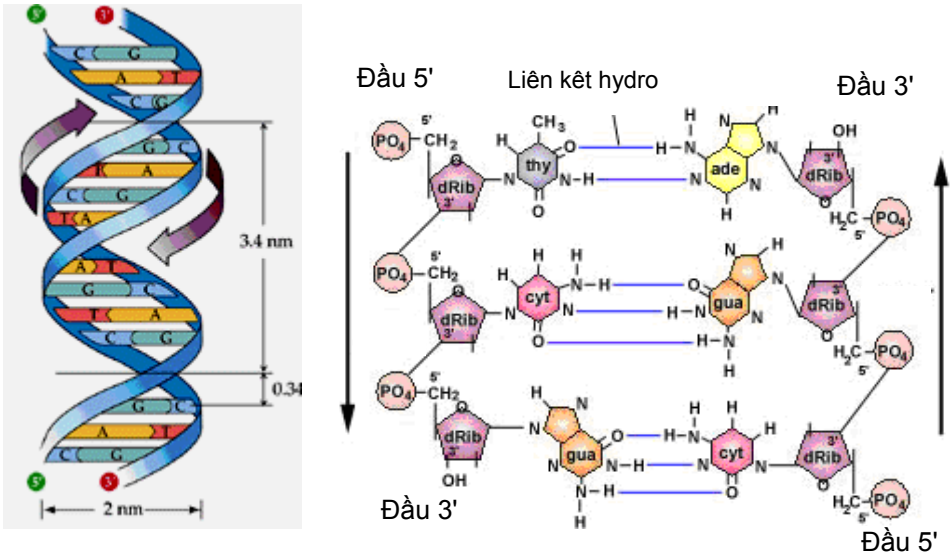
(1) DNA gồm hai chuỗi *đối song song* (antiparallel) cùng uốn quanh trục trung tâm theo chiều xoắn phải, với đường kính 20A$^o$, gồm nhiều vòng xoắn lặp lại một cách đều đặn và chiều cao mỗi vòng xoắn là 34 A$^o$, ứng với 10 *cặp base* (base pair, viết tắt là bp).

(2) Các bộ khung đường-phosphate phân bố ở mặt ngoài chuỗi xoắn và các base nằm ở bên trong; chúng xếp trên những mặt phẳng song song với nhau và thẳng góc với trục phân tử, với khoảng cách trung bình 3,4 A$^o$.

(3) Hai sợi đơn gắn bó với nhau bằng các mối *liên kết hydro* được hình thành giữa các cặp base đối diện theo *nguyên tắc bổ sung* (Hình 2.3). Cụ thể là, trong DNA chỉ tồn tại hai kiểu kết cặp base đặc thù A-T (với hai liên kết hydro) và G-C (với ba liên kết hydro).

(4) Tính chất bổ sung theo cặp base dẫn đến sự bổ sung về trình tự base của hai sợi đơn. Vì vậy, trong DNA sợi kép bao giờ cũng có: A = T

và G = C (*quy luật Chargaff*), nghĩa là $\frac{A+G}{T+C}=1$, còn tỷ lệ $\frac{A+T}{G+C}$ đặc thù cho từng loài.




**Hình 2.3** Mô hình cấu trúc DNA (trái) và cấu trúc chi tiết của nó.

*4. Sơ lược về các đặc tính hóa lý của các nucleic acid*

4.1. Các dạng biến đổi của DNA

Mô hình Watson-Crick hay DNA *dạng B* là cấu trúc phổ biến. Tuy nhiên, sau này người ta còn phát hiện ra nhiều dạng khác: các dạng DNA xoắn phải A, C, D, v.v. và một dạng DNA xoắn trái duy nhất gọi là *DNA-Z*. Chúng có một số biến đổi so với DNA-B (Bảng 2.1).

***Bảng 2.1*** *Đặc điểm của các dạng DNA - A, B, C và Z*

| Dạng | Chiều xoắn | Số bp/vòng xoắn | Đường kính chuỗi xoắn |
|---|---|---|---|
| A | Phải | 11,0 | 23A$^o$ |
| B | Phải | 10,0 | 19A$^o$ |
| C | Phải | 9,3 | 19A$^o$ |
| Z | Trái | 12,0 | 18A$^o$ |

4.2. Biến tính và hồi tính của DNA

Bằng thực nghiệm, người ta đã chứng minh được rằng, khi tăng nhiệt độ từ từ hoặc khi có mặt các tác nhân gây mất ổn định như alkali hay formamide, các phân tử DNA bị *biến tính từng phần* (các vùng giàu cặp AT sẽ tách trước, trong khi các vùng giàu cặp GC vẫn giữ nguyên đặc tính xoắn kép). Điều này có thể lý giải là do mỗi cặp AT chỉ có hai liên kết hydro, kém bền hơn so với mỗi cặp GC chứa ba liên kết hydro. Khi đun

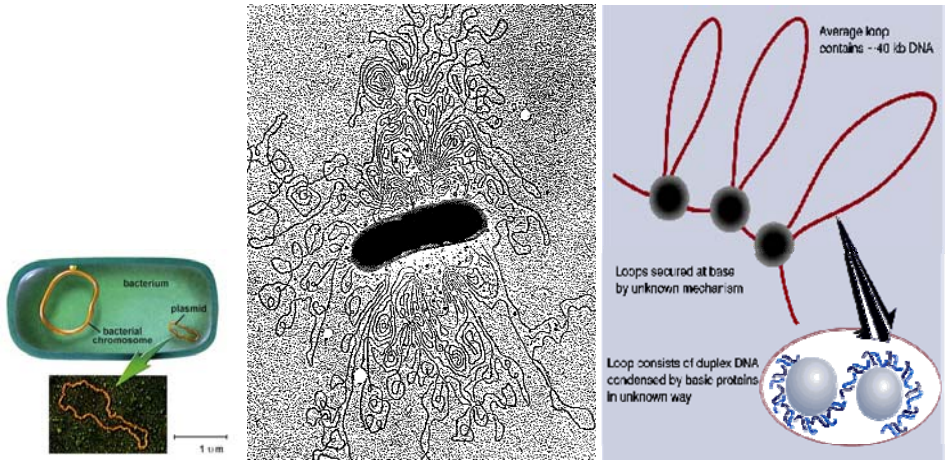
nóng từ từ dung dịch chứa DNA lên tới nhiệt độ gần 100$^{o}$C, các liên kết hydro của chúng bị phá hủy hoàn toàn và hai sợi bổ sung tách ra. Hiện tượng đó gọi là *biến tính hoàn toàn* (denaturation). Ngược lại, khi làm nguội từ từ dung dịch đốt nóng chứa DNA bị biến tính hoàn toàn, các sợi đơn thường cặp lại với sợi bổ sung của chúng và làm phục hồi chuỗi xoắn kép ban đầu. Hiện tượng đó được gọi là *hồi tính* (renaturation).

Nhiệt độ mà tại đó các sợi DNA bị biến tính hay tách nhau một nửa được gọi là *nhiệt độ nóng chảy* (melting temperature), hay $T_m$. $T_m$ là điểm giữa của pha chuyển tiếp và nó tùy thuộc vào hàm lượng G-C của DNA, nghĩa là đặc trưng cho DNA mỗi loài. Ví dụ, DNA của *E. coli* với 50% G-C thì có $T_m$ là 69$^{o}$C. Nói chung, hàm lượng GC của một DNA có thể biến thiên từ 22% ở mốc nhầy *Dictyostelium* đến 73% ở *Mycobacterium phlei*.

## II. Tổ chức phân tử của các nhiễm sắc thể vi khuẩn và eukaryote

*1. Tổ chức bộ gene của các vi khuẩn*

Nhóm prokaryote bao gồm các vi khuẩn (bacteria) và vi khuẩn cổ (archaeobacteria) là các sinh vật có cấu tạo tế bào đơn giản nhất. *Escherichia coli* là đối tượng được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu di truyền phân tử (Hình 2.5a).




(a) (b) (c)

**Hình 2.5** Một tế bào *E. coli* với nhiễm sắc thể và vi ảnh điện tử của plasmid pSC101 (a). Tổ chức của bộ gene vi khuẩn *E. coli* nhìn dưới kính hiển vi điện tử (b) và sơ đồ minh hoạ (c).

Chẳng hạn, bộ gene của *E. coli* là một phân tử DNA sợi kép vòng có kích thước 4.639.221 bp, với 4290 gene mã hóa protein cộng với 53 gene RNA (Kimball 2004). Nó thường tập trung ở "*vùng nhân*" (nucleoid), không có màng nhân bao bọc, và ở trạng thái *siêu xoắn* (supercoiled) dưới

sự kiểm soát của các *topoisomerase*. Mỗi bộ gene có ~4,6 triệu cặp bazơ với ~100 vòng siêu xoắn; mỗi vòng chứa khoảng 40 ngàn cặp bazơ (Hình 2.5b-c). Ngoài ra còn có nhiều phân tử DNA sợi kép vòng khác có kính thước bé phân bố rải rác trong tế bào chất, gọi là các *plasmid*.

***★ Một số hiểu biết mới về tổ chức các nhiễm sắc thể vi khuẩn***

Các nghiên cứu trong thập niên 1990 cho thấy: Không phải tất cả các vi khuẩn đều có một nhiễm sắc thể vòng đơn; một số vi khuẩn có nhiều nhiễm sắc thể mạch vòng, và nhiều vi khuẩn có các nhiễm sắc thể mạch thẳng và các plasmid mạch thẳng. Bằng chứng thực nghiệm về nhiều nhiễm sắc thể và các nhiễm sắc thể mạch thẳng đầu tiên thu được từ các nghiên cứu nhờ sử dụng *điện di gel trên trường xung động* (pulsed field gel electrophoresis = PFGE), một phương pháp sử dụng các trường điện từ biến đổi để tách các phân tử DNA lớn trên bản gel agarose. Các dự án phân tích trình tự bộ gene đã bổ sung thêm danh sách các vi khuẩn có nhiều nhiễm sắc thể hoặc các nhiễm sắc thể mạch thẳng (xem Bảng 2.2).

***Bảng 2.2*** *Một vài ví dụ về tổ chức bộ gene vi khuẩn* (*Nguồn*: Maloy, 2006).

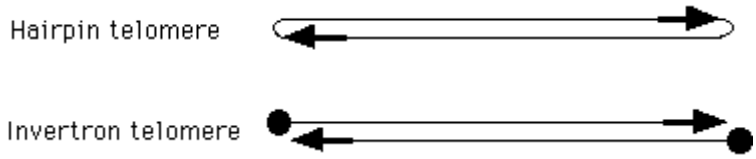
| Vi khuẩn | (Các) Nhiễm sắc thể | (Các) Plasmid |
|---|---|---|
| *Agrobacterium tumefaciens* | 1 thẳng (2,1 Mb) + 1 vòng (3,0 Mb) | 2 vòng (450+200 Kb) |
| *Bacillus subtilis* | 1 vòng (4,2 Mb) | |
| *B. thuringiensis* | 1 vòng (5,7 Mb) | 6 (mỗi cái > 50 Kb) |
| *Borrelia* | 1 thẳng (0,91 Mb) | nhiều vòng + thẳng (5-200 Kb) |
| *Brucella melitensis* | 2 vòng (2,1 + 1,2 Mb) | |
| *Brucella suis* biovar 1,2,4 | 2 vòng (1,0 + 2,0 Mb) | |
| *Brucella suis* biovar 3 | 1 vòng (3,1 Mb) | |
| *Buchnera sp.* nòi APS | 1 vòng (640 Kb) | 2 vòng ( < 7,8 Kb) |
| *Deinococcus radiodurans* | 2 vòng (2,6 + 0,4 Mb) | 2 vòng (177 + 45 Kb) |
| *E. coli* K.12 | 1 vòng 4,6 Mb) | |
| *Leptospira interrogans* | 2 vòng (4,7 + 0,35 Mb) | |
| *Paracoccus denitrificans* | 3 vòng (2 + 1,1 + 0,64 Mb) | |
| *Pseudomonas aeruginosa* | vòng đơn (6,3 Mb) | |
| *Rhizobacterium meliloti* | 2 vòng (3,4 + 1,7 Mb) | 1 megaplasmid vòng (1.400 Kb) |
| *Rhodobacter sphaeroides* | 2 vòng (3,0 + 0,9 Mb) | |
| *Vibrio cholera* | 2 vòng (2,9 + 1,1 Mb) | |
| *Vibrio parahaemolyticus* | 2 vòng (3,2 + 1,9 Mb) | |
| *Xylella fastidiosa* | 1 vòng (2,7 Mb) | 2 vòng (51+1,3 Kb) |

* 1Mb = $10^3$ Kb = $10^6$ b; các số liệu base = b ở đây cần hiểu là cặp base = bp.

Bằng chứng thuyết phục đầu tiên cho rằng một số vi khuẩn có nhiều nhiễm sắc thể dựa trên các nghiên cứu ở *Rhodobacter sphaeroides*. Các nghiên cứu về phân tử (Suwanto và Kaplan, 1989) và di truyền học (Suwanto và Kaplan, 1992) đã chỉ rõ vi khuẩn này có hai nhiễm sắc thể vòng lớn, 3,0 Mb và 0,9 Mb v.v.

Hơn nữa, một số vi khuẩn lại có các nhiễm sắc thể mạch thẳng. Chi *Borrelia* có các nhiễm sắc thể mạch thẳng và hầu hết các nòi đều chứa cả hai loại plasmid thẳng và vòng; hầu hết các vi khuẩn thuộc chi *Streptomyces* có các nhiễm sắc thể và plasmid đều là mạch thẳng cả, còn một số thì có các plasmid vòng. Ngoài ra, trong một số trường hợp có thể có sự cân bằng động học giữa các dạng thẳng và vòng của một phân tử DNA. Một số bằng chứng cho thấy sự tuyến tính hoá (linearization) có thể là do sự xen của bộ gene phage mạch thẳng vào trong phân tử DNA vòng (Volff và Altenbuchner, 2000).

Các đầu mút của các DNA mạch thẳng (gọi là các *telomere*) đặt ra hai vấn đề không áp dụng được cho các phân tử DNA mạch vòng. Thứ nhất, vì các đầu mút DNA sợi kép tự do là rất nhạy cảm với sự phân huỷ bởi các nuclease nội bào, cho nên hẳn phải có một cơ chế bảo vệ các đầu mút này. Thứ hai là, các đầu mút của các phân tử DNA mạch thẳng phải có một cơ chế đặc biệt để tái bản DNA. Những vấn đề này đã được giải quyết bằng các đặc điểm của các telomeres. Thực ra có hai kiểu telomere khác nhau ở các vi khuẩn: các *telomere dạng kẹp cài tóc* (hairpin telomeres) và các *telomere quay ngược* (invertron telomeres).




Có những ví dụ về các phân tử DNA mạch thẳng ở vi khuẩn được bảo vệ bằng cả hai kiểu telomere: các vòng kẹp cài tóc đối xứng xuôi ngược được bảo vệ bằng sự vắng mặt các đầu mút sợi kép tự do. Cả hai cơ chế này cũng được sử dụng bởi một số phage, các virus của eukaryote, và các plasmid của eukaryote.

Hai kiểu telomere cũng giải quyết vấn đề tái bản DNA một cách khác biệt. Các invertron telomere có một protein kết dính đồng hoá trị vào các đầu 5' của phân tử DNA (gọi là protein đầu mút 5' hay TP cho đoạn ngắn). DNA polymerase tương tác với TP tại telomere và xúc tác hình thành liên kết đồng hoá trị giữa TP và một dNTP. dNTP này bám vào TP có một nhóm 3'-OH tự do hoạt động như là đoạn mồi cho sự kéo dài chuỗi. Sự tái bản của các telomere dạng nút cài tóc còn chưa rõ lắm. Dường như nhiều

trình tự kẹp cài tóc có thể kết cặp để tạo thành các đoạn lặp lại (concatemer) là các sản phẩm trung gian của tái bản.

Điều quan trọng là ở chỗ chúng ta chỉ mới bắt đầu hiểu biết về sự giống nhau của nhiều quá trình vốn được coi là hoàn toàn khác nhau giữa các vi khuẩn và các eukaryote, một phần bởi vì hiện giờ có các công cụ tốt hơn để nghiên cứu các quá trình này và một phần là do hầu hết các nghiên cứu trước đây tập trung vào chỉ một vài vi khuẩn. Càng nghiên cứu trên phạm vi rộng các vi khuẩn, các phage và các plasmid, càng trở nên rõ ràng ở chỗ *E. coli* là mô hình tuyệt vời cho việc khảo sát các đặc điểm về sinh học phân tử và tế bào, nhưng không phải tất cả các vi khuẩn tiến hành mọi thứ theo cùng cách thức. Hơn nữa, việc tấn công vào di truyền học phân tử của nhóm vi khuẩn cổ (archaeobacteria) chỉ mới bắt đầu gần đây, và những gì chúng ta biết được gợi ý rằng nhóm prokaryote đa dạng này thậm chí chia xẻ nhiều đặc điểm chung với các eukaryote.

***★ Kích thước bộ gene các prokaryote lớn cỡ nào?***

Cách đây không lâu người ta cho rằng tất cả các bộ gene prokaryote (gồm cả các *vi khuẩn* = Bacteria hay Eubacteria và *vi khuẩn cổ* = Archae hay Archaeobacteria) là bé hơn nhiều các bộ gene eukaryote. Tuy nhiên, việc áp dụng các kỹ thuật mới để xây dựng các bản đồ vật lý và xác định trình tự đầy đủ bộ gene đã chỉ ra rằng có một sự đa dạng rất lớn trong kích thước và tổ chức của các bộ gene prokaryote. Hình 2.6 cho thấy một số ví dụ về kích thước bộ gene của các Bacteria và Archae. Kích thước nhiễm sắc thể của các Bacteria biến thiên từ 0,6 Mbp đến 10 Mbp, còn kích thước nhiễm sắc thể của các Archae biến thiên từ 0,5 Mbp đến 5,8 Mbp.

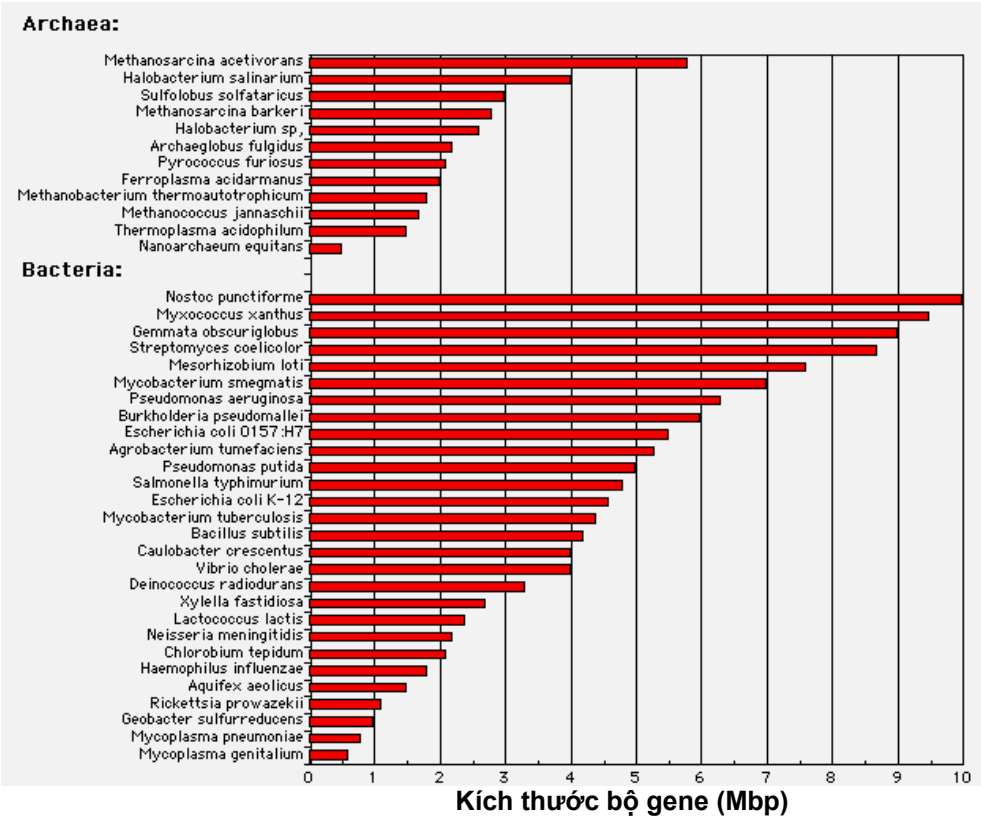
Bộ gene các vi khuẩn cổ bé nhất được xác định cho đến nay là từ *Nanoarchaeum equtans*, một thể cộng sinh bắt buộc nhỏ nhất có kích thước bộ gene là 491 Kbp. Sinh vật này không có các gene cần thiết cho tổng hợp các lipid, các amino acid, các nucleotide và các vitamin, và như thế chúng phải sinh trưởng bằng cách kết hợp chặt chẽ với sinh vật khác để được cung cấp các chất dinh dưỡng này.

Các bộ gene vi khuẩn ngày nay (Eubacteria hay Bacteria) bé nhất được xác định gần đây là từ *Mycoplasma genitalium*, một tác nhân gây bệnh ký sinh nội bào bắt buộc có kích thước bộ gene bằng 580 Kbp.

Khác với *Nanoarchaeum* và *Mycoplasma*, các vi khuẩn sống tự do phải dành ra nhiều gene thực hiện các con đường sinh tổng hợp và vận chuyển các dưỡng chất và các khối kiến trúc cơ sở. Vì vậy các vi sinh vật sống tự do bé nhất có kích thước bộ gene trên 1 Mbp.

Một đặc điểm thường được dùng để phân biệt các bộ gene của các

prokaryote and eukaryote là số lượng DNA "rác" ("junk" DNA). Trên nguyên tắc chung, các prokaryote có xu hướng rất ít DNA dạng này (điển hình là chưa đến 15% của bộ gene) và các eukaryote thì có số lượng đáng kể DNA này. Tuy nhiên, các trình tự bộ gene của các vi khuẩn nào bị hạn chế chặt vào những ổ sinh thái (ví dụ tác nhân gây bệnh ở người *Mycobacterium leprae,* và *Buchnera* - thể nội cộng sinh ở rệp cây *Aphis*) chỉ ra rằng, giống như ở các eukaryote, một số lượng đáng kể của các bộ gene vi khuẩn có thể bao gồm *DNA "rác"*.




**Hình 2.6** So sánh kích thước bộ gene của các Bacteria và Archaeobacteria (*Nguồn*: Maloy, 2006).

*2. Tổ chức phân tử của các nhiễm sắc thể eukaryote*

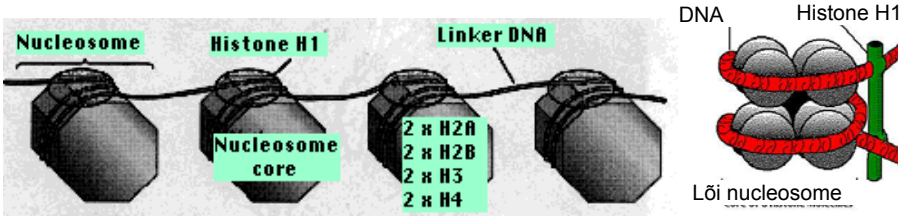
Nhóm eukaryote là nhóm lớn nhất và tiến hóa đa dạng nhất về trình độ tổ chức cơ thể, bao gồm tất cả các sinh vật có cấu tạo tế bào (trừ vi khuẩn và vi khuẩn lam), có thể là đơn bào hoặc đa bào. Trong tế bào chứa hai hệ thống di truyền, nhân và tế bào chất. Trong khi kích thước mỗi DNA nhiễm sắc thể có thể lên tới vài trăm triệu cặp base, mỗi phân tử DNA sợi kép vòng của các bào quan nói chung là nhỏ. Chẳng hạn, *DNA ty thể*

(mitochondrial DNA = mtDNA) của *S. cerevisiae* là 85.779 bp; các lạp thể của *N. crassa*: 3581; 3675; 7050 bp; mtDNA của người và các động vật có vú ~15.000-17.000 bp; một *DNA lạp thể* (chloroplast DNA = cpDNA) ở phần lớn tế bào thực vật thường vào khoảng 130.000 -150.000 bp.

***Bảng 2.3*** *Kích thước bộ gene một số vi sinh vật thường gặp*

| Bộ gene vi sinh vật | Số bp | Số gene | Ghi chú |
|---|---|---|---|
| **Virus** | | | |
| Phage Ø-X174 (ở *E. coli*) | 5.386 | 10 | DNA sợi đơn vòng |
| Phage lambda (ở *E. coli*) | 48.502 | ~61 | DNA sợi kép thẳng |
| Phage T2 hoặc T4 (ở *E. coli*) | ~$2x10^5$ | 150-200 | DNA sợi kép thẳng |
| Phage MS2 (ở *E. coli*) | 3.569 | 4 | RNA |
| SV40 (gây khối u ở khỉ) | 5.226 | | DNA sợi kép vòng |
| Epstein-Barr virus (EBV) | 172.282 | 80 | DNA sợi kép thẳng |
| **Prokaryote** | | | |
| *Haemophilus influenzae* | 1.830.138 | 1.738 | Gây nhiễm tai giữa |
| *Streptococcus pneumoniae* | 2.160.837 | 2.236 | *Pneumococcus* |
| *Escherichia coli* | 4.639.221 | 4.377 | Có 4290 cistron |
| *Agrobacterium tumefaciens* | 4.674.062 | 5.419 | Vector hữu ích... |
| **Eukaryote (đơn bào)** | | | |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 12.495.682 | 5.770 | Men bia nảy chồi |
| *Schizosaccharomyces pombe* | 12.462.637 | 4.929 | Nấm men phân cắt |
| *Plasmodium falciparum* | 22.853.764 | 5.268 | Gây sốt rét nguy nhất |
| *Neurospora crassa* | 38.639.769 | 10.082 | + 498 gene RNA |

Mỗi nhiễm sắc thể eukaryote là một phức hợp *nucleoprotein* bao gồm một phân tử DNA sợi kép thẳng kết hợp với các phân tử protein kiềm chủ yếu là các *histone*. Ngoài ra còn có các protein acid. Phức hợp như thế gọi là *chất nhiễm sắc* (chromatin).

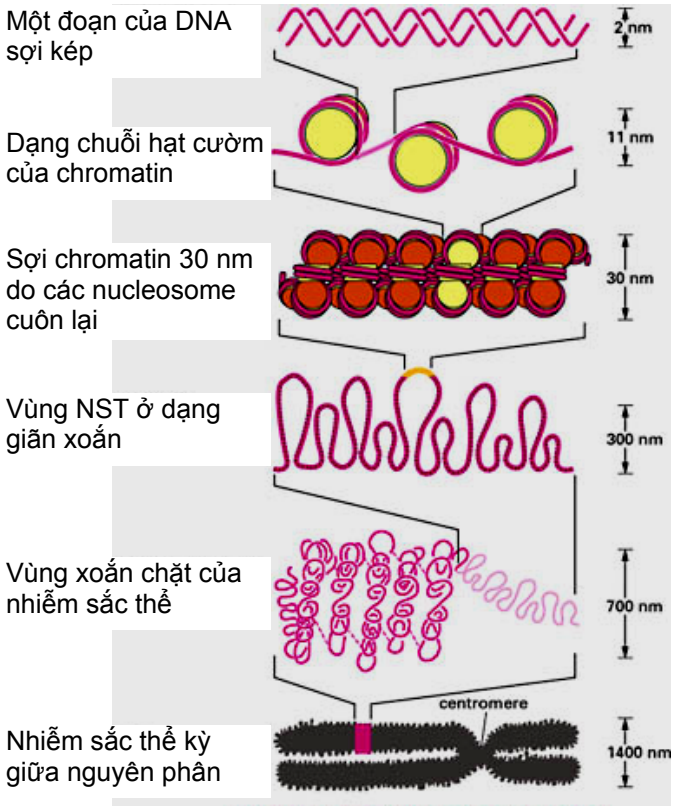



**Hình 2.7** Sơ đồ cấu trúc một đoạn sợi nucleosome (trái) và một nucleosome.

Đơn vị tổ chức của cơ sở các nhiễm sắc thể eukaryote là các *nucleosome* (hình 2.7). Mỗi nucleosome có đường kính khoảng 11 nm, gồm một khối cầu tám phân tử histone, $(H2A+ H2B +H3+H4)_2$, gọi là *lõi octamer* và đoạn DNA có kích thước 146 cặp base quấn 1¾ vòng xung quanh nó. Một phân tử H1 bám vào đoạn *DNA "nối"* (linker DNA) bên

ngoài khối cầu, giữ vững sự tương tác của DNA với các histone lõi.

Bậc cấu trúc đầu tiên của chromatin có thể hình dung dưới dạng một xâu chuỗi các hạt cườm, gọi là *sợi nucleosome* (nucleosome fiber) với độ dày 11 nm. Bậc thứ hai của của sự cuộn gập chromatin có liên quan tới sự xoắn lại của sợi nucleosome thành ra một sợi dày 25 nm gọi là *solenoid*. Các histone H1 tham gia vào sự xoắn lại này bằng cách tương tác với các phân tử H1 khác. Bậc thứ ba của sự hóa xoắn là cuộn vòng của sợi 25 nm thành một cấu trúc kiểu như bàn chải với các vòng được neo dính vào một giá trung tâm (dày ~300 nm). Đây chính là vùng giãn xoắn của nhiễm sắc thể, tương ứng với *chất đồng nhiễm sắc* (euchromatin). Sau đó các dãy vòng được sắp xếp trong các không gian ba chiều này xoắn chặt tạo thành các vùng gọi là *chất dị nhiễm sắc* (heterochromatin) trên một *chromatid* với độ dày khoảng 700 nm. Tại kỳ giữa của nguyên phân, mỗi nhiễm sắc thể gồm hai chromatid chị em dính nhau ở *tâm động* (centromere) với độ dày toàn bộ chừng 1400 nm. Sự đóng xoắn của DNA trong nhiễm sắc thể kỳ giữa làm cho chiều dài của nó rút ngắn khoảng 50.000 lần. (hình 2.8).




**Hình 2.8** Các mức độ tổ chức của DNA trong nhiễm sắc thể kỳ giữa.

## III. Tái bản DNA (DNA replication)

*1. Các nguyên tắc và đặc điểm chung của tái bản DNA*

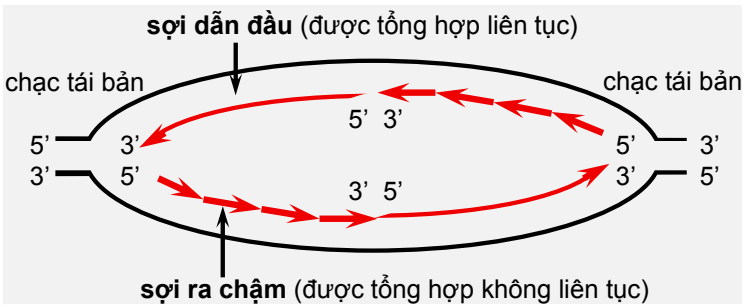
Trong khi khám phá ra cấu trúc DNA, Watson và Crick đã đưa ra dự đoán chính xác rằng sự tái bản DNA phải diễn ra theo kiểu *bán bảo toàn* (semi-conservative). Các thí nghiệm sau đó ở *E. coli* của Meselson và Stahl (1958) và John Cairn (1961) đã nhanh chóng khẳng định điều dự đoán này. Dưới đây là các nguyên tắc chung của tái bản DNA.

(i) Tái bản theo kiểu *bán bảo toàn* (semi-conservative).

(ii) Tái bản bắt đầu tại một hoặc nhiều *khởi điểm* (Ori). Từ khởi điểm, DNA mở xoắn tạo thành hai *chạc tái bản* (replication fork). Cấu trúc như vậy gọi là *đơn vị tái bản* (*replicon*) (Hình 2.9). DNA *E. coli* trong quá trình tái bản như vậy có cấu trúc giống chữ cái theta Hy Lạp (θ) nên gọi là *tái bản theta*. Đối với các DNA mạch vòng, mỗi phân tử chỉ có một *Ori*; trong khi đó mỗi DNA nhiễm sắc thể eukaryote có nhiều *Ori*.

(iii) Tham gia vào sự tái bản DNA có nhiều protein và enzyme.

(iv) Tại mỗi chạc tái bản, trước tiên xảy ra sự tổng hợp các *đoạn mồi* RNA (primer) bởi vì các DNA polymerase tự nó không thể bắt đầu tổng hợp mới được. Mặt khác, do hai sợi đơn của mỗi chạc ngược chiều nhau trong khi các DNA- và RNA polymerase chỉ xúc tác theo chiều 3'→ 5', cho nên sự tái bản DNA trên hai sợi khuôn là không giống nhau: một sợi liên tục gọi là *sợi dẫn đầu* (leading strand) và một sợi không liên tục gọi là *sợi ra chậm* (lagging strand). Kiểu tái bản như thế gọi là *tái bản nửa gián đoạn* (semi-discontinuous), được R. Okazaki phát hiện đầu tiên năm 1969.




**Hình 2.9** Một khởi điểm và hai chạc tái bản sinh trưởng đồng thời theo hai hướng đối lập nhau, mỗi chạc gồm một sợi dẫn đầu và một sợi ra chậm.

*Lưu ý*: Tất cả các DNA polymerase đều cần có mồi để xúc tác tổng hợp chuỗi theo chiều 5'→3'; và chỉ có một số enzyme này là có *hoạt tính đọc sửa* (proofreading activity). Khác với *E. coli* (có ba loại DNA polymerase I, II và III; trong đó Pol II không tham gia tái bản), các tế bào

eukaryote có năm loại DNA polymerase (α, β, γ, δ và ε), trong đó ba loại chịu trách nhiệm tái bản DNA nhân là các polymerase α, δ và ε. Polymerase δ chịu trách nhiệm chính cho tổng hợp ở *sợi dẫn đầu* và polymerase α cho *sợi ra chậm*. Polymerase γ tái bản DNA của các bào quan ty-lạp thể, còn polymerase β chịu trách nhiệm sửa chửa DNA. Vấn đề tái bản của các virus được trình bày ở chương 5.

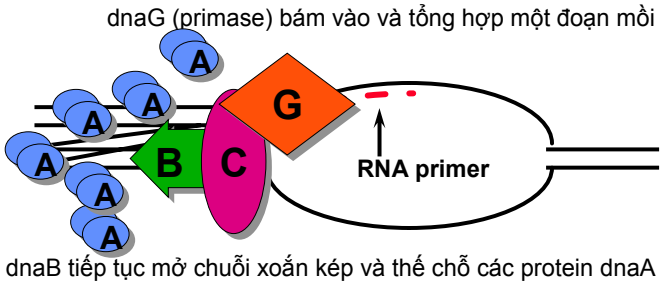
*2. Các thành phần của bộ máy tái bản DNA ở* E. coli

| | |
|---|---|
| Protein dnaA | Bám trình tự DNA của khởi điểm |
| Primasome | |
| protein dnaB | Helicase (mở xoắn DNA tại khởi điểm) |
| protein dnaC | Bám protein dnaB |
| protein dnaG | Primase (tổng hợp RNA mồi) |
| DNA gyrase | Mở siêu xoắn ngược đằng trước mỗi chạc |
| Protein Rep | Helicase (mở xoắn DNA ở chạc tái bản) |
| Protein SSB | Bám DNA sợi đơn |
| DNA polymerase III | Polymerase tái bản chính yếu |
| DNA polymerase I | Tách bỏ mồi và lấp khoảng trống |
| DNA ligase | Hàn liền khoảng hở bằng cách tạo thành liên kết 3',5'-phosphodiester |

*3. Cơ chế tái bản DNA* (E. coli)

3.1. Giai đoạn khởi đầu (initiation)

Đối với nhiễm sắc thể *E. coli*, sự tái bản bắt đầu tại một khởi điểm đặc thù gọi là *Ori*. Quá trình diễn biến ở khởi điểm *E. coli* cho đến lúc hình thành hai chạc có thể tóm tắt như sau: (1) Các protein bám khởi điểm dnaA bám *Ori* tạo ra cấu trúc nucleoprotein chuyên hoá của khởi điểm; (2) Cấu trúc này mở xoắn vùng DNA giàu AT để hình thành "*phức hợp mở*"; và (3) Hai phân tử helicase dnaB chui vào phức hợp mở làm mở xoắn khởi điểm theo cả hai hướng, tạo thành hai *chạc tái bản* (replication fork). Khi cả hai sợi đơn của mỗi chạc được tách ra thì các protein SSB bám vào.




**Hình 2.10** Hình thành phức hợp mở đầu (primasome) tại khởi điểm với việc tổng hợp đoạn mồi đầu tiên ở một chạc tái bản.

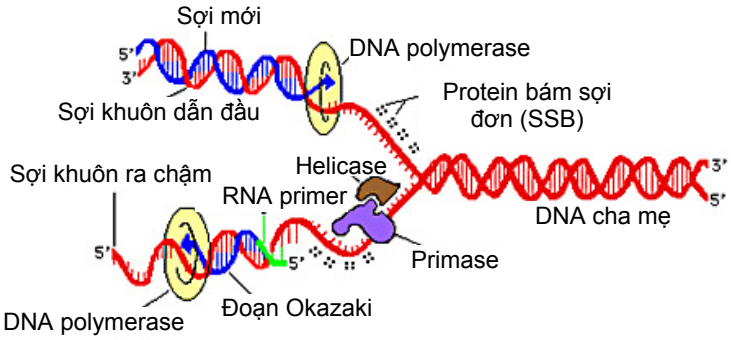
Khởi đầu trong tái bản DNA ở *E. coli* là sự tổng hợp một đoạn mồi ngắn khoảng 10-12 nucleotide bởi primase (xét chung ở các sinh vật là ~ 5 base). Cả ba loại protein *dnaB*, *dnaC* và *dnaG* hợp thành một phức hợp có tên là *primasome* (hoặc *primosome*: thể mở đầu; hình 2.10).

3.2. Giai đoạn kéo dài (elongation)

Một khi primasome tổng hợp xong một mồi, sự kéo dài chuỗi DNA được bắt đầu bằng một phức hợp giữa primasome và DNA polymerase III hoàn chỉnh, gọi là *replisome* (thể tái bản). Sự tái bản DNA trên mỗi chạc xảy ra theo kiểu *nửa gián đoạn* (semi-discontinuous), như sau (hình 2.11):

Trên sợi khuôn dẫn đầu (3'→5'): Sau khi primase (primasome) tổng hợp xong đoạn mồi RNA với đầu 3'-OH tự do, enzyme hoàn chỉnh DNA polymerase III (hay replisome) bắt đầu kéo dài chuỗi DNA mới sinh trưởng theo chiều 5'→3' một cách liên tục.

Trên sợi khuôn ra chậm (5'→3'): Sự kéo dài diễn ra không liên tục dưới dạng các đoạn Okazaki. Kích thước trung bình mỗi đoạn Okazaki ở *E. coli* là 1.000 - 2.000 nucleotide. Quá trình này đòi hỏi sự "mồi hóa" lặp lại, với sự tham gia lần lượt của bốn enzyme sau: (i) primase tổng hợp một đoạn mồi RNA; (ii) DNA polymerase III kéo dài đoạn Okazaki; (iii) DNA polymerase I vừa cắt bỏ đoạn mồi vừa lấp khoảng trống bằng cách kéo dài dần đoạn Okazaki theo sau; (iv) DNA ligase hàn liền khe hở giữa hai đoạn Okazaki bằng một liên kết phosphodiester.




**Hình 2.11** Cơ chế tái bản nửa gián đoạn trên một chạc tái bản.

3.3. Giai đoạn kết thúc (termination)

Do cấu trúc nhiễm sắc thể ở hai nhóm prokaryote và eukaryote là hoàn toàn khác nhau, nên cơ chế kết thúc tái bản của chúng cũng khác nhau.

Cả hai chạc tái bản của DNA *E. coli* được bắt đầu từ một khởi điểm (*ori*), và di chuyển hầu như cùng tốc độ theo hai hướng đối lập nhau xung quanh nhiễm sắc thể mạch vòng cho tới khi chúng gặp nhau tại một điểm kết thúc chung đối diện với *ori*. Theo Bastia và cs (1997) cũng như nhiều

tác giả khác, đây là vùng chứa các trình tự đặc thù gọi là các *điểm kết thúc tái bản* (replication termini). Tại các trình tự này có các *protein kết thúc tái bản* (replication terminator protein = RTP) bám vào và các phức hợp protein-DNA này ngăn cản sự di chuyển của các chạc tái bản. Đó là bước đầu tiên của sự hoàn thành một vòng tái bản, và sau đó tách hai nhiễm sắc thể con rời ra một cách có trật tự nhờ xúc tác của *topoisomerase IV*.

★ RTP của *E. coli* có TLPT ~36kD, được mã hóa bởi gene *tus* (*ter*) và trong mỗi tế bào có ~80 bản sao của protein này được duy trì hầu như ổn định trong suốt chu kỳ tế bào. Trình tự điều hoà của vùng kết thúc tái bản ở *E. coli* (R6K), theo Bastia và cs (1997), như sau:

5'NN(A/T)(A/T)(A/T)G(A/T)(A/G)TGTTGTAACTA(A/C)NN3'

★★ *Vấn đề kết thúc tái bản ở eukaryote*: Mỗi nhiễm sắc thể eukaryote chứa một phân tử DNA sợi kép mạch thẳng kết hợp với nhiều loại protein, có các đầu mút đặc trưng gọi là *telomere*. Các telomere có cấu trúc đơn giản gồm những trình tự ngắn (6-8 bp) lặp lại nối tiếp cả ngàn lần và đặc thù cho từng loài. Chẳng hạn, ở *Tetrahymena* là $(TTGGGG)_n$. Một khi đoạn mồi đầu tiên trên mỗi sợi được loại bỏ thì nó không có cách nào để bù đắp lại khoảng trống đó, bởi vì DNA không thể nào nới rộng theo chiều 3'→5'. Các kết quả nghiên cứu đầu tiên của Elizabeth Blackburn và cs đã giải đáp cho vấn đề này. Các đoạn lặp này được gắn thêm vào đầu 3' của các sợi DNA nhờ sự xúc tác của *telomerase*, một enzyme *phiên mã ngược* (reverse transcriptase). Chẳng hạn, telomerase của *Tetrahymena* có một RNA dài 159 nucleotide có chứa trình tự 3'-CAACCCCAA-5' làm khuôn cho tổng hợp các đoạn lặp 5'-TTGGGG-3' (Về chi tiết, xem trong *Giáo trình Di truyền học* của cùng tác giả).

## IV. Phiên mã (Transcription) và các loại RNA ở prokaryote

### *1. Sơ lược về các gene*

Một cách tương đối, *gene (cistron) là một đoạn xác định của bộ gene mã hóa thông tin của một polypeptid hoặc một phân tử RNA chức năng*.

Ở các prokaryote và eukaryote bậc thấp, thường có một mối quan hệ đơn giản giữa gene và sản phẩm của nó (một gene - một sản phẩm). Hơn nữa, các gene đồng nghĩa với vùng mã hóa hay *khung đọc mở* (open reading frame). Nghĩa là, ở các prokaryote các gene liên quan về chức năng thường được tổ chức trong một *operon* (xem chương 3), vì thế có nhiều sản phẩm được dịch mã từ một *mRNA polycistron*. Trái lại, ở các eukaryote, các gene đồng nghĩa với *đơn vị phiên mã* (transcription unit) và hầu hết chúng được phiên mã dưới dạng *mRNA monocistron*.

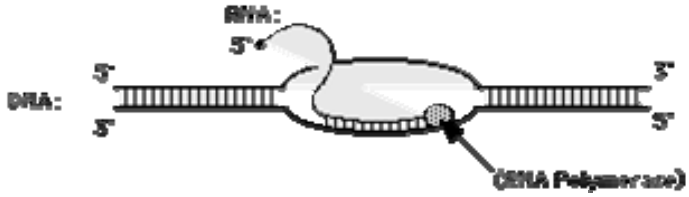
Ở các bộ gene eukaryote bậc cao, thường có một mối quan hệ phức tạp giữa gene và sản phẩm. Hầu hết các gene đều chứa các *intron* (các đoạn không mã hóa protein) nằm xen giữa các *exon* (các đoạn mã hóa protein). Các gene như vậy được gọi là *gene phân đoạn* (split gene), được Phillip

Sharp phát hiện đầu tiên năm 1977 (sẽ được đề cập sơ lược sau đây).

*2. Các nguyên tắc và đặc điểm chung của phiên mã*

*Phiên mã* (transcription) là quá trình tổng hợp các RNA khác nhau từ thông tin di truyền chứa đựng trong DNA. Trừ các gene mã hóa protein trong các operon ở vi khuẩn, nói chung, các RNA mới được tổng hợp chỉ là các *bản sao sơ cấp* (primary transcript) gọi là các pre-RNA. Các pre-RNA này phải trải qua một quá trình sửa đổi để trở thành các RNA trưởng thành (mature) trước khi tham gia vào quá trình sinh tổng hợp protein của tế bào.

Quá trình phiên mã DNA các đặc điểm chung sau đây (hình 2.12).




**Hình 2.12** Sự tổng hợp RNA trên một sợi khuôn của gene (DNA).

(i) Diễn ra dưới tác dụng của các enzyme *RNA polymerase*.

(ii) Chỉ một sợi đơn được dùng làm khuôn cho tổng hợp RNA, gọi là *sợi khuôn, sợi mã hoá* hay *sợi có nghĩa* (template/ coding / sense strand); còn sợi bổ sung được gọi là *sợi đối khuôn, sợi không mã hoá* hay *sợi đối nghĩa* (antitemplate/ non-coding / antisense strand).

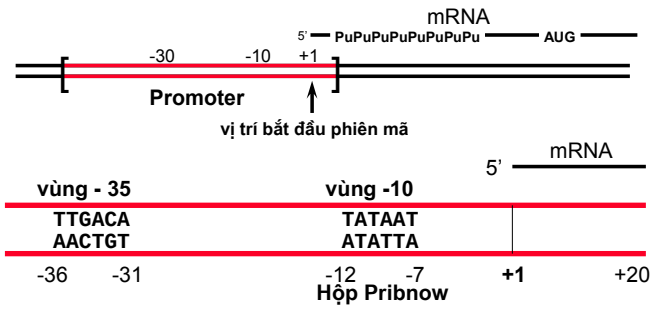
(iii) Phản ứng tổng hợp RNA diễn ra theo *nguyên tắc bổ sung* và được kéo dài theo chiều 5'→3', ngược với chiều của sợi khuôn.

(iv) Nguyên liệu cho tổng hợp gồm: ATP, UTP, GTP và CTP.

(v) Sản phẩm của phiên mã là các RNA sợi đơn.

(vi) Khởi đầu và kết thúc phiên mã phụ thuộc vào các tín hiệu điều hoà là các trình tự DNA đặc thù nằm trước gen (vùng khởi động) và sau gene.

*3. RNA polymerase và vùng khởi động (promoter) của prokaryote*




**Hình 2.13** Cấu trúc promoter của prokaryote.

Ở các prokaryote, RNA *polymerase hoàn chỉnh* (holoenzyme) là một phức hợp gồm nhân tố sigma (σ) và lõi enzyme. *Nhân tố* σ giúp RNA polymerase nhận biết và bám vào promoter để có thể bắt đầu phiên mã tại vị trí chính xác, và *lõi enzyme* đóng vai trò xúc tác tổng hợp RNA.

*Vùng khởi động* (promoter) nói chung nằm kề trước gene và có chứa các trình tự đặc thù cho phép RNA polymerase nhận biết và bám vào. Trình tự quan trọng nhất của promoter là *hộp TATA* hay *hộp Pribnow* (Pribnow box) ở vị trí "-10". Ngoài ra, còn có trình tự TTGACA ở vị trí "-35", gọi là *đoạn nhận biết* (recognition sequence). Các vùng này được bảo tồn cao.

*4. Các giai đoạn của quá trình phiên mã ở prokaryote*

- *Khởi đầu*: RNA polymerase holoenzyme nhận biết và bám vào promoter, tháo xoắn một đoạn khoảng 12 cặp base. Sau khi tổng hợp ribonucleotide đầu tiên (Appp hoặc Gppp), nhân tố sigma tách ra để đi vào một chu kỳ phiên mã khác, gọi là *chu kỳ sigma* (sigma cycle).

- *Kéo dài*: Enzyme lõi tổng hợp sợi RNA dọc theo sợi khuôn.

- *Kết thúc*: Khi phiên mã xong hai vùng giàu GC và AT nằm sau gene, ở vùng đuôi của sợi RNA hình thành cấu trúc "kẹp cài tóc" (hairpin loop) làm dừng sự phiên mã của lõi RNA polymerase. Cuối cùng, dưới tác dụng của nhân tố *rho* (ρ), sợi RNA và enzyme lõi được giải phóng khỏi DNA khuôn.

*5. Ba loại RNA ở tế bào prokaryote*

Có ba loại RNA tham gia vào quá trình sinh tổng hợp protein ở các tế bào: *RNA thông tin* (messenger RNA = mRNA), *RNA vận chuyển* (transfer RNA = tRNA) và *RNA ribosome* (ribosomal RNA = rRNA). Bảng 2.4 cho thấy hàm lượng tương đối (%) và kích thước của các RNA ở *E. coli*.

***Bảng 2.4*** *Các phân tử RNA ở* E. coli

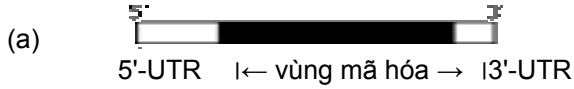
| Loại RNA | | Chức năng | (%) | TLPT | Số nucleotide |
|---|---|---|---|---|---|
| mRNA | | Mã hoá các protein | 5 | Biến thiên | Biến thiên |
| tRNA | | Mang amino acid | 15 | $2,5.10^1$ | ~ 75 |
| rRNA | 5S | Thành phần ribosome | 80 | $3,6.10^1$ | 120 |
| | 16S | Thành phần ribosome | | $0,55.10^3$ | 1542 |
| | 23S | Thành phần ribosome | | $1,2.10^3$ | 2904 |

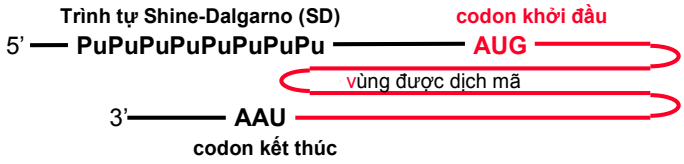
5.1. Các mRNA

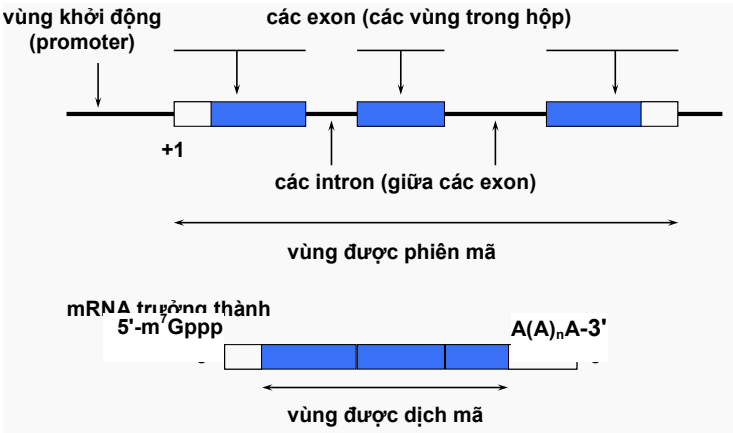
Các mRNA là loại RNA quan trọng nhất được dùng làm khuôn cho quá trình tổng hợp các chuỗi polypeptide. Chúng có cấu trúc mạch thẳng, với ba phần chính (Hình 2.14a): *vùng 5′ không được dịch mã* (5'UTR);

*vùng mã hoá* (coding region); và *vùng 3' không được dịch mã* (3'-UTR).

Các mRNA prokaryote và eukaryote khác nhau chủ yếu ở vùng mã hoá: mRNA prokaryote có dạng polycistron, còn mRNA eukaryote - monocistron và một số chi tiết ở các vùng 5'-và 3'-UTR (Hình 2.14b-c).




**Hình 2.14** Cấu trúc ba vùng chính của mRNA nói chung (a); của mRNA prokaryote (b) và mRNA eukaryote (c).

5.2. Các tRNA

Các tRNA có hai chức năng chính là mang amino acid và đọc mã trên mRNA. Có 86 tRNA ở *E. coli*. Hầu hết các tRNA có khoảng 75-80 nucleotide và có *cấu trúc bậc hai* mở rộng do các tương tác cặp base (A-U và G-C) ở một số đoạn của chúng cũng như *cấu trúc bậc ba* (không phải dạng siêu xoắn, mà nó có kiểu uốn gập thêm nữa trong không gian ba chiều). Trong thành phần nucleotide của các tRNA có khá nhiều base hiếm tập trung ở các *vòng thân* như: 5',6'-dihydrouridine (DHU), inosine (I), ribothymidine (T), pseudouridine (Ψ) v.v. (Hình 2.15).

Nói chung, các phân tử tRNA thường rất giống nhau ở nhiều đoạn và khác nhau chủ yếu ở *bộ ba đối mã* (anticodon). Mỗi tRNA thường có 3-4 vòng trên thân (tính từ đầu 5') với chức năng khác nhau như sau:

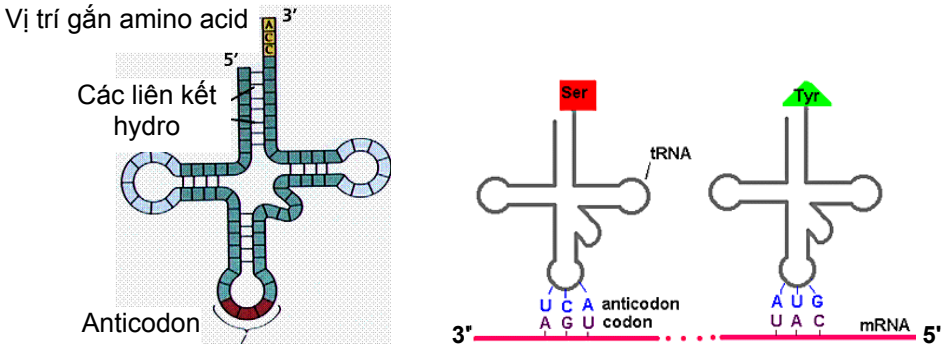
(i) *vòng DHU* nhận biết aminoacyl-tRNA synthetase;

(ii) *vòng anticodon* đọc mã mRNA bằng sự kết cặp anticodon-codon;

(iii) *vòng "phụ"* (extra loop) có thể không có ở một số tRNA;

(iv) *vòng TΨC* nhận biết ribosome để đi vào đúng "vị trí A" .

Và cuối cùng, *đoạn mạch thẳng -CCA* ở đầu 3' là vị trí gắn vào của amino acid đã được hoạt hoá để tạo thành aminoacyl-tRNA.




**Hình 2.15** Cấu trúc của một tRNA (trái) và các chức năng chính của nó.

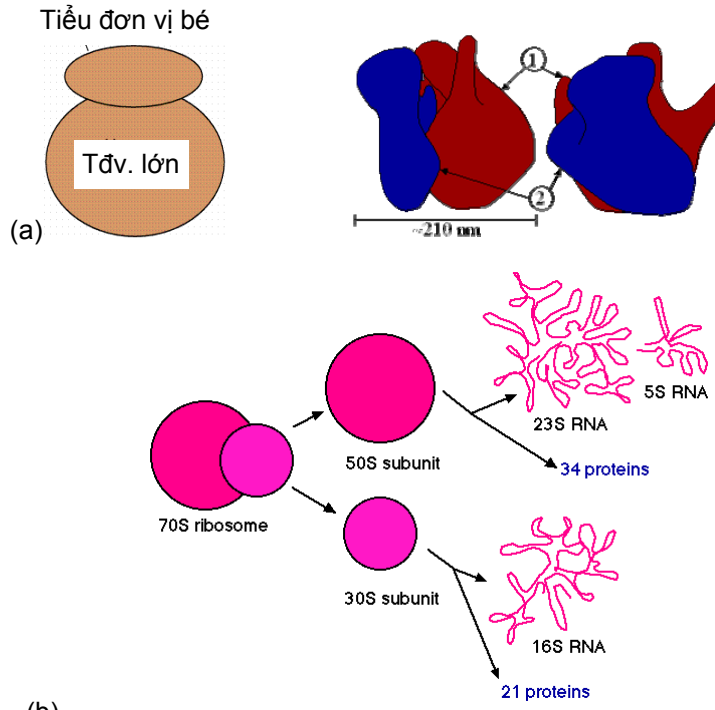
5.3. Các rRNA và ribosome

Các rRNA cùng với các protein đặc thù là những thành phần cấu trúc nên các ribosome -"nhà máy" tổng hợp protein của tế bào. Ở vi khuẩn có 3 loại rRNA với hệ số lắng là 23S, 16S và 5S (Hình 2.16). Ở tế bào eukaryote có 4 loại rRNA với các hệ số lắng là 28S, 18S, 5,8S và 5S.

Các hợp phần cấu tạo các ribosome của prokaryote và eukaryote được giới thiệu ở Bảng 2.5. Mỗi ribosome hoàn chỉnh có hai *tiểu đơn vị bé* và *lớn*. Tiểu đơn vị bé bám vào mRNA trước tiên trong dịch mã. Tiểu đơn vị lớn chứa hai vị trí: vị trí A là nơi bám vào của aminoacyl-tRNA và vị trí P - tiếp nhận peptidyl-tRNA và có chứa *peptidyl transferase*.

***Bảng 2.5*** *Thành phần cấu tạo của các ribosome (R) ở pro- và eukaryote*

| | **Thành phần** | **R 70S ở vi khuẩn** | **R 80S ở eukaryote** |
|---|---|---|---|
| Tiểu đơn vị bé | rRNA | 16S | 18S |
| | Protein | 21 phân tử | 33 phân tử |
| Tiểu đơn vị lớn | rRNA | 23S + 5S | 28S + 5S + 5,8S |
| | Protein | 35 phân tử | 49 phân tử |
| Đường kính | | 18-20 nm | 20-22 nm |




**Hình 2.16** Sơ đồ tổng quát của một ribosome với hai tiểu đơn vị: 1- lớn và 2- bé (a); và các thành phần cấu trúc của một ribosome vi khuẩn (b).

## V. Cơ chế dịch mã (translation)

*1. Mã di truyền*

1.1. Giải mã di truyền

Năm 1961, S.Brenner, F.Crick và L.Barnett đã phân tích chi tiết nhiều thể đột biến của phage T4 nhận được nhờ xử lý acridin, đã khẳng định *đơn vị mã* (*codon*) gồm ba nucleotide xác định một amino acid.

Cũng trong năm 1961, M. Nirenberg và H. Matthaei lần đầu tiên sử dụng mRNA nhân tạo có thành phần base biết trước được tổng hợp bằng enzyme *polynucleotide phosphorylase* và hệ thống tổng hợp là dịch chiết tế bào *E. coli* bao gồm đầy đủ các yếu tố cần thiết cho tiến hành giải *mã di truyền* (genetic code) *in vitro*. Với mRNA chỉ chứa toàn U, poly(U), chuỗi polypeptide sinh ra chỉ chứa toàn phenylalanine (Phe).

Sau đó, Khorana sử dụng các mRNA tổng hợp có chứa nhiều hơn một nucleotide được kết nối lặp lại để giải mã *in vitro*. Chẳng hạn, với mRNA nhân tạo chứa hai base là poly(UC) và thu được một polypeptide gồm hai amino acid luân phiên nhau là serine và leucine, poly(Ser-Leu). Việc giải mã di truyền được hoàn thành vào tháng 6/1966. Với công lao to lớn đó Khorana và Nirenberg được trao giải thưởng Nobel năm 1968 (Bảng 2.6).

***Bảng 2.6*** *Mã di truyền (cho các codon trên mRNA theo chiều 5'→3')*

| | U | | C | | A | | G | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| U | UUU<br>UUC | Phenyl-alanine | UCU<br>UCC<br>UCA<br>UCG | Serine | UAU<br>UAC | Tyrosine | UGU<br>UGC | Cysteine | U<br>C |
| | UUA<br>UUG | Leucine | | | UAA<br>UAG | Stop codon<br>Stop codon | UGA<br>UGG | Stop codon<br>Tryptophan | A<br>G |
| C | CUU<br>CUC<br>CUA<br>CUG | Leucine | CCU<br>CCC<br>CCA<br>CCG | Proline | CAU<br>CAC | Histidine | CGU<br>CGC<br>CGA<br>CGG | Arginine | U<br>C<br>A<br>G |
| | | | | | CAA<br>CAG | Glutamine | | | |
| A | AUU<br>AUC<br>AUA | Isoleucine | ACU<br>ACC<br>ACA<br>ACG | Threonine | AAU<br>AAC | Asparagine | AGU<br>AGC | Serine | U<br>C |
| | AUG | Methionine; initiation codon | | | AAA<br>AAG | Lysine | AGA<br>AGG | Arginine | A<br>G |
| G | GUU<br>GUC<br>GUA<br>GUG | Valine | GCU<br>GCC<br>GCA<br>GCG | Alanine | GAU<br>GAC | Aspartic acid | GGU<br>GGC<br>GGA<br>GGG | Glycine | U<br>C<br>A<br>G |
| | | | | | GAA<br>GAG | Glutamic acid | | | |

1.2. Các đặc tính của mã di truyền

- *mã bộ ba* (triplet code): bộ ba mã hoá của mRNA gọi là *codon* (mã) và bộ ba tương ứng của tRNA gọi là *anticodon* (đối mã).

- *không gối lên nhau* và được đọc theo chiều 5'→3'.

- có tính liên tục, *không bị ngắt quãng* (unpunctuated).

- có các codon *khởi đầu* (AUG) và *kết thúc* (UAA,UAG vàUGA).

- có tính *thoái hóa* (xem bảng 6.2); và sự đọc mã trên thực tế diễn ra theo nguyên tắc kết cặp linh hoạt anticodon (base 5')-codon (base 3').

- có tính *phổ biến*, thống nhất cho toàn bộ sinh giới.

*2. Dịch mã*

*Dịch mã* (translation) là quá trình sinh tổng hợp protein diễn ra trong tế bào chất, được chia làm hai giai đoạn sau đây.

2.1. Hoạt hoá amino acid

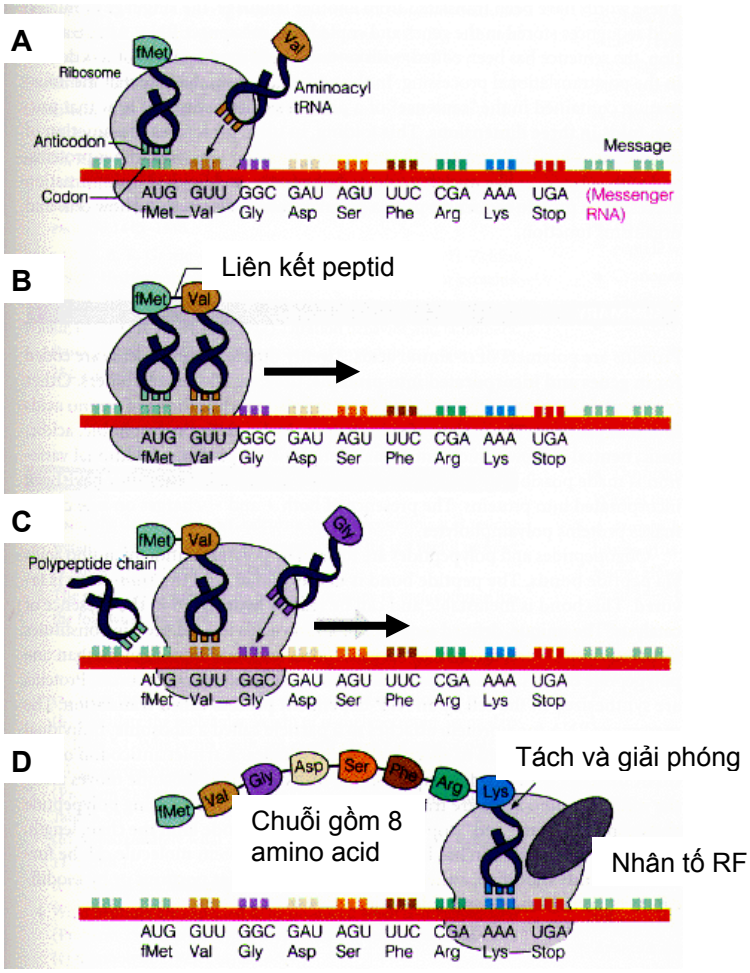
Đây là quá trình tạo nguồn các *aminoacyl-tRNA* cho dịch mã. Mỗi amino acid được đính vào tRNA thích hợp thông qua hai phản ứng nhờ enzyme *aminoacyl-tRNA synthetase* đặc thù cùng với ATP và $Mg^{2+}$.

$$R{-}CH(NH_2){-}COOH + ATP \rightarrow R{-}CH(NH_2){-}CO{\sim}AMP + PP$$

$$R{-}CH(NH_2){-}CO{\sim}AMP + tRNA \rightarrow R{-}CH(NH_2){-}CO{\sim}tRNA + AMP$$

2.2. Cơ chế của quá trình dịch mã (tổng hợp polypeptide)

*Mở đầu* (initiation): Quá trình dịch mã bắt đầu khi một tiểu đơn vị ribosome bé bám vào mRNA tại vị trí của codon khởi đầu AUG. Lúc này một phân tử tRNA khởi đầu đặc thù mang methionine (ở vi khuẩn là formyl-Met) đi vào và khớp anticodon của nó với codon mở đầu của mRNA. Kế đó, tiểu đơn vị ribosome lớn bám vào tiểu đơn vị bé tạo ra một ribosome hoạt động hoàn chỉnh. Lúc này Met-tRNA ở vị trí P và vị trí A để trống; một tRNA thứ hai (ví dụ, $tRNA^{Val}$) đi vào vị trí A và khớp với codon thứ hai (hình 2.17A).




**Hình 2.17** Quá trình tổng hợp chuỗi polypeptide.

*Kéo dài* (elongation): Quá trình kéo dài bắt đầu sau khi liên kết peptide đầu tiên được hình thành. Phản ứng này được xúc tác bởi enzyme *peptidyl transferase*, và kết quả là tạo ra một peptidyl-tRNA ở vị trí A (hình

2.17B). Sau đó, ribosome lập tức chuyển dịch sang một codon mới dọc theo mRNA theo chiều 5'→3' (hình 2.17C). Phản ứng này đẩy phân tử tRNA tự do vốn ở vị trí P ra ngoài; lúc này peptidyl-tRNA nằm ở vị trí P và vị trí A lại để trống. Một chu kỳ dịch mã mới lại bắt đầu, một aminoacyl-tRNA thứ ba đi vào và khớp anticodon của nó với codon đang để trống ở vị trí A, một liên kết peptide thứ hai được hình thành, và ribosome lại dịch chuyển sang codon kế tiếp. Quá trình nói trên cứ diễn ra một cách tuần tự dọc theo mRNA làm cho chuỗi polypeptide dài dần ra cho đến dịch mã xong codon có nghĩa cuối cùng.

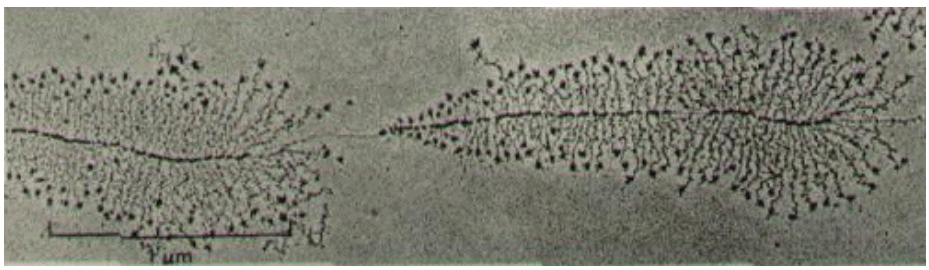
*Kết thúc* (termination): Quá trình tổng hợp polypeptide sẽ dừng lại khi codon kết thúc của mRNA đối diện với vị trí A. Lúc này *nhân tố giải phóng* RF (release factor) đi vào (Hình 2.17D); chuỗi polypeptide được tách ra và phóng thích cùng với hai tiểu đơn vị ribosome cũng như tRNA ra khỏi mRNA.

★ *Lưu ý*:

(1) Thực ra, trên một mRNA có rất nhiều ribosome cùng hoạt động, gọi là *polysome*, tạo ra nhiều polypeptide giống nhau.

(2) Trên nguyên tắc, amino acid mở đầu sẽ được cắt bỏ khỏi chuỗi polypeptide. Tuy nhiên, ở các eukaryote không phải lúc nào amino acid mở đầu này cũng bị tách bỏ, mà trong một số protein nó vẫn được giữ lại.

(3) Sau tổng hợp, các chuỗi polypeptide sẽ được sửa đổi và chuyển sang các bậc cấu trúc cao hơn để trở thành các protein chức năng. Thực ra sự biến đổi sau dịch mã còn có các chaperone và nhiều cơ chế tác động phức tạp khác nữa.




**Hình 2.18** Vi ảnh điện tử chỉ ra tính đồng thời của hai quá trình phiên mã và dịch mã ở tế bào vi khuẩn (Nguồn: Kimball 2004).

(4) Tham gia vào các bước mở đầu, kéo dài và kết thúc còn có các yếu tố protein, với tên gọi tương ứng là các *nhân tố mở đầu*, *kéo dài*, và *giải phóng* cùng với ATP, GTP và các ion $Mg^{2+}$, $K^+$ và $NH^+_4$.

(5) Trong các tế bào prokaryote, các ribosome và các aminoacyl-tRNA sẽ bám vào đầu 5' của mRNA để bắt đầu quá trình dịch mã trong khi ở đầu

3' của nó quá trình phiên mã đang còn tiếp diễn. Ngược lại, ở các tế bào eukaryote, các pre-mRNA phải trải qua sửa đổi sau phiên mã ở trong nhân, còn dịch mã diễn ra sau đó trong tế bào chất (Hình 2.18).

(6) Về *RNA đối nghĩa* (antisense RNA), đây là loại RNA thấy có ở nhiều hệ thống, nhưng rất phổ biến ở các vi khuẩn. Nó được tổng hợp từ sợi đối nghĩa của gene, nên bổ sung với mRNA và có thể tạo thành một sợi kép với nó để gây kìm hãm dịch mã. Vì vậy RNA đối nghĩa còn được gọi là *RNA bổ sung gây nhiễu mRNA*, và được ứng dụng hiệu quả trong điều trị ung thư.

## Câu hỏi và Bài tập

1. Mô hình Watson-Crick cho phép giải thích các kết quả của Chargaff như thế nào và gợi ý khả năng tự tái bản của DNA ra sao?

2. Thế nào là nguyên tắc bổ sung? Nguyên tắc này được biểu hiện như thế nào trong các cơ chế di truyền ở cấp độ phân tử? và có ý nghĩa gì?

3. Phân tích vai trò các enzyme và cơ chế tái bản DNA ở prokaryote.

4. Phân tích đặc điểm cấu trúc của RNA polymerase, promoter và cơ chế phiên mã ở prokaryote.

5. Nêu vai trò của các yếu tố tham gia vào quá trình sinh tổng hợp protein của tế bào và giải thích cơ chế dịch mã dựa trên sự tương tác giữa các aminoacyl~tRNA, mRNA và ribosome.

6. Bằng thực nghiệm vấn đề mã di truyền đã được giải quyết như thế nào? Phân tích các đặc tính của mã di truyền và cho ví dụ.

7. Phân tích sự phù hợp giữa cấu trúc và chức năng của các loại RNA.

8. (a) Hàm lượng GC của DNA phage T3 là 53%. Bạn sẽ kỳ vọng hàm lượng G+C của mRNA T3 ra sao? (b) Nếu biết được hàm lượng purine của DNA phage T3 và không biết mạch nào làm khuôn, có thể dự đoán hàm lượng purine của mRNA T3 hay không? Tại sao, hoặc tại sao không?

9. Nếu sử dụng các phân tử mRNA nhân tạo có thành phần gồm các cụm gồm ba hoặc bốn nucleotide lặp lại dưới đây để tiến hành tổng hợp protein *in vitro*, thành phần amino acid thu được từ các polypeptide sẽ như thế nào? Có trường hợp nào không tổng hợp được protein? Tại sao?

(a) $(UUC)_n$ ; (b) $(UAC)_n$ ; (c) $(GAUA)_n$ ; (d) $(GUAA)_n$.

10. So sánh cấu trúc của một gene và bản sao RNA tương ứng của nó ở các prokaryote và eukaryote.

# Tài liệu Tham khảo

**Tiếng Việt**

Phạm Thành Hổ. 2000. *Di truyền học*. Tái bản lần II, NXB Giáo Dục.

Hoàng Trọng Phán. 1995. *Một số vấn đề về Di truyền học hiện đại* (Tài liệu BDTX cho giáo viên THPT chu kỳ 1993-1996). Trường ĐHSP Huế.

Hoàng Trọng Phán. 1997. *Di truyền học Phân tử*. NXB Giáo Dục.

**Tiếng Anh**

Bastia D, Manna AC, Sahoo T. 1997. Termination of DNA replication in prokaryotic chromosomes. In: *Genetic Engineering, Vol. 19*. (Setlow JK Ed.) pp 101-119. Plenum Press, New York, USA.

Cambridge Healthtech Institut. 2005. *Gene Definition; RNA Glosary*. http://www.healthtech.com

Charlebois, R. 1999. *Organization of the Prokaryotic Genome*. ASM Press, Washington, D.C.

Chen C. 1996. www.ym.edu.tw/ig/cwc/end_troubles/End_Troubles.html

Cole, S., and I. Saint-Girons. 1999. *Bacterial genomes - all shapes and sizes.* In R. Charlebois (ed.), Organization of the prokaryotic genome, pp. 35-62. ASM Press, Washington DC.

Cooper DN. 2004. *Gene structure, function and expression*. www.cardiff.ac.uk/medicine/medical_genetics/study/medical_teaching/

DOE Microbial Genome Program Report. 2005. http://www.www.ornl.gov/hgmis/publicat/microbial/13doeproj.html

Greider CW and Blackburn EH. 1996. Telomere, Telomerase and Cancer. *Scientific American*, 2/96, p.92: < http://www.genethik.de/telomerase.htm >

Kelman Z, O'Donell M. 1994. DNA replication: enzymology and mechanisms. In: *Current Opinion in Genetics & Development* (Stillman B and Green M, eds.),Vol.4(2): 185-195. Current Biology Ltd, UK.

Kimball J. 2004. http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/

Kobryn K, Chaconas G. 2001. The circle is broken: telomere resolution in linear replicons. Curr Opin Microbiol. 4(5): 558-564.

Lewin B. 1999. *Genes VI*. Oxford University Press, Oxford.

Miller, J. 1992. A short course in bacterial genetics handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

Peterson, S., and C. Fraser. 2001. The complexity of simplicity. *Genome Biology* 2: 1-8.

Russell PJ. 2003. *Essential Genetics*. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, Menlo Park, CA.

Maloy, S. 2006. *Microbial Genetics*.

http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/other-bacteria.html

Suwanto, A and S. Kaplan. 1992. Chromosome transfer in *Rhodobacter sphaeroides*: Hfr formation and genetic evidence for two unique circular chromosomes. *J. Bacteriol*. 174: 1135-1145.

TIGR Microbial Genome Database.2005.

http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbcomplete.html

Trucksis et al. 1998. The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 95: 14464-14469.

Volff, J.-N., and J. Altenbuchner. 2000. A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *FEMS Microbiol. Lett*. 186: 143-150.

Weaver RF, Hedrick PW. 1997. *Genetics*. 3rd ed, McGraw-Hill Companies, Inc. Wm.C.Browm Publishers, Dubuque, IA.

Yang CC, Huang CH, Li CY, Tsay YG, Lee SC, Chen CW. 2002. The terminal proteins of linear *Streptomyces* chromosomes and plasmids: a novel class of replication priming proteins. *Mol Microbiol*. 43(2): 297-305.

# Chương 3
# Điều hoà Biểu hiện Gene ở Vi khuẩn

Ở chương trước, chúng ta đã tìm hiểu cấu trúc và các cơ chế hoạt động của gene - phiên mã và dịch mã. Tuy nhiên, trên thực tế, các gene không tồn tại riêng rẽ và hoạt động như những thực thể biệt lập, với một cường độ ổn định. Trái lại, giữa các gene trong bộ gen có sự kiểm soát lẫn nhau và sự hoạt động của chúng còn phụ thuộc vào các điều kiện môi trường cụ thể. Có thể nói rằng bộ gene của tế bào là một hệ thống mở có khả năng tự điều chỉnh, đảm bảo sự hoạt động của các gene diễn ra hợp lý trước điều kiện cụ thể của môi trường (trong quá trình phát triển cá thể).

Trong chương này, chúng ta sẽ tìm hiểu một số cơ chế điều hoà biểu hiện của các gene liên quan tới sự chuyển hoá ở vi khuẩn: (i) Các nguyên lý điều hoà; (ii) Mô hình operon; (iii) Điều hoà âm tính của các operon cảm ứng - *lac* operon; (iv) Điều hoà âm tính của các operon ức chế - *trp* operon; (v) Điều hoà dương tính *lac* operon; (vi) Sự kết thúc phiên mã sớm ở *trp* operon; (vii) Sự tự điều hoà; và (viii) Điều hoà ở mức dịch mã.

## I. Các nguyên lý điều hoà

Cho đến nay, các cơ chế điều hoà được hiểu rõ nhất là các cơ chế được sử dụng bởi các vi khuẩn và phage. Trong các hệ thống này, *hoạt động điều hoà mở-đóng* (on-off regulatory activity) xảy ra thông qua kiểm soát sự phiên mã ở chỗ: sự tổng hợp một mRNA (mở) cụ thể chỉ xảy ra khi sản phẩm của gene được cần đến và bị kìm hãm (đóng) khi sản phẩm này không thực sự cần đến. Đó chính là cơ chế liên hệ ngược (feed-back). Trong trường hợp sau, nói cho đúng là sự phiên mã diễn ra rất thấp, với một ít sản phẩm gene có mặt.

Ở các vi khuẩn, khi một vài enzyme hoạt động theo một trình tự trong một con đường chuyển hoá thì thường hoặc là tất cả các enzyme này được sinh ra hoặc không. Hiện tượng này gọi là *điều hoà phối hợp* (coordinate regulation), do mRNA của các prokaryote thuộc kiểu polycistron.

Một số cơ chế diều hoà phiên mã có tính phổ biến; một cơ chế cụ thể được sử dụng thường phụ thuộc vào các enzyme được điều hoà hoạt động trong các con đường chuyển hóa thuộc kiểu phân giải (dị hoá) hay tổng hợp (đồng hoá). Chẳng hạn, trong một hệ thống phân giải nhiều bước thì sự có sẵn các phân tử để phân giải thường xác định việc tổng hợp các enzyme trong con đường chuyển hoá đó. Trái lại, trong con đường sinh tổng hợp, sản phẩm cuối của con đường chuyển hoá này thường đóng vai trò là phân tử điều hoà. Ngay cả trong một hệ thống mà trong đó một phân

tử protein (không nhất thiết phải là một enzyme) được dịch mã từ một mRNA monocistron, protein đó có thể *tự điều hoà* (autoregulated) - nghĩa là, bản thân nó có thể kìm hãm sự khởi đầu phiên mã và nồng độ cao của protein này sẽ khiến cho tổng hợp mRNA của nó ít lại.

Các cơ chế phân tử đối với mỗi một kiểu điều hoà sai khác nhau rất lớn nhưng thường rơi vào một trong hai tiêu chí chính yếu sau: *điều hoà âm tính* (negative regulation) và *điều hoà dương tính* (positive regulation). Trong hệ thống được điều hoà theo kiểu âm tính, *chất ức chế* (inhibitor/ repressor) có mặt trong tế bào và gây cản trở phiên mã. Một chất đối lập của chất ức chế, gọi chung là *chất cảm ứng* (inducer), cần thiết cho sự khởi đầu phiên mã. Trong hệ thống được điều hoà theo kiểu dương tính, phân tử hiệu ứng (có thể là một protein) kích hoạt vùng khởi động (promoter) làm tăng cường hiệu quả phiên mã. Cần lưu ý rằng, sự điều hoà âm tính và dương tính không phải loại trừ lẫn nhau, và một số hệ thống được điều hoà theo cả hai cách này bằng cách sử dụng hai chất điều hoà để đáp ứng với các điều kiện khác nhau trong tế bào.

Một hệ thống phân giải có thể được điều hoà hoặc dương tính hoặc âm tính. Trong con đường sinh tổng hợp, sản phẩm cuối cùng thường điều hoà âm tính sự tổng hợp của riêng nó; ở kiểu điều hoà âm tính đơn giản nhất, sự vắng mặt của sản phẩm này làm tăng cường sự tổng hợp ra nó và sự có mặt của sản phẩm lại làm giảm mức tổng hợp của nó.

Các phương thức điều hoà ở các prokaryote rõ ràng là đơn giản hơn và được hiểu rõ hơn so với ở các eukaryote, mặc dù lượng thông tin có được về các hệ thống eukaryote đang được tích luỹ với một tốc độ phi thường.

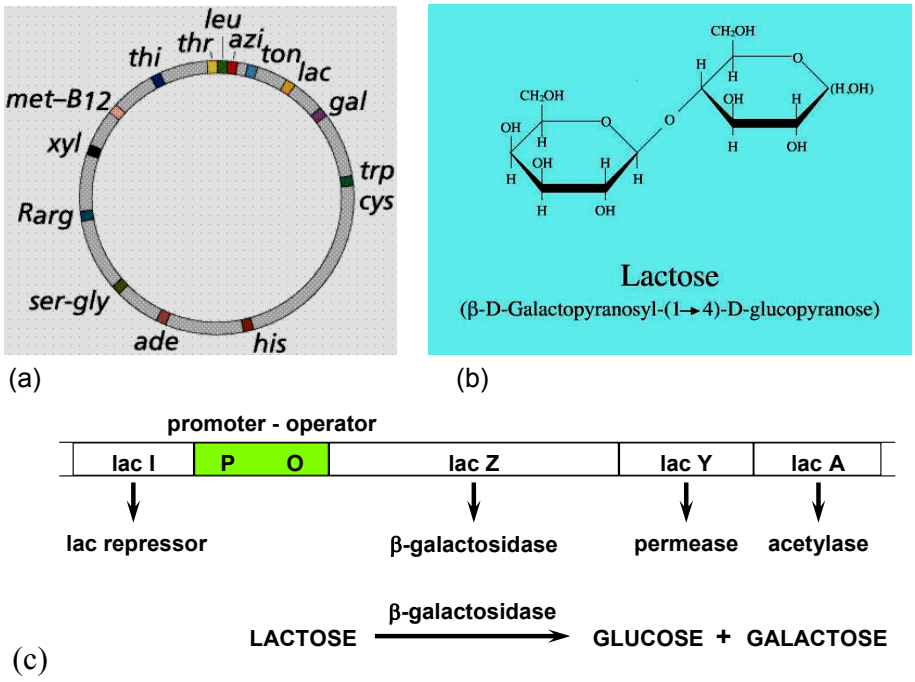
## II. Mô hình Operon

Phần lớn các gene trong bộ gen vi khuẩn được tổ chức thành các đơn vị hoạt động chức năng đặc trưng, gọi là các *operon*. Các gene cấu trúc trong một operon được điều hoà chung trong quá trình chuyển hoá một hợp chất nhất định của tế bào. Lần đầu tiên vào năm 1961, Francois Jacob và Jacques Monod (France) đề xuất *giả thuyết operon* để giải thích sự điều hoà quá trình sinh tổng hợp protein ở vi khuẩn - các enzyme tham gia vào con đường hấp thụ và phân giải đường lactose - operon lactose (*lac* operon). Đây là operon được nghiên cứu kỹ nhất cho đến nay (Hình 3.1).

*Operon* là đơn vị tổ chức và hoạt động gene đặc trưng của các bộ gene prokaryote; nó là một phức hợp liên kết chặt chẽ giữa *vùng khởi động* (promoter) cùng với *yếu tố chỉ huy* (operator) và *nhóm gene cấu trúc* do yếu tố này trực tiếp kiểm soát. (Vì vậy nó được gọi là operon).

Tham gia vào điều hòa hoạt động của một operon gồm có bốn yếu tố

thuộc hai thành phần chính: (i) *các locus cấu trúc* (structural loci) và (ii) *các locus điều hòa* (regulatory loci); trong đó nhóm sau bao gồm yếu tố chỉ huy (operator), vùng khởi động (promoter) và gene điều hòa (regulator gene).




**Hình 3.1** (a) Nhiễm sắc thể *E. coli* với vị trí tương đối của các operon khác nhau. (b) Cấu trúc phân tử đường lactose; và (c) mô hình operon lactose và chức năng của nó - sản sinh các enzyme hấp thụ và phân giải đường lactose.

- Một nhóm *các gene cấu trúc* (structural genes) liên quan với nhau về mặt chức năng xếp cạnh nhau, khi phiên mã sẽ tạo ra một phân tử mRNA chung gọi là *mRNA đa cistron* (polycistronic mRNA). Các enzyme được dịch mã từ một mRNA này sẽ tham gia vào quá trình chuyển hoá (đồng hoá hoặc dị hoá) cụ thể, một chuỗi các phản ứng sinh hoá gồm nhiều khâu nối tiếp hoặc có quan hệ dạng lưới phức tạp.

- Một *yếu tố chỉ huy* (operator = O): trình tự DNA nằm kế trước nhóm gene cấu trúc, là vị trí tương tác với chất ức chế.

- Một *vùng khởi động* (promotor region = P): trình tự DNA nằm trước yếu tố chỉ huy và có thể trùm lên một phần hoặc toàn bộ vùng này, là vị trí bám vào của RNA polymerase để có thể khởi đầu phiên mã tại vị trí chính xác ở sợi khuôn.

- Một *gene điều hoà* hay còn gọi là *gene ức chế* (regulatory/ inhibitory

gene = R/I): Gene này sinh ra loại protein điều hoà gọi là *chất ức chế* (repressor) điều hòa hoạt động của nhóm gene cấu trúc thông qua sự tương tác với yếu tố chỉ huy. Mặc dù mỗi gene điều hòa có một vùng khởi động riêng và không có yếu tố chỉ huy, đôi khi người ta vẫn coi chúng là một operon điều hòa; gene này sinh ra chất ức chế một cách ổn định.

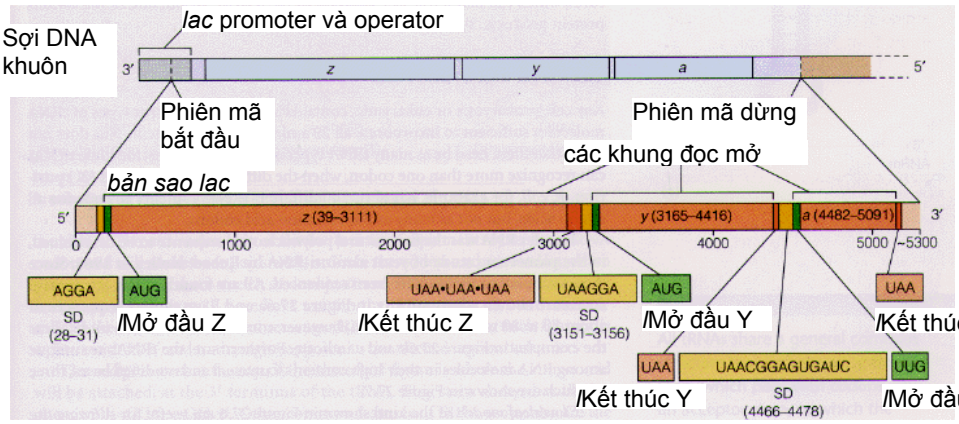
## III. Điều hoà âm tính của các operon cảm ứng: *lac* operon

Đại diện cho tất cả các operon của các loại đường di- và polysaccharide (mà vi khuẩn sử dụng như một nguồn cung cấp các hợp chất carbon và năng lượng) là operon lactose ở *E. coli*.

Operon lactose có chức năng sản sinh các enzyme tham gia vào quá trình hấp thụ và phân giải đường lactose (một disacharide) thành galactose và glucose. Nó chỉ hoạt động khi có mặt đường lactose, vì vậy lactose được gọi là chất cảm ứng và *lac* operon được gọi là *operon cảm ứng* (inducible) hay *operon dị hoá* (catabolite). Nói đúng ra, chất cảm ứng là allolactose; *lactose* (liên kết galactosid dạng β-1,4) bị biến đổi thành chất trung gian trong quá trình thuỷ phân lactose dưới tác dụng của β-galactosidase, gọi là *allolactose* (liên kết β-1,6).

*1. Cấu trúc của* lac *operon*

Các thành phần của *lac* operon ở *E. coli* như sau (Hình 3.1 và 3.2):




**Hình 3.2** Cấu trúc chi tiết các vùng khác nhau của operon lactose.

- Nhóm *các gene cấu trúc* bao gồm ba gene: *lacZ*, *lacY* và *lacA* (nói gọn là Z, Y và A)*;* trong đó *lacZ* mã hoá cho *β galactosidase* (thuỷ phân lactose), *lacY* mã hoá cho *permease* (vận chuyển lactose qua màng) và *lacA* mã hoá *transacetylase* (chức năng không rõ ràng; theo ý nghĩa nó không phải là enzyme liên quan trực tiếp đến sự chuyển hoá lactose).

- Y*ếu tố chỉ huy* (*lac* operator) là trình tự DNA dài ~34 cặp base cách

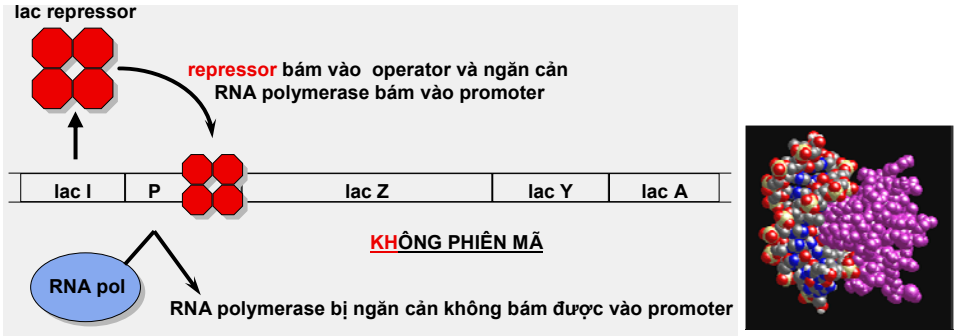
gene *Z* chừng 10 cặp base về phía trước, là vị trí tương tác với chất ức chế. Nó chứa trình tự 24 cặp base đối xứng xuôi ngược, giúp chất ức chế (*lac* repressor) có thể nhận biết và bám vào bằng cách khuếch tán dọc theo DNA từ cả hai phía.

- V*ùng khởi động* (*lac* promotor) là đoạn DNA dài chừng 90 cặp base nằm trước và trùm lên *lac* operator 7 cặp base. Nó chứa hai vị trí tương tác với RNA polymerase và với protein hoạt hoá dị hoá (catabolite activator protein = CAP, hoặc CRP - xem mục V). Điểm khởi đầu phiên mã là vị trí gần cuối của *lac* promoter.

- *Gene điều hoà* (regulatory gene) nằm trước vùng khởi động, mã hoá một protein ức chế gồm bốn polypeptide giống nhau, gọi là tứ phân (tetramer), đều chứa 360 amino acid.

*2. Cơ chế điều hoà âm tính của* lac *operon*

Khi trong môi trường nuôi cấy *E. coli* vắng mặt lactose (allolactose, chất cảm ứng) thì *lac* operon không hoạt động, nghĩa là các enzyme tham gia hấp thụ và phân giải lactose không được sinh ra. Nguyên nhân là do chất ức chế của operon (*lac* repressor) vốn tự thân có hoạt tính, bám chặt vào yếu tố chỉ huy (*lac* operator) và gây kìm hãm sự phiên mã của các gene cấu trúc Z, Y và A (Hình 3.3). Do đó các sản phẩm enzyme của *lac* operon không được tạo ra; tức biểu hiện âm tính.

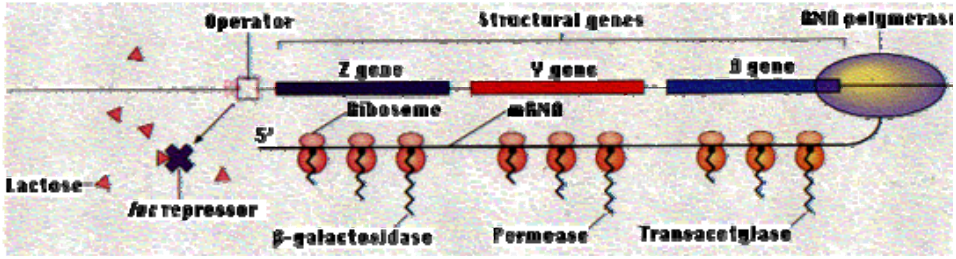



(a) (b)

**Hình 3.3** (a) Chất ức chế bám chặt *lac* operator gây ức chế phiên mã; (b) Mô hình *lac* operator (rìa trái) bị bám chặt bởi protein ức chế (rìa phải).

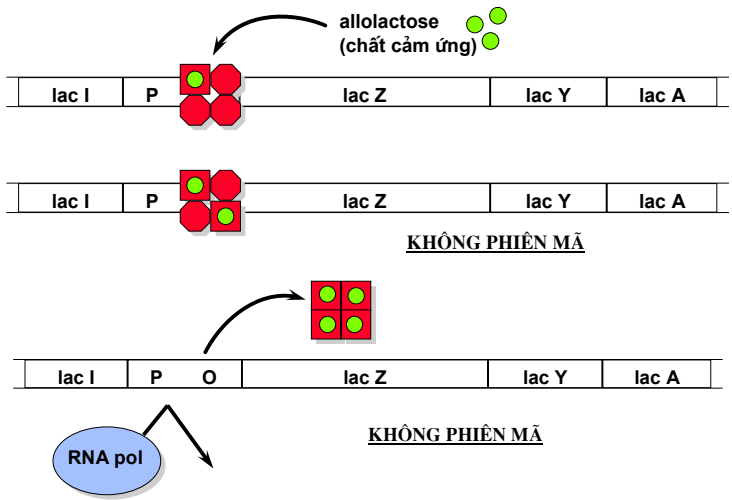
Ngược lại, nếu bổ sung lactose vào môi trường thì một thời gian sau vi khuẩn sẽ bắt đầu hấp thụ và phân giải nó, nghĩa là các enzyme liên quan đã được sinh ra. Sự kiện này được lý giải như sau: *Chất cảm ứng* (inducer), ở đây là allolactose - dạng biến đổi của lactose - tương tác với *chất ức chế* (repressor) làm biến đổi cấu hình của chất này. Một phân tử allolactose bám vào một tiểu đơn vị của chất ức chế. Vì vậy chất ức chế mất ái lực và không thể bám vào *lac* operator; nó tách ra khỏi DNA. Lúc

này các gene cấu trúc được phiên mã và các enzyme tương ứng được tổng hợp, nhờ vậy vi khuẩn có thể hấp thụ và phân giải đường lactose (Hình 3.4). Lactose vì vậy là tác nhân gây cảm ứng (hoạt hoá) *lac* operon. Ngoài ra, ITPG (isopropyl thiogalactoside) cũng được dùng như một chất cảm ứng nhưng không phải là tác nhân sinh lý.




**Hình 3.4** Chất cảm ứng kết hợp với chất ức chế và làm biến đổi hình dáng của nó; chất ức chế vì vậy không bám được vào *lac* operator. Kết quả là các gene cấu trúc của *lac* operon được phiên mã tạo ra phân tử mRNA polycistron và các enzyme tương ứng được tổng hợp.

Phương thức điều hoà như thế được gọi là điều hoà cảm ứng - âm tính, bởi vì chất ức chế *lac* operon một khi bám vào *lac* operator sẽ kìm hãm phiên mã, nghĩa là gây hiệu quả âm tính lên sự biểu hiện của các gene; và hoạt động chức năng của protein này lại phụ thuộc vào chất cảm ứng. Nhờ cơ chế điều hoà kiểu liên hệ ngược này mà vi khuẩn có thể thích ứng để tồn tại và phát triển một cách hợp lý.




**Hình 3.5** Chất ức chế một khi được bám đầy đủ bởi allolactose thì tách khỏi operator khiến cho sự điều hoà âm tính (sự ức chế) được làm dịu bớt, tuy nhiên RNA polymerase vẫn chưa thể tạo thành một phức hợp bền vững với promoter để có thể khởi đầu phiên mã được.

Về cơ bản, cơ chế "mở" của *lac* operon được trình bày như trên; nhưng thực ra sự hoạt động của chất cảm ứng mới chỉ làm dịu bớt (alleviation) sự điều hoà âm tính (sự ức chế) của *lac* operon. Hình 3.5 cho thấy ngay cả khi chất ức chế đã tách khỏi operator, RNA polymerase vẫn không thể bám ổn định vào promoter và khởi đầu phiên mã - nó không có ái lực đủ cao đối với promoter để bám vào đủ lâu để có thể khởi đầu tạo thành liên kết phosphodiester đầu tiên (xem mục V).

*3. Các thể đột biến của* lac *operon: các gene cấu trúc, operator, gene điều hoà và promoter*

3.1. Các đột biến ở các promoter và operator

Nói chung, các đột biến ở các vùng kiểm soát, chẳng hạn các promoter và operator, thường chỉ ảnh hưởng lên DNA mà chúng khu trú; các đột biến này không tác động lên các vùng định khu trên các phân tử DNA khác (khi nói vi khuẩn xét đến là *thể lưỡng bội một phần*, merodiploid). Chúng được gọi là các thể đột biến trội *cis*.

Dưới đây ta hãy xem xét một vài tình huống liên quan.

• *Ví dụ 1*: Một nòi vi khuẩn có kiểu gene là operon $P^- X^+ Y^+ Z^+$ (P = promoter; X, Y, Z = các gene cấu trúc; dấu "-" chỉ đột biến và dấu "+" chỉ chức năng bình thường). Do promoter bị sai hỏng nên RNA polymerase không thể bám vào, vì vậy operon luôn luôn đóng - không tạo ra mRNA.

• *Ví dụ 2*: Một nòi vi khuẩn có kiểu gene $P^+ O^- X^+ Y^+ Z^+$ ($O^-$ hay $O^c$ = đột biến cơ định operator). Vì operator bị sai hỏng nên chất ức chế dù bình thường cũng không thể nhân biết và bám vào, vì vậy sự điều hoà sẽ không xảy ra. Operon sẽ luôn luôn ở trạng thái mở (hoạt động).

3.2. Các đột biến ở các yếu tố ức chế

Các phân tử ức chế như đã biết có thể tương tác với tất cả các phân tử DNA trong một tế bào, không có dính dáng tới DNA mà từ đó chúng được sinh ra. Nghĩa là các đột biến tại gene điều hoà có thể cài hiệu quả của chúng lên tất cả các DNA trong tế bào; đó là các thể đột biến *trans*.

• *Ví dụ 3*: Xét hai nòi vi khuẩn có các operon sau đây:

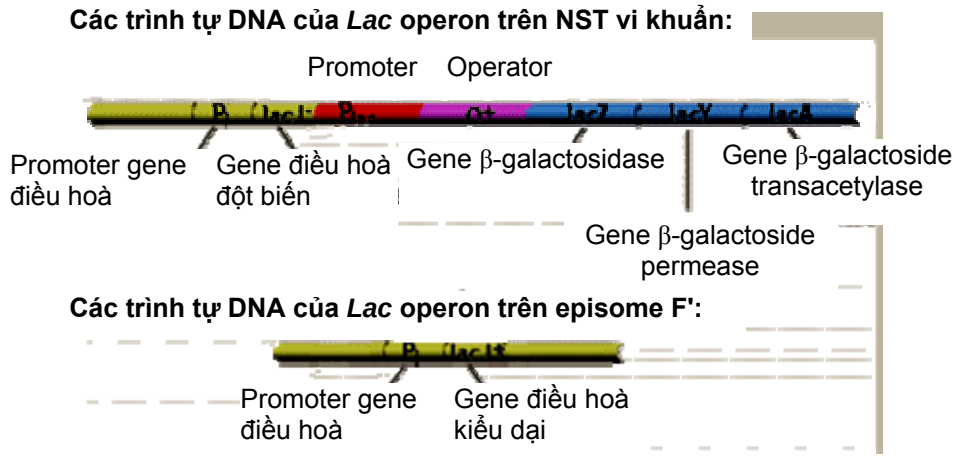
(1) $R^- P^+ O^+ X^+ Y^+ Z^+$

(2) $R^+ P^- O^+ X^+ Y^+ Z^+ / R^- P^+ O^- X^+ Y^+ Z^+$

trong đó $R^-$ là gene điều hoà bị đột biến. Ta thấy rằng ở nòi 1, tế bào tạo ra chất ức chế không hoạt động chức năng và nó sẽ chẳng bao giờ bám được operator. Vì vậy operon sẽ luôn luôn ở trạng thái mở. Ở nòi 2 (lưỡng bội một phần), ta hãy xét riêng từng DNA rồi sau đó xét gộp chung với nhau. Operon "trên" (trước) sẽ không bao giờ tạo ra RNA bởi vì promoter bị sai

hỏng. DNA "dưới" (sau) lúc nào cũng tạo ra RNA vì chất ức chế bị sai hỏng. Xét chung cho thấy DNA "trên" có thể tạo ra chất ức chế bình thường có thể bám vào cả hai operator. Vì vậy, nòi vi khuẩn này có operon được điều hoà.

• *Ví dụ 4*: Bây giờ ta thử xét kiểu hình của các tế bào lưỡng bội (một phần) đối với gene lacI qua tình huống sau. Một nòi *E. coli* mà lac I⁻ được tiếp hợp với các tế bào *E. coli* mang một plasmid F' với đoạn DNA gồm $P_I$ - lacI⁺ DNA trên episome. Sự biểu hiện của lacZ⁺ sẽ được điều hoà như thế nào trong các tế bào lưỡng bội và dị hợp tử về gene lacI (lac I⁺ trên episome và lacI⁻ trên nhiễm sắc thể vi khuẩn)? Giải thích.




Rõ ràng là các tế bào này xảy ra kiểu điều hoà bình thường về sự chuyển hoá lactose. Vì gene $lacI^+$ trên episome F' là trội so với $lacI^-$ trên nhiễm sắc thể vi khuẩn. Bạn có thể tự giải thích cơ chế điều hoà này?

3.3. Các đột biến xảy ra trong các gene cấu trúc

Nếu như các tổn thương xảy ra trong các gene cấu trúc thì chúng chỉ ảnh hưởng lên DNA bị đột biến mà thôi.

• *Ví dụ 5*: Xét ba nòi vi khuẩn có các operon sau đây, với giả thiết các gene Z và Y cần cho quá trình phân giải đường lactose.

(1) $P^+ O^+ Z^- Y^+$

(2) $P^+ O^+ Z^- Y^+ / P^+ O^+ Z^+ Y^-$

(3) $I^+ O^+ Z^+ / I^+ O^- Z^-$

Ta thấy rằng nòi 1 không thể tổng hợp được β-galactoside có chức năng bình thường; dù môi trường có lactose chúng cũng không thể hấp thụ và phân giải (kiểu hình đột biến). Nòi 2 có sự bổ sung bù trừ về sản phẩm của các gene $Z^+$ và $Y^+$ của hai DNA, nên *lac* operon ở tế bào này được điều hoà, nghĩa là chỉ hoạt động khi môi trường có lactose và ngưng hoạt

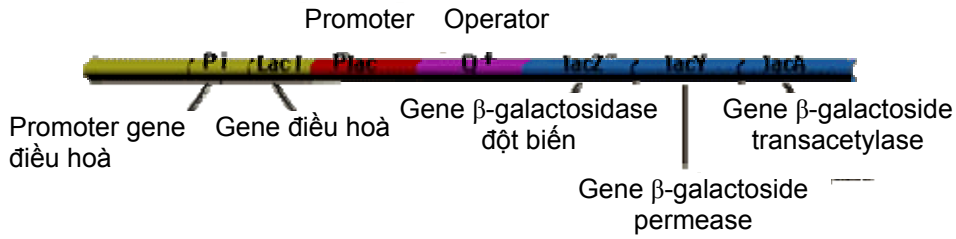
động khi môi trường vắng mặt lactose. Ở nòi 3, operon được điều hoà.

• *Ví dụ 6*: Một nòi *E. coli* là $F^-$ $lacZ^-$ $met^+$ $bio^+$ được hỗn hợp với nòi *E. coli* là $lacZ^+$ $met^-$ $bio^-$ và mang một episome với trình tự DNA Plac $O^+$ $lacZ^+$ trên episome, và được nuôi cấy trong vài giờ. Sau đó các tế bào này được tách ra, rửa sạch và cấy sang môi trường tối thiểu có chứa lactose như là nguồn đường duy nhất. Một số tế bào sinh trưởng được trên môi trường tối thiểu có lactose và hình thành các khuẩn lạc. Bằng cách nào một số tế bào đó trở thành $lacZ^+$ $met^+$ $bio^+$?

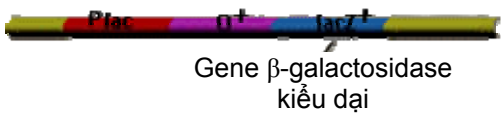
Rõ ràng đây là kết quả của một kiểu tiếp hợp đặc biệt, gọi là *chuyển nạp* (sexduction), tức là quá trình mà trong đó các mẩu DNA tự trị được mang vào một vi khuẩn $F^-$ bởi một DNA thuộc nhân tố F, và đã xảy ra sự tái tổ hợp ở vị trí lacZ (xem chương 5).

• *Ví dụ 7*: Bạn sẽ mô tả cơ chế điều hoà sự chuyển hoá lactose như thế nào trong các tế bào vừa được mô tả ở trên (ví dụ 6) khi chúng mọc được trên môi trường tối thiểu có lactose như là nguồn dinh dưỡng? Thực chất là ta đang xét sự điều hoà của gene lacZ trên một episome F' dựa trên sơ đồ sau đây:

**Các trình tự DNA của *Lac* operon trên NST vi khuẩn:**




**Các trình tự DNA của *Lac* operon trên episome F':**




Ở đây, các tế bào này xảy ra kiểu điều hoà bình thường về chuyển hoá lactose. Trình tự DNA gồm Plac $O^+$ $lacZ^+$ trên episome được điều hoà bằng chất ức chế (repressor) và protein hoạt hoá dị hoá (CAP hay CRP; xem mục V bên dưới) được mã hoá trên nhiễm sắc thể vi khuẩn.

## IV. Điều hoà âm tính của các operon ức chế: *trp* operon

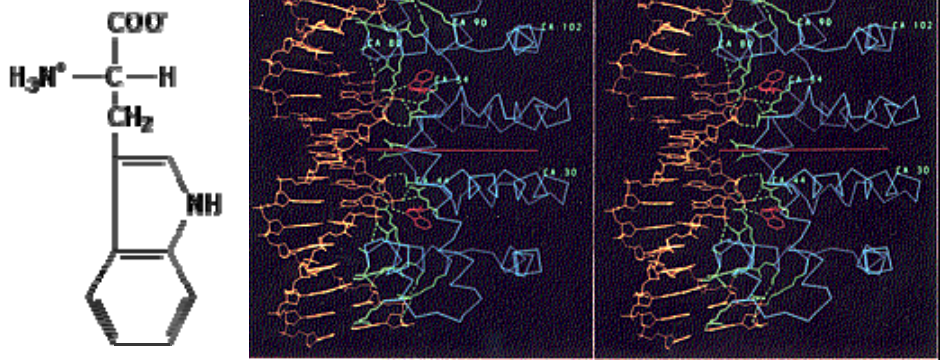
Đại diện cho tất cả các operon của các loại amino acid và các vitamine là operon tryptophan (*trp* operon; trp đọc là"trip") ở *E. coli*.

Operon tryptophan có chức năng sản sinh các enzyme *đồng hoá* (anabolic) tham gia vào quá trình sinh tổng hợp ra amino acid tryptophan

cần thiết cho tế bào tiến hành tổng hợp protein; thiếu amino acid này vi khuẩn không thể tổng hợp protein được và nó sẽ chết. *Trp* operon cũng chịu sự điều hoà âm tính như *lac* operon; nó chỉ hoạt động khi môi trường nội bào thiếu hụt amino acid này và không hoạt động (bị ức chế) khi dư thừa tryptophan, sản phẩm cuối của con đường sinh tổng hợp. Vì vậy *trp* operon được gọi là *operon ức chế* (repressible) hay *operon đồng hoá.*

*1. Cấu trúc của trp operon*

*trp* operon của *E. coli* có chứa năm gene cấu trúc chính (*trpE, trpD, trpC, trpB* và *trpA*) mã hoá cho các enzyme tham gia vào các con đường sinh tổng hợp amio acid tryptophan theo một cơ chế rất phức tạp (ở đây chúng ta không quan tâm các con đường cụ thể này). *trp* operon có một sso đặc điểm khác như: trình tự operator nằm lọt trong promoter; gene điều hoà nằm cách xa operon về phía trước.




(a) (b)

**Hình 3.6** (a) Cấu trúc phân tử amino acid tryptophan. (b) Cấu trúc lập thể của chất ức chế operon tryptophan (bên phải mỗi hình) bám vào DNA operator của nó (bên trái mỗi hình). Chất ức chế này là một dimer gồm hai polypeptide giống nhau (tượng trưng bằng vạch ngang màu đỏ). Sự bám vào DNA chỉ xảy ra khi một phân tử tryptophan (các vòng màu đỏ) được bám dính vào mỗi monomer của chất ức chế này.

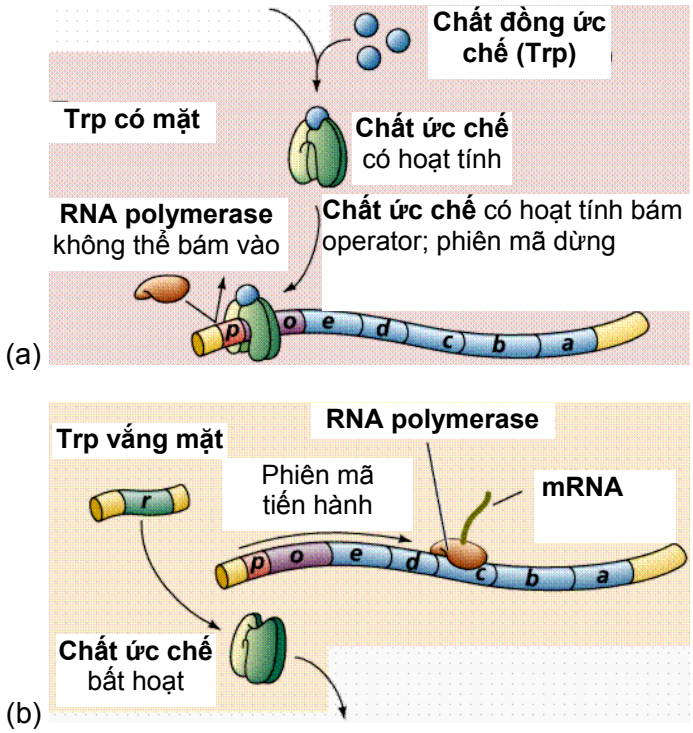
*2. Cơ chế điều hoà âm tính của* trp *operon*

Sau đây chúng ta tìm hiểu tổng quát cơ chế điều hoà âm tính của *trp* operon, còn cơ chế *phiên mã dở* (attenuation) được xét riêng ở mục VI.

Khi trong tế bào *E. coli* dư thừa amino acid tryptophan (sản phẩm cuối cùng của con đường chuyển hoá) thì *trp* operon ngừng hoạt động và do đó các enzyme tương ứng không được sinh ra. Sự kiện này được giải thích như sau: Chất ức chế bình thường của operon này (*trp* repressor) tồn tại ở dạng bất hoạt gọi là *aporepressor* (Hình 3.6), không có ái lực đối với *trp*

operator, nhưng khi các amio acid dư thừa kết hợp vào sẽ tạo ra phức hợp có hoạt tính, nghĩa là có ái lực với *trp* operator. Vì thế tryptophan được gọi là *chất đồng ức chế* (corepressor). Phức hợp này bám vào yếu tố chỉ huy làm kìm hãm phiên mã của *trp* operon (Hình 3.7a).

Ngược lại, khi trong tế bào vắng mặt hay thiếu hụt các amino acid này, tự thân chất ức chế này ở trạng thái bất hoạt nên không bám được vào yếu tố chỉ huy (*trp* operator). Vì vậy các gene cấu trúc xảy ra sự phiên mã và kết quả là các enzyme tham gia tổng hợp tryptophan được sinh ra (Hình 3.7b). Và một khi hàm lượng amio acid này được tổng hợp ở mức dư thừa sẽ tác động ngược trở lại, kìm hãm hoạt động của *trp* operon.




**Hình 3.7** Operon tryptophan bị kìm hãm (a) và hoạt động (b).

Tóm lại, phương thức điều hòa hoạt động gene theo các cơ chế liên hệ ngược hay phản hồi như thế (feed-back mechanisms) đảm bảo cho bộ gene các vi khuẩn hoạt động một cách hợp lý và nhờ đó các vi khuẩn thích ứng và phát triển trước các điều kiện môi trường luôn thay đổi.

◆ Cần lưu ý rằng, các protein ức chế và đồng ức chế không hẳn là cách duy nhất các vi khuẩn điều hòa phiên mã gene. Ở nhiều vi khuẩn (và một số eukaryote), sự điều hòa mức chuyển hóa nào đó cũng có thể được kiểm soát bởi các ***riboswitch*** (tạm dịch là: *công tắc ribo*). Một riboswitch

là một phần của *vùng 5'-không được dịch mã* (5'-untranslated region = 5'-UTR) trong phân tử mRNA, tại đó có một vị trí bám đặc thù cho chất chuyển hóa (metabolite).

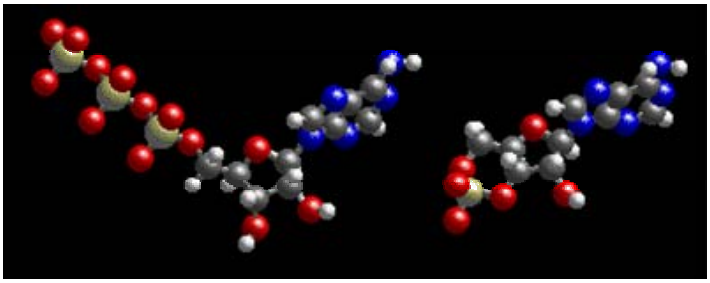
Một số chất chuyển hóa bám vào các riboswitch, như: các purine adenine và guanine; các amino acid glycine và lysine; mononucleotide flavin (nhóm phụ của NADH dehydrogenase); S-adenosyl methionine (nhường nhóm methyl cho nhiều phân tử, kể cả DNA và "chóp" ở đầu 5' của mRNA eukaryote).

Trong mỗi trường hợp, riboswitch kiểm soát các gene liên quan đến sự chuyển hóa của phân tử đó. Chất chuyển hóa bám vào mRNA đang sinh trưởng và bao gồm cả sự thay đổi biến cấu (allosteric) mà: (i) đối với một số gene nó khiến cho sự tổng hợp mRNA hơn nữa để kết thúc trước khi hình thành một sản phẩm chức năng, và (ii) đối với một số gene khác, nó tăng cường hoàn chỉnh việc tổng hợp mRNA. Trong cả hai trường hợp, kết quả là do sự kiểm soát mức độ của chính chất chuyển hóa ấy. Một số riboswitch kiểm soát sự dịch mã mRNA hơn là phiên mã mRNA. Đã có gợi ý rằng các cơ chế điều hoà này, vốn không liên quan bất kỳ protein nào; nó là một cơ chế còn sót lại từ "giới RNA".

## V. Sự ức chế dị hoá (Catabolite repression): Điều hoà dương tính của *lac* operon

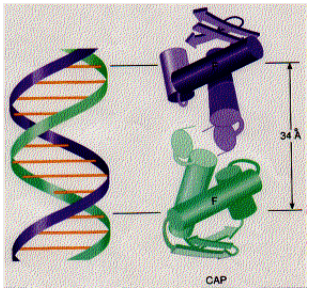
Như chúng ta có thể dự đoán, *điều hoà dương tính* (positive control) là đối lập với điều hoà âm tính; đó là, operon bị đóng, ngưng hoạt động (thực ra là hoạt động của operon bị giảm xuống một mức cơ sở) trừ phi có yếu tố nào đó xen vào bật nó hoạt động trở lại. Trong trường hợp của *lac* operon, điều này có nghĩa là tách bỏ chất ức chế ra khỏi operator là chưa đủ để kích hoạt operon như đã đề cập trước đây. Nó cần đến một nhân tố dương tính bổ sung thêm.

Thật vậy, hoạt động của *lac* operon còn chịu sự kiểm soát của một *protein điều hoà dương tính* liên quan với sự có mặt của glucose. Cụ thể, khi trong môi trường có mặt đồng thời cả lactose và glucose thì operon lac tạm thời ngưng hoạt động. Hiện tượng này gọi là *ức chế dị hoá* (catabolite repression). Người ta nhận thấy rằng, khi glucose có mặt ở nồng độ cao thì hàm lượng *AMP vòng* (3',5'-cyclic adenosine monophosphate = cAMP; Hình 3.8a) trong tế bào rất thấp; và ngược lại, khi không có glucose hoặc có không đáng kể thì hàm lượng cAMP trong tế bào được tổng hợp tăng cao. cAMP vì vậy được xem là *chất chỉ thị* (indicator) của sự vắng mặt glucose và được coi là *nhân tố điều hoà dương tính* (positive regulator) của các operon dị hoá.

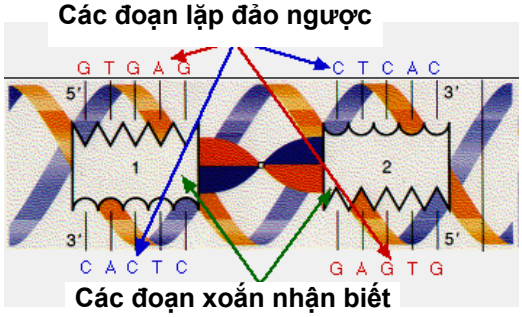



(a)

(b)




(c)

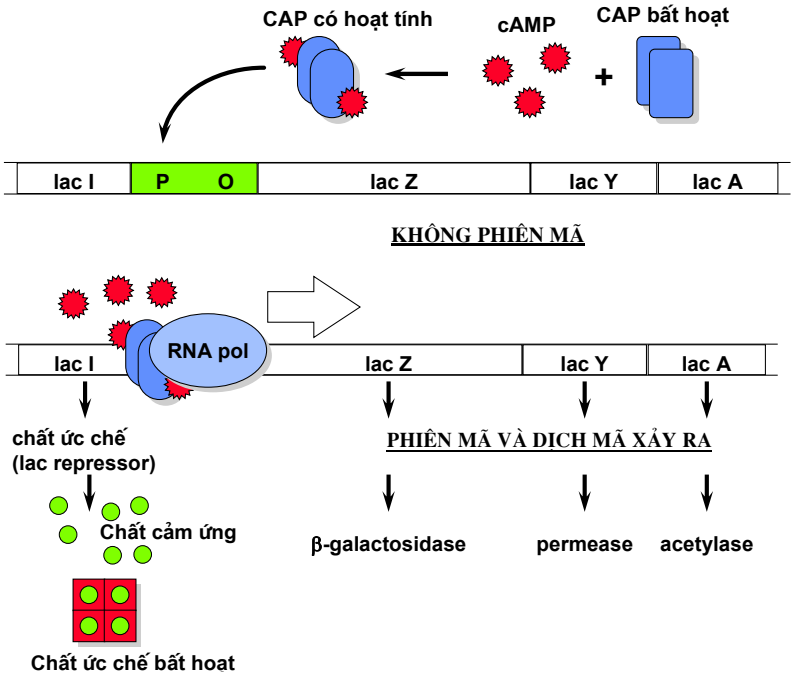



**Hình 3.8** (a) Cấu trúc và sự hình thành phân tử cAMP từ ATP. (b) CAP gồm hai monomer giống nhau, mỗi monomer nhận biết một trình tự DNA nhờ vùng xoắn alpha được đánh dấu F; và (c) Trình tự đối xứng của vị trí CAP là các đoạn lặp đảo ngược.

Ngoài ra, còn phát hiện một loại protein điều hoà dương tính có tên là *protein hoạt hoá dị hoá* (catabolite activator protein = CAP) cũng gọi là protein tiếp nhận / bám cAMP (cyclic AMP receptor / binding protein = CRP) hay protein bám cAMP. CAP gồm hai tiểu đơn vị giống nhau gọi là *homodimer* (Hình 3.8b); nó chỉ hoạt động khi môi trường nội bào có hàm lượng cAMP cao. Trong trường hợp đó, cAMP kết hợp với CAP tạo thành phức hợp CAP-cAMP và làm tăng ái lực của CAP đối với promoter. Phức hợp này có khả năng nhận biết và bám vào một đoạn 16 bp về phía trước vùng khởi động, với *các đoạn lặp đảo ngược* (inverted repeats), gọi là *vị trí CAP* (Hình 3.8c). Bằng cách đó RNA polymerase được kích thích bám chặt vào promoter và bắt đầu tổng hợp mRNA ở mức cao (Hình 3.9).

Như vậy, khác với kiểu điều hoà âm tính do sự tương tác giữa "chất ức chế và operator" (*tương tác protein-DNA*) ở đây sự tương tác xảy ra giữa protein điều hoà thuộc phức hợp CAP-cAMP mà yếu tố chính là CAP với RNA polymerase (*tương tác protein-protein*) giúp RNA polymersae bám

ổn định vào promoter, tăng cường hoạt động phiên mã (điều hoà dương tính) mà chủ yếu là điều chỉnh tốc độ khởi đầu phiên mã. Mặt khác khi CAP/cAMP bám vào, nó làm cho DNA uốn gập đáng kể (khoảng 90 độ). Và như thế, RNA polymerase dễ dàng tách hai sợi của DNA, tạo thành một phức hợp mở.




**Hình 3.9 Điều hoà dương tính *lac* operon** (xem giải thích trong bài).

CAP/cAMP cũng có thể kích thích phiên mã các operon cảm ứng khác, bao gồm các *ara* và *gal* operon được nghiên cứu kỹ. Ngay khi *lac* operon tiến hành chuyển hoá lactose, các operon khác này mã hoá cho các enzyme phân cắt các đường biến đổi tương ứng, arabinose và galactose. Như thế, để cho hiệu suất lớn nhất, tất cả ba operon này sẽ vẫn đóng chừng nào tế bào vẫn còn có sẵn glucose. Vì cAMP đáp ứng với nồng độ glucose, nên ta chẳng ngạc nhiên gì khi cả ba operon này cùng chia xẻ một cơ chế điều hoà chung có liên quan cAMP. Phức hợp CAP-cAMP bám ở promoter hoặc gần promoter của mỗi operon và tạo điều kiện thuận lợi cho việc bám vào của RNA polymerase.

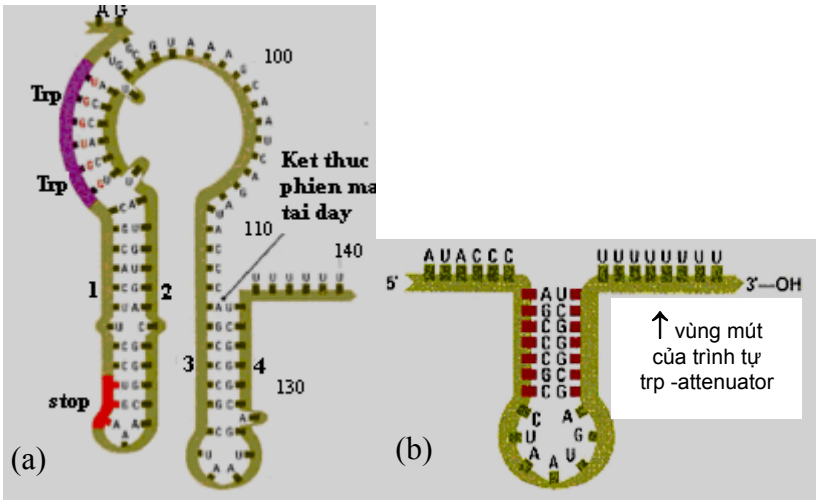
## VI. Sự kết thúc phiên mã sớm (Attenuation) ở *trp* operon

*Attenuation* (phiên mã dở) là một cơ chế điều hoà gây ra sự *kết thúc phiên mã sớm* dưới những điều kiện nhất định, bằng cách đó ngăn cản sự biểu hiện của mRNA cần cho sự biểu hiện của các sản phẩm gene tương

ứng. Phiên mã dở tạo thành mRNA uốn gập một cách điển hình thành các cấu trúc bậc hai xen kẻ (alternative secondary structures), mà một trong số đó là nhân tố kết thúc độc lập ρ (Rho-independent terminator).

Một cách tiếp cận tin sinh học đã được phát triển để xác định các gene được điều hoà theo kiểu phiên mã dở (Một số bài báo tổng quan hay về phiên mã dở như: Gollnick và Babitzke 2002; Henkin và Yanofsky 2002.)

Operon tryptophan chẳng hạn còn có một kiểu điều hòa *phiên mã dở*. Nó sử dụng dịch mã để điều khiển sự phiên mã. Khi có mặt tryptophan trong môi trường nội bào, thậm chí ở nồng độ thấp, sẽ xảy ra sự dịch mã một phần ở vùng leader của mRNA đang được tổng hợp. Kết quả là làm dừng sự phiên mã trước khi gene cấu trúc đầu tiên (*trpE*) của operon được phiên mã.




**Hình 3.10** Cấu trúc của đoạn dẫn đầu - *TrpL* (a) và vùng kết thúc phiên mã sớm - *trp attenuator* với đuôi 3' gồm 8 uridine (b).

Sự kết thúc phiên mã sớm ở operon tryptophan là kết quả của sự tương tác bổ sung nội phân tử giữa các trình tự DNA bên trong vùng leader của bản sao RNA. Kết quả của sự kết thúc phiên mã sớm này tạo ra một mRNA chứa 140 base (hình 3.10A). Tại vùng đầu mút 3' của nó xảy ra sự tự bổ sung ở đoạn giàu GC tạo thành một cấu trúc hình vòng trên thân RNA và gây ra sự kết thúc phiên mã sớm. Vùng này được gọi là *đoạn phiên mã dở của operon tryptophan* (*trp* attenuator) và ở phần đuôi của mRNA này cũng có 8 base uridine (hình 3.10B). Kiểu cấu trúc "kẹp cài tóc" này là tín hiệu kiểm soát kết thúc phiên mã ở prokaryote nói chung.

Với kiểu cấu trúc đặc thù ở đoạn dẫn đầu của trp operon như vậy làm cho nó có ý nghĩa quan trọng trong điều hoà phiên mã dở, ở chỗ: (i) tổng

hợp một peptide dẫn đầu chứa 14 amino acid; (ii) trên mRNA của đoạn peptide này chứa hai codon của Trp ở các vị trí 10 và 11; (iii) ở bốn vùng được đánh số 1-4 xảy ra sự tự bổ sung giữa các vùng 1 và 2 và giữa 3 và 4; và ở một số trường hợp có thể xảy ra sự kết cặp giữa các vùng 2 và 3.

Do trong trình tự mã hóa của trình tự dẫn đầu *trpL* có hai codon Trp, nên sự dịch mã đoạn này tỏ ra nhạy cảm với số lượng $tRNA^{trp}$ đưa vào. Nếu môi trường cung cấp đầy đủ Trp, ribosome trượt qua các codon Trp để đi vào vùng 2. Và sự có mặt của ribosome ở vùng 2 ngăn cản vùng này kết cặp với vùng 3. Khi đó vùng 3 sẽ cặp với vùng 4 và tạo ra điểm kết thúc phiên mã sớm (xảy ra sau khi tổng hợp xong 8 uridine ở ngay sau vùng 4). Khi số lượng $tRNA^{Trp}$ đưa vào không đầy đủ, sự dịch mã đoạn dẫn đầu dừng lại đột ngột ở các codon Trp của nó. Điều này ngăn cản ribosome tiến vào vùng 2, do đó vùng này sẽ cặp với vùng 3 gây cản trở việc tạo thành cấu trúc phiên mã dở (*trp* attenuator). Kết quả là phân tử mRNA đa cistron của operon tryptophan được tạo thành một cách đầy đủ.

★ ***Operon ở eukaryote - một ngoại lệ thú vị!***

Khác với tất cả các eukaryote, *Caenorhabditis elegans* và có lẽ cả một số giun tròn khác cũng có một tỷ lệ lớn các gene được tổ chức theo kiểu operon. ở *C. elegans*, ít nhất 2.300 gene của nó (chiếm khoảng 15% bộ gene của nó) có mặt trong các operon, mỗi operon chứa từ 2 đến 8 gene. Giống như các prokaryote, tất cả các gene trong một operon được phiên mã từ một promoter đơn sinh ra một bản sao sơ cấp đơn (pre-mRNA). Một số gene trong các operon này dường như có liên quan đến cùng chức năng sinh hoá như ở các prokaryote, nhưng không phải là trường hợp cho tất cả. Các operon của *C. elegans* cũng khác với các operon ở prokaryote ở chỗ, mỗi pre-mRNA được xử lý thành một mRNA riêng cho mỗi gene hơn là được dịch mã như một đơn vị.

## VII. Sự tự điều hoà (Autoregulation)

Có khá nhiều protein được tạo ra từ các bản sao được khởi đầu ở tốc độ ổn định. Tuy nhiên, với một số sản phẩm gene cần thiết cho một tế bào sai khác nhau rất lớn và tỷ lệ phiên mã của các gene tương ứng phải thuận theo nhu cầu đó. Một cơ chế cho điều hoà tổng hợp của mRNA monocistron là *tự điều hoà* (autoregulation). Trong các hệ thống tự điều hoà đơn giản nhất, sản phẩm của gene cũng là một chất ức chế: nó bám vào vị trí operator kề sát promoter. Khi nồng độ sản phẩm gene vượt quá nhu cầu tế bào cần đến, một phân tử sản phẩm sẽ chiếm lấy operator và phiên mã bị ức chế. Vào thời gian về sau nhu cầu đó có thể lớn hơn, nồng độ các phân tử sẽ không bám được sẽ giảm xuống. Trong các điều kiện đó, phân tử bám vào operator sẽ tách khỏi vị trí bám, promoter sẽ được tự do

và sự phiên mã lại xảy ra. Sự tổng hợp của hầu hết các protein ức chế - chẳng hạn, sản phẩm *lacI* và chất ức chế miễn dịch phage λ - và nhiều enzyme cần đến lúc nào cũng được tự điều hoà.

## VIII. Điều hoà ở mức dịch mã

• Trong sự điều hoà operon lactose xảy ra sự dịch mã biệt hoá của các gene trong mRNA. Tỷ lệ số lượng các bản sao của ba enzyme β-galactosiase, permease và transacetylase là 1,0 : 0,5 : 0,2. Sự sai khác này là ví dụ cho sự điều hoà dịch mã, có thể đạt được theo hai cách:

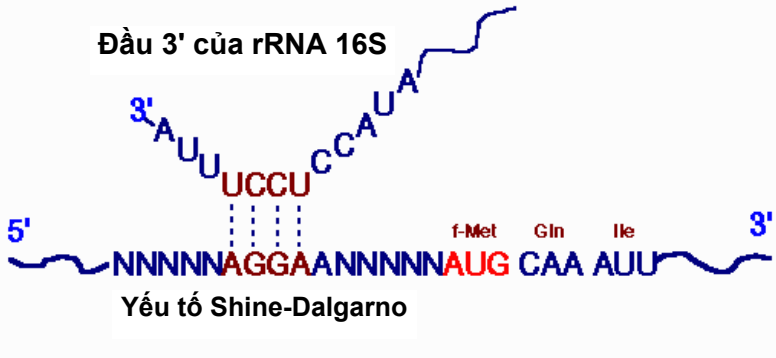
(1) Gene *lacZ* được dịch mã trước. Vì nó là mRNA polycistron và tại mỗi codon kết thúc thường có một số ribosome tách khỏi mRNA, cho nên sự tổng hợp các polypeptide có sự phân hoá từ đầu 5' cho đến đầu 3'. Hiện tượng đó gọi là *tính phân cực của các phân tử mRNA polycistron*.

(2) Sự suy thoái của mRNA lac được khởi đầu thường xuyên hơn ở gene *lacA* so với *lacY* và hay xảy ra ở gene *lacY* hơn là *lacZ*. Do đó số lượng bản sao hoàn chỉnh của gene lacZ có được nhiều hơn các gene kia.

Nói cách khác, hiệu suất dịch mã suy giảm từ đầu 5' đến đầu 3' của mRNA polycistron. Những đặc điểm chịu trách nhiệm cho hiện tượng này là: (i) Hiệu quả khởi đầu sự dịch mã sai khác nhau; (ii) khoảng cách khác nhau giữa các codon kết thúc chuỗi và codon mở đầu tiếp theo cho phép ribosome và mRNA tách rời nhau; và (iii) mức nhạy cảm khác nhau của các vùng khác nhau của mRNA đối với sự suy thoái. Những hiệu quả này lên sự dịch mã quyết định số lượng protein tạo ra trong mỗi đơn vị thời gian cho mỗi gene... Tuy nhiên, sự điều hoà dịch mã quan sát được ở một vài loài phage - đó là, sự ức chế việc dịch mã của một gene cụ thể bằng sản phẩm của một gene khác.

• Hiệu quả của sự khởi đầu dịch mã phụ thuộc trình tự giàu purine ở vùng 5'-UTR; đó là 6-8 base (thường gặp là AGGAGGU). Nó nằm ngay trước codon khởi đầu AUG của mRNA. Đoạn này bàm vào tiểu đơn vị ribosome bé và được J.Shine và L.Dalgarno (Austria) xác định lần đầu tiên năm 1974. Vì vậy nó được gọi là *trình tự Shine-Dalgarno* (Hình 3.11). Các tác giả này cho rằng hầu như có sự bổ sung chính xác giữa đoạn này (ở đầu 5' của mRNA) và vùng tương ứng ở đầu 3' của rRNA 16S. Điều này phù hợp với hiện tượng cố định bước đầu phân tử mRNA trên tiểu đơn vị 30S. Thông thường, ở các mRNA được dịch mã có hiệu quả nhất thì vùng bám vào ribosome thường nằm cách codon khởi đầu khoảng 8 nucleotide về phía trước. Nếu các đột biến xảy ra ở vùng này dẫn tới sự dịch chuyển trình tự Shine-Dalgarno kề sát codon AUG hoặc xa hơn, có thể làm giảm đột ngột hiệu quả dịch mã trên mRNA đó. Tuy nhiên, chỉ riêng sự có mặt của trình tự Shine-Dalgarno phân bố chuẩn vẫn

chưa đủ đảm bảo cho sự khởi đầu dịch mã. Trên thực tế, có nhiều trình tự như thế bị che khuất dưới dạng "kẹp cài tóc", vì vậy nó không thể tham gia tương tác với vùng tương ứng của rRNA 16S.




**Hình 3.11** Sự tương tác giữa yếu tố Shine-Dalgarno của một mRNA và đoạn trình tự tương ứng ở đầu 3' của rRNA 16S có mặt trong tiểu đơn vị ribosome bé 30S (theo M.W.King 1996).

Các số liệu thu được cho thấy hiệu quả của sự sử dụng trình tự Shine-Dalgarno nhất định có thể "chế tác" các protein mà đến lượt chúng lại bám vào trình tự đó và ngăn cản nó. Được nghiên cứu chi tiết nhất là các protein của ribosome ở *E. coli*. Khi tốc độ tổng hợp các protein này vượt quá mức tạo rRNA thì xảy ra sự tích luỹ các protein ribosome tự do. Số protein dư thừa này được gọi là các protein "khoá"; chúng bám vào trình tự Shine-Dalgarno trong các mRNA tương ứng. Nhờ vậy, tốc độ dịch mã - tổng hợp các protein ribosome được duy trì ở mức không vượt quá khả năng sử dụng chúng để kiến tạo các ribosome. Có thể nói, sự điều hoà ở mức dịch mã là sự "cạnh tranh" giữa rRNA và mRNA của các protein ribosome, gây ra sự kết hợp với các protein "khoá" này. Khi sự dịch mã mRNA cho các protein ribosome trở nên không thể tiếp tục được nữa (do sự bám dính bởi các protein "khoá") thì các mRNA này bị suy thoái nhanh hơn bình thường.

Một ví dụ khác là phage R17 của *E. coli* chứa RNA thay vì DNA; nhiễm sắc thể của nó là một phân tử mRNA, vì thế sự biểu hiện của gene chỉ cần duy nhất sự dịch mã. Phage này tạo ra ba sản phẩm gene - hai protein cấu trúc (protein A và protein vỏ của phage) và một enzyme tái bản RNA (replicase). Các phân tử protein vỏ được cần đến nhiều hơn các replicase. Ngoài ra, sự tổng hợp replicase chỉ cần thiết một lúc sau khi lây nhiễm, trong khi đó để sản xuất một số lượng các phân tử đủ cho lắp ráp phage thì sự tổng hợp protein vỏ phải xảy ra trong suốt chu kỳ sống. Sau một lúc lây nhiễm, cả replicase và các phân tử protein vỏ được dịch mã từ RNA. Phân tử RNA phage có chứa vị trí bám cho một protein vỏ định khu

giữa codon kết thúc của gene protein vỏ và codon mở đầu AUG của gene replicase. Khi protein vỏ được tổng hợp, vị trí bám này dần dần được lấp đầy bởi các phân tử protein và ngăn cản việc dịch mã vùng mã hoá replicase. Bằng cách đó, việc tổng hợp replicase sẽ dừng lại một lúc ngắn sau khi các protein vỏ bắt đầu.

• *Quan hệ giữa hàm lượng các tRNA với tốc độ dịch mã mRNA*: Nếu dịch mã đã bắt đầu thì tốc độ của nó được xác định bởi sự có mặt của các loại tRNA khác nhau, tương ứng với các codon đặc hiệu trong mRNA. Hàm lượng tương đối của các tRNA khác nhau trong tế bào về cơ bản là khác nhau. Ví dụ, methionine và tryptophan là hai loại amino acid chỉ có một codon đặc hiệu tương ứng, AUG và UGG, thì tương đối ít gặp trong phần lớn các protein và các tRNA đặc thù của chúng có mặt trong tế bào với số lượng không nhiều. Hơn nữa, các tRNA thường gặp nhất, về nguyên tắc, tương ứng với các codon được sử dụng thường xuyên nhất. Như vậy, mRNA nào chứa nhiều codon "hiếm" thì sự dịch mã điễn ra chậm hơn các mRNA có chứa nhiều codon thông dụng. Nói cách khác, tốc độ dịch mã mRNA được kiểm soát một phần bởi hàm lượng các codon mà chúng được nhận biết bởi các tRNA họ hàng có độ tập trung cao nhất.

## Câu hỏi và Bài tập

1. Phân biệt các cặp khái niệm sau: (a) chất cảm ứng với chất ức chế; (b) điều hoà âm tính với điều hoà dương tính; (c) operon cảm ứng với operon ức chế. Hãy vẽ sơ đồ một operon và giải thích mối quan hệ giữa các yếu tố điều hoà hoạt động của một operon dị hoá.

2. Operon là gì? Hãy nêu các đặc điểm giống nhau và khác nhau trong các cơ chế điều hoà âm tính đối với *lac* operon và *trp* operon. Từ đó cho biết ý nghĩa của các cơ chế điều hoà này.

3. Hãy giải thích các tình trạng đóng-mở của *lac* operon dưới các điều kiện sau đây và cho các hình vẽ minh hoạ: (a) chỉ có glucose; (b) chỉ có lactose; (c) không có chất đường nào cả; và (d) có cả glucose và lactose.

4. So sánh cấu trúc của một gene và bản sao tương ứng của nó ở các vi khuẩn ngày nay (eubacteria) về các dấu hiệu sau bằng cách trả lời Có hoặc Không: (a) Đơn gene; (b) đa gene; (c) chứa intron; (d) phiên mã và dịch mã đồng thời; (e) đầu 5' của mRNA là codon khởi đầu.

5. Phân biệt các cơ chế điều hoà âm tính và dương tính. Hai kiểu điều hoà này có đối lập nhau trong một operon hay không? Tại sao?

6. Thế nào là phiên mã dở? Giải thích cơ chế điều hoà bằng phiênmã dở đối với operon tryptophan. Tại sao phiên mã dở (attenuation) không

phải là một phương thức điều hoà có hiệu quả tất cả các gene?

7. Các operon có tồn tại ở eukaryote nào? Nêu các đặc điểm giống và khác nhau giữa các operon ở một số eukaryote với các prokaryote, và cho biết ý nghĩa của hiện tượng đó.

8. Hiệu quả có thể có của các đột biến trong mỗi thành phần sau đây của operon vi khuẩn là gì? (a) Operator; (b) Promoter; (c) Protein ức chế; (d) Các gene cấu trúc.

9. Phải chăng protein ức chế của operon là một protein cảm ứng, ức chế hoặc cơ định (constitutive)? Tại sao?

10. Phân tích một cơ chế điều hoà dịch mã và cho biết ý nghĩa của nó.

## Tài liệu Tham khảo

**Tiếng Việt**

Hoàng Trọng Phán. 1993. *Di truyền Phân tử* (G.trình ronéo). ĐHSP Huế.

Hoàng Trọng Phán. 1995. *Một số vấn đề về Di truyền học hiện đại* (Tài liệu BDTX cho giáo viên THPT chu kỳ 1993-1996). Trường ĐHSP Huế.

Hoàng Trọng Phán. 1997. *Di truyền học Phân tử*. NXB Giáo Dục.

**Tiếng Anh**

Birge EA. 1981. *Bacterial and Bacteriophage Genetics*. Springer-Verlag.

Gollnick P, Babitzke P. 2002. Transcription attenuation. *Biochim Biophys Acta*. 1577: 240-250.

Hartle DL, Freifelder D, Snyder LA. 1988. *Basic Genetics*. Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA. (Ch, 14, pp 359-387).

Hayes W. 1968. *The Genetics of Bacteria and Their Viruses*. 2nd ed. John Wiley, NY.

Henkin TM, Yanofsky C. 2002. Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *Bioessays* 24: 700-707.

Kimball J. 2004. http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/

Lewin B. 1999. *Genes VI*. Oxford University Press, Oxford.

Maloy, S. 2006. *Microbial Genetics*.

http://www.bio.sdsu.edu/faculty/maloy.html

http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/history.html

McKane L, Kandel J. (1996): *Microbiology: Essentials & Applications*.

2nd edn. McGraw-Hill, Inc.

Russell PJ. 2003. *Essential Genetics*. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, Menlo Park, CA.

Summer DK. 1996. *Plasmid Biology*. Blackwell Science, Oxford.

Tamarin RH. 1999. *Principles of Genetics*. 6th edn. McGraw-Hill, Inc., NY.

Twyman RM. 1998. *Advanced Molecular Biology*. BIOS Scientific Publishers Ltd/ Springer-Verlag Singapore Pte Ltd.

Watson JD, Tooze J, Kurtz DT. 1983. *DNA Recombinant: A Short Course*. WH Freeman and Company, New York.

Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM. 1987. *Molecular Biology of the Gene*. 4th ed, Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, Menlo Park, CA.

Weaver RF, Hedrick PW. 1997. *Genetics*. 3rd ed, McGraw-Hill Companies, Inc. Wm.C.Browm Publishers, Dubuque, IA.

**Một số trang web bổ sung**

http://www.life.uiuc.edu/micro/316/supplement.html

http://esg-www.mit.edu:8001/esgbio/pge/pgedir.html

**Chương 4**

# Biến dị ở Vi sinh vật

## I. Đột biến gene ở vi sinh vật

*1. Các kiểu đột biến gene*

Đột biến gene hay đột biến điểm: là các biến đổi rất nhỏ trên một đoạn DNA, thường liên quan đến một cặp base đơn của DNA hoặc một số ít cặp base kề nhau. Đột biến điểm làm thay đổi gene kiểu dại (wild-type gene). Thực tế đột biến điểm hầu như làm giảm hoặc làm mất chức năng của gene hơn là làm tăng cường chức năng của gene.

Về nguồn gốc, đột biến điểm được phân ra làm đột biến ngẫu nhiên (spontaneous) và đột biến cảm ứng (induced).

Đột biến cảm ứng: là dạng đột biến xuất hiện với tần số đột biến tăng lên khi xử lý có mục đích bằng tác nhân đột biến hoặc tác nhân môi trường đã được biết. Đột biến ngẫu nhiên là đột biến xuất hiện khi không có sự xử lý của tác nhân đột biến. Đột biến ngẫu nhiên được tính là tỉ lệ cơ sở của đột biến và được dùng để ước chừng nguồn biến dị di truyền tự nhiên trong quần thể. Tần số đột biến ngẫu nhiên thấp nằm trong khoảng $10^{-5}$ - $10^{-8}$, vì vậy đột biến cảm ứng là nguồn đột biến quan trọng cho phân tích di truyền.

Tác nhân đột biến được sử dụng phổ biến là nguồn chiếu xạ năng lượng cao (high-energy radiation) hoặc các hóa chất đặc biệt.

Các dạng đột biến điểm: có hai dạng đột biến điểm chính trong phân tử DNA:

+ Đột biến thay thế cặp base (base substitution)

+ Đột biến thêm bớt cặp base (base insertion - base delection)

Các đột biến này có thể phát sinh do ảnh hưởng của môi trường như ảnh hưởng của các tác nhân gây đột biến.

1.1. Đột biến thay thế cặp base

Kiểu đột biến đơn giản nhất là thay thế một base, trong đó một cặp nucleotide trong gene được thay thế bằng một cặp nucleotide khác.

Ví dụ: A được thay thế bằng G trong sợi DNA. Sự thay thế này tạo ra sự cặp base G-T. Ở lần sao chép tiếp theo tạo ra cặp G-C trong một phân tử DNA con và cặp A-T ở phân tử DNA con kia.

Tương tự, đột biến thay thế A bằng T trên một sợi, tạo ra sự kết cặp tạm thời T-T. Kết quả sao chép tạo ra T-A trên một phân tử DNA con và A-T trên phân tử DNA con kia. Trong trường hợp hợp này, cặp base T-A

là đột biến và cặp A-T không đột biến. Nếu sợi gốc DNA không đột biến có trình tự 5'-GAC-3', trên sợi đột biến có trình tự 5'-GTC-3' và sợi kia không đột biến có trình tự 5'-GAC-3'.

Đột biến thay thế cặp base được chia làm hai loại:

+ Đột biến đồng hoán (transition mutations): Nếu một đột biến mà base pyrimidine được thay thế bằng một pyrimidine và một purine thay bằng một purine.

Đột biến đồng hoán có thể là:

$T \rightarrow C$ hoặc $C \rightarrow T$

(Pyrimidine $\rightarrow$ pyrimidine)

$A \rightarrow G$ hoặc $G \rightarrow A$

(purine $\rightarrow$ purine)

Đột biến đảo hoán (Transversion): Đột biến làm thay một pyrimidine thành một purine hay một purine được thay thế bằng một pyrimidine. Các đột biến đảo hoán:

$T \rightarrow A$, $T \rightarrow G$, $C \rightarrow A$ hoặc $C \rightarrow G$

(Pyrimidine $\rightarrow$ purine)

$A \rightarrow T$, $A \rightarrow C$. $G \rightarrow T$ hoặc $G \rightarrow C$

(Purine $\rightarrow$ pyrimidine)

Như vậy có thể có 4 thay thế kiểu đột biến đồng hoán và có đến 8 thay thế kiểu đột biến đảo hoán. Nếu các thay thế này xảy ra với ngẫu nhiên xác suất như nhau, sẽ có tỷ lệ đột biến: 1 đồng hoán : 2 đảo hoán. Tuy nhiên trong thực tế, đột biến thay thế base có xu hướng nghiêng về đột biến đồng hoán, cho nên trong số các đột biến thay thế base tự phát thì tỷ lệ xảy ra đột biến là: 2 đồng hoán : 1 đảo hoán

1.2. Đột biến thêm hoặc bớt base (base-pair addition/deletion hay insertion-deletion). Trường hợp đơn giản nhất của đột biến này là thêm hoặc mất một cặp base đơn. Đôi khi đột biến làm thêm hoặc mất đồng thời nhiều cặp base.

Hậu quả của đột biến điểm đến cấu trúc và sự biểu hiện của gene: Đột biến điểm xuất hiện trong vùng mã hóa chuỗi polypeptide của gene (a polypetide-coding part of a gene), chẳng hạn đột biến thay thế base đơn có thể gây nhiều hậu quả, nhưng tất cả đều có tác động lên mã di truyền theo 2 hướng: làm thoái hóa mã di truyền hoặc xuất hiện mã kết thúc quá trình dịch mã. Có các dạng:

- Đột biến đồng nghĩa (synonymous mutations): đột biến thay đổi một

codon mã hóa acid amin thành codon mới mã hóa cho cùng acid amin đó. Đột biến đồng nghĩa cũng có thể xem là đột biến im lặng (silent mutations)

- Đột biến nhầm nghĩa (missense mutations), đôi khi còn gọi là đột biến không đồng nghĩa (nonsynonymous mutations): codon mã hóa cho một acid amin này bị thay đổi thành codon mã hóa cho một acid amin khác.

- Đột biến vô nghĩa (nonsense mutations): codon mã hóa cho một acid amin bị thay đổi thành codon kết thúc dịch mã (translation termination/stop codon).

Mức độ ảnh hưởng của đột biến nhầm nghĩa và vô nghĩa lên chuỗi polypeptide khác nhau tùy trường hợp.

Nếu đột biến nhầm nghĩa thay thế một acid amin này bằng một acid amin khác tương tự về mặt hóa học, được xem là đột biến thay thế bảo thủ (conservative substitution). Sự thay đổi này hầu như ít ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng protein. Ngược lại, nếu thay thế bằng một acid amin khác về phương diện hóa học gọi là nonconservative substitution, hầu hết đều gây ra sự thay đổi lớn ở cấu trúc và chức năng protein.

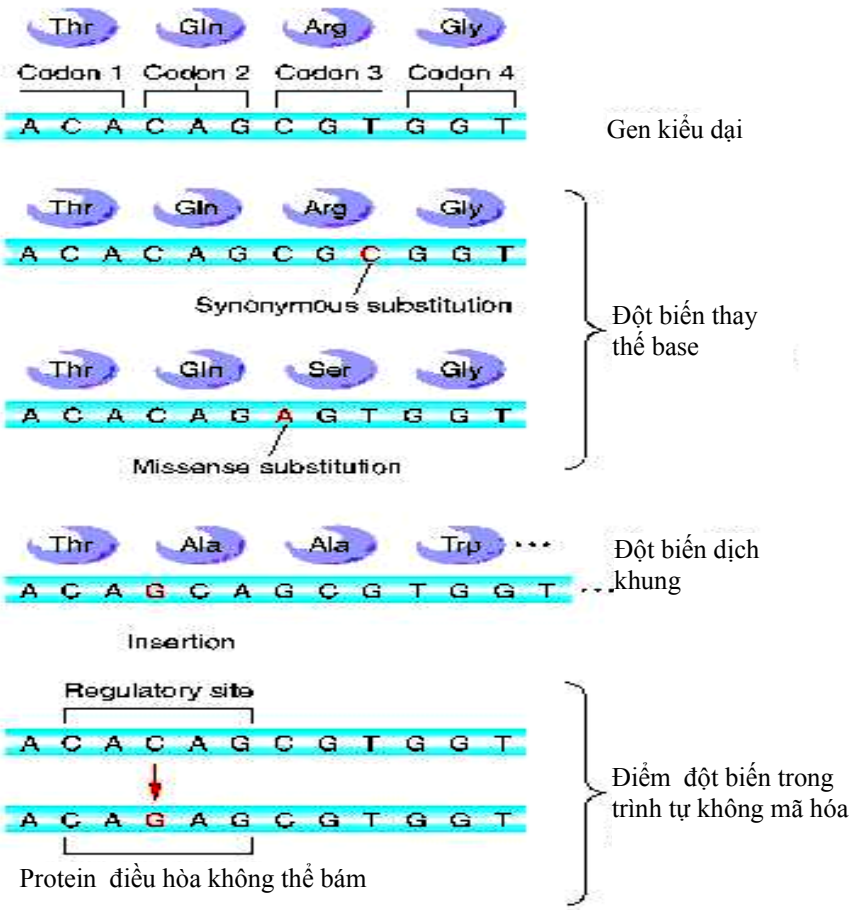
Đột biến vô nghĩa sẽ dẫn đến sự kết thúc dịch mã sớm. Vì vậy chúng gây ra hậu quả tương ứng trên chức năng protein. Nếu đột biến vô nghĩa xảy ra càng ở gần đầu 3' của khung đọc mã, kết quả ít ảnh hưởng đến protein. Tuy nhiên nhiều đột biến vô nghĩa ở vùng này vẫn tạo ra các sản phẩm hoàn toàn bị mất hoạt tính.

Giống với đột biến vô nghĩa, đột biến thêm bớt base gây hậu quả trên trình tự polypetide kể từ điểm bị đột biến (hình 4.1). Trình tự trên mRNA được đọc theo từng khung gồm ba base (codon) một lúc. Mất hoặc thêm base sẽ làm thay đổi khung đọc trong quá trình dịch mã từ điểm bị đột biến cho đến kết thúc theo khung mới. Vì vậy loại đột biến này được gọi là đột biến dịch khung (frameshift mutations). Đột biến này tạo ra trình tự acid amin kể từ điểm bị đột biến cho đến kết thúc khác với trình tự acid amin gốc. Đột biến dịch khung gây ra sự mất hoàn toàn cấu trúc và chức năng của protein bình thường.

Trường hợp đột biến xảy ra ở trình tự điều hòa và các trình tự không mã hóa khác (hình 4.1). Những phần đó của gene không trực tiếp mã hóa cho protein mà chứa nhiều điểm bám DNA chủ yếu cho protein xen vào, đó là những trình tự không nhạy cảm cho sự biểu hiện của gene hoặc cho hoạt tính của gene.

***Bảng 4.1*** *Đột biến điểm ở mức độ phân tử*

| Kiểu đột biến | Kết quả và ví dụ |
|---|---|
| • Ở mức độ DNA<br>Đột biến đồng hoán (Transition) | Purine được thay thế bằng một purine khác, pyrimidine được thay thế bằng một pyrimidine khác: A.T → G.C, G.C → A.T, C.G → T.A, T.A → C.G |
| Đột biến đảo hoán (Transversion) | Purine được thay thế bằng một pyrimidine hoặc một pyrimidine được thay thế bằng một purine:<br>A.T→ C.G, A.T→ T.A, G.C→T.A, G.C→C.G<br>T.A→G.C, T.A → A.T, C.G→ A.T, C.G→G.C |
| Đột biến thêm bớt base (Insertion-deletion) | Thêm vào hoặc mất đi một hoặc một số cặp base của DNA (thêm/mất base được gạch dưới)<br>AAGACTCCT → AAGAGCTCCT<br>AAGACTCCT → AAACTCCT |
| • Ở mức độ protein<br>Đột biến đồng nghĩa (Synonymous mutation) | Codon đặc biệt mã hoá cho cùng một acid amin:<br>AGG → CGG<br>Arg Arg |
| Đột biến nhầm nghĩa (Missense mutation)<br>Loại bảo thủ<br><br><br>Loại không bảo thủ | Codon tạo thành mã hoá cho amino acid khác<br>Mã hoá cho acid amin có cùng bản chất hoá học:<br>AAA → AGA<br>Lys Arg<br>(kiềm) (kiềm)<br>Mã hoá cho amino acid khác về bản chất hoá học: UUU → UCU<br>Phenylalanine Serine<br>kỵ nước Phân cực |
| Đột biến vô nghĩa (Nonsense mutation) | Codon kết thúc: CAG → UAG<br>Gln Stop |
| Đột biến dịch khung (Frameshift mutation) | Thêm vào một cặp base:<br>AAG ACT CCT → AAG AGC TCC T...<br>Mất một cặp base:<br>AAG ACT CCT → AAA CTC CT... |




**Hình 4.1** Hậu quả của đột biến điểm trong gene. Codon 1-4 nằm trong vùng mã hóa của gene

Ở mức độ DNA, những điểm mất đi (docking) gồm những điểm mà RNA polymerase và những nhân tố gắn kết của nó bám vào, cũng như những điểm mà protein điều hòa phiên mã đặc trưng gắn vào. Ở mức độ RNA, những docking quan trọng thêm vào gồm điểm bám của ribosome (ribosome-binding site) trên mRNA vi khuẩn, những điểm nối đầu 5' và 3' để gắn các exon ở eukaryote và các điểm có vai trò cho điều hòa dịch mã và định vị mRNA đến vùng đặc biệt trong tế bào. Nhìn chung hậu quả chức năng của bất kì đột biến điểm nào ở vùng như thế đều phụ thuộc vào việc làm gián đoạn (hoặc tạo ra) một điểm bám. Đột biến làm gián đoạn ở những điểm đó có khả năng làm thay đổi phần biểu hiện của gene dựa vào sự thay đổi số lượng sản phẩm được biểu hiện ở một thời điểm nhất định hoặc ở một mô nhất định hay bằng sự thay đổi phản ứng với những tín

hiệu (cue) của môi trường nhất định. Ngược lại, đột biến ở một vài điểm bám có thể hoàn toàn làm hỏng một giai đoạn cần cho sự biểu hiện bình thường của gene, như điểm bám của mRNA polymerase hoặc là nhân tố splicing. Vì vậy nó làm bất hoạt sản phẩm của gene hoặc ngăn cản sự hình thành sản phẩm.

Cần phân biệt giữa những thay đổi xảy ra của một đột biến gene đó là sự thay đổi trình tự DNA của gene với sự thay đổi ở mức độ kiểu hình. Nhiều đột biến điểm trong trình tự không mã hóa làm ít thay đổi hoặc không thay đổi trên kiểu hình như đột biến giữa điểm bám DNA cho protein điều hòa hoặc thay đổi những điểm khác trong gene làm thay đổi chức năng của chúng.

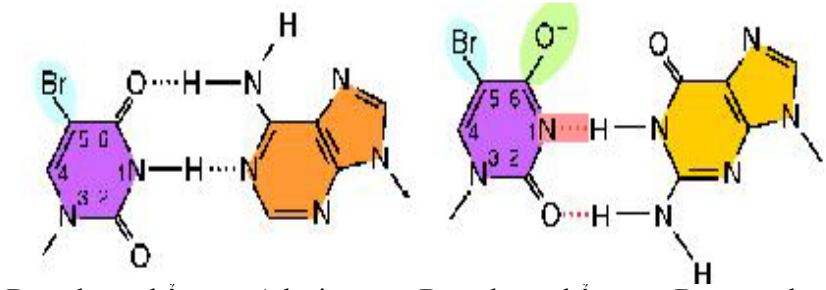
*2. Các tác nhân gây đột biến (Mutagens)*

Khi kiểm tra dãy đột biến được gây tạo bởi các tác nhân đột biến khác nhau cho thấy mỗi tác nhân đột biến được đặc trưng bởi một đặc tính đột biến khác nhau hay "preference" về cả một dạng đột biến nhất định và một điểm đột biến nhất định, được gọi là điểm dễ xảy ra đột biến (mutational hot spots). Đặc tính đột biến như thế được chú ý lần đầu tiên ở locus rII của bacteriophage T4.

Tác nhân đột biến hoạt động ít nhất qua ba cơ chế khác nhau: chúng có thể làm thay thế một base trong DNA; làm biến đổi một base gây kết cặp nhầm với một base khác; làm sai hỏng một base, dẫn đến không thể kết cặp với bất kỳ base nào trong điều kiện bình thường.

*Đột biến thay thế base*: một vài hợp chất hóa học tương tự nitrogen base bình thường của DNA, đôi khi chúng có thể gắn vào DNA thay cho base bình thường. Những chất như thế được gọi là các chất tương đương với base (base analogs). Các chất tương đương này kết cặp không như sự kết cặp của các base bình thường. Vì vậy chúng có thể gây ra đột biến do gắn vào một nucleotide không đúng trong quá trình sao chép.

Để hiểu hoạt động của các chất tương đương base, trước hết cần phải xem xét khuynh hướng tự nhiên của các base đối với sự hình thành các dạng khác nhau. Mỗi base trong phân tử DNA có thể xuất hiện ở một trong số nhiều dạng được gọi là tautomer, chúng là các đồng phân khác nhau ở vị trí vị trí nguyên tử và những liên kết giữa các nguyên tử. Dạng keto của mỗi base thường có trong DNA (hình 4.2), trong khi dạng imino và enol của base là hiếm. Tautomer imino hoặc enol có thể kết cặp sai với base tạo một kết cặp nhầm (mispair). Khả năng kết cặp nhầm như thế gây ra đột biến trong quá trình sao chép được chú ý đầu tiên bởi Watson và Crick khi các tác giả này nghiên cứu công thức về mô hình cấu trúc DNA.




**Hình 4.2** Chứng minh một vài kết cặp nhầm có thể xảy ra do kết quả của sự thay đổi 1 tautomer thành 1 tautomer khác

Sự kết cặp nhầm có thể sinh ra ngẫu nhiên, nhưng cũng có thể sinh ra khi base bị ion hóa. Tác nhân gây đột biến 5-Bromouracil (5-BrU) là chất tương đương với thymine, có brome ở vị trí carbon số 5 thay cho nhóm -$CH_3$ của thymine. Hoạt tính của nó dựa trên quá tình inolization và ionization. Ở dạng keto, 5-BrU kết cặp với adenin như trường hợp thymine. Tuy nhiên, sự có mặt của nguyên tử bromine làm thay đổi một cách có ý nghĩa sự phân bố electron ở vòng base. Vì vậy 5-BrU có thể chuyển sang dạng enol và dạng ion, và nó có thể kết cặp với guanine như trường hợp cytosine tạo ra cặp 5-BrU-G. Trong lần nhân đôi tiếp theo G kết cặp với C, tạo cặp G-C thay cho cặp A-T. Kết quả gây ra đột biến đồng hoán. Tương tự 5-BrU cũng có thể gây ra đột biến đồng hoán A-T thay cho cặp G-C.

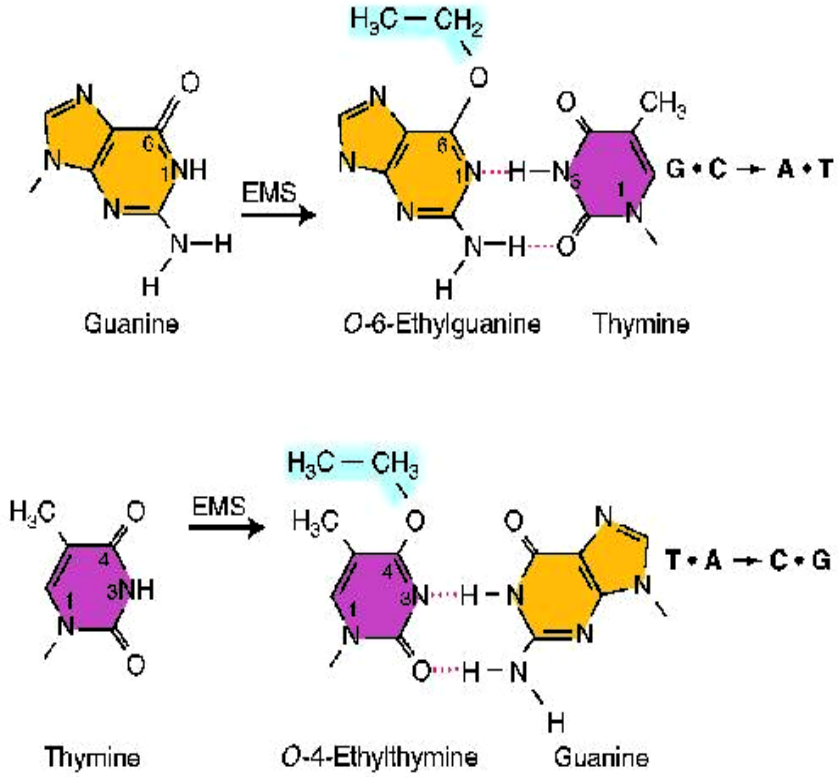
Một hóa chất gây đột biến khác là 2-amino-purine (2-AP), là hóa chất tương đương adenine, có thể kết cặp với thymine. Khi bị proton hóa, 2-AP có thể kết cặp nhầm với cytosine, có thể gây ra thế hệ sau đột biến đồng hoán G-C thay cho A-T do kết cặp nhầm với cytosine trong lần sao chép tiếp theo.

- Thay thế base (base alteration)

Một vài tác nhân đột biến không gắn vào DNA, mà lại làm biến đổi base gây ra sự kết cặp sai. Tác nhân alkyl được sử dụng phổ biến như là tác nhân đột biến, chẳng hạn như ethylmethanesulfonate (EMS) và nitrosoguanidine (NG) gây đột biến theo cách này.

Những tác nhân như thế sẽ thêm nhóm alkyl (nhóm ethyl trong trường hợp EMS và nhóm methyl trong trường hợp NG) ở nhiều vị trí trên cả 4 base. Tuy nhiên, đột biến hầu như chỉ xảy ra khi nhóm alkyl được

thêm vào ở oxy số 6 của guanine tạo ra O-6-alkylguanine. Sự alkyl hóa này dẫn đến sự kết cặp nhầm với thymine (hình 4.3). Kết quả sinh ra đột biến đồng hoán G-C→A-T trong lần sao chép tiếp theo.




**Hình 4.3** Sự kết cặp nhầm chuyên biệt do đột biến cảm ứng alkyl hoá

Tác nhân xen vào giữa (intercalating agents) là nhóm tác nhân quan trong khác gây biến đổi DNA. Nhóm của các hợp chất này bao gồm proflavin, acridine cam và một nhóm các hợp chất hóa học khác. Các tác nhân này là nhóm các phân tử bắt chước các cặp base và có thể xen vào giữa các nitrogenous base ở lõi chuỗi xoắn kép DNA. Ở vị trí xen vào này chúng gây sự thêm vào hoặc mất đi một cặp nucleotide.

- Sai hỏng base

Một số lớn tác nhân đột biến gây sai hỏng một hoặc nhiều base. Vì vậy không thể kết cặp với base đặc trưng. Kết quả làm cản trở sự sao chép vì DNA polymerase không thể tiếp tục quá trình tổng hợp DNA qua những base sai hỏng. Ở *E.coli* quá trình này xảy ra đòi hỏi hoạt tính của hệ thống SOS. Hệ thống này được kích thích như là một phản ứng khẩn cấp ngăn cản sự chết tế bào khi DNA bị sai hỏng nặng.

*3. Phát hiện các thể đột biến*

Muốn phát hiện các đột biến có hiệu quả cần có hệ thống chọn lọc để tìm thấy các đột biến hiếm hoi trong khối rất lớn các dạng không đột biến. Các hệ thống chọn lọc đột biến có nhiều phụ thuộc vào các đột biến khác nhau. Liên quan đến chọn lọc đột biến ở vi sinh vật, người ta đưa ra khái niệm lực phân giải (resolving power). Khái niệm này dùng để chỉ khả năng phát hiện các đột biến rất hiếm so với không đột biến.

Có nhiều phương pháp để phát hiện các loại đột biến ở vi sinh vật:

- **Phương pháp đề kháng**: ở vi khuẩn các tác nhân chọn lọc thường là thuốc và phage. Các đột biến được dễ dàng phát hiện trên môi trường agar có thuốc hay phage ở dạng các khuẩn lạc được mọc lên.

- **Phương pháp làm giàu chậm**: việc phát hiện đột biến khuyết dưỡng khó khăn hơn. Dung dịch vi khuẩn pha loãng được cấy lên bề mặt môi trường agar tối thiểu để mọc rời thành khuẩn lạc. Một lớp môi trường tương tự được đổ lên trên, phủ lớp mỏng. Hộp petri được ủ để các khuẩn lạc bình thường mọc lên. Sau đó, đổ phủ thêm một lớp môi trường dinh dưỡng có chất bổ sung và ủ tiếp cho chất bổ sung khuếch tán. Các đột biến khuyết dưỡng sẽ mọc sau khi có chất bổ sung, nên khuẩn lạc nhỏ hơn do mọc chậm.

- **Phương pháp làm giàu hạn chế**: là dạng đơn giản của phương pháp làm giàu chậm. Các vi khuẩn được cấy trên môi trường tối thiểu có một ít bổ sung. Trong điều kiện đó các đột biến khuyết dưỡng mọc đến khi hết chất dinh dưỡng bổ sung thì dừng, nên tạo khuẩn lạc nhỏ. Các vi khuẩn bình thường tiếp tục mọc tạo khuẩn lạc to.

- **Phương pháp làm giàu nhờ penicillin**: được áp dụng cho các vi khuẩn. Penicillin có tác dụng diệt các vi khuẩn bình thường khi phân chia. Các vi khuẩn được cho vào môi trường tối thiểu có penicillin. Các vi khuẩn đang tăng trưởng bị diệt chỉ có các tế bào đột biến không tăng trưởng còn sống sót. Sau đó hỗn hợp được cấy lên môi trường không có penicillin thì các đột biến khuyết dưỡng mọc lên với tỷ lệ tương đối cao hơn.

- **Phương pháp chọn lọc**: được sử dụng để chọn lọc các đột biến khuyết dưỡng ở nấm sợi.

Dung dịch các bào tử được nuôi trong môi trường dinh dưỡng thiếu chất bổ sung. Các đột biến thiếu chất bổ sung không mọc được, các dạng bình thường mọc ra nhiều sợi. Khi lọc qua màng lọc sợi thủy tinh, các dạng bình thường nhiều sợi bị giữ lại, các dạng đột biến đi qua màng lọc. Dung dịch có nhiều dạng đột biến được cấy trên môi trường có chất bổ sung và kiểm tra tìm các dạng đột biến.

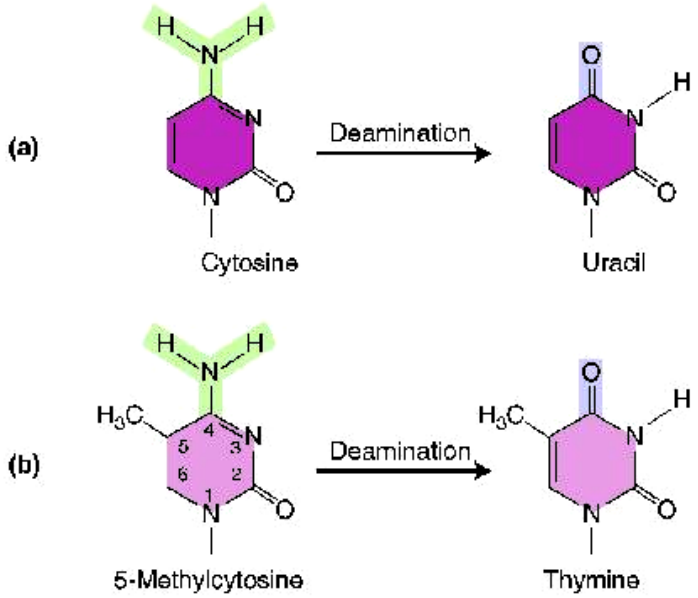
- Trong phương pháp in, các vi khuẩn được cấy để mọc rời từng khuẩn lạc trên môi trường dinh dưỡng tối thiểu. Các khuẩn lạc đột biến không mọc lên được. Căn cứ vào đột biến không mọc ở bản sao tách các đột biến khuyết dưỡng.

Ngoài ra còn có các phương pháp chuyên biệt để phát hiện các loại đột biến khác.

*4. Cơ chế phân tử của các đột biến gene*

Đột biến ngẫu nhiên xảy ra do nhiều nguyên nhân: gồm sai hỏng trong quá trình sao chép DNA, các tổn thương ngẫu nhiên, sự chen vào của yếu tố di động. Đột biến ngẫu nhiên hiếm nên khó xác định cơ chế cơ bản. Tuy nhiên, một vài hệ thống chọn lọc cho phép thu được đột biến ngẫu nhiên và phân tích ở mức độ phân tử. Từ bản chất của những thay đổi trình tự có thể suy ra quá trình dẫn đến đột biến ngẫu nhiên.

Những sai hỏng ngẫu nhiên (spontaneous lesions) đến DNA có thể sinh ra đột biến. Hai tổn thương ngẫu nhiên thường xuất hiện nhất: mất purine (depurination) và mất amin (deamination), trong đó depurination phổ biến hơn.




**Hình 4.4** Deamination của Cytosine (a) và 5-methylcytosine

Depurination do tác dụng của aflatoxin, làm mất một base purine. Ngoài ra, quá trình mất purine cũng xảy ra một cách tự nhiên. Một tế bào động vật mất ngẫu nhiên khoảng 10.000 purine của DNA trong một thế hệ tế bào khoảng 20 giờ ở 37$^{o}$C. Nếu tổn thương này được giữ lại, dẫn đến

sai hỏng di truyền đáng kể vì trong quá trình sao chép, vị trí mất purine không thể định rõ được loại base nào. Trong những điều kiện nhất định một base có thể chèn vào tạo ra đột biến.

Deamination của cytosine tạo ra uracil. Uracil sẽ kết cặp với adenin trong quá trình sao chép, kết quả tạo ra đột biến đồng hoán G-C→ A-T. Deamination 5-methylcytosine tạo ra thymine (hình 4.4). Quá trình sao chép tạo ra đột biến đồng hoán chuyển C thành T.

Ngoài 2 quá trình gây sai hỏng như trên, sự oxy hóa tạo ra các base bị sai hỏng là dạng tổn thương thứ ba. Dạng oxygen hoạt động như gốc superoxid ($O_2^{-}$), hydrogen peroxide ($H_2O_2$) và gốc hydroxyl ($^{\cdot}OH$) được tạo ra do sản phẩm của quá trình chuyển hóa (aerobic metabolism). Các dạng này có thể gây tổn thương oxy hóa đến DNA, kết quả tạo ra đột biến.

Các sai hỏng trong sao chép DNA cũng là nguồn đột biến khác.

Thay thế base: sai hỏng trong sao chép DNA có thể xảy ra khi có một cặp nucleotide ghép không chính xác (như A-C) tạo ra trong quá trình tổng hợp DNA dẫn đến sự thay thế một base.

Đột biến thêm vào và mất base: Một loại sai hỏng sao chép khác dẫn đến thêm vào hoặc mất đi một hoặc một số cặp base. Trong trường hợp số base thêm vào hoặc mất đi không chia hết cho 3, sẽ tạo ra đột biến dịch khung trong vùng mã hóa protein.

## II. Sửa chữa và bảo vệ DNA ở vi khuẩn

*1. Quang phục hoạt (Photoreactivation)*

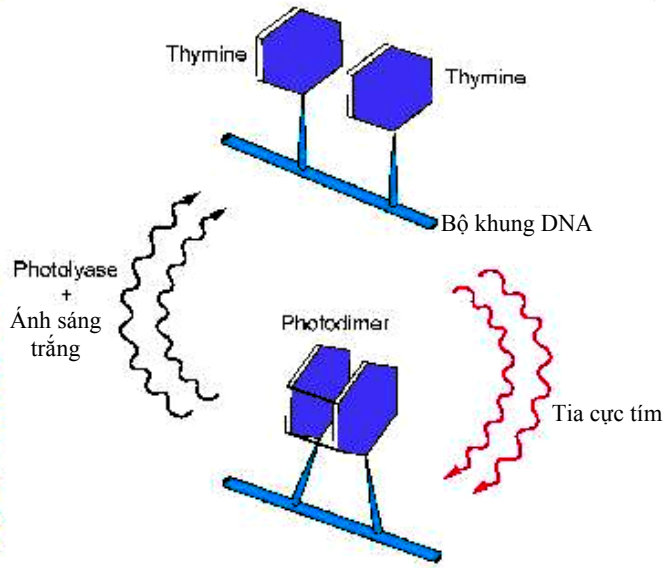
Quang phục hoạt (photoreactivation) hay sửa sai nhờ ánh sáng (light repair). Sau khi xử lý tia tử ngoại gây đột biến, nếu đưa ra ánh sáng thì phần lớn sai hỏng được phục hồi nhờ enzyme photolyase. Enzyme này gắn vào photodimer cắt nó thành các monomer dưới tác dụng của ánh sáng mặt trời có bước sóng 320-370 nm. Sau đó phục hồi các base ban đầu (hình 4.5).

*2. Sửa chữa bằng cắt bỏ (excision repair)*

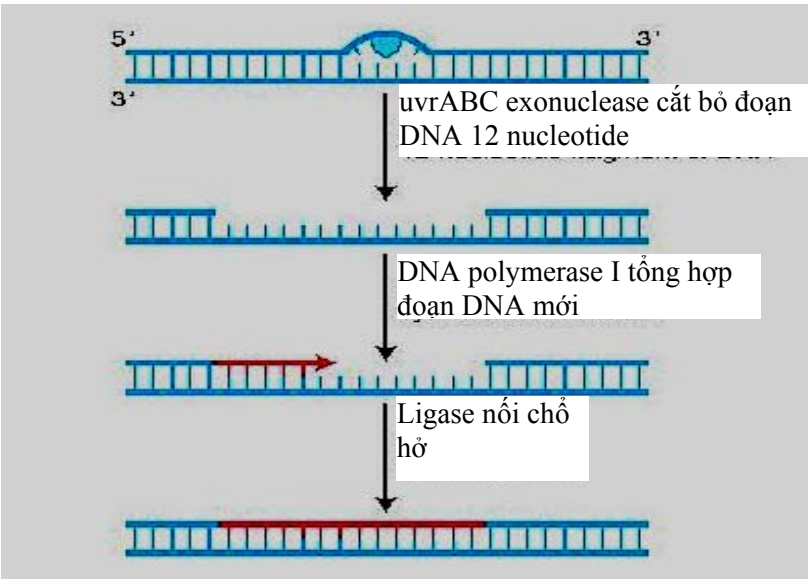
Phần lớn các cơ chế sửa sai khác thực hiện theo lối cắt bỏ (excistion repair) không cần ánh sáng nhờ các nuclease, sau đó thay vào các base đúng. Có thể xảy ra theo nhiều cách:

+ Cắt các base (base excision repair) Sự cắt bỏ các base sai hỏng nhờ các enzyme DNA glycosylase. Các enzyme này nhận biết các base bị biến đổi và các điểm mất purine hay mất pyrimidine và thủy giải liên kết N-glycosilic nối base với đường. Rồi enzyme AP endonuclease cắt liên kết đường và phosphate gần base bị biến đổi. Sau đó enzyme thứ ba,

deoxyribophosphodiesterase loại bỏ từng nucleotide kế tiếp nhau ở đoạn bị hỏng. Sau đó, DNA polymerase lấp đầy khoảng trống với các nucleotide bổ sung với sợi khuôn còn lại. Enzyme DNA ligase sẽ gắn các khe hở giữa 2 đầu 3'-5' (hình 4.6).




**Hình 4.5** Sự tạo thành và sự loại bỏ dimer thymine




**Hình 4.6** Sửa sai bằng cắt bỏ nucleotide

Trong tế bào tồn tại một số DNA glycosylase. Chẳng hạn, enzyme uracil-DNA glycosylase cắt uracil khỏi DNA. Uracil tạo thành do đột biến mất nhóm amin ngẫu nhiên ở cytosine, dẫn đến đột biến đồng hoán thay C bằng T. Enzyme này phát hiện ra uracil trên DNA như là một bất thường, chúng sẽ cắt bỏ và sửa sai.

+ Cắt các nucleotide: Sự cắt bỏ vùng có nhiều pyrimidine dimer được thực hiện nhờ enzyme exonuclease (enzyme rạch mạch hay enzyme tạo khấc trên DNA) như phức hợp 3 enzyme được mã hóa bởi gene uvr ABC của *E. coli*. Phức hợp này cắt đoạn 12 nucleotide trên một mạch: 8 nucleotide từ một đầu bị sai hỏng và 4 nucleotide của đầu còn lại. Khoảng trống của 12 nucleotide này sẽ được lấp đầy nhờ enzyme DNA polymerase I dựa vào mạch đơn bổ sung kia của trình tự DNA gốc. DNA ligase sẽ gắn vào các khe hở.

+ Sửa sai dựa vào tính tương đồng (Homology-dependent repair system)

Một hệ thống sửa sai quan trọng đã phát hiện tính chất bổ sung đối song song của 2 mạch đơn DNA để phục hồi đoạn sai hỏng trở lại trạng thái bình thường ban đầu. Trong hệ thống này, đoạn DNA sai hỏng bị cắt bỏ và thay bằng một đoạn nucleotide mới được tổng hợp bổ sung với sợi khuôn đối diện. Sự sửa sai xảy ra qua sợi khuôn và nguyên tắc của sao chép DNA bảo đảm sự sửa sai hoàn thành với độ chính xác cao - đó là sự giải phóng sai hỏng (error-free). Có 2 hệ thống chủ yếu để loại bỏ sai hỏng: Hệ thống sửa chữa sai hỏng phát hiện ra trước khi sao chép và hệ thống sửa chửa sai hỏng phát hiện trong quá trình diễn biến sao chép (sửa sai sau sao chép).

*3. Sửa chữa kết cặp sai (Mismatch repair)*

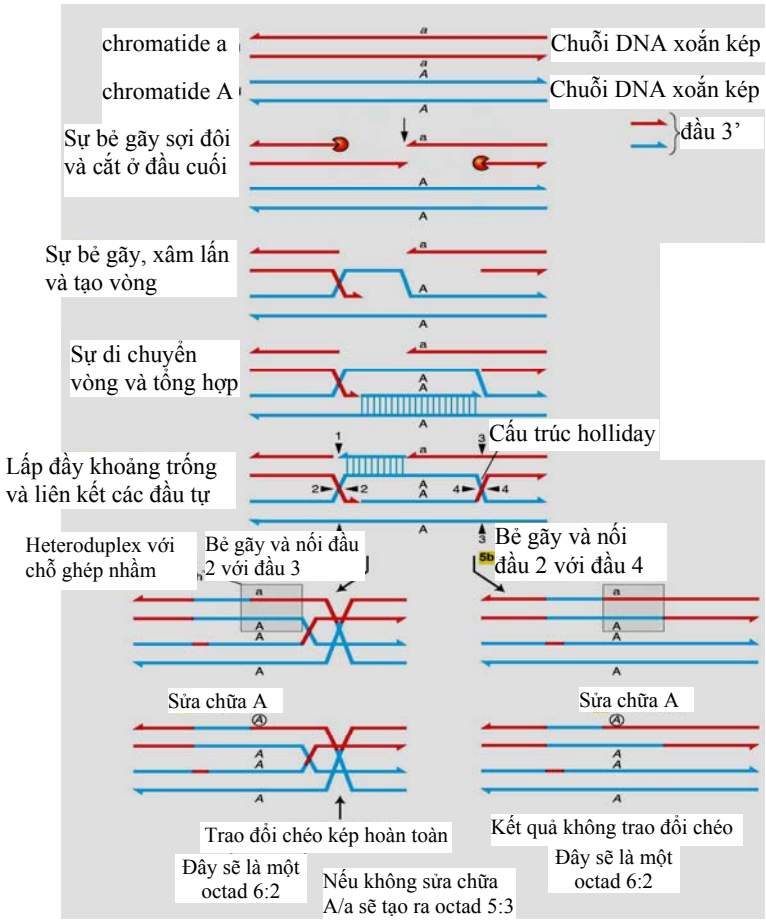
Cơ chế sửa chữa đối với các base kết cặp sai (proofreading for base-pair matching) được thực hiện trong sao chép DNA. Trong quá trình sao chép, trước khi thực hiện phản ứng polymer hóa nối các nucleotide, các nucleotide triphotphate mới phải bắt cặp bổ sung với mạch khuôn. Nếu sự bắt cặp sai xảy ra, DNA polymerase sẽ loại bỏ nucleotide bắt cặp sai. Ngay cả trước khi nucleotide mới ráp vào, enzyme dò lại cặp base cuối, nếu chúng không bắt cặp thì sự polymer hóa tiếp theo bị dừng. Cặp nucleotide ở đầu cuối 3' bắt cặp sai sẽ bị loại bỏ nhờ hoạt tính exonuclease3'→5' của DNA polymerase. Khi đã bắt cặp đúng, quá trình polymer hóa mới được tiếp tục.

Hoạt tính đọc sửa đối với các base bắt cặp sai là đặc tính của nhiều DNA polymerase đảm bảo cho sự kéo dài chính xác của mạch đạng được tổng hợp.

*4. Sửa chữa tái tổ hợp Error-prone*

Trong một số trường hợp sự sửa sai thất bại, tính liên tục của bộ gene vẫn có thể duy trì nhờ sao chép "úp sấp sai hỏng" (error-prone replication), DNA polymerase có thể bỏ qua chỗ sai sao chép tiếp.

Khi cả 2 sợi của chuỗi xoắn kép bị đứt ở cùng một vị trí, được gọi là đột biến đứt mạch đôi, có thể gây ra sai hình nhiễm sắc thể, làm chết tế bào hoặc tạo ra trạng thái tiến ung thư. Tế bào sử dụng nhiều protein và con đường sửa sai đứt gãy mạch đôi là thực hiện tái tổ hợp trong giảm phân. Quá trình sửa chữa do trao đổi chéo trong giảm phân xảy ra như sau (hình 4.7):




**Hình 4.7** Mô hình bẻ gãy sợi đôi nhờ trao đổi chéo

Trên một nhiễm sắc thể xảy ra sự đứt mạch đôi và kết quả ăn mòn các đầu mút ở đoạn ngắn của DNA sợi đơn. Đầu 3' của một trong những sợi này "xâm lấn" vào một chromatid.

Đoạn xâm lấn làm mồi cho tổng hợp các base bị mất của nó nhờ sử dụng sợi đối song song của chromatid như là sợi khuôn. Sự tổng hợp mới này sẽ tạo ra một vòng sợi đơn lai với một sợi đơn không xâm lấn. Vì vậy tạo ra một vùng dị hợp tử nhỏ "Aa" và sử dụng như mạch khuôn để khôi phục các base bị mất trên sợi đó. DNA polymerase sẽ lấp đầy chỗ trống và enzyme ligase sẽ nối các đầu mút xảy ra trong cấu trúc đặc biệt giống với trao đổi chéo 2 sợi đơn. Cấu trúc này cũng chứa các đoạn bắt cặp không tương đồng đơn giản.

Trao đổi chéo sợi đơn được gọi là cấu trúc Holliday (Holliday structure) do Holliday phát hiện vào những năm 1960.

*5. Bảo vệ bằng hệ thống các enzyme methylase và restriction endonuclease*

Ngoài hệ thống sửa sai, tế bào còn có các hệ thống bảo vệ DNA. Các vi khuẩn có hệ thống miễn nhiễm đáng kể với các DNA lạ.

Mặc dù trình tự các base trên phân tử DNA là cố định, nhưng một số base bị biến đổi hoá học sau khi đã được gắn vào DNA. Cả sinh vật tiền nhân và sinh vật nhân thực đều có các enzyme methyl hoá (methylation) gắn nhóm $–CH_3$ ở những điểm nhất định trên phân tử DNA. Các enzyme này có tính đặc hiệu cao chuyên hoá cho từng dòng vi khuẩn, nên DNA của mỗi dòng vi khuẩn được methyl hoá ở những điểm chuyên biệt nhất định tuỳ mỗi dòng. Nhờ đó mỗi vi khuẩn dễ dàng phân biệt giữa DNA của bản thân chúng với DNA lạ xâm nhập vào. Các enzyme cắt hạn chế (restriction enzyme) là một loại endonuclease của mỗi dòng vi khuẩn, không cắt DNA của chúng vì đã được methyl hoá ở những điểm nhất định.

Các cơ chế biến đổi chính DNA của nó một cách đặc hiệu và phân huỷ hay cắt hạn chế các phân tử DNA không được đánh dấu. Hệ thống restriction-modification (R-M) ngăn chặn DNA ngoại lai không có hoạt động chức năng nhưng có thể thực hiện tái tổ hợp.

Hệ thống restriction-modification có 2 tính chất căn bản

- Hoạt tính cắt hạn chế (restriction) đặc hiệu chống sự xâm nhập của DNA ngoại lai

- Hoạt tính bảo vệ DNA của bản thân nó

Hệ thống R-M lần đầu tiên được phát hiện khi nghiên cứu sự nhiễm phage vào vi khuẩn *E. coli*. Sự biến đổi thường là methyl hoá nhóm 6 – amino của Adenin trong những trình tự đặc hiệu, trong hệ thống kiểu II, C5 của Cytosine được methyl hoá. Restriction được thực hiện do các hệ thống endonuclease. Chúng nhận biết các điểm đặc hiệu ít nhất ở một mạch DNA không bị biến đổi. Endonuclease cắt đứt mạch ở nhiều điểm

nhận biết và sau đó các đoạn ngắn được cắt bằng các nuclease khác. Phần lớn các DNA bị biến đổi các các đặc tính di truyền không ổn định. Sự methyl hoá thường mất qua sao chép trong tế bào chủ.

Các nghiên cứu cho thấy ở *E. coli* B có 3 gene liên kết chặt với nhau mã hoá cho 3 sản phẩm khuyếch tán: các polypeptid phục vụ cho các restriction, cho sự biến đổi và tạo sự đặc hiệu của điểm nhận biết.

DNA mạch kép nhạy cảm hơn với biến đổi và restriction. Các phage mạch đơn như M13 và ϕX174 ít bị tác động hơn. Sự biến đổi của một mach DNA đủ để miễn nhiễm DNA lạ. Do vậy DNA sao chép bán bảo tồn được bảo vệ bởi methyl hoá mạch khuôn.

## III. Các yếu tố di truyền vận động (Transposable genetic elements)

*1. Các yếu tố di truyền vận động ở vi khuẩn*

Trình tự đoạn xen (insertion sequence) của vi khuẩn là một đoạn DNA của vi khuẩn di chuyển từ một vị trí trên nhiễm sắc thể đến vị trí mới trên cùng nhiễm sắc thể hoặc trên nhiễm sắc thể khác. Khi xen vào giữa gene, yếu tố IS làm gián đoạn trình tự mã hóa và làm bất hoạt sự biểu hiện của gene. Một số trường hợp, có tín hiệu kết thúc phiên mã và dịch mã, yếu tố IS làm cản trở sự biểu hiện ở sau promoter trong cùng operon.

***Bảng 4.2*** *Một vài trình tự xen vào và kích thước của chúng*

| Trình tự xen vào | Số bản sao trong *E. coli* | Chiều dài (bp) | Đoạn lặp lại đảo ngược (bp) |
|---|---|---|---|
| IS1 | 5-8 bản sao trên nhiễm sắc thể | 768 | 18-23 |
| IS2 | 5 bản sao trên nhiễm sắc thể, 1 bản sao trên plasmid | 1327 | 32-41 |
| IS3 | 5 bản sao trên nhiễm sắc thể, 2 bản sao trên plasmid | 1400 | 32-38 |
| IS4 | 1-2 bản sao trên nhiễm sắc thể, | 1400 | 16-18 |
| IS5 | Chưa biết | 1250 | Ngắn |

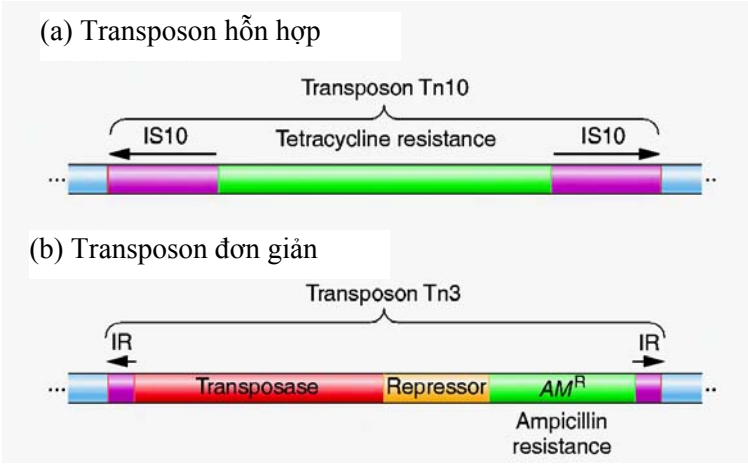
Yếu tố IS được tìm thấy đầu tiên ở operon *gal* của *E. coli*, chia làm bốn nhóm: IS1, IS2, IS3 và IS4. Chúng có thể phân bố rãi rác trên nhiễm sắc thể chính của vi khuẩn và trên các plasmid. Ví dụ yếu tố IS1 có khoảng 5-8 bản sao trên nhiễm sắc thể với chiều dài 768 bp.

Tất cả các yếu tố IS đều chứa đoạn DNA mã hóa cho protein, được gọi là transposase, là enzyme cần thiết cho sự di chuyển của yếu tố IS từ

một vị trí trên nhiễm sắc thể đến vị trí khác. Đoạn gene này nằm giữa 2 đoạn lặp lại đảo ngược (inverted repeat - IR) ngắn. Ví dụ yếu tố IS1 có khoảng 5-8 bản sao trên nhiễm sắc thể với chiều dài 768 bp, đoạn lặp lại đảo ngược có kích thước 18-23 bp, yếu tố IS2 có 5 bản sao và các yếu tố IS khác. Yếu tố IS là những vùng của các trình tự xác định, chúng là những vị trí xảy ra trao đổi chéo. Ví dụ: Sự tái tổ hợp của plasmid và nhiễm sắc thể của *E. coli* tạo ra những chủng Hfr xảy ra qua trao đổi chéo đơn giữa yếu tố IS trên plasmid và yếu tố IS trên nhiễm sắc thể.

1.1. Gene nhảy

Các yếu tố IS riêng lẻ không chỉ có khả năng tự di chuyển mà khi hai yếu tố này nằm đủ gần nhau thì chúng có thể vận động như một đơn vị hoàn chỉnh và mang theo các gene nằm giữa chúng. Cấu trúc phức tạp này được gọi là transposon. Có hai kiểu transposon ở vi khuẩn:




**Hình 4.8** Đặc trưng về cấu trúc của transposon hỗn hợp (composite transposon) và transsposon đơn giản (simple transposon)

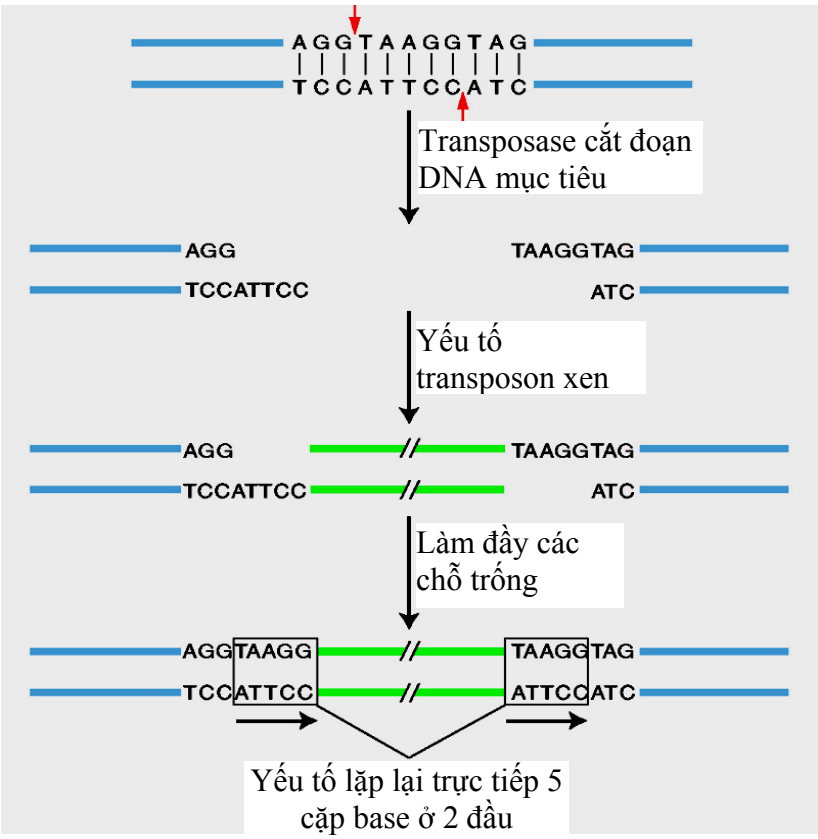
Transposon hỗn hợp (composite transposon) chứa nhiều gene nằm giữa 2 trình tự IS gần nhau, có hướng ngược nhau tạo ra tình tự lặp lại đảo ngược (inverted repeat - IR). Một trong 2 yếu tố IS mã hóa cho transposase xúc tác cho sự chuyển vị của cả transposon. Chẳng hạn Tn10 là transposon hỗn hợp mang gene mã hóa cho tính kháng kháng sinh tetracyline. Gene này nằm giữa hai yếu tố IS10 có hướng ngược nhau.

Transposon đơn giản (simple transposon) ở giữa các trình tự IR, nhưng những trình tự này ngắn (<50bp) và không mã hóa cho transposase. Sự chuyển vị của chúng không phải là kết quả của sự liên kết với yếu tố IS. Các transposon đơn giản mã hóa transposase riêng thêm vào để mang các gene của vi khuẩn. Tn3 là một transposon đơn giản (hình 4.8).

Transposon hỗn hợp và transposon đơn giản đều chứa các gene thêm vào liên quan đến chức năng mới ở tế bào vi khuẩn. Cả hai loại này thường được gọi chung là transposon. Transposon dài hơn yếu tố IS (thường chứa vài kb), chúng chứa các gene mã hóa cho protein thêm vào.

1.2. Cơ chế của sự chuyển vị

Đầu tiên, transposase cắt vết hình chữ chi qua 5 cặp base (khác với sự cắt của enzyme restriction endonuclease) ở vi trí DNA mục tiêu (target site DNA) (hình 4.9). Tiếp theo là sự hội nhập của transposon qua trung gian của transposase, transposon xen vào giữa các đầu mút của chữ chi. Đầu lồi ra của sợi đơn được sử dụng như là khuôn để tổng hợp sợi bổ sung thứ hai. Sự gắn vào tạo sự sao chép 5 cặp base, được gọi là sự sao chép điểm mục tiêu (target site duplication).




**Hình 4.9** Sự nhân đôi đoạn trình tự DNA ngắn ở điểm xen vào (insertion site)

Hầu hết các yếu tố di động của prokaryote đều sử dụng một trong 2 cơ chế chuyển vị: là sao chép (replicative) và bảo thủ (conservative) hay không sao chép. Trong con đường sao chép (như ở Tn3), một bản sao mới của yếu tố di động tạo ra khi chuyển vị, kết quả là một bản sao ở vị trí mới

và bản sao còn lại ở vị trí cũ. Trong con đường bảo thủ (như ở trường hợp Tn10) không có sự sao chép. Thay vào đó, yếu tố được cắt ra từ nhiễm sắc thể hoặc plasmid và được gắn vào vị trí mới. Con đường này còn được gọi là con đường "cắt và dán" (cut and paste)

*2. Các yếu tố di truyền vận động ở virus*

Retrovirus là virus RNA sợi đơn, sao chép qua trung gian DNA sợi kép. RNA được sao chép thành DNA nhờ enzyme phiên mã ngược. DNA sợi kép được gắn vào nhiễm sắc thể tế bào chủ, từ đó phiên mã tạo RNA virus và tạo protein hình thành hạt virus mới. Một vài retrovirus như virus tạo khối u chuột (MMTV) và virus sarcoma Rous (RSV) xâm nhiễm kích thích tạo khối u ung thư. Khi gắn vào nhiễm sắc thể, bản sao DNA sợi kép của genome virus được gọi là provirus.

Phương thức phiên mã ngược của các phần tử di động tương tự như của retrovirus. Sự di chuyển qua trung gian RNA nhờ reverse transcritase tạo cDNA và sự xen đoạn cDNA vào vị trí mới được gọi là retrotransposition.

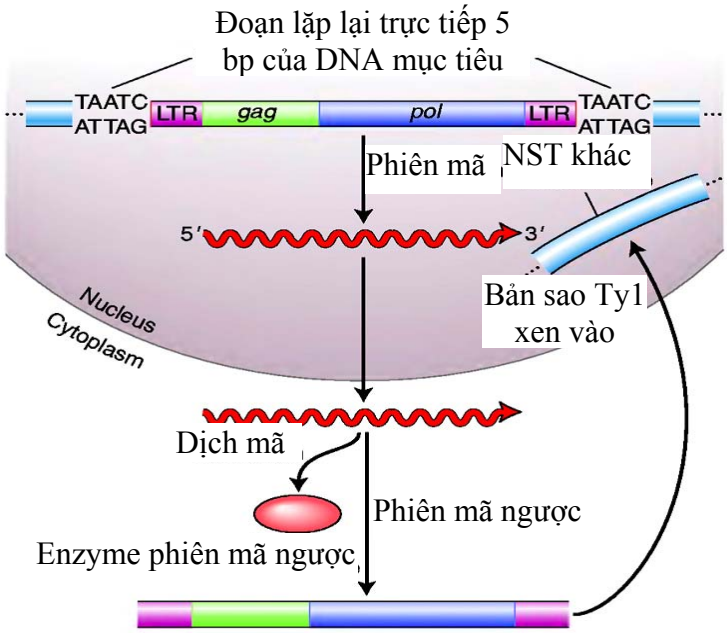
Retrotransposition tạo bản sao của phần tử ở vị trí mới, trong khi phân tử cho ban đầu vẫn giữ nguyên cấu trúc không đổi. Do vậy retrotransposition tạo nên một ít đứt đoạn và các tái cấu trúc của bộ gene tế bào chủ. Những biến đổi của bộ gene liên quan với retrotransposition sẽ dẫn đến việc làm ngừng hay hoạt hóa các gene mà một số gene có thể gây ung thư.

*3. Các yếu tố di truyền vận động ở vi nấm*

Gery Fink và cs. là những người đầu tiên sử dụng nấm men để nghiên cứu điều hoà hoạt tính gene ở eukaryote. Các tác giả này đã phân lập được hàng ngàn đột biến gene HIS4 mã hóa enzyme tham gia tổng hợp histidine. Trong số hơn 1.500 đột biến ngẫu nhiên HIS4 được tìm thấy có 2 đột biến có kiểu hình không bền vững. Các đột biến không bền vững này có tần số phục hồi lại dạng kiểu dại cao 1.000 lần hơn các đột biến HIS4 khác. Những đột biến này cho đoạn DNA lớn xen vào gene HIS4, sự xen vào này được thực hiện do một trong các yếu tố là Ty của nấm men. Có 35 bản sao của yếu tố xen đoạn gọi là Ty1 ở genome của nấm men.

Việc tạo dòng những yếu tố này từ các allele đột biến cho thấy xen đoạn này không giống với yếu tố IS hoặc transposon của vi khuẩn. Thay vào đó chúng có đặc tính của retrovirus (virus của động vật). Có sự giống nhau trong cấu trúc và thành phần gene của retrovirus và yếu tố Ty1 được phân lập từ đột biến HIS4. Giống với retrovirus, transposon của nấm men có lặp đoạn cuối dài (long terminal repeat sequence) LTRs, chứa hàng

trăm cặp base, được gọi là trình tự δ nằm ở 2 phía đoạn mã hóa, cả hai đều chứa gene *gag* và gene *pol*. Retrovirus có ít nhất 3 gene mã hóa cho 3 protein trong quá trình sao chép: gene *gag* mã hóa cho một protein có vai trò làm biến tính RNA genome. Gene *pol* mã hóa enzyme reverse transcriptase. Gene *env* mã hóa cho protein vỏ. Yếu tố Ty chỉ chứa gene *gag* và gene *pol*, không chứa gene *env* (hình 4.10)




**Hình 4.10** Sự chuyển vị nhờ retrotransposition

Mô hình về sự chuyển vị nhờ retrotransposon. Một bản phiên mã RNA từ retrotransposon dưới tác dụng của enzyme phiên mã ngược tạo thành DNA nhờ enzyme reverse transcriptase được mã hóa bởi retrotransposon. Bản sao DNA được chèn vào vị trí mới trên bộ gene.

Vào năm 1985, J. Bocke và G. Fink đã chứng minh, yếu tố Ty1, giống với retrovirus, thực hiện việc di chuyển qua trung gian RNA. Chúng bắt đầu bằng biến đổi yếu tố Ty1 của nấm men được tạo dòng trên plasmid. Trước tiên ở một đầu mút của yếu tố, có sự xen vào một promoter được hoạt hóa nhờ thêm galactose vào môi trường. Thứ hai, một intron từ một gene khác của nấm men được đưa vào vùng mã hóa của transposon Ty. Sự thêm vào galactose làm tăng tần số chuyển vị của yếu tố Ty bị biến đổi. Điều này làm tăng số lượng RNA, vì galactose kích thích phiên mã RNA Ty bắt đầu từ promoter nhạy cảm galactose.

## Câu hỏi và Bài tập

1. Vì sao phần lớn các đột biến ảnh hưởng đến các gene cấu trúc thường là lặn so với các allele hoang dại?

2. Sự hình thành đột biến dịch khung diễn ra như thế nào?

3. Các hóa chất gây đột biến có đặc điểm gì?

4. Giải thích cơ sở đột biến của các tác nhân gây đột biến sau: 5-bromuracil, acid nitrơ và acridin.

5. Hãy mô tả một loại sai hỏng ngẫu nhiên dẫn đến đột biến.

6. Phân tích sự giống nhau và khác nhau giữa các kiểu transposition.

7. Các trình tự đảo ngược có vai trò gì trong transposition?

8. Cho một chuỗi trình tự nucleotid trên mRNA như sau:

Dạng hoang dại: ... 5' AAUCCUUACGGA 3' ...

Dạng đột biến: .... 5' AAUCCUACGGA 3' ...

Hãy cho biết sai hỏng trên xảy ra do loại đột biến nào?

9. Đột biến xảy ra trong trình tự nucleotid do kết cặp nhầm như sau:

5' AGCTGCCTT 3'

3' ACGATGGAA 5' (mạch khuôn)

Acid amin nào liên quan codon có nucleotid bị thay đổi như trên?

## Tài liệu Tham khảo

1. Phạm Thành Hổ. 2000. Di truyền học. NXB Giáo Dục.

2. Lê Đình Lương, Phan Cự Nhân (1998). Cơ sở di truyền học. NXB GD.

3. Hoàng Trọng Phán. 1995. Di truyền học phân tử. Trung tâm Đào tạo Từ xa, Đại học Huế

4. Anthony J. F. Griffiths, Susan R. Wessler, Richard C. Lewontin, William M. Gelbart, David T. Suzuki, Jeffrey H. Miller. 2004. An introduction to genetics analysis. W.H. Freeman Publishers.

5. Harlt D.L., Jones E.W. 1998. Genetics - Principle and analysis. Jone and Bartlett Publshers, Toronto, Canada.

6. Stansfield W.D. 1991. Schaum's outline of theory and problems of genetics. McGraw-Hill, Companies, Inc., United States of America.

7. Watson D.J, Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R. 2004. Molecular biology of the gene. Benjamine Cummings, San Francisco, United States of America.

## Chương 5

# Di truyền học Virus

## I. Đặc tính của các virus

*1. Tính đa dạng về cấu trúc và thành phần di truyền*

Virus có bộ gene rất đa dạng. Bộ máy di truyền của virus có thể là DNA mạch kép (double strand - dsDNA), DNA mạch đơn (single strand - ssDNA), RNA mạch kép (dsRNA) hay RNA mạch đơn (ssRNA). Bộ gene RNA của virus là một phân tử hoặc một đoạn, sợi đơn phân cực mạch (+) hoặc mạch (-), có thể ở dạng vòng tròn hay dạng thẳng. Virus nhỏ nhất có nhất có khoảng 4 gene, virus lớn có khoảng vài trăm gene. Bộ gene của virus cấu trúc đa dạng nhưng đều đảm bảo yêu cầu chung là phải sao chép được trong tế bào chủ tạo ra cả genome cho lắp ráp virion thế hệ sau và các mRNA phải tổng hợp protein của virus.

*2. Tính đặc thù về vật chủ (Host specificity)*

Mỗi kiểu virus có thể nhiễm và kí sinh chỉ ở một biên độ giới hạn của tế bào được gọi là biên độ chủ (host range). Các virus nhận biết tế bào chủ theo nguyên tắc "ống khóa và chìa khóa" các protein bên ngoài của virion lấp vừa các điểm nhận trên bề mặt tế bào. Một số virus có biên độ chủ rộng đủ để xâm nhập vào vài loài. Chẳng hạn, các virus bệnh dại có thể nhiễm nhiều loài có vú gồm gậm nhấm, chó và người. Biên độ có thể rất hẹp như nhiều phage chỉ nhiễm vi khuẩn *E. coli*.

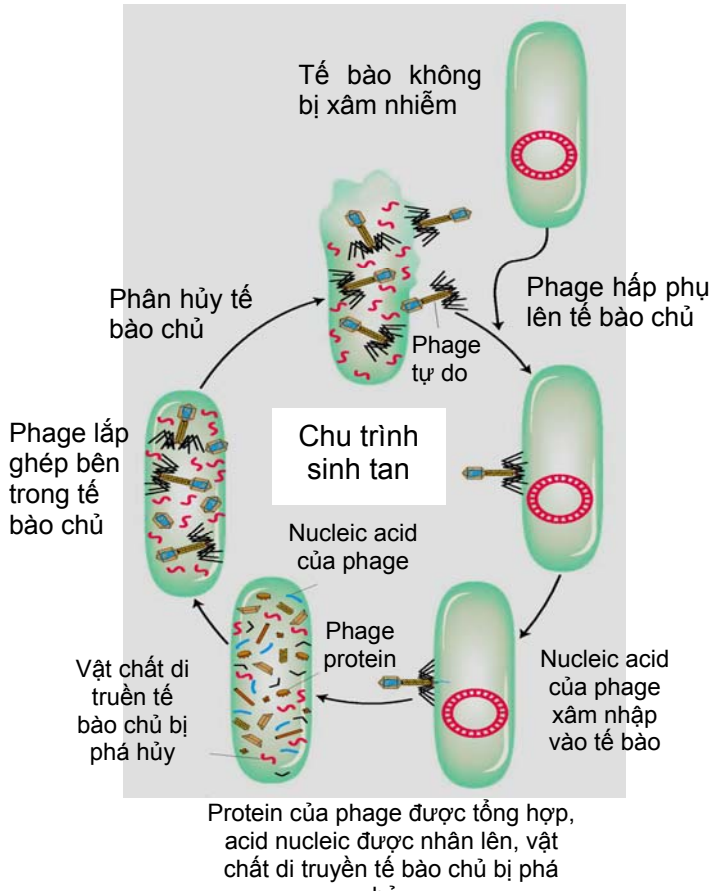
## II. Di truyền học thể thực khuẩn (Bacteriophage hay phage)

*1. Sự hình thành vết tan và các thể đột biến phage*

Phage được phát hiện dễ dàng vì trong chu trình tan, một tế bào bị nhiễm phage vỡ ra và giải phóng các hạt phage vào môi trường (hình 5.1). Sự tạo thành các đốm đã được quan sát.

Một số lớn tế bào vi khuẩn (khoảng $10^8$ tế bào) được trãi lên trên môi trường đặc. Sau một thời gian sinh trưởng, tạo một lớp tế bào vi khuẩn màu trắng đục. Nếu phage có mặt ở thời điểm vi khuẩn được trãi lên môi trường, nó sẽ nhiễm vào tế bào vi khuẩn. Sau đó tế bào nhiễm phage bị làm tan và giải phóng nhiều phage mới. Thế hệ sau này của phage lại nhiễm vào vi khuẩn gần đó, và tham gia vào chu trình tan khác, các vi khuẩn này bị vỡ giải phóng ra nhiều phage, chúng có thể nhiễm vào các vi khuẩn khác ở vùng lân cận. Chu trình xâm nhiễm của phage được tiếp tục và sau nhiều giờ, phage phá huỷ tất cả các tế bào vi khuẩn của một

vùng, tạo đốm (plage) trong suốt khác với lớp tế bào vi khuẩn màu trắng đục.

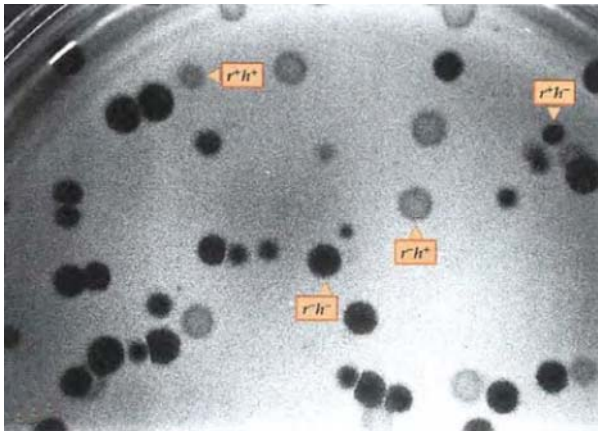



**Hình 5.1** Chu trình sinh tan của bacteriophage

Phage chỉ có thể được nhân lên chỉ khi sinh trưởng trong tế bào vi khuẩn, vì vậy làm cạn nguồn dinh dưỡng trong môi trường sinh trưởng, làm hạn chế sự nhân lên của phage và kích thước của đốm. Vì mỗi đốm là kết quả của sự nhiễm một hạt phage ban đầu, có thể đếm được số lượng các đốm riêng biệt có trên môi trường (hình 5.2).

Kiểu gene của các thể đột biến phage có thể được xác định nhờ nghiên cứu các đốm. Trong một số trường hợp, sự xuất hiện của các đốm là đầy đủ. Chẳng hạn, đột biến phage làm giảm số lượng phage thế hệ sau từ những tế bào bị nhiễm thường tạo đốm nhỏ hơn. Các đốm lớn có thể được tạo ra bởi các đột biến gây ra sự tan sớm các tế bào bị nhiễm, nên mỗi đốm đó tiếp tục nhiễm nhanh hơn. Kiểu đột biến khác của phage có

thể được xác định bởi phage có khả năng hoặc không có khả năng tạo đốm trên những chủng vi khuẩn đặc biệt.




**Hình 5.2** Sự xâm nhập của phage vào tế bào vật chủ theo cả 2 dạng bố mẹ đồng thời.
$r^+$: đốm nhỏ, $r^-$: đốm lớn, $h^+$: đốm mờ, $h^-$: đốm trong

*2. Tái tổ hợp di truyền trong chu kỳ sinh tan (Lytic cycle)*

Các phage tuy có kích thước nhỏ bé phải nhìn dưới kính hiển vi điện tử mới thấy được. Nhưng các tính trạng của phage được quan sát dựa theo các vết tan hoặc biên độ chủ. Cho hai dòng phage $T_4$ có kiểu gene khác nhau nhiễm vào một tế bào vi khuẩn *E.coli*, một vài phage thế hệ sau sẽ thực hiện tái tổ hợp di truyền, DNA phage sao chép và trao đổi đoạn nếu có nhiễu âm. Allele $r^-$ tan nhanh, kết quả tạo ra đốm lớn, allele $h^-$ nhiễm vào các tế bào chủ, kết quả tạo đốm trong. Phép lai như sau:

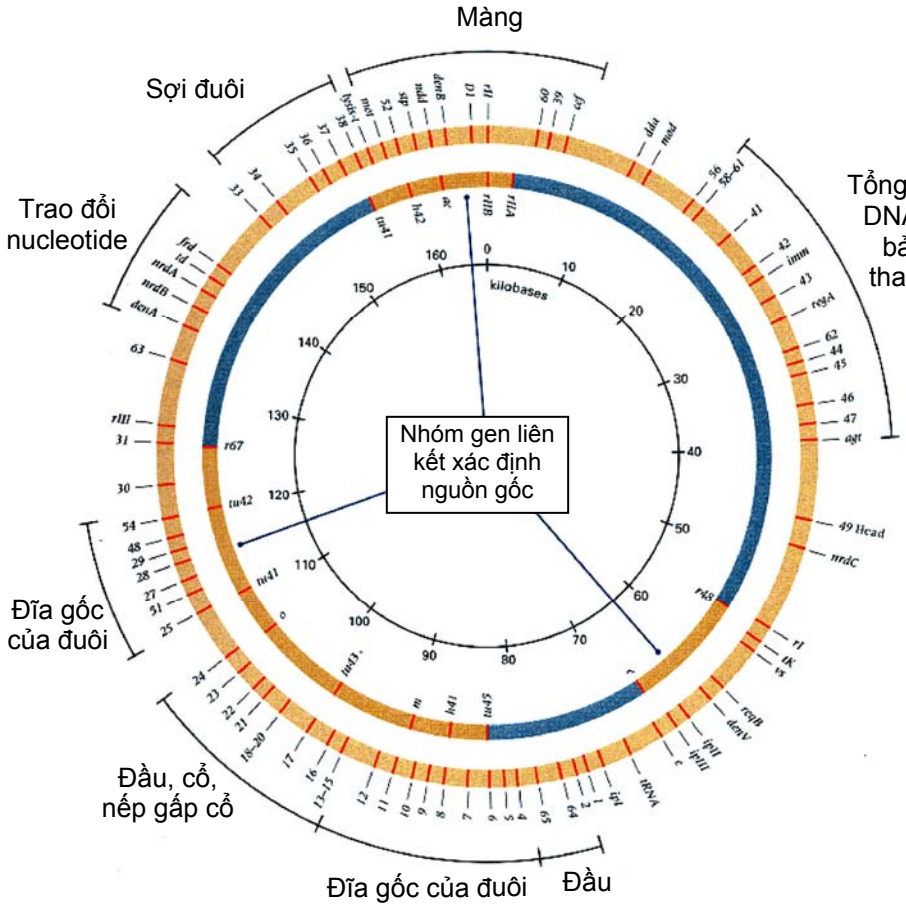
$r^-h^+ \quad \times \quad r^+h^-$

Kết quả thu được bốn kiểu đốm. Hai kiểu đốm đục, lớn và đốm trong, nhỏ tương ứng với kiểu hình của phage bố mẹ. Hai kiểu hình khác, đốm trong lớn, đốm mờ nhỏ là dạng tái tổ hợp tương ứng kiểu gene $r^-h^-$ và $r^+h^+$. Khi nhiều vi khuẩn bị nhiễm số dạng tái tổ hợp thuận nghịch thường được tìm thấy trong số các phage ở thế hệ sau. Trong thí nghiệm, mỗi kiểu gene trong số bốn kiểu gene trên sinh ra kiểu hình khác nhau về dạng đốm (hình 5.2). Số lượng kiểu gene có thể xác định được bằng kiểm tra các đốm tạo thành. Tần số tái tổ hợp, được biểu diễn dưới dạng phần trăm, được xác định như sau:

$$\text{Tần số tái tổ hợp} = \frac{\text{Số phage tái tổ hợp}}{\text{Tổng số phage}} \times 100$$

*3. Sự sắp xếp của các gene trong nhiễm sắc thể phage*

Tần số tái tổ hợp có thể được sử dụng để xác định khoảng cách của bản đồ ở Eukaryote. Các thí nghiệm lập bản đồ cho thấy đột biến ở T4 được lập bản đồ thành 3 cụm riêng biệt. Cả ba cụm này có liên kết với một cụm khác. George Streisinger và cộng sự (1964) đã chứng minh bản đồ di truyền của phage T4 có dạng vòng tròn.




**Hình 5.3** Bản đồ di truyền của T4 với các marker

Trong mỗi phép lai, lập ba đến bốn marker di truyền lần lượt với mỗi nhóm và tiến hành qua toàn bộ genome của T4. Nhiều gene khác đã được xác định và lập bản đồ đầy đủ trên phân tử vòng tròn (hình 5.3). Những vùng ở vòng tròn bên trong là 3 cụm của marker T4 đã được xác định và lập bản đồ di truyền. Vòng ngoài có mặt của nhiều bộ marker lớn tạo thành toàn bộ vòng tròn của bản đồ di truyền. Bản đồ di truyền phage T4 cho thấy gene của phage T4 tạo cụm mở rộng theo chức năng của chúng. Chẳng hạn có cụm lớn các gene dùng cho sao chép DNA ở vị trí phần tư

bên trên phía phải và có cụm gene tổng hợp các cấu phần tạo nên đầu của phage ở phía dưới của vòng tròn.

Phân tử DNA của phage T4 là phân tử sợi đơn dạng thẳng, mỗi đầu tận cùng của DNA phage T4 được nhân lên hoặc lặp đoạn ở đầu cuối (terminal redundant). Do vậy, mỗi phân tử DNA có kích thước tăng thêm 2%. Khi DNA được sao chép trong tế bào, sự tái tổ hợp giữa các phần ở đầu tận cùng của bộ gen T4 với những trình tự tương đồng của bộ gen T4 khác, kết quả tạo ra sản phẩm DNA có kích thước lớn hơn khả năng chứa của phần đầu. Những phân tử chứa lặp đoạn được tạo thành vì sự tái tổ hợp trong bộ gen của phage T4 xảy ra thường xuyên, trung bình có khoảng 20% sự kiện tái tổ hợp xảy ra trên một nhiễm sắc thể. Khi phân tử DNA được gói vào phần đầu, nó được cắt bằng enzyme chỉ còn chứa khoảng 102% của chiều dài bộ gen phage T4, vì có chứa đoạn lặp lại của phần đầu.

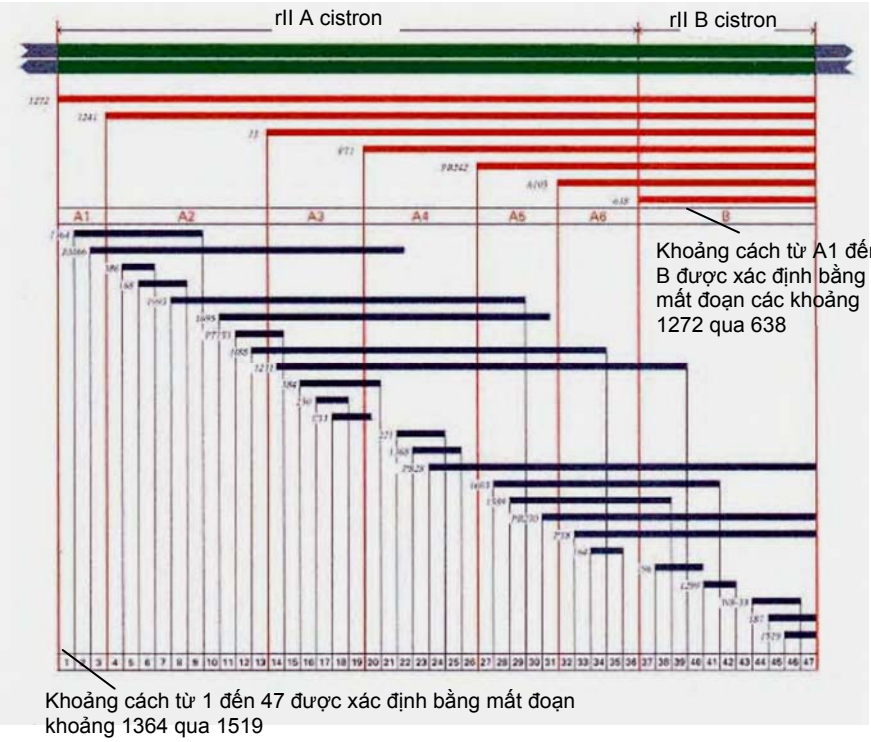
*4. Lập bản đồ cấu trúc tinh vi vùng rII của phage T4*

Các nghiên cứu chi tiết về các đột biến rII của phage T4 làm sáng tỏ hơn về cấu trúc gene. Phage T4 ở dạng hoang dại $r^+$ có khả năng nhiễm đồng thời hai nòi *E.coli* B và K. Các đột biến rII chỉ nhiễm nòi B nhưng không nhiễm nòi K. Seymour Benzer (1955) đã nhận được 2400 đột biến rII có nguồn gốc độc lập với nhau. Ông đã cho lai các đột biến với nhau và căn cứ vào sự xuất hiện các dạng tái tổ hợp hoang dại $r^+$ mà lập bản đồ các điểm đột biến.

Mỗi đột biến có thể tái tổ hợp với các đột biến khác. Đột biến mất đoạn ngăn cản sự tái tổ hợp với hai hoặc nhiều đột biến điểm ở các vị trí khác nhau của gene. Mỗi mất đoạn làm mất một phần bộ gene của phage bao gồm cả vùng rII. Sử dụng đột biến mất đoạn là phương pháp đơn giản để lập bản đồ của hàng ngàn đột biến. Bản đồ mất đoạn (Deletion mapping) dựa trên sự có hoặc không có dạng tái tổ hợp. Trong bất kỳ phép lai nào giữa một đột biến điểm chưa biết và một đột biến mất đoạn, sự xuất hiện của dạng hoang dại cho thấy đột biến điểm nằm ngoài vùng mất đoạn. Ngược lại, nếu đột biến điểm xuất hiện trong vùng mất đoạn, không xuất hiện dạng tái tổ hợp kiểu hoang dại ở thế hệ sau.

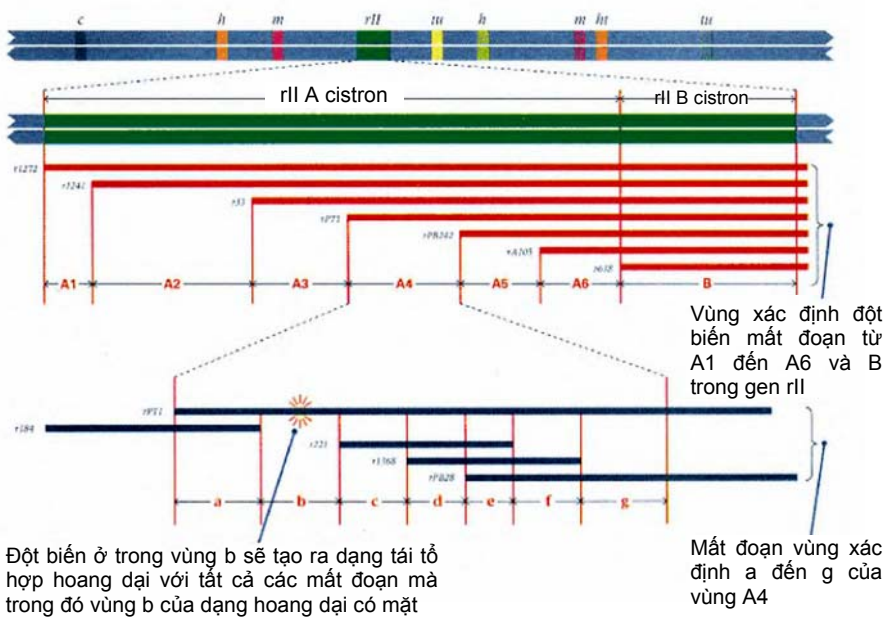
Nhiều phép lai đã được thực hiện để lập bản đồ đột biến chi tiết gene rII. Khoảng cách từ A1 đến A6 và B được trình bày ở hình 5.4. Một đột biến đặc biệt đã được kiểm tra định vị ở vùng A4. Đột biến này không tái tổ hợp tạo dạng kiểu dại trong phép lai với các đột biến mất đoạn lớn như r1272, r1241, rJ3 và rPT1 nhưng nó có thể tái tổ hợp tạo dạng kiểu dại trong phép lai với rPB242, rA105 và r638. Các đột biến được tạo ra bởi cùng một khuôn, kết quả lai với các đột biến mất đoạn lớn sẽ được xếp

vào vùng A4. Bản đồ di truyền trong vùng A4 có thể được tạo ra bởi một bộ các đột biến mất đoạn được trình bày ở phần dưới của hình 5.5. Xác định 7 tiểu vùng ở trong A4 (từ a qua g).




**Hình 5.4** Đột biến mất đoạn được sử dụng để chia locus rII của bacteriophage T4 thành 7 vùng và 47 tiểu vùng nhỏ

Ví dụ, một đột biến trong vùng A4 kết quả tái tổ hợp tạo dạng kiểu dại với đột biến mất đoạn r1368, nhưng lại không thể thực hiện được với đột biến r221 sẽ được sắp vào tiểu vùng c. Ở mức độ chi tiết hơn, các đột biến trong một tiểu vùng được sắp xếp nhờ lai giữa chúng với nhau. Ở phage T4, các điểm đột biến ở rất gần nhau, được tách nhau nhờ tái tổ hợp. 1% tái tổ hợp tương ứng với khoảng cách khoảng 100 bp. Vì vậy, bất kỳ hai đột biến không thể tái tổ hợp được với nhau có thể được xếp vào cùng vị trí trong gene. Bản đồ di truyền cho số lớn các đột biến rII có nguồn gốc độc lập được mô tả ở hình 5.6.




**Hình 5.5** Xác định vùng rII liên quan với các marker di truyền dạng thẳng của bản đồ di truyền phage T4

Nghiên cứu đột biến ở vùng rII và lập bản đồ di truyền có vai trò quan trọng, qua đó có thể rút ra các kết luận sau:

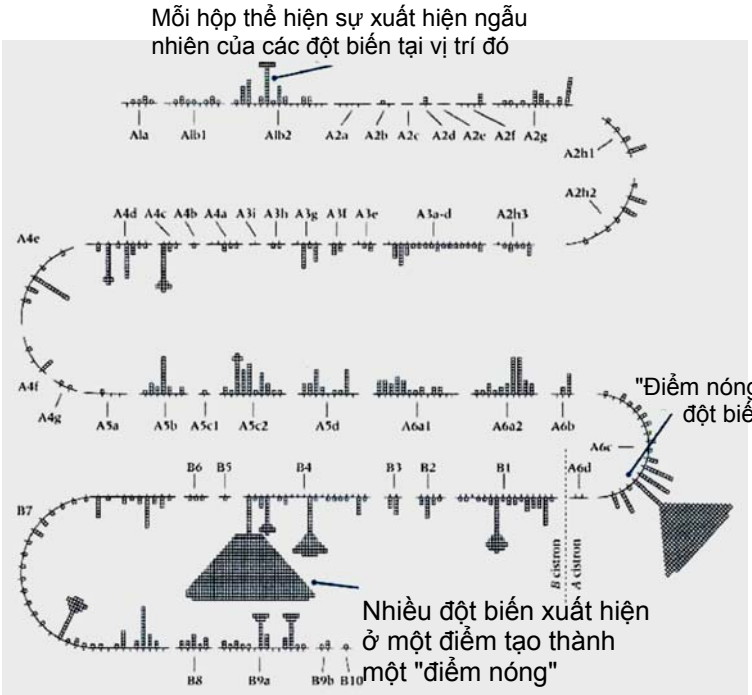
+ Sự trao đổi di truyền có thể xảy ra trong gene và có thể giữa các nucleotide ở gần nhau.

+ Các đột biến không được tạo ra ở cùng tần số với tất cả các điểm trong gene, chúng phân bố không đều nhau. Chẳng hạn, 2400 đột biến rII đã được xác định chỉ ở 304 điểm. Một trong những điểm này có thể có đến 474 đột biến (hình 5.6). Những điểm có tần số đột biến cao như thế được gọi là các điểm nóng (hotspot mutation). Ở những điểm khác, đột biến được phục hồi một lần hoặc vài lần.

Kết quả phân tích vùng rII rất quan trọng, giúp cho chúng ta phân biết được 3 khái niệm về gene. Phổ biến nhất, gene liên quan với một đơn vị chức năng. Điều này tương ứng với một đoạn DNA mã hóa cho một phân tử protein. Benzer đưa ra thuật ngữ cistron để chỉ chức năng này, thuật ngữ cistron thỉnh thoảng vẫn được sử dụng. Đơn vị chức năng được xác định qua thử nghiệm bổ sung (complementation test), xác định được 2 đột biến có allele với nhau không.

Trước thí nghiệm của ông rII được coi là một locus. Thí nghiệm cho thấy các đột biến xếp thành hai nhóm rIIA và rIIB. Lai các đột biến rIIA × rIIB

sẽ có $r^+$, nhưng lai rIIA × rIIA và rIIB × rIIB thì thu được kiểu hình đột biến r.




**Hình 5.6** Bản đồ di truyền locus rII của phage T4

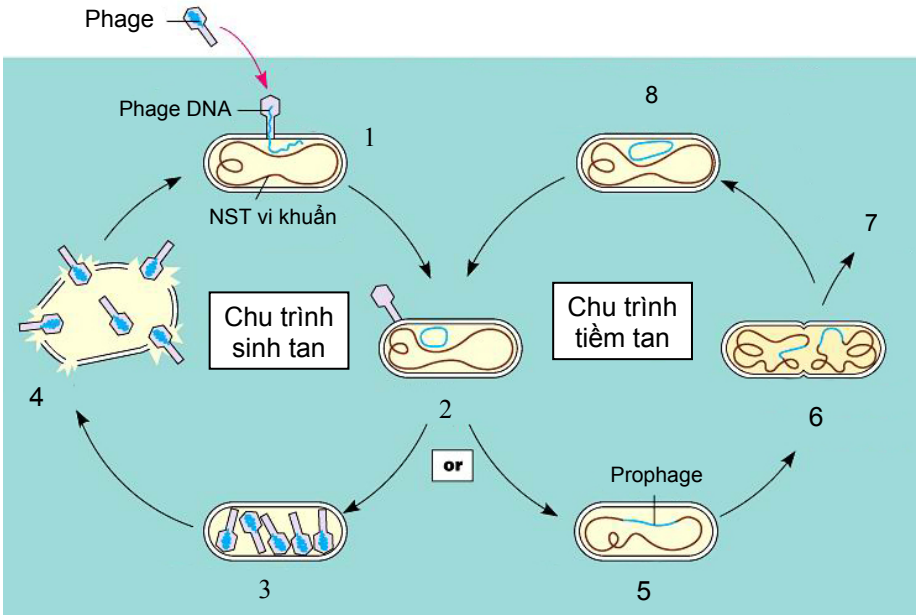
Ngoài nghĩa là đơn vị chức năng, gene còn là đơn vị tái tổ hợp (recon) và đơn vị đột biến (muton). Cả hai đơn vị này, đều tương ứng với những nucleotide riêng lẽ trong gene.

*5. Tính tiềm tan (Lysogeny) và phage λ*

Chu trình tiềm tan bắt đầu khi phân tử DNA của phage λ gắn vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn và tiến hành sao chép như một phần nhiễm sắc thể vi khuẩn. Các hạt phage không được tạo thành. Phân tử DNA của phage được gắn vào bộ gen của vi khuẩn được gọi là prophage, tế bào vi khuẩn mang prophage được gọi là tế bào tiềm tan (lysogen). Một chủng tiềm tan cho phage λ được ký hiệu theo tên của phage. Ví dụ chủng *E. coli* K12(λ) là chủng K12 trở thành tế bào tiềm tan của phage λ.

Phân tử DNA của phage λ có đầu các đầu cuối chứa 12 nucleotide không kết cặp, mà ở dạng sợi đơn tạo đầu dính (cohesive end) bổ sung. Khi vào tế bào, đầu cuối bổ sung gắn lại tạo phân tử vòng tròn. Sự tạo vòng tròn xảy ra sớm ở cả chu trình tan và chu trình tiềm tan (hình 5.7). Có khoảng 75% tế bào vi khuẩn bị nhiễm phage, phân tử DNA vòng tròn

sao chép và chu trình tan xảy ra tiếp theo. Còn khoảng 25% tế bào bị nhiễm, phân tử DNA vòng tròn của phage λ và phân tử DNA vòng tròn của *E. coli* tương tác và xảy ra tái tổ hợp điểm chuyên biệt (site-specific recombination) và DNA của phage gắn vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn.



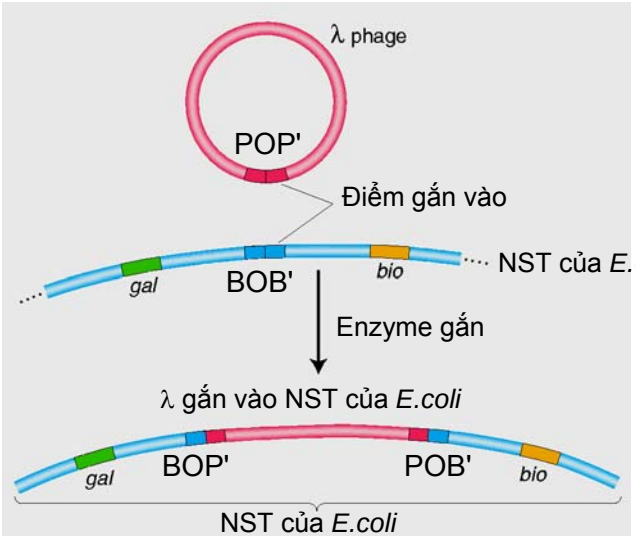

**Hình 5.7** Chu trình tan và tiềm tan ở phage λ

Chu trình tan:
1. Phage tấn công tế bào chủ và bơm DNA vào
2. Tái tạo vòng DNA phage
3. DNA và protein của phage được tổng hợp và lắp ghép tạo thành phage mới
4. Tế bào bị phân giải, giải phóng phage

Chu trình tiềm tan:
5. DNA của phage tích hợp vào NST vi khuẩn tạo thành dạng prophage
6. Tế bào vi khuẩn phân chia bình thường, sao chép prophage và truyền cho thế hệ sau
7. Nhiều tế bào phân chia tạo ra khuẩn lạc vi khuẩn có chứa prophage
8. Một số prophage tồn tại trên NST vi khuẩn, khởi đầu cho chu trình sinh tan

Vị trí của tái tổ hợp điểm chuyên biệt ở DNA của vi khuẩn và phage được gọi là điểm gắn vào của vi khuẩn và phage (bacterial and phage attachment sites). Mỗi điểm gắn có chứa 3 đoạn: ở đoạn trung tâm có cùng trình tự nucleotide ở cả 2 vị trí gắn và là vùng mà sự tái tổ hợp thực sự xảy ra. Điểm gắn vào của phage được ký hiệu bởi POP' (P: phage) và điểm gắn vào ở vi khuẩn được biểu diễn bằng BOB' (B: bacteria). So sánh bản

đồ di truyền của phage và prophage POP' nằm gần vùng trung tâm của phân tử DNA dạng thẳng. Một protein của phage, integrase, xúc tác cho tái tổ hợp điểm chuyên biệt. Enzyme integrase nhận ra điểm gắn vào của phage và vi khuẩn, gây ra sự trao đổi vật lý, kết quả là phân tử DNA của phage gắn vào phân tử DNA của vi khuẩn. Kết quả của sự tái tổ hợp làm bản đồ di truyền của prophage khác với bản đồ di truyền của phage. Bản đồ di truyền prophage là sự chuyển đổi vòng tròn bản đồ di truyền phage tự do. Prophage được chèn vào nhiễm sắc thể của *E. coli* giữa gene *gal* và gene *bio*. Sự chèn vào của phage λ làm tăng khoảng cách giữa gene *gal* và gene *bio* (Hình 5.8). Khoảng cách giữa gene *gal* và gene *bio* ở tế bào tiềm tan với phage λ là khoảng hai phút so với một phút ở tế bào không tiềm tan.




**Hình 5.8** Mô hình gắn của phage λ vào NST của *E.coli*

Khi tế bào tiềm tan, các gene của phage trở thành một phần nhiễm sắc thể của vi khuẩn vì vậy có thể làm kiểu hình của vi khuẩn bị thay đổi. Nhưng hầu hết các gene của phage ở prophage đều được giữ ở trạng thái bất hoạt nhờ protein repressor - sản phẩm của gene ở phage. Protein repressor được bắt đầu tổng hợp nhờ sự nhiễm vào của phage và nó được tiếp tục tổng hợp nhờ prophage. Gene mã hóa cho repressor thường chỉ là gene của prophage được biểu hiện ở chu trình tiềm tan. Nếu tế bào tiềm tan bị nhiễm bởi phage giống với prophage, sự có mặt của repressor trong prophage ngăn cản sự biểu hiện các gene của phage nhiễm vào. Tính kháng với những phage giống với prophage được gọi là tính miễn nhiễm (immunity). Đây là tiêu chuẩn để xác định tế bào vi khuẩn chứa phage đặc

biệt. Chẳng hạn phage λ không tạo đốm trên vi khuẩn chứa prophage λ. Trong tế bào tiềm tan, sự sao chép không giải phóng các phage mới. Tuy nhiên, các prophage đôi khi trở nên có hoạt tính, trải qua chu trình tan, tạo ra số lượng lớn phage ở thế hệ sau. Hiện tượng này được gọi là sự cảm ứng prophage (prophage induction), nó được bắt đầu bằng sự hư hại DNA của vi khuẩn. Đôi khi prophage có thể tách ra khỏi DNA của vi khuẩn một cách ngẫu nhiên nhưng thường nó được gây ra do các tác nhân của môi trường như hóa chất hoặc chiếu xạ. Khả năng bị cảm ứng là một thuận lợi cho phage bởi vì DNA của phage có thể thoát khỏi tế bào bị hư hại. Cơ chế sinh hóa của sự cảm ứng là phức tạp nhưng sự thoát ra của phage xảy ra dễ dàng.

Sự cắt ra của phage là sự tái tổ hợp điểm chuyên biệt khác, ngược với quá trình gắn vào. Sự cắt này yêu cầu enzyme của phage, integrase thêm protein của phage là excisionase. Nghiên cứu di truyền của sự gắn vật lý cho thấy escisionase gắn với integrase và sau đó nhận ra điểm gắn vào của prophage BOP' và POB', gắn với các điểm này. Integrase cắt ở trình tự O và tạo ra lại BOB' và POP'. Quá trình tách diễn ra ngược lại với sự gắn vào.

## III. Tái bản của các virus

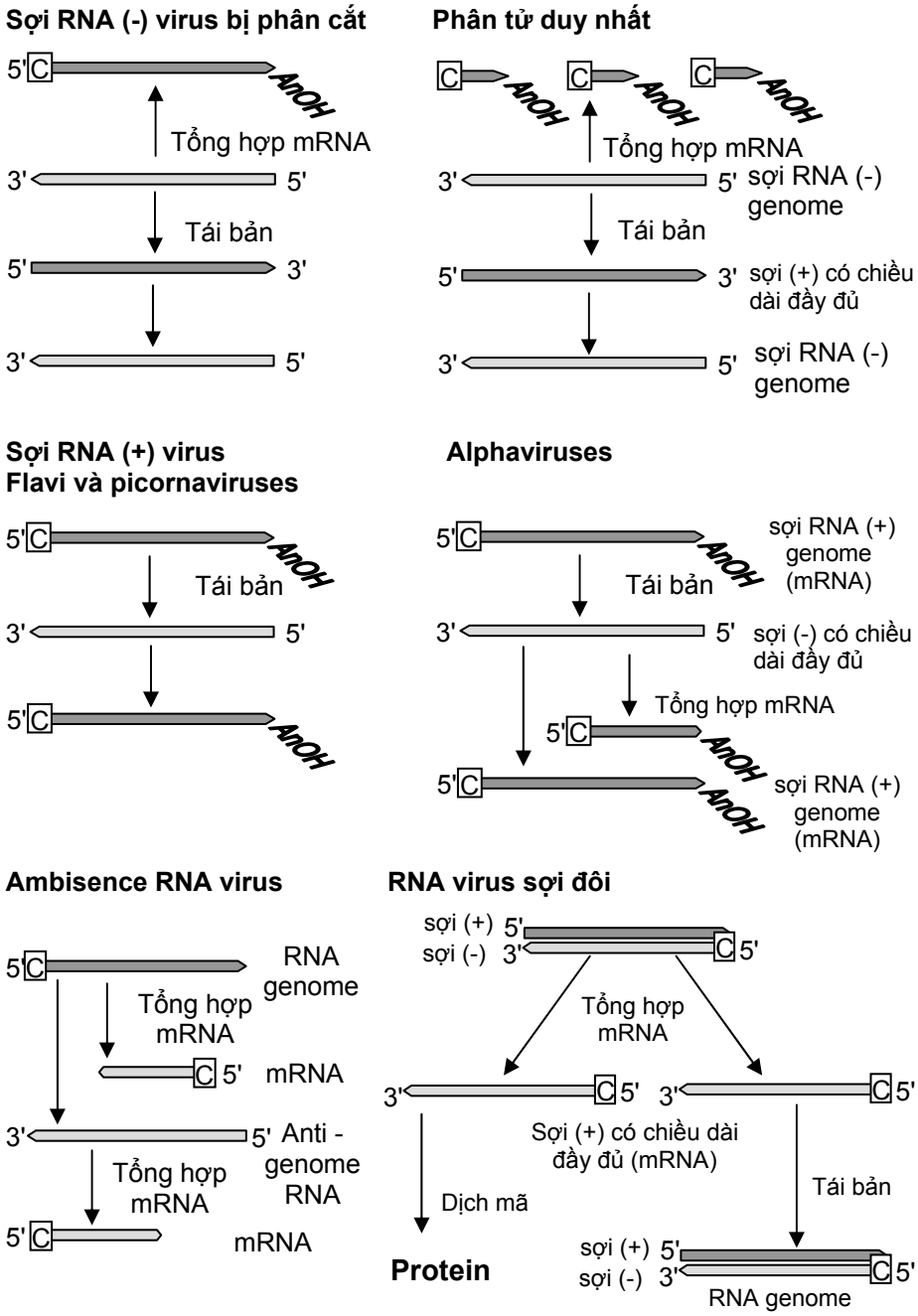
Bản chất genome của virus xác định kiểu sao chép.

*1. Phân loại virus*

Virus được phân loại dựa trên các đặc điểm:

- Phân loại theo bệnh: chia ra virus gây bệnh ở người, động vật và cây trồng … Vấn đề chủ yếu đối với hệ thống phân loại này là nhiều loại virus khác nhau lại gây ra cùng một triệu chứng. Chẳng hạn, sự nhiễm trùng hô hấp với sốt có thể được gây ra do nhiều virus khác nhau.
- Phân loại theo hình thái: phân loại virus cơ bản dựa trên cấu trúc của hạt virus. Kiểu phân loại này có hạn chế trong phân biệt giữa các virus có hình thái tương tự nhưng gây ra triệu chứng bệnh khác nhau.
- Phân loại theo chức năng: trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu được tiến hành dựa trên phương thức sao chép của virus. Cần xác định thành phần và cấu trúc genome của virus và từ đó xác định cách sao chép.

Kiểu tế bào bị nhiễm bởi virus có ảnh hưởng quan trọng đối với quá trình sao chép. Đối với virus của prokaryote, sự sao chép phản ánh mối quan hệ mở rộng đơn giản của các tế bào chủ. Đối với virus của tế bào eukaryote, vấn đề phức tạp hơn. Khả năng mã hoá của genome buộc virus chọn một phương thức sao chép.




**Hình 5.9** Sao chép RNA của virus

Phương thức sao chép của virus phụ thuộc vào bản chất vật liệu di truyền của chúng. Về phương diện này, virus được chia thành 7 nhóm:

Nhóm I: Virus chứa DNA sợi đôi. Nhóm này được chia nhỏ thành hai loại:

+ Sao chép là chỉ của nhân. Sự sao chép của các virus này phụ thuộc tương đối vào các yếu tố của tế bào.

+ Sao chép xảy ra trong tế bào chất. Những virus này có liên quan với các yếu tố cần thiết cho phiên mã và sao chép genome của chúng và vì vậy phụ thuộc nhiều vào bộ máy tế bào.

Nhóm II: virus chứa DNA sợi đơn. Sự sao chép xảy ra trong nhân liên quan sự tạo thành qua trung gian sợi kép được xem như là khuôn cho tổng hợp lại DNA sợi đơn thế hệ sau.

Nhóm III: virus chứa RNA sợi kép. Những virus này có bộ gene được chia đoạn. Những đoạn này được phiên mã riêng để tạo ra các monocistronic mRNA.

Nhóm IV: Virus chứa RNA sợi đơn mạch (+), có thể chia nhỏ thành 2 nhóm:

+ Virus với polycistronic mRNA. RNA genome tạo ra mRNA, phân tử này dịch mã tạo sản phẩm là một polyprotein, thường được phân cắt để tạo các protein trưởng thành.

+ Virus phiên mã phức tạp. Cách dịch mã (như Togavirus) hoặc các RNA của subgenome (Tobamovirus) cần thiết để tạo RNA của bộ gene.

Nhóm V: Virus chứa RNA sợi đơn mạch (-), genome của virus này được chia thành 2 nhóm:

- Genome không chia đoạn (Mononegvirales). Bước đầu tiên trong sao chép là phiên mã RNA sợi (-) của genome nhờ RNA polymerase phụ thuộc RNA của hạt virus để tạo ra monocistronic mRNA, được xem là khuôn cho sao chép genome.

- Genome được chia đoạn (Orthomyxoviridae). Sao chép xảy ra trong nhân với monocistronic mRNA cho mỗi gene của virus được tạo ra nhờ enzyme transcriptase từ genome đầy đủ của virus.

Nhóm VI: Virus chứa mRNA sợi đơn mạch (+) qua trung gian DNA. Bộ gene của retrovirus là mRNA mạch (+) nhưng ở dạng lưỡng bội. Chúng không trực tiếp tạo ra mRNA mà phiên mã ngược tạo DNA.

Nhóm VII: DNA sợi đôi qua trung gian RNA. Virus nhóm này dựa vào enzyme phiên mã ngược, những khác với retrovirus, quá trình này xảy ra bên trong hạt virus trong suốt quá trình trưởng thành.

*2. Các virus của vi khuẩn*

Có 3 pha bắt đầu cho xâm nhiễm của virus.

- Bắt đầu nhiễm
- Sao chép và biểu hiện genome của virus
- Giải phóng các virion trưởng thành từ tế bào bị nhiễm

Bacteriophage được thêm vào nuôi cấy vi khuẩn đang sinh trưởng mạnh và sau một vài phút nuôi cấy bị giảm, ngăn cản tương tác giữa các hạt phage và tế bào. Ngay sau khi làm giảm nuôi cấy, có giai đoạn khoảng 10-15 phút không phát hiện thấy các hạt phage, đây là giai đoạn che khuất (eclipse period). Điều này xảy ra một thời gian sau khi nhiễm vào tế bào, liên quan với genome của chúng như là điều kiện trước tiên cho sao chép. Ở giai đoạn này không có sự nhiễm nữa vì vậy không thể phát hiện nhờ vết đốm. Giai đoạn muộn là thời gian trước khi hạt virus mới đầu tiên xuất hiện và khoảng 20-25 phút cho hầu hết các bacteriophage. Khoảng 40 phút sau khi tế bào bị nhiễm, đường cong về số lượng hạt virus tổng số và virus ngoại bào hợp nhau thành một vì lúc này, tế bào bị nhiễm làm tan và giải phóng các hạt phage ngoại bào. Các bacteriophage làm chết tế bào chủ gọi là độc (virulent) và chúng sinh sản theo chu trình tan

Các virus ôn hoà (temperate virus) có thể sinh sản mà không là chết tế bào chủ. Chúng có hai khả năng sinh sản: chu trình tan và chu trình tiềm tan không làm chết tế bào chủ. Chu trình sống bắt đầu khi phage gắn vào bề mặt tế bào *E. coli* và bơm DNA vào trong gây nhiễm. DNA của phage sau khi vào tế bào tạo DNA vòng tròn và sẽ tham gia vào một trong hai chu trình. DNA của phage có thể hoặc tham gia vào chu trình tiềm tan của phage$T_4$ hoặc gắn vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn nhờ tái tổ hợp điểm chuyên biệt để bước vào chu trình tiềm tan.

*3. Các virus thực vật*

Hầu hết virus thực vật có genome RNA, tuy nhiên 2 nhóm virus thực vật được nghiên cứu nhiều nhất có chứa genome DNA: Cauliflower mosaic virus (CaMV) và gemini virus.

- Các virus RNA

Phần lớn virus thực vật có bộ gene RNA sợi đơn mạch (+) và nhiều dạng có capsid hình que, các protein capsomer hình xoắn.

+ Tobacco mosaic virus (TMV)

Genome TMV là RNA sợi đơn. Genome của chúng mã hoá ít nhất 4 chuỗi polypeptid. Protein 130 và 180 kDal được dịch mã trực tiếp từ cùng một codon bắt đầu trên RNA bộ gene. Hai protein khác, 30 kDal và protein vỏ được dịch mã từ đoạn RNA. Protein 130 và 180 kDal liên quan với sao chép virus, trong khi đó protein 30 kDal cần cho sự di chuyển của virus từ tế bào này đến tế bào khác. Vì vậy 3 loại protein này cần cho sự

nhân lên của virus trong toàn bộ cây.

- Các virus DNA

Virus thực vật có bộ gene DNA rất hiếm, chỉ gồm 2 nhóm:

+ Cauliflower mosaic virus: CaMV được nghiên cứu nhiều nhất trong nhóm Caulimovirus. Đây là nhóm virus dạng cầu, chứa genome DNA vòng tròn, mạch kép, kích thước khoảng 8 kb. Caulimovirus gây ra một số bệnh làm thiệt hại kinh tế cấy trồng. Chúng có phổ vật chủ hạn chế, chỉ nhiễm cây 2 lá mầm.

DNA của CaMV có cấu trúc không bình thường, có 3 điểm gián đoạn trên sợi kép, hai điểm trên một sợi và một điểm trên sợi còn lại với những vùng trình tự overlap. Ngoài ra DNA CaMV có ribonucleotide gắn với đầu cuối 5' của điểm gián đoạn. Từ các nghiên cứu ở CaMV, Hull và Covey (1983), Pfeiffer và Hohn (1983) cho rằng sao chép CaMV liên quan với phiên mã ngược qua trung gian RNA của bộ gene. Chu trình sao chép giống với retrovirus và hepatitis B virus.

+ Gemini virus: Gemini virus là nhóm virus có phổ xâm nhiễm rộng, cả cây một lá mầm và 2 lá mầm.Virus sọc vằn lá ngô (maiz streak virus – MSV) là một gemini virus lây nhiễm qua lá, được truyền do côn trùng. Bộ gene của geminivirus chứa phân tử DNA vòng tròn sợi đơn. Sao chép DNA virus được nghĩ là xảy ra nhờ trung gian DNA và genome của virus sao chép cho nhiều bản sao trong nhân của những tế bào tăng sinh nhanh. Virus gây ra sự ức chế sinh trưởng và lá có sọc vàng của những cây ngô bị nhiễm.

*4. Các virus động vật*

Chu trình sao chép của virus động vật  có nhiều điểm tương tự với các virus khác với nhiều biến dạng đáng kể. Virus động vật thường có promoter mạnh, có thể áp dụng cho biểu hiện gene. Trong nhiều trường hợp, chúng có khả năng sao chép genome của chúng với số lượng lớn bản sao trong tế bào. Một số virus động vật như retrovirus gắn DNA của chúng vào nhiễm sắc thể tế bào chủ như là một phần chu trình sao chép của chúng.

- Các virus RNA như retrovirus, paramyxo virus …

Retrovirus có phổ vật chủ rộng gồm chim, động vật có vú và những động vật khác. Sự nhiễm của retrovirus không dẫn đến làm chết tế bào. Biểu hiện gene của virus mạnh nhờ promoter mạnh. Retrovirus chứa genome RNA. Hạt virus chứa 2 bản sao RNA. Mỗi genome RNA có nhiều tính chất tương tự với mRNA eukaryote: có trình tự poly(A) khoảng 200 đơn vị ở đầu mút 3 và cấu trúc mũ ở đầu 5'. Virus xâm nhiễm vào tế bào

kèm theo enzyme reverse transcriptase và intergrase. Enzyme reverse transcritase tham gia phản ứng tổng hợp cDNA, dẫn đến sự hình thành bản sao DNA mạch kép của RNA virus, được gọi là DNA provirus. DNA provirus được đóng vòng tròn nhờ protein intergrase và được xen vào genome tế bào chủ. Thường chỉ có một bản sao DNA provirus được gắn vào trong một tế bào chủ. Điểm gắn vào genome là ngẫu nhiên.

Retrovirus là một tác nhân gây ung thư. Hầu hết chúng có cấu trúc genome chứa trình tự oncogene. Oncogene virus thường được tạo thành từ gene của tế bào và thường là kết quả của sự dung hợp gene tế bào với gene của virus. Kết quả là những virus gây ung thư như thế bị mất chức năng gene của virus. Chúng có thể sao chép trong lây nhiễm hỗn hợp với một helper virus cung cấp chức năng bị mất.

- Các virus DNA: SV40, Bovine papilloma virus (BPV) …

Hạt virus SV40 chứa DNA mạch kép, vòng tròn, khoảng 5,2 kb được gắn với 4 phân tử histon: H4, H2a, H2b và H3. SV40 có thể tham gia vào hai kiểu chu trình sống phụ thuộc vào tế bào chủ. Trong tế bào cho phép virus xâm nhiễm (permissive cell) thường là các dòng tế bào ổn định có nguồn gốc từ khỉ châu Phi, sự sao chép virus xảy ra như các trường hợp nhiễm bình thường. Trong tế bào không cho phép (non-permissive cell), thường là những dòng tế bào chuột, không có sự nhiễm làm tan tế bào vì virus không thể sao chép toàn bộ DNA của chúng. Ở những tế bào khỉ bị nhiễm và làm tan do SV40, có thể phân ra 3 giai đoạn. Trong suốt 8 giờ đầu tiên, hạt virus không vỏ và DNA của chúng di chuyển đến nhân tế bào chủ. 4 giờ tiếp theo là pha sớm (early phase), có sự tổng hợp mRNA sớm và protein sớm và có sự kích thích tổng hợp DNA của tế bào chủ. Trong pha muộn xảy ra ở 36 giờ tiếp theo, trong giai đoạn này có sự tổng hợp DNA của virus, mRNA muộn và protein muộn, lắp ráp virus và làm tan tế bào.

+ Bovine papilloma virus (BPV)

BPV gây nên bệnh bướu (wart) ở trâu bò. BPV có genome DNA sợi kép, vòng tròn khoảng 7,9 kb.

*5. Các virus gây ung thư, HIV/AIDS ...*

Khoảng 15% ung thư ở người có cơ chế hình thành liên quan với virus. Chúng có các nhóm sau :

+ DNA virus: họ Apovavirus (Papilloma virus), họ Hepadnavirus (Hepative-B virus), họ Herpesvirus (Eptein-Barr virus)

+ RNA virus: họ Retrovirus (HIV-1, virus AIDS)

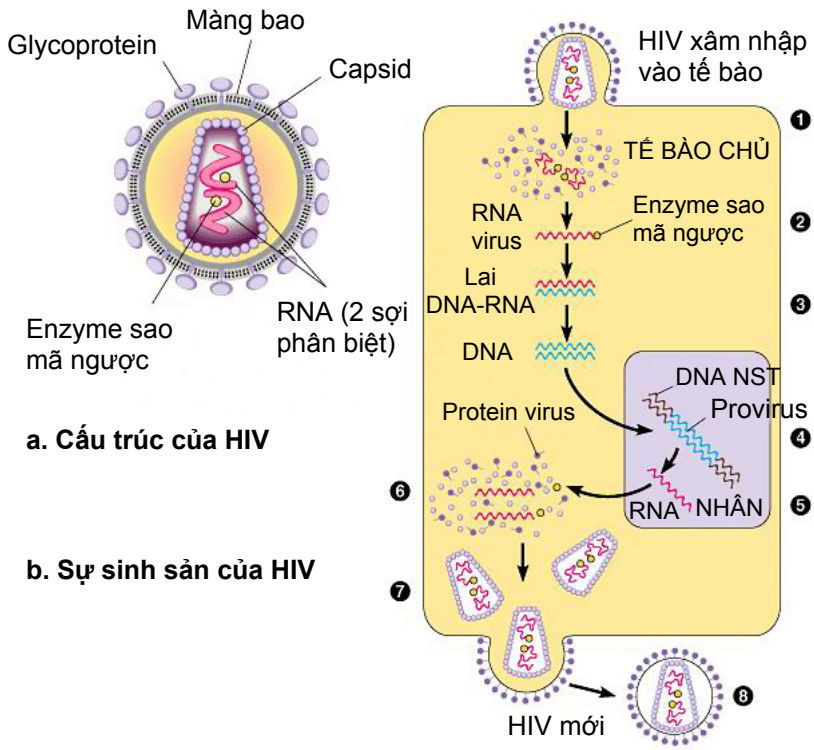
Các virus gây ung thư có thể tác động do xen đoạn DNA của chúng

vào bộ gene chủ. Ngoài ra có thể thực hiện :

+ Hoạt hoá bộ máy sao chép DNA của tế bào chủ.

+ Kìm hãm tác động của các tumour suppressor gene chủ yếu để hoạt hoá sao chép DNA

Như vậy bằng nhiều cách khác nhau các virus khi xâm nhập tế bào có thể làm tế bào mất sự kiểm soát bình thường.




**Hình 5.10** Chu trình sinh sản của virus HIV

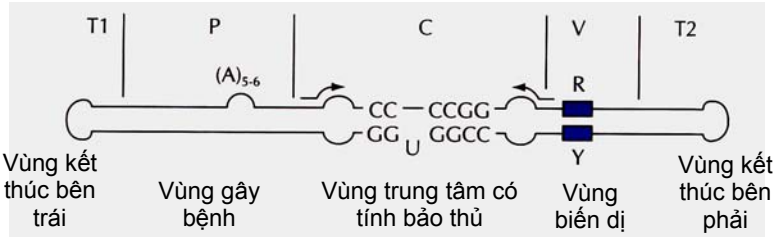
1. Virus xâm nhiễm vào tế bào
2. Phiên mã RNA của virus thành DNA sợi đơn nhờ enzyme phiên mã ngược
3. Quá trình tổng hợp DNA sợi đôi từ DNA sợi đơn
4. Sự gắn DNA retrovirus vào genome tế bào chủ
5. Sự phiên mã DNA retrovirus tạo thành mRNA virus và RNA genome virus
6. Tổng hợp vỏ protein virus
7. Lắp ráp RNA genome virus vào vỏ protein
8. Sự nẩy chồi của virus, giải phóng virus khỏi tế bào

AIDS (Acquired immunodeficiency syndrome) là hội chứng do virus làm suy giảm miễn dịch ở người (HIV). Hạt virus là một khối cầu, bờ ngoài gồ ghề, gồm vỏ bên ngoài, trong là chất nền protein bao quanh lõi

có mặt cắt dạng nón. Trong lõi có genome gồm 2 sợi RNA giống nhau gắn với enzyme DNA polymerase là reverse transcriptase. Trong quá trình nhiễm, virus HIV bám và nhiễm lõi của nó vào tế bào hệ thống miễn dịch của người. Tiếp theo chúng sử dụng enzyme reverse transcriptase để sao RNA genome của chúng thành phân tử DNA sợi kép trong tế bào chất của tế bào chủ. Phân tử xoắn kép này chuyển đến nhân, gắn vào nhiễm sắc thể tế bào chủ nhờ một enzyme khác. Một khi đã gắn vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ, genome của virus có thể thực hiện một trong 2 quá trình. Nó có thể trưng dụng bộ máy tổng hợp protein của tế bào chủ để có thể tạo ra hàng trăm hạt virus mới sinh sản bằng nảy chồi, tách khỏi màng tế bào và đôi khi làm chết tế bào chủ. Nó cũng có thể tiềm tàng trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ, rồi sao chép và truyền genome virus sang 2 tế bào mới khi tế bào phân chia (Hình 5.10). Ngoài ra sinh học hiện đại còn phát hiện ra hai dạng sống đặc biệt là các viroid và prion

*6. Viroid*

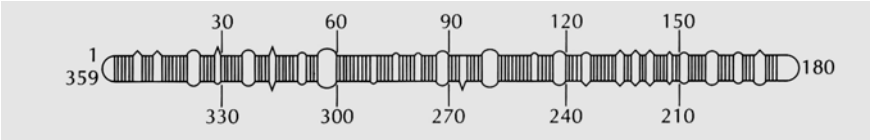
Viroid: là những phân tử RNA rất nhỏ (200-400 nucleotide), dạng que có mức độ cấu trúc bậc hai cao (hình 5.11). Chúng không có capsid và vỏ bao (envelope) và chỉ chứa một phân tử acid nucleic đơn. Viroid gắn liền với bệnh thực vật. Viroid đầu tiên được phát hiện và nghiên cứu đầy đủ nhất là viroid ống thoi khoai tây (potato spindle tuber viroid – PSTVd). Viroid không mã hóa cho bất kì một protein nào và nó được sao chép nhờ RNA polymerase của tế bào chủ hoặc có thể nhờ một sản phẩm của một gene RNA polymerase phụ thuộc RNA trong một vài tế bào eukaryote. Chi tiết của sao chép đến nay người ta chưa rõ, dường như nó xảy ra nhờ cơ chế vòng tròn xoay có sự cắt (autocatalytic cleavage) và gắn (self-ligation) để tạo ra viroid trưởng thành.




**Hình 5.1**. Các vùng chức năng của phân tử RNA viroid

Giữa các viroid khác nhau có các trình tự khác nhau, nó được sử dụng trong phân loại để chia viroid thành giống (genera) và loài (species). Tuy nhiên, tất cả viroid đều có đặc điểm chung là vùng trung tâm có tính chất bảo thủ liên quan với sao chép của chúng (hình 5.12). Một nhóm các viroid có khả năng tạo thành cấu trúc « đầu búa » (hammerhead) làm cho chúng có tính chất enzyme của một ribozyme. Hoạt tính này được sử dụng

để cắt cấu trúc nhiều đơn phân tạo ra trong quá trình sao chép. Các viroid khác sử dụng các enzyme chưa được biết trong tế bào chủ để thực hiện điều này. Một vài viroid gây bệnh trầm trọng và gây chết thực vật chủ. Các viroid khác gồm các loại từ không có biểu hiện bệnh bên ngoài đến có triệu chứng bệnh nhẹ.




**Hình 5.12** Cấu trúc RNA viroid

- Prion: Một nhóm bệnh lây nhiễm hệ thần kinh kinh niên, phát triển nhanh chóng và gây chết được biết như là bệnh xốp não lây nhiễm (Transmissible spongiform encephalopathics - TSE). Tác nhân lây nhiễm liên quan đến TSE không phải là acid nucleic (Tikvah Alper, 1967). Các bệnh TSE ở người như là bệnh Kuru và Creutzfeldt-Jacob có thể gây nên do các phần tử protein gây nhiễm và Standley Prusiner (1982) gọi chúng là prion (proteinacious infectious particle). Bản chất của prion là chưa được chứng minh một cách chắc chắn. Chúng là một hiện tượng mới vượt ra ngoài hiểu biết thông thường. Tất cả các bệnh prion đều có bệnh lý giống nhau cơ bản, mặc dù giữa chúng có sự khác biệt có ý nghĩa ở những điều kiện khác nhau. Các bệnh khác nhau được đặc trưng bởi sự lắng (deposition) của các protein bất thường trong các mô khác nhau như thận, lách, gan hoặc não ... Sự lắng các « amyloid » này bao gồm sự tích luỹ các protein khác nhau ở dạng tấm hoặc dạng cuộn rối tạo ra protein β amyloid. Chúng là kết quả từ những sai hỏng của bộ gene trong trao đổi chất do nhiều loại nhân tố chưa được biết.. Mặc dù cơ chế phân tử liên quan với sự chết của tế bào là chưa rõ ràng, nhưng tác động gây ra xốp nào do tạo lỗ ở mô não đã được quan sát thấy dưới kính hiển vi. Những lỗ này gây ra do sự mất tế bào thần kinh và gliosid. Phép chẩn đoán xác định TSE không chỉ tiến hành trên lâm sàng mà yêu cầu chứng minh sự lắng protein prion (prp) bằng nhuộm hoá học miễn nhiễm mô não người sau khi chết.

## Câu hỏi và Bài tập

1. Hãy trình bày quá trình tái tổ hợp genome của bacteriophage.
2. Genome của vi khuẩn và virus tương tác vật lý theo cách nào?
3. Ý nghĩa của việc phân tích cấu trúc locus rII của phage T4.
4. Hãy nêu đặc điểm về chu trình sống của phage.
5. Virus thực vật có những nhóm nào?

6. Hãy trình bày phương thức sao chép của virus chứa RNA sợi đơn.
7. Đặc điểm chu trình sinh sản của virus HIV.
8. Hãy nêu tên các dạng sống chỉ có acid nucleic hoặc chỉ có protein.
9. Có bao nhiêu đốm tan của phage được tạo thành trên môi trường nuôi cấy từ một phage riêng lẽ ban đầu?
10. Bacteriophage có trật tự các gene là ABC att DEF. Hỏi trật tự của các gene này ở prophage như thế nào?

## Tài liệu Tham khảo

1. Phạm Thành Hổ. 2000. Di truyền học. NXB Giáo Dục.

2. Lê Đình Lương, Phan Cự Nhân (1998). Cơ sở di truyền học. NXB Giáo dục.

3. Hoàng Trọng Phán. 1995. Di truyền học phân tử. Trung tâm Đào tạo Từ xa, Đại học Huế

4. Anthony J. F. Griffiths, Susan R. Wessler, Richard C. Lewontin, William M. Gelbart, David T. Suzuki, Jeffrey H. Miller. 2004. An introduction to genetics analysis. W.H. Freeman Publishers.

5. Cann AJ. 2001. Priciple of molecular virolory. Academic Press. London, UK.

6. Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. 2000. Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. ASM Press, Washington DC. Printed in the United States of America.

7. Harlt D.L., Jones E.W. 1998. Genetics - Principle and analysis. Jone and Bartlett Publshers, Toronto, Canada.

8. Hartwell et al. 2003. Genetics: From genes to genomes, Second editor. The McGraw-Hill Companies.

9. Michael T. Madigan, John M. Martinko. 2006. Brock biology of microorganisms. Pearson Education International. Eleventh edition.

10. Old RW & Primrose SB. 1989. Principles of gene manipulation. Blackwell Scientific Publication.

11. Stansfield W.D. 1991. Schaum's outline of theory and problems of genetics. McGraw-Hill, Companies, Inc., United States of America.

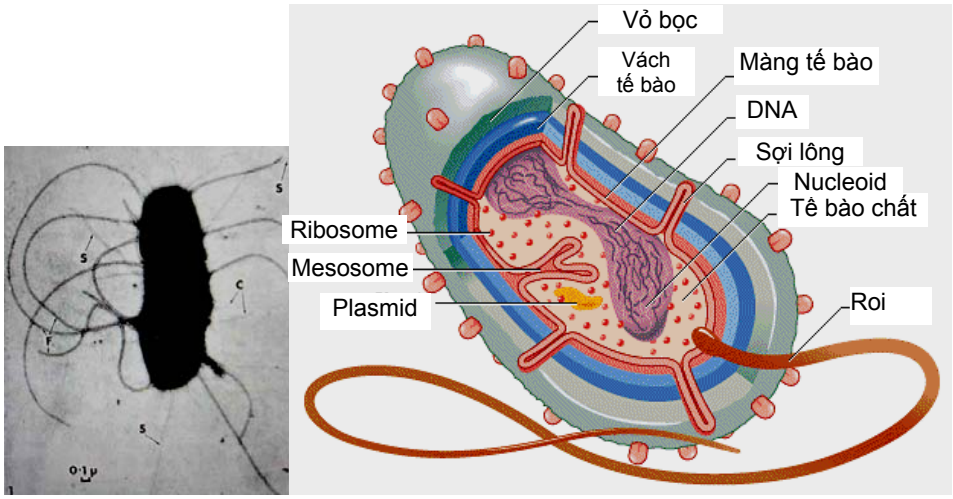
12. Watson D.J, Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R. 2004. Molecular biology of the gene. Benjamine Cummings, San Francisco, United States of America.

## Chương 6

# Di truyền học Vi khuẩn

Việc nghiên cứu di truyền học các vi khuẩn và các virus của chúng (các phage, chương 5) bắt đầu từ thập niên 1940. Đó là nền tảng chính của di truyền học phân tử sau này, với đối tượng kinh điển được nhắc lại nhiều lần là *Escherichia coli* (Hình 6.1) - mô hình thuận lợi của di truyền học vi khuẩn. Ngoài những lý do đã đề cập ở chương 1, cần nhắc lại rằng: Một trong những lý do rất ấn tượng là bộ gene của nó 4.639.221 cặp base, chứa 4.290 gene mã hoá protein (Maloy 2006). Một lợi thế khác là trong suốt toàn bộ chu kỳ sống, *E. coli* chỉ tồn tại ở pha đơn bội, vì vậy các đột biến biểu hiện ra kiểu hình rõ ràng mà không bị lấn át bởi các allele trội trong caá kiểu gene dị hợp tử như ở các sinh vật lưỡng bội.

*Vi khuẩn* (bacteria) thuộc nhóm sinh vật tiền nhân (prokaryote) và *thường* chỉ có một phân tử nhiễm sắc thể chính với nhiều plasmid (chương 2). Các vi khuẩn không có sinh sản hữu tính theo nghĩa ở các eukaryote. Chúng không có sự xen kẻ các thế hệ lưỡng bội và đơn bội, không có các giao tử, và không có giảm phân. Nhưng chúng có các quá trình tái tổ hợp di truyền gọi là *sinh sản cận hữu tính* (parasexual reproduction), đó là: biến nạp (transformation), tiếp hợp (conjugation) và tải nạp (transduction). Các phage chỉ sinh sản bên trong tế bào vi khuẩn và có khả năng trao đổi vật liệu di truyền giữa phage - phage và phage - vi khuẩn.




(a) (b)

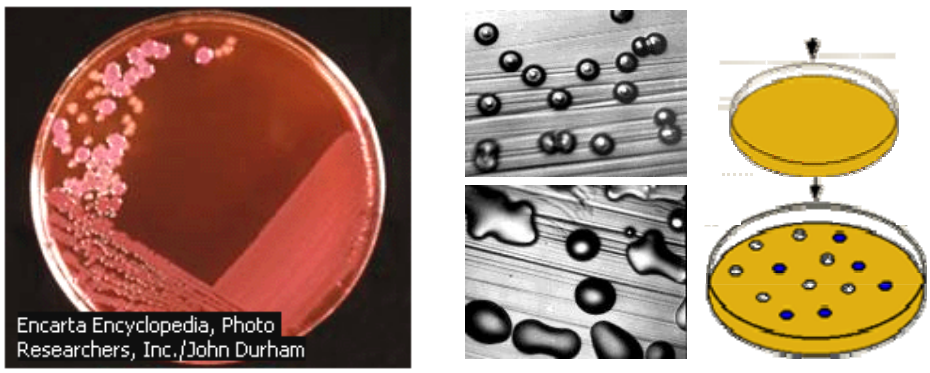
**Hình 6.1** (a) Tế bào *E. coli* với các lông giới tính (sex pilli). Ba kiểu cấu trúc dạng sợi trên bề mặt tế bào: các lông tơ phổ biến chung (C), roi vận động (F) và lông giới tính (S). (b) Các thành phần cấu trúc của tế bào *E. coli*.

Trước khi tìm hiểu các cơ chế nói trên chúng ta hãy xem xét cách sinh trưởng của vi khuẩn trên đối tượng *E. coli* và nguyên tắc nghiên cứu di truyền học đối với vi khuẩn.

Xung quanh chúng ta vi khuẩn có mặt hầu như khắp nơi. Trong những điều kiện sinh trưởng thuận lợi nhất định, một vi khuẩn nhanh chóng lớn lên hay dài ra và phân chia (trực phân) tạo thành hai tế bào con có vật chất di truyền giống như tế bào cha mẹ. Nếu như môi trường cực thuận, *E. coli* có thể phân chia trung bình cứ 20 phút mỗi thế hệ, và chẳng mấy chốc bề mặt trái đất phủ đầy các vi khuẩn. Nhưng thực tế lại không như thế. Lý do chủ yếu là các điều kiện cực thuận là rất hiếm hoi!

## I. Làm việc với các vi khuẩn

Các nhà khoa học nghiên cứu vi khuẩn cố gắng tạo ra môi trường nuôi cấy cực thuận trong phòng thí nghiệm, với nguồn năng lượng thiết yếu, các chất dinh dưỡng, pH và nhiệt độ mà khả năng sinh trưởng của vi khuẩn có thể dự đoán được.




(a) (b) (c)

**Hình 6.2** (a) Các khuẩn lạc *E. coli* sinh trưởng trên đĩa thạch agar. (b) Hai dạng khuẩn lạc nhẵn và thô nhám - trên và dưới - của *S. pneumoniae*; và (c) phương pháp thu nhận bản sao các khuẩn lạc qua đêm sinh trưởng trên môi trường đặc hiệu: các khuẩn lạc mọc được có màu xanh và không mọc được màu trắng.

Vi khuẩn có thể được nuôi cấy trên môi trường đặc (thường chứa thạch *agar*) hoặc trong môi trường lỏng. Trong môi trường lỏng, vi khuẩn sinh sản theo hàm số mũ cho đến khi hết chất dinh dưỡng hoặc cho đến khi tích luỹ những sản phẩm độc hại. Số lượng vi khuẩn tồn tại ở mỗi thời điểm trong môi trường lỏng có thể xác định được một cách dễ dàng. Dùng pipet đưa một mẫu nhỏ lên đĩa petri có môi trường đặc rồi cấy chải đều trên mặt thạch. Sau thời gian ủ 24 - 36 giờ mỗi tế bào vi khuẩn sẽ cho một cụm tế bào có thể dễ dàng nhìn thấy được bằng mắt thường gọi là *khuẩn lạc* (colonies; Hình 6.2a) chứa hàng triệu tế bào, ngay cả trong những điều

kiện sinh trưởng tương đối nghèo nàn. Do đó, các thí nghiệm ở *E. coli* thường chỉ mất một ngày, trong khi ở ngô chẳng hạn phải mất hàng tháng.. Khả năng mọc hay không mọc của vi khuẩn trên những môi trường riêng biệt giúp ta xác định kiểu gene của tế bào vi khuẩn (Hình 6.2c).

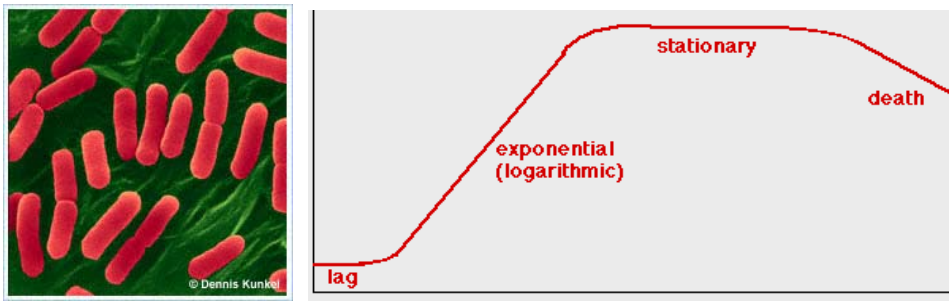
Các vi khuẩn thường trải qua các pha sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy huyền phù như sau (xem Hình 6.3A):

(i) *Pha lag*: Sinh trưởng thoạt đầu rất chậm, vì chúng phải làm quen với đời sống trong các điều kiện mới.

(ii) *Pha log* (logarithmic hay exponential): Một khi bộ máy chuyển hoá vận hành, chúng bắt đầu phân chia theo hàm số mũ, gấp đôi số lượng sau vài phút: $n = \frac{\log_{10} N_f - \log_{10} N_o}{.301}$.

(iii) *Pha dừng* (stationary): Khi môi trường sống cạn kiệt, sự sinh trưởng vi khuẩn dừng lại và ổn định về số lượng. Và, cuối cùng,

(iv) *Pha chết* (death): Các sản phẩm độc do bài tiết tích luỹ có thể gây chết vi khuẩn.



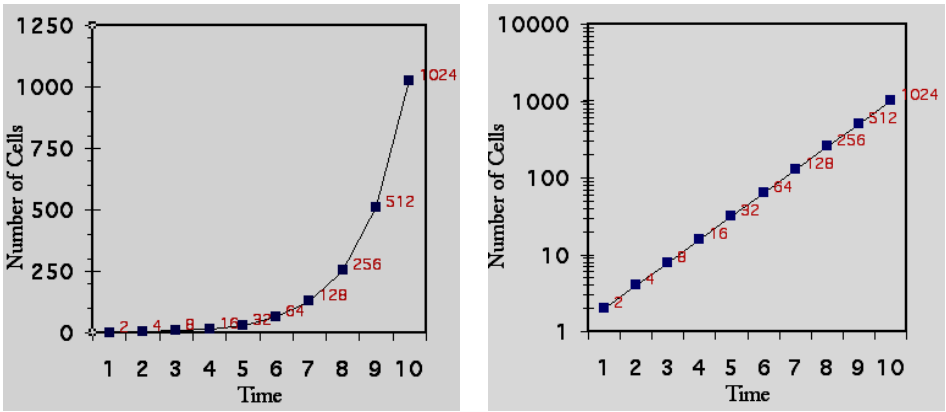

**Hình 6.3A** Các tế bào vi khuẩn *E. coli* đang phân chia (bên trái), và đường cong sinh trưởng của vi khuẩn trong dịch huyền phù (bênphải; trục tung biểu thị số tế bào tăng theo hàm số mũ, và trục hoành biểu thị thời gian).

✦ Đã nhiều lần các nhà nghiên cứu muốn xác định xem bằng cách nào các tế bào phân chia hay sinh trưởng một cách nhanh chóng như vậy. Một phương pháp đơn giản để đo tốc độ sinh trưởng là đếm số tế bào trong một đơn vị thể tích nhỏ (aliquot) tại nhiều thời điểm và biểu diễn một *đường cong sinh trưởng* (growth curve; Hình 6.3B). Đó là một đường cong không quá cong lắm như như đồ thị về số lượng tế bào (number of cells) đếm được tại các thời điểm khác nhau. Nếu như các tế bào có được không gian và dưỡng chất không giới hạn, thì chúng sẽ sinh trưởng ở tốc độ hàm số mũ. Như chỉ ra ở Hình 6.3B, cùng các số liệu về đường cong sinh trưởng như nhau được phác hoạ trên một thang tuyến tính (linear scale) hay thang log (log scale).

Mặc dù các tế bào có thể sinh trưởng một cách vô hạn trong một không gian nào đó, nhưng các phòng thí nghiệm thì không thể làm được những cái lọ to quá

cỡ. Vì vậy các tế bào thường được cho sinh trưởng trong các môi trường pha loãng. Chẳng hạn, thử hình dung 1.000 tế bào được cho vào trong một cái lọ và sau đó có 1.000.000 tế bào dược sinh ra trong đó. Nếu mất độ tế bào quá dày đặc, thì chúng sẽ sinh trưởng chậm lại. Để ngăn chặn sự suy giảm các tế bào, thì một phần mẫu đại diện của các tế bào (ví dụ, một mL chứa 1.000 tế bào) sẽ được chuyển sang một lọ mới và sẽ sinh trưởng. Quá trình lấy một số tế bào từ lọ này và cho sinh trưởng tiếp tục trong một lọ mới cho đến khi nhà nghiên cứu có đủ số lượng tế bào để tiến hành thí nghiệm.

Có nhiều cách khác nhau để đo ttốc độ sinh trưởng. Đôi khi, người ta bổ sung các dNTP có đánh dấu đồng vị phóng xạ (radioactive) vào môi trường nuôi cấy các tế bào. Khi các tế bào tái bản các DNA của chúng, chúng sẽ kết hợp các dNTP vào trong DNA của chúng và qua đó có thể định lượng được. Phương pháp tái bản DNA này thường được dùng để dành các mẫu mô sống hoặc các tế bào eukaryote được cho sinh trưởng trong các đĩa nuôi cấy. Các vi khuẩn, nấm men và nhiều vi sinh vật khác thường được đếm một cách trực tiếp.




**Hình 6.3** Các đường cong sinh trưởng. Đồ thị bên trái cho thấy tốc độ sinh trưởng được biểu thị bằng các chấm trên một thang tuyến tính. Đồ thị bên phải cho thấy cùng số liệu đó trên thang logarith.

*1. Các thể đột biến của vi khuẩn*

Để phân tích di truyền ở vi khuẩn thường dùng các thể đột biến sau :

(i) *Đột biến khuyết dưỡng* (auxotroph): Các thể đột biến không có khả năng tổng hợp chất cần thiết như kiểu dại (hay *thể nguyên dưỡng*, prototroph) và do đó, không sinh trưởng được nếu không thêm vào môi trường chất dinh dưỡng đó. Ví dụ, thể đột biến khuyết dưỡng methionin không sống được trên môi trường chỉ chứa muối vô cơ (*môi trường tối thiểu,* minimal medium) nhưng nếu thêm methionin vào thì nó sống được.

(ii) *Đột biến kháng chất kháng sinh:* Những đột biến này có thể sinh trưởng được khi có chất kháng sinh trong môi trường, như streptomycin

(str) hay tetracyclin (tet). Ví dụ, tế bào mẫn cảm với streptomycin ($Str^s$)là kiểu dại và không mọc trên môi trường có streptomycin nhưng những thể đột biến kháng streptomycin ($Str^r$) lại mọc được.

(iii) *Đột biến nguồn carbon*: Các thể đột biến này không sử dụng được một cơ chất nào đó làm nguồn năng lượng hay nguồn cung cấp carbon. Ví dụ, thể đột biến *lac*$^-$ không sử dụng đường lactose.

Môi trường mà trên đó mọi vi khuẩn đều mọc được được gọi là *môi trường không chọn lọc*. Nếu môi trường chỉ cho một kiểu tế bào mọc được, thì gọi là *môi trường chọn lọc*. Ví dụ, môi trường chứa streptomycin là chọn lọc cho thể đột biến $Str^r$ và môi trường tối thiểu chứa lactose là chọn lọc cho $Lac^+$. Để lai vi khuẩn người ta trộn hai thể đột biến khuyết dưỡng khác nhau với nhau, chẳng hạn a b c $d^+$ $e^+$ $f^+$ và $a^+$ $b^+$ $c^+$ d e f, rồi đem cấy hỗn hợp lai lên môi trường tối thiểu, các tế bào nào mọc được trên môi trường này chính là các tế bào lai nguyên dưỡng ($a^+$ $b^+$ $c^+$ $d^+$ $e^+$ $f^+$).

*2. Kiểu hình và kiểu gene của vi khuẩn*

Trong di truyền học vi khuẩn, kiểu gene và kiểu hình được ký hiệu như sau: (i). *Kiểu gene*: Các gene vi khuẩn được đặt tên bằng cách sử dụng danh pháp di truyền tiêu chuẩn do Demerec đề nghị. Mỗi gene được ký hiệu bằng chữ cái thường in nghiêng, và dấu (+) hay (-) để chỉ có mang hay không mang tính trạng nào đó, hoặc "s" hay "r" để chỉ tính mẫn cảm hay kháng với chất nào đó. (ii) *Kiểu hình* được ký hiệu bằng ba chữ cái với ký hiệu như kiểu gene nhưng với chữ cái đầu viết hoa.(xem Bảng 6.1).

***Bảng 6.1*** *Một số ký hiệu kiểu gene và kiểu hình của di truyền học vi khuẩn*

| **Ký hiệu** | | |
|---|---|---|
| **Kiểu gene** | **Kiểu hình** | **Mô tả kiểu hình** |
| *lac*$^-$ | $Lac^-$ | Không thể chuyển hoá đường lactose |
| *mal*$^-$ | $Mal^-$ | Không thể chuyển hoá đường maltose |
| *ara*$^-$ | $Ara^-$ | Không thể chuyển hoá đường arabinose |
| *trp*$^-$ | $Trp^-$ | Không thể tạo ra amino acid tryptophan |
| *pro*$^-$ | $Pro^-$ | Không thể tạo ra amino acid proline |
| *leu*$^-$ | $Leu^-$ | Không thể tạo ra amino acid leucine |
| *bio*$^-$ | $Bio^-$ | Không thể tạo ra vitamin biotin |
| *ton*$^r$ | $Ton^r$ | Kháng được phage T1 |
| *ton*$^s$ | $Ton^s$ | Có thể bị lây nhiễm bởi phage T1 |
| *str*$^r$ | $Str^r$ | Kháng được chất kháng sinh streptomycin |
| *str*$^s$ | $Str^s$ | Mẫn cảm với chất kháng sinh streptomycin |

## II. Biến nạp ở vi khuẩn (Transformation)

Lần đầu tiên tái tổ hợp di truyền ở *E. coli* được phát hiện trong các thí nghiệm của Joshua Lederberg và E.L. Tatum năm 1946. Nhưng cơ sở của hiện tượng này được giải thích trong công trình của Wollman và Jacob năмh 1955 về sự tiếp hợp ở *E. coli*. Đến nay, tái tổ hợp di truyền ở vi khuẩn được nghiên cứu kỹ trong ba phương thức đã nói ở trên: biến nạp, tiếp hợp và tải nạp; trong đó vật chất di truyền (một phần của bộ gene hoặc plasmid) được truyền từ tế bào này (*thể cho*, donor) sang tế bào khác (*thể nhận*, recipient) theo cách thức khác nhau. Trước tiên, ta hãy xét quá trình biến nạp vốn được ghi nhận rất sớm bởi Griffith từ năm 1928.

*1. Định nghĩa, thí nghiệm và đặc điểm chung*

Biến nạp là quá trình xâm nhập của DNA ngoại bào (thể cho) vào tế bào thể nhận và gây biến đổi một (một số) đặc tính của thể nhận bằng ảnh hưởng của DNA thể cho. Khác với tiếp hợp và tải nạp, biến nạp là quá trình chuyển DNA trực tiếp tách ra từ thể cho sang thể nhận mà không cần sự tiếp xúc trực tiếp giữa hai tế bào hoặc thông qua vật trung gian (các phage). Tế bào thể cho và thể nhận có thể bắt nguồn từ các sinh vật khác nhau, nhưng trong khuôn khổ của chương này, chúng ta chỉ xét hiện tượng biến nạp ở vi khuẩn. Hiện tượng này lần đầu tiên được Fred Griffith phát hiện ở vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* năm 1928 trong các thí nghiệm trên chuột. Tiếp tục phát triển hướng nghiên cứu này với DNA tinh chiết và gây biến nạp *in vitro*, thông qua xử lý bằng các enzyme khác nhau, đến năm 1944 O.T. Avery và cs đã chứng minh được rằng: DNA là vật chất mang thông tin di truyền, chứ không phải protein.

*2. Cơ chế phân tử của biến nạp*

Cơ chế biến nạp chủ yếu bao gồm việc vi khuẩn thể nhận tiếp nhận DNA của thể cho (gọi là *đoạn ngoại lai*, exogenote) và sau đó DNA này có thể trao đổi với đoạn DNA tương đồng của thể nhận (gọi là *đoạn nội tại,* endogenote) bằng trao đổi chéo. Những tế bào có khả năng tiếp nhận DNA gọi là các *tế bào khả biến* (competent). Tế bào vi khuẩn nhận đoạn ngoại lai lúc đó có bộ gene ở trạng thái *lưỡng bội một phần* (merodiploid) hay *hợp tử từng phần* (merozygote). Quá trình trao đổi thông tin di truyền bằng cách chuyển chỉ một phần vật chất di truyền như thế được gọi là sự *giao nạp* hay *tiếp hợp từng phần* (meromixis).

Tương tự như trong tiếp hợp và tải nạp, để lập bản đồ di truyền bằng biến nạp cần có các tế bào thể cho và thể nhận có các kiểu gene khác nhau. Về mặt thực nghiệm, DNA được tách ra từ các tế bào thể cho, sau đó được đưa vào quần thể các thể bào thể nhận. Các tế bào thể nhận sẽ tiếp nhận các đoạn DNA một cách ngẫu nhiên. Không phải tất cả các loài vi khuẩn

đều có khả năng tiếp nhận DNA. Ngay cả những loài có khả năng này cũng chỉ có thể tiếp nhận được DNA ở những pha sinh trưởng nhất định và trong môi trường nuôi cấy cụ thể. Các loài *Streptoccocus pneumoniae* (tức *Diplococcus*) và *Bacillus subtilis* tương đối dễ dàng trở thành khả biến hơn, trong khi *E. coli* phải mất đi hai loại enzyme exonuclease và phải được nuôi cấy trong môi trường có nồng độ cao của calcium chloride để làm cho màng tế bào của nó có thể thấm được DNA. Do vậy để lập bản đồ gene ở *E. coli* người ta ưa dùng tiếp hợp và tải nạp hơn. Tuy nhiên, trong công nghệ DNA tái tổ hợp, biến nạp *E. coli* là một khâu rất quan trọng (chương 8).

Để biến nạp có thể xảy ra với hiệu quả cao ở vi khuẩn, chẳng hạn *B. subtilis*, DNA biến nạp phải có mạch kép và phân tử lượng tương đối cao ($1.10^6$ dalton). Khi DNA xuyên qua màng tế bào của vi khuẩn khả biến thì một trong các sợi của DNA bị phân huỷ. Sau đó sợi đơn DNA chuyển sang có thể trao đổi với nhiễm sắc thể thể nhận ở vùng tương đồng; sự kiện này có thể phát hiện được nhờ những khác biệt di truyền thích hợp giữa các tế bào thể cho và thể nhận.

Tóm lại, hiệu quả của biến nạp phụ thuộc vào ba yếu tố: (i) Tính dung nạp hay khả biến của tế bào thể nhận; (ii) Kích thước của đoạn DNA được biến nạp; và (iii) Nồng độ của DNA.

Cơ chế phân tử của biến nạp (trong thí nghiệm Griffith), về cơ bản, có thể giải thích như sau:

(i) DNA sợi kép tế bào vi khuẩn cho S xâm nhập qua màng tế bào vi khuẩn nhận R, với một sợi đơn bị phân huỷ bởi nuclease;

(ii) DNA thể nhận R biến tính ở vùng tương đồng để bắt cặp hay tiếp hợp (*synapsis*) với đoạn DNA sợi đơn còn lại của thể cho S. Để có thể tái tổ hợp bình thường ở vi khuẩn cần có protein được mã hoá bởi gene *recA*$^+$.

(iii) Phân tử DNA với đoạn lai (*heteroduplex*) "R-S" tái bản tạo ra hai DNA sợi kép con: một sợi kép "R-R" và một sợi kép khác có mang đoạn DNA thể nhận "S-S", tất cả có hai sợi đơn giống nhau (*homoduplex*).

Từ thí nghiệm của Avery và cs, ta thấy rằng: Mặc dù thành phần hoá học của vỏ vi khuẩn (capsule) được xác định bằng các gene, nhưng mối quan hệ đó là gián tiếp. DNA được phiên mã thành RNA và RNA được dịch mã thành các protein. Kiểu hình của pneumococcus — thành phần của vỏ polysaccharide — được xác định bằng các enzyme (proteins) cụ thể (dùng để tổng hợp polysaccharide).

★ *Xác định liên kết gene bằng biến nạp*

Trong quá trình tách chiết DNA để tiến hành biến nạp, nhiễm sắc thể của vi

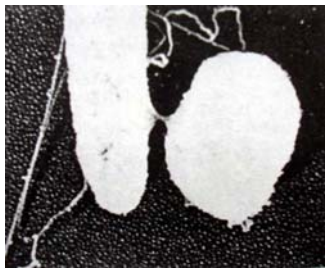
khuẩn thường bị đứt ra thành khoảng 250 đoạn, tức các phân tử riêng biệt. Các gene nằm ở những vị trí khác nhau trên nhiễm sắc thể vi khuẩn khi đó sẽ bị tách rời nhau và được truyền đi trong quá trình biến nạp một cách độc lập. Vì số gene ở vi khuẩn rất lớn mà số đoạn DNA lại hạn chế nên không loại trừ các trường hợp hai gene khác nhau cùng nằm trên một đoạn DNA, và vì vậy, cùng được chuyển đi. Trên thực tế những trường hợp như thế đã quan sát thấy ở hàng loạt vi khuẩn và gọi là *biến nạp liên kết*. Có thể phát hiện được biến nạp liên kết bằng cách xác định tần số biến nạp kép (biến nạp đồng thời hai gene, hay *đồng biến nạp*, cotransformed) và so sánh nó với trị số kỳ vọng khi hai gene được truyền đi một cách độc lập. Trong thí nghiệm người ta xác định sự liên kết gene bằng cách phát hiện hiệu quả pha loãng DNA. Trong một giới hạn nào đó của nồng độ DNA thì tần số biến nạp tỉ lệ tuyến tính với nồng độ DNA. Nếu hai gene nằm trên cùng một đoạn DNA thì sự biến đổi tần số biến nạp kép (liên kết) sẽ giống như biến nạp đơn. Còn nếu như biến nạp kép là do hai đoạn DNA khác nhau cùng chui vào tế bào (không liên kết) thì đường cong biến đổi của tần số biến nạp kép sẽ có độ dốc rõ rệt hơn so với biến nạp đơn.

Biến nạp chỉ được dùng để lập bản đồ gene cho một số loài. DNA thể cho được tách ra và làm đứt gãy thành những đoạn nhỏ. Đối với những tế bào khả biến, tần số biến nạp khoảng 1/ $10^3$ tế bào. Nếu hai gene a và b xa nhau trên nhiễm sắc thể thì nó thường nằm ở 2 đoạn bị đứt ra khác nhau. Khi đó tần số biến nạp cả hai gene này vào thể cho sẽ khoảng $1/10^3$ x $1/10^3$ = $1/10^6$. Nếu hai gene này gần nhau thì tần số đồng biến nạp của chúng xấp xỉ bằng biến nạp đơn: $1/10^3$. Nghiên cứu khả năng đi kèm nhau của các gene biến nạp có thể xác định được trật tự của chúng.

## III. Tiếp hợp ở vi khuẩn (Conjugation)

*1. Định nghĩa, thí nghiệm và đặc điểm chung*

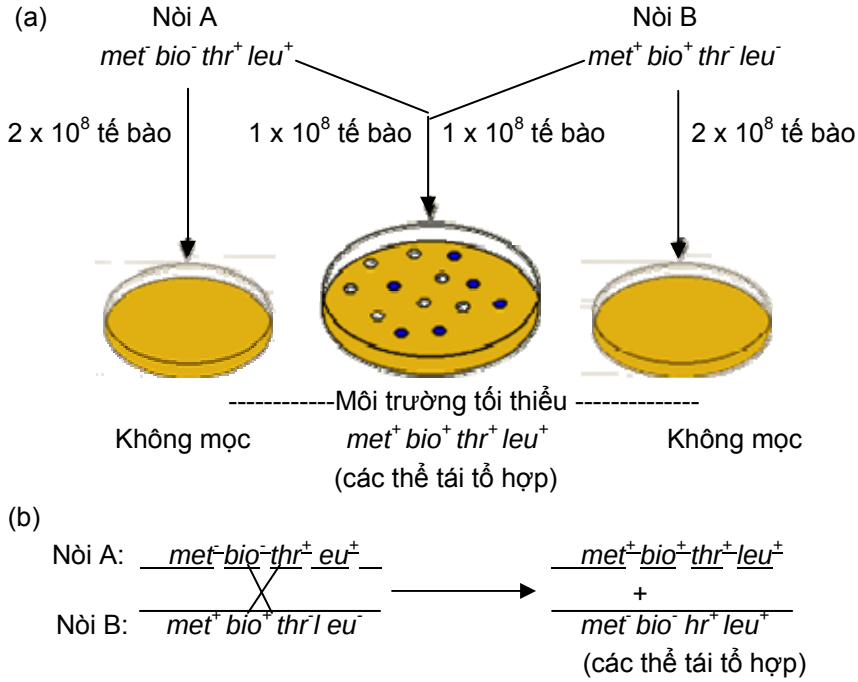
**Định nghĩa**: Tiếp hợp là hiện tượng tiếp xúc trực tiếp giữa hai tế bào vi khuẩn và kèm theo việc truyền một phần vật chất di truyền từ tế bào thể cho (donor) sang tế bào thể nhận (recipient, receptor).

(a) (b) 

**Hình 6.4** (a) Joshua Lederberg (trái) và E.L. Tatum; (b) *E. coli* tiếp hợp. Hai tế bào kết hợp nhau bằng một cầu nối, thể cho bên trái và thể nhận bên phải.

**Thí nghiệm:** Vào năm 1946, Joshua Lederberg và E.L.Tatum (Hình 6.4) đã sử dụng các nòi đột biến khuyết dưỡng khác nhau ở E, coli để

chứng minh có tái tổ hợp giữa chúng. Cụ thể, nòi A có kiểu gene *met⁻ bio⁻ thr⁺ leu⁺* và nòi B có kiểu gene ngược lại, *met⁺ bio⁺ thr⁻ leu⁻*. Nếu đem nuôi cấy riêng rẽ trên các môi trường tối thiểu, các nòi này không sinh trưởng được. Tuy nhiên sau khi trộn lẫn hai nòi A và B trong ống nghiệm và đem cấy lên môi trường tối thiểu, thấy có xuất hiện các khuẩn lạc. Điều đó chứng tỏ có sự tái tổ hợp giữa hai nòi và làm xuất hiện dạng lai hay các thể tái tổ hợp, với kiểu gene *met⁺ bio⁺ thr⁺ leu⁺*, bù đắp sự khiếm khuyết cho nhau trong nhu cầu dinh dưỡng (Hình 6.5).



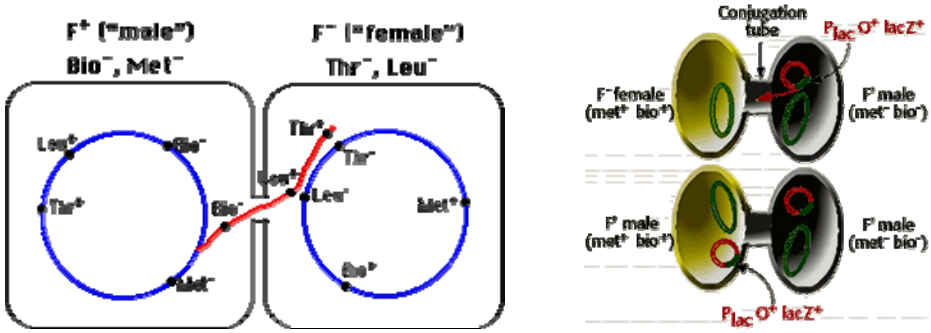

**Hình 6.5** Thí nghiệm kinh điển về tái tổ hợp ở vi khuẩn. (a) Hai nòi khuyết dưỡng A và B được hỗn hợp với nhau. Mỗi nòi tự nó không thể mọc được trên trên môi trường tối thiểu, nhưng khi hỗn hợp hai nòi làm xuất hiện các thể tái tổ hợp có thể mọc được trên môi trường tối thiểu, cho các khuẩn lạc mọc trên đĩa petri ở giữa. (b) Sự kiện tái tổ hợp làm sản sinh các thể nguyên dưỡng. Một trao đổi chéo xảy ra giữa các gene *bio* và *thr* đem các allele kiểu dại về một nhiễm sắc thể và các allele đột biến trên nhiễm sắc thể kia.

Như vậy, theo hiểu biết sau này ta có thể hình dung một số vi khuẩn, ví dụ *E. coli*, có thể truyền một phần nhiễm sắc thể của chúng cho thể nhận mà chúng tiếp xúc trực tiếp. Khi thể cho tái bản nhiễm sắc thể của nó thì bản sao được tiêm vào thể nhận. Tại thời điểm bất kỳ thể cho và thể nhận tách khỏi nhau thì việc truyền gene dừng lại. Các gene thực hiện "chuyến du hành" thành công sẽ thay chỗ tương đương trong nhiễm sắc thể của thể nhận. DNA được truyền gồm một bộ các gene nằm kề nhau gọi

là các *gene truyền*. Các gene truyền có thể tồn tại ở dạng phân tử DNA mạch vòng gọi là các *plasmid* hoặc nằm bên trong nhiễm sắc thể thể cho gọi là plasmid *lồng ghép* trong nhiễm sắc thể.

**Thuyết minh:** Hình 6.6 cho thấy cơ chế tiếp hợp ở *E. coli*, trong đó:

- Thể "cho" (donor) thiếu hẳn các gene chức năng cần thiết cho tổng hợp vitamin biotin và amino acid methionine ($Bio^-$, $Met^-$) vì thế cần phải bổ sung các chất này vào môi trường nuôi cấy của nó.
- Thể "nhận" (recipient) có các gene này ($Bio^+$, $Met^+$) nhưng các gene (đột biến) không hoạt động chức năng ngăn cản không cho nó tổng hợp các amino acid threonine và leucine ($Thr^-$, $Leu^-$), cho nên phải bổ sung các chất này vào môi trường nuôi cấy của nó.
- Khi được nuôi cấy chung với nhau, một số tế bào *thể nhận* nhận được các gene Thr và Leu *c*ó chức năng bình thường từ *thể cho*.
- Một sự trao đổi chéo kép có thể làm thay thế các allele không hoạt động chức năng bằng các allele có chức năng.
- Bây giờ các tế bào có thể sinh trưởng trên môi trường tối thiểu chỉ chứa glucose và muối.




**Hình 6.6** Cơ chế tiếp hợp và tái tổ hợp gene ở các tế bào *E. coli*.

**Các đặc điểm**

(i) Chỉ có thể xảy ra giữa các tế bào thuộc các kiểu bắt cặp đối diện; trong đó thể cho (male) mang một nhân tố hữu thụ ($\mathbf{F}^+$) và thể nhận (female) không có nhân tố này ($\mathbf{F}^-$). Lưu ý rằng, hiện tượng phân hoá giới tính này ở vi khuẩn (tương tự các giống đực và cái ở sinh vật bậc cao) đã được Hayes phát hiện từ năm 1953.

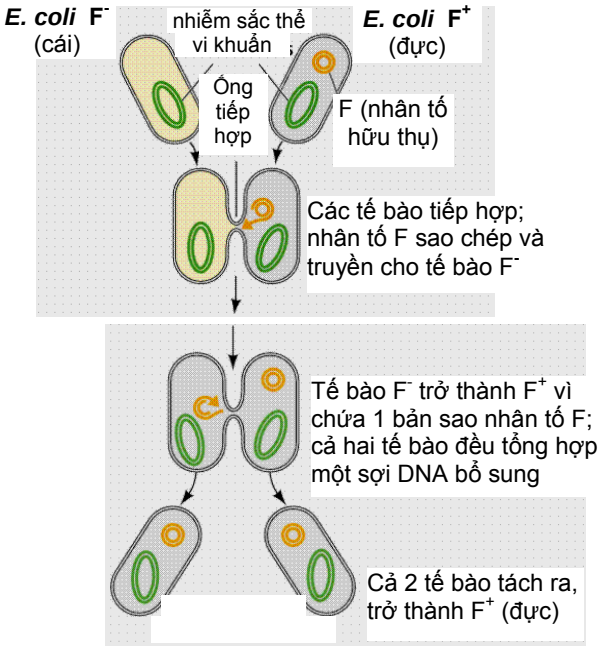
(ii) **F** là một bộ các gene nguyên vẹn nhận được từ một plasmid và bây giờ được sát nhập vào nhiễm sắc thể vi khuẩn; nó xác định khởi điểm tái bản cho nhiễm sắc thể; một phần của F là motor ("đầu máy") đẩy nhiễm sắc thể vào trong tế bào thể nhận; phần còn lại của nó là "toa công nhân".

(iii) Ở *E. coli*, trung bình một gene truyền qua mất một giây mà các tế

bào vẫn được duy trì tiếp hợp với nhau, lúc đó mất khoảng 100 phút để chuyển toàn bộ bộ gene 4.377 gene của nó. Nhưng quá trình này thực ra dễ dàng bị gián đoạn, vì thế có thể các gene vật chủ nằm gần phía sau các gene của plasmid F đi trước sẽ được truyền đi sớm hơn là các gene nằm xa hơn. Phần còn lại "toạ công nhân" hiếm khi được truyền đi vì vậy khó mà nhận được một nhân tố F hoàn chỉnh, tế bào thể nhận tiếp tục là **F**$^{-}$.

(iv) DNA truyền qua sẽ tìm ra vùng tương đồng trên DNA thể nhận và thay chỗ đó bằng một trao đổi chéo kép.

(v) Bằng cách tách các tế bào một cách cẩn thận vào bất cứ lúc nào, trật tự và khoảng cách tương đối của các gene có thể được xác định. Theo đó, ta có thể thiết lập một bản đồ di truyền — tương đương với bản đồ di truyền của các eukaryote. Nhưng ở đây các quãng cách bản đồ được tính bằng giây (hoặc phút), chứ không phải bằng centiMorgan.




**Hình 6.7** Sự tiếp hợp giữa các tế bào *E. coli* $F^+$ (đực) và $F^-$ (cái), với việc truyền nhân tố F- (ở dạng DNA sợi đơn đang tái bản kiểu vòng lăn) từ tế bào $F^+$ sang tế bào $F^-$ qua cầu tiếp hợp. Trong điều kiện lý tưởng, tế bào $F^-$ nhận được một bản sao của nhân tố F và sau đó tổng hợp sợi DNA bổ sung và trở thành tế bào $F^+$.

Như vậy, đặc trưng của việc truyền DNA trong tiếp hợp là đòi hỏi phải có sự tiếp xúc tế bào-tế bào (tiếp hợp được ngăn bởi màng lọc chỉ cho phép pha trộn môi trường nhưng ngăn cản tiếp xúc giữa các tế bào cho và nhận); xảy ra thông qua lỗ tiếp hợp; truyền theo một chiều từ thể cho sang

thể nhận mà không ngược lại; ...

**Cơ chế**

Tiếp hợp được gán cho các kiểu yếu tố di truyền nhất định, cụ thể là các plasmid. Việc truyền plasmid từ thể cho sang thể nhận không đòi hỏi DNA của plasmid để tái tổ hợp với DNA của thể nhận. Tiếp hợp là có tính bảo tồn - thể cho vẫn giữ lại bản sao của plasmid sau khi truyền đi, điều đó chỉ ra rằng sự tái bản của plasmid xảy ra trong khi tiếp hợp.

Sự tái bản plasmid đòi hỏi phải có một "cầu tiếp hợp" (mating bridge) giữa các tế bào cho và nhận. Đó là vùng tiếp xúc giữa các tế bào này, trong đó DNA được truyền qua một cái lỗ. Như vậy, trước khi cầu tiếp hợp có thể hình thành, thể cho phải nhận biết tế bào nhận và phải tiếp xúc với thể nhận. Hai sự kiện này không nhất thiết xảy ra đồng thời.

Có nhiều gene được cần đến cho tiếp hợp. Chẳng hạn, đối với plasmid TiC58 các *trb* operon mã hoá cho các sản phẩm gene cần thiết để nhận biết thể nhận và bắt cặp (giao phối). Các gene trong cụm phức hợp này mã hoá cho sợi lông giới tính (sex pilus), yếu tố thiết yếu cho tiếp hợp. Lông giới tính có thể rất dài (ví dụ lông sinh ra bởi plasmid F) hoặc rất ngắn (ví dụ lông sinh ra bởi plasmid RP4). DNA không phải được truyền qua lông giới tính. Mặc dù thể nhận còn chưa biết về plasmid tiếp hợp bất kỳ nào, nhưng sợi lông giới tính là cần cho việc nhận biết tế bào thể nhận. Các plasmid tương tự F mã hoá cho các lông gấp nếp (flexous pili) bắt cặp tốt trong môi trường lỏng, nhưng các plasmid mã hoá cho các lông ngắn cứng (short stiff pili) thường bắt cặp chỉ trong bề mặt đặc. Sự tiếp xúc như sau, sợi lông dài gấp nếp của F hoạt động như một chiếc motor co rút - các tế bào cho và nhận được kéo lại gần nhau khi các tiểu đơn vị của sợi lông khử polymer thành ra màng tế bào chất của các tế bào cho. Ngược lại, bản chất co rút của các sợi lông khác vẫn chưa được xác định.

Các *tra* operon mã hoá các sản phẩm gene cần cho các chức năng tái bản DNA. Sự tái bản DNA đòi hỏi nhiều bước.

- Khởi đầu *tái bản vòng lăn* (rolling circle replication) hay *tái bản sigma* (σ replication) đòi hỏi phải đứt sợi ở DNA của plasmid đóng vòng. DNA plasmid bị đứt tại một vị trí tác động *cis* đặc thù (specific *cis*-acting site) gọi là *nic* bên trong khởi điểm của đoạn truyền (*oriT*). Enzyme thuỷ phân làm đứt đó được gọi là "nickase" hay "strand transferase". Để làm đứt DNA, nickase vẫn giữ sự kết dính đồng hoá trị nhóm 5' phosphate, để lại nhóm 3'OH tự do. Các protein hỗ trợ tạo thuận lợi cho nickase bám vào *oriT*, và phức hợp này được gọi là "relaxosome" (thể giãn xoắn).
- Tái bản DNA khởi đầu tại 3'OH, và tiến hành theo chiều 5' đến 3'.

- Phức hợp relaxasome bám vào lỗ truyền.
- Sự tái bản DNA kiểu vòng lăn trong thể nhận đẩy DNA sợi đơn (single stranded DNA = *ssDNA*) vào trong tế bào thể nhận.
- ssDNA được biến đổi thành DNA sợi kép (double stranded DNA = *dsDNA*) trong thể nhận bằng cách tổng hợp DNA sợi ra chậm.

Khi vắng mặt thể nhận, relaxasome làm đứt và nối lại DNA của plasmid. Mặc dù cơ chế còn chưa rõ, sự tiếp xúc với tế bào thể nhận bằng cách nào đó kích thích làm đứt và truyền DNA đi sau đó.

**Phạm vi vật chủ**

Phạm vi vật chủ (host range) có thể được xác định bằng phạm vi các vật chủ mà có thể sử dụng với tư cách là các thể nhận cho việc truyền DNA hoặc phạm vi các vật chủ mà plasmid có thể tái bản bên trong chúng. Phạm vi vật chủ cho tiếp hợp được xác định tiêu biểu bằng khả năng plasmid tái bản nội bên trong vật chủ đặc thù. Chẳng hạn, xét các plasmid tiếp hợp sau:

| Plasmid | P.vi v.chủ t.hợp | P.vi v.chủ tái bản | P.vi v.chủ truyền |
|---|---|---|---|
| F | hẹp (Gram- đường ruột) | hẹp | rộng |
| RP4 | rộng (Gram- và Gram+) | rộng | rộng |

Phạm vi vật chủ của một số plasmid tiếp hợp là rất rộng, bao gồm cả việc truyền sang thể nhận là các vi khuẩn, nấm men, các tế bào thực vật và các tế bào động vật có vú. Tuy nhiên, sự tái bản của plasmid thường bị giới hạn vào các vật chủ nào đó.

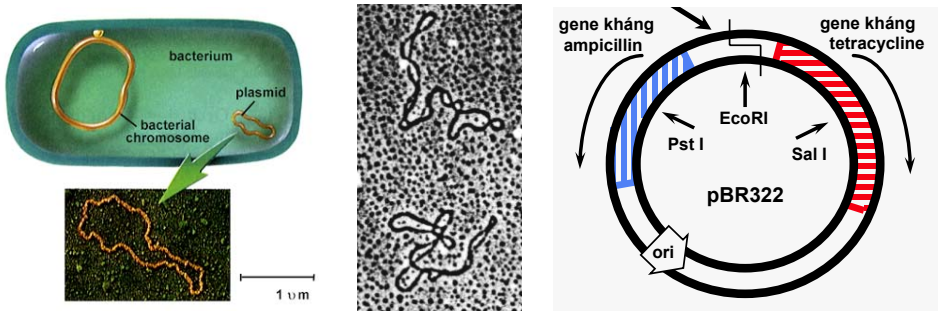
*2. Các plasmid và sự truyền DNA ở vi khuẩn*

Plasmid là những phân tử DNA mạch vòng có khả năng tái bản độc lập và có kích thước 0,05- 10% kích thước của nhiễm sắc thể vi khuẩn. Chúng có ở nhiều loài vi khuẩn và thường không quan trọng đối với sự sinh trưởng của tế bào. Plasmid rất đa dạng về gene và nhiều gene của chúng không có trong nhiễm sắc thể vi khuẩn và bằng nhiều cách, chúng có thể có được các gene của vi khuẩn. Sự tồn tại của plasmid được chứng minh bằng kiểu hình mà tế bào mang chúng thể hiện. Ví dụ, plasmid mang allele *tet*$^r$ sẽ làm cho vi khuẩn kháng với tetracyclin (Hình 6.8).

Plasmid dựa vào các enzyme tái bản DNA của tế bào chủ để tái bản, nhưng sự khởi đầu lại do các gene của plasmid kiểm soát. Do vậy số bản sao của chúng có thể khác nhau. Plasmid tái bản mạnh có thể tạo ra 50 bản sao trong một tế bào, trong khi các plasmid khác chỉ cho 1 hoặc 2 bản sao.

Có nhiều loại plasmid ở *E. coli*. Các plasmid đã được nghiên cứu kỹ là plasmid R, Col và F. *Plasmid R* gọi là *các plasmid kháng thuốc* vì chúng có mang các gene kháng với một hay nhiều loại kháng sinh (Hình 6.8).

*Plasmid Col* có khả năng tổng hợp colicin - các protein có thể giết chết các vi khuẩn họ hàng không mang plasmid Col.




**Hình 6.8** Các plasmid của vi khuẩn: pSC101 (trái), plasmid siêu xoắn (giữa), và pBR322 - một vector tạo dòng được dùng trong DNA sequencing - với vị trí của khởi điểm tái bản (ori), các gene kháng $Amp^R$ và $Tet^R$ và một số vị trí của các enzyme cắt giới hạn (xem chương 8).

*Plasmid F* (F = fertility), còn gọi là các *plasmid giới tính* hay *nhân tố F* có kích thước ~94.500 cặp base (xấp xỉ 1/50 chiều dài của nhiễm sắc thể vi khuẩn), rất được quan tâm vì chúng chứa các gene truyền và xác định tính hữu thụ của vi khuẩn. Nhân tố F có chứa các gene quy định sự hình thành các lông giới tính (pili) mảnh, mềm và có thể rất dài trên mặt tế bào gọi là lông F. Các gene khác trong nhân tố F chuyên trách việc hình thành cầu tiếp hợp nối các tế bào cho và nhận để nhân tố F có thể chuyển qua. F là plasmid tái bản yếu, và một tế bào $F^+$ điển hình mang 1 hoặc 2 bản sao của nhân tố F. Phần tử di truyền $F^+$ này tồn tại ngoài nhiễm sắc thể nên còn gọi là *episome*.

Nhân tố F được truyền từ tế bào $F^+$ sang $F^-$ trong quá trình tiếp hợp và xảy ra đồng thời với việc tái bản plasmid. Sự tiếp xúc giữa $F^+$ và F là tín hiệu bắt đầu cho việc tái bản nhân tố F và chỉ một sợi đơn thẳng được truyền sang tế bào thể nhận (Hình 6.6). Quá trình tổng hợp DNA xảy ra đồng thời ở cả hai tế bào cho và nhận để tạo ra DNA sợi kép dạng vòng. Sau đó cả hai tế bào đều chứa nhân tố F và có thể thực hiện chức năng như là tế bào thể cho (Hình 6.7).

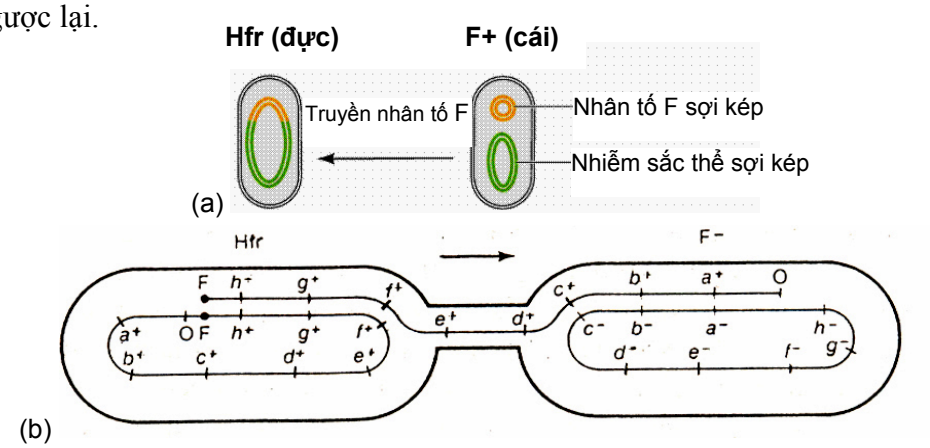
*3. Nòi Hfr*

Một số nòi $F^+$ có thể sinh ra những tế bào "thể cho" có khả năng truyền gene trên nhiễm sắc thể với tần số cao, gọi là các tế bào có khả năng tái tổ hợp cao hay các *nòi Hfr* (high frequency recombination). Các nòi Hfr cũng có những lông F như các tế bào $F^+$, nhưng giữa chúng có một điểm khác biệt quan trọng ở chỗ, trong các tế bào Hfr nhân tố F được đính vào nhiễm sắc thể vi khuẩn. Vì vậy ngoài những biểu hiện của nhân tố F

giống như các tế bào $F^+$, các tế bào Hfr còn có khả năng truyền đi nhiễm sắc thể vi khuẩn qua ống tiếp hợp.

*4. Sự xen plasmid F vào trong nhiễm sắc thể vật chủ*

Nhân tố F được đính vào nhiễm sắc thể bằng cơ chế trao đổi chéo đơn và làm cho nhiễm sắc thể này trở nên lớn hơn. Tế bào Hfr có thể biến đổi thành tế bào $F^+$ (mang nhân tố F trong tế bào chất) bằng một quá trình ngược lại.




**Hình 6.9** (a) Sự sát nhập của nhân tố F vào nhiễm săc thể ở vi khuẩn "cho" $F^+$ tạo thành nhiễm sắc thể có kích thước lớn trong vi khuẩn "nhận" Hfr bằng một trao đổi chéo đơn; hiện tượng này mang tính thuận nghịch. (b) Truyền DNA sợi đơn từ thể cho (Hfr) sang thể nhận ($F^-$).

Bởi vì nhân tố F có khả năng đính vào nhiều vị trí khác nhau trên nhiễm sắc thể vi khuẩn, do đó trình tự gene được chuyển sang các tế bào $F^-$ bởi các nòi Hfr khác nhau là rất khác nhau. Vì khi bắt đầu chuyển gene từ Hfr sang $F^-$ thì nhân tố F bị tách ra, nên một phần được chuyển đi trước, phần còn lại chính là đuôi của nhiễm sắc thể *E. coli* được chuyển đi sau cùng hoặc không được truyền sang nếu qúa trình bị ngắt quãng giữa chừng. Khi đó chỉ một phần nhiễm sắc thể được chuyển sang $F^-$, phần còn lại cùng với nhân tố F vẫn nằm lại trong tế bào Hfr.

Những khác biệt cơ bản giữa việc truyền nhân tố F và Hfr như sau:

(i) Cần 100 phút để truyền toàn bộ nhiễm sắc thể vi khuẩn trong khi chỉ cần khoảng 2 phút để truyền nhân tố F.

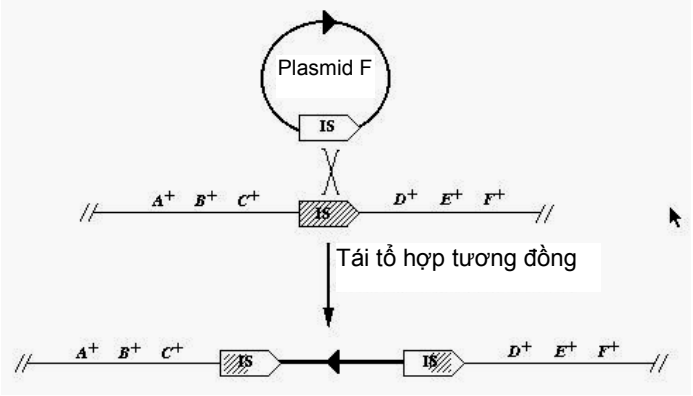
(ii) Quá trình truyền DNA Hfr thường bị đứt quãng. Trung bình khoảng vài trăm gene được truyền trước khi hai tế bào tách ra.

(iii) Sau khi được truyền $F^-$ vẫn là $F^-$ vì đoạn cuối của F thường không được truyền sang (khi tiếp hợp giữa F với Hfr ).

(iv) Một đoạn DNA của Hfr được truyền đi không thể tạo thành mạch

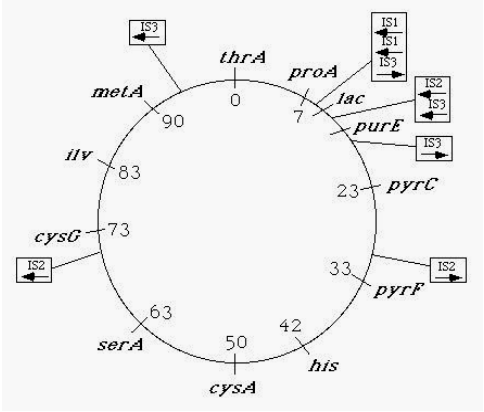
vòng được và không tự tái bản được, chúng có thể trao đổi chéo với nhiễm sắc thể của thể nhận để tạo nên các thể tái tổ hợp $F^-$. Ví dụ, cho tiếp hợp Hfr $leu^+$ x $F^-$ $leu^-$ có thể cho ra $F^-$ $leu^+$.

* Sự hình thành Hfr: Các nòi Hfr có thể hình thành giữa một yếu tố (đoạn xen) IS trên plasmid F và cùng yếu tố IS đó trên nhiễm sắc thể vật chủ (Hình 6.10).




**Hình 6.10** Sự hình thành Hfr tại đoạn xen IS.

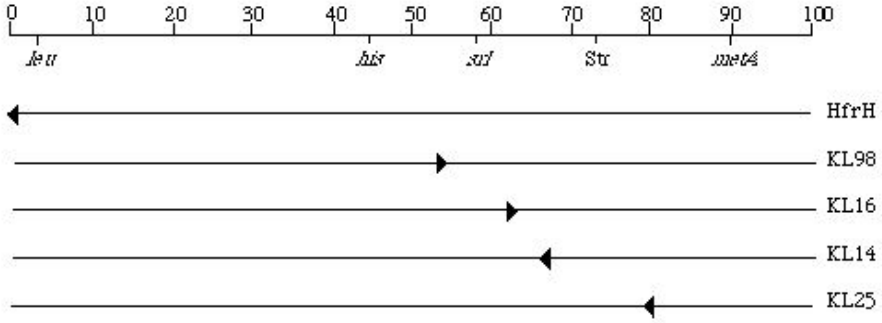
Có nhiều đoạn xen IS trong nhiều nhiễm sắc thể vi khuẩn. Chẳng hạn, *E. coli* K-12 kiểu dại có 8 đoạn xen IS1, 6 đoạn xen IS2 và 5 đoạn xen IS3. Vì các đoạn xen IS là các yếu tố di truyền vận động, mỗi nòi có thể có số lượng các đoạn xen IS khác nhau. Sự định khu của một số đoạn xen IS1, IS2 và IS3 trên nhiễm sắc thể *E. coli* K-12 và hướng của chúng được cho thấy ở Hình 6.11 dưới đây.




**Hình 6.11** Vị trí của các đoạn xen IS1, IS2 và IS3 trên nhiễm sắc thể *E. coli* K-12 và hướng của chúng.

Bằng cách đó, các đoạn xen của Hfr có thể được phân lập tại nhiều vị trí ở *E. coli* và các hướng khác nhau so với nhiễm sắc thể. Một số ví dụ về

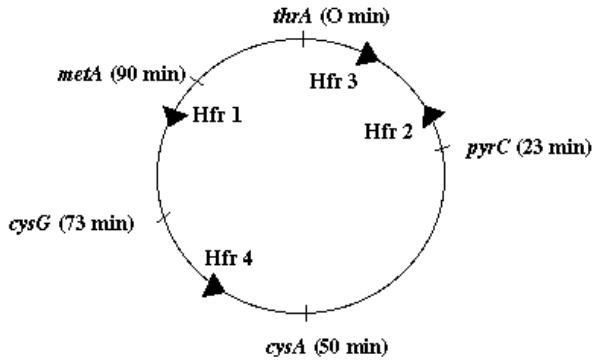
các đoạn xen của Hfr đã được phân lập ở *E. coli* được cho thấy ở hình 6.12 dưới đây. Lưu ý rằng nhiễm sắc thể *E. coli* ở đây được biểu diễn dưới dạng mạch thẳng. Các con số bên trên hình biểu thị số phút (hay là "centisome") trên bản đồ di truyền của *E. coli*.




**Hình 6.12** Các đoạn xen của Hfr đã được phân lập ở *E. coli.*

Ngược lại, *Salmonella typhimurium* khuyết nhiều yếu tố IS vốn có mặt ở *E. coli*. Rõ ràng, các đoạn xen của Hfr được gây ra bởi sự tái tổ hợp tương đồng giữa các đoạn xen IS trên plasmid F và nhiễm sắc thể là hiếm gặp ở *S. typhimurium*.

Một thể đột biến mới được phân lập đó là $Str^R$ và không thể sử dụng acetate như một nguồn carbon (ace). Để xác định vị trí các đột biến trên bản đồ, nó được cho giao phối với bốn nòi Hfr $Str^S$ $ace^+$ khác nhau được chỉ ra dưới đây. [Các mũi tên chỉ ra sự định khu và hướng truyền từ mỗi Hfr khác nhau.]

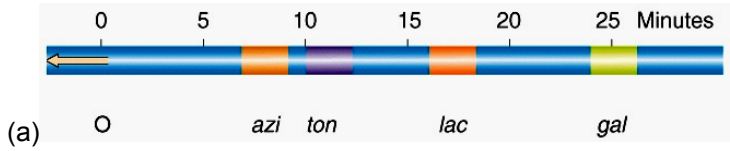



**Hình 6.13** Vị trí và hướng truyền của các Hfr 1-4.

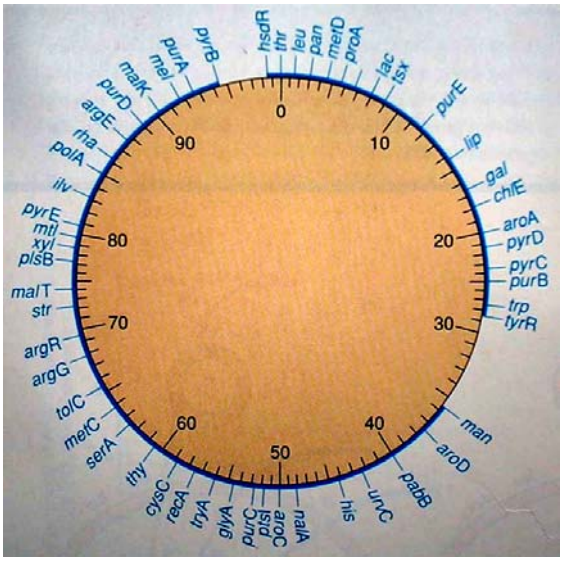
*5. Lập bản đồ di truyền bằng tiếp hợp ngắt quãng*

Bằng các phép giao phối Hfr x $F^-$ có thể lập được bản đồ gene. Tuy nhiên, bản đồ này khác với bản đồ liên kết gene thông thường, đó là bản đồ trật tự truyền gene.

Bằng cách ngắt quãng cơ học việc truyền gene trong quá trình giao phối có thể xác định thời gian mà một gene nào đó được truyền sang nhờ việc xác định tần số các thể tái tổ hợp. Từ đó xác định được khoảng cách giữa các gene và vị trí của chúng trên nhiễm sắc thể đo bằng đơn vị thời gian (phút; Hình 6.14a). Đó là *kỹ thuật ngắt quãng tiếp hợp* mà Elie Wollman và Jacob đã sử dụng để thiết lập bản đồ trật tự phân bố các gene.




(a)




(b)

**Hình 6.14** (a) Vị trí và khoảng cách của một số gene trên nhiễm sắc thể đo bằng phút. (b) Bản đồ mạch vòng của bộ gene *E. coli* được thiết lập từ năm 1976 và chỉ chứa một phần các gene mà hiện giờ đã được lập bản đồ.

Để lập bản đồ của toàn bộ nhiễm sắc thể mạch vòng ở *E. coli* người ta đã sử dụng nhiều nòi Hfr khác nhau, mặc dù vậy trật tự của gene và vị trí của chúng trên nhiễm sắc thể, kể cả khoảng cách giữa các gene (đo bằng phút), vẫn giống nhau. Toàn bộ bản đồ nhiễm sắc thể ở *E. coli* là 100 phút (Hình 6.14).

*6. Lập bản đồ với* E. coli: *các plasmid F' và trắc nghiệm cis-trans*

6.1. Các plasmid F'

Nhân tố F đôi khi bị cắt khỏi DNA của tế bào Hfr bằng cơ chế trao đổi chéo các đoạn tương đồng giống như khi lồng ghép. Tuy nhiên, trong một

vài trường hợp. Sự trao đổi chéo xảy ra không thật chính xác - tại đoạn không tương đồng - và vì vậy có thể tạo ra một plasmid mang một phần DNA của nhiễm sắc thể vi khuẩn - đó là plasmid F'.

Bằng cách dùng những nòi Hfr có các điểm khởi đầu truyền gene khác nhau, người ta đã tách được những plasmid F' khác nhau. Những plasmid này có mang các đoạn nhiễm sắc thể của tế bào Hfr ở dạng lưỡng bội từng phần nên rất có ích cho việc nghiên cứu sự biểu hiện của gene. Người ta ký hiệu kiểu gene của tế bào, ví dụ mang đột biến *lac* và mẫn cảm với streptomycin, có chứa plasmid F' lac$^+$ như sau: F' flac$^+$flac$^-$ str$^s$.

6.2. Trắc nghiệm bổ sung *cis-trans* (*cis-trans* complementation test)

Về nguyên tắc chung của trắc nghiệm (hay phép thử) bổ sung *cis-trans*, như đã đề cập ở chương 1. Có thể tóm tắt như sau: Hai đột biến khác nhau ảnh hưởng lên cùng một chức năng thì có thể thuộc về trắc nghiệm cis-trans, hay phép thử bổ sung, để xác định xem liệu chúng xảy ra trong cùng gene hay trong các gene khác nhau. Trong phép thử này, hai gene đột biến được cung cấp cho cùng tế bào ở dạng *trans* (trên các nhiễm sắc thể riêng biệt). Nếu như các đột biến bổ sung bù trừ cho nhau để cho chức năng kiểu dại, chúng có thể nằm trong các gene riêng biệt. Nếu như các đột biến không bổ sung được cho nhau, chứng tỏ chúng ảnh hưởng cùng một gene như nhau.

## IV. Tải nạp (Transduction)

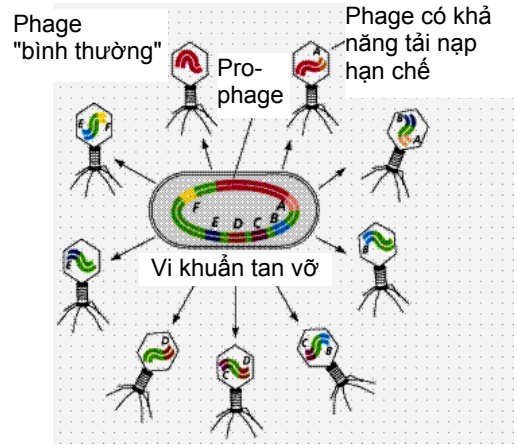
*1. Định nghĩa, thí nghiệm và đặc điểm chung*

Tải nạp là quá trình chuyển vật chất di truyền từ vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận thông qua phage. Những phage này được gọi là các *hạt tải nạp*. Có hai dạng phage tải nạp là phage tải nạp chung và phage tải nạp đặc hiệu. Phage tải nạp chung sản sinh ra các hạt mang những đoạn DNA vi khuẩn từ bất kỳ phần nào của nhiễm sắc thể vi khuẩn và không có DNA phage. Còn *phage tải nạp đặc hiệu* sản sinh ra các hạt mang cả DNA phage và gene vi khuẩn liên kết thành một sợi đơn, và gene vi khuẩn được lấy từ những *vùng đặc biệt của nhiễm sắc thể vi khuẩn*.

*2. Tải nạp chung (generalized transduction): Phage P1*

Tải nạp chung là trường hợp bất kì gene nào của thể cho cũng có thể được chuyển sang thể nhận bằng phage. Thí nghiệm đầu tiên về tải nạp chung được N. Zinder và J. Lederberg tiến hành vào năm 1952 trên vi khuẩn *Salmonella typhimurium*. Các tác giả này đã sử dụng một ống thuỷ tinh hình chữ U có ngăn ở giữa bằng màng lọc vi khuẩn, còn phage vẫn chui qua được. Bên trái của ống có chứa nòi vi khuẩn LA2 với kiểu gene *phe$^+$ trp$^+$ met$^-$ his$^-$* còn bên phải ống mang nòi LA22 với kiểu gene *phe$^-$ trp$^-$*

*met*$^{+}$ *his* $^{+}$. Vi khuẩn kiểu dại đã xuất hiện ở bên phải ống nhưng không thấy có ở bên trái ống, chứng tỏ vật trung gian chuyển gene (mà sau này tìm ra là P22) đã được LA2 sinh ra và nó làm xuất hiện các thể tái tổ hợp kiểu dại ở nòi LA22. P22 là một phage ôn hoà có khả năng tiềm tan hoá nòi LA22 và gây tan nòi LA2. Trong quá gây tan một đoạn DNA vật chủ có thể được bọc gói trong vỏ của phage, vì vậy khi tiềm tan hoá các tế bào LA22 chúng có thể sinh ra các thể tái tổ hợp kiểu dại do kết quả của trao đổi chéo giữa các đoạn DNA của LA2 (do phage P22 đưa sang) và nhiễm sắc thể của LA22.




**Hình 6.15** Tải nạp chung (generalized transduction).

Tải nạp có thể diễn ra ở các vi khuẩn khác như *E. coli* với sự trung gian của phage P1, ở *Bacillus subtilisvowis* sự tham gia của phage SP10.

Phân tích di truyền bằng tải nạp chung: DNA của phage P22 bằng khoảng 1/100 DNA của *Salmonella typhimurium*, vì vậy phage chỉ có thể chuyển đi một đoạn rất nhỏ nhiễm sắc thể vật chủ. Do đó tải nạp có thể cung cấp thông tin về hai đột biến nằm rất gần nhau và cũng có thể giúp xác định trình tự tương đối của các gene khi tiến hành nghiên cứu đồng thời ba gene. Ví dụ, dùng phage P1 để tải nạp các gene giữa hai nòi *E. coli.* Nòi cho là *leu*$^{+}$ *thr*$^{+}$ *azi*$^{r}$, nòi nhận là *leu*$^{-}$ *th*$^{-}$ *azi*$^{s}$. Kết quả của thí nghiệm được tổng kết ở bảng dưới đây.

Tần số đồng tải nạp các dấu chuẩn trong thí nghiệm dùng phage P1, nòi cho là *leu*$^{+}$ *thr*$^{+}$*azi*$^{r}$, và nòi nhận là *leu*$^{-}$ *thr*$^{-}$ *azi*$^{s}$.

| Dấu chuẩn chọn lọc | Dấu chuẩn không chọn lọc |
|---|---|
| *leu*$^{+}$ | 50% *azi*$^{r}$ |
| | 2% *thr*$^{+}$ |
| *thr*$^{+}$ | 3% *leu*$^{+}$ |
| | 0% *azi*$^{r}$ |

Trong thí nghiệm chọn lọc theo $leu^+$ các kết quả cho thấy các gene *leu* và *azi* nằm gần nhau và cả hai đều nằm xa gene *thr*. Kết quả của thí nghiệm chọn lọc theo $thr^+$ cho thấy gene *leu* nằm gần gene *thr* hơn so với gene *azi*. Vậy trình tự các gene là *thr-leu- azi*.

Đoạn DNA tải nạp thường mang khoảng 50 gene và tải nạp có thể dùng để lập bản đồ gene. Giả sử một quần thể phage P1 được lấy từ vi khuẩn có kiểu gene $leu^+$ $gal^+$ $bio^+$. Trong số các phage này sẽ có các hạt tải nạp chỉ mang hoặc $leu^+$ hoặc $gal^+$. Vì vậy nếu cho chúng xâm nhiễm vi khuẩn có kiểu gene $leu^-$ $gal^-$ thì có thể có các thể tải nạp $leu^+$ $gal^-$ hoặc $leu^-$ $gal^+$. Nếu tỷ lệ phage / vi khuẩn rất nhỏ hơn 1 sẽ không có các vi khuẩn lai $leu^+$ $gal^+$. Rất hiếm khi một đoạn DNA vi khuẩn lại mang cả hai gene *leu* và *gal* vì hai gene này khá xa nhau trên nhiễm sắc thể vi khuẩn.

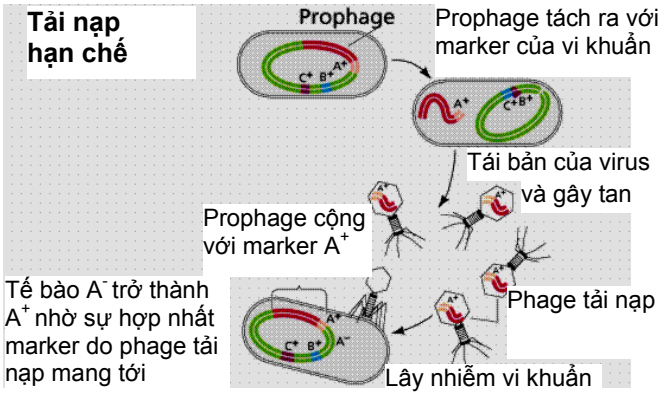
Hai gene *gal* và *bio* chỉ cách nhau $2,3 \times 10^4$ cặp base nên chúng có thể cùng có mặt trên đoạn DNA tải nạp, vì hạt tải nạp có thể bọc gói một đoạn DNA có kích thước $7,7 \times 10^4$ cặp base. Tuy nhiên không phải tất cả hạt tải nạp $gal^+$ đều cũng phải là $bio^+$ và ngược lại, vì enzyme nuclease có thể cắt DNA ở điểm gẽưa hai gene này. Hiện tượng tải nạp cả hai gene đánh dấu được gọi là đồng tải nạp. Tần số đồng tải nạp tỷ lệ nghịch với khoảng cách giữa các gene. Sử dụng môi trường chọn lọc cho cả hai gene, ta sẽ phát hiện được các thể đồng tải nạp. Như vậy, việc nghiên cứu hiện tượng đồng tải nạp có thể giúp ta xây dựng bản đồ di truyền.

Có thể sử dụng đoạn DNA tải nạp mang ba gene đánh dấu để xác định trật tự gene. Trong trường hợp này gene nằm giữa sẽ có tần số tải nạp thấp nhất vì nó cần bốn trao đổi chéo để hình thành, trong khi hai gene kia chỉ cần có hai.

*3. Tải nạp chuyên biệt (specialized transduction): Phage λ*

Tải nạp chuyên biệt hay đặc hiệu là trường hợp phage chỉ truyền đi những gene nhất định từ thể cho sang thể nhận. Ví dụ, trường hợp phage lambda (λ) thực hiện tải nạp giữa các vi khuẩn *E. coli*. Phage λ chứa DNA có chiều dài 50.000 cặp base, bằng khoảng 1/4 DNA của các phage T chẵn. Hầu như toàn bộ DNA của λ có mạch kép và bổ sung nhau.

Khi *E. coli* bị nhiễm λ thì DNA của phage tạo thành vòng tròn, nó có thể sao chép và bắt đầu sinh tan, hoặc có thể xen vào nhiễm sắc thể vật chủ để chuyển sang trạng thái prophage. Việc xen vào này diễn ra giống như đối với nhân tố F: có một điểm dính đặc hiệu cho λ ở trên DNA vật chủ (*λ attachment site*, viết tắt là *attλ* ). Đây là một đoạn tương đồng với đoạn trên DNA phage gọi là b2. Sau đó diễn ra trao đổi chéo giữa DNA phage và DNA vi khuẩn tại vị trí nói trên dẫn đến xen bộ gene λ vào giữa các gene *gal* (galactose) và gene *bio* (biotin) trên nhiễm sắc thể *E. coli*.




**Hình 6.16** Tải nạp chuyên biệt hay tải nạp hạn chế (restricted transduction).

*4. Lập bản đồ các đột biến bằng tải nạp*

Năm 1956 J. Lederberg đã tiến hành tải nạp gene từ nòi vi khuẩn *E. coli* K12(λ) kiểu dại tiềm tan sang nòi *E. coli* K12 không tiềm tan và có mang nhiều đột biến khuyết dưỡng. Kết quả là chỉ có gene $gal^+$, tức gene nằm kế sát điểm *attλ*, mới được phage chuyển sang thể nhận, vì vậy gọi là tải nạp đặc hiệu.

Cơ chế tải nạp đặc hiệu nêu trên hình 6.16. Bước đầu tiên là hình thành vòng bộ gene phage sai (vì ngoài bộ gene λ còn có một đoạn nhỏ nhiễm sắc thể vi khuẩn chứa gene $gal^+$ nằm trong vòng tròn). Một trao đổi chéo xảy ra tạo thành vòng DNA có chứa phần lớn bộ gene λ (chứ không phải tất cả) và một đoạn ngắn nhiễm sắc thể vi khuẩn chủ mang gene $gal^+$. DNA mạch vòng (dưới tác dụng của enzyme) chuyển thành mạch thẳng để sau này lắp ráp vào các hạt phage thế hệ con gọi là λ dg (λ defective galactose), chúng có mang gene $gal^+$ của vi khuẩn .

Phage λ *dg* có thể truyền gene $gal^+$ vào tế bào thể nhận không tiềm tan. Khi nhiễm vào tế bào đó, DNA của λ dg có thể xen vào nhiễm sắc thể thể nhận bằng trao đổi chéo diễn ra ở vùng *gal* tương đồng. Ở đây, trao đổi chéo tạo thành DNA mạch thẳng có chứa prophage khiếm khuyết (λ def, defective prophage) nằm giữa hai gene *gal* của vi khuẩn. Vì $gal^+$ là trội so với $gal^-$ nên kiểu hình là $gal^+$.

Tải nạp đặc hiệu có thể sử dụng để nghiên cứu di truyền học. Ví dụ, có thể tiến hành phép thử nghiệm bổ trợ đối với các đột biến nằm trong vùng *gal* để xác định số lượng *đơn vị chức năng* (cistron). Trên thực tế, người ta đã xác định được vùng *gal* có chứa ba cistron.

## Câu hỏi và Bài tập

1. Biến nạp là gì? Nêu và giải thích cơ chế của hiên tượng biến nạp trong các thí nghiệm của Griffith và của Avery và các cộng sự của ông.

2. Phân biệt ba kiểu tái tổ hợp ở vi khuẩn: tiếp hợp, biến nạp và tải nạp. Cho biết ý nghĩa của các kiểu tái tổ hợp di truyền này.

3. (a) Thế nào là tiếp hợp? (b) Hãy cho biết thí nghiệm chứng minh biến nạp ở *E. coli*, các đặc điểm và cơ chế của hiện tượng biến nạp đó.

4. Phân biệt tải nạp chung và tải nạp chuyên biệt.

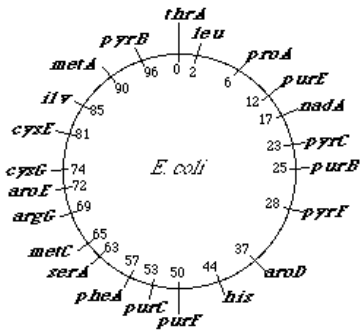
5. Thế nào là kỹ thuật ngắt quãng tiếp hợp? Giải thích và cho ví dụ ứng dụng của kỹ thuật này để lập bản đồ trật tự các gene.

6. Phân biệt các nòi $F^+$, $F^-$ và Hfr ở *E. coli.*

7. Ở các phép lai $F^+$ x $F^-$, nòi nhận $F^-$ chuyển thành nòi cho với tần số rất cao. Nhưng các phép lai Hfr x $F^-$ thì rất ít khi nòi nhận trở thành nòi cho. Tại sao?

8. Tại sao một tế bào Hfr hiếm khi truyền toàn bộ bộ gene của nó trong các thí nghiệm tiếp hợp?

10. Nòi *E. coli* KL98 chứa plasmid F xâm nhập kề sát gene $dsdA^+$ (cần cho dị hoá d-serine) nằm ở khoảng phút thứ 54 (54 min) trên nhiễm sắc thể *E. coli*. Khởi điểm được định hướng như vậy nên $dsdA^+$ được truyền sang thể nhận ngay sau khi tiếp hợp bắt đầu. Nhờ sử dụng bản đồ di truyền của *E. coli* được cho dưới đây và giả sử rằng bạn sẽ có nòi vi khuẩn thể nhận bất kỳ bạn cần đến, bằng cách nào bạn có thể phân lập được F' mang gene $dsdA^+$? [Vẽ một sơ đồ cho thấy kiểu gene phù hợp của thể cho và thể nhận, cách thức F' được tạo thành, và cách bạn làm thí nghiệm gồm cả các môi trường mà bạn sử dụng. Lưu ý rằng các đột biến ở bất kỳ gene nào được cho trên bản đồ di truyền là do hiện tượng khuyết dưỡng gây ra.]



# Tài liệu Tham khảo


**Tiếng Việt**

Phạm Thành Hổ. 2000. Di truyền học. NXB Giáo Dục.

Lê Đình Lương, Phan Cự Nhân. 1998. *Cơ sở Di truyền học*. NXB Giáo Dục, Hà Nội.

Hoàng Trọng Phán. 1993. *Di truyền phân tử* (G.trình ronéo). ĐHSP Huế.

**Tiếng Anh**

Birge EA. 1981. *Bacterial and Bacteriophage Genetics*. Springer-Verlag.

Dubnau D. 1999. DNA uptake in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol*. 53: 217-244.

Genbank entry for Plasmid F: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

GenomeAtlas for *Escherichia coli* F plasmid:

http://www.cbs.dtu.dk/services/GenomeAtlas/Bacteria/

Gordon S, Rech J, Lane D, Wright A. 2004. Kinetics of plasmid segregation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 51: 461-469.

Kimball J. 2004. http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/

Kohiyama M, Hiraga S, Matic I, Radman M. 2003. Bacterial sex: playing voyeurs 50 years later. *Science* 301: 802-803.

Lawley TD, Klimke WA, Gubbins MJ, Frost LS. 2003. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett.* 224: 1-15.

Lawley T, Wilkins B, Frost L. 2004. Bacterial conjugation in Gram negative bacteria, pp. 203-226. In B. Funnell and G. Phillips (eds.), *Plasmid Biology*. ASM Press, Washington DC.

Maloy, S. 2006. *Microbial Genetics*.

http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/genetics/

McKane L. and Kandel J. (1996): *Microbiology: Essentials & Applications*. 2nd edn. McGraw-Hill, Inc.

Mulligan, ME. 2004. http://www.balzan.it/english/

Summer D.K. (1996): *Plasmid Biology*. Blackwell Science, Oxford.

Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM. 1987. *Molecular Biology of the Gene*. 4th ed, Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, Menlo Park, CA.

Weaver RF, Hedrick PW. 1997. *Genetics*. 3rd ed, McGraw-Hill Companies, Inc. Wm.C.Browm Publishers, Dubuque, IA.

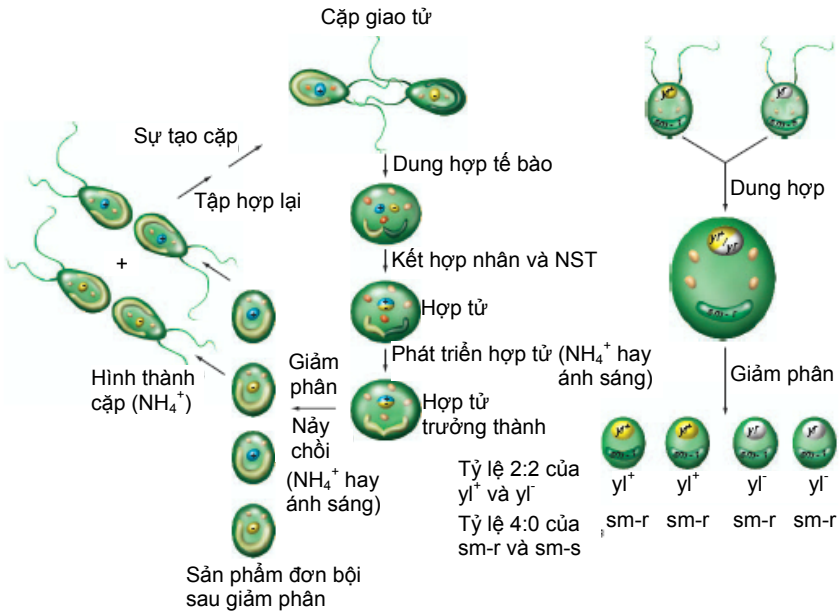
## Chương 7

# Di truyền học Vi nấm và Vi tảo

## I. Đại cương về di truyền ở một số vi tảo thông dụng

Loài vi tảo được sử dụng sớm nhất và nghiên cứu di truyền chi tiết hơn cả là *Chlamydomonas reinhardii*. Ưu thế của đối tượng này là có thể tiến hành lai và phân tích bộ bốn không xếp theo thứ tự.

Ở các loài này, các tế bào đơn bội có thể sinh sản vô tính một thời gian dài. Các tế bào đơn bội gồm 2 loại: mt (+) và mt (-) (mating type), tế bào đơn bội của mỗi loại không kết hợp với nhau. Sự kết hợp hai tế bào khác kiểu bắt cặp mt (+) với mt (-) tạo ra hợp tử. Hợp tử qua giảm phân cho tỷ lệ phân ly của một gen là 2 tế bào mt (+) : 2 tế bào mt (-).




**Hình 7.1** Gen nhân (yl) phân ly 2:2 trong quá trình tạo giao tử còn gen của lục lạp (sm) phân ly theo tỷ lệ 4:0

Trong điều kiện thí nghiệm, có thể nuôi các tế bào *Chlamydomonas reinhardii* để nhận các tế bào đồng nhất (synchronous culture), khi thay đổi chu kì 12 giờ sáng 12 giờ tối đều đặn. Theo dõi tổng hợp DNA cho thấy DNA của lục lạp tổng hợp vào giờ thứ 5-6 ngoài sáng, còn DNA của nhân tổng hợp khoảng giờ thứ 16-18, sau đó chia tế bào đồng loạt.

Một số đột biến kháng streptomycine đã được thu nhận và nhận thấy

ở một số có sự di truyền trong nhân, số khác có sự di truyền ngoài nhân.

## II. Phân tích di truyền ở vi nấm

*1. Tính không dung hợp (incompatibility) ở vi nấm*

Khái niệm tính không dung hợp ở nấm được dùng để chỉ khả năng kết hợp với nhau giữa các dòng nấm trong sinh sản hữu tính. Cho đến nay gần 450 loài nấm đã được nghiên cứu về các kiểu không dung hợp. Sự không dung hợp được xác định về mặt di truyền. Theo kiểu dung hợp thì nấm được phân làm 2 loại:

- Đồng tản (Homothallic) là khi có sự kết hợp với nhau giữa các tế bào (hay hệ sợi tơ – mycellium) giống nhau trong sinh sản hữu tính. Ví dụ, tế bào a kết hợp với tế bào a, hay $\alpha$ với $\alpha$ tạo dạng lưỡng bội 2n tương ứng aa hay $\alpha\alpha$.

- Dị tản (Heterothallic) là kiểu khi có sự lai nhau giữa 2 loại tế bào khác nhau như a với $\alpha$ tạo dạng dị hợp tử lưỡng bội a$\alpha$. Các nấm dị tản có thể chia thành: lưỡng cực (bipolar) và tứ cực (tetrapolar).

Đại diện điển hình của nấm dị tản lưỡng cực (bipolar heterothallic) là nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Ở nấm men, sự hợp bào (cytogamy) và hợp nhân (karyogamy) chỉ xảy ra giữa các tế bào (hay nang bào tử - ascospora) có kiểu bắt cặp (matting type) khác nhau như a và $\alpha$ và các allele khác nhau của locus MAT. Do có sự tham gia của 2 allele nên gọi là lưỡng cực. Nấm mốc vàng bánh mì *Neurospora crassa* cũng thuộc kiểu không dung hợp này. Nấm rơm (*Volvariella volvacea*) và nấm mỡ (*Agaricus bisporus*) cũng thuộc loại này.

Kiểu dị tản tứ cực (tetrapola heteropolic) đặc trưng cho nhiều loại nấm đảm Bacidiomycetes mà đại diện là *Schizophyllum communae*. Nấm bào ngư (*Pleurotus*) và nấm hương (*Lentinus edodes*) thuộc kiểu không dung hợp này. Sự xác định di truyền không dung hợp ở các loài nấm này do 2 gen A và B. Mỗi gen có 2 allele hoặc nhiều hơn, thường là $A_1$, $A_2$ và $B_1$, $B_2$. Sự kết hợp giữa các dòng đơn bội chỉ tạo dạng hữu thụ có kiểu gene $A_1A_2B_1B_2$ tức bốn nhân tố khác nhau, do đó gọi là tứ cực.

Sự đa dạng của các chu trình sống và các kiểu không dung hợp ở nấm có ảnh hưởng đến các phương pháp phân tích di truyền. Ở một số nấm sinh sản hữu tính thực hiện trên cơ sở dị hợp bào (heterogamy) như ở *Neurospora crassa*. Ở những loài khác, sự sinh sản hữu tính thực hiện trên cơ sở đồng hợp bào (isogamy). Song song với sinh sản hữu tính còn có chu trình cận hữu tính hoàn toàn hay không hoàn toàn phụ thuộc vào loại nấm. Chu trình sinh sản cận hữu tính là quá trình kết hợp và tái tổ hợp gene diễn ra trong nguyên phân chứ không phải giảm phân, không có sự

thụ tinh như sinh sản hữu tính.

*2. Phân tích bộ bốn và lập bản đồ ở vi nấm*

Nấm men có nhiều đặc trưng để trở thành mô hình lý tưởng cho nghiên cứu di truyền ở eukaryote. Nấm men là một eukaryote đơn bào, chu kỳ sống chỉ khoảng 90 phút, có thể thu được nấm men với số lượng lớn khi nuôi trên môi trường đặc. Bộ gen của nấm men chứa khoảng 12 megabase với 6.000 gen phân bố trên 16 nhiễm sắc thể. Nấm men là eukaryote đầu tiên được giải mã bộ gen.

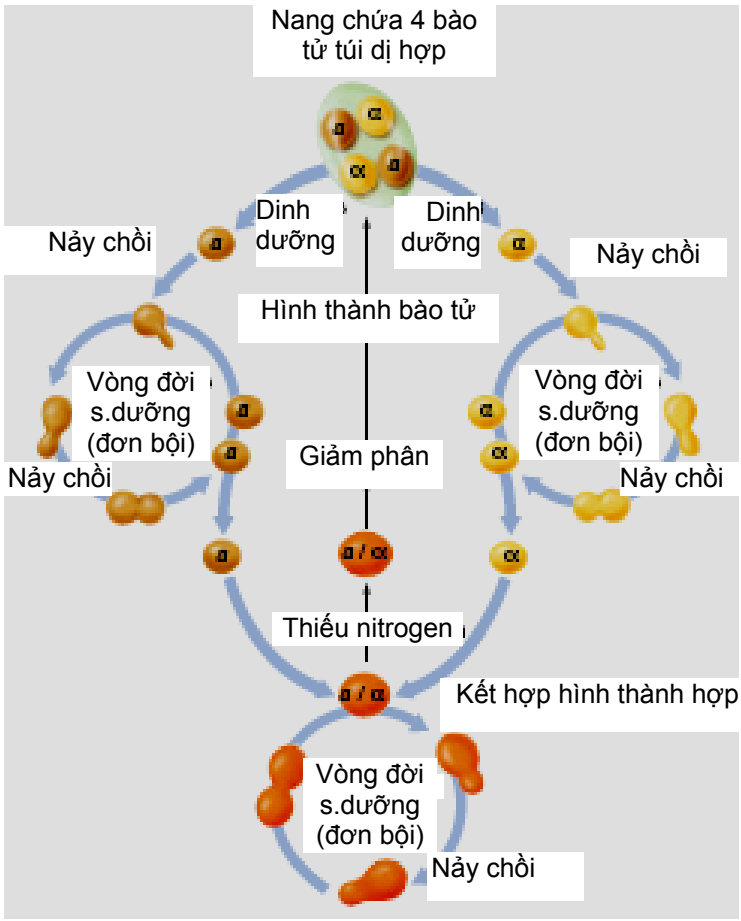
Chu trình sống của nấm men gồm hai giai đoạn có thể chuyển đổi qua lại. Tế bào có thể tồn tại ở cả dạng lưỡng bội và cả dạng đơn bội. Trong cả hai trường hợp, tế bào mẹ tạo chồi giống hệt nó. Những tế bào lưỡng bội này có thể tiếp tục sinh trưởng bằng mọc chồi và có thể trãi qua giảm phân tạo 4 bào tử đơn bội (haploid) trong một nang (ascus) được gọi là tetrad. Bào tử đơn bội (haploid spore) của kiểu kết cặp khác nhau (a với $\alpha$) sẽ qua thụ tinh tạo thể lưỡng bội. Những bào tử của kiểu kết cặp giống nhau sẽ tiếp tục sinh trưởng bằng nẩy chồi.

Nấm men được xem là *E. coli* của các tế bào eukaryote, có thể sử dụng nấm men để phân tích đột biến. Tế bào nấm men đơn bội được gây đột biến bằng tia X, sau đó sàng lọc các kiểu hình đột biến trên môi trường nuôi cấy. Đầu tiên nuôi cấy tế bào nấm men trên môi trường giàu dinh dưỡng để tất cả các tế bào phát triển. Đĩa nuôi cấy này sau đó được nhân lên qua đĩa sao chép chứa môi trường chọn lọc hoặc điều kiện sinh trưởng đặc biệt. Chẳng hạn, các đột biến nhạy cảm nhiệt độ có thể sinh trưởng trên các đĩa gốc nhưng lại không sinh trưởng trên các đĩa sao chép ở nhiệt độ giới hạn. So sánh các khuẩn lạc ở đĩa gốc với đĩa sao chép sẽ phát hiện được những đột biến nhạy cảm với nhiệt độ.

Lớp nang khuẩn (Ascomycetes) có đặc điểm là khi các tế bào lưỡng bội phân chia giảm nhiễm sẽ tạo ra các bào tử nằm trong một vỏ bao được gọi là nang (ascus). Các cơ thể này có các đặc điểm thuận lợi cho phân tích di truyền:

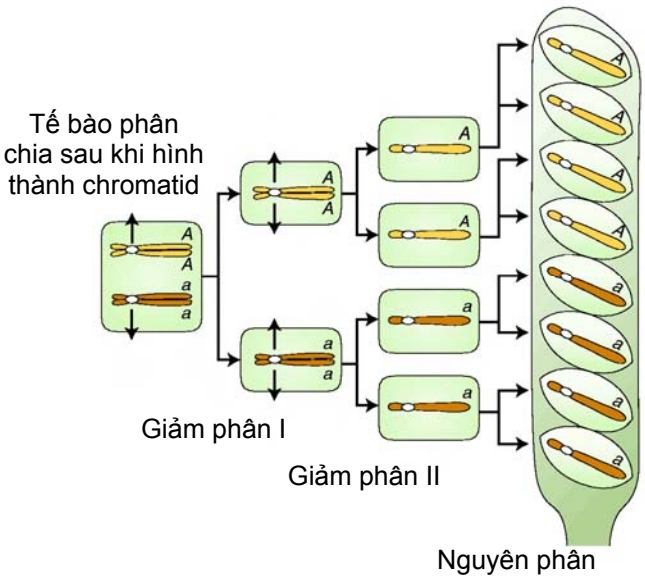
Các vi nấm có thể tồn tại ở dạng đơn bội, nên tất cả các gene có thể biểu hiện trực tiếp thành kiểu hình.

Các vi nấm này có thể tạo ra số lượng cá thể lớn ở thế hệ sau nên có thể phát hiện các sự kiện di truyền hiếm và có thể ước lượng được tần số tái tổ hợp một cách chính xác.




**Hình 7.2** Chu trình sống của nấm men.
Tế bào nấm men có thể sống ở dạng sinh dưỡng đơn bội hay dị bội. Tín hiệu chuyển từ đơn bội sang dị bội xuất hiện theo dạng kết hợp và tín hiệu chuyển từ dị bội sang đơn bội là sự giảm phân trong quá trình hình thành bào tử.

Trong chu trình sống, chỉ có hợp tử là lưỡng bội, sẽ trải qua giảm phân ngay sau khi được tạo thành, tạo các bào tử đơn bội, bào tử nẩy mầm hình thành giai đoạn cây. Ở một số loài các bộ bốn tạo thành trải qua một lần phân chia nguyên nhiễm nữa để tạo ra từng cặp gồm hai bào tử giống hệt nhau. Ở mốc vàng cam bánh mì (*N. crassa*), các bào tử xếp thẳng hàng trong nang theo một trật tự xác định liên quan trực tiếp đến tiến trình của giảm phân (hình 7.3). Hầu hết các loại nấm mốc khác, sản phẩm của giảm phân không sắp xếp theo một trật tự đặc biệt trong nang như mốc bánh mì.




**Hình 7.3** Mốc vàng cam bánh mì (*Neurospora crassa*) là mô hình nghiên cứu phân li trong giảm phân

- Lập bản đồ di truyền bằng phân tích bộ bốn

Đối với trường hợp bộ bốn không theo thứ tự:

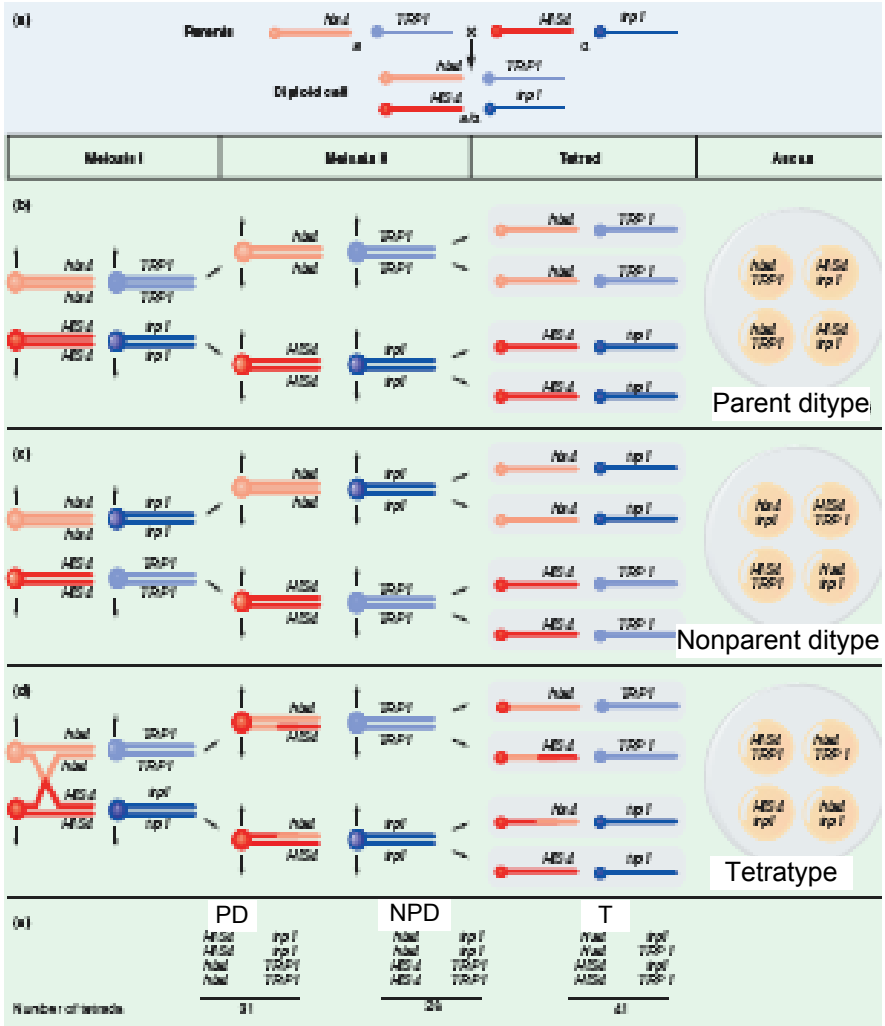
Ví dụ: khi lai các tổ hợp của hai gene AB × ab. Sự thụ tinh cho nhân lưỡng bội AB/ab và nó chia giảm nhiễm ngay.

Nếu không có trao đổi chéo xảy ra hoặc trao đổi chéo đôi xảy ra trên cùng hai chromatid thì sẽ có bộ bốn: 2 AB : 2ab, gọi là kiểu đôi cha mẹ (parental ditype – PD).

Nếu trao đổi chéo xảy ra trên cả bốn chromatid của mỗi cặp nhiễm sắc thể kép, sẽ có 2AB : 2aB, gọi là bộ bốn kiểu đôi không cha mẹ (Nonparental ditype – NPD) hay còn gọi là kiểu đôi tái tổ hợp (Reconbinational ditype – RD)

Trường hợp tạo ra mỗi nang bốn loại bào tử có kiểu gene khác nhau: 1AB : 1Ab : 1aB : 1ab được gọi là kiểu bốn (tetratype)

Phân tích bộ bốn cho phép xác định hai gene liên kết. Khi hai gene không liên kết thì tần số bộ bốn kiểu đôi bố mẹ và kiểu đôi không bố mệ bằng nhau (PD = NPD). Ngược lại khi hai gene liên kết, kiểu PD có tần số lớn hơn kiểu NPD. Tần số tương đối của các kiểu bộ bốn khác nhau được sử dụng để xác định bản đồ khoảng cách giữa hai gene liên kết.




**Hình 7.4** Phân tích bộ bốn

*3. Phân tích di truyền trong chu trình cận hữu tính (tái tổ hợp trong nguyên phân)*

Nhiều loại nấm có sợi dinh dưỡng kết hợp với nhau, làm cho các nhân đơn bội từ các dòng cùng ở chung trong tế bào chất. Các thể dị nhân (heterocaryon) được tạo nên có thể tồn tại lâu dài như ở *N. crassa*. Sự tạo thành các thể dị nhân được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu sự tương tác giữa các gene, giữa các allele và giữa các gene của nhân với tế bào chất. Trong một số trường hợp, sự so sánh các dị hợp tử và dị nhân cho thấy sự khác nhau trong tương tác giữa các allele, có lẽ do:

- Tỷ lệ số lượng nhân và tương ứng các allele trong thể dị nhân có thể

khác nhau

- Các allele của các gene ở một nhân không được ngăn cách như ở giữa các thể dị nhân.

Các nhân ở thể dị nhân đôi khi hợp nhau tạo nên đoạn lưỡng bội. Hơn nữa trong quá trình chia nguyên phân tiếp theo, nhân lưỡng bội có thể chịu tác động của hai quá trình: đơn bội hoá hoặc tái tổ hợp nguyên phân.

3.1. Sự đơn bội hoá (Haploidisation)

Sự đơn bội hoá có thể xảy ra ngẫu nhiên hoặc được gây tạo bởi chất n-fluorphenylalanin.

Nếu như các nhân trong nhiều nguyên phân bị 1 nhiễm sắc thể (2n – 1) thì nhân lệch bội vừa xuất hiện trở nên không ổn định và tiếp tục mất các nhiễm sắc thể khác của một bộ đơn bội, cho đến khi trở thành nhân đơn bội (n) ổn định. Trong quá trình đó nhiễm sắc thể bị mất độc lập nhau, các gene của cùng một nhiễm sắc thể có sự liên kết hoàn toàn. Dựa vào đặc điểm này có thể xác lập sự liên kết dựa vào gene đánh dấu trên mỗi nhiễm sắc thể.

3.2. Tái tổ hợp trong nguyên phân (Mitotic recombination)

Tái tổ hợp trong nguyên phân là hiện tượng thường gặp ở nhiều sinh vật, khi xảy ra trao đổi chéo giữa các nhiễm sắc thể tương đồng trong nguyên phân.

Trong trường hợp này khoảng cách của gene đánh dấu xa tâm động nhất, sự đồng hợp tử hoá thường xảy ra hơn cả (được coi là 100%) và sự phân bố các gene được tính theo công thức:

$$D = Nab/Nb \times 100\%$$

D: khoảng cách của gene đến tâm động

Nb - tổng số các dạng phân li, đồng hợp tử theo b.

Nab - số các dạng phân li đồng hợp cả a và b, nếu như b là gene đánh dấu xa tâm động nhất.

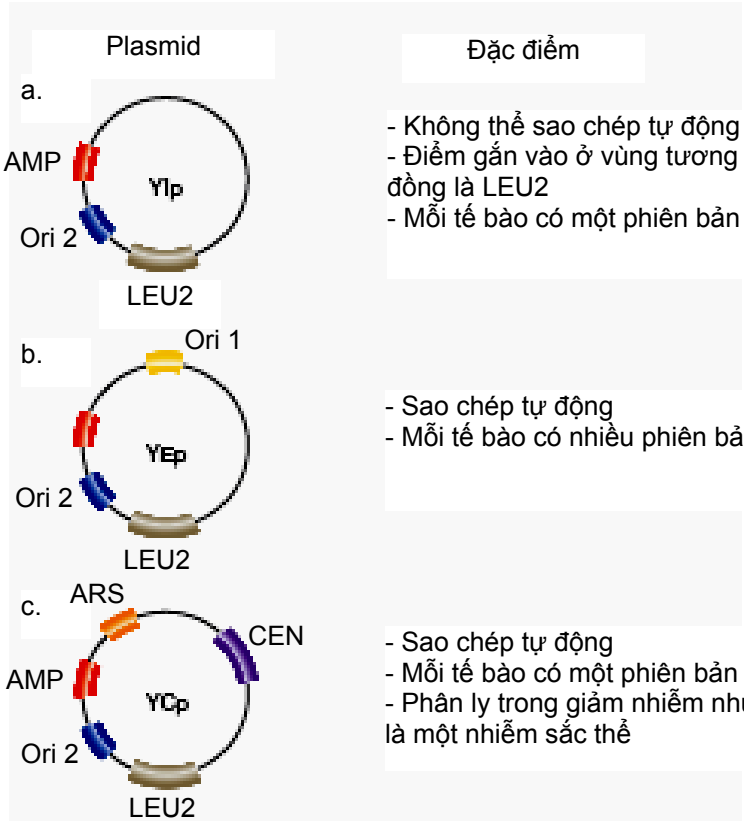
Bản đồ liên kết gene được xây dựng bằng tái tổ hợp giảm phân và tái tổ hợp nguyên phân (trong chu trình cận hữu tính) có thứ tự gene xếp giống nhau ở *Aspergillus nidulans*.

## III. Nấm men như là *E. coli* của các tế bào eukaryote

*1. Các nhiễm sắc thể nấm men nhân tạo (YAC)*

Để xây dựng nhiễm sắc thể nhân tạo có chức năng như một phần bộ gene của tế bào, để đảm bảo sự phân chia của nhiễm sắc thể cần có tâm động (centromere). Thứ hai, phần đầu mút của nhiễm sắc thể thẳng dài

được giữ nguyên vẹn khi đưa vào tế bào, tránh được sự phân giải của nuclease nhờ đoạn trình tự DNA lặp lại đặc biệt và phức hợp protein bao đầu nhiễm sắc thể là telomere. Cuối cùng, DNA phải sao chép trước khi tế bào phân chia vì vậy để nhiễm sắc thể nhân tạo sao chép phải có ít nhất một điểm xuất phát sao chép.



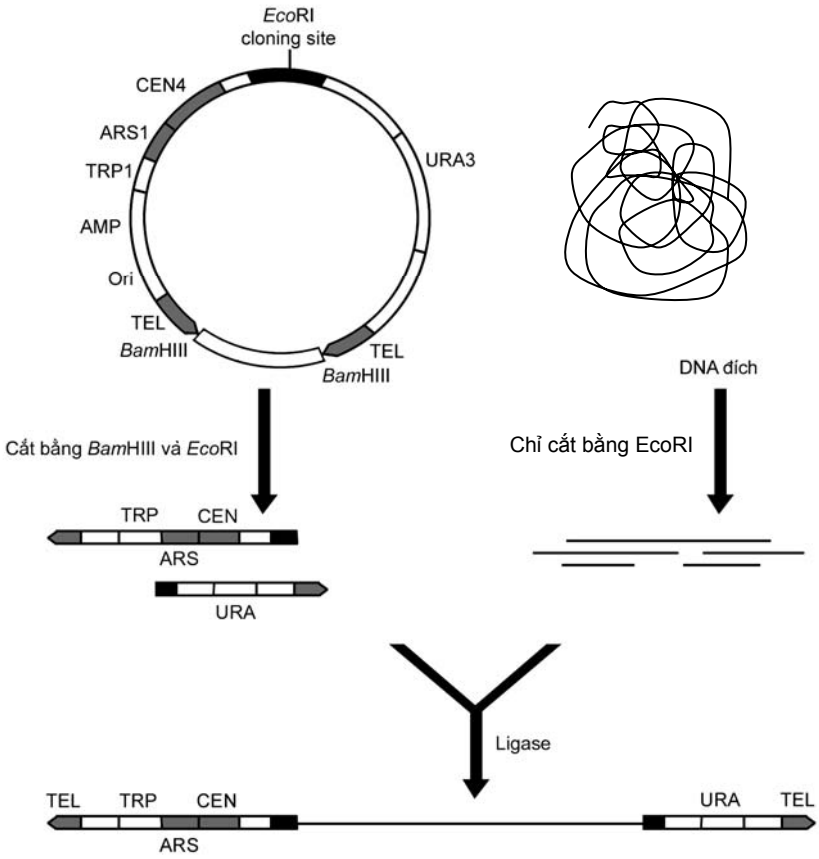

**Hình 7.5** Plasmid của nấm men
a. YIp: không chứa ori và không thể sao chép tự động
b. YEp: chứa điểm ori 1 và sao chép tự động
c. YCp: chứa tâm động và phân ly trong quá trình giảm phân
LEU2: gen nấm men, Ori 1: xuất phát sao chép của plasmid nấm men, Ori 2: xuất phát sao chép của vi khuẩn, AMP: gen kháng kháng sinh của vi khuẩn

Vào những năm 1980, các nhà di truyền học phân tử đã đưa ra 3 yếu tố chìa khóa cho một nhiễm sắc thể: centromere, telomere và điểm xuất phát sao chép và sử dụng vật liệu từ tế bào nấm men là plasmid để cấu tạo nhiễm sắc thể nấm men nhân tạo.

Cho đến nay, ở eukaryote chỉ tìm được một loại plasmid duy nhất đó là plasmid vòng tròn 2 μm dài khoảng 6300 cặp base có nhiều trong tế bào

nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Sự cải tiến plasmid này qua nhiều bước tạo thành nhiễm sắc thể nhân tạo ở nấm men, gọi là YAC (yeast artificial chromosome), có chứa các trình tự nucleotide quan trọng:

ARS (autonomously replicating sequence): trình tự sao chép tương tự ori ở plasmid. CEN (centromere): trình tự của tâm động, đảm bảo sự chia đôi và đi về 2 cực của tế bào như tâm động. 2 TEL (telomere): hai trình tự duy trì hai đầu mút nhiễm sắc thể thẳng mà không bị cắt, vẫn sao chép và phân chia




**Hình 7.6** NST nhân tạo của nấm men

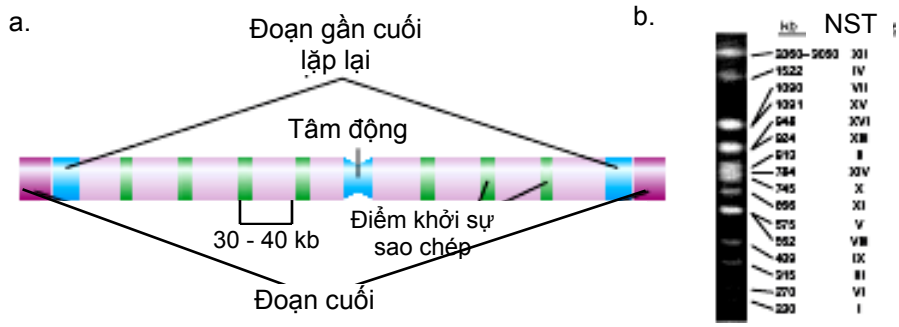
TEL: telomere của nấm men, ARS 1: trình tự sao chép tự động, CEN 4: tâm động của NST, URA 3 và TRP 1: các gen marker của nấm men, Amp: gen kháng Ampicillin của pBR322, ori: điểm xuất phát sao chép của pBR322.

*2. Những hiểu biết mới về tổ chức của các nhiễm sắc thể của nấm men*

Nấm men là cơ thể eukaryote đơn bào, bộ máy di truyền của nó giống với tế bào của cơ thể bậc cao. Các điểm xuất phát sao chép, tâm

động và telomere được xác định là một đoạn DNA nhỏ, tự do. Tế bào nấm men đơn bội có 16 nhiễm sắc thể trong nhân, xếp thành dãy có chiều dài khoảng 235.000 đến hơn 2 triệu bp. Tất cả có cấu trúc theo cùng bản đồ chi tiết. Mỗi nhiễm sắc thể chứa một tâm động. Hai đầu nhiễm sắc thể chứa đoạn lặp lại dài theo sau trình tự telomere ngắn. Trên nhiễm sắc thể có chứa nhiều điểm xuất phát sao chép, ở cách nhau khoảng 30-40 kb. Nhiễm sắc thể nấm men cũng tạo thành các đơn vị là các nucleosome chứa lõi histon gồm $H_2A$, $H_2B$, $H_3$ và $H_4$.

Điện di trên gel với trường dao động (pulse field gel electrophoresis), tách ra những nhiễm sắc thể nguyên vẹn và lập được karyotype phân tử của nhiễm sắc thể nấm men. Dựa vào karyotype có thể quan sát được các biến đổi chủ yếu trong cấu trúc nhiễm sắc thể. Qua karyotype cho thấy, nhiễm sắc thể số I dài khoảng 235 kb là nhiễm sắc thể nấm men nhỏ nhất. Nhiễm sắc thể số XII lớn nhất với kích thước khoảng 2060 – 3060 kb, sự khác nhau về kích thước của nhiễm sắc thể này do số lượng gen của rRNA lặp lại với số lượng khác nhau, thường dao động khoảng 100 – 200 bản sao ở những chủng khác nhau. Trình tự DNA của nấm men được giải mã 100% vào tháng 4/1996.




**Hình 7.7** Nhiễm sắc thể nấm men
a. Các thành phần của NST. Mỗi sợi chứa 1 tâm động, nhiều điểm khởi sự sao chép, các đoạn gần cuối lặp lại và đoạn cuối của chuỗi DNA.
b. Hệ gen của NST nấm men trên hình ảnh điện di.

Bản đồ di truyền của nấm men được xác định bằng phân tích bộ bốn. Một đơn vị chức năng của tần số tái tổ hợp trong giảm phân khoảng 4400 cM, trung bình khoảng 3 kb/cM. Khoảng cách di truyền tỷ lệ với khoảng cách vật lý. Bản đồ di truyền của nấm men dài khác thường so với bản đồ di truyền của các nấm khác. Ví dụ: *Neurospora crassa* có cùng hàm lượng DNA như nấm men nhưng bản đồ di truyền chỉ dài khoảng 15% bản đồ di truyền của nấm men. Số lượng gene mã hoá protein của nấm men ít hơn khoảng 6 – 10 lần số lượng gene của người. Từ khi chương trình giải mã

genome nấm men hoàn thành vào năm 1996, không thể nói chính xác có bao nhiêu gene mã hoá cho protein ở nấm men. Số lượng gene mã hoá protein của nấm men khoảng 6.000 – 6.500 gene ở nấm men.

*3. Những hiểu biết mới về tái bản và phiên mã của bộ gen nấm men*

Nấm men có thể hoàn thành một chu trình sao chép và phân chia khoảng 1,4 giờ. Xuất phát điểm cho sao chép DNA của nấm men gồm nhiều điểm giống với oriC của *E. coli*. Đó là vùng giàu AT được tách ra khi có một protein khởi động gắn vào điểm kề bên. Các điểm xuất phát sao chép dài hàng ngàn đến hàng chục ngàn nucleotide. Khác với prokaryote, mỗi nhiễm sắc thể eukaryote có nhiều điểm xuất phát sao chép để quá trình sao chép genome của eukaryote có kích thước lớn hơn nhiều xảy ra một cách nhanh chóng. Có khoảng 400 điểm xuất phát sao chép phân bố trên toàn bộ 16 nhiễm sắc thể của nấm men. Sự sao chép xảy ra trực tiếp trên nhiều điểm xuất phát sao chép. Sợi mạch kép được tạo thành ở mỗi điểm xuất phát sao chép kéo dài và nối với sợi kép được tạo thành ở một điểm khác. Khi sao chép trên 2 mạch đơn hoàn thành sẽ tạo ra 2 phân tử DNA con giống hệt nhau.

Sự tổng hợp DNA chỉ xảy ra ở một giai đoạn trong chu trình tế bào, đó là pha S. Ở nấm nấm men có 3 protein cần cho lắp ráp của replisome. Đó là phức hợp DNA polymerase phối hợp hoạt động ở chẽ ba sao chép. Phức hợp nhận biết điểm xuất phát (Origin recognition complex – ORC) sẽ gắn vào trình tự xuất phát của nấm men như DnaA protein của *E. coli.* Những phức tương tự được tìm thấy ở tất cả các eukaryote. Sự có mặt của ORC làm bổ sung thêm 2 protein khác, Cdc6 và Cdt. Cả 2 protein này và ORC làm kích hoạt helicase và những thành phần khác của replisome. Sự gắn vào của helicase được xem là sự "xác nhận" (license) cho điểm xuất phát, giúp lắp ráp replisome và bắt đầu tổng hợp DNA.

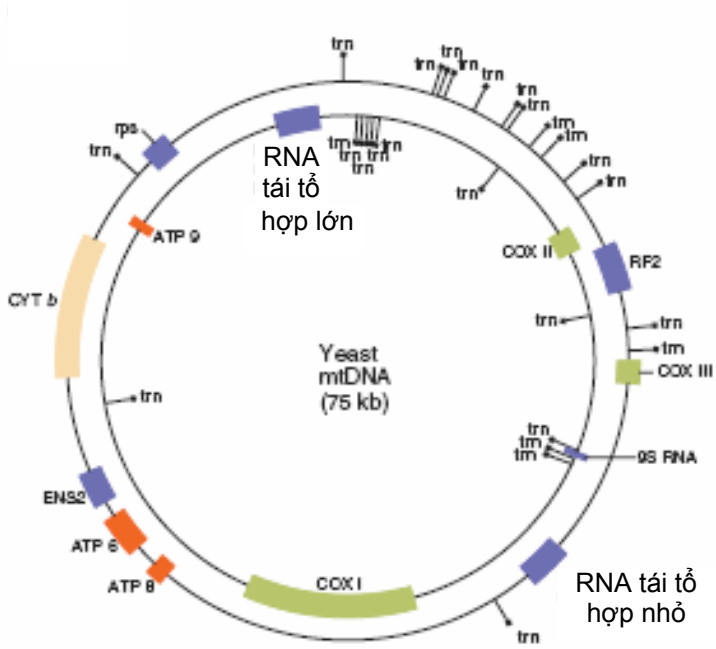
Trong số các gene mã hoá protein, intron chỉ có khoảng 4-5% tất cả các gene của nấm men (276 gene chứa một intron đơn và 7 gene chứa 2 intron riêng rẽ), kích thước trung bình của intron khoảng 2000 nucleotide. Tần số thấp của intron ở nấm men có lẽ liên quan với tần số thấp của các gene giả (pseudogene) giống như intron, phổ biến ở eukaryote bậc cao. Gene giả chứa trình tự mã hoá, nhưng vì thiếu intron và promoter phiên mã nên trình tự mã hoá không được biểu hiện.

Gene mã hoá protein không chỉ là những dạng gene chức năng. Genome của nấm men chứa số lớn gen tạo ra RNA không mã hoá, bao gồm các gene lặp lại mã hoá cho rRNA, 274 gene của tRNA, trong đó có 80 gene chứa nhóm intron đặc biệt, 71 RNA nhân nhỏ (snRNA) tham gia chức năng chế biến rRNA, 5 snRNA tham gia chế biến intron, một vài

RNA chưa biết chức năng và 3 RNA như là các tiểu đơn vị chức năng của enzyme Rnase, endoribonuclease và telomere.

*4. Những hiểu biết mới về ADN ty thể của nấm men*

DNA ty thể (mitochondrial DNA – mtDNA) nấm men dài 4 lần hơn DNA ty thể của người và những động vật khác. Hai yếu tố trên DNA ty thể nấm men được cho là có kích thước lớn hơn so với các đối tượng khác: trình tự giữa các gene (intergenic) và intron. Trình tự dài, giàu A-T của vùng đệm "spacer" tách biệt với các gene của mtDNA. Hầu hết DNA của spacer đều được dịch mã và một số trong chúng được duy trì trên mRNA như đầu 5' và 3' kéo dài, không dịch mã. Yếu tố thứ hai là intron, chiếm khoảng 25% genome ty thể nấm men và nó được xem là tạo ra sự khác nhau về kích thước giữa mt DNA của nấm men và người.




**Hình 7.8** DNA ty thể nấm men

## Câu hỏi và Bài tập

1. Hãy trình bày sự sinh sản vô tính của *Chlamydomonas reihardii*.
2. Hãy cho biết các kiểu dung hợp ở vi nấm.
3. Sự xác định giới tính ở vi nâm như thế nào? Cho ví dụ.
4. Các kiểu bộ bốn nào được tạo ra do dòng nấm men lưỡng bội có kiểu

gene AB/ab, nếu A và B liên kết hoàn toàn?

5. Trong 100 chu trình giảm nhiễm của *Neurospora* theo cách bình thường có bao nhiêu bào tử được tạo thành?
6. Ý nghĩa của phân tích bộ bốn trong nghiên cứu di truyền.
7. Trình bày cấu tạo NST nhân tạo nấm men và ứng dụng của chúng.
8. Một chủng kháng kháng sinh của nấm men được phân lập, cho kết cặp với một chủng hoang dại nhạy cảm với kháng sinh tạo thể lưỡng bội. Sau khi sinh sản một vài thế hệ, chúng được kích thích để sinh bào tử. Kết quả thu được bộ bốn nguyên phân chứa 8 bào tử gồm 4 bào tử kháng kháng sinh và 4 bào tử nhạy cảm kháng sinh. Hãy kết luận về sự di truyền của tính kháng kháng sinh.

## Tài liệu Tham khảo

1. Phạm Thành Hổ. 2000. Di truyền học. NXB Giáo Dục.

2. Lê Đình Lương, Phan Cự Nhân (1998). Cơ sở di truyền học. NXB GD.

3. Hoàng Trọng Phán. 1995. Di truyền học phân tử. Trung tâm Đào tạo Từ xa, Đại học Huế

4. Anthony J. F. Griffiths, Susan R. Wessler, Richard C. Lewontin, William M. Gelbart, David T. Suzuki, Jeffrey H. Miller. 2004. An introduction to genetics analysis. W.H. Freeman Publishers.

5. Cann AJ. 2001. Priciple of molecular virolory. Academic Press. London, UK.

6. Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. 2000. Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. ASM Press, Washington DC. Printed in the United States of America.

7. Harlt D.L., Jones E.W. 1998. Genetics - Principle and analysis. Jone and Bartlett Publshers, Toronto, Canada.

8. Hartwell et al. 2003. Genetics: From genes to genomes, Second editor. The McGraw-Hill Companies.

9. Old RW & Primrose SB. 1989. Principles of gene manipulation. Blackwell Scientific Publication.

10. Stansfield W.D. 1991. Schaum's outline of theory and problems of genetics. McGraw-Hill, Companies, Inc., United States of America.

11. Watson D.J, Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R. 2004. Molecular biology of the gene. Benjamine Cummings, San Francisco, United States of America.

## Chương 8

# Di truyền Vi sinh vật và Công nghệ Gene

Các nghiên cứu của di truyền vi sinh vật về các enzyme giới hạn và plasmid cũng như việc sử dụng chúng để tạo ra các phân tử DNA tái tổ hợp đầu tiên trong ống nghiệm (*in vitro*) trong những năm đầu của thập niên 1970 là cơ sở cho sự ra đời của công nhgệ sinh học hiện đại: *kỹ thuật di truyền* (genetic engineering) - *công nghệ DNA tái tổ hợp* (recombinant DNA technology). Sự ra đời và phát triển nhanh chóng của lĩnh vực này không những đã đưa lại sự hiểu biết sâu sắc về cấu trúc và các cơ chế hoạt động của các gene và bộ gene mà còn trở thành lực lượng sản xuất trực tiếp của xã hội, góp phần giải quyết những vấn đề thực tiễn đặt ra trong y-dược học, nông nghiệp và môi trường.

Trong chương này chúng ta sẽ tìm hiểu: (i) Các công cụ thiết yếu của kỹ thuật di truyền; (ii) Các phương pháp cơ bản của việc xây dựng DNA tái tổ hợp *in vitro*; (iii) Tạo dòng gene ở vi khuẩn; (i) Phóng thích ra môi trường các sinh vật được biến đổi gene; (vi) Sử dụng các vi sinh vật để chuyển gene vào các thực vật và động vật; (vi) Tạo giống vi sinh vật mới bằng kỹ thuật di truyền và một số ứng dụng khác của kỹ thuật di truyền.

## I. Các công cụ thiết yếu của kỹ thuật di truyền

*1. Các enzyme cắt giới hạn và một số enzyme khác*

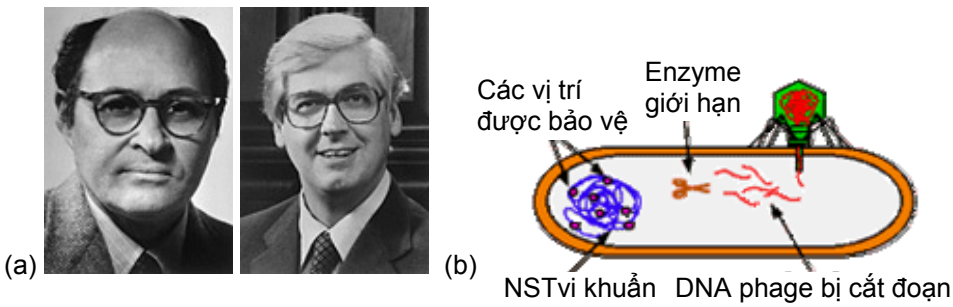
1.1. Các enzyme cắt giới hạn *(restriction endonuclease)*

Từ 1953 người ta đã phát hiện thấy rằng, khi đưa DNA của một nòi vi khuẩn *E. coli* này vào tế bào thuộc một nòi khác thường thì DNA được đưa vào, gọi là DNA ngoại lai hay DNA lạ, mất hẳn hoạt tính di truyền và hầu như bao giờ cũng bị phân cắt thành các đoạn ngắn. Chỉ trong một số ít trường hợp DNA lạ đó mới không bị phân cắt và do đó nó có thể tái bản trong tế bào chủ. Điều đó chứng tỏ DNA lạ được sửa đổi bằng cách nào đó dưới sự kiểm soát của tế bào chủ. Các hiện tượng nói trên xảy ra chủ yếu khi các phage lây nhiễm các tế bào vi khuẩn.

Công trình nghiên cứu đầu tiên xác nhận các tế bào vi khuẩn là những hệ thống chứa các enzyme sửa đổi và enzyme cắt giới hạn thuộc về Daniel Nathan và Hamilton Smith năm 1969 ở *Haemophilus influenzae* (giải Nobel năm 1978; Hình 8.2). Đây là một trong những khám phá đầu tiên cho phép phát triển công nghệ DNA tái tổ hợp. Các enzyme này đều có đối tượng nhận biết là các đoạn trình tự của DNA vật chủ và DNA ngoại lai, nhưng có vai trò khác nhau. Các *enzyme sửa đổi* (methylase) đóng vai

trò bảo vệ DNA vật chủ bằng cách gắn thêm nhóm methyl ở một số base nhất định trong *đoạn nhận biết* hay *đoạn đích* (recognition/ target sequence). Trong khi các *enzyme giới hạn* lại đóng vai trò vô hiệu hoá hoạt tính của các DNA lạ bằng cách phân cắt ở các vị trí đặc thù chừng nào nó chưa được sửa đổi cho giống với DNA vật chủ.

Như vậy, *enzyme cắt giới hạn là các enzyme đặc thù của vi khuẩn có khả năng nhận biết và cắt DNA sợi kép tại các vị trí đặc thù, và được coi là hàng rào bảo vệ tự nhiên của các vi khuẩn chống lại sự xâm nhập của các phage lạ hoặc DNA ngoại lai* (Hình 8.1).




**Hình 8.1** (a) D.Nathan (trái) và H.Smith. (b) Enzyme giới hạn cắt vụn DNA của phage lạ khi nó xâm nhập vào tế bào vi khuẩn.

* Tính chất của các enzyme giới hạn

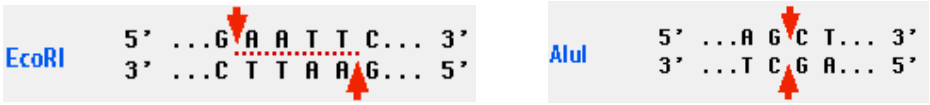
Các enzyme giới hạn chỉ phát hiện được ở các vi khuẩn mà không có ở các eukaryote. Vì vậy, tên gọi của các enzyme giới hạn được biểu thị bằng ba hoặc bốn chữ cái viết tắt của vi khuẩn mà từ đó enzyme được chiết xuất. Chữ cái đầu tiên được viết hoa để chỉ *chi* (genus) và hai chữ cái tiếp theo viết thường để chỉ *loài* (species), và nếu cần thêm chữ cái thứ tư để chỉ *nòi* hoặc *chủng* (strain, type). Ngoài ra, để phân biệt các enzyme của cùng một nòi dùng thêm số La Mã kèm theo sau (xem Bảng 8.1).

Tính chất quan trọng nhất của các enzyme giới hạn là *tính đặc hiệu vị trí* (specificity), nghĩa là chúng có thể nhận biết đoạn trình tự DNA đặc thù để cắt ở vị trí xác định. Tuỳ theo vị trí cắt so với đoạn nhận biết mà chia ra hai loại chính: loại I bao gồm các enzyme giới hạn cắt bên ngoài phạm vi đoạn nhận biết và loại II bao gồm các enzyme cắt đặc hiệu bên trong đoạn nhận biết. Ở đây chúng ta chỉ xét các enzyme giới hạn loại II vốn được xem là công cụ thiết yếu cho phép thao tác các gene trong kỹ thuật DNA tái tổ hợp (hình 8.2).

Đặc trưng nổi bật của các đoạn đích là có kích thước ngắn 4-8 cặp base và có tính *đối xứng xuôi ngược* (palindrome).

Các enzyme giới hạn khác nhau có hai kiểu cắt: cắt lệch và cắt thẳng.

Với kiểu cắt lệch, tạo ra các đoạn DNA có các đầu sợi đơn gồm một số base bổ sung gọi là các *đầu dính* (cohesive/sticky ends); ví dụ BamHI, HindIII và EcoRI. Với kiểu cắt thẳng, tức cắt cùng vị trí trên cả hai sợi của DNA sợi kép, tạo ra các đoạn DNA có các *đầu bằng* (blunt ends); ví dụ AluI, Hind II và SmaI. Các enzyme giới hạn này, đặc biệt là loại đầu, có vai trò to lớn trong việc xây dựng các phân tử DNA tái tổ hợp *in vitro* (Hình 8.2). Tất cả các đặc tính trên có thể minh hoạ ở sơ đồ sau:




Ngoài ra, các enzyme giới hạn có đoạn đích giống nhau mặc dù vị trí và kiểu cắt có thể giống hoặc khác nhau, được gọi là *các enzyme giới hạn tương ứng* (isoschizomers); ví dụ, SmaI và XmaI (Bảng 8.1).

***Bảng 8.1*** *Các trình tự nhận biết và vị trí cắt của các enzyme giới hạn được chọn lọc* (mũi tên chỉ vị trí cắt; các trình tự ở đây được chỉ ra trên sợi 5'→3')

| Nguồn vi sinh vật | Tên enzyme | Trình tự nhận biết |
|---|---|---|
| *Arthrobacter luteus* | AluI | AG↓CT |
| *Bacillus amyloliquefaciens* H | BamHI | G↓GATCC |
| *Escherichia coli* RY13 | EcoRI | G↓AATTC |
| *Haemophilus influenzae* Rd | HindII | GTPy↓PuAC |
| *Haemophilus influenzae* Rd | HindIII | A↓AGCTT |
| *Nocardia otitidis-caviarum* | NotI | GC↓GGCCGC |
| *Providencia stuartii* | PstI | CTGCA↓G |
| *Serratia marcescens* | SmaI | CCC↓GGG |
| *Xanthomonas malvaccarum* | XmaI | C↓CCGGG |

1.2. Một số enzyme khác thường dùng trong kỹ thuật di truyền

Bên cạnh các enzyme giới hạn là các enzyme chủ chốt trong lĩnh vực công nghệ DNA tái tổ hợp nói trên, còn có nhiều enzyme khác. Tựu trung có ba nhóm chính:

(i) *Các DNA polymerase và RNA polymerase, kể cả các enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase):* được sử dụng khi cần tạo ra một số lượng lớn các bản sao của các nucleic acid. Chẳng hạn, tạo các vật dò (probe), xác định trình tự nucleotide, tổng hợp mồi, oligonucleotide và DNA bằng PCR hoặc các cDNA và các gene từ các RNA, ...

(ii) *Các ligase* xúc tác các phản ứng nối các đầu 3' và 5' của các đoạn DNA sợi đơn (*DNA ligase*) hoặc các đoạn RNA (*RNA ligase*), được sử dụng trong kiến tạo DNA tái tổ hợp và tạo dòng nói chung. Đó là các DNA ligase của *E. coli*; các DNA ligase, RNA ligase và *polynucleotide kinase* của phage T4; ...

(iii) *Các nuclease* thuộc nhóm các enzyme phân cắt DNA (DNase) hoặc RNA (RNase) một cách không đặc thù như các enzyme giới hạn đã nói ở trên. Nhóm này bao gồm các enzyme *DNase I* tạo các "vết nứt" (nick) trên DNA trong kỹ thuật đánh dấu mẫu dò, phát hiện các gene trong chất nhiễm sắc; các *nuclease S1* có khả năng cắt DNA sợi đơn nên được dùng để loại bỏ các vòng trong tổng hợp cDNA hoặc để tách bỏ các đầu mút sợi đơn so le trong các DNA; các *exonuclease III* của *E. coli* có hoạt tính exonuclease 3' → 5' được dùng để tạo các cấu trúc sợi đơn ở một số vùng trên phân tử DNA hoặc gây các đột biến mất đoạn tại các vùng đặc biệt khi phối hợp với nuclease S1...

*2. Các vector*

*DNA tái tổ hợp* (recombinant DNA) là phân tử DNA được tạo ra trong ống nghiệm bằng cách kết hợp các DNA từ các nguồn (loài) khác nhau, theo một quy trình kỹ thuật nhất định, gọi là kỹ thuật tái tổ hợp DNA.

Thông thường một phân tử DNA tái tổ hợp bao gồm một phân tử DNA có bản chất là *plasmid* hoặc *phage* nguyên vẹn gọi là *vector* (thể tải) và một đoạn DNA từ nguồn khác mang một gene hoặc yếu tố điều hòa mong muốn được cho xen vào; nó được gọi là *DNA ngoại lai* (foreign DNA).

Vector là phân tử DNA có kích thước bé hoặc vừa phải, đóng vai trò là vật trung gian mang truyền đoạn DNA ngoại lai nghiên cứu vào trong tế bào thể nhận (tế bào khả biến) bằng con đường *biến nạp* (transformation) hoặc *tải nạp* (transduction).

Có hai loại vector thông dụng là các plasmid hoặc các phage.

Trong số các phage dùng làm vector thì phage lambda (λ) có nhiều ưu thế nhất, bởi lẽ ở phần giữa của bộ gene có chứa một số gene không quan trọng và không liên quan với sự tái bản của nó, nên thuận lợi cho việc xen đoạn DNA mong muốn vào đây. Các phage không chứa các gene kháng thuốc cho nên việc theo dõi phage tái tổ hợp được xác định dựa vào các *vết tan dương tính* (positive plaques) trên nền vi khuẩn.

Các plasmid của vi khuẩn tồn tại độc lập với nhiễm sắc thể trong tế bào vi khuẩn (Hình 8.2). Chúng được sử dụng rộng rãi hơn cả, nhờ có các đặc điểm sau: (i) Mỗi plasmid là một phân tử DNA sợi kép thường ở dạng vòng và chỉ có một khởi điểm tái bản riêng; (ii) Có khả năng xâm nhập

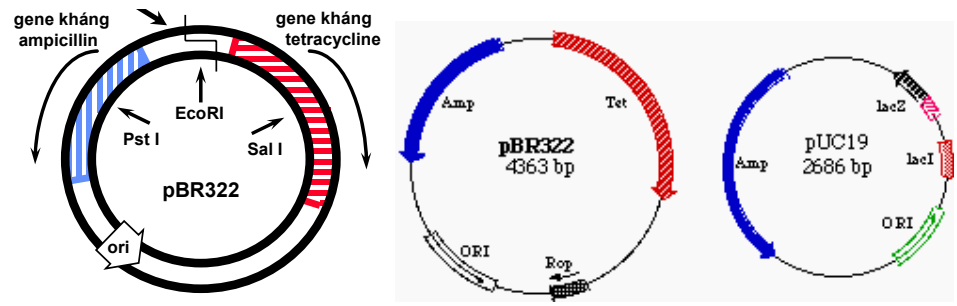
vào tế bào vật chủ và hoạt động bình thường; (iii) Có kích thước bé, thường chỉ vài ngàn cặp base nên dễ dàng tinh chiết; (iv) Số bản sao trong mỗi tế bào vi khuẩn thường khá cao; (v) Một số plasmid có chứa các gene kháng thuốc tiện lợi cho việc theo dõi và phát hiện sự có mặt của plasmid tái tổ hợp trong vi khuẩn chủ.

Nói chung, các plasmid được tái bản bởi cùng một bộ máy tái bản dùng cho nhiễm sắc thể vi khuẩn. Một số plasmid được sao chép với cùng tỷ lệ như nhiễm sắc thể vi khuẩn, vì vậy trong một tế bào chỉ có một bản sao của plasmid. Các plasmid được sao chép độc lập với nhiễm sắc thể ở một tỷ lệ cao, vì vậy một tế bào có thể có nhiều hơn 50 bản sao mỗi loại.

Các gene trên các plasmid có mặt nhiều lần thông thường được biểu hiện ở mức cao. Về bản chất, các gene này thường mã hoá cho các protein (ví dụ như các enzyme) bảo vệ vi khuẩn khỏi bị tác động của một hoặc nhiều chất kháng sinh. Và như đã đề cập ở chương 5, các plasmid đi vào các tế bào vi khuẩn tương đối dễ dàng. Điều này xảy ra trong tự nhiên và có thể lý giải cho phạm vi và mức độ kháng các chất kháng sinh cao ở các bệnh viện và mọi nơi. Các plasmid vì vậy được sử dụng một cách hiệu quả trong các thí nghiệm biến nạp và tạo dòng ở các tế bào vi khuẩn.

Dưới đây ta hãy xét đặc điểm trúc của các plasmid vi khuẩn và một số eukaryote đơn bào thường được sử dụng trong công nghệ DNA tái tổ hợp.

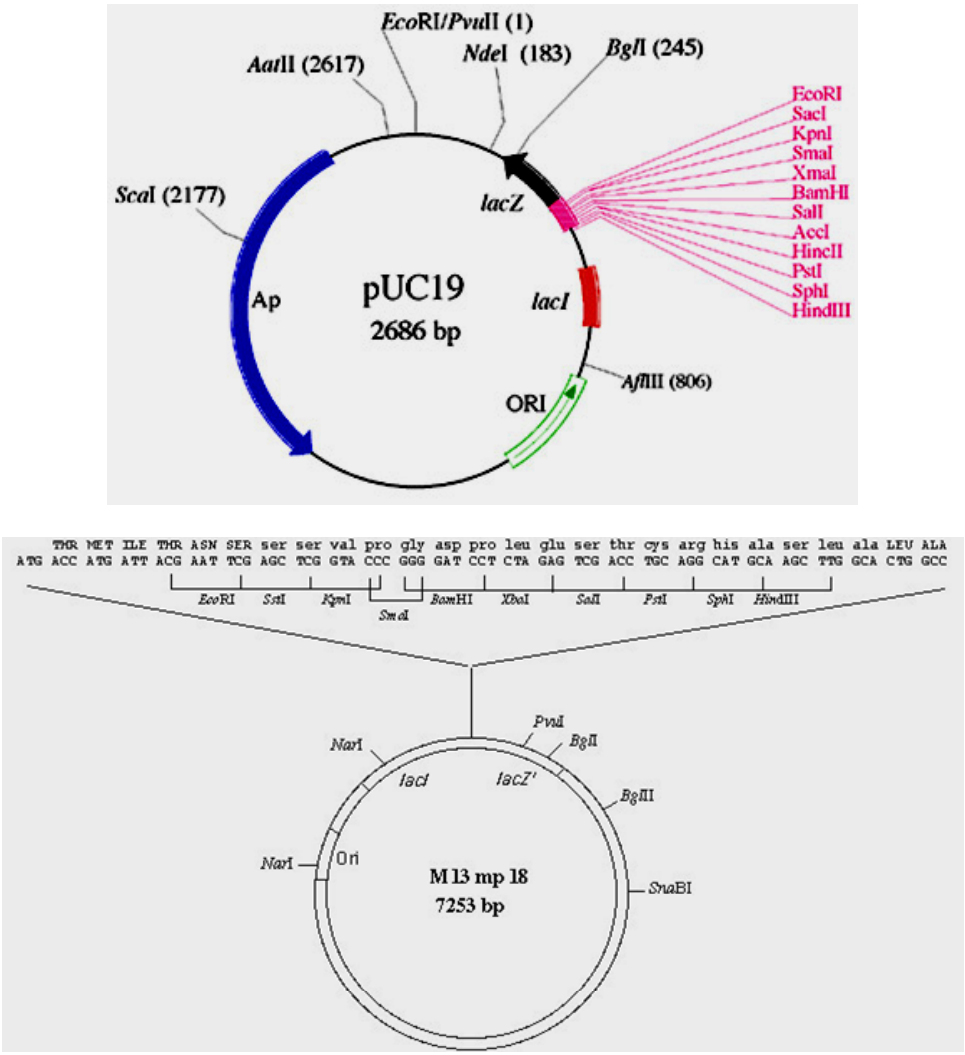
Plasmid **pUC19** được xây dựng từ **pBR322** và khởi điểm (ori) từ pBR322 bắt nguồn từ plasmid pMB9. Vùng ký hiệu ORI trên hai plasmid pBR322 và pUC19 là giống nhau, nhưng pUC19 có nhiều hơn 100 bản sao trong mỗi tế bào *E. coli* trong khi pBR322 có khoảng 20 bản sao trong mỗi tế bào (Hình 8.2).




**Hình 8.2A Các plasmid pBR322 và pUC19.** Ở đây cho thấy kích thước, khởi điểm (ORI) và các vùng chứa gene kháng ampicillin và tetracyclin (Amp, Tet) cũng như các gene của *lac* operon (ở pUC19). Hình pBR322 bên trái cho thấy vị trí cắt của một số enzyme giới hạn trong các gene kháng ampicillin và tetracyclin.

Ở hình 8.2B cho thấy cấu trúc chi tiết của các plasmid pUC19 (2.686

bp) và M13 mp 18 (7.253 bp).




**Hình 8.2B** Cấu trúc chi tiết của các plasmid pUC19 và M13 mp 18.

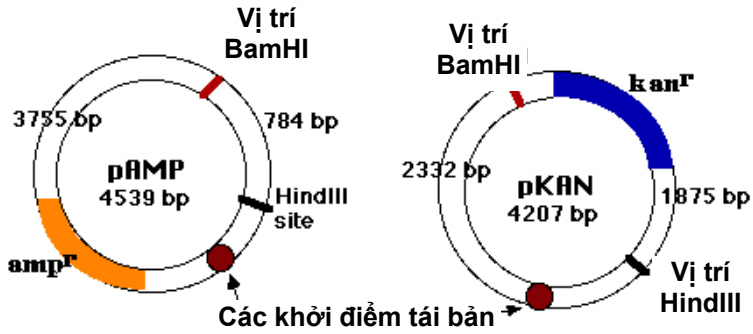
Sau đây là một số ví dụ khác về các plasmid pAMP và pKAN.

(1) Plasmid **pAMP** có kích thước 4539 bp, có một khởi điểm tái bản riêng, một gene amp$^r$ kháng ampicillin, một trình tự 5'GGATCC3' được nhận biết và cắt bởi enzyme giới hạn BamHI và một trình tự 5'AAGCTT3' cho enzyme HindIII (Hình 8.3).

Việc xử lý pAMP bằng hỗn hợp của BamHI và HindIII sẽ sinh ra cả hai đoạn có các đầu dính với đặc điểm sau: một đoạn 3755 bp mang cả gene amp$^r$ và khởi điểm tái bản và một đoạn 784 bp.

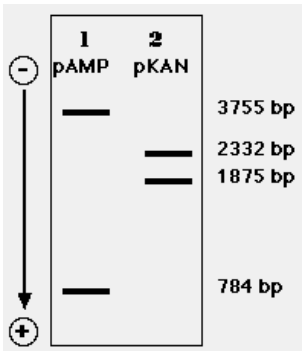
(2) Plasmid **pKAN** có 4207 bp, một *Ori* riêng, một gene kan$^r$ có khả năng kháng kanamycin, một vị trí cắt độc nhất bởi BamHI, một vị trí cắt độc nhất bởi HindIII (Hình 8.3).

Việc xử lý pKAN bằng hỗn hợp của BamHI và HindIII sẽ sinh ra cả hai đoạn có các đầu dính với đặc điểm sau: một đoạn 2332 bp và một đoạn 1875 bp với gene kan$^r$ (nhưng không có *Ori*).




**Hình 8.3** Các plasmid có chứa khởi điểm tái bản (*Ori*), các điểm cắt của một số enzyme cắt giới hạn và các gene kháng ampicillin (Amp$^R$), kanamycin (Kan$^R$).

Các đoạn này có thể quan sát được bằng cách cho hỗn hợp được phân cắt chạy điện di (electrophoresis) trong gel agarose. Do sự tích điện âm của các nhóm phosphate, DNA di chuyển về phía cực dương (anode) khi cho mẫu chạy điện di. Các đoạn càng bé sẽ di chuyển càng xa trong bản gel (Hình 8.4). Khả năng nối các đoạn DNA này trong kỹ thuật tái tổ hợp *in vitro* chúng ta sẽ xét trở lại ở phần sau.



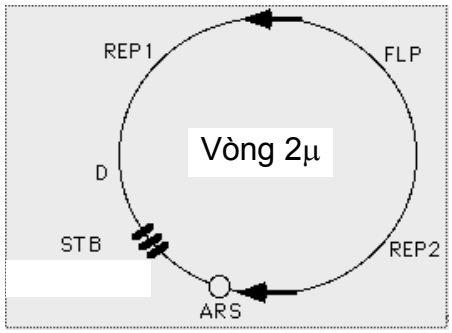

**Hình 8.4** Mẫu điện di hỗn hợp các đoạn DNA của pAMP và pKAN (được cắt bởi BamHI và HindIII) trong gel agarose.

★ *Các plasmid ở các vi sinh vật eukaryote*

Như đã biết, các plasmid không chỉ giới hạn ở các vi khẩn. Chẳng hạn, một số plasmid đã được nghiên cứu rộng rãi ở nấm men và được phát triển

thành các vector tạo dòng nấm men. Các plasmid này cũng đã được sử dụng như là một "hệ thống đơn giản" để tìm hiểu cơ chế và sự điều hoà tái bản DNA ở các tế bào eukaryote.

Một plasmid nấm men được quan tâm là vòng 2μ (2μ circle). Vòng 2μ nay là một yếu tố nhiễm sắc thể phụ, mạch vòng 6,3 kb thấy có trong nhân của hầu hết các nòi *Saccharomyces cerevisiae*. Nó không cung ứng cho tế bào mang nó bất kỳ một lợi thế rõ ràng nào, nhưng nó được duy trì ổn định ở khoảng 50 đến 100 bản sao trong mỗi bộ gene đơn bội của các tế bào nấm men. Giống như các nhiễm sắc thể vật chủ, vòng 2μ được bao bởi các nucleosome và tái bản được khởi đầu một lần trong mỗi lần phân bào bằng các enzyme tái bản của vật chủ. Khởi điểm tái bản hai hướng được bắt đầu tại một vị trí đặc thù gọi là *trình tự tái bản tự trị* ARS ("autonomous replication sequence").




**Hình 8.5** Plasmid vòng 2μ ở nấm men.

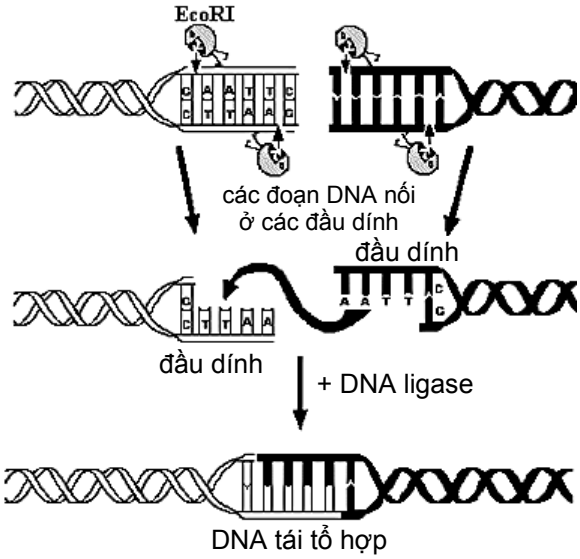
Ở hình 8.5 cho thấy vòng 2μ có chứa trình tự ARS, gene FLP, ba gene mã hoá các protein cần thiết cho điều hoà sự biểu hiện của gene FLP (REP2, REP1 và D), và một bộ các đoạn lặp nhỏ cùng chiều (gọi là "STB") cần cho sự phân chia về các tế bào con trong quá trình nguyên phân và giảm phân.

## II. Các phương pháp cơ bản của việc xây dựng DNA tái tổ hợp in vitro

*1. Phương pháp sử dụng các đầu dính*

Bất kỳ đoạn DNA nào nếu được cắt bởi cùng một loại enzyme giới hạn (ví dụ, *EcoRI*) cho các đầu dính thì có thể dính líp lại với nhau và được nối bởi DNA ligase (hình 8.6). Phương pháp thành lập phân tử DNA tái tổ hợp kiểu này lần đầu tiên được đưa ra bởi J.Mert và R.Davis năm 1972 bằng thực nghiệm trên các virus. Và sau đó, lần đầu tiên năm 1973, H.Boyer và nhóm nghiên cứu của S.Cohen đã tạo ra được phân tử DNA tái tổ hợp gồm vector là plasmid nhỏ pSC101 của *E. coli* và DNA "ngoại

lai" là một plasmid khác. Chính sự kiện này đã đặt nền móng và mở ra triển vọng to lớn cho kỹ thuật DNA tái tổ hợp sau này.



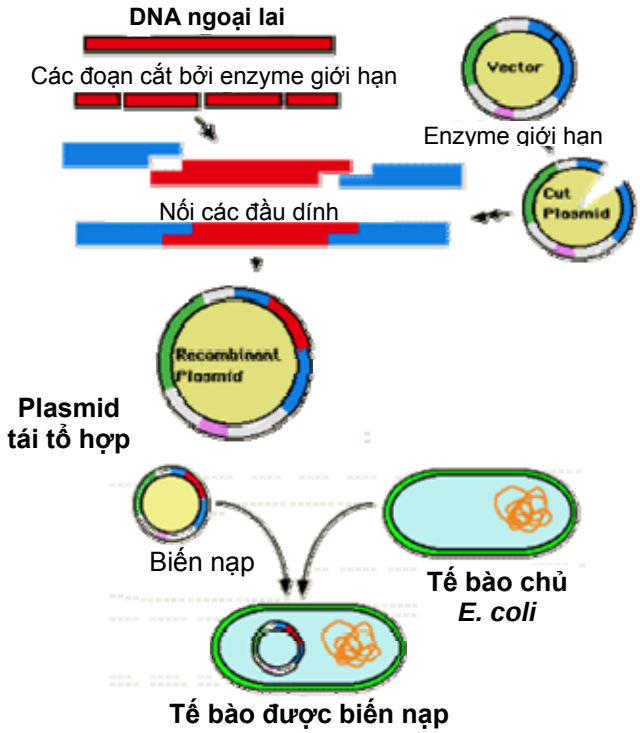

**Hình 8.6** Hai phân tử DNA khác nhau được cắt bởi cùng một enzyme giới hạn EcoRI tạo ra các đầu dính bổ sung nhau, bằng cách đó có thể khâu nối thành phân tử DNA tái tổ hợp *in vitro* nhờ xử lý với DNA ligase.

*2. Phương pháp nối trực tiếp hoặc tổng hợp các đầu bổ sung*

Đối với các đoạn DNA được tạo ra bằng cách xử lý enzyme giới hạn cắt thẳng như HindII chẳnghạn, thì việc nối các đoạn DNA có đầu bằng được tạo ra có thể thực hiện theo hai cách sau: Nối trực tiếp bằng DNA ligase của phage T4 hoặc tổng hợp thêm các đầu dính vào các đầu 3' một số nucleotide bổ sung bằng cách sử dụng các enzyme *end-transferase*, rồi sau đó các đoạn DNA như thế sẽ được nối với nhau bởi DNA ligase của vi khuẩn. Cơ sở của phương pháp kết hợp DNA này được thực hiện lần đầu tiên giữa DNA của virus SV40 với DNA của phage λ bởi L.Lobban và D.Kaiser (1972), và D.Jackson và P.Berg (1972)

## III. Tạo dòng gene ở vi khuẩn

Về nguyên tắc, kỹ thuật DNA tái tổ hợp hay *tạo dòng* (cloning) gồm các bước chung nhất như sau: (1) Tách chiết và tinh sạch DNA thuộc các nguồn khác nhau (gồm vector và DNA mang gene mong muốn); (2) tạo ra phân tử DNA tái tổ hợp *in vitro*; (3) đưa phân tử DNA tái tổ hợp vào trong tế bào nhận, thường là *E. coli* hoặc nấm men. Hình 8.7 mô tả một quy trình kỹ thuật đơn giản như thế. Tuy nhiên, trên thực tế, sự phức tạp là ở bước (4), phát hiện và phân lập các dòng DNA tái tổ hợp đặc hiệu.




**Hình 8.7** Một quy trình kỹ thuật di truyền sử dụng vector là plasmid, các enzyme cắt và nối là EcoRI và DNA ligase, và tế bào nhận là *E. coli*.

Trong tế bào chủ, phân tử DNA tái tổ hợp có thể biểu hiện gene mong muốn (cho sản phẩm protein) hoặc tái bản độc lập nhiều lần để tạo ra hàng loạt bản sao của nó, và khi tế bào chủ phân chia sẽ kéo theo hiện tượng *tạo dòng phân tử* (molecular cloning). Mặt khác, do tốc độ phân chia rất nhanh của các vi khuẩn nên có thể tạo hàng triệu bản sao mong muốn. Vì thế nhà khoa học có thể tách dòng bất kỳ một gene nào để dùng cho nghiên cứu hoặc cho sản xuất trên quy mô công nghiệp một số lượng lớn các protein vốn là những chế phẩm y-sinh học nào đó.

*1. Phân lập và tách chiết DNA ngoại lai*

Bây giờ ta xét một quy trình kỹ thuật tạo dòng mà việc phát hiện DNA tái tổ hợp dựa trên khả năng kháng thuốc do vector plasmid mang lại.

Giả sử đã tinh chiết được plasmid có chứa hai gene kháng ampicilline và tetracycline, ký hiệu là $Amp^R$ và $Tet^R$; và cũng giả thiết rằng gene $Tet^R$ có chứa điểm cắt của EcoRI, và phân tử DNA người có mang gene insulin.

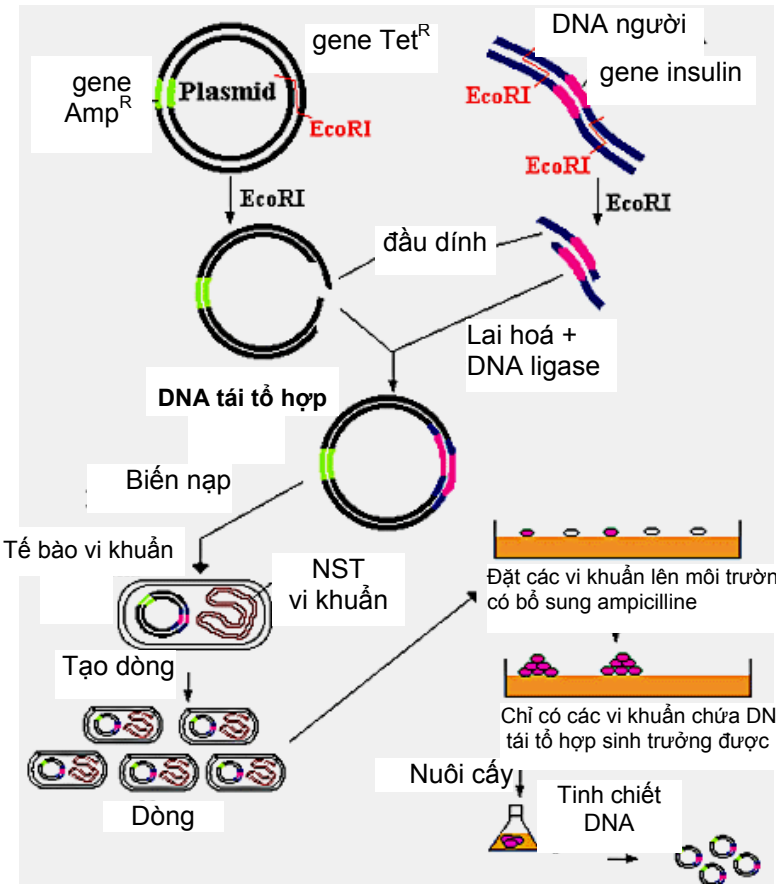
*2. Kiến tạo phân tử DNA tái tổ hợp in vitro*

Trước tiên, dùng enzyme giới hạn đầu dính EcoRI (xem Bảng 8.1) để cắt vòng plasmid tại giữa gene $Tet^R$ và cho cắt DNA người, trong số các

đoạn bị cắt có một đoạn mang gene insulin. Sau đó đem trộn lẫn hai loại DNA trên trong ống nghiệm với DNA ligase. Kết quả là có thể xảy ra ba trường hợp: (1) Plasmid tự nối lại thành mạch vòng như lúc đầu; (2) Đoạn DNA tự nối lại thành mạch vòng; và (3) Plasmid tái tổ hợp có mang gene insulin, và có thể mang một đoạn DNA không phải gene đó.

*3. Chọn lọc vật chủ thích hợp và chuyển các gene vào các tế bào chủ*

Đưa các DNA được xử lý vào các tế bào *E. coli*. Nếu phân tử có kích thước lớn người ta phải xử lý vi khuẩn 'thể nhận' bằng chlorid calcium ($CaCl_2$) để làm cho màng trở nên thấm được dễ dàng. Sau đó đem cấy riêng rẽ các vi khuẩn trên môi trường có ampicillin và theo dõi.




**Hình 8.8** Sơ đồ thí nghiệm tạo dòng vi khuẩn mang DNA tái tổ hợp có chứa gene insulin người.

+ Nếu có xuất hiện khuẩn lạc, chứng tỏ vi khuẩn có mang gene Amp$^R$, tức là chúng có mang plasmid ban đầu (trường hợp 1) hoặc plasmid tái tổ hợp (trường hợp 3). Ngược lại, nếu chỗ cấy không xuất hiện khuẩn lạc,

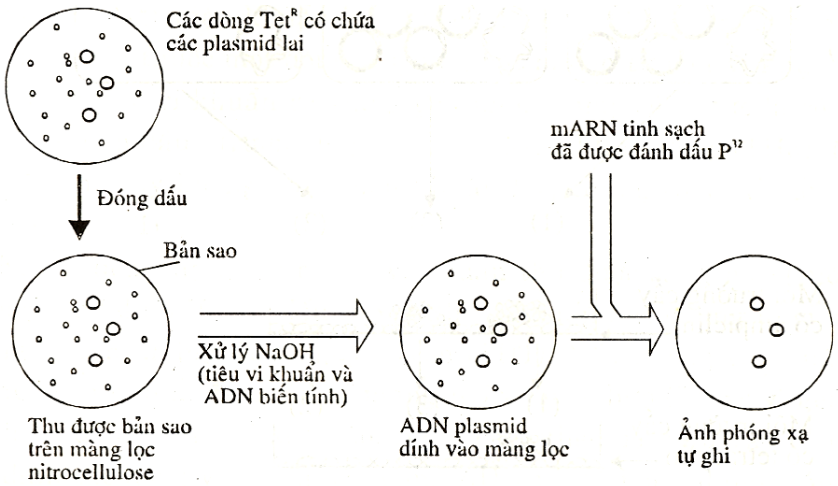
chứng tỏ vi khuẩn mang DNA tự nối (trường hợp 2).

+ Kế đó, đem cấy riêng rẽ các vi khuẩn thu được sang môi trường có tetracycline. Nếu có xuất hiện khuẩn lạc, chứng tỏ vi khuẩn có mang gene $Tet^R$ nguyên vẹn (trường hợp 1). Nếu không có khuẩn lạc, chứng tỏ vi khuẩn đem cấy có mang DNA tái tổ hợp (trường hợp 3); vì gene $Tet^R$ bị bất hoạt do đoạn DNA xen vào. Bằng cách theo dõi như vậy cho phép xác định được dòng vi khuẩn mang DNA tái tổ hợp, nhưng vẫn chưa biết được đâu là các dòng đặc hiệu, nghĩa là có mang gene insulin.

Hình 8.8 mô tả một quy trình đơn giản về tạo dòng vi khuẩn mang gene insulin người.

*4. Xác định các vi khuẩn tái tổ hợp*

Về nguyên tắc, trong cả triệu phép thử mới có một tế bào mang gene mong muốn. Với trường hợp trên đây chẳng hạn, người ta có thể sử dụng phương pháp miễn dịch học bằng cách dùng kháng thể chống lại protein được sinh ra bởi dòng vi khuẩn tương ứng (tức huyết thanh tìm gene kháng insuline). Nói chung, để tìm dòng lai đặc hiệu người ta sử dụng các mẫu dò là mRNA đặc hiệu.




**Hình 8.9** Xác định dòng vi khuẩn mang plasmid có xen đoạn mDNA đặc hiệu.

Chẳng hạn, trong trường hợp nếu cần chọn dòng lai mang đoạn mRNA cụ thể, người ta đem cấy đều các dòng vi khuẩn có chứa DNA tái tổ hợp lên trên mặt thạch của hộp petri chứa môi trường nuôi cấy. Sau đó đóng dấu lên *màng lọc nitrocellulose*, và thu được bản sao. Việc xử lý bản sao bằng NaOH sẽ làm cho các tế bào vi khuẩn tan vỡ tại chỗ (*in situ*), và các DNA thoát ra từ chúng sẽ bị biến tính (các sợi đơn tách rời nhau) và dính vào màng lọc. Sau đó đem nhúng màng lọc này vào mẫu mRNA tương

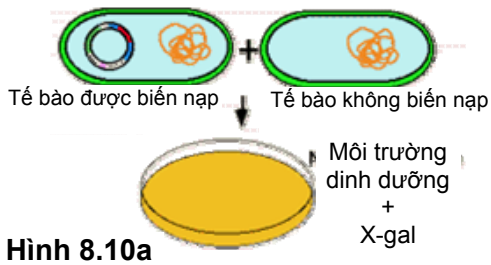
ứng đã được tinh khiết và đánh dấu phóng xạ ($P^{32}$); mẫu RNA này được gọi là *vật dò phóng xạ* (radioactive probe). Nếu dòng nào có chứa DNA mã hoá cho mRNA thì sẽ xảy ra hiện tượng lai giữa mRNA và vùng sợi đơn tương ứng trên DNA đó. Sau khi loại bỏ các mRNA không lai được, người ta đặt một miếng phim ảnh lên trên màng lọc; những vết ảnh xuất hiện trên ảnh phóng xạ tự ghi cho thấy vị trí của dòng mang DNA bổ trợ với mẫu RNA (Hình 8.9). Từ đây có thể tách riêng các dòng lai đặc hiệu để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Hình 8.10 minh họa các công đoạn của quy trình thí nghiệm DNA tái tổ hợp ở vi khuẩn *E. coli* khi sử dụng môi trường nuôi cấy có bổ sung ampicillin đối với ba kiểu tế bào: tế bào có mang plasmid tái tổ hợp, tế bào chỉ mang plasmid pUC19 không tái tổ hợp, và tế bào không biến nạp được (hình 8.10a). Qua đêm sinh trưởng, các tế bào nào có mang plasmid tái tổ hợp và plasmid không tái tổ hợp sẽ mọc thành các khuẩn lạc (màu sắc tương ứng ở đây là trắng và xanh; hình 8.10b). Sau khi chọn ra các dòng có xen plasmid tái tổ hợp, đưa lên màng lọc và cho tiến hành lai hóa giữa RNA và DNA-gene của nó bằng các vật dò phóng xạ như đã nói ở trên. Sau đó đưa sản phẩm lai phân tử này lên tấm phim X quang để định vị gene quan tâm từ dòng tái tổ hợp (hình 8.10c).

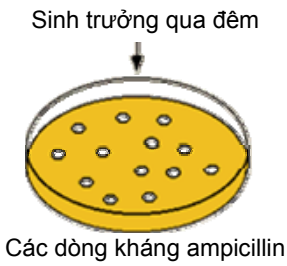
** Chọn lọc các tế bào truyền gene kháng với chất kháng sinh*

Vector plasmid chứa một gene kháng ampicillin làm cho tế bào có tính kháng.

Sự sinh trưởng của các tế bào được biến nạp (các tế bào tiếp nhận plasmid) có thể được xác định trên môi trường agar có chứa ampicillin chẳng hạn.




**Hình 8.10a**



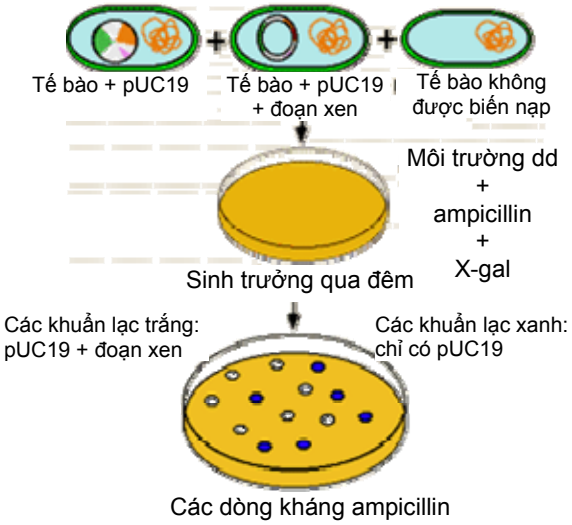

** Sự phát sinh đột biến xen đoạn cho phép xác định các plasmid mang DNA xen đoạn*

*Xác định các dòng*

Vector plasmid có chứa gene có thể xác định được (ví dụ, một khả năng kháng thuốc thứ hai hoặc hoạt tính của enzyme), với trình tự mã hoá của gene này chứa vị trí giới hạn cho xen đoạn.

Sự xen đoạn của DNA ngoại lai ở vị trí này làm gián đoạn kgung đọc mã của gene và gây ra đột biến xen đoạn.

Ở ví dụ này cho thấy, gene b-galactosidase bất hoạt. Cơ chất "X-gal" đổi thành màu xanh nếu như gene không tiếp xúc, nghĩa là làm cho enzyme có hoạt tính. Các khuẩn lạc trắng ở X-gal chỉ ra sự có mặt của DNA tái tổ hợp trong plasmid.

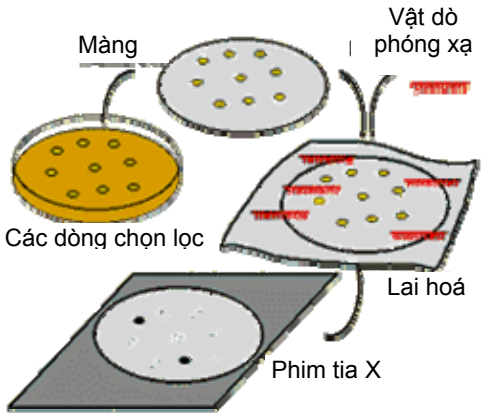



**Hình 8.10b**

## *5. Phát hiện và sàng lọc nucleic acid ngoại lai và protein*

*Tìm các dòng có chứa gene phù hợp*

Trong sơ đồ này, các plasmid tái tổ hợp chứa trong vi khuẩn mọc được như là các khuẩn lạc. Các dòng là các blot được chuyển sang một tấm màng lọc, và DNA có mặt bị biến tính và được cố định ỏctên bề mặt. Khi bổ sung vật dò phóng xạ hay các đoạn bổ sung và cho phép DNA lai hoá để sau đó hiển lộ lênn phim X-quang cho phép xác định được dòng có chứa DNA tái tổ hợp được xen đúng cách.




**Hình 8.10c**

**Hình 8.10** Xác định các dòng vi khuẩn mang plasmid có xen một đoạn DNA đặc hiệu bằng vật dò phóng xạ là mRNA - sản phẩm của nó.

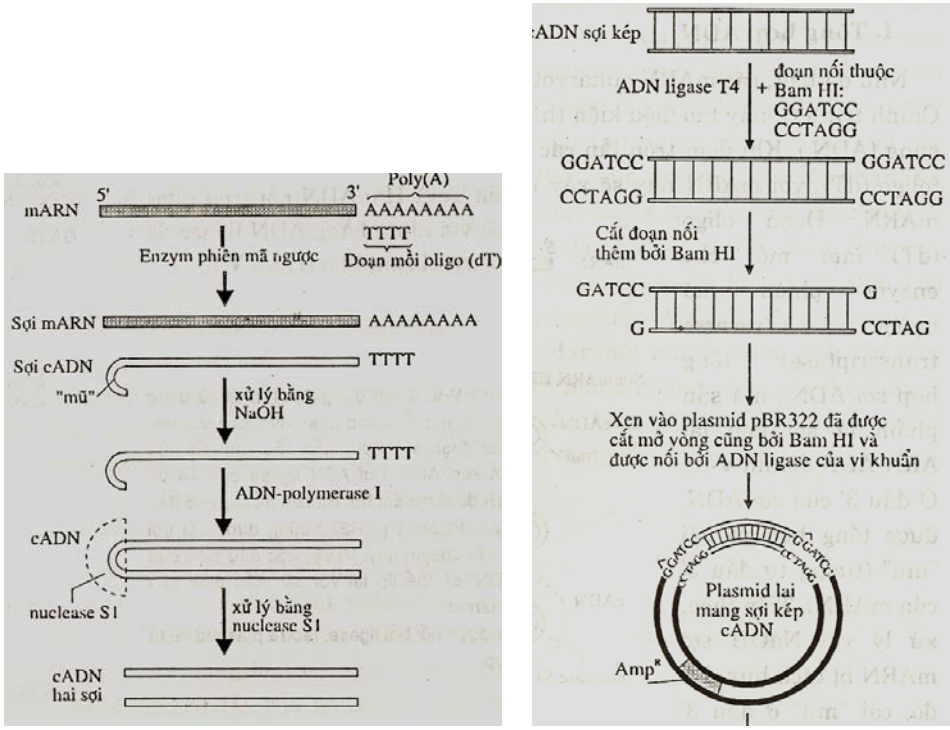
** Tổng hợp và tạo dòng cDNA*

Đối với trường hợp cần cho biểu hiện một gene lạ (sản xuất một protein) mong muốn ở vi khuẩn, người ta có thể tổng hợp gene của nó dựa trên khuôn mẫu mRNA và enzyme phiên mã ngược tinh chế từ các virus

RNA. Sau đó cho xen gene này vào plasmid, rồi đem cấy vào vi khuẩn và xác định các dòng cDNA đặc hiệu. Ở đây ta chỉ xét hai bước đầu:

*Bước 1*: Tổng hợp cDNA (complementary DNA)

Như đã biết, các mRNA eukaryote đều có cái đuôi poly(A) ở đầu 3'. Chính trình tự nầy tạo điều kiện thuận lợi cho việc tổng hợp sợi DNA bổ sung, cDNA. Khi đem trộn lẫn các đoạn ngắn gồm các nucleotide thymine (oligodT) với mRNA này sẽ xảy ra sự lai hoá giữa nó với vùng đuôi mRNA. Đoạn oligo(dT) làm mồi cho *enzyme phiên mã ngược* (reverse transcriptase) tổng hợp sợi cDNA, mà sản phẩm là sợi kép lai RNA-cDNA. Ở đầu 3' của sợi cDNA được tổng hợp có cái 'mũ' (tương tự đầu 5' của mRNA). Tiếp theo, bằng cách xử lý với NaOH, sợi mRNA bị loại ra; kế đó cái 'mũ' ở đầu 3' của cDNA lại làm mồi cho DNA polymerase I tổng hợp sợi thứ hai dọc theo sợi khuôn vốn có của nó. Sản phẩm cDNA bây giờ còn mang cái 'vòng' sợi đơn. Sau đó, cái vòng này được cắt bỏ bằng cách xử lý với nuclease S1 để tạo ra cDNA sợi kép (Hình 8.11a).




(a) (b)

**Hình 8.11** Tổng hợp cDNA từ một mRNA nhờ sử dụng enzyme phiên mã ngược - reverse transcriptase (a) và kiến tạo plasmid tái tổ hợp (b)

*Bước 2*: Xen đoạn cDNA vào plasmid

Để xen đoạn cDNA vào plasmid người ta có thể dùng enzyme *end-transferase* (terminal transferase) để gắn thêm "đuôi" homopolymer (ví dụ, CCCC....) vào các đầu 3' của cDNA. Và plasmid sau khi được mở vòng, cũng phải lắp thêm ở đầu 3' những trình tự tương ứng là GGGG... cũng với enzyme trên. Tuy nhiên, cách phổ biến hơn cả là gắn thêm vào cả hai 'đầu bằng' của sợi kép cDNA nay bằng các oligonucleotide gồm 8-10 cặp base, nhờ xúc tác của DNA ligase T4. Sau đó, dùng enzyme giới hạn thích hợp để cắt "đoạn nối" này tạo ra các đầu dính. Đồng thời cắt plasmid bởi cùng một enzyme đó tại gene $Tet^R$. Hai DNA nói trên được nối với nhau bằng DNA ligase để tạo ra plasmid lai hay plasmid tái tổ hợp như đã đề cập (Hình 8.11b).

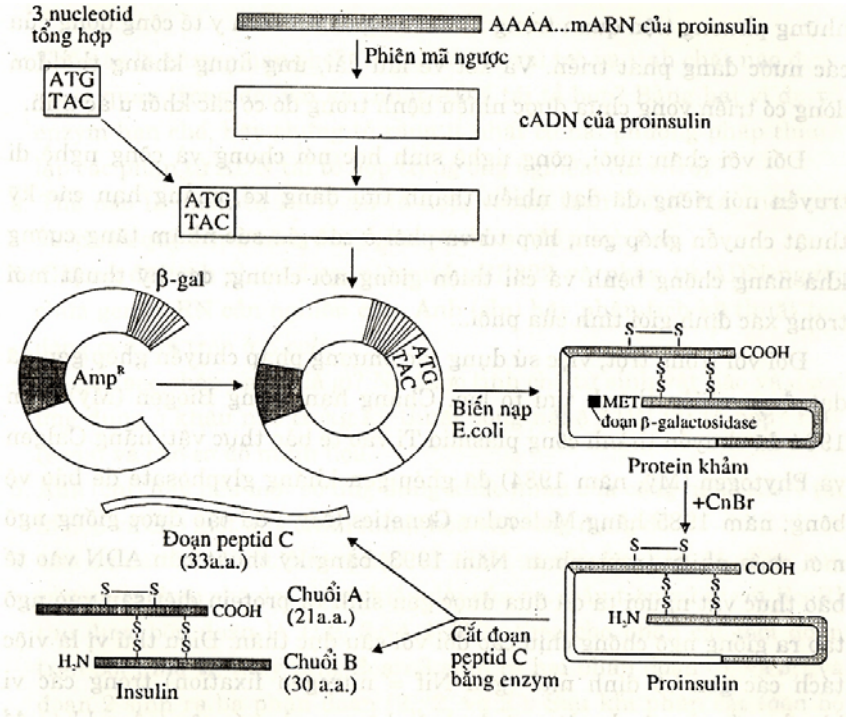
*6. Cho biểu hiện các gene ngoại lai (các gene được tạo dòng)*

Một số các vector đã được sử dụng trong các thí nghiệm tạo dòng tái tổ hợp (như đã đề cập) vẫn có thể được sử dụng như là những *vector biểu hiện* (expression vectors). Các vector này có thể sản sinh ra các sản phẩm protein của các gene được tạo dòng. Chẳng hạn, các vector pUC và pBS được xen vào DNA dưới sự kiểm sóat của *lac* promoter, vốn nằm phía trước so với vị trị tạo dòng phức (multiple cloning site). Nếu như một đoạn DNA được cho xen có mặt trong cùng khung đọc mã thì nó làm gián đoạn gene *lacZ'*, sẽ sinh ra một *protein dung hợp* (fusion protein). Nó sẽ có một phần trong trình tự của protein beta-galacyosidase tại đầu amin và trình tự protein khác nữa vốn được mã hóa trong DNA được xen vào, ở đầu carboxyl của nó. Tuy nhiên, nếu ta quan tâm tới sự biểu hiện cao của vector được tạo dòng, thì các vector chuyên biểu hiện thường hoạt động tốt hơn. Có hai yếu tố điển hình cần thiết cho sự biểu hiện gene có hoạt tính: một promoter mạnh và một vị trí bám của ribosome mà bao gồm luôn cả trình tự Shine-Dalgarno nằm gần codon khởi đầu AUG.

Trên thực tế, người ta sử dụng các *vector biểu hiện có các promoter mạnh* (expression vector with strong promoters), chẳng hạn như promoter của operon tryptophan. Nó tạo thành cơ sở cho nhiều vector biểu hiện kể cả *ptrpL1*.

Ngoài ra, người ta còn sử dụng các *vector biểu hiện dạng cảm ứng* (inducible expression vectors). Trường hợp này thường tiện lợi ở chỗ, nó giữ cho một gene được tạo dòng ở trạng thái đóng cho tới khi ta sẵn sàng cho nó biểu hiện. Một lý do là ở chỗ, các protein của eukaryote được sản sinh một số lượng lớn ở vi khuẩn có thể gây độc. Ngay cả các protein vốn không độc thực sự, chúng cũng có thể được tạo ra nhiều đến mức gây rối loạn sự sinh trưởng của vi khuẩn... Promoter của operon lactose (*lac* promoter) là vector biểu hiện kiểu cảm ứng đến một mức độ nào đó, có lẽ

là vẫn giữ bất hoạt cho tới khi được kích hoạt bởi chất cảm ứng allolactose hoặc bằng chất tổng hợp tương tự của nó là IPTG. Tuy nhiên, sự biểu hiện vẫn kém bởi chất ức chế *lac* là không đầy đủ hoàn toàn, và sự biểu hiện nào đó của gene được tạo dòng vẫn có thể phát hiện được ngay cả khi không có mặt chất cảm ứng. Một cách xoay quanh vấn đề này là cho biểu hiện gene mong muốn trong một plasmid hay phagemid mà nó mang được gene *lacI* của riêng nó, như là plasmid pBS chẳng hạn.




**Hình 8.12** Tổng hợp cDNA của proinsulin và cho sản xuất insulin trong tế bào *E. coli* (xem giải thích trong bài).

Bây giờ chúng ta thử tìm hiểu một phương pháp sản xuất insulin người bằng con đường tổng hợp DNA và cho biểu hiện gen ở *E. coli*. Trước tiên cần lưu ý rằng, để thực hiện được điều này người ta phải dựa trên thành tựu mới nhất từ việc nghiên cứu cấu trúc chi tiết và quá trình tổng hợp các chế tiết insulin từ tuyến tụy vào máu. Nói vắn tắt thì sản phẩm sơ cấp của quá trình dịch mã từ phân tử mRNA hoàn chỉnh là *preproinsulin* gồm đoạn peptide "tín hiệu dẫn đầu" và chất tiền thân của insulin là *proinsulin*; đoạn pre- bị tách bỏ trong quá trình tổng hợp. Proinsulin được chế tiết là phân tử gồm ba đoạn A, B và C liền nhau trong một cấu trúc "hình quai" có ba cầu disulfur; khi đoạn peptid C (33 amino acid) bị cắt bỏ bởi enzyme đặc thù trong các túi của tế bào tuyến tụy sẽ tạo ra các sản phẩm insulin có

hoạt tính. Phân tử *insulin* gồm hai chuỗi polypeptid A (21 amino acid) và B (30 amino acid) riêng biệt được duy trì cùng nhau bởi hai cầu disulfur.

Từ đây ta có thể hình dung quá trình tổng hợp gene insulin nhân tạo (cDNA) và cho sản xuất hormone này ở *E. coli* như sau. Trước tiên, dùng mRNA của proinsulin làm khuôn để tổng hợp đầy đủ một DNA sợi kép bằng con đường phiên mã ngược như đã trình bày ở trước. Sau đó lắp thêm bộ ba khởi đầu ATG nhân tạo (mã hoá amino acid mở đầu - methionine) vào đầu 5' bằng phương pháp hoá học. Tiếp đến, cho nó kết hợp với một phần của operon lactose (gồm một đoạn của gene β-galactosidase và toàn bộ promoter) của *E. coli* để nó có thể hoạt động được trong tế bào thể nhận. Sau đó gene "lai" này được xen vào plasmid pBR322 (Hình 8.12; Ở đây không đi sâu vào các chi tiết kỹ thuật, chẳng hạn như sử dụng các đoạn nối, và các enzyme giới hạn).

***Bảng 8.2*** *Một số sản phẩm sinh ra thông qua các vi khuẩn chứa các gene người được tạo dòng*

| **Sản phẩm** | **Áp dụng** |
|---|---|
| Các interferon | Điều trị các bệnh lây nhiễm virus và một số bệnh ung thư |
| Interleukin 2 | Kích thích hệ thống miễn dịch và có thể dùng trong điều trị ung thư và các rối loạn hệ thống miễn dịch |
| Insulin | Điều trị bệnh tiểu đường |
| Somatotropin (GH) | Điều trị dị tật lùn thuộc về tuyến yên |
| Chất kích hoạt plasminogen | Làm tan các cục đông máu cho điều trị và ngăn chặn các tình trạng tắc nghẽn tim mạch |
| Nhân tố hoại tử khối u | Tấn công và giết các khối u ung thư |
| Các nhân tố XI và VIII | Điều trị bệnh máu khó đông |
| Erythropoietin | Kích thích tạo các tế bào hồng cầu cho điều trị bệnh thiếu máu (anemia) |
| Beta endorphin | Các chất giảm đau tự nhiên do cơ thể tạo ra; có thể được dùng làm giảm đau |
| Các enzyme | Được dùng rộng rãi từ việc điều khiển các phản ứng hoá học trong các quá trình kỹ nghệ cho đến việc bổ sung các enzyme trong khẩu phần ăn của người |

| | |
|---|---|
| Các vaccine tiểu đơn vị (tái tổ hợp) | Kích thích khả năng miễn dịch của cơ thể đối với một hoặc hai kháng nguyên then chốt của một tác nhân gây bệnh; giảm nguy cơ rủi ro của các vaccine thông thường |

Khi đưa plasmid lai này vào vi khuẩn *E. coli,* nó sẽ sản sinh ra các protein lai gồm một đoạn peptide của β-galactosidase nối liền với phân tử proinsulin qua gốc methionine (MET). Sau khi phân lập protein này và xử lý *in vitro* bằng cyanogen bromide thì gốc MET bị cắt bỏ (kéo theo phần enzyme của vi khuẩn là β-galactosidase tách ra) và thu được proinsulin nguyên vẹn. Cuối cùng, nhờ xử lí với enzyme thích hợp, đoạn peptid C ở giữa proinsulin được tách ra và có thể thu được insulin ở dạng tinh khiết.

Hiện nay người ta đã tạo ra được các dòng vi khuẩn và các chủng nấm men mới đặc hiệu có khả năng sản xuất insulin trên quy mô công nghiệp với chỉ số insulin cao, và đặc biệt là các chủng này có thể trực tiếp bài xuất sản phẩm đặc hiệu vào môi trường nuôi cấy. Trong trường hợp đó, các tế bào chuyên sản xuất insulin vẫn được duy trì và tái sử dụng với hiệu quả kinh tế cao. Một số sản phẩm quan trọng trong y-dược tạo ra bằng công nghệ DNA tái tổ hợp ở vi khuẩn được giới thiệu ở Bảng 8.2.

## IV. Phóng thích ra môi trường các sinh vật được biến đổi gene

Kỹ thuật di truyền sử dụng các vi khuẩn và virus đã tạo ra nhiều loại sản phẩm hữu ích (xem Bảng 8.2). Một số vi khuẩn được sử dụng như là những nhà máy sản xuất các protein, mà hầu hết là các dược phẩm và các enzyme. Các vi khuẩn khác có thể mang những tổ hợp gene duy nhất và được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền chuyên biệt để phóng thích vào môi trường, ở những nơi mà chúng có thể được dùng để phân huỷ các chất gây ô nhiễm, làm phì nhiêu đất đai, hoặc bảo vệ thực vật. Chẳng hạn, vi sinh vật "ăn dầu" đầu tiên được tạo ra để xử lý các cặn bã dầu hoả.

Các vi sinh vật được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền (genetically engineered microbes = GEMs) nếu không được phép của các cơ quan chức năng (ví dụ ở Mỹ, đó là Cơ quan Bảo vệ Môi trường - EPA hoặc Bộ Nông nghiệp Mỹ - USDA hoặc cả hai cơ quan này) sẽ không thể đưa thử nghiệm bên ngoài phòng thí nghiệm. Các cơ quan chính phủ này chịu trách nhiệm xác định độ an toàn cho việc phóng thích các sinh vật biến đổi gene. Những mối hiểm hoạ tiềm tàng từ sự phóng thích các sinh vật mới được tạo ra này liên quan tới khả năng truyền gene cho các sinh vật khác và tác dụng của các vi sinh vật đó lên sinh thái khu vực. Bất kỳ một vi sinh vật mới được tạo ra nào cũng có thể ảnh hưởng lên các thực vật, côn

trùng và con người trong các quần xã mà nó được đưa vào. Thí dụ, nếu như các marker (chất chỉ thị) kháng kháng sinh được sử dụng trong việc phát triển các GEM đã được truyền sang các vi khuẩn trong đất khác, từ đó chúng xâm nhập vào các vi khuẩn ở trâu bò, và cuối cùng đi vào các vi khuẩn cư trú hoặc lây nhiễm ở người thì sao? Để giải quyết vấn đề này, các marker chọn lọc chẳng hạn như các gene điều khiển tế bào sản xuất một sắc tố sẽ được dùng để dò tìm số phận của các GEM. Các sinh vật là tác nhân gây bệnh hoặc bản thân chúng có thể thiết lập như là *hệ vi khuẩn* (microflora) bình thường ở người thì không được sử dụng trừ phi các vi khuẩn đó (như *E. coli* chẳng hạn) đã được sửa đổi sao cho nó có thể không sống sót được ở người.

*Agrobacterium tumefaciens* đã dược sử dụng rộng rãi trong kỹ thuật di truyền ở thực vật. Bằng cách chuyển các gene chọn lọc vào T-DNA của plasmid vi khuẩn trong các điều kiện phòng thí nghiệm sao cho chúng có thể xen vào nhiễm sắc thể thực vật khi cấy chuyển T-DNA (Hình 8.13). Tuy nhiên, một số phương pháp chọn lọc khác nhau cũng được dùng cho kỹ thuật di truyền thực vật. Một vài ứng dụng thương mại của các công nghệ này được giới thiệu ở Bảng 8.3.

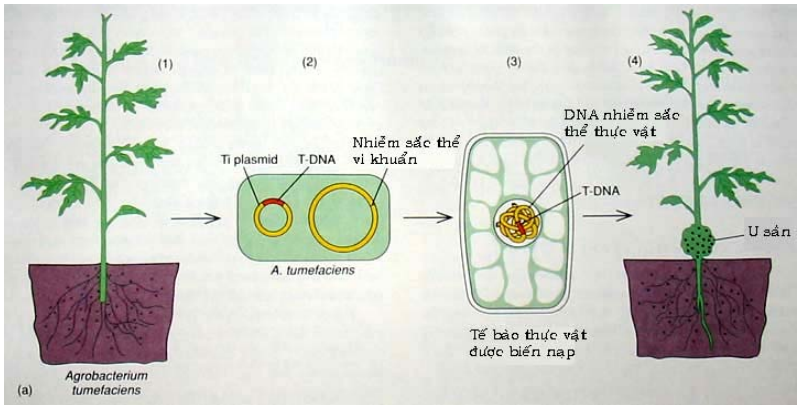
***Bảng 8.3*** *Một số thực vật biến đổi gene được phóng thích (theo Birch, 1997)*

| **Cây trồng và năm phóng thích** | **Tên** | **Hãng** | **Các đặc tính mới** |
|---|---|---|---|
| Cà chua (1994) | Flavr Savr | Calgene | Giữ được hương thơm của nho chín và bảo quản lâu dài |
| Cà chua (1995) | | Zeneca | Ổn định bột nhão của cà chua |
| Cây bông<br>Khoai tây<br>Ngô (1996-97) | Bollgard<br>NewLeaf<br>YieldGuard | Monsanto | Độc tố của *Bacillus thuringiensis* để kháng côn trùng |
| Đậu tương<br>Cây cải dầu<br>Cây bông (1995-96) | Roundup Ready | Monsanto | Diệt cỏ nhờ glyphosate |

Các giống khoai tây chuyển gene không biểu hiện gene mã hoá cho *polygalacturonase*, một enzyme phân huỷ pectin, dẫn đến làm mềm các mô quả. Kết quả là các khoai tây này có thể được giữ lại trên cây lâu hơn để tích luỹ các thành phần hương vị và và chúng cũng có thể cho bột nhão khoai tây tốt hơn.

Nhiều cây trồng đã được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền nhằm biểu hiện gene độc tố diệt côn trùng *(insecticidal toxin gene)* của vi khuẩn *Bacillus*

*thuringiensis*, vì vậy các côn trùng ăn các cây này sẽ bị giết chết. Đây là một thành công to lớn, nhưng cũng có những hạn chế tiềm ẩn mà xu hướng bộc lộ tiếp tục của các côn trùng đối với độc tố sẽ được chọn lọc để phát trển khả năng kháng độc tố.

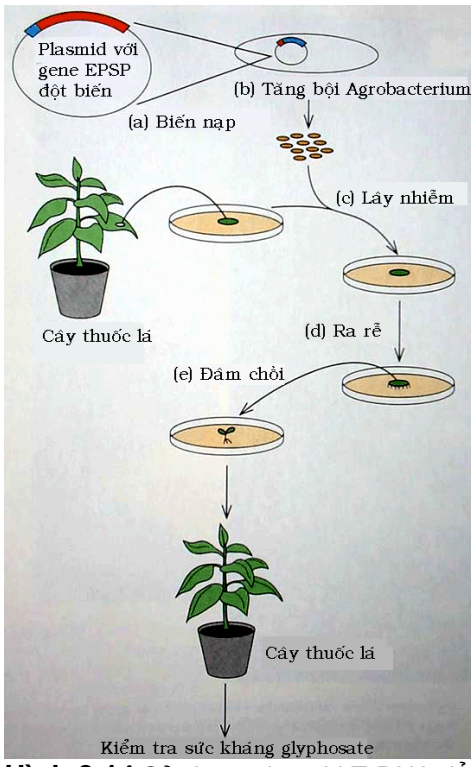



**Hình 8.13** Sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* để tạo khối u sần ở thực vật.

Nhiều cây trồng cũng đã được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền để kháng với các thuốc diệt cỏ chẳng hạn như *glyphosate*, vì thế chất diệt cỏ có thể được dùng để phòng trừ cỏ dại mà không gây phương hại đến mùa màng (Hình 8.14). Những ví dụ nổi tiếng là các cây trồng có tên "Roundup Ready" được hãng Monsanto tung ra thị trường.

Các chiến lược chuyển gene được khai thác và thương mại hoá bao gồm:

- Các nghiên cứu kháng virus bằng sự kết hợp các gene của protein vỏ virus hoặc RNA đối nghĩa (antisense RNA);
- Các nghiên cứu khả năng kháng các tác nhân gây bệnh do nấm, bằng cách tăng cường sự biểu hiện của các enzyme có khả năng huỷ hoại vách nấm (chitinase và các glucanase).




**Hình 8.14** Sử dụng plasmid T-DNA để đưa gene đột biến EPSP vào cây thuốc lá để kiểm tra sức kháng glyphosate.

## V. Sử dụng các vi sinh vật để chuyển gen vào các thực vật

Đối với trồng trọt, việc sử dụng các phương pháp chuyển ghép gene đã đạt được nhiều thành tựu to lớn. Chẳng hạn, hãng Biogen (USA) năm 1984 đã chuyển thành công plasmid *Ti* vào tế bào thực vật; hãng Calgene và Phytogene (USA, 1984) đã ghép thành công gene kháng glyphosate để bảo vệ cây bông; năm 1985 hãng Molecular Genetics (USA) đã tạo được giống ngô mới cho nhiều tryptophan. Năm 1993, nhờ sử dụng kỹ thuật súng bắn gene vào tế bào thực vật người ta đã đưa được gene sản xuất protein diệt sâu vào cây ngô, và kết quả là đã tạo ra được giống ngô chống chịu cao đối với sâu đục thân. Một điều kỳ vọng thú vị là việc tách các gene cố định đạm, gene *Nif* (Nif = nitrogene fixation) từ các vi khuẩn nốt sần cây họ đậu và đưa vào bộ gene của các cây trồng khác để tạo ra các giống cây trồng mới có khả năng cố định nitơ và cho năng suất cao.

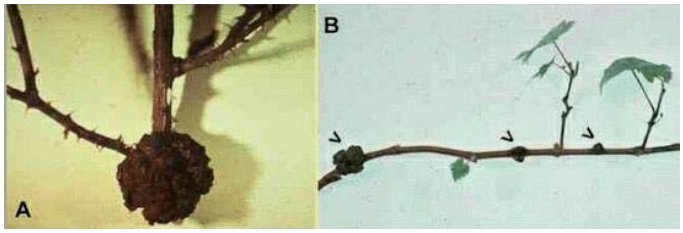
Dưới đây ta sẽ tìm hiểu kỹ các đặc điểm sinh học chủ yếu của vi khuẩn *Agrobacterium* gây bệnh nổi tiếng ở thực vật và các quy trình kỹ thuật di truyền áp dụng thành công trên đối tượng này.

*1. Về khả năng gây bệnh của Agrobacterium tumefaciens*

*A. tumefaciens* gây các bệnh u chồi (crown gall) trên phạm vi rộng các cây hai lá mầm (có lá rộng), đặc biệt là các thành viên của họ hoa hồng như táo, đậu, đào, anh đào, hạnh, cây mâm xôi và hoa hồng. Một nòi riêng gọi là biovar 3, gây mụn rộp ở cây vang nho.

Cây bị bệnh này trên thân của nó xuất hiện các chỗ trương phồng giống như khối u sần mà điển hình là ở các chồi cây ngay trên mặt đất. Mặc dù nó làm giảm đáng kể khả năng thương mại của giống gốc vườn ươm, nhưng nó thương không tổn thương nghiêm trọng các cây lớn hơn. Tuy nhiên, bệnh này lại được biết đến một cách rộng rãi nhất do đặc tính sinh học đáng kể của nó. Về cơ bản, vi khuẩn *A. tumefaciens* này truyền một phần DNA của nó cho cây, và DNA này lại xâm nhập vào trong bộ gene của cây, dẫn tới tạo thành các khối u và các biến đổi liên đới trong sự chuyển hoá của cây.

Phương thức hoạt động độc đáo của *A. tumefaciens* đã cho phép sử dụng vi khuẩn này như là một công cụ trong chọn giống thực vật (plant breeding). Bất kỳ các gene mong muốn nào, như các gene sản sinh độc tố kháng côn trùng (xem *Bacillus thuringiensis*) hoặc các gene sản sinh chất diệt cỏ, có thể đưa vào DNA vi khuẩn bằng kỹ thuật di truyền và qua đó xen vào bộ gene thực vật. Việc sử dụng *Agrobacterium* không chỉ rút ngắn quá trình chọn giống thực vật thông thường, mà còn cho phép chuyển các gene hoàn toàn mới (không phải thực vật) vào các cây trồng.




**Hình 8.15** ***Agrobacterium tumefaciens*** **và sự tạo thành các u sần**

**A**. Mụn cây lớn hình thành ở gốc thân cây ngấy lá hồng.

**B**. Một loạt các mụn cây được chỉ ra bằng các mũi tên dọc theo một cành nho (Ảnh của Sharon von Broembsen, Oklahoma State University).

Câu chuyện về *Agrobacterium* còn tiếp diễn xa hơn nữa khiến cho nó trở thành một trong những vi khuẩn được quan tâm và có ý nghĩa nhất đối với các nghiên cứu chi tiết. Chẳng hạn, có một hệ thống kiểm soát sinh học hiệu quả cao đối với bệnh này - một trong các ví dụ đầu tiên và thành công nổi bậc nhất của việc phòng ngừa sinh học về bệnh thực vật.

Ở đây có ba khía cạnh chính cần xét của căn bệnh được quan tâm này:

- sinh học vi khuẩn này và quá trình lây nhiễm,
- phát triển phát triển hệ thống phòng ngừa sinh học thành công cao cấp chống lại bệnh u sần chồi cây,
- sử dụng rộng rãi hơn *A. tumefaciens* như là một công cụ cho kỹ thuật di truyền thực vật.

*2. Vi khuẩn A. tumefaciens và các plasmid của nó*

*A. tumefaciens* là một vi khuẩn Gram-âm, không sinh bào tử, có khả năng di động, hình que, có quan hệ họ hàng với *Rhizobium* vốn tạo ra các nốt sần cố định đạm ở cây cỏ ba lá và các cây họ đậu. Các nòi của *Agrobacterium* được phân loại thành ba nhóm sinh học (**biovars**) dựa trên khả năng sử dụng các carbohydrate khác nhau và các thử nghiệm sinh hoá khác. Những sự khác nhau giữa các biovar được xác định bằng các gene trên DNA nhiễm sắc thể vòng đơn. Các sai khác về biovar không phù hợp một cách đặc biệt với khả năng gây bệnh của *A. tumefaciens*, ngoại trừ một điểm: biovar 3 gây bệnh cây vang nho khắp nơi trên thế giới.

Hầu hết các gene liên quan đến bệnh u sần chồi không do nhiễm sắc thể của *A. tumefaciens* sinh ra mà nó nằm trên một plasmid lớn, gọi là **plasmid *$T_i$* (tumour-inducing)**. Theo cùng cách, hầu hết các gene giúp cho các nòi vi khuẩn *Rhizobium* tạo ra các nốt sần cố định nitơ đọc chứa trên một plasmid lớn cộng sinh (symbiotic), gọi là **plasmid *Sym***. Như vậy, sinh học đặc trưng của hai loại vi khuẩn này chủ yếu là chức năng của các plasmid, chứ không phải là nhiễm sắc thể vi khuẩn.

★ Như đã đề cập, mỗi plasmid là một DNA vòng tồn tại ngoài nhiễm sắc thể, có khả năng tái bản độc lập trong tế bào và được truyền từ tế bào vi khuẩn này sang vi khuẩn khác bằng tiếp hợp (conjugation). Các plasmid mã hoá các chức năng không thiết yếu trong ý nghĩa là một vi khuẩn có thể sinh trưởng bình thường khi nuôi cấy thậm chí ngay cả lúc plasmid biến mất.

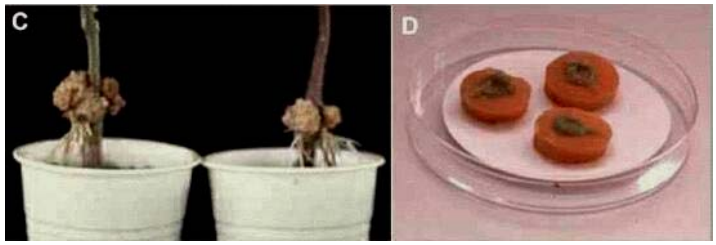
Vai trò trung tâm của các plasmid ở các vi khuẩn này có thể dễ dàng chứng minh bằng cách thử thách ("curing") các nòi. Nếu vi khuẩn được cho sinh trưởng ở nhiệt độ gần như cực đại của nó (khoảng 30$^{o}$C trong trường hợp của *Agrobacterium* hoặc *Rhizobium*) thế thì plasmid biến mất và khả năng gây bệnh (của *Agrobacterium*) hoặc khả năng tạo nốt sần (của *Rhizobium*) cũng biến mất. Tuy nhiên, sự biến mất của plasmid không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng khi nuôi cấy các nòi vi khuẩn chứa plasmid-tự do vốn hoạt động chức năng bình thường.

Trong các điều kiện phòng thí nghiệm, người ta cũng có thể thử thách *Agrobacterium* hoặc *Rhizobium* và sau đó đưa vào plasmid của sinh vật khác. Việc đưa plasmid $T_i$ vào *Rhizobium* khiến cho sinh vật này tạo ra các u sần; còn đưa plasmid *Sym* vào *Agrobacterium* khiến cho nó tạo thành các cấu trúc giống như nốt sần, mặc dù chúng không có chức năng đầy đủ.

Các nghiên cứu như thế này đặt ra nhiều câu hỏi thú vị và thách thức về bản chất của các vi khuẩn. Chẳng hạn, tên gọi của các loài hoặc chi của vi khuẩn thực sự có nghĩa gì, nếu như sinh vật đó có thể thay đổi mạnh mẽ bằng cách mất đi hoặc có được một plasmid không thiết yếu? Và sự trao đổi gene xảy ra như thế nào cho các plasmid và các yếu tố di truyền vận động khác (mobile genetic elements) bên trong các quần thể tự nhiên?

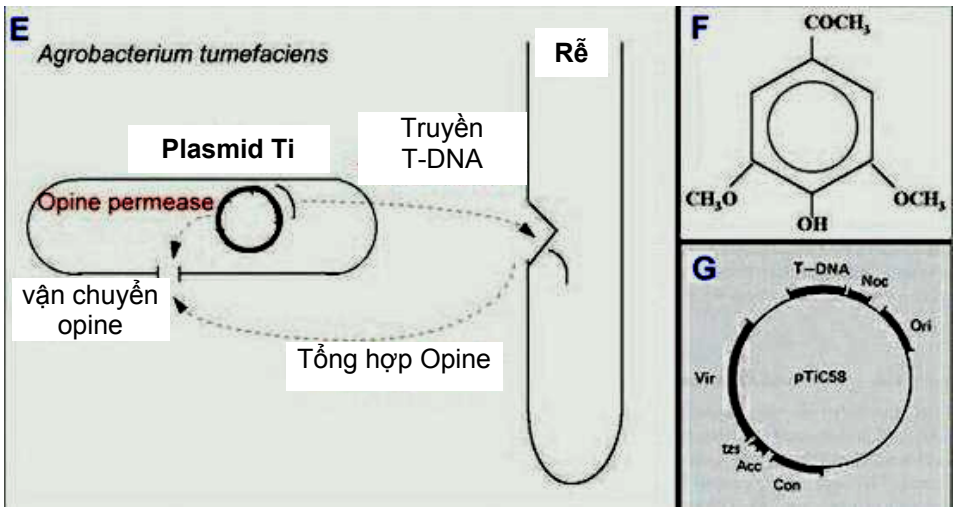
*3. Quá trình lây nhiễm*

*Agrobacterium tumefaciens* được phát hiện chủ yếu ở trên và xung quanh các bề mặt rễ - vùng đó được gọi là *bầu rễ* (**rhizosphere**) - là chỗ chúng sống sót nhờ sử dụng các chất dinh dưỡng rò rỉ ra từ các mô rễ. Thế nhưng nó lây nhiễm chỉ qua các vết thương trầy xước, hoặc xảy ra một cách tự nhiên hoặc gây ra bởi việc cấy các cây non và giống gốc vườn ươm. Các đòi hỏi tổn thương này có thể được xác minh dễ dàng trong các điều kiện thí nghiệm. Ví dụ, Hình 8.15C cho thấy các gốc của hai cây cà chua non ở chỗ một giọt dịch huyền phù chứa vi khuẩn *A. tumefaciens* được nhỏ lên trên phần thân và một vết kim châm sau đó trên thân tại điểm này. Bức ảnh này chụp được sau đó 5 tuần . Hình 8.15D cho thấy một xét nghiệm khác nữa, tại chỗ dịch huyền phù vi huẩn được bổ sung trên bề mặt của các mẩu củ cà rốt được cắt tươi. Sau 2 tuần lễ các u sần non (có màu xanh lục) phát triển từ các mô phân sinh xung quanh hệ mạch dẫn trung tâm.




**Hình 8.15 C, D**

Trong các điều kiện tự nhiên, các tế bào di động của *A. tumefaciens* được thu hút tới các chỗ bị thương bởi đặc tính hướng về hoá chất (**chemotaxis**). Đó một phần là do đáp ứng với sự giải phóng các chất đường và các thành phần phổ biến khác của rễ, và thậm chí còn phát hiện được ở các nòi có plasmid được thử thách. Tuy nhiên, các nòi chứa plasmid $T_i$ đáp ứng thậm chí còn mạnh hơn nữa, bởi vì chúng nhận biết các hợp chất phenol của vết thương như là **acetosyringone** (Hình 8.15F) vốn có sức thu hút mạnh ngay cả ở nồng độ rất thấp ($10^{-7}$ Mol). Như vậy, một trong những chức năng của plasmid $T_i$ là mã hoá cho các chất nhận bổ sung, có tính hướng hoá chất đặc thù được xen vào trong màng vi khuẩn và giúp vi khuẩn nhận biết các vị trí vết thương.




**Hình 8.15 E, F và G**

**E.** Tổng quát về sự lây nhiễm ở một chỗ trầy xước trên cây bởi *Agrobacterium tumefaciens*. Plasmid *Ti* mã hoá cho một protein tiếp nhận chất dinh dưỡng (opine permease) mà chất này sẽ được xen vào màng tế bào vi khuẩn. Plasmid cũng sao chép và cắt bỏ từng phần DNA của nó, các đoạn DNA này xâm nhập vào các tế bào thực vật và khiến chúng sản xuất các opine - một loại amino acid.

**F.**Cấu trúc của *acetosyringone*.

**G.** Sơ đồ một số vùng chính yếu của plasmid *Ti* của *A. tumefaciens* nòi C58. **T-DNA** = transferred DNA; **Noc** = các gene dị hoá nopaline (nopaline catabolising genes); **Ori** = Khởi điểm tái bản của plasmid (origin of replication); **Con** = vùng điều khiển sự truyền plasmid sang các nòi *Agrobacterium* khi xảy ra tiếp hợp (region governing conjugative transfer of the plasmid); **Acc** = các gene dị hoá agrocinopine (agrocinopine catabolising genes); **tzs** = tổng hợp transzeatin (transzeatin synthesis); **Vir** = các gene độc (virulence genes).

Acetosyringone đóng một vai trò sâu xa trong quá trình lây nhiễm, vì ở nồng độ cao (khoảng $10^{-5}$ đến $10^{-4}$ Mol) hơn là các quá trình gây ra tính hướng hoá chất làm kích hoạt các gene độc (virulence genes = **Vir** genes) trên plasmid $T_i$ (xem Hình 8.15**G**). Các gene này phối hợp quá trình lây nhiễm và, đặc biệt là:

- dẫn tới việc sản xuất các protein (các **permease** - xem chương 3) xen vào trong màng tế bào vi khuẩn để tiếp nhận các hợp chất (các **opine** - một loại amino acid) do các khối u tạo ra (xem ở dưới);
- gây ra việc sản xuất một **endonuclease** - enzyme giới hạn - cắt bỏ từng phần của plasmide $T_i$ gọi là **T-DNA** (transferred DNA).

Sơ đồ ở Hình 8.15E cho thấy T-DNA bị cắt ra được giải phóng bởi vi khuẩn và xâm nhập vào các tế bào thực vật, tại đây nó xen vào các nhiễm sắc thể thực vật và nó làm đảo lộn hoạt động chức năng của các tế bào đó. Cơ chế truyền đi thực sự vẫn còn chưa rõ ràng, nhưng dường như nó cần đến một quá trình có điều kiện, có lẽ được xử lý bằng việc sản xuất các **cytokinin** (các hormone thực vật) bởi vi khuẩn đó. Gene **tzs (transzeatin gene)** trên plasmid $T_i$ mã hoá cho hormone này (Hình 8.15G).

Các nòi khác của *A. tumefaciens* chứa các kiểu plasmid $T_i$ khác nhau mã hoá cho việc sản xuất các loại opine khác nhau. Một trong những kiểu plasmid $T_i$ phổ biến nhất (phát hiện được ở nòi C58 của *A. tumefaciens*; Hình 8.15G) mã hoá cho việc sản xuất **nopaline** (cấu trúc được chỉ ra ở dưới), và cho **agrocinopine A**. Phần còn lại của plasmid trong vi khuẩn mã hoá cho việc tiếp nhận và dị hoá các hợp chất này (gene **Noc** và gene **Acc** được chỉ ra ở Hình 8.15G). Kiểu phổ biến khác của plasmid $T_i$ mã hoá cho việc tổng hợp **octopine** và **agropine**. Ý nghĩa của sự khác nhau này sẽ rõ ràng hơn khi ta thảo luận về sự kiểm soát sinh học của các u chồi.

Để chấm dứt phần thảo luận về quá trình gây bệnh này, ta nên quay lại câu hỏi đã đặt ra từ trước: *sự trao đổi di truyền giữa các vi khuẩn trong các điều kiện tự nhiên xảy ra đến mức nào?*

Khi *Agrobacterium* được phân lập từ các bề mặt rễ cây trong các môi trường tự nhiên hoặc trong mùa màng, đại đa số các nòi (90% hoặc cao

hơn) phát hiện được là các dạng không gây bệnh (non-pathogenic) - thậm chí ngay cả các trường hợp phân lập được lấy từ các cây bị bệnh. Các nòi không gây bệnh này theo thông lệ được gọi bằng tên loài *Agrobacterium radiobacter*. Vì vậy ta phải kết luận rằng *Agrobacterium* về cơ bản là một sinh vật cư trú ở bầu rễ (rhizosphere inhabitant), và chỉ một tỷ lệ nhỏ các nòi là gây bệnh (chứa plasmid $T_i$). Một cách tình cờ, cùng một sự thật cho *Rhizobium* - đó là hầu hết các nòi được phân lập từ vùng rễ đều không có khả năng hình thành nốt sần cho các thực vật.

Trong nhiều cách điều này tạo nên ý nghĩa về mặt sinh học: về cơ bản, các vi khuẩn là một sinh vật cư trú ở bầu rễ bởi vì các nòi gây bệnh của *Agrobacterium* chỉ có thể đáp ứng một cách nhanh chóng với các vị trí tổn thương nếu như có một quần thể được xác lập ở vùng rễ. Thế nhưng plasmid $T_i$ lại là một plasmid tiếp hợp (**conjugative plasmid**) - nó có thể được truyền từ tế bào này sang tế bào khác, dưới sự kiểm soát của vùng **Con** (Hình 8.15G). Trong các điều kiện phòng thí nghiệm, việc truyền tiếp hợp này được xúc tiến mạnh mẽ bởi sự có mặt của nopaline, vì thế dường như nòi gây bệnh tạo ra các điều kiện (sản xuất nopaline từ các vị trí tổn thương bị lây nhiễm) hỗ trợ cho nó truyền đi plasmid của nó sang nòi khác ở bầu rễ.

*4. Sự kiểm soát sinh học các u sần (crown gall)*

Nói chung, các bệnh do vi khuẩn ở thực vật là rất khó kiểm soát phòng trừ do thiếu các hoá chất hiệu quả. Có thể sử dụng các chất kháng sinh, nhưng chúng rất đắt và, trong bất kỳ trường hợp nào, các hợp chất sẵn có để điều trị ở người đều không được phép sử dụng trong nông nghiệp. Dạng biến đổi thay thế hiệu quả nhất là sử dụng đồng (Cu), vốn có độc tính tiềm ẩn đối với thực vật (potentially phytotoxic).

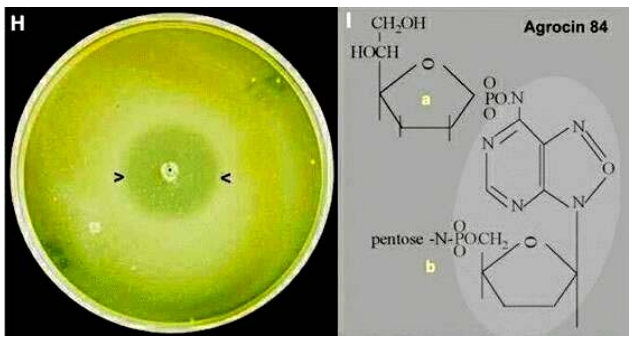
Tuy nhiên, đối với các nòi sản xuất nopaline của *A. tumefaciens* thì có một hệ thống phòng ngừa sinh học hiệu quả cao, đã được Allan Kerr ở Australia khám phá và phát triển. Nó được sử dụng ở Australia từ 1973 - một đại lý phòng ngừa sinh học có tính chất thương mại đầu tiên đối với bất kỳ bệnh thực vật nào. Hiện giờ nó được sử dụng khắp thế giới, và được tiếp thị bởi nhiều công ty dưới một loạt nhãn hiệu thương mại khác nhau (ví dụ, "Galltrol"). Xem *Crown Gall Disease of Nursery Crops* (Oregon State University; http://plant-disease.orst.edu/articles.cfm).

Kerr khám phá ra hệ thống phòng ngừa sinh học này (biocontrol system) bằng cách phân lập các nòi không gây bệnh của *Agrobacterium radiobacter* từ các vị trí bệnh và thử nghiệm khả năng cạnh tranh của chúng với các nòi gây bệnh trong các thí nghiệm cấy ủ hỗn hợp. Nhiều nòi

không gây bệnh giúp giảm thiểu sự lây nhiễm, nhưng đặc biệt là một nòi, *A. radiobacter* **nòi K84**, hoàn toàn ngăn chặn được bệnh khi bổ sung vào các vị trí tổn thương ở tỷ lệ 1:1 với các tế bào của *A. tumefaciens*. Đây là nòi được tiếp thị trên toàn cầu. Nó rất hiệu quả về mặt kinh tế ở chỗ, có thể bổ sung trên các đĩa thạch agar hoặc trong một cơ chất than bùn, và được dùng bằng cách tạo dịch huyền phù các tế bào vi khuẩn trong nước, sau đó nhúng các hạt, cây con hoặc nhúng các cành chiết vào trong dịch huyền phù trước khi đem gieo trồng. Nó hoạt động chỉ như là một biện pháp xử lý phòng bệnh, chứ không phải để cứu chữa các trường hợp lây nhiễm, vì vậy nó được áp dụng ở một mức quần thể cao để bảo vệ bất kỳ những vị trí tổn thương trầy xước nào chống lại sự xâm nhập của tác nhân gây bệnh.

*5. Phương thức hoạt động của nòi K84*

Như đã chỉ rõ ở Hình 8.15H, hiệu quả phòng ngừa cao của *A. radiobacter* nòi K84 được so sánh với các nòi khác có quan hệ đến việc sản xuất một chất ức chế trong nuôi cấy giống trong phòng thí nghiệm. Chỉ những nòi của *A. tumefaciens* có chứa một plasmid $T_i$ kiểu (nopaline-type plasmid) được phát hiện là bị ức chế trong các mẩu xét nghiệm, và chỉ những nòi này là được kiểm soát một cách hiệu quả bởi nòi K8 trong các thử nghiệm thực vật (xem Hình 8.15J bên dưới). May thay, các nòi có khả năng sử dụng nopaline đều là các tác nhân gây bệnh phổ biến hơn ở nhiều khu vực nông nghiệp và nghề làm vườn. Các nòi gây bệnh bằng các plasmid thuộc kiểu octopine-agropine đều không bị ức chế, và cũng không ức chế các vi khuẩn không có quan hệ họ hàng.



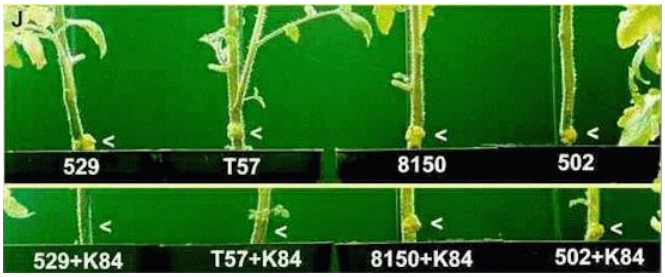

**Hình 8.15 H, J**

**H.** Đĩa agar được cấy *A. radiobacter* nòi K84 ở trung tâm và ủ trong 24 giờ trước khi vi khuẩn này bị giết chết bằng hơi khí chloroform. Sau đó lớp trên của agar được làm lạnh có chứa *A. tumefaciens* được rót qua một đĩa khác (kỹ thuật tráng lớp mỏng lên bề mặt đĩa: overlay plate technique). Sự sinh trưởng của tác nhân gây bệnh được ức chế ở một vùng rộng (các đầu mũi tên) xung quanh vết

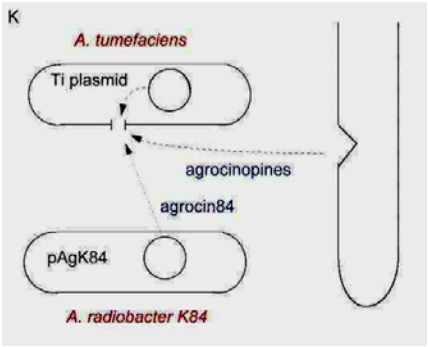
đốm là vị trí nòi K84 đã sinh trưởng. [Lưu ý: cả hai vi khuẩn đều tạo ra sự sinh trưởng màu trắng-kem; bản đĩa xuất hiện màu vàng bởi vì hình này là ảnh chụp đã qua xử lý để làm nổi bật vùng ức chế].

**I.** Cấu trúc của agrocin 84.

Các phát hiện này có vai trò ngăn ngừa đối với một phổ kháng sinh rộng "thông thường", nhưng chúng là điển hình về các hoạt động của các chất diệt khuẩn (**bacteriocins**) - các hợp chất được sản sinh bởi nhiều vi khuẩn (ví dụ *Escherichia coli*) và chúng tác động một cách đặc thù lên các nòi vi khuẩn của cùng một loài hoặc có quan hệ gần gũi. Tuy nhiên, không như hầu hết các chất diệt khuẩn có bản chất protein, chất diệt khuẩn sinh ra bởi nòi K84 đã được phát hiện là có một kiểu cấu trúc độc nhất (Hình 8.15 I) và được gọi là **agrocin 84**. Nó là một nucleotide kiểu adenine đánh lừa (fraudulent adenine-type nucleotide; phần sáng hơn của Hình 8.15 I) với hai chất dẫn xuất đường đính vào nó: (**a**) 6-carbon glucofuran phosphate và (**b**) pentanamide được methyl hoá (các chi thiết không được chỉ ra đầy đủ). [M.E. Tate *et al*., 1979; *Nature* **280**, 697-699].




**Hình 8.15 J** Tính chất đặc thù của hệ thống phòng ngừa của *A. radiobacter* nòi K84. Hình này cho thấy các gốc của 8 cây cà chua sinh trưởng trong các chậu đất. Hàng trên: các cây được tiêm truyền (các đầu mũi tên) với bốn nòi gây bệnh khác nhau của *A. tumefaciens* và ủ trong 3 tuần. Hàng dưới: các cây được xử lý giống nhau nhưng được tiêm truyền bằng một hỗn hợp 1 : 1 các tế bào của nòi gây bệnh và *A. radiobacter* nòi K84.




**Hình 8.15 K.** Phương thức hoạt động của agrocin 84. Các nòi gây bệnh của *A.*

*tumefaciens* với một plasmid *Ti* mã hoá cho việc sản sinh nopaline đồng thời cũng khiến cho cây sản xuất các agrocinopine. Plasmid này mã hoá cho enzyme agrocinopine permease, là chất được xen vào màng vi khuẩn. Chất ức chế, agrocin 84, được nhận biết bởi permease này, đi vào các tế bào gây bệnh và tại đó nó đình chỉ quá trình tổng hợp DNA.

Hai nòi gây bệnh 529 và T57 có các plasmid $T_i$ mã hoá cho việc sản xuất nopaline; chúng được kiểm soát bởi nòi K84. Các nòi 8150 và 502 có các plasmid $T_i$ mã hoá cho việc sản xuất các opine khác và không được kiểm soát bởi nòi K84.

Khả năng gây độc có chọn lọc của agrocin 84 đối với các nòi sản xuất nopaline được giải thích bằng sự kiện rằng các nòi này cũng gây cho cây sản xuất các agrocinopine, và các plasmid $T_i$ mã hoá cho một enzyme đặc thù **agrocinopine permease,** để tiếp nhận các dưỡng chất này (Hình 8.15K**).** Agrocin 84 được lấy vào thông qua permease này (vốn nhận biết gốc đường **a** ở Hình 8.15I) và, là một nucleotide tương đồng, đình chỉ tổng hợp DNA trong tác nhân gây bệnh.

*6. Những vấn đề và các bước phát triển trong kiểm soát sinh học*

*A. radiobacter* nòi K84 hầu như là một tác nhân kiểm soát sinh học hoàn hảo - mặc dù chúng ta đã nỗ lực để thiết kế một tác nhân kiểm soát nhưng khó có thể làm được điều đó tốt hơn!

Nó chứa một plasmid, gọi là **pAgK84**, mã hoá cho agrocin 84. Nó cũng chứa một plasmid khác, **pNOC**, mã hoá cho việc tiếp nhận và dị hoá nopaline. Như thế, trong các tình huống tự nhiên nòi K84 có thể tăng sinh tại các vị trí u sần (gall sites), thu lấy nguồn dưỡng chất (các opine) quyết định của tác nhân gây bệnh, và cũng giết chết tác nhân gây bệnh này bằng cách sản xuất agrocin 84. Ngoài các điểm này ra, và do tầm quan trọng đặc biệt cho sự kiểm soát sinh học có hiệu quả kinh tế, nòi K84 là một tập đoàn sinh vật thuộc địa rất hiệu quả cho các rễ cây khỏe mạnh và cho các vị trí tổn thương, cung ứng ít nhất một mức độ bảo vệ còn sót lại nào đó sau khi nó được áp dụng. Sự hình thành tập đoàn có hiệu quả này và sự tồn tại dai dẳng trên các rễ được coi ít nhất một phần là do các gene của nhiễm sắc thể, bởi vì nhiều nghiên cứu đã cho thấy rằng việc truyền đi của plasmid agrocin (pAgK84) vào một nòi *A. radiobacter* khác thì không thể làm cho chúng có hiệu quả bằng nòi K84 được.

Một vấn đề tiềm ẩn đang đe doạ sự thành công tiếp tục của hệ thống kiểm soát sinh học này, bởi vì plasmid agrocin về mặt lý thuyết có thể truyền sang các tế bào khác, kể cả các nòi gây bệnh (hoặc ngược lại). Điều này đã được xác nhận trong các điều kiện phòng thí nghiệm, và nếu như nó xảy ra trong tự nhiên thì sẽ tạo ra các nòi gây bệnh kháng được với

agrocin 84 - tất cả các sinh vật có sản sinh các chất ức chế hẳn cũng kháng được với các tác dụng của các chất ức chế này.

Plasmid agrocin không phải là plasmid tiếp hợp, nhưng pNOC (cũng có mặt trong nòi kiểm soát sinh học) là một plasmid tiếp hợp và nó có thể chuyển dịch plasmid agrocin trong quá trình truyền gene của riêng nó. Tần số truyền gene được tăng cường bởi sự có mặt của nopaline, như đã xảy ra tại các vị trí mà ở đó tác nhân gây bệnh được xác lập.

Để tránh sự phá vỡ tiềm tàng của việc kiểm soát sinh học, vùng truyền gene hay **vùng Tra** (**transfer region**) vốn giúp cho sự vận động của plasmid agrocin đã bị mất đi qua kỹ thuật di truyền, để tạo ra nòi đột biến plasmid $Tra^-$ (nhân tố truyền đi bị biến mất) của K84 gọi là ***A radiobacter*** **K1026**. Nòi được biến đổi di truyền hiện giờ được dùng để thay thế nòi K84 ở Australia. Nó có tất cả các ích lợi và sự an toàn của nòi K84, với tính bền vững thêm vào cho sự kiểm soát sinh học. Các phương pháp chi tiết của di truyền phân tử được sử dụng để thiết kế nòi này đã được M.H. Ryder và D.A. Jones mô tả năm 1991 (trên tạp chí *Australian Journal of Plant Physiology* **18**, 571-579.)

Nòi K1026 là vi sinh vật được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền đầu tiên được phóng thích để sử dụng rộng khắp trong môi trường. Nó sinh trưởng ở 37$^o$C và không ảnh hưởng đến con người và các động vật khác cũng như thực vật, và trong tất cả các mặt liên quan, ngoại trừ sự mất bớt (*deletion*) một phần bộ gene của nó; nó giống với các nòi xảy ra trong tự nhiên.

*7. Kỹ thuật di truyền thực vật với* A. tumefaciens

Cơ sở của kỹ thuật di truyền xử lý *Agrobacterium* là ở chỗ T-DNA của *A. tumefaciens* được cắt ra và chèn vào bộ gene thực vật như là một phần của quá trình lây nhiễm tự nhiên bởi vi khuẩn này. Như vậy, bất kỳ DNA ngoại lai nào được cho xen vào T-DNA cũng sẽ được hợp nhất.

Tuy nhiên, các phần thiết yếu duy nhất của T-DNA lại là các đoạn lặp biên (**border repeats**) rất bé (25 cặp base), ít nhất một trong các đoạn này cần thiết cho sự biến nạp thực vật. Vì vậy T-DNA được thiết kế để loại bỏ các gene mã hoá các hormone thực vật, và một đoạn dài của DNA được xen vào vốn có chứa một marker chọn lọc (ví dụ, một gene kháng kháng sinh; thông thường là kháng **kanamycin**). Độ dài này của DNA hẳn phải có chứa một vị trí giới hạn (**restriction site**) - một vị trí có trình tự nucleotide đặc thù mà *enzyme giới hạn* sẽ cắt DNA. Chẳng hạn, enzyme *Bam*HI cắt DNA bất kỳ ở đâu có trình tự nucleotide GGATCC trên một sợi DNA đơn. Nó để lại các đầu dính, vì vậy bất kỳ một mẩu DNA nào được cắt với cùng enzyme đó đều có thể xen vào vị trí này.

Sự biến nạp thực vật đòi hỏi:

- một tế bào *Agrobacterium* để hoạt động như là một vật truyền đối với plasmid biến nạp.
- một plasmid $T_i$ có các gene *Vir* hoạt đông chức năng (xem Hình 8.15G) để nhận biết các tín hiệu của thực vật và để cắt T-DNA
- T-DNA với các đoạn mất thích hợp và gene xen vào.

Tuy nhiên, T-DNA không cần phải ở trên cùng plasmid như các gene *Vir*, vì vậy thông thường người ta xây dựng một plasmid nhỏ hơn, có khả năng tự tái bản chứa T-DNA và đưa nó vào các tế bào *Agrobacterium* với một plasmid $T_i$ "không cánh" ('disarmed', một hệ thống vector thứ cấp).

Sự biến nạp thực vật có thể thành công bằng cách ủ *Agrobacterium* với các protoplast thực vật. Sau đó vi khuẩn này được giết chết bằng một chất kháng sinh, các protoplast được cho phép tái sinh các vách và tạo thành một mô nuôi cấy, các tế bào không được biến nạp sẽ bị giết chết bằng cách bổ sung kanamycin, và các tế bào còn lại (sống sót sau xử lý kanamycin bởi vì chúng có gene kháng) được dùng để tái sinh các cây từ mô nuôi cấy.

*Agrobacterium* cũng có thể được bổ sung vào các đĩa lá bất dục trong môi trường lỏng, sau đó dùng các hormone để cảm ứng sự ra rễ từ các đĩa lá này và bằng cách đó tái sinh các cây con.

Một phương pháp thứ ba có thể sử dụng cho một số thực vật như *Arabidopsis* - vi khuẩn này hoặc thậm chí DNA "trần" có thể đem ngâm/tiêm thông qua vỏ hạt để gây biến nạp.

Dưới đây là một số thành tựu khác của kỹ thuật di truyền ở thực vật.

(1) *Cải thiện chất lượng dinh dưỡng*: Lúa gạo là nguồn thực phẩm thiết yếu cho một tỷ lệ lớn dân số thế giới. Lúa gạo loại bỏ vỏ trấu và bất kỳ beta-carotene nào nó chứa. Beta-carotene là một chất tiền thân cho vitamin A, vì thế ta không ngạc nhiên gì khi vitamin A thiếu hụt khắp nơi, đặc biệt là ở các quốc gia Đông Nam Á.

Sự tổng hợp beta-carotene đòi hỏi một số khâu xúc tác bởi enzyme. Vào tháng Giêng năm 2000, một nhóm các nhà nghiên cứu châu Âu thông báo rằng họ đã thành công trong việc kết hợp ba gene truyền (three transgenes) vào các cây lúa giúp cho cây sản xuất được beta-carotene trong nội nhũ của chúng.

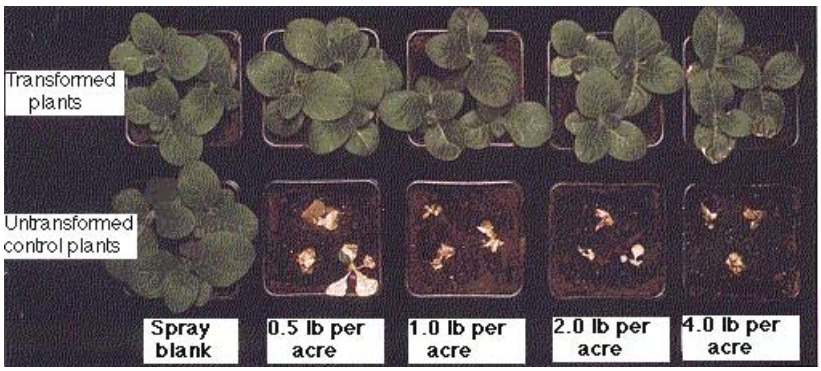
(2) *Kháng côn trùng*: ***Bacillus thuringiensis*** là một vi khuân gây bệnh đối với một số các côn trùng gây hại. Hiệu quả gây chết của nó do một độc tố có bản chất protein. Thông qua các phương pháp DNA tái tổ hợp, gene độc tố (toxin gene) có thể được đưa trực tiếp vào bộ gene thực vật mà tại

đó nó được biểu hiện và cung cấp khả năng bảo vệ chống lại côn trùng gây hại thực vật. (xem Kimball 2004).

(3) *Kháng bệnh*: Các gene cung cấp tính kháng chông lại các virus thực vật đã được chuyển thành công vào các cây trồng như thuốc lá, cà chua và khoai tây (Hình 8.16)

**Hình 8.16** Khoai tây lây nhiễm bởi virus đốm thuốc lá (tobacco mosaic virus = TMV). Các cây ở hàng sau có mang một gene được đưa vào có khả năng giúp cây kháng với virus. Các cây có tính kháng này cho lượng quả nhiều gấp ba lần các cây mẫn cảm (hàng trước) và cũng như vậy đối với các cây đối chứng. (Monsanto Company.)

(4) *Kháng chất diệt cỏ*: Hàng loạt câu hỏi được nêu ra về độ an toàn - cho cả con người và môi trường - của một số thuốc diệt cỏ có lá rộng như 2,4-D. Các dạng biến đổi đều có sẵn, nhưng chúng có thể gây hại cho mùa vụ cũng như cỏ dại mọc trong đó. Tuy nhiên, các gene kháng với một số các chất diệt cỏ mới đã được đưa vào một số thực vật và giúp chúng có khả năng phân huỷ các thuốc diệt cỏ (Hình 8.17). Ngoài ra, còn có một số thành tựu khác như tạo các giống cây trồng chịu mặn, chịu phèn, ...




**Hình 8.17** Hiệu quả của chất diệt cỏ bromoxynil lên các cây thuốc lá được biến nạp bằng gene của vi khuẩn mà sản phẩm của chúng có khả năng phân huỷ bromoxynil (hàng trên) và các cây đối chứng (hàng dưới). (Calgene, Davis, CA.)

## VI. Sử dụng các vi sinh vật để chuyển gen vào tế bào động vật

Các nhà khoa học hy vọng cải tiến các kỹ thuật để truyền gene vào động vật và, cuối cùng, vào con người. Các kỹ thuật truyền gene như thế có thể giúp ta có thêm các hiểu biết mới về chức năng của gene và protein, có thể cải thiện y tế cũng như năng suất và phẩm chất vật nuôi, và có thể dẫn tới các hệ thống tổng hợp protein an toàn và hiệu quả để sử dụng cho con người, đặc biệt là ở những khâu mà không thể thao tác thí nghiệm với các vi sinh vật. Một mục tiêu hấp dẫn đặc biệt là *liệu pháp gene* (gene therapy) - truyền gene vào các tế bào người để chữa các bệnh do các gene sai hỏng hoặc bị khuyết tật gây ra.

*1. Thay thế gene (gene replacement)*

Bằng cách thay các gene khyết tật bằng các gene có chức năng bình thường, liệu pháp gene chẳng mấy chốc có thể cứu chữa nhiều bệnh mà hiện thời không thể cứu chữa được hoặc chỉ điều trị triệu chứng. Chẳng hạn các bệnh đái tháo đường (diabete) có thể cứu chữa bằng cách đưa một gene insulin có chức năng bình thường thay cho một gene sai hỏng.

Các virus đã được chứng minh là những vector có hiệu quả nhất để truyền gene vào các tế bào động vật. Các virus sẵn sàng lây nhiễm các tế bào, và nói chung chúng có chứa các yếu tố kiểm soát được coi là tương thích với tế bào vật chủ. DNA của virus cũng có thể được đưa vào bằng kỹ thuật *chuyển nhiễm* (transfection), tức biến nạp bằng nucleic acid của virus, hoặc bằng *vi tiêm* (microinjection). Các vector virus được sử dụng phổ biến nhất trong liệu pháp gene là các retrovirus; chúng có khả năng xâm nhập vào nhiễm sắc thể tế bào chủ, và bằng cách đó làm cho DNA của chúng (và bất kỳ các gene ngoại lai nào được xen vào) trở thành một phần của bộ gene tế bào chủ.

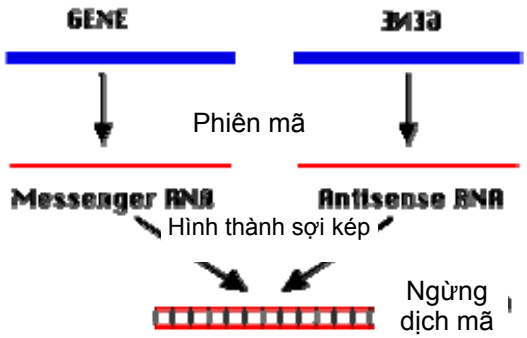
Liệu pháp gene đang mở ra những triển vọng to lớn trong việc chữa trị các căn bệnh phổ biến nhất, tác động tới hàng triệu người trên hành tinh như: bệnh máu khó đông, thiếu máu hông cầu hình liềm, u xơ nang, rối loạn dưỡng cơ, một số dạng ung thư, viêm gan do virus, các bệnh tim mạch, các bệnh thoái hóa thần kinh (bệnh Parkinson, bệnh Huntington, bệnh Alzheimer...) hay cả những bệnh mạn tính như đa thấp khớp, và có lẽ ngay cả AIDS.

Sự kiện nổi bật nhất là vào tháng 9 năm 1990, W.F.Anderson, R.M.Blaese và Ken Cuver thực hiện thành công ca liệu pháp gene đầu tiên trên một bé gái bốn tuổi mắc bệnh suy giảm miễn dịch phối hợp (SCID) do sự thiếu hụt *adenosine deaminase* (ADA), một enzyme đóng vai trò rất thiết yếu trong hệ thống miễn dịch. Bệnh này còn gọi là hội chứng

"bubble-boy", do một gene sai hỏng nằm ở gần đầu mút vai ngắn nhiễm sắc thể số 20 gây ra. Cháu bé này đã được tiêm các lympho bào (một kiểu tế bào máu trắng) được thiết kế bằng kỹ thuật sử dụng các retrovirus để mang gene ADA hoạt động chức năng; sau này cháu bé đã có được một hệ thống miễn dịch vận hành bình thường.

*2. Công nghệ antisense (antisense technology)*

Một cách tiếp cận khác đối với liệu pháp gene là dựa trên DNA tổng hợp được thiết kế để sản xuất *RNA đối nghĩa* (antisense RNA; Hình 8.18). Các RNA đối nghĩa được tạo thành có các trình tự nucleotide bổ sung với các mRNA được tạo ra bên trong tế bào. RNA đối nghĩa có tính đặc thù cao độ. Nó sẽ liên kết với phân tử mRNA bổ sung và bằng cách đó nó ngăn chặn sự dịch mã của nó và sự tạo thành sản phẩm protein. Công nghệ này cho phép kiểm soát các thông tin bất thường và có hại liên quan với ung thư và các trường hợp lây nhiễm vi sinh vật. RNA đối nghĩa cũng có thể kiểm soát việc sản xuất các protein vượt quá mức như amyloid phát hiện được trong bệnh Alzheimer. Trong khi RNA đối nghĩa có thể báo trước một cách rõ ràng một kỷ nguyên mới trong điều trị thuốc, thì hầu hết các thử nghiệm hiện giờ đang được tiến hành bằng các kỹ thuật nuôi cấy tế bào và các động vật thí nghiệm.



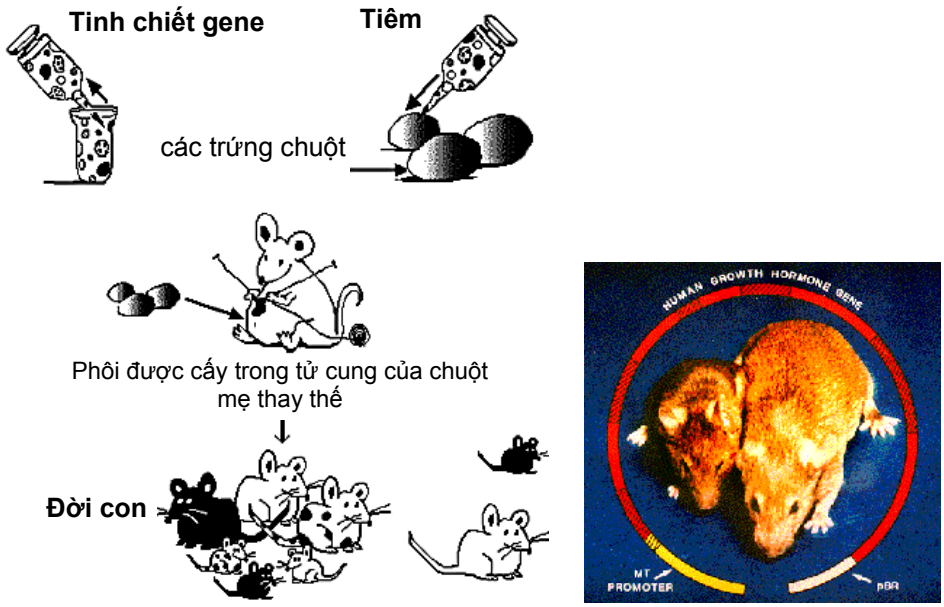

**Hình 8.18** Các kiểu phiên mã trên sợi có nghĩa và sợi đối nghĩa tạo ra mRNA và antisense RNA của cùng một gene. Sự kết cặp của hai sợi RNA này tạo thành sợi kép làm kìm hãm sự dịch mã của mRNA.

Bệnh nhân đầu tiên được chấp nhận áp dụng liệu pháp antisense ở người là người mắc bệnh bạch cầu cấp (acute leukemia). Năm 1992, sau khi tất cả các dạng trị liệu khác đều bị thất bại, bệnh nhân này đã được điều trị tĩnh mạch bằng một trình tự DNA có đích xác định là chống lại gene mà sự biểu hiện được tin tưởng là sẽ khiến cho các tế bào máu bình thường tở thành các tế bào bạch cầu. Hiệu quả của việc điều trị đã không thể xác định được bởi vì bệnh nhân này vốn rất ốm yếu và đã chết vì một

sự lây nhiễm. Tuy nhiên, thử nghiệm này đã cho thấy rằng không hề có các dấu hiệu nhiễm độc liên quan đến sự điều trị. Khi cuốn sách này được công bố, nhiều thử nghiệm trên người đã được tiến hành chỉ ra hiệu quả của các nucleic acid đối nghĩa chống lại các ung thư và các tác nhân lây nhiễm chẳng hạn như các virus papilloma ở người. Việc đưa các gene đối nghĩa vào các tế bào lympho người bị nhiễm HIV đã cho thấy triển vọng trong việc điều trị AIDS.

*3. Các động vật chuyển gene (transgenic animals)*

Đối với ngành chăn nuôi, công nghệ sinh học đã đạt được nhiều thành tựu đáng kể, chẳng hạn các kỹ thuật chuyển ghép gene áp dụng cho hợp tử và phôi ở các gia súc nhằm tăng cường khả năng chống bệnh và cải thiện giống nói chung; các kỹ thuật mới dùng để xác định giới tính của phôi v.v.




**Hình 8.19** Mô hình tổng quát về thí nghiệm truyền gene ở động vật (trái). Hình bên phải là của Brinster và Hammer cho thấy một con chuột chuyển gene (phải) với một con chuột bình thường.

Các gene được truyền cho các phôi động vật là nhằm nỗ lực xác định các gene này thông qua toàn bộ cơ thể. Chẳng hạn, các phôi bò đã tiếp nhận được các gene mới cho hormone sinh trưởng của bò. Các động vật nhận được các gene này sẽ sản sinh hormone sinh trưởng ở mức cao và do đó cho nhiều thịt và sữa hơn các động vật không được chuyển gene này. Việc truyền các gene ngoại lai vào các phôi có thể tạo ra *động vật chuyển*

*gene* (động vật có chứa các gene từ nhiều hơn một *chi*, genus) [Nói chung, tất cả các sinh vật được tạo ra bằng con đường biến đổi về mặt di truyền được gọi là *sinh vật biến đổi gene*; genetically modified organism = GMO]. Các thao tác như vậy đã dẫn tới việc tạo ra các con lợn có khả năng sản xuất hemoglobin người, protein trong các tế bào hồng cầu mang oxy. Các tiến bộ nhờ sử dụng lợn để sản xuất sản phẩm này thay vì vi khuẩn làm gia tăng gấp hai lần. Tuy nhiên, khó khăn là ở khâu sản xuất và tinh sạch số lượng lớn hemoglobin được tạo ra bằng sự lên men vi khuẩn.

Hình 8.19 cho thấy khả năng ứng dụng kỹ thuật cấy ghép gene trên trứng chuột đã được thụ tinh. Sau đó đem phôi đã ghép gene cấy vào trong tử cung của con chuột làm mẹ khác. Kết quả là tạo ra được chuột con có bộ lông dạng khảm như mong muốn. Điển hình cho các thí nghiệm truyền gene ở động vật là vào năm 1982, R.D.Palmiter, R.L.Brinster và các đồng sự ở Đại học Seatle (Philadelphia, USA) bằng cách truyền gene xác định hormone sinh trưởng của chuột cống vào trứng đã thụ tịnh của chuột bình thường, rồi cấy trở lại các tế bào đã được biến đổi gene vào vòi trứng của các chuột cái có thể mang thai cho đến cùng. Kết quả là, các tác giả này đã thu được dạng chuột nhắt có kích thước lớn gấp 2-3 lần chuột bình thường, gọi là *chuột khổng lồ*.

## VII. Tạo các giống vi sinh vật mới bằng kỹ thuật di truyền

Trong chọn tạo giống vi sinh vật bằng kỹ thuật di truyền, cho đến nay đã đạt được rất nhiều thành tựu có ý nghĩa và quan trọng đối với sự phát triển của chính lĩnh vực di truyền và công nghệ vi sinh vật, sự tiến bộ của y-dược học, sự phát triển bền vững của nông nghiệp và sinh thái môi trường... Một số hiểu biết liên quan về vấn đề này đã được đề cập rải rác ở các chương trước và ở các phần trước của chương này (xem thêm ở Bảng 8.2 và ở mục VIII bên dưới).

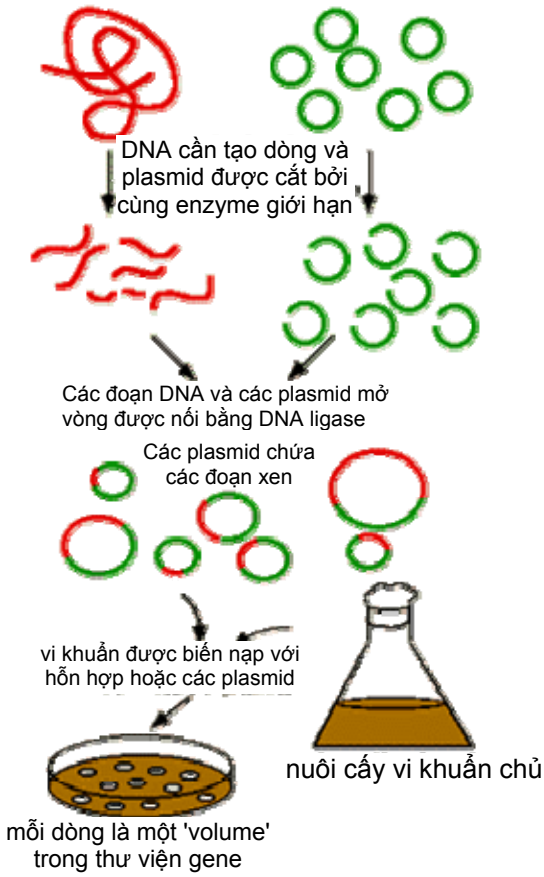
Chẳng hạn, người ta đã thực hiện thành công việc chuyển gene *cellulase* vào vi khuẩn (J.P.Aubert, France 1/1983), cải biến *E. coli* để sản xuất L-aspartat (hãng Tanabe, Japan 1985), ghép gene vào xạ khuẩn *S. violacconiger* để cải tiến việc sản sinh enzyme glucoisomerase (hãng Roquette và Cayla, France 1985). Ngoài ra, còn tạo được các giống vi sinh vật biến đổi gene có khả năng ăn cặn dầu dùng để xử lý các phế thải có độc tố nhằm bảo vệ môi sinh. Bên cạnh việc tạo ra giống nấm men mới có thể giết chết các vi khuẩn xuất hiện trong bia (hãng Suntory, 1985), còn tạo được chủng nấm men sản xuất insulin (bán trên thị trường từ 1982) và interferon (A. Kimura, Japan 1986) v.v.

## VIII. Một số ứng dụng khác của kỹ thuật di truyền ở vi sinh vật

*1. Công nghệ DNA tái tổ hợp với việc nghiên cứu bộ gene*

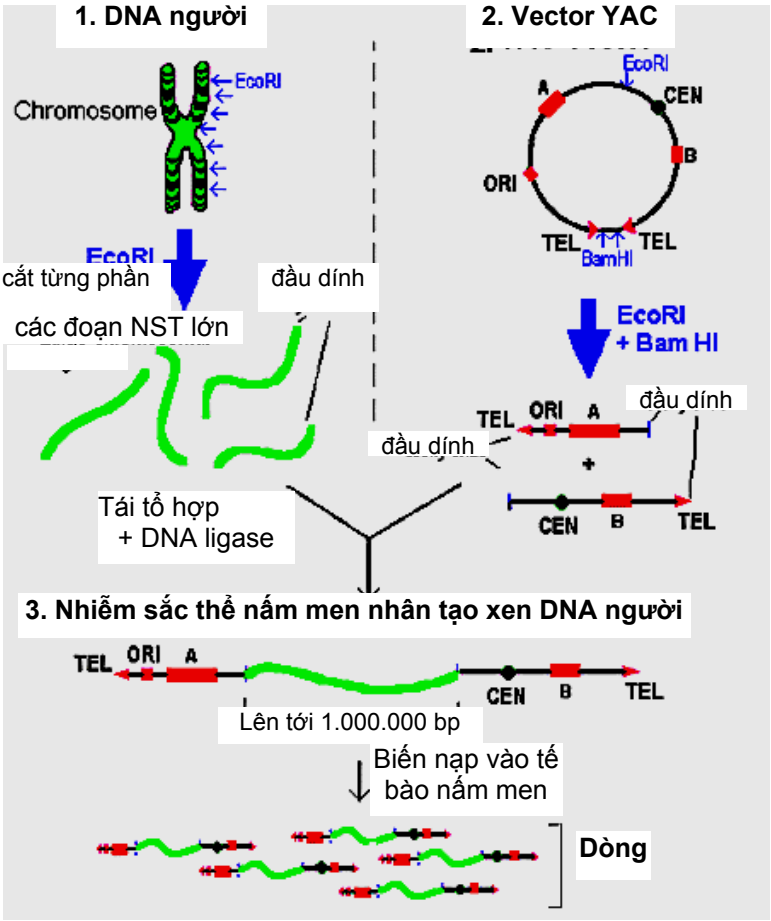
Việc tách dòng tái tổ hợp cho phép nhận được một số lượng lớn bất kỳ gene hoặc vùng điều hoà nào để tiến hành phân tích trình tự nucleotide, xác định các vùng chức năng và chỉ ra các cơ chế hoạt động của chúng. Nhờ đó đã đưa lại những hiểu biết mới về tổ chức và hoạt động của các bộ gene prokaryote (như các khởi điểm tái bản, các vùng điều hoà phiên mã, các gene nhảy v.v.) và ở các bộ gene eukaryote (như các centromere, telomere, các gene phân đoạn, các gene giả, DNA lặp lại v.v.) như đã được thảo luận ở các chương trước.

*Thư viện gene* (gene library) là một bộ sưu tập các đoạn DNA được tạo dòng chứa toàn bộ thông tin di truyền của một sinh vật cụ thể; các dòng này được đựng riêng rẽ trong các hộp nuôi cấy vi khuẩn, mỗi hộp chỉ chứa một phần của bộ gene.




**Hình 8.20** Xây dựng thư viện gene hay thư viện bộ gene (gene or genomic library) bằng các thí nghiệm tạo dòng plasmid tái tổ hợp ở vi khuẩn.

Bằng các thí nghiệm tạo dòng plasmid tái tổ hợp kinh điển ở vi khuẩn *E. coli* (hình 8.20), và bằng cách cải tiến sử dụng *nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men* này (yeast artificial chromosome = YAC; hình 8.21), người ta đã thành lập các *thư viện gene* (gene library) hay *thư viện bộ gene* (genomic library) để trên cơ sở đó tiến hành lập *bản đồ vật lý* (physical map) và xác định trình tự DNA bộ gene của nhiều sinh vật khác nhau, kể cả bộ gene người (NHGRI 2005). Nếu như vào năm 1977, F.Sanger xác định đầy đủ các trình tự phage ΦX174 (5386 nucleotide với 9 gene) và phage G4 (5577 nucleotide với 10 gene), thì đến nay người ta xác định và lập bản đồ cho các DNA có kích thước lớn hơn nhiều; ví dụ: bộ gene phage lambda gồm 48.502 bp với khoảng 61 gene (1983), nhiễm sắc thể số 3 của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* gồm 370.000 bp (1992) v.v...




**Hình 8.21** Xây dựng thư viện gene bằng các thí nghiệm tạo dòng tái tổ hợp nhờ sử dụng nhiễm sắc thể nấm men nhân tạo (YAC).

Đáng kể là, *Dự án Bộ gene Người* (Human Genome Project = HGP; hình 8.22) đã chính thức đi vào hoạt động từ 1990 do James Watson chủ trì cùng với sự cộng tác của nhiều nhà khoa học trên thế giới. Việc phân tích trình tự bộ gene người đã được hoàn thành vào 4/2003, cho thấy bộ gene (*genome*) của chúng ta có trình tự đầy đủ gồm 3.164.700.000 cặp base, chứa đựng khoảng 25.000 gene mã hóa protein chịu trách nhiệm xây dựng nên một bộ protein (*proteome*) gồm khoảng 50.000 protein khác nhau trong các tế bào. HGP thực sự là một trong những kỳ công thám hiểm vĩ đại nhất trong lịch sử; lần đầu tiên HGP cho phép chúng ta đọc được toàn bộ thông tin di truyền của tự nhiên đã làm nên con người (NHGRI 2005).

**Hình 8.22** Biểu tượng của HGP cho thấy tác động của dự án này lên nhiều lĩnh vực quan trọng của kinh tế - xã hội, các vấn đề về môi sinh, sức khoẻ và đời sống con người trên phạm vi toàn cầu.

*2. Công nghệ DNA tái tổ hợp với y-dược học*

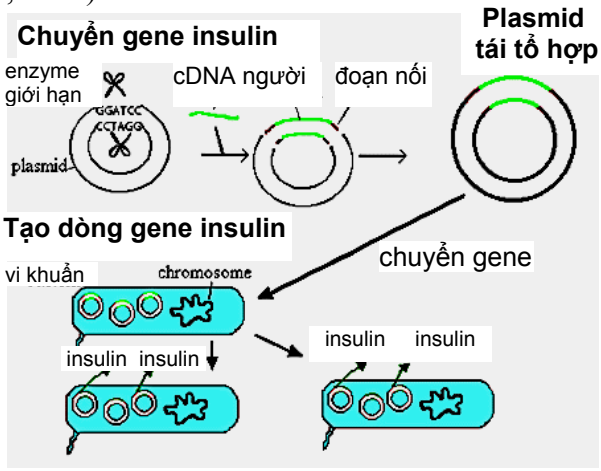
2.1. Sản xuất các chế phẩm y-sinh học bằng công nghệ DNA tái tổ hợp

Nếu như vào năm 1972, giáo sư Roger Guillemin (France) đã phải dùng tới 500.000 não cừu mới tinh chiết được vài miligram *somatostatin*, một hormone sinh trưởng của vùng dưới đồi thị (với công trình này ông đã được trao giải Nobel năm 1980), thì vào 10/1977 Hebert Boyer (USA) đã chế tạo thành công hormone này từ *E. coli* bằng phương pháp DNA tái tổ hợp. Đến 8/1978 chính Boyer lại là người đầu tiên cho sản xuất thành công insulin người từ *E. coli* (hình 8.23). Các thành tựu đầu tiên này đã mở ra một kỷ nguyên mới phát triển rực rỡ nhất trong lịch sử công nghệ sinh học, công nghệ DNA tái tổ hợp.

Sau đó là hàng loạt các chế phẩm khác như các hormone tăng trưởng của người (human growth hormone = HGH), bò (BGH), lợn (PGH), các vaccine và các interferon phòng chống các căn bệnh nan ở người y như ung thư, viêm gan ... và một số bệnh quan trọng ở gia súc như hiện tượng

'lở mồm-long móng' do virus gây ra... tất cả đều được sản xuất từ *E. coli*. Đặc biệt là, sự ra đời của các hãng, các công ty lớn đã đầu tư mạnh mẽ cho sự phát triển của kỹ nghệ này. Nhờ vậy đã góp phần giải quyết một cách có hiệu quả nhiều vấn đề thực tiễn đặt ra trong y học, trong chăn nuôi-thú y, và nông nghiệp nói chung v.v... (xem Bảng 8.2).

Ở nước ta cũng đã có một số công trình nghiên cứu về các vấn đề này, chẳng hạn như nghiên cứu sự sai khác di truyền ở gene hormon sinh trưởng của một số giống gà Việt Nam. Qua đó cho thấy intron I của gene hormon sinh trưởng ở các giống gà Ri, gà Mía, gà Ác, gà Hồ dài hơn kích thước dự đoán của gene hormon sinh trưởng gà đã được Tanaka công bố năm 1992 (Trần Xuân Hoàn, 2004).




(a) (b)

**Hình 8.23** (a) H. Boyer (trái) và S. Cohen; và (b) sơ đồ thí nghiệm tạo dòng và biểu hiện gene insulin người ở vi khuẩn *E. coli*.

Bên cạnh việc sản xuất các hormone, vaccine... nói trên, người ta còn sản xuất được các *kháng thể đơn dòng* (monocloning antibodies) dùng để: (i) xác định vi khuẩn gây bệnh (như thương hàn chẳng hạn); (ii) xác định mức hormone từ đó đánh giá chức năng tuyến nội tiết hoặc sự thay đổi trong quá trình tổng hợp hormone do khối u gây ra; (iii) phát hiện một số protein có ý nghĩa trong chẩn đoán khối u hoặc một số tình trạng trước khi sinh; (iv) phát hiện các thuốc bị cấm có trong máu, hoặc kiểm tra nồng độ thuốc trong máu và tổ chức nhằm đảm bảo liều thuốc sử dụng sao cho không vượt quá ngưỡng gây độc v.v. Nhờ có tính đặc hiệu và chính xác cao và sử dụng dễ dàng, việc sản xuất các kháng thể đơn dòng đã tạo nên một nhánh phát triển mau lẹ nhất của công nghệ sinh học, và cùng với việc sản xuất các vaccine chúng đã trở thành những phương tiện quan trọng nhất trong chính sách y tế cộng đồng của các nước đang phát triển và xét

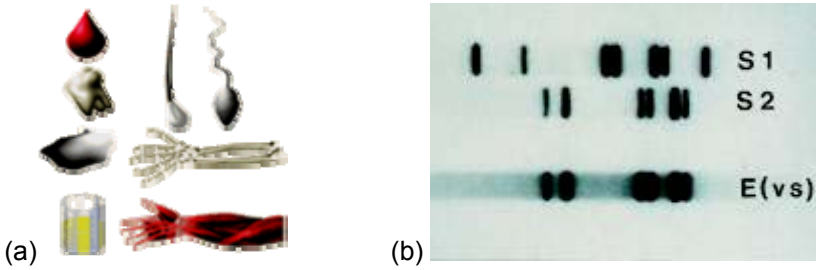
về lâu dài, việc ứng dụng các kháng thể đơn dòng có triển vọng chữa được nhiều bệnh trong đó có các khối u ác tính.

2.2. Ứng dụng kỹ thuật di truyền trong chẩn đoán và điều trị gene

Trong *chẩn đoán bệnh ở mức phân tử*, thành tựu nổi bật nhất là vào năm 1981, lần đầu tiên bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm được chẩn đoán trước sinh ở mức độ gene nhờ phân tích DNA bằng enzyme giới hạn. Từ đây đã mở ra hai hướng chính trong chẩn đoán gene là: chẩn đoán các bất thường bẩm sinh và chẩn đoán các bất thường DNA soma. Một số thành tựu khác đạt được theo hướng đầu gồm có: bệnh hemophilia A, rối loạn dưỡng cơ Duchenne, hội chứng X-fragile, bệnh retinoblastoma - một dạng ung thư võng mạc...Theo hướng sau, người ta đã áp dụng đối với một số dạng ung thư máu như các lympho Burkitt, lympho nang, bệnh bạch cầu...Đáng kể là gần đây, người ta đã xác định được nhiều gene gây bệnh quan trọng ở người, như: gene gây *bệnh hóa xơ nang* (cystic fibrosis) năm 1990, gene gây bệnh Huntington năm 1993...

*Liệu pháp gene*, như đã đề cập ở trước, là một phương thức sản xuất và điều trị mới bằng các phân tử trị liệu. Đây là hướng có nhiều triển vọng nhất nhưng khó thực hiện nhất vì nó có liên quan đến cả vấn đề phương pháp luận lẫn khía cạnh đạo lý (xem mục VI-1).

2.3. Kỹ thuật di truyền với hình pháp học và một số vấn đề xã hội khác




**Hình 8.24**

(a) Các mẫu dùng cho xét nghiệm và phân tích DNA (một giọt máu, một cái răng, một chân tóc, một tinh trùng ...).

(b) Dấu vân DNA (*DNA finger-printing*) có thể giúp các nhà nghiên cứu xác định khả nghi trong trường hợp tội phạm. Kiểu đường nằm ngang biểu thị cho bản chất di truyền của một người. Trong mẫu này cho thấy các băng của máu người mang mã số S2 khả nghi trùng khớp với bằng chứng, mẫu máu E(vs).

Kỹ thuật di truyền còn được ứng dụng rất hiệu quả trong các ngành hình pháp học, chẳng hạn bằng cách sử dụng kỹ thuật '*dấu vân DNA*' (DNA fingerprinting) thay cho 'dấu vân tay' trước đây cho phép các ngành cảnh sát hình sự có thể xác định chính xác các tội phạm (hình 8.24); các

trung tâm phân tích DNA và tư vấn di truyền có thể giúp xác định quan hệ huyết thống giữa các anh em hay giữa cha/mẹ với con cái trong những trường hợp cần thiết; hoặc nhận dạng xác nạn nhân trong chiến tranh hoặc do tai nạn gây ra v.v.

Ở nước ta, trong thời gian gần đây đã bắt đầu phát triển một số trung tâm chuyên xét nghiệm, phân tích DNA (chẳng hạn, các trung tâm thuộc Bộ Công an, và của GS.TS. Lê Đình Lương) cũng như một số phòng thí nghiệm ở các Bệnh viện lớn.

## Câu hỏi và Bài tập

1. Thế nào là enzyme giới hạn? Chúng có những tính chất nào mà được coi là công cụ thiết yếu đối với công nghệ DNA tái tổ hợp? Bằng hai ví dụ về enzyme giới hạn, hãy chứng tỏ rằng ít nhất có hai phương pháp thành lập các phân tử DNA tái tổ hợp *in vitro*.

2. Từ các enzyme giới hạn BamHI, EcoRI và HindIII ở Bảng 10.1 và BglII có đoạn đích được biết là A↓GATCT, hãy cho biết cặp enzyme nào sẽ tạo ra các đầu dính hay đầu bổ sung (sticky/complementary ends) tương thích? Trình tự của đầu dính tương thích này là gì?

3. Giả sử bạn cắt hai DNA khác nhau, một với BamHI và một với BglII, sau đó nối chúng lại với nhau thông qua các đầu dính tương thích. Một khi đã khâu nối rồi, bạn có thể tách hai DNA này lần nữa bằng một trong hai enzyme giới hạn đó hay không? Tại sao, hoặc tại sao không?

4. Giả sử bạn đưa (biến nạp) một DNA tái tổ hợp cho một vi khuẩn và do nhầm lẫn, bạn đặt các tế bào được biến nạp đó trên môi trường không có chất kháng sinh nào cả. Kết quả mà bạn quan sát được là gì? Tại sao?

5. Giả sử rằng bạn chiết xuất được một enzyme cắt giới hạn từ loài vi khuẩn có tên khoa học là *Xenobacterium giganticus*. Theo danh pháp đã học, bạn sẽ viết tên enzyme đó như thế nào?

6. Cho biết trình tự của một đoạn DNA có chứa một vị trí nhận biết đối xứng xuôi ngược (palindromic recognition site) cho một enzyme giới hạn là: GACGATATCAACT. Hãy tìm trình tự của vị trí nhận biết đó.

7. Thế nào là phân tử DNA tái tổ hợp, vector tách dòng? Hãy nêu các bước của quy trình tạo dòng gene tái tổ hợp và cho sơ đồ minh hoạ.

8. Giả sử tinh chế được plasmid pBR322 và phân tử DNA người có chứa một gene cần nghiên cứu. Hãy phân tích kỹ thuật tạo dòng gene nói trên ở *E. coli*.

9. Enzyme phiên mã ngược là gì? Nó được tinh chế từ loại sinh vật

nào và được ứng dụng vào khâu nào trong công nghệ DNA tái tổ hợp? Giải thích và cho sơ đồ minh hoạ.

10. Có thể sử dụng các chất kháng sinh để xác định xem liệu plasmid pBR322 đã nhận được một đoạn xen ở trong vị trí EcoRI của nó hay không? Tại sao, hoặc tại sao không?

## Tài liệu Tham khảo


**Tiếng Việt**

Hồ Huỳnh Thuỳ Dương. 1997. *Sinh học Phân tử*. NXB Giáo Dục.

Phạm Thành Hổ. 2000. *Di truyền học* (tái bản lần II). NXB Giáo Dục.

Lê Đình Lương. 2001. *Nguyên lý Kỹ thuật Di truyền*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

Phan Cự Nhân. 1999. Công nghệ DNA tái tổ hợp. Trong: *Di truyền học* tập II (Phan Cự Nhân, chủ biên). Trang: 257-303. NXB Giáo Dục, Hà Nội.

Hoàng Trọng Phán. 1995. *Một số vấn đề về Di truyền học hiện đại* (Tài liệu BDTX cho giáo viên THPT chu kỳ 1993-1996). Trường ĐHSP Huế.

Hoàng Trọng Phán. 1999. *Di truyền học Phân tử*. NXB Giáo Dục.

Hoàng Trọng Phán. 1999. "Giới thiệu công nghệ sinh học"; và "Cơ sở khoa học của công nghệ sinh học". Trong: *Chuyên đề công nghệ sinh học* (Tài liệu BDTX giáo viên THPT chu kỳ 1997-2000; biên soạn chung với Nguyễn Bá Lộc và Biền Văn Minh). Trang: 56-96. Trường ĐHSP Huế.

**Tiếng Anh**

Birch RG. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 297-326.

Campbell NA, Reece JB. 2001. *Essential Biology*. Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc, San Francisco, CA.

Collins FS, Green ED, Guttmacher AE DNA Guyer MS. 2003. A Vision for the Future of Genomics Research. *Nature*, Vol.422, No.6934, p.835-847.

Farrand SK. 1990. *Agrobacterium radiobacter* K84: a model biocontrol system. pp. 679-691 in, *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. (Publ. Alan R Liss Inc.)

Grierson D. (ed.). 1991. *Plant Genetic Engineering*. Blackie, Glasgow.

Hartwell, Hood, Goldberg, Reynolds, Silver, Veres. 2004. *Genetics* -

*From Genes to Genomes*. 2nd Edition. McGraw Hill, Inc., New York.

Kimball J. 2004. http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/

Lewis R. 2003. *Human Genetics: Concepts DNA Applications*. 5th ed, McGraw-Hill, Inc, NY.

Maloy, S. 2006. *Microbial Genetics*.

http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/genetics/

http://www.life.uiuc.edu/micro/316/supplement.html

Palladino MA. 2002. *Understanding the Human Genome Project*. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, Menlo Park, CA.

Ryder MH, Jones DA. 1990. Biological control of crown gall. pp. 45-63 in, *Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens* (D Hornby, ed.). CAB International, Wallingford.

Sigee DC. 1993. *Bacterial Plant Pathology: Cell and Molecular Aspects*. Cambridge University Press.

Tinland B. 1996. The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends in Plant Science* 1, 178-184.

Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. 1992. *Recombinant DNA*. 2nd ed, Scientific American Books, New York.

Weaver RF, Hedrick PW. 1997. *Genetics*. 3rd ed, McGraw-Hill Companies, Inc. Wm.C.Browm Publishers, Dubuque, IA.

**Một số trang web liên quan**

Agricultural Biotechnology (Công nghệ sinh học nông nghiệp):

http://www.aphis.usda_gov/biotechnology/

http://www.agbioworld.org

http://www.colostate.edu/programs/lifescience/TransgenicCrops/

http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/

http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/bt.htm#Top

http://plant-disease.orst.edu/articles.cfm

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM™):

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/mimstats.html

The Institute for Genomic Research: http://www.tigr.org

Celera Genomics Corp.: http://www.celera.com

# Mục lục

**Lời nói đầu** 3
**Mục lục** 5
***Bài mở đầu:*** **Di truyền học vi sinh vật và cuộc cách mạng công nghệ sinh học**
***Hoàng Trọng Phán*** 8
***Chương 1:*** **Các đặc điểm của di truyền học vi sinh vật**
***Hoàng Trọng Phán*** 23
I. Lược sử vi sinh vật học 23
II. Các loại tế bào 24
III. Đặc điểm của vi sinh vật 30
IV. Các phương pháp nghiên cứu đặc thù của di truyền học VSV và một số phương pháp sinh học phân tử thông dụng 34
V. Vai trò của vi sinh vật trong đời sống và sản xuất 44
***Chương 2:*** **Cơ sở phân tử của tính di truyền**
***Hoàng Trọng Phán*** 50
I. Sơ lược về thành phần hoá học và cấu trúc của các nucleic acid 50
II. Tổ chức phân tử của các nhiễm sắc thể vi khuẩn và sinh vật nhân chuẩn 54
III. Tái bản DNA (DNA replication) 61
IV. Phiên mã (transcription) và các loại RNA ở prokaryote 64
V. Cơ chế dịch mã (transcription) ở prokaryote 69
***Chương 3*****: Điều hoà biểu hiện gene ở vi khuẩn**
***Hoàng Trọng Phán*** 76
I. Các nguyên lý điều hoà 76
II. Mô hình Operon 77
III. Điều hoà âm tính của các operon cảm ứng: *lac* operon 79
1. Cấu trúc của *lac* operon 79
2. Cơ chế điều hoà âm tính của *lac* operon 80
3. Các thể đột biến của *lac* operon 81
IV. Điều hoà âm tính của các operon ức chế: *trp* operon 84
1. Cấu trúc của *trp* operon 85

2. Cơ chế điều hoà âm tính của *trp* operon 85
V. Sự ức chế dị hoá (catabolite repression): Điều hoà dương tính của *lac* operon 87
VI. Sự kết thúc phiên mã sớm (attenuation) ở *trp* operon 89
VII. Sự tự điều hoà (autoregulation) 91
VIII. Điều hoà ở mức dịch mã 92

***Chương 4*: Biến dị ở vi sinh vật**

***Trương Thị Bích Phượng*** 97
I. Đột biến gene ở vi sinh vật 97
1. Các kiểu đột biến gene 97
2. Các tác nhân gây đột biến (mutagens) 102
3. Phát hiện các thể đột biến 105
4. Cơ chế phân tử của các đột biến gene 106
II. Sửa chữa và bảo vệ DNA ở vi khuẩn 107
1. Quang phục hoạt (photoreactivation) 107
2. Sửa chữa bằng cắt bỏ (excision repair) 107
3. Sửa chữa kết cặp sai (mismatch repair) 109
4. Sửa chữa tái tổ hợp và error-prone 110
5. Bảo vệ DNA vi khuẩn bằng hệ thống các enzyme methylase và restrictase 111
III. Các yếu tố di truyền vận động (transposable genetic elements) 112
1. Các yếu tố di truyền vận động ở vi khuẩn 112
2. Các yếu tố di truyền vận động ở virus 115
3. Các yếu tố di truyền vận động ở vi nấm 115

***Chương 5*: Di truyền học virus**

***Trương Thị Bích Phượng*** 118
I. Đặc tính của các virus 118
1. Tính đa dạng về cấu trúc và thành phần di truyền 118
2. Tính đặc thù về vật chủ (host specificity) 118
II. Di truyền học thể thực khuẩn (bacteriophage hay phage) 118
1. Sự hình thành vết tan và các thể đột biến phage 118
2. Tái tổ hợp di truyền trong một chu kỳ sinh tan (lytic cycle) 120
3. Sự sắp xếp của các gene trong nhiễm sắc thể phage 120

4. Lập bản đò cấu trúc tinh vi vùng rII của phage T4 122
5. Tính tiềm tan (lysogeny) và phage λ 125
III. Tái bản của các virus 128
1. Các virus của vi khuẩn 128
2. Các virus thực vật 130
3. Các virus động vật 131
4. Các virus gây ung thư, HIV/AIDS 132

***Chương 6*: Di truyền học vi khuẩn**

***Hoàng Trọng Phán*** 138
I. Làm việc với vi khuẩn 139
1. Các thể đột biến của vi khuẩn 141
2. Kiểu hình và kiểu gene của vi khuẩn 142
II. Biến nạp (transformation) ở vi khuẩn 143
1. Định nghĩa, thí nghiệm và đặc điểm chung 143
2. Cơ chế phân tử của biến nạp 143
III. Tiếp hợp (conjugation) ở vi khuẩn 145
1. Định nghĩa, thí nghiệm và đặc điểm chung 145
2. Các plasmid và sự truyền DNA ở vi khuẩn 150
3. Nòi Hfr 151
4. Sự xen plasmid F vào nhiễm sắc thể vật chủ 152
5. Lập bản đồ bằng tiếp hợp ngắt quãng 154
6. Lập bản đồ với *E. coli*: Các plasmid F' và trắc nghiệm *cis-trans* 155
IV. Tải nạp (transduction) 156
1. Định nghĩa, thí nghiệm và đặc điểm chung 156
2. Tải nạp chung (generalized transduction) 156
3. Tải nạp chuyên biệt (specialized transduction) 158
4. Lập bản đồ các đột biến bằng tải nạp 159

***Chương 7*: Di truyền học vi nấm và vi tảo**

***Trương Thị Bích Phượng*** 162
I. Đại cương về nghiên cứu di truyền ở một số vi tảo thông dụng 162
II. Phân tích di truyền ở vi nấm 163
1. Tính không dung hợp ở vi nấm 163

2. Phân tích bộ bốn và lập bản đồ ở vi nấm 164
3. Phân tích di truyền trong chu trình cận hữu tính (tái tổ hợp trong nguyên phân) 167
III. Nấm men như là *E. coli* của các tế bào eukaryote 168
1. Các nhiễm sắc thể nấm men nhân tạo (YAC) 168
2. Những hiểu biết mới về tổ chức của các nhiễm sắc thể nấm men 170
3. Những hiểu biết mới về tái bản và phiên mã của bộ gene nấm men 170
4. Những hiểu biết mới về DNA ty thể của nấm men 172
***Chương 8*: Di truyền vi sinh vật và công nghệ gene**
***Hoàng Trọng Phán*** 175
I. Các công cụ thiết yếu của kỹ thuật di truyền 175
1. Các enzyme giới hạn và một số enzyme khác 175
2. Các vector 178
II. Các phương pháp cơ bản của việc xây dựng phân tử DNA tái tổ hợp *in vitro* 182
III. Tạo dòng gene ở vi khuẩn 183
1. Phân lập và tách chiết các đoạn DNA ngoại lai 184
2. Kiến tạo phân tử DNA tái tổ hợp *in vitro* 184
3. Chọn lọc vật chủ thích hợp và chuyển các gene vào tế bào chủ 185
4. Xác định các vi khuẩn tái tổ hợp 186
5. Phát hiện và sàng lọc nucleic acid ngoại lai và protein 188
6. Cho biểu hiện gene ngoại lai 190
IV. Phóng thích ra môi trường các sinh vật được biến đổi gene 193
V. Sử dụng các vi sinh vật để chuyển gene vào các thực vật 196
VI. Sử dụng các vi sinh vật để chuyển gene vào tế bào động vật 208
VII. Tạo các giống vi sinh vật mới bằng kỹ thuật di truyền 211
VIII. Một số ứng dụng khác của kỹ thuật di truyền ở vi sinh vật 211