

# Di truyền tế bào

Nguyễn Như Hiền



NXB Đại học quốc gia Hà Nội 2005.

*Từ khoá:* Di truyền tế bào, AND, Cấu trúc phân tử, Mã di truyền, Cấu trúc của gen, Hardy- Weinberg, Tiến hóa vi mô, Thể nhiễm sắc của tế bào, T. Morgan, C. B. Bridges, Kiểu nhân, Băng nhiễm sắc, Biến dị, Thường biến, Đột biến gen, Đột biến nhiễm sắc thể, Biến dị di truyền, Quy luật Mendel, Quy luật phân ly, Lai phân tích, Cơ sở tế bào, Hoán vị gen, Chu kỳ sống, Sự phân giao, Phân bào nguyên nhiễm, Sinh sản vô tính, Sinh sản hữu tính, Phân bào giảm nhiễm, Tế bào Soma, Ung thư, Lai tế bào, Tế bào lành, tế bào ung thư.

*Tài liệu trong Thư viện điện tử ĐH Khoa học Tự nhiên có thể được sử dụng cho mục đích học tập và nghiên cứu cá nhân. Nghiêm cấm mọi hình thức sao chép, in ấn phục vụ các mục đích khác nếu không được sự chấp thuận của nhà xuất bản và tác giả.*

## Mục lục

<b>Lời nói đầu</b> .....	5
<b>Chương 1 Cơ sở phân tử của di truyền tế bào</b> .....	7
1.1 ADN – vật chất mang thông tin di truyền .....	7
1.1.1 Nhân tố chuyển dạng của Griffith .....	7
1.1.2 Thí nghiệm của A. Hershey và M. Chase.....	8
1.1.3 Mô hình cấu trúc phân tử của ADN .....	8
1.1.4 Sự tái bản của ADN .....	9
1.2 Từ ADN đến ARN và đến Protein - Sự biểu hiện thông tin di truyền .....	12
1.2.1 Mã di truyền .....	12

1.2.2	Sự phiên mã (transcription).....	14
1.2.3	Sự dịch mã (translation).....	16
1.3	Khái niệm về gen và hệ gen.....	18
1.3.1	Cấu trúc của gen.....	18
1.3.2	Hệ gen (genome). Tổ chức của hệ gen.....	23
1.4	Sự điều hòa hoạt động của gen.....	28
1.4.1	Điều hòa hoạt động của gen ở sinh vật nhân sơ.....	28
1.4.2	Điều hòa hoạt động của gen ở sinh vật nhân chuẩn.....	30
1.5	Tiến hóa của hệ gen.....	35
1.5.1	Hàm lượng ADN.....	35
1.5.2	Vốn gen (gene pool). Biến dị di truyền trong quần thể.....	36
1.5.3	Phân tích vốn gen. Công thức Hardy- Weinberg.....	37
1.5.4	Tiến hóa vi mô (Microevolution).....	38
<b>Chương 2 Thể nhiễm sắc của tế bào - tổ chức chứa ADN.....</b>		<b>41</b>
2.1	Hình thái thể nhiễm sắc.....	41
2.1.1	Kích thước thể nhiễm sắc.....	41
2.1.2	Số lượng thể nhiễm sắc.....	42
2.2	Cấu trúc hiển vi của thể nhiễm sắc.....	44
2.2.1	Thể nhiễm sắc thường và thể nhiễm sắc giới tính.....	44
2.2.2	Trung tiết (Centromere).....	48
2.2.3	Thế mút (telomere).....	49
2.2.4	Các băng nhiễm sắc (chromosome bands).....	50
2.3	Cấu trúc siêu vi của thể nhiễm sắc.....	51
2.4	Học thuyết thể nhiễm sắc của Di truyền.....	52
2.4.1	Thí nghiệm của T. Morgan.....	52
2.4.2	Thí nghiệm của C. B. Bridges.....	54
2.4.3	Cơ sở thể nhiễm sắc của các quy luật Mendel.....	55
2.5	Kiểu nhân - Tiến hóa của kiểu nhân.....	56
2.5.1	Kiểu nhân (caryotype).....	56
2.5.2	Tiến hóa kiểu nhân ở tế bào nhân chuẩn (Eukaryota).....	61
2.5.3	Nghiên cứu kiểu nhân ở côn trùng truyền bệnh.....	66
2.5.4	Phương pháp nhận biết loài.....	68
<b>Chương 3 Cơ sở tế bào của biến dị di truyền.....</b>		<b>70</b>
3.1	Đặc tính biến dị của cơ thể.....	70
3.1.1	Thường biến.....	70
3.1.2	Biến dị di truyền.....	71
3.2	Đột biến gen.....	71
3.2.1	Đột biến gen có thể là đột biến soma hay là đột biến mầm.....	71
3.2.2	Đột biến gen là ngẫu nhiên hoặc cảm ứng.....	72
3.2.3	Đột biến là quá trình ngẫu nhiên không có tính thích nghi.....	73
3.2.4	Đột biến là quá trình thuận nghịch.....	73
3.2.5	Hậu quả kiểu hình của đột biến gen.....	74
3.2.6	Đa số các đột biến đều có hại và lặn.....	74
3.2.7	Đột biến gây chết có điều kiện.....	75
3.2.8	Cơ sở phân tử của đột biến gen.....	76
3.2.9	Hệ thống sửa chữa và bảo vệ ADN.....	76

3.3	Đột biến thể nhiễm sắc (chromosome aberration) .....	81
3.3.1	Đột biến về số lượng thể nhiễm sắc .....	81
3.3.2	Đột biến cấu trúc thể nhiễm sắc .....	88
3.4	Phương pháp phát hiện đột biến .....	92
3.4.1	Sử dụng các kỹ thuật di truyền, nuôi cấy tế bào và phân tích phả hệ trong phát hiện các đột biến .....	92
3.4.2	Tần số đột biến ngẫu nhiên .....	96
3.5	Nguyên nhân gây đột biến .....	98
3.5.1	Tia tử ngoại và Thymin dimer .....	98
3.5.2	Nhân tố bức xạ .....	98
3.5.3	Đột biến tạo các dẫn xuất của bazo (chất tương tự bazo) .....	99
<b>Chương 4 Cơ sở tế bào của các quy luật và phương thức di truyền .....</b>		<b>101</b>
4.1.	Các quy luật Mendel .....	101
4.1.1	Gregor Mendel và cây đậu vườn .....	101
4.1.2	Quy luật phân ly (Principle of Segregation) và cơ sở tế bào .....	102
4.1.3	Quy luật phân ly độc lập (Principle of Independent Assortment) và cơ sở tế bào .....	105
4.1.4	Lai phân tích .....	107
4.1.5	Qui luật xác suất .....	108
4.2.	Các phương thức di truyền bổ sung cho qui luật Mendel, cơ sở tế bào và phân tử của chúng .....	109
4.2.1	Tính trội không hoàn toàn .....	109
4.2.2	Hiện tượng đa alen và tính đồng trội .....	109
4.2.3	Hiện tượng liên kết gen (Gene linkage) .....	110
4.2.4	Hiện tượng hoán vị gen và tái tổ hợp di truyền .....	111
4.2.5	Di truyền liên kết giới tính .....	113
4.2.6	Sự tương tác giữa các gen .....	113
4.2.7	Di truyền tế bào chất .....	115
<b>Chương 5 Chu kỳ sống của tế bào và sự phân bào .....</b>		<b>116</b>
5.1	Các thời kỳ của chu kỳ tế bào .....	116
5.1.1	Gian kỳ .....	117
5.1.2	Pha G1 .....	117
5.1.3	Pha S .....	117
5.1.4	Pha G2 .....	118
5.1.5	Phân bào .....	118
5.2	Phân bào nguyên nhiễm .....	119
5.3.1	Đặc điểm của phân bào nguyên nhiễm .....	119
5.3.2	Các kỳ của phân bào .....	119
5.3.3	Thời gian của các kỳ và sự điều chỉnh phân bào .....	122
5.3	Phân bào giảm nhiễm .....	123
5.3.1	Sinh sản vô tính và sinh sản hữu tính .....	123
5.3.2	Sơ đồ chung của phân bào giảm nhiễm .....	124
5.3.3	So sánh phân bào giảm nhiễm và phân bào nguyên nhiễm .....	127
5.3.4	Thể nhiễm sắc chổi bóng đèn (Lampbrush chromosome) .....	128
5.3.5	Ý nghĩa của phân bào giảm nhiễm .....	129
<b>Chương 6 Điều chỉnh chu kỳ tế bào .....</b>		<b>133</b>
6.1	Điều chỉnh chu kỳ tế bào ở cơ thể đa bào .....	133

6.1.1	Một hệ thống trung tâm phát động các quá trình cần thiết của chu kỳ.....	133
6.1.2	Hệ thống điều chỉnh chu kỳ - phức hệ các protein-kinaza.....	134
6.1.3	Chu kỳ của tế bào phôi sớm và vai trò của MPF .....	135
6.1.4	Điều chỉnh chu kỳ tế bào ở nấm men - Các gen mã hóa cyclin và Cdk.....	138
6.1.5	Điều chỉnh chu kỳ tế bào động vật có vú .....	143
<b>Chương 7 Di truyền tế bào Lai Soma.....</b>		<b>153</b>
7.1	Sự biệt hóa các tế bào soma.....	153
7.6.2	Sự biệt hóa về hình thái và chức năng.....	153
7.6.2	Sự biệt hóa về sinh hóa .....	153
7.6.2	Sự biệt hóa- hoạt động biệt hóa của hệ gen.....	154
7.2	Lai tế bào soma .....	154
7.6.2	Lai ghép ở thực vật.....	154
7.6.2	Cấy ghép mô ở động vật .....	155
7.3	Lai tế bào soma động vật invitro .....	155
7.6.2	Sự tạo thành ngẫu nhiên tế bào lai soma invitro .....	155
7.6.2	Lai tế bào khi sử dụng virus kích thích .....	157
7.6.2	Các tế bào lai heterocaryon.....	157
7.6.2	Sự hoạt hóa của gen ở tế bào lai .....	162
7.6.2	Các bào quan trong tế bào lai.....	164
7.4	Lập bản đồ gen .....	165
7.5	Lai tế bào soma và công nghệ tế bào thực vật.....	166
7.6.2	Phương pháp tạo tế bào trần (protoplast).....	166
7.6.2	Sự liên kết và dung hợp tế bào trần .....	167
7.6.2	Sự phát triển của tế bào lai.....	167
7.6.2	Chọn lọc và xác định các dòng tế bào lai và mô sẹo.....	167
7.6.2	Ưu thế của lai soma ở thực vật .....	168
7.6	Công nghệ tế bào lai và thực tiễn sản xuất.....	169
7.6.2	Tạo và chọn lọc giống cây trồng.....	169
7.6.2	Sản xuất kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody) .....	169
<b>Chương 8 Di truyền tế bào Soma và ung thư.....</b>		<b>172</b>
8.1	Bệnh ung thư (cancer).....	172
8.2	Sự chuyển hóa ung thư.....	173
8.2.1	Tế bào lành và tế bào ung thư invitro .....	173
8.2.2	Sự chuyển hóa ung thư khi lai tế bào.....	173
8.2.3	Sự chuyển hóa ung thư in vivo .....	174
8.3	Cơ sở di truyền tế bào của ung thư .....	175
8.3.1	Đột biến thể nhiễm sắc và ung thư .....	175
8.3.2	Các gen gây ung thư (oncogenes) và phát sinh ung thư .....	175
8.3.3	Ung thư vú (breast cancer).....	179
8.3.4	U xơ thần kinh (neurofibromatose) .....	179
8.3.5	Ung thư võng mạc (retinoblastome).....	180
8.3.6	Ung thư thận.....	181
8.3.7	Ung thư kết - trực tràng (colorectal cancer) .....	181
8.4	Ung thư thất điều dẫn mạch (ataxie telangiectasie) .....	182
8.5	Chẩn đoán và chữa trị ung thư.....	183
8.6	Điều trị bệnh di truyền bằng liệu pháp gen (Genetic therapy).....	184

8.5.1	Nguyên lý của liệu pháp gen.....	184
8.5.2	Liệu pháp gen ex vivo .....	185
8.5.3	Liệu pháp gen in vivo.....	187
8.5.4	Liệu pháp gen sử dụng các oligonucleotit.....	187
<b>Tài liệu tham khảo .....</b>		<b>188</b>

## Lời nói đầu

Giáo trình Di truyền tế bào là tài liệu học tập của học viên Cao học tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội theo khung chương trình đào tạo sau Đại học của Bộ Giáo dục và Đào tạo.

Giáo trình được biên soạn nhằm giới thiệu những kiến thức chuyên ngành về Di truyền tế bào, bao gồm: những kiến thức cơ bản và chuyên sâu cập nhật thuộc lĩnh vực khoa học trung gian giữa Di truyền học, Tế bào học và Sinh học phân tử. Phần cơ bản chủ yếu ôn lại một cách có hệ thống các kiến thức Di truyền học và Sinh học tế bào là những kiến thức cơ sở để có thể nghiên cứu chuyên sâu một số vấn đề về Di truyền tế bào như: tổ chức và hoạt động

của hệ gen, thể nhiễm sắc, di truyền tế bào soma, chu trình tế bào và cơ chế phân tử của điều chỉnh chu trình. Giáo trình cũng đề cập một số ứng dụng thực tiễn của Di truyền tế bào như: công nghệ tế bào, di truyền tế bào và bệnh ung thư v.v..

Trong phần đầu của mỗi chương đều có nêu mục tiêu cần đạt được về nội dung và cuối chương đều có các chủ đề để các học viên chuẩn bị và thảo luận trong các buổi xêmine, cùng các bài thực tập theo từng chủ mà học viên cần phải làm.

Giáo trình có thể được dùng làm tài liệu tham khảo cho các cán bộ nghiên cứu tại các Trường Đại học hay các Viện nghiên cứu có liên quan đến chuyên ngành Di truyền tế bào.

Tuy nhiên, Di truyền tế bào là chuyên ngành rộng lớn, có liên quan đến Di truyền học, Sinh học tế bào và Sinh học phân tử, cho nên giáo trình không thể đề cập chuyên sâu đến nhiều lĩnh vực mà chỉ có thể đề cập một số vấn đề cốt lõi nhất. Giáo trình chắc chắn còn nhiều thiếu sót, tác giả chân thành mong muốn nhận được nhiều đóng góp ý kiến của độc giả để hoàn thiện hơn.

**Tác giả**

# Chương 1

## Cơ sở phân tử của di truyền tế bào

Mục tiêu: Sau khi học xong chương này, học viên sẽ có khả năng:

- Trình bày được các khái niệm về gen, hệ gen và mã di truyền.
- Trình bày được mô hình và cơ chế tái bản ADN.
- Trình bày được mô hình và cơ chế phiên mã, ADN → ARN.
- Trình bày được mô hình và cơ chế dịch mã, ADN → mARN → Protein.
- Trình bày được cơ chế điều hòa hoạt động của gen.
- Giải thích được cơ sở phân tử của tiến hóa.

### 3.1 ADN – vật chất mang thông tin di truyền

ADN (axit deoxyribonucleic) là hợp chất đại phân tử cấu tạo nên các gen và thể nhiễm sắc – là vật chất quy định đặc tính di truyền và biến dị của cơ thể sống.

Chúng ta sẽ xem xét lịch sử mà qua đó các nhà sinh vật học đã khám phá ra ADN là vật chất di truyền.

#### 8.1.1 Nhân tố chuyển dạng của Griffith

Năm 1928 Federick Griffith, nhà sinh vật học người Anh, đã công bố các kết quả thí nghiệm về sự chuyển nạp (transformation) ở vi khuẩn gây bệnh viêm phổi (*Streptococcus pneumoniae*). Ông đã sử dụng hai chủng vi khuẩn là một chủng gây bệnh viêm phổi và một chủng không gây bệnh – chủng lành. Chủng gây bệnh có đặc tính gây bệnh và có vỏ bảo vệ, còn chủng lành không gây bệnh và không có vỏ. Ông giết chết vi khuẩn bằng nhiệt độ cao và đem trộn lẫn các vi khuẩn gây bệnh đã giết chết với các vi khuẩn lành còn sống và đem tiêm vào chuột. Chuột bị bệnh viêm phổi và trong máu chuột tìm thấy các vi khuẩn gây bệnh sống. Ông kết luận rằng các chủng lành đã chuyển dạng thành các chủng gây bệnh do một nhân tố nào đó (nhân tố quy định bệnh và di truyền) đã chuyển từ chủng bệnh sang chủng lành và biến chủng lành thành chủng gây bệnh. Các chủng gây bệnh do bị chuyển dạng sinh sản ra con cháu đều mang tính gây bệnh. Nhưng Griffith chưa phát hiện được bản chất hóa học của nhân tố chuyển dạng.

Phải đợi đến năm 1944, các nhà sinh vật học với rất nhiều nghiên cứu khoa học khác nhau mới chứng minh được nhân tố chuyển dạng của Griffith là ADN. Tại Viện Nghiên cứu Rockefeller (Mỹ) T. Avery và các cộng tác viên đã tiến hành nhiều thí nghiệm tỉ mỉ và chính xác trên các đối tượng vi khuẩn mà Griffith đã nghiên cứu và chứng minh được rằng nhân tố do Griffith giả định có bản chất là ADN, nghĩa là ADN của vi khuẩn gây bệnh đã chuyển sang cho vi khuẩn lành, biến vi khuẩn lành thành vi khuẩn gây bệnh có vỏ bảo vệ.

### 8.1.2 Thí nghiệm của A. Hershey và M. Chase

Năm 1952, hai nhà sinh vật học người Mỹ là Affred Hershey và Martha Chase đã tiến hành nhiều thí nghiệm trên đối tượng thực khuẩn thể (Bacteriophage) T2 là virus ký sinh trong vi khuẩn *E. coli*. Bằng phương pháp tách phần ADN và protein của virus riêng biệt nhau và đánh dấu phóng xạ ADN bằng photpho phóng xạ và đánh dấu protein bằng sunphua phóng xạ, đồng thời gây nhiễm cho *E. coli* bằng virus có mang ADN và protein đánh dấu, các ông đã chứng minh rằng chỉ có ADN của virus xâm nhập vào tế bào vi khuẩn và gây bệnh cho vi khuẩn vì virus tạo được vỏ protein của mình (không có dấu phóng xạ) và sinh sản ra nhiều virus T2 phá hủy tế bào vi khuẩn. Khi đem tiêm trực tiếp ADN của T2 vào *E. coli* thì *E. coli* bị lây nhiễm, còn tiêm protein của T2 vào *E. coli* thì *E. coli* không bị lây nhiễm.

Như vậy, các nhà nghiên cứu đã khẳng định được vật chất di truyền của virus là ADN. Nhiều virus có vật chất di truyền là ARN, ví dụ virus gây bệnh khảm thuốc lá, virus HIV v.v.. Trong những năm 50, nhiều thí nghiệm phân tách ARN và protein cũng đã chứng minh rằng ARN là vật chất mang thông tin di truyền.

Cũng trong năm 1952, các nhà khoa học đã quan sát thấy hiện tượng được gọi là tải nạp (transduction) – là hiện tượng chuyển tải ADN từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác một cách gián tiếp thông qua virus và khẳng định vai trò của ADN trong đặc tính di truyền của cơ thể.

Từ khi phát hiện ra ADN là vật chất di truyền thì cần phải tìm hiểu bản chất và cấu trúc của phân tử ADN.

### 8.1.3 Mô hình cấu trúc phân tử của ADN

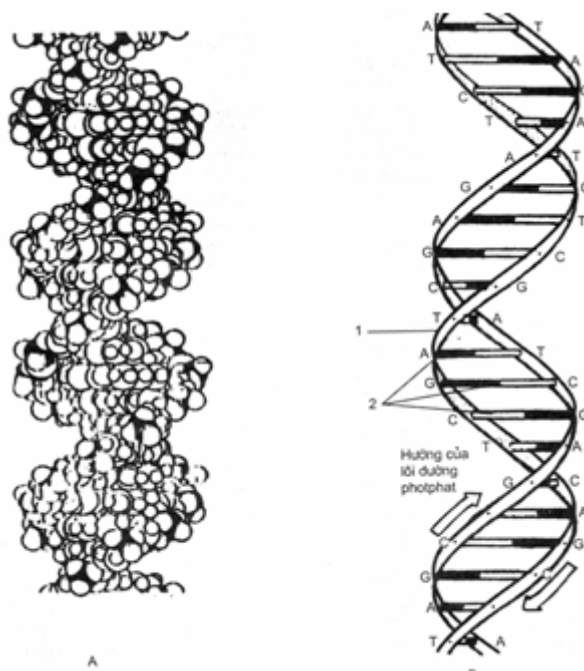
Như phần trên ta đã biết ADN và ARN đều là axit nucleic. Chúng được cấu tạo gồm nhiều đơn vị (monomere) được gọi là nucleotit. Các nucleotit liên kết với nhau theo tuyến tính tạo nên mạch trùng hợp (polymere) được gọi là mạch polynucleotit.

Năm 1953, nhà sinh học người Mỹ là Jame D. Watson và nhà vật lý người Anh Francis Crick, căn cứ vào cấu tạo hóa học của ADN và ảnh chụp tinh thể ADN bằng phương pháp nhiễu xạ Rongen (do Maurice Wilkins và Franklin Rosalind nghiên cứu) đã công bố mô hình cấu trúc phân tử ADN được giới khoa học công nhận và năm 1962, hai ông (cùng với Wilkins) đã được nhận giải thưởng Nobel về công trình đó.

Theo mô hình cấu tạo phân tử ADN của Watson và Crick thì phân tử ADN là sợi xoắn kép gồm 2 mạch đơn deoxyribonucleotit xoắn với nhau quanh một trục trung tâm tưởng tượng, trong đó hai tay thang dọc ở phía ngoài là các liên kết đường – photphat, còn nằm phía trong là các bậc thang - là các liên kết hydro giữa các bazơ nitơ của hai mạch theo nguyên tắc bổ sung: A - T và C - G (hình 1.1).

Sợi xoắn kép ADN theo nguyên tắc bổ sung của Watson và Crick không chỉ chứng minh cho công thức của Ewin Chargaff tìm ra trước đây là  $(A+T)/(C+G) = 1$ . Điều này có nghĩa là trong phân tử ADN tổng số các nucleotit A và T luôn luôn bằng C và G, đồng thời cũng là cơ sở cấu trúc cho các đặc tính quan trọng của phân tử ADN như là phân tử tích thông tin di truyền, là phân tử có đặc tính tự tái bản (ADN  $\rightarrow$  ADN) để truyền thông tin di truyền qua các thế hệ. ADN còn là phân tử có đặc tính phiên mã để cho ra ARN từ đây dịch mã để tổng hợp protein là cơ sở của các tính trạng trong mỗi thế hệ cơ thể.





**Hình 1.1**

Mô hình sợi ADN xoắn kép

### 8.1.4 Sự tái bản của ADN

Một trong những đặc tính của cơ thể sống là đặc tính tự sinh sản ra những cơ thể mang các tính trạng hình thái và sinh lý giống bố mẹ. Đặc tính đó dựa trên đặc tính tự tái bản (replication) của phân tử ADN qua đó một phân tử ADN mẹ đã sinh sản ra hai phân tử ADN con giống hệt ADN mẹ và thông qua cơ chế phân bào hai phân tử ADN con được phân ly về hai tế bào con, do đó mà hai tế bào con mang đặc tính di truyền như tế bào mẹ.

#### 1.1.4.1 Đặc tính của sự tái bản ADN

Sự tái bản của ADN bảo đảm tính chính xác của sự sao chép mã di truyền từ phân tử ADN mẹ sang các phân tử ADN con nhờ các cơ chế đặc biệt.

Sự tái bản của ADN dựa trên nguyên tắc khuôn và bổ sung, nghĩa là mỗi mạch đơn ADN được dùng làm khuôn theo đó các deoxyribonucleotit (A, C, T, G) được lắp ráp theo nguyên tắc bổ sung (A lắp với T, C lắp với G và ngược lại) vì vậy, trong sợi xoắn kép ADN con có trình tự sắp xếp các nucleotit giống như sợi ADN mẹ.

Sự tái bản ADN mang tính nửa bảo tồn nghĩa là sợi ADN con mang một mạch đơn ADN cũ (mạch khuôn) và một mạch đơn ADN mới (mạch mới được tổng hợp).

Sự tái bản ADN mang tính định hướng và diễn ra theo hai hướng ngược nhau, vừa liên tục vừa gián đoạn, nghĩa là sự tổng hợp mạch mới chỉ diễn ra theo hướng 3' - 5' (tức là từ đầu 3 đến đầu 5 của mạch khuôn) do trong sợi kép ADN, hai mạch đơn ADN xoắn theo hai chiều ngược nhau nên sự tổng hợp diễn ra theo cả hai hướng ngược nhau (một mạch theo hướng 3'-5', mạch kia theo hướng 5'-3'). Trong hai mạch khuôn, thì một mạch được dùng để tổng hợp mạch mới một cách liên tục (gọi là mạch dẫn đầu hay mạch liền - leading strand), còn mạch kia tổng hợp gián đoạn (gọi là mạch chậm hay mạch gián đoạn - lagging strand) nghĩa là tổng

hợp từng đoạn ADN ngắn và sau đó mới được khâu lại tạo thành mạch ADN hoàn chỉnh (hình 1.2).

#### 1.1.4.2 Cơ chế và mô hình của sự tái bản ADN

Có nhiều loại protein và enzym tham gia vào quá trình tái bản ADN:

- Phức hệ replixom (replisome) là một phức hệ đa enzym gồm có:

Enzym helicaza có tác động (phối hợp với một protein gây bất ổn định được gọi là SSB) mở xoắn và tách đôi sợi ADN kép;

Primoxom (primosome) gồm enzym và một số protein có trách nhiệm tổng hợp các đoạn ARN mồi (ARN primer).

Các enzym ADN polimeraza I và III có vai trò trùng hợp các deoxyribonucleotit thành mạch ADN.

Enzym ATPaza có vai trò thủy phân ATP.

- Enzym ADN- polimeraza II.

- Enzym topoisomeraza có tác dụng như enzym ligaza dùng để khâu các đoạn ADN lại với nhau.

Các enzym ADN polimeraza ngoài tác dụng trùng hợp - xúc tác tổng hợp mạch ADN mới, còn có hoạt tính enzym exonucleaza cắt mạch ADN từ đầu tự do (trong lúc các endonucleaza lại cắt ADN từ các điểm nằm bên trong sợi) và chúng có tác dụng sửa sai – phát hiện và cắt bỏ những bazơ kết cặp sai do đó giúp cho quá trình tái bản được chính xác.

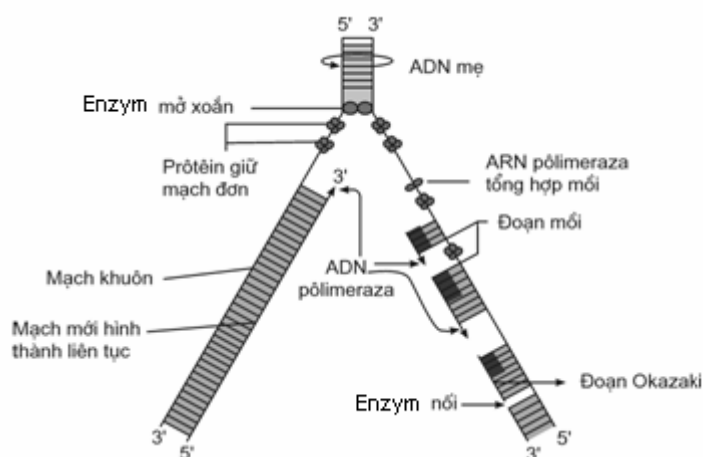
Phân tử ADN của vi khuẩn là sợi xoắn kép có dạng vòng. Bước vào quá trình tái bản, phân tử ADN đính vào mesoxom (phần lõm vào của màng sinh chất) ở điểm khởi đầu cho sự tái bản, ở vùng này có gen khởi đầu (initiator gene). Sự tái bản bắt đầu từ điểm khởi đầu. Do sự mở xoắn và tách hai mạch nên ở điểm khởi đầu xuất hiện “con mắt tái bản” ở dạng vòng tròn gồm hai mạch đơn nối liền với sợi xoắn ở hai điểm gọi là điểm tăng trưởng hay điểm chẻ đôi, từ đây sợi kép sẽ tiếp tục mở xoắn và tách ra ở cả hai đầu. Ở điểm tách ra của hai mạch tạo nên chẻ ba (gồm hai mạch đơn nối với sợi kép) được gọi là chẻ ba tái bản (replication fork, hình 1.2). Sự lắp ráp các deoxyribonucleotit diễn ra trong chẻ ba và sử dụng các mạch đơn ADN mẹ làm khuôn. Sự mở xoắn và tách hai mạch đơn là do enzym helicaza tác động, đồng thời các protein gây bất ổn định SSB (Single Strand Binding) là protein bám mạch đơn ngăn không cho chúng xoắn lại với nhau, để chúng có thể làm khuôn tổng hợp mạch mới. Sự xoắn và tách đôi hai mạch đòi hỏi cung cấp năng lượng từ ATP. ATP được thủy phân cho ra ADP, P và năng lượng nhờ enzym ATPaza của replixom.

Mỗi lần ADN mở xoắn thì lại làm tăng thêm xoắn ở sợi kép tiếp theo ngay trước enzym helicaza. Sự tăng xoắn có thể dẫn tới làm đứt gãy ADN. Enzym topoisomeraza tác động như một nhân tố làm dẫn xoắn bằng cách cắt các đoạn ADN quá xoắn để chúng dẫn xoắn và khâu nối lại suốt trong tiến trình hoạt động của helicaza.

Các ADN polimeraza không có khả năng khởi đầu cho việc tổng hợp mạch ADN mới. Để khởi đầu cho việc tổng hợp ADN, đòi hỏi phải có một đoạn ARN mồi gồm 10 ribonucleotit (ARN primer). Về sau đoạn mồi bị tiêu hủy và sẽ bị ADN thế chỗ. Đoạn ARN mồi được tổng hợp nhờ enzym primaza (ARN polimeraza phụ thuộc ADN) ngay từ khi khởi đầu tái bản - khi xuất hiện “con mắt tái bản”. Do hai mạch ADN xếp song song ngược chiều cho nên tiến trình lắp ráp các mạch ADN từ hai mạch khuôn là không giống nhau. Mạch khuôn có hướng 3'- 5'

sẽ được tổng hợp trước và liên tục và mạch ADN mới được hình thành có hướng 5'- 3', mạch này được gọi là mạch liên. Đối với mạch ADN khuôn thứ hai có hướng 5'- 3' diễn ra chậm hơn và diễn ra gián đoạn, nghĩa là tổng hợp từng đoạn ADN và sau đó được khâu nối lại. Mạch ADN mới này có hướng 3'- 5' được gọi là mạch gián đoạn (hình 1.2).

Quá trình tổng hợp ADN mạch liên tục diễn ra ngay sau khi đoạn ARN mồi được tổng hợp (cùng trên khuôn của mạch ADN 3'- 5') có hướng 5'- 3', do đó ADN polymeraza III nhận biết đầu 3'-OH của đoạn mồi, bắt đầu xúc tác lắp ráp các deoxyribonucleotit và tạo nên mạch ADN mới có hướng 5'- 3' bổ sung với mạch khuôn. Đoạn mồi bị cắt bỏ và bị tiêu huỷ bởi exonucleaza.



**Hình 1.2**

Mô hình tái bản ADN theo mạch liên và mạch gián đoạn.

Tiến trình tổng hợp ADN mạch gián đoạn diễn ra trên mạch ADN khuôn thứ hai. Do mạch ADN khuôn thứ hai có hướng 5'- 3' nên sự tổng hợp diễn ra gián đoạn phức tạp hơn và chậm hơn so với mạch dẫn đầu. Nhờ xúc tác của enzym ARN-polimeraza phụ thuộc ADN (1 loại primaza) đoạn ARN mồi thứ nhất được tổng hợp, enzym ADN polimeraza III nhận biết đầu 3'-OH của ARN – mồi bắt đầu tổng hợp một đoạn ADN (có khoảng 2.000 nucleotit) được gọi là đoạn Okazaki (hình 1.2). Đoạn ARN mồi thứ nhất bị thủy phân bởi ADN - polimeraza (tác động như exonucleaza). Tiếp theo trên khuôn của ADN, đoạn ARN mồi thứ hai được tổng hợp và tiếp theo đó ADN – polimeraza tổng hợp đoạn Okazaki thứ 2, đoạn mồi thứ hai bị cắt bỏ. Đoạn Okazaki thứ nhất được khâu nối với đoạn Okazaki thứ 2. Tiến trình cứ tiếp diễn như thế cho đến khi kết thúc sự tái bản - các đoạn Okazaki được khâu nối với nhau nhờ enzym ligaza thành mạch ADN liên tục.

Về cơ bản thì sự tái bản ADN ở Eucaryota cũng giống với Prokaryota. Tuy nhiên, ở Eucaryota ADN liên kết với histon để tạo thành nucleoxom và tạo thành các sợi nhiễm sắc nhiều cấp phức tạp cho nên quá trình tái bản ADN diễn ra phức tạp hơn và có vài điểm khác biệt.

### 1.1.4.3 Các đơn vị tái bản (replicon)

Đối với Prokaryota chỉ tồn tại một điểm khởi đầu tái bản và quá trình tái bản diễn ra theo hai chiều ngược nhau xuất phát từ điểm đó. Như vậy, ở Prokaryota chỉ là một đơn vị tái bản. Đối với tế bào Eucaryota phân tử ADN vô cùng dài nếu như chỉ có một đơn vị tái bản thì thời

gian tái bản phải kéo dài tới 76 ngày, trên thực tế thời gian tái bản chỉ kéo dài 6 - 8 giờ (tốc độ tái bản ADN xảy ra ở mức độ  $2\mu\text{m}/\text{phút}$ ). Điều đó nói lên rằng ở ADN của Eucaryota tồn tại nhiều đơn vị tái bản (replicon). Mỗi replicon có chiều dài từ 40 - 400 $\mu\text{m}$ . Mỗi replicon có điểm khởi đầu tái bản riêng của mình. Tiến trình tái bản trong từng replicon cũng diễn ra giống như ở Prokaryota nghĩa là theo nguyên tắc khuôn bổ sung, có định hướng, theo hai chiều ngược nhau, liên tục và gián đoạn.

Khi tất cả các replicon đã được tái bản, chúng liên thông với nhau và khi đó hai sợi ADN được hình thành.

*Nucleoxom và tiến trình tái bản.* Sự tồn tại cấu trúc nucleoxom ở Eucaryota làm cho tiến trình tái bản xảy ra chậm hơn và các đoạn okazaki ngắn hơn. Trong tiến trình tái bản phân tử ADN dẫn cuộn khỏi lõi histon, trong lúc đó histon octomer biến dạng thành hai tetramer. Các histon mới được tổng hợp từ tế bào chất được chuyên chở vào nhân, tạo thành các octomer mới để cùng sợi kép ADN được tổng hợp tạo thành các nucleoxom và từ đó tạo thành các sợi nhiễm sắc và thể nhiễm sắc con.

Qua pha S, hàm lượng ADN và số lượng thể nhiễm sắc được tăng gấp đôi, qua quá trình phân bào sẽ chia đôi đồng đều cho hai tế bào con.

## 8.2 T<sub>Đ</sub> ADN và ARN và Protein - Sự biểu hiện thông tin di truyền

Như ta đã biết, phân tử ADN là vật chất mang thông tin di truyền và thông tin di truyền được di truyền từ thế hệ bố mẹ sang thế hệ con cái thông qua sự tái bản ADN và phân ly ADN về các tế bào con qua phân bào.

Ở mỗi cơ thể nhất định, thông tin di truyền được thể hiện ở các tính trạng hình thái và sinh lý - được gọi là kiểu hình (phenotype). Các tính trạng hình thái như: độ lớn cơ thể, màu sắc, hình dạng, cũng như các tính trạng sinh lý và tập tính như: trao đổi chất, trao đổi năng lượng, tính chịu nhiệt, ưa sáng v.v. đều do protein quy định. Như vậy, phải có mối liên hệ giữa ADN và protein. Sinh học phân tử đã cho chúng ta biết dòng thông tin từ ADN đến protein phải thông qua ARN hay còn gọi là giáo lý trung tâm của Crick:



Cấu tạo đặc thù của protein được quy định bởi cấu tạo đặc thù của ADN hay nói một cách khác mã của protein được quy định bởi mã của ADN và được gọi là mã di truyền (genetic code). Quá trình từ ADN  $\rightarrow$  ARN được gọi là sự phiên mã (transcription) và quá trình từ ARN  $\rightarrow$  Protein là sự dịch mã (translation).

### 8.2.1 Mã di truyền

Mã di truyền (genetic code) là mã của ngôn ngữ protein được mã hóa bởi ngôn ngữ axit nucleic, hay nói một cách cụ thể hơn là trình tự các axit amin trong mạch polypeptit của protein được quy định bởi trình tự của các nucleotit trong mạch polynucleotit của ADN.

Để xây dựng nên polypeptit cần đến 20 loại axit amin, trong lúc đó mạch polynucleotit được cấu tạo bởi 4 dạng nucleotit là A, T (U), G và C.

Các nhà di truyền học phân tử đã giả thiết rằng mã di truyền là mã bộ ba (tripled code) nghĩa là trình tự của một bộ ba (một codon) nucleotit quy định cho trình tự một axit amin. Như vậy, sẽ có  $4^3 = 64$  codon tương ứng với 20 axit amin. Nhưng bộ ba (codon) nào quy định axit amin nào thì phải đến năm 1961 nhà sinh vật học người Anh là M. Nirenberg lần đầu tiên

đã chứng minh bằng thực nghiệm rằng mã di truyền là mã bộ ba và đã tìm ra codon đầu tiên mã hóa cho axit amin phenilalanin là bộ ba UUU. Những năm sau đó, các codon mã hóa cho 20 axit amin đều được xác định (xem bảng 1.1).

Người ta đã phát hiện ra rằng mã di truyền là mã thoái hóa nghĩa là một axit amin có thể tương ứng với nhiều mã ví dụ: tương ứng với phenilalanin có hai mã, với valin có bốn mã và với leucin có đến sáu mã (xem bảng 1.1).

Theo quy định trong bảng mà người ta ký hiệu codon bằng ba ribonucleotit, ví dụ UUU hoặc UUC mã cho phenilalanin, vì khi tổng hợp protein ADN được phiên mã thành khuôn mARN theo nguyên tắc bổ sung tức là U - A và C - G.

Ngoài ra, trong 64 mã còn có mã khởi đầu (mã AUG vừa là mã của methionin, vừa là mã khởi đầu) và mã kết thúc (3 mã UAA, UAG và UGA) là mã báo hiệu sự khởi đầu và kết thúc mạch polynucleotit được tổng hợp trên khuôn mARN.

### **Bảng 1.1 Từ điển mã di truyền (ghi theo mã ARN)**

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

Mã thoái hóa nói lên tính dự trữ và sự thích nghi của cơ thể để hạn chế bớt tác hại của đột biến xảy ra làm sai lệch mã dẫn đến hư hỏng protein.

Mã di truyền có tính vạn năng, nghĩa là tất cả các cơ thể sống từ vi khuẩn cho đến thực vật, động vật và cả con người đều sử dụng một bộ mã chung. Bằng thực nghiệm người ta đã chuyển gen từ cơ thể này sang cơ thể khác và gen đó vẫn được phiên mã và dịch mã tổng hợp nên protein do gen đã được mã hóa. Tính vạn năng của mã chứng tỏ rằng mã xuất hiện rất sớm trong quá trình tiến hóa và tất cả các cơ thể sống có chung cơ sở phân tử và nguồn gốc phát sinh. Tuy nhiên, có một số ngoại lệ, ví dụ ở một số động vật đơn bào và các bào quan (ty thể) bộ mã có ít nhiều sai khác với bộ mã chung. Ví dụ đối với ADN của ti thể ở người, động vật có vú, nấm men v.v. mã AUG là mã của triptophan, mã AUG là mã của metionin, mã AGA và AGG là mã kết thúc. Điều đó chứng tỏ mã di truyền khi mới xuất hiện có tính đa dạng và qua quá trình tiến hóa chọn lọc mới hình thành bộ mã chung như hiện nay.

## 8.2.2 Sự phiên mã (transcription)

Sự phiên mã của ADN có thể diễn ra trong tất cả các pha của gian kỳ. Sự phiên mã là sự tổng hợp các phân tử mRNA cũng như rARN và tARN từ ADN theo nguyên tắc bổ sung (A - U và C - G) diễn ra trong nhân.

### 1.2.2.1 Các ARN polimeraza

ARN - polimeraza là enzym có vai trò phiên mã, nghĩa là xúc tác sự tổng hợp các ARN (mARN, tARN và rARN) trên khuôn của một mạch ADN. Sự tổng hợp ARN diễn ra theo chiều 3' - 5' và được xác định bởi promoter. Ở Bacteria người ta chỉ tìm thấy một dạng ARN -

polimeraza với trọng lượng phân tử 500.000D chứa nhiều mạch polypeptit (ví dụ ở *E.coli* có đến 5 mạch).

Ở Eucaryota có đến 3 dạng ARN - polimeraza, mỗi dạng có vai trò riêng, đó là các dạng ARN - polimeraza I, II và III.

ARN - polimeraza I có vai trò tổng hợp các rARN (trừ rARN 5S).

ARN - polimeraza II có vai trò phiên mã các mARN.

ARN - polimeraza III có vai trò tổng hợp các tARN và rARN 5S.

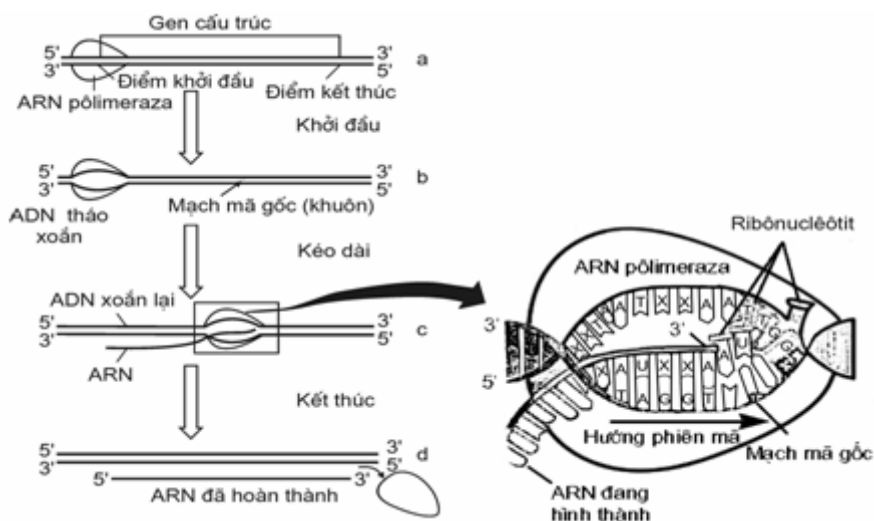
Trong tế bào động vật có vú, người ta đã tính được khoảng 40.000 phân tử ARN - polimeraza I, 40.000 phân tử ARN - polimeraza II và khoảng 20.000 phân tử ARN - polimeraza III.

### 1.2.2.2 Cơ chế phiên mã

Sự tổng hợp ARN mang tính chọn lọc cao. Trong tế bào Eucaryota có khoảng 1% các trình tự nucleotit trong ADN được phiên mã thành ARN phục vụ cho hoạt động của tế bào. Tham gia quá trình phiên mã ngoài các ARN - polimeraza còn có các nhân tố khác đóng vai trò điều chỉnh. Các nhân tố đó thường là các protein axit. Bắt đầu phiên mã là sự acetyl hóa các histon đưa đến biến đổi trong cấu trúc của nucleoxom. Do sự acetyl hóa dạng histon bát hợp (octamere) đã biến thành histon tứ hợp (tetramere) hoặc nửa nucleoxom. Sợi ADN dẫn vòng và được nới lỏng.

Promoter được nhận biết bởi các ARN - polimeraza nhờ một hoặc nhiều protein liên kết với ADN ở đoạn promoter. Promoter trở thành hoạt động khi đã liên kết với protein (được gọi là nhân tố phiên mã), thì ARN - polimeraza gắn vào promoter và bắt đầu phiên mã từ điểm khởi đầu và di chuyển dọc theo sợi ADN đã được tháo xoắn và bằng cách dùng một mạch ADN làm khuôn theo nguyên tắc bổ sung, các ribonucleotit được lắp ráp thành mạch ARN kéo dài theo hướng 5'-3' cho đến điểm kết thúc; phân tử ARN được tổng hợp tức thì được tách khỏi ADN. ARN- polimeraza cũng tách khỏi ADN (xem hình 1.3) sự kéo dài và kết thúc mạch ARN đòi hỏi có sự tham gia của các nhân tố điều chỉnh.

Sự điều chỉnh hoạt động của gen (phiên mã) có thể do yếu tố cấu trúc gen như các enhancer, promoter, v.v. là những đoạn ADN có khả năng liên kết với các nhân tố điều chỉnh - là các protein điều chỉnh tác động như những nhân tố đóng mở gen (ức chế hoặc hoạt hóa gen). Các nhân tố điều chỉnh hoạt động của gen không chỉ là hệ thống các protein rất đa dạng của nhân và thể nhiễm sắc mà còn có thể là các nhân tố ngoại bào như các sản phẩm trao đổi chất và các hormon v.v..



**Hình 1.3**

Mô hình quá trình phiên mã

Mạch ARN mới được tổng hợp bao gồm cả ARN được phiên từ các *exon* và *intron*, vì vậy được gọi là bản phiên khởi thủy. Bản phiên khởi thủy này phải được xử lý, chế biến (ARN processing) thành các ARN có hoạt tính chức năng trước khi được tế bào sử dụng (các mARN, tARN và rARN). Trong nhân tế bào dưới tác dụng của enzym exonucleaza các đoạn *intron* của mARN khởi thủy bị cắt bỏ và sau đó các đoạn *exon* được khâu nối lại với nhau nhờ enzym ligaza và tạo thành mARN chín có hoạt tính chức năng nghĩa là dùng để dịch mã khi được chuyển đến riboxom.

### 8.2.3 Sự dịch mã (translation)

Sự dịch mã là sự tổng hợp protein cũng có thể xảy ra ở các pha khác nhau của gian kỳ.

Protein là chất trùng hợp mang tính đặc trưng loài, đặc trưng cho cá thể và đặc trưng cho tế bào. Sự đặc trưng này được thể hiện trong cấu trúc cấp 1 của protein, tức là trình tự sắp xếp của các đơn hợp - các axit amin cấu tạo nên protein đó. Trình tự sắp xếp các axit amin trong mạch polypeptit (protein) được mã hóa bằng trình tự sắp xếp của các nucleotit trong mạch polynucleotit (ADN) - Mã như vậy được gọi là mã di truyền - tức là một bộ ba (hay là codon) nucleotit trong ADN qui định cho một axit amin trong polypeptit và như vậy trình tự các codon trong mạch polynucleotit qui định nên trình tự các axit amin trong mạch polypeptit. Có 64 codon ứng với 20 loại axit amin. Như vậy, 1 axit amin có thể có nhiều codon tương ứng. Kiểu mã như thế gọi là mã thoái hóa. Mã di truyền là vạn năng - nghĩa là áp dụng cho tất cả các cơ thể sống. Do ADN chứa trong thể nhiễm sắc định khu trong nhân tế bào, cho nên mã chứa trong ADN sẽ được phiên mã thành mã chứa trong mARN - qua xử lý và chế biến, mARN được chuyên chở đến riboxom trong tế bào chất, ở đây mARN được dùng làm khuôn để lắp ráp các axit amin thành protein nhờ các tARN và các nhân tố khác nữa.

#### 1.2.3.1 Cơ chế tổng hợp protein

+ *Vai trò của tARN.* Mỗi axit amin tương ứng với một số tARN; phân tử tARN liên kết với axit amin đặc trưng nhờ enzym amino - axil - tARN synthetaza. Có 20 amino - axil -



tARN synthetaza đặc trưng cho 20 axit amin. Đầu tiên là amino - axil - tARN synthetaza liên kết với axit amin đặc trưng cho riêng mình thành một phức hợp - phức hợp này liên kết với tARN đặc trưng qua đầu 3' với axit amin của phức hợp, tARN nhận biết được axit amin đặc trưng cho mình là nhờ enzym amino - axil - tARN - synthetaza, còn liên kết giữa tARN với axit amin đòi hỏi tiêu phí năng lượng từ ATP. Khi tARN đã liên kết với axit amin (amino-axil-tARN) thì enzym được giải phóng và amino - axil - tARN chuyển đến bên A của riboxom, trong đó anticodon của tARN phù hợp - bổ sung với codon của mARN, nghĩa là đúng codon của axit amin được mã hóa (hình 1.4).

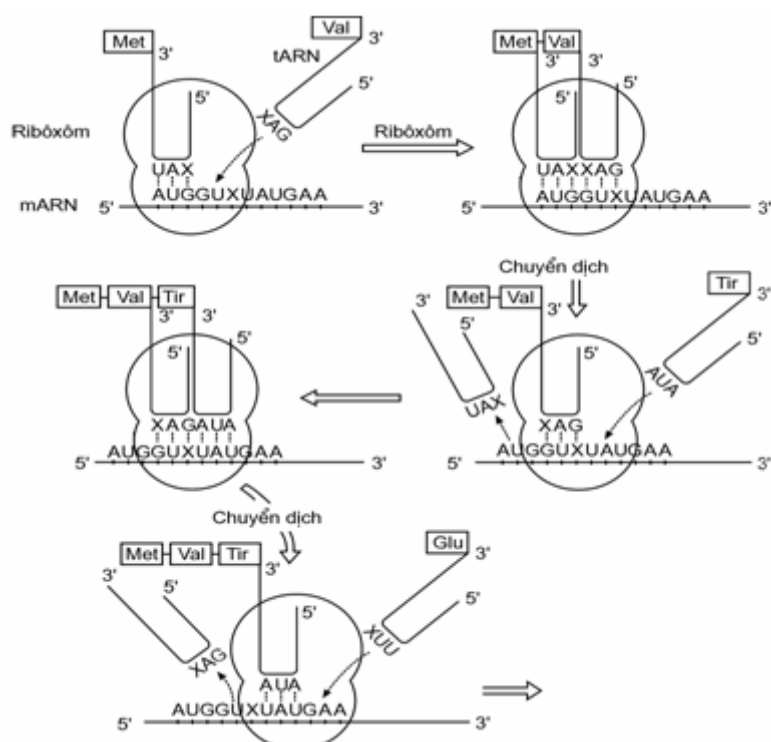
Đầu tiên, một tARN mang axit amin mở đầu (met - tARN) đến bám vào vị trí mã mở đầu. Đối mã của nó khớp bổ sung với mã mở đầu trên mARN; aa1 - tARN tới vị trí bên cạnh và đối mã của nó khớp bổ sung với mã của axit amin.

+ *Vai trò của riboxom.* Sự lắp ráp các axit amin để tạo thành mạch polypeptit được thực hiện trên riboxom, gồm 3 giai đoạn:

- Giai đoạn khởi đầu, bao gồm sự hình thành phức hệ khởi đầu do sự liên kết của mARN với đơn vị nhỏ 40S của riboxom (nhờ nhân tố  $F_3$  và ion  $Mg^{+}$ ) trong đó codon khởi đầu (codon AUG mã hóa cho methionin) được liên kết bổ sung với anticodon của methionin tARN. Đối với tế bào Eucaryota thì codon khởi đầu là methionin còn đối với tế bào Prokaryota là N - formyl - methionin. Methionin tARN kết hợp anticodon UAC với codon AUG nhờ nhân tố  $F_{19}$ ,  $F_2$  và GTP và liên kết vào bên P của đơn vị nhỏ 60S của riboxom.

- Giai đoạn kéo dài, trong tiến trình kéo dài sự lắp ghép các axit amin thành mạch polypeptit, bao gồm sự hình thành liên kết peptit giữa các axit amin và sự chuyển dịch. Các amino - axil - tARN lần lượt chuyên chở các axit amin vào bên A, trong đó anticodon của tARN phù hợp với codon tiếp theo của mARN - ví dụ codon tiếp theo AUG là GCA (codon của alanin) chẳng hạn thì alanin - tARN sẽ đến đậu ở bên A và anticodon CGU sẽ khớp với codon GCA. Sự liên kết này đòi hỏi phải có mặt các nhân tố của sự kéo dài là EF1 và GTP. Với sự xúc tác của enzym peptidyl - transferaza và sự có mặt của ion  $K^{+}$ , liên kết peptit giữa methionin - alanin được hình thành. Sau đó, nhờ nhân tố EF<sub>2</sub> và GTP tARN mang methionin được giải phóng, đồng thời riboxom chuyển dịch theo sợi mARN với khoảng cách một codon và alanin- tARN được chuyển sang bên P, và amino- axil- tARN tiếp theo vào đậu ở bên A ứng với codon của nó (hình 1.4). Sự hình thành liên kết peptit và chuyển dịch của riboxom xảy ra liên tục, các tARN được giải phóng và lại quay vòng chuyên chở các axit amin tương ứng vào bên A và kết quả là kết thúc sự tạo thành mạch polypeptit.

- Giai đoạn kết thúc, diễn ra khi riboxom dịch chuyển đến codon kết thúc dịch mã là UAA hoặc UGA hoặc UAG (đây là 3 codon kết thúc dịch mã chung cho tất cả mARN). Mạch polypeptit được giải phóng nhờ nhân tố giải phóng RF, GTP và riboxom phân giải thành hai đơn vị nhỏ và phân tử mARN cũng được giải phóng nhưng có thể được dùng lại để tổng hợp những phân tử protein khác. Các protein mới được tổng hợp sẽ được kiến tạo thành các cấu trúc cấp 2, cấp 3 v.v. là cấu trúc không gian đặc thù để thực hiện các chức năng của chúng trong tế bào.



Hình 1.4

Mô hình quá trình dịch mã

### 8.3 Khái niệm về gen và hệ gen

Từ năm 1865, G. Mendel khi công bố các quy luật di truyền đã giả định rằng đặc tính di truyền được quy định bởi các “nhân tố” có ở bố mẹ và được di truyền lại cho thế hệ con cái. Các “nhân tố” đó quy định các tính trạng kiểu hình như: độ lớn của cây, màu sắc hoa, dạng quả, hạt v.v.. Sau năm 1900, tức là sau khi tái phát hiện các quy luật Mendel, các nhà di truyền gọi các “nhân tố” Mendel là gen (gene, Johannson, 1909) và được xác định như là đơn vị chức năng quy định tính di truyền của cơ thể sống và học thuyết thể nhiễm sắc của di truyền xác định rằng “gen được chứa trong các thể nhiễm sắc”.

#### 8.3.1 Cấu trúc của gen

Theo quan điểm hiện đại thì gen được xác định là một đoạn ADN chứa mã quy định cho một polipeptit. Nhưng khái niệm gen được mở rộng hơn ở chỗ người ta phân biệt: gen cấu trúc - đoạn ADN có chứa mã để tổng hợp polipeptit; gen điều chỉnh, gen vận hành v.v. là các đoạn ADN đóng vai trò điều chỉnh hoạt động của gen cấu trúc. Ngoài ra còn có các gen rARN và tARN là các đoạn ADN chứa mã cho các rARN và tARN. Người ta thường đánh giá độ lớn của gen bằng độ dài của đoạn ADN thể hiện bằng số cặp nucleotit có trong gen. Độ lớn của gen tùy thuộc vào loại gen, ví dụ gen cấu trúc, gen rARN hay gen tARN v.v.. Bình thường gen cấu trúc có độ lớn từ 1.000 - 2.000 cặp nucleotit, nhưng nếu là gen khảm số nucleotit của gen có thể đạt tới vài trăm nghìn đến hàng triệu cặp nucleotit. Như vậy, cấu trúc của gen và tổ chức của hệ gen (genom) - tập hợp tất cả gen và ADN của một cơ thể là vô cùng phức tạp.

Hệ gen của Eucaryota có tổ chức rất đa dạng và phức tạp gồm các thành phần sau:

### 1.3.1.1 Gen cấu trúc (structure genes)

Gen cấu trúc là các gen chứa các cặp nucleotit mã hóa cho polipeptit, khi phiên mã sẽ cho ra mARN và khi dịch mã cho ra protein. Có loại gen cấu trúc trong trình tự nucleotit chỉ chứa các cặp nucleotit khi phiên mã cho ra mARN được dùng làm khuôn để dịch mã ngay. Loại gen cấu trúc này thường gặp ở vi khuẩn. Ở vi khuẩn nhiều gen cấu trúc thường tập hợp thành cụm được gọi là operon, ví dụ operon *lac* ở *E. coli* gồm 3 gen cấu trúc (mã cho 3 enzym khác nhau) xếp kế tiếp nhau và khi phiên mã chúng được phiên mã đồng thời. Có loại gen cấu trúc trong trình tự nucleotit có chứa các đoạn *exon* xen kẽ với đoạn *intron*. Những gen như thế được gọi là gen khảm. Gen khảm thường quan sát thấy ở tế bào vi khuẩn cổ (Archaea) và ở tế bào nhân chuẩn (Eucaryota). Đoạn *exon* là đoạn nucleotit được phiên mã và sẽ được dịch mã cho ra polipeptit. Đoạn *intron* là đoạn nucleotit được phiên mã nhưng không được dịch mã và sẽ bị cắt bỏ trong quá trình xử lý ARN. Gen khảm thường có độ dài rất lớn có thể chứa từ hàng chục nghìn đến hàng triệu cặp nucleotit, ví dụ ở người, gen mã hóa cho protein dystrophin có độ dài 2,4 triệu cặp nucleotit và chứa 79 *exon*. Các gen khảm khi phiên mã sẽ cho ra các tiền mARN. Các tiền mARN sẽ bị xử lý, chế biến để cắt bỏ các đoạn *intron* và nối các đoạn *exon* tạo nên mARN chín - chỉ chứa các codon qui định axit amin. Cấu trúc gen khảm có ý nghĩa nhất định trong quá trình tiến hóa và là cơ sở để tạo nên các tổ hợp gen ở mức độ các mARN (xem phần sau).

Phụ thuộc vào gen cấu trúc còn có các đoạn *promotor*, *enhancer* hoặc *silencer* là các đoạn ADN chứa nucleotit có vai trò điều hòa sự phiên mã, nhưng bản thân chúng không được phiên mã. Ngoài ra trong gen còn chứa các đoạn nucleotit báo hiệu sự khởi đầu (mã khởi đầu - AUG) và đoạn nucleotit báo hiệu kết thúc phiên mã (mã kết thúc - UAA, UAG, UGA).

*Promotor* (còn được gọi là gen vận hành) là đoạn nucleotit nằm ngay phía trước gen, có vai trò là nơi liên kết của enzym phiên mã ARNpolimeraza và tác động phiên mã chỉ xảy ra theo một chiều. Trong lúc đó *enhancer* (còn được gọi là gen tăng cường) và *silencer* (còn được gọi là gen im lặng hay gen bất hoạt) là đoạn nucleotit dài hơn có thể định vị ở phía trước, phía sau hoặc phía trong gen, chúng tác động theo cả hai chiều và có thể tác động phối hợp với *promotor* điều chỉnh hoạt động của gen khi ở cách xa gen. Cơ chế tác động điều chỉnh của *promotor* cũng như của *enhancer* thể hiện ở chỗ chúng chứa vùng nucleotit đặc thù là nơi bám của các protein điều chỉnh (xem phần sau).

### 1.3.1.2 Gen điều chỉnh (regulator genes)

Gen điều chỉnh là các gen chứa các cặp nucleotit mã hóa cho các protein có vai trò điều chỉnh sự phiên mã của các gen cấu trúc và điều chỉnh sự phát triển cá thể (thông qua sự phiên mã và dịch mã). Hoạt động của operon *lac* của *E. coli* được điều chỉnh bởi gen điều chỉnh R, gen này hoạt động sẽ sản sinh ra protein ức chế R có tác động ức chế hoạt động của operon *lac*. Nhiều đoạn ADN đặc trưng không chứa mã, đóng vai trò điều chỉnh hoạt động của gen cấu trúc (được gọi là ADN điều chỉnh) bằng cách liên kết với các protein điều chỉnh.

### 1.3.1.3 Các gen rARN và gen tARN

Gen rARN là những gen chứa các cặp nucleotit khi phiên mã sẽ cho ra các rARN, gen tARN là những gen chứa các cặp nucleotit khi phiên mã sẽ cho ra các tARN tương ứng. Các gen rARN và tARN thường là các gen đa bản.

### 1.3.1.4 Các gen đơn bản và gen đa bản

Nhiều gen có trong hệ gen là gen đơn bản nghĩa là chỉ có một trình tự nucleotit độc nhất, nhưng có nhiều gen là gen đa bản nghĩa là có nhiều bản về trình tự của gen đó - gen lặp, ví dụ gen mã hóa histon có tần số lặp từ 20 - 1000 bản, các gen tARN và rARN cũng đều là những gen đa bản. Trong những trường hợp cần thiết tất cả các bản của gen đa bản đều có thể phiên mã cho ra mARN (tARN hoặc rARN) và dịch mã cho ra nhiều protein nhằm đáp ứng kịp thời hoạt động sống của tế bào và cơ thể. Ví dụ, trong giai đoạn chín của noãn bào của động vật các gen đa bản rARN được phiên mã hàng loạt để tạo nên rất nhiều rARN xây dựng nên hàng tỷ riboxom đáp ứng kịp thời cho sự tổng hợp các chất dinh dưỡng của noãn hoàng trứng.

### 1.3.1.5 Các gen nhảy (transposons)

Gen nhảy hay còn được gọi là yếu tố ADN di động (transposable element) là đoạn nucleotit có khả năng di chuyển vị trí ngay trong nội bộ một thể nhiễm sắc hoặc từ thể nhiễm sắc này sang thể nhiễm sắc khác. Gen nhảy có vai trò trong sự tái tổ hợp lại hệ gen. Gen nhảy lần đầu tiên được Barbara McClintock phát hiện và nghiên cứu ở cây ngô từ những năm 40 của thế kỉ XX (Bà nhận được giải thưởng Nobel vào năm 1983), nhưng phải chờ đến những năm 70 - 80 với sự tiến bộ của kĩ thuật phân tích di truyền người ta mới hiểu rõ được cấu trúc và cơ chế hoạt động của transposon. Transposon được tìm thấy ở vi khuẩn, nấm, thực vật, động vật và con người.

+ Gen nhảy ở Prokaryota

Loại transposon đơn giản nhất được tìm thấy ở vi khuẩn gọi là đoạn trình tự xen hay đoạn xen (Insertion Sequences - IS), đó là những đoạn ngắn, nucleotit xếp xen kẽ vào trong gen hoặc trong *plasmid*. Trường hợp điển hình IS gồm 2500 cặp nucleotit và chỉ chứa các gen mã hóa cho các protein, có vai trò phát động hoặc điều chỉnh sự chuyển dịch vị trí. Nhiều loại IS ở vi khuẩn đã được nghiên cứu. Loại IS bé nhất gồm 768 cặp nucleotit được gọi là IS1. Các loại IS đều có đoạn trình tự ngắn tương đối giống nhau ở hai đầu cuối được gọi là đoạn lặp cuối ngược chiều (inverted terminal repeats) chứa khoảng 9 - 40 cặp nucleotit. Ví dụ:

```
ACCGTCGGC----- CGGCTGCCA
TGGCAGCCG↓↓↓↓ GCGACGGT↑↑↑↑↑
```

Đoạn lặp cuối này có vai trò quan trọng trong sự chuyển dịch của transposon. Những đột biến xảy ra trong đoạn này đều làm mất khả năng chuyển dịch của transposon. Sự chuyển dịch của transposon là nhờ có enzym transposaza, enzym này có vai trò bám vào ADN và cắt đoạn dịch chuyển và tách chúng khỏi ADN và ghép chúng vào vị trí mới của phân tử ADN đó hoặc phân tử ADN khác. Enzym transposaza thường được mã hóa trong trình tự nucleotit của IS.

Khi một IS được ghép xen vào phân tử ADN nhận (hoặc *plasmid* nhận) sẽ gây nên sự nhân đoạn (duplication) ở vùng đó của ADN. Trong phân tử ADN nhận, nơi mà IS được ghép vào là nơi có đoạn lặp cùng chiều (direct repeat) gồm khoảng 2 - 13 cặp nucleotit. Ví dụ:

```
--- ATGCA----- ATGCA---
----TACGT----- TACGT↑↓ | | | |
```

Như vậy, sau khi được lắp ghép, IS sẽ nằm xen vào giữa hai đoạn lặp cùng chiều của phân tử nhận và phân tử ADN nhận sẽ có trình tự nucleotit như sau:

```
---- ATGCA.ACCGTCGGC----- CGGCTGCCA.ATGCA--
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
```

---- TACGT.TGGCAGCCG----- GCCGACGGT.TACGT--

Trong hệ gen của vi khuẩn, ví dụ *E. coli* mỗi loại *IS* có thể có vài bản sao. Ví dụ, *IS1* có từ 6 - 10 bản sao. *IS* có thể tồn tại trong hệ gen hoặc trong *plasmid*. Ví dụ trong *plasmid F* (là *plasmid* qui định tính tiếp hợp của *E. coli*) có hai *IS* khác nhau, đó là *IS2* và *IS3*. Khi hai *IS* này được dịch chuyển sang hệ gen của cá thể *E. coli* nào đó thì cá thể có hệ gen tổ hợp này trở nên có khả năng tiếp hợp, nghĩa là trao đổi vật chất di truyền giữa hai cá thể để tạo nên ADN tái tổ hợp, tức là tạo nên đa dạng di truyền trong quần thể vi khuẩn v.v..

Ngoài những *IS*, ở vi khuẩn còn có các đoạn xen có khả năng di chuyển có kích thước lớn hơn nằm xen vào giữa hai *IS*, được gọi là transposon (*Tn*). Ví dụ, *Tn9* với hai *IS1* ở hai bên, chứa gen *camR* (gồm 2.500 cặp nucleotit) qui định tính chống chịu cloramphenicol của vi khuẩn. *Tn5* gồm hai *IS50* chứa ba gen *kanR*, *bleR*, và *strR* (gồm 5.700 cặp nucleotit) qui định tính chống chịu kanamixin, bleomixin, và streptomixin. *Tn10* gồm hai *IS10* chứa gen *tetR* (gồm 9.300 cặp nucleotit) qui định tính chống chịu tetraxiclin của vi khuẩn.

Đặc biệt là các *IS* của các *Tn* có thể mã hóa cho các enzym và protein có vai trò trong sự chuyển dịch của *Tn*. Ví dụ, đoạn *IS50* có chứa gen mã hóa cho enzym transposaza cần cho sự cắt và dịch chuyển của *Tn*.

Nghiên cứu gen nhảy ở vi khuẩn có tầm quan trọng đối với Y - Dược học. Sự ra đời và sử dụng thuốc kháng sinh đã là cuộc cách mạng trong việc chữa trị các bệnh nhiễm trùng. Nhưng càng ngày vi khuẩn gây bệnh càng trở nên nhờn thuốc. Nhân loại đã từng vui sướng khi cho rằng bệnh lao đã được loại trừ ra khỏi đời sống, nhưng càng ngày tần số người bị nhiễm lao và chết vì lao càng gia tăng. Tại sao vậy? Bởi vì vi khuẩn lao đã chống chịu được (nhờn thuốc) với tác động của kháng sinh kể cả thuốc đa kháng sinh và với liều cao. Các hãng dược phẩm đang có cuộc chạy đua với tính kháng thuốc của vi khuẩn. Tại sao vi khuẩn xuất hiện tính kháng thuốc? Các nhà khoa học đã phát hiện là tính kháng thuốc của vi khuẩn có liên quan đến tính biến dị di truyền của vi khuẩn và đặc biệt liên quan đến các gen nhảy. Đa số *Tn* của vi khuẩn đều chứa gen chống chịu thuốc kháng sinh. Chúng có thể di chuyển từ phân tử ADN này sang phân tử ADN khác, từ hệ gen này sang hệ gen khác, từ cá thể này sang cá thể khác và kết quả là gen kháng thuốc được phổ biến rộng trong quần thể vi khuẩn và hậu quả là các thuốc kháng sinh sẽ sớm mất tác dụng chống bệnh. Quá trình này đã được quan sát thấy trong nhiều chủng gây bệnh ở người, ví dụ các chủng *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Neisseria*, *Shigella* và *Samonella*. Hiện nay, nhiều bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn như bệnh lỵ, lao, lậu v.v. rất khó chữa khỏi, nhiều trường hợp bị tử vong vì vi khuẩn gây bệnh nhờn với nhiều loại kháng sinh khác nhau. Đặc biệt tính kháng thuốc được lan truyền nhanh trong quần thể vi khuẩn là do các *plasmid R* tiếp hợp (conjugative *R plasmids*) có chứa gen đề kháng. Những *plasmid* này có hai cấu thành: một, được gọi là nhân tố chuyển kháng (*RTF*) chứa các gen cần thiết cho sự chuyển gen bằng cách tiếp hợp giữa các tế bào; cấu thành thứ hai được gọi là thể quyết định *R* chứa gen đề kháng. Các gen đề kháng này thường nằm trong transposon xếp xen kẽ trong *plasmid*. Các *plasmid R* tiếp hợp có thể được chuyển giao giữa các vi khuẩn trong quần thể, thậm chí giữa các loài khác nhau, ví dụ giữa *Coccus* và *Bacillus*. Như vậy, tính kháng thuốc một khi đã có ở một bộ phận nhỏ sẽ được lan truyền nhanh chóng cho các bộ phận khác của quần thể vi khuẩn.

+ *Gen nhảy ở Eucaryota*

Người ta đã phát hiện nhiều loại gen nhảy ở nhiều nhóm sinh vật nhân chuẩn. Chúng rất đa dạng về độ lớn và cơ chế hoạt động, nhưng đều có điểm chung là được xếp xen kẽ vào hệ

gen và sử dụng enzym transposaza để di chuyển từ vị trí này sang vị trí khác của phân tử ADN.

Ở cây ngô các gen nhảy *Ac* và *Ds* đã được Barbara McClintock phát hiện và nghiên cứu. Chúng qui định tính biến dị thiếu áo và hạt đốm ở bắp ngô. Bà đã giả thiết là có hai nhân tố *Ac* và *Ds* qui định tính đột biến này và chúng là những yếu tố có thể di chuyển từ thể nhiễm sắc này sang thể nhiễm sắc khác. Về sau các nhà di truyền học phân tử đã xác định *Ac* và *Ds* thuộc họ gen nhảy (transposons). Trong hệ gen của ngô chứa rất nhiều bản *Ac* và *Ds*. Chúng có thể di chuyển và ghép xen vào trong gen gây nên đột biến gen. Kỹ thuật giải trình tự nucleotit cho thấy đoạn *Ac* gồm 4.563 cặp nucleotit được bao bởi đoạn lặp ngược chiều gồm 11 cặp nucleotit. Đoạn lặp này cần thiết cho sự di chuyển của *Ac*. Khi đã được di chuyển sang ADN nhận, chúng được bao bởi đoạn lặp cùng chiều gồm 8 cặp nucleotit. *Ds* cũng thuộc họ gen nhảy với *Ac* và sự hoạt động chuyển dịch vị trí đều phụ thuộc vào sự hoạt động tương tác của *Ac* và *Ds*.

Ở ruồi quả *Drosophila melanogaster*, gen nhảy được nghiên cứu nhiều nhất là yếu tố *P*. Yếu tố *P* gây nên tính đột biến bất thường ở ruồi. Yếu tố *P* có trong thể nhiễm sắc của dòng bố (paternel) (nên được gọi là yếu tố *P*) là gen nhảy. Chúng gồm có 2.907 cặp nucleotit với đoạn lặp ngược chiều gồm 31 cặp nucleotit. Yếu tố *P* có chứa gen mã hóa cho enzym transposaza. Nhờ transposaza yếu tố *P* có thể chuyển dịch sang vị trí mới của hệ gen. Trong hệ gen của ruồi quả có thể có từ vài bản đến 50 bản yếu tố *P*. Điều đáng ngạc nhiên là trước năm 1950 người ta không phát hiện được yếu tố *P* trong các quần thể ruồi. Vì vậy, các nhà di truyền học đã giả thiết rằng yếu tố *P* được di nhập vào hệ gen của ruồi từ các virut kí sinh trong tế bào ruồi. Cũng tương tự như vậy, các yếu tố *IS* trong hệ gen vi khuẩn *E. coli* là có nguồn gốc từ thể thực khuẩn thông qua hiện tượng tải nạp di truyền (genetic transduction).

Ngoài ra ở ruồi quả còn phát hiện thấy gen nhảy *mariner* gồm 1286 cặp nucleotit với đoạn lặp ngược chiều gồm 28 cặp nucleotit. Điều đặc biệt là gen nhảy *mariner* còn được phát hiện ở nhiều loài côn trùng, ở giun tròn, ở nấm và cả ở người. Đáng ngạc nhiên là gen nhảy *mariner* ở ruồi quả cũng tương tự như ở ong mật (đứng về mặt tiến hóa chúng cách xa nhau hàng trăm triệu năm), vì vậy các nhà di truyền học cho rằng gen nhảy *mariner* đã được chuyển giao giữa các loài côn trùng với nhau hoặc thông qua virut kí sinh khi chúng lây nhiễm từ vật chủ này sang vật chủ khác và mang theo gen nhảy ghép vào trong hệ gen của vật chủ. Trong hệ gen của nhiều động vật không xương sống và động vật có xương sống, người ta cũng đã phát hiện gen nhảy *Tc1* tương tự như *mariner* nhưng lớn hơn, chứa khoảng 1.700 cặp nucleotit.

#### + Các Retrotransposon

Trong genom của Eucaryota ngoài các gen nhảy có bản chất ADN, còn có các yếu tố di động có nguồn gốc từ ARN được gọi là retrotransposon. Có hai loại retrotransposon: một loại giống như retrovirut (virutARN) nghĩa là giống với ARN của virut và thông qua sự phiên mã ngược thành ADN để nhân bản phổ biến và một loại có liên quan đến ARN của tế bào được gọi là retroposon.

Loại yếu tố giống retrovirut, ví dụ *Ty1* transposon tìm thấy ở Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* là đoạn ADN chứa khoảng 5900 cặp nucleotit. Có chừng có tới 35 bản *Ty1*. *Ty1* chỉ chứa hai gen là gen *TyA* và gen *TyB* giống với gen *gag* và gen *pol* của retrovirut và sản phẩm protein của chúng trong tế bào Nấm men cũng giống của virut. ADN của *Ty1* là có nguồn gốc từ sự phiên mã ngược từ ARN. Trong quá trình dịch chuyển của *Ty1* thì ARN được phiên mã từ ADN của *Ty1*, sau đó ARN sẽ được phiên mã ngược thành ADN *Ty1* (nhờ enzym revertaza do gen *Ty1B* mã hóa). ADN *Ty1* mới được ghép nối vào ADN nhận để hình thành nên *Ty1*

mới. Các yếu tố di động giống retrovirut cũng được tìm thấy ở ruồi quả, ví dụ yếu tố *copia*, yếu tố *gypsy* đều chứa những gen giống với gen của retrovirut. Retroposon là loại retrotransposon rất phổ biến trong giới động vật: đó là các yếu tố *F*, *G* và *I* tìm thấy ở ruồi quả; các yếu tố *LINE* tìm thấy ở động vật có vú và ở người. Chúng có đặc tính là những đoạn ADN không chứa các đoạn lặp ở cuối và khi dịch chuyển vị trí phải thông qua ARN và sự phiên mã ngược thành ADN nhờ enzym revertaza do chúng mã hóa. Một đặc tính điển hình nhất của các retroposon là đều có nguồn gốc từ sự phiên mã ngược từ các ARN có phần tận cùng chứa nhiều nucleotit lặp *poliA*.

Đối với con người retroposon *LINE1* (còn gọi là *L1*) được phát hiện từ năm 1988 và được nghiên cứu nhiều nhất. Bình thường *L1* có trong thể nhiễm sắc số 22 và khi chúng dịch chuyển vào gen liên kết với thể nhiễm sắc *X* (gen này mã hóa cho protein là nhân tố *VIII* của sự đông máu), gây nên đột biến và kết quả là gây bệnh hay chảy máu (hemophilia) ở người. Điều đáng ngạc nhiên là ở khi đột Gorilla cũng tìm thấy yếu tố *L1* trong thể nhiễm sắc số 22 của chúng, có nghĩa là *L1* đã xuất hiện trước khi Người và Vượn người phân hóa thành hai nhánh cách đây trên 6 triệu năm. Trong hệ gen của Người có thể có từ 50000 - 100000 bản sao *L1* và chiếm tới 5% ADN của hệ gen.

#### + Ý nghĩa tiến hóa của gen nhảy

Gen nhảy là cấu thành rất phổ biến và lâu đời của hệ gen. Đối với một số loài, gen nhảy chiếm số lượng khá nhiều, ví dụ ở ruồi quả, chúng chiếm tới 12 - 15% ADN của hệ gen. Như vậy, rõ ràng là gen nhảy là cấu thành quan trọng của hệ gen. Chúng có vai trò gia tăng tần số đột biến, ví dụ ở ruồi quả *Drosophila* một nửa đột biến ngẫu nhiên là do gen nhảy tạo nên. Như vậy, gen nhảy có vai trò gì trong quá trình tiến hóa? Gen nhảy từ đâu đến? Chúng là thành phần cấu trúc của hệ gen hay chỉ là phân tử kí sinh?

Nhiều nghiên cứu ở nhiều đối tượng khác nhau đã chứng minh rằng gen nhảy là cấu thành quan trọng của hệ gen và đóng vai trò quan trọng trong sự tiến hóa của cấu trúc thể nhiễm sắc. Người ta đã xác định được ở ruồi quả có khoảng 40 họ gen nhảy khác nhau. Mỗi họ có thể có từ 20 – 80 thành viên. Với khả năng di động di chuyển vị trí, các gen nhảy tạo nên sự tổ hợp lại hệ gen làm cho hệ gen càng đa dạng. Hơn nữa gen nhảy còn gia tăng tần số đột biến. Các gen nhảy có thể được xếp xen kẽ vào các đoạn *exon*, các đoạn *intron* hoặc vào vùng ADN điều chỉnh của gen và tạo nên các đột biến gen rất đa dạng. Tuy nhiên, những đột biến mới do sự di chuyển vị trí của gen nhảy xảy ra hiếm hơn cơ chế kiểm soát chặt chẽ sự di chuyển của đa số gen nhảy. Về nguồn gốc của gen nhảy có tác giả cho rằng gen nhảy là do sự phân hóa ngay trong hệ gen của tế bào. Về nguồn gốc các retrotransposon là có thể có nguồn gốc từ các retrovirut bị biến đổi và bắt nhốt vào hệ gen vật chủ hoặc do các retrovirut mang theo khi lây nhiễm từ vật chủ này sang vật chủ khác.

Ngày nay các kĩ thuật tách chiết, nhân bản, giải trình tự và chuyển ghép gen nhảy là một công cụ quan trọng của công nghệ gen và công nghệ tế bào.

### 8.3.2 Hệ gen (genome). Tổ chức của hệ gen

Có thể xem hệ gen là một tập hợp tất cả ADN của một cơ thể trong đó bao gồm cả ADN tạo nên các gen cấu trúc, gen điều chỉnh, các gen rARN và tARN, các ADN điều chỉnh cùng tất cả các loại ADN khác.

Cơ thể đơn bội ( $n$ ) có chứa một genom, cơ thể lưỡng bội ( $2n$ ) chứa hai genom bao gồm genom của bố và genom của mẹ. Trong tế bào và cơ thể đơn bội, gen không có *alen*, còn trong tế bào và cơ thể lưỡng bội gen có *alen* tương ứng: một gen có nguồn gốc từ bố và một

gen có nguồn gốc từ mẹ. Gen và *alen* của nó định khu trong cùng locut của cặp thể nhiễm sắc tương đồng.

Hàm lượng ADN trong genom ở các cơ thể khác nhau là rất khác nhau và tổ chức của genom phản ánh mức độ tiến hóa của loài.

### 1.3.2.1 Độ lớn của hệ gen

Độ lớn của hệ gen được đánh giá bằng hàm lượng ADN chứa trong tế bào thể hiện ở số lượng cặp nucleotit và chúng rất khác nhau ở các nhóm phân loại khác nhau. Qua quá trình tiến hóa, hệ gen của các sinh vật ở mức độ tiến hóa cao hơn có hàm lượng ADN nhiều hơn. Tất nhiên, mức độ tiến hóa không chỉ thể hiện ở hàm lượng ADN trong hệ gen mà thể hiện chủ yếu ở tổ chức của hệ gen.

+ *Đối với tế bào Prokaryota*

Hệ gen của Prokaryota là phân tử ADN xoắn kép, trần, dạng vòng và được định vị trực tiếp trong tế bào chất. Hàm lượng ADN trong hệ gen của Prokaryota khoảng  $0,7 \times 10^6$  đến  $10^7$  cặp nucleotit, chứa khoảng vài trăm đến hàng nghìn gen. Hệ gen của vi khuẩn, ví dụ của *E. coli* là phân tử ADN xoắn kép có dạng vòng chứa khoảng  $4,64 \times 10^6$  cặp nucleotit, chứa 4397 gen (mã hóa cho hàng nghìn protein qui định nên các đặc tính hình thái và sinh lý của vi khuẩn) nếu ta cắt và kéo dài ra thì phân tử ADN có chiều dài khoảng 1,6mm và rộng khoảng 2,4nm, như vậy nó dài hơn tế bào *E. coli* hàng nghìn lần, vì vậy trong tế bào vi khuẩn (có độ lớn vài  $\mu\text{m}$ ) phân tử ADN phải cuộn gấp tạo thành thể chắc được gọi là nucleoid (thể tương tự nhân).

Đối với một số ít vi khuẩn, ADN có dạng xoắn kép thẳng, ví dụ vi khuẩn *Borrelia burgdorferi* có ADN mạch thẳng với độ dài 910.000 cặp nucleotit chứa 853 gen. Hệ gen của vi khuẩn không chứa các đoạn *intron* (trừ vi khuẩn cổ). Một đặc tính tổ chức của hệ gen vi khuẩn là các gen cấu trúc cùng với các phần điều chỉnh thường tập hợp thành đơn vị operon. Ví dụ operon *lac* ở *E. coli* gồm có ba gen cấu trúc với operator và promotor riêng.

Ngoài ra trong tế bào vi khuẩn còn có một số phân tử ADN bé hơn (chứa từ 1.000 - 100.000 cặp nucleotit) có cấu tạo dạng thẳng hoặc dạng vòng được gọi là *plasmid*. *Plasmid* có thể tồn tại độc lập với genom hoặc có thể nhập vào genom tạo nên ADN tái tổ hợp. *Plasmid* có thể được di chuyển từ vi khuẩn sang vi khuẩn khác. Trong *Plasmid* chứa một số gen qui định một số đặc tính của vi khuẩn như tính chống chịu được môi trường khắc nghiệt, ví dụ gen chống chịu kim loại độc; gen chuyển hóa các hóa chất đặc biệt như: toluen, naphtalen, các sản phẩm dầu mỏ v.v. gen chống chịu thuốc kháng sinh. Một số chất độc của vi khuẩn gây bệnh cho động vật và thực vật cũng do *plasmid* qui định. Một đặc tính quan trọng của *plasmid* là nó qui định tính tiếp hợp giữa hai tế bào vi khuẩn qua đó chúng trao đổi gen cho nhau. Cũng vì vậy mà công nghệ gen đã sử dụng *plasmid* như là vectơ chuyển gen, đồng thời dùng *plasmid* để tạo các chủng vi khuẩn tái tổ hợp có đặc tính mong muốn sử dụng trong y học và công nghệ môi trường.

Với kỹ thuật giải trình tự hệ gen các nhà công nghệ gen đã tiến hành giải trình tự hệ gen của nhiều loài vi khuẩn, đặc biệt là các vi khuẩn gây bệnh hoặc vi khuẩn có tầm quan trọng đối với công nghệ vi sinh vật. Điều này cho phép các nhà công nghệ gen biết được cấu trúc và hoạt động của hệ gen (tạo ra hệ protein) từ đó sử dụng chúng cho mục đích y dược học (tạo vaccin phòng chống bệnh, tạo kháng sinh đặc hiệu chống nhờn thuốc v.v.), mục đích công nghệ sản xuất các chế phẩm công nghiệp lên men (tạo chủng có năng suất cao nhất), công nghệ thực phẩm (bia, rượu, nước giải khát, chất dinh dưỡng: sữa, bơ, phò mát, axit amin



không thay thế v.v.), công nghiệp hóa chất (chất phụ gia, mỹ phẩm, hóa chất tẩy rửa, nhuộm màu, xăng etanol, xăng hidro v.v.), công nghệ xử lý rác thải làm sạch môi trường v.v..

+ *Đối với tế bào Eucaryota*

Trong tế bào Eucaryota, ADN liên kết với protein histon tạo nên cấu trúc thể nhiễm sắc chứa trong nhân tế bào. Hệ gen đơn bội của chúng chứa tới  $10^8$  (ở nấm, tảo, động vật đơn bào) cho tới  $10^{11}$  cặp nucleotit (thực vật và động vật đa bào) tức là vào khoảng 6.000 gen (ví dụ nấm men) cho tới vài chục nghìn gen. Ví dụ hệ gen đơn bội của người chứa từ  $3 \times 10^9$  đến  $3,2 \times 10^9$  cặp nucleotit và chứa khoảng từ 25.000 đến 35.000 gen.

Số lượng gen này được chứa trong ADN của 23 thể nhiễm sắc (22 thể nhiễm sắc thường và một thể nhiễm sắc giới tính X hoặc Y). Ngoài ra trong tế bào người (cũng như ở các tế bào nhân chuẩn khác) còn có hệ gen ty thể chứa các phân tử ADN ty thể có cấu tạo xoắn kép dạng vòng, trần (giống ADN vi khuẩn). Mỗi ty thể của tế bào người chứa 10 phân tử ADN và mỗi phân tử ADN có 16.569 cặp nucleotit, chứa 13 gen (không có đoạn *intron*) mã hóa cho protein riêng của ty thể. Ở các cơ thể nhân chuẩn quang hợp thì trong lục lạp cũng có hệ gen lục lạp chứa các ADN lục lạp có cấu tạo xoắn kép dạng vòng (giống ADN vi khuẩn lam). Ví dụ trong lục lạp của cây lúa, ADN lục lạp có 136.000 cặp nucleotit và chứa hàng trăm gen. ADN ty thể và ADN lục lạp được gọi là ADN ngoài nhân chứa các gen tế bào chất (plasmogen) và là cơ sở của di truyền tế bào chất.

**Bảng 2.1 Hàm lượng ADN trong tế bào của các cơ thể sinh vật**

Cơ thể	Độ lớn của hệ gen ( $10^6$ cặp Nu)
+ Prokaryota	+
+ - <i>Mycoplasma genitalium</i>	+ 0,58
+ - <i>Escherichia coli</i>	+ 4,64
+ - <i>Bacillus megaterium</i>	+ 30
+ Eucaryota	+
+ Nấm	+
+ - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Nấm men)	+ 12,1
+ - <i>Aspergillus nidulans</i>	+ 25,4
+ Động vật đơn bào	+
+ - <i>Tetrahymena pyriformis</i>	+ 190
+ Động vật không xương sống	+
+ - <i>Caenorhabditis elegans</i> (giun tròn)	+ 100
+ - <i>Drosophila melanogaster</i> (ruồi quả)	+ 140
+ - <i>Bombyx mori</i> (tằm dâu)	+ 490
+ - <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (cầu gai)	+ 845
+ - <i>Locusta migratoria</i> (châu chấu)	+ 5.000
+ Động vật có xương sống	+
+ - <i>Fugu rubripes</i> (cá Fugu)	+ 400
+ - <i>Rana esculenta</i> (ếch)	+ 15.000
+ - <i>Salamandra</i> sp. (sa giông)	+ 90.000

+	- <i>Mus musculus</i> (chuột nhắt)	+ 3.300
+	- <i>Homo sapiens</i> (người)	+ 3.200
	+ Thực vật	+
+	- <i>Arabidopsis thaliana</i> (rau tاليا)	+ 100
+	- <i>Oryza sativa</i> (lúa)	+ 565
+	- <i>Pisum sativum</i> (đậu Hà lan)	+ 4.800
+	- <i>Zea mays</i> (ngô)	+ 5.000
+	- <i>Triticum aestivum</i> (lúa mì)	+ 17.000
+	- <i>Fritillaria assyriaca</i>	+ 120.000

Khi phân tích hàm lượng ADN ở các cơ thể khác nhau người ta thấy là hàm lượng ADN tăng dần theo cấp độ tiến hóa nhưng không thấy có sự tương ứng hoàn toàn giữa hàm lượng ADN với độ phức tạp của cơ thể ở các bậc tiến hóa. Ví dụ như các loài thuộc lớp chân khớp ở mức độ tiến hóa cao có tổ chức cơ thể phức tạp có hàm lượng ADN dao động trong khoảng từ  $10^8$  -  $10^{10}$  cặp nucleotit tương tự với nhóm động vật đơn bào là bọt ở mức tiến hóa thấp. Trong lớp lưỡng cư, hàm lượng ADN dao động rất lớn từ  $10^9$  -  $10^{11}$  cặp nucleotit. Đối với con người ở đỉnh cao của tiến hóa nhưng hàm lượng ADN ít hơn so với nhiều các loài lưỡng cư.

Đối với Eucaryota, tiến hóa của hệ gen không thể hiện ở hàm lượng ADN chứa trong hệ gen (xem bảng 2.1).

**Bảng 2.2** Hàm lượng ADN và số lượng gen chứa trong bộ thể nhiễm sắc đơn bội của người

+ NST	Số	+ Nhóm	+ Hàm lượng ADN (triệu cặp Nu)	+ Số lượng gen	+ Số lượng gen/ + 1 triệu cặp Nu
+ 1		+ A	+ 279	+ 3013	+ 13
+ 2		+ A	+ 251	+ 2230	+ 10
+ 3		+ A	+ 221	+ 1979	+ 10
+ 4		+ B	+ 197	+ 1406	+ 8
+ 5		+ B	+ 198	+ 1678	+ 9
+ 6		+ C	+ 176	+ 1802	+ 11
+ 7		+ C	+ 163	+ 1479	+ 10
+ 8		+ C	+ 148	+ 1154	+ 9
+ 9		+ C	+ 140	+ 1250	+ 11
+ 10		+ C	+ 143	+ 1261	+ 10
+ 11		+ C	+ 148	+ 1948	+ 15
+ 12		+ C	+ 142	+ 1648	+ 12
+ 13		+ D	+ 118	+ 715	+ 8

+ 14	+ D	+ 107	+ 1072	+ 12
+ 15	+ D	+ 100	+ 987	+ 13
+ 16	+ E	+ 104	+ 1222	+ 15
+ 17	+ E	+ 88	+ 1486	+ 19
+ 18	+ E	+ 86	+ 580	+ 8
+ 19	+ F	+ 72	+ 1730	+ 27
+ 20	+ F	+ 66	+ 856	+ 14
+ 21	+ G	+ 45	+ 351	+ 10
+ 22	+ G	+ 48	+ 787	+ 23
+ X	+ C	+ 163	+ 1218	+ 8
+ Y	+ G	+ 51	+ 128	+ 6

Hơn nữa người ta cũng không quan sát thấy sự tương ứng giữa hàm lượng ADN và số lượng gen trong hệ gen. Ví dụ, nếu ta so sánh Nấm men *Saccharomyces* có hàm lượng ADN là  $12,1 \times 10^6$  cặp nucleotit chứa tới 6.000 gen (đã được giải trình tự năm 1996) với người có hàm lượng ADN là  $3.200 \times 10^6$  cặp nucleotit (gấp 250 lần so với Nấm men) thì hệ gen người phải chứa tới 1,5 triệu gen. Nhưng thực tế hệ gen người chỉ có khoảng 25.000 – 35.000 gen (đã được giải trình tự năm 2003). Như vậy, sự sai khác về tiến hóa trong hệ gen không chỉ thể hiện ở hàm lượng ADN mà còn thể hiện ở tính tổ chức của hệ gen.

Nếu tính trung bình một gen có độ lớn khoảng 1.500 – 1.800 cặp nucleotit thì tế bào con người chứa khoảng hàng triệu gen mã hóa cho hàng triệu protein khác nhau. Nhưng hệ gen người chỉ có khoảng 25.000 gen, hơn nữa cấu trúc của gen phức tạp hơn nhiều, có thể chứa tới hàng chục nghìn, hàng trăm nghìn thậm chí hàng triệu cặp nucleotit (xem bảng 2.2).

Như vậy, tại sao lại có một hàm lượng ADN khổng lồ trong hệ gen người? Để sáng tỏ được vấn đề này cần tìm hiểu mức độ tổ chức đa dạng và phức tạp của hệ gen.

### 1.3.2.2 Đặc tính tổ chức của hệ gen

Tính đa dạng và phức tạp của hệ gen (genome) ở Eucaryota không chỉ thể hiện ở thành phần cấu trúc mà còn thể hiện ở sự sắp xếp của các gen trong hệ gen thể hiện ở chỗ:

#### + Họ đa gen

Nhiều gen thân thuộc sắp xếp liên kết thành họ đa gen. Các họ đa gen này cũng rất đa dạng nhưng đều thể hiện vai trò tổ hợp trong hoạt động của hệ gen đáp ứng nhu cầu của cơ thể trong quá trình sinh trưởng và phát triển.

Có họ đa gen mã hóa cho các họ protein có vai trò cấu trúc và chức năng như: actin, tubulin, collagen, keratin, protein màng nuôi, một số protein huyết tương, hemoglobin, một số protein màng, histon, protein noãn hoàng và protein kháng thể. Các gen trong họ đa gen là kết quả của sự nhân đoạn và đột biến hoặc tổ hợp từ gen gốc. Ví dụ ở người, trong tế bào nón và tế bào que (có vai trò thu nhận ánh sáng) tồn tại 4 gen mã hóa cho 4 loại protein khu trú trong màng sinh chất có chức năng thu nhận bức xạ ánh sáng khác nhau, 4 loại protein này đều thuộc họ rodopsin. Bốn gen này định vị thành một cụm trong thể nhiễm sắc X. Các bệnh sai

lệch về thị giác, đặc biệt là bệnh mù màu là có nguyên nhân đột biến trong họ gen rodopxin dẫn tới làm sai lệch cấu trúc phân tử của protein thuộc họ Rodopxin.

Có họ đa gen không mã hóa cho protein mà là các gen chỉ phiên mã - đó là các gen rARN và tARN.

#### + Sự định khu và sắp xếp của các gen

Trong phân tử ADN các gen được sắp xếp tuyến tính nối tiếp nhau theo từng cụm cùng với các phần *bổ trợ* tạo nên các operon như ở vi khuẩn hoặc sắp xếp theo các họ đa gen như ở Eucaryota. Các gen cùng họ có thể giống nhau và xếp liên tiếp cạnh nhau như các gen rARN hoặc có thể là các gen khác nhau xếp liên tiếp cạnh nhau như các gen mã hóa cho globin của hemoglobin; hoặc có thể là các gen khác nhau định khu ở trong các thể nhiễm sắc khác nhau ví dụ họ gen – actin, họ gen – tubulin.

- Giữa các gen trong họ gen, có các đoạn nucleotit đệm xen kẽ vào. Các đoạn đệm có thể phiên mã hoặc *không*, nhưng không được dịch mã.

- Các gen định khu trong thể nhiễm sắc theo trình tự của các nucleotit xếp nối tiếp thẳng hàng liên tục, nhưng có rất nhiều gen sắp xếp theo kiểu nối ghép (split) tức có xen kẽ các đoạn *intron* (là đoạn nucleotit được phiên mã nhưng không được dịch mã) với đoạn *exon* (đoạn nucleotit được phiên mã và dịch mã). Ví dụ gen mã hóa cho vitellogenin A có đến 33 đoạn *intron*. Các gen có chứa các đoạn *intron* xen kẽ được gọi là gen phân tán hoặc gen khảm.

Kiểu tổ chức theo kiểu gen khảm có vai trò quan trọng trong việc thực hiện cơ chế điều hòa hoạt động của *gen*, cũng như có vai trò trong tiến hóa.

#### + Các đoạn ADN lặp

Trong hệ gen của Eucaryota có rất nhiều trình tự nucleotit lặp với tần số lặp từ 3 đến 100.000 lần. Đoạn nucleotit lặp có thể chỉ chứa vài cặp nucleotit đến 300 cặp nucleotit hay nhiều hơn và có khi chiếm *trên* 40 - 50% ADN của hệ gen. Các đoạn lặp ngắn thường phân bố xen kẽ vào các gen cấu trúc. Có ý kiến cho rằng các cụm nucleotit lặp xen kẽ đóng vai trò điều hòa và tổ hợp hoạt động của các gen cấu trúc.

Trong tổ chức của hệ gen, các nhân tố điều chỉnh hoạt động của gen được tăng cường theo con đường đa dạng hóa không chỉ tăng cường các yếu tố điều hòa tại chỗ – các đoạn ADN sắp xếp trước gen, xen kẽ trong gen mà còn bằng sự sắp xếp các gen theo định khu không gian (không *tuyến tính*) trong tổ chức thể nhiễm sắc tạo điều kiện cho sự phối hợp sự điều hòa hoạt động của gen cũng như tổ hợp lại các gen có sẵn tạo nên các gen mới.

Tính đa dạng và phức tạp về tổ chức của hệ gen không chỉ thể hiện trong cấu tạo mà còn thể hiện ở cơ chế hoạt động và điều hòa hoạt động của gen.

## 8.4 Sự điều hòa hoạt động của gen

### 8.4.1 Điều hòa hoạt động của gen ở sinh vật nhân sơ

Hệ gen của tế bào sinh vật nhân sơ có hàng trăm đến nghìn gen. Ở mỗi thời điểm chỉ có một số ít các gen hoạt động, đại bộ phận các gen khác ở trạng thái ức chế. Cơ chế điều hòa hoạt động của gen đã được F. Jacob và J. Monod là hai nhà khoa học người Pháp phát hiện ở vi khuẩn *E.coli* vào năm 1961.

Cơ chế điều hòa của gen phụ thuộc vào cấu trúc của hệ gen trong ADN, phụ thuộc vào các nhân tố trong tế bào và các nhân tố của môi trường.

### 1.4.1.1 Mô hình điều hòa cảm ứng

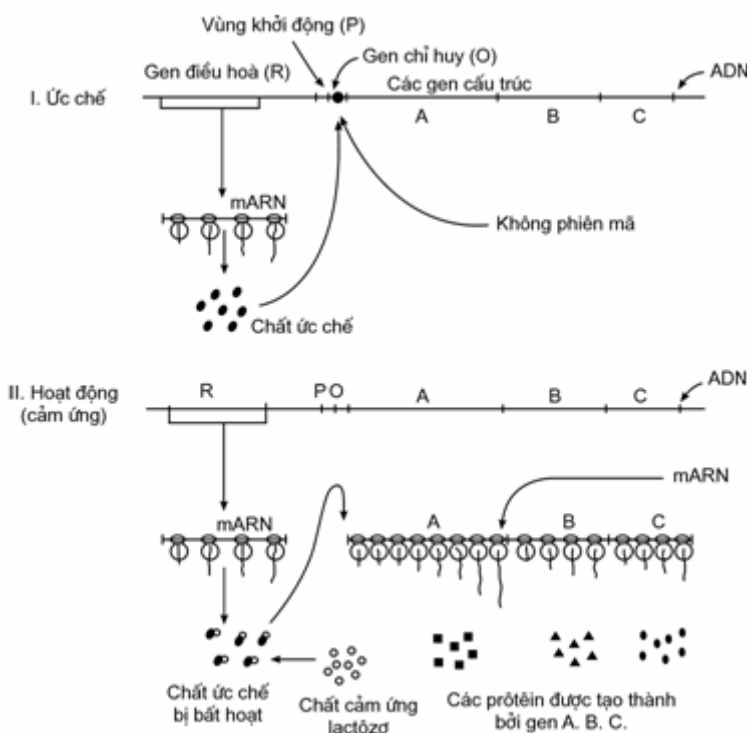
Trong ADN, các gen có liên quan về chức năng thường được phân bố thành một cụm, có chung một cơ chế điều hòa được gọi là operon. Ví dụ: operon lac ở *E.coli* điều hòa tổng hợp các enzym ( $\beta$ -galactozidaza, transaxetilaza, permeaza v.v.) giúp chúng sử dụng đường lactozo có trong môi trường.

Operon lac gồm các thành phần:

+ *Nhóm gen cấu trúc* (structure gene - S) liên quan với nhau về chức năng nằm kề nhau (ví dụ các gen A, B, C) mã hóa cho các enzym ( $\beta$ -galactozidaza, transaxetilaza, permeaza).

+ *Gen chỉ huy* (operator gene - O): nằm trước các gen cấu trúc và là vị trí tương tác với protein ức chế.

+ *Vùng khởi động* (còn gọi là gen vận hành) (promotor - P): nằm trước gen chỉ huy đó là vị trí tương tác với enzym ARN polimeraza để khởi đầu phiên mã.



Hình 1.5

Sơ đồ cơ chế điều hòa hoạt động của operon lac ở *E. coli*

Sự hoạt động của operon chịu sự điều khiển của một gen điều hòa (regulator gene- R) nằm ở trước operon. Bình thường gen R tổng hợp ra một loại protein có tác dụng ức chế (được gọi là protein ức chế - repressor) gắn vào gen chỉ huy do đó enzym ARN polimeraza không phiên mã được, gen cấu trúc ở trạng thái ức chế không hoạt động. Đó là trường hợp trong môi trường không có lactozo. Trong trường hợp môi trường có lactozo thì operon chuyển sang trạng thái hoạt động. Lactozo đóng vai trò như nhân tố cảm ứng bằng cách liên

kết với protein ức chế, do đó protein ức chế không gắn vào *O*, nhờ vậy enzym phiên mã ARNpolimeraza tương tác được với *P* để phiên mã.

Sơ đồ cơ chế điều hòa hoạt động của operon lac ở trạng thái ức chế (I) và trạng thái hoạt động (II) được mô tả trên hình 1.5.

### 1.4.1.2 Mô hình điều hòa ức chế

Mô hình điều hòa ức chế thể hiện cơ chế điều hòa theo kiểu cảm ứng (hoạt hóa gen) xảy ra đối với các operon khi có chất cảm ứng là các cơ chất được vi khuẩn phân giải. Ngoài ra còn có cơ chế điều hòa theo kiểu ức chế (bất hoạt gen) đặc trưng cho các operon khi có chất ức chế là các sản phẩm được tổng hợp bởi vi khuẩn. Ví dụ, đối với operon *trp* là operon chứa các gen mã hóa cho enzym (tryptophan xynthetaza) có vai trò tổng hợp axit amin tryptophan cần cho vi khuẩn. Trường hợp vi khuẩn thiếu tryptophan, operon *trp* hoạt động và sản sinh ra enzym, do đó tryptophan được tổng hợp, nhưng khi lượng tryptophan đã đủ thì chính tryptophan lại trở thành chất ức chế hoạt động của operon *trp*. Tryptophan được gọi là chất đồng ức chế, bởi vì trong trường hợp bình thường khi không có tryptophan thì chất ức chế do gen *R* sản sinh ra không có hoạt tính nghĩa là không gắn vào *O* do đó operon *trp* hoạt động sản sinh ra enzym, còn khi có quá nhiều tryptophan thì tryptophan sẽ liên kết với chất ức chế và phức hợp này sẽ gắn vào *O* và do đó ức chế hoạt động của operon.

Nhân tố của môi trường tham gia vào cơ chế điều chỉnh hoạt động của gen có thể là các nhân tố nội bào (các sản phẩm của trao đổi chất) hoặc nhân tố đến từ môi trường. Chúng có thể đóng vai trò cảm ứng (hoạt hóa gen ví dụ lactozơ hoạt hóa operon *lac*) hoặc đóng vai trò ức chế (bất hoạt gen ví dụ tryptophan ức chế operon *trp*).

## 8.4.2 Điều hòa hoạt động của gen ở sinh vật nhân chuẩn

Cơ chế điều hòa hoạt động của gen ở sinh vật nhân chuẩn phức tạp hơn, do cấu trúc phức tạp của ADN trong thể nhiễm sắc. ADN trong các tế bào của sinh vật nhân chuẩn có khối lượng rất lớn tới hàng chục triệu, hàng tỉ cặp nucleotit. Chỉ có một phần nhỏ ADN mã hóa các thông tin di truyền (tạo nên các gen cấu trúc) còn đại bộ phận đóng vai trò điều hòa hoặc không hoạt động.

Tế bào tổng hợp protein nhiều hay ít là do nhu cầu của từng tế bào hoặc tùy từng giai đoạn phát triển của cơ thể.

ADN nằm trong thể nhiễm sắc có cấu trúc bện xoắn phức tạp cho nên trước phiên mã, thể nhiễm sắc phải tháo xoắn. Sự điều hòa hoạt động của gen ở sinh vật nhân chuẩn qua nhiều mức điều hòa, qua nhiều giai đoạn như: thể nhiễm sắc tháo xoắn, phiên mã, biến đổi sau phiên mã, dịch mã và biến đổi sau dịch mã.

Trong cùng một loại tế bào, các loại mRNA có tuổi thọ khác nhau. Các protein đã được tổng hợp xong vẫn tiếp tục chịu một cơ chế kiểm soát của các enzym. Enzym phân giải những protein bị sai lệch hoặc không còn cần thiết đồng thời tổng hợp các protein khác thay thế.

Ở các sinh vật nhân chuẩn bên cạnh vùng khởi động (promotor) phiên mã người ta còn thấy có các yếu tố điều hòa khác như các gen tăng cường (enhancer), gen bất hoạt (gen im lặng-silencer). Các gen tăng cường tác động lên gen điều hòa gây nên sự biến đổi cấu trúc của nucleoxom; còn gen bất hoạt làm ngừng quá trình phiên mã.

Về tín hiệu, thì ngoài những tín hiệu đóng mở gen có trong tế bào chất hoặc đến từ môi trường thì còn có rất nhiều tín hiệu đến từ tế bào bên cạnh, từ các mô và cơ quan khác nhau,

ví dụ các chất sinh trưởng (growth factors), các hormon steroid là tín hiệu hoạt hóa gen. Về cơ chế thì phức tạp hơn thể hiện sự điều chỉnh theo nhiều cấp độ, lệ thuộc vào nhau và phối hợp với nhau.

Trong tế bào soma của động vật có xương sống bậc cao có khoảng 20 - 20.000 gen hoạt động, thuộc 2 loại:

- Những gen phổ biến còn được gọi là các “gen giữ nhà” (house keeping genes) là những gen chiếm đa số, hoạt động trong tất cả các dạng tế bào. Ví dụ, các gen mã hóa cho các enzym của quá trình đường phân.

- Những gen đặc thù chỉ hoạt động trong một số dạng tế bào. Các gen này chịu trách nhiệm trong sự biệt hóa tế bào về cấu tạo và chức năng. Các gen này hoạt động (mở) ở một số tế bào và không hoạt động (đóng) ở một số tế bào khác, ví dụ các gen mã hóa cho hemoglobin hoạt động trong dòng tế bào tủy xương biệt hóa thành hồng cầu, còn đối với các tế bào biểu bì da thì các gen mã hóa cho keratin ở trạng thái hoạt động, còn gen mã hóa cho hemoglobin bị đóng.

### 1.4.2.1 Cấp độ điều hòa

Sự điều hòa hoạt động của gen thực hiện ở 9 cấp độ khác nhau:

a/ Tổ chức của ADN trong thể nhiễm sắc bao gồm tổ chức phân tử, siêu hiển vi và hiển vi.

b/ Sự phiên mã ADN thành ARN, bao gồm các nhân tố tham gia phiên mã như: các ARN polymeraza, các phức hợp nhân tố phiên mã, các nhân tố liên kết với vùng điều chỉnh của gen (nhân tố liên kết được gọi là TRANS, còn vùng ADN bị liên kết được gọi là CIS).

c/ Quá trình xử lý, chế biến ARN sau phiên mã, gồm quá trình chín ARN.

d/ Sự chuyên chở mARN từ dịch nhân qua lỗ màng nhân ra tế bào chất, nơi cần để dịch mã.

e/ Sự dịch mã trên riboxom để tạo thành protein: protein cấu trúc, protein enzym hoặc protein điều chỉnh.

f/ Sự tồn tại và phân giải của mARN - tuổi thọ của mARN.

g/ Các biến đổi của protein sau dịch mã bao gồm sự glucit hóa (glycosylation), sự photphorin hóa, sự tạo thành cấu trúc 3D.

h/ Sự cung cấp protein đúng địa chỉ, nơi tế bào và cơ thể cần sử dụng.

i/ Sử dụng và phân giải protein được tổng hợp.

### 1.4.2.2 Điều hòa hoạt động của gen trong phiên mã

- *Protein điều chỉnh* (regulator proteins)

+ Các nhân tố điều hòa phiên mã là các protein (yếu tố TRANS) gắn vào ADN ở vùng điều chỉnh (yếu tố CIS) của gen. Các protein điều chỉnh có cấu trúc cấp 4 ở dạng nhị hợp (dimer) hoặc đa hợp (polymer) có chứa tối thiểu 3 vùng hoạt tính: vùng hoạt tính cần cho sự

nhị hợp hóa, vùng hoạt tính cần cho sự gắn kết với ADN và vùng hoạt tính cần cho sự điều hòa phiên mã (tương tác với ARN - polymeraza).

+ Protein điều chỉnh nhận biết trình tự nucleotit của vùng điều chỉnh của gen (gồm khoảng 6 nucleotit) có cả ở 2 mạch ADN. Mỗi mạch polipeptit của protein điều chỉnh gắn với một mạch ADN ở vùng điều chỉnh.

+ Khi protein điều chỉnh gắn vào ADN điều chỉnh sẽ tạo nên chỗ gấp cong của ADN. Góc gấp cong ADN thay đổi tùy theo loại protein điều chỉnh và có ảnh hưởng đến tốc độ hoạt động của gen. Đồng thời, protein điều chỉnh qua vùng hoạt tính thứ 3 sẽ liên kết với ARN - polymeraza II ở vùng promotor của gen để tạo nên chỗ gấp cong thứ hai và dẫn tới tạo nên những vòng bên ADN. Sự hình thành vòng bên tạo điều kiện cho sự điều hòa phiên mã bởi các vùng ADN ở cách xa nhau của mạch ADN ở dạng tuyến tính.

+ Cùng một gen có thể có nhiều vùng điều chỉnh gắn với các protein điều chỉnh khác nhau. Các vùng điều chỉnh này có tên gọi chung là “yếu tố trả lời” (response element-RE). Ví dụ, RE cho các tín hiệu hormon steroid. Hormon khuếch tán qua màng sẽ liên kết với protein - thụ thể nội bào tạo thành dimer và dimer sẽ gắn với ADN điều chỉnh. Ví dụ, RE cho AMP vòng (CRE). AMP vòng xuất hiện khi có tác động của hormon protein gắn với thụ thể màng và khi nồng độ AMP vòng tăng cao sẽ làm photphorin hóa protein-dimer được gọi là CREB (CRE binding protein), dimer này sẽ gắn vào ADN điều chỉnh tức là CRE. Cần nhớ rằng các protein điều chỉnh cũng được mã hóa bởi các gen điều chỉnh và bản thân các gen này cũng có vùng điều chỉnh riêng của mình.

+ Sự liên kết của protein điều chỉnh với vùng ADN điều chỉnh gây nên hiệu ứng hoạt hóa hoặc ức chế sự phiên mã (mở hoặc đóng gen) và kết quả là làm tăng cao hoặc giảm thiểu lượng mRNA được tổng hợp tùy nhu cầu.

Sự ức chế phiên mã là do sự gắn của protein đặc thù vào vùng ADN được gọi là vùng bất hoạt (silencer).

Những protein đặc thù đó kiểm soát sự phiên mã của các gen mã hóa cho các protein của neuron (các protein tạo nên các tơ thần kinh (neurofilament), các protein tạo nên kênh natri v.v.).

Sự kích thích phiên mã là do các protein điều chỉnh gắn vào vùng ADN được gọi là vùng tăng cường (enhancer).

+ Một số protein có tác động điều hòa sự phiên mã là cần thiết cho sự biệt hóa tế bào và mô.

Ví dụ, protein MyoD1 tác động trong sự biệt hóa các hợp bào cơ vân, hàm lượng của chúng thay đổi tùy theo các giai đoạn phát triển của hợp bào cơ vân. MyoD1 là protein điều chỉnh phiên mã của các gen mã hóa cho các protein tạo nên các tơ cơ co rút và các protein tạo kênh ion trong màng sinh chất hợp bào cơ. Ở giai đoạn cơ bào (myoblast) hàm lượng MyoD1 rất ít và được tăng cao ở giai đoạn hợp bào cơ chứa nhiều tơ cơ. Trong hợp bào cơ hàm lượng của chúng giảm khi cơ đã có phân bố thần kinh (hình thành xinap cơ-thần kinh) và sẽ tăng cao khi hợp bào cơ bị cắt mất dây thần kinh. Như vậy, MyoD1 có tác động hoạt hóa các gen mã hóa cho các protein co rút hoặc protein kênh ion ở dạng “trưởng thành” của hợp bào cơ khi hợp bào cơ chưa có tiếp xúc thần kinh và khi đã hình thành tiếp xúc thần kinh các gen này sẽ bị ức chế.

Protein MyoD1 kết hợp cùng các protein khác cùng họ với MyoD1 tác động nối tiếp nhau kiểm tra các giai đoạn biệt hóa của hợp bào cơ.



+ Nhiều protein điều chỉnh có chứa vùng hoạt tính đặc biệt được gọi là vùng homeo (homeodomain), chúng chịu trách nhiệm trong sự biệt hóa của phôi giai đoạn sớm tức là kiểm soát sự phân cắt và phân cực của phôi.

Đột biến của các gen mã hóa cho các protein này sẽ dẫn đến sai lệch và quái thai ở các phần khác nhau của cơ thể ở ruồi quả cũng như ở người. Những gen này vẫn có thể hoạt hóa ở cơ thể trưởng thành và protein do chúng qui định vẫn đóng vai trò điều chỉnh phiên mã cho các gen khác.

- *Tương tác giữa enzym ARN- polymeraza III với promotor*

+ Môi tương tác giữa enzym ARN-polymeraza III với promotor cũng là nhân tố điều hòa hoạt động của gen. Promotor là đoạn ADN gồm một số trình tự nucleotit đặc thù có ái lực liên kết với ARN-polymeraza III để bắt đầu phiên mã. Số lượng promotor cũng như vị trí định khu của chúng trong gen cũng là nhân tố kiểm soát sự hoạt động của gen. Ví dụ, gen mã hóa cho enzym  $\alpha$ -amilaza. Amilaza là enzym xúc tác thủy phân tinh bột thành maltose. Chúng được tổng hợp trong gan (để thủy phân glicogen) và trong tuyến nước bọt (để thủy phân tinh bột). Gen này có hai promotor và là gen khảm có chứa các đoạn *intron* và các đoạn *exon* S, L, 2, 3, v.v..

Trong tế bào gan, promotor nằm cạnh *exon* L được hoạt hóa và kết quả tạo nên amilaza trong gan.

Trong tế bào tuyến nước bọt, promotor nằm cạnh *exon* S được hoạt hóa và tạo nên amilaza trong nước bọt.

+ Mạch ADN của Eucaryota nằm gấp khúc và nén trong cấu trúc thể nhiễm sắc tạo nên sự định vị không gian của các gen cũng như của các promotor, tạo điều kiện cho sự liên kết của ARN-polymeraza với promotor để điều hòa hoạt động của gen đáp ứng nhu cầu của tế bào.

### 1.4.2.3 Điều hòa hoạt động của gen sau phiên mã

Điều hòa hoạt động của gen sau phiên mã thể hiện chủ yếu ở quá trình chín và số phận tương lai của mARN.

- Các mARN vừa được tổng hợp chưa thể dùng làm khuôn để dịch mã được gọi là tiền mARN (hay mARN sơ cấp), chúng cần được xử lý ghép nối (alternative splicing) tức là quá trình cắt bỏ các đoạn *intron* và ghép nối các đoạn *exon* tạo thành nhiều mARN chín khác nhau có thể làm khuôn để dịch mã sản sinh nhiều protein khác nhau. Sự chế biến ghép nối có thể tạo nên mARN để dịch mã cho các iso của cùng protein trong cùng một tế bào hoặc trong các tế bào khác nhau, ví dụ một gen có thể sản sinh ra các dạng iso của protein dính kết NCAM 140 và 180kDa trong noron và cơ vân và dạng 120kDa trong các tế bào thần kinh đệm (astrocyte). Sự chế biến ghép nối có thể tạo nên các mARN để dịch mã cho 2 loại protein khác nhau, trong 2 loại tế bào khác nhau, ví dụ cùng một gen nhưng trong tế bào cạnh nang của tuyến giáp sẽ sản sinh ra hormon calcitonin, còn trong noron vận động lại sản sinh ra CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) là chất trung gian thần kinh.

- Các quá trình khác trong sự chín của mARN và sự xuất xưởng của mARN cũng tham gia vào sự điều hòa hoạt động của gen, ví dụ độ lớn và thành phần nucleotit của vùng 3' không mã hóa của mARN có ảnh hưởng đến sự ổn định và tuổi thọ của mARN. Phần tử mARN thường gồm 3 đoạn: đoạn 5' không mã hóa (không dùng để dịch mã sang protein) có độ lớn khoảng 100 nucleotit tạo thành mũ được gắn với protein, cần thiết cho sự vận chuyển

mARN qua lỗ màng nhân và dịch mã trên riboxom và đoạn cuối 3' không mã hóa có độ lớn khoảng 1.000 nucleotit và tận cùng bởi đuôi poly-A. Chính đoạn 3' không mã hóa này có chứa tín hiệu địa chỉ nơi tế bào chất mà ở đó mARN cần chuyên chở đến, cũng như chứa tín hiệu liên kết với protein đặc thù trong tế bào chất qui định tuổi thọ của mARN. Độ dài của đuôi poly-A qui định tuổi thọ của mARN, đuôi poly-A càng ngắn thì mARN bị phân giải càng nhanh. Trong tế bào chất đoạn 3' không mã hóa có thể liên kết với các cấu trúc vi sợi và vi ống. Một số dạng mARN có tuổi thọ ngắn khoảng 15 phút, có dạng mARN có tuổi thọ dài tới vài ngày.

#### 1.4.2.4 Cấu trúc của thể nhiễm sắc

Ở Eucaryota, cấu trúc phức tạp của thể nhiễm sắc cũng đóng góp vào cơ chế điều hòa hoạt động của gen trong các tế bào soma, ví dụ như trạng thái xoắn và đóng đặc của sợi nhiễm sắc, sự khác biệt giữa vùng nhiễm sắc thực (eurochromatine) và vùng dị nhiễm sắc (heterochromatine), như hiện tượng bất hoạt của một thể nhiễm sắc X ở cá thể cái động vật có vú (hiện tượng bù liều), như hiện tượng hình thành các thể nhiễm sắc đặc biệt qua các giai đoạn phát triển cá thể (thể nhiễm sắc khổng lồ ở giai đoạn ấu trùng ruồi quả, thể nhiễm sắc chồi bóng đèn ở giai đoạn tiền kỳ giảm phân I ở một số động vật) v.v.. Ta xem xét một số trạng thái cấu trúc của thể nhiễm sắc gây ảnh hưởng lên hoạt động của gen.

##### - Vùng nhiễm sắc thực và vùng dị nhiễm sắc

Trong nhân tế bào ở giai đoạn gian kỳ, chất nhiễm sắc tồn tại ở hai trạng thái thấy rõ dưới kính hiển vi: vùng chất nhiễm sắc thẫm hơn, đậm đặc hơn được gọi là vùng dị nhiễm sắc và vùng ở đó *chất* nhiễm sắc thưa hơn, nhạt hơn được gọi là vùng nhiễm sắc thực. Nhiều nghiên cứu di truyền tế bào kết hợp với nghiên cứu sinh hóa đã chứng minh rằng vùng nhiễm sắc thực chứa các sợi nhiễm sắc đang ở trạng thái dãn xoắn (gen hoạt động), còn vùng dị nhiễm sắc là nơi chứa các sợi nhiễm sắc ở trạng thái xoắn và cô đặc (gen không hoạt động). Bằng kỹ thuật di truyền, nếu đem chuyển gen ở vùng nhiễm sắc thực đến vùng dị nhiễm sắc thì chúng sẽ không sản ra sản phẩm hoặc sinh ra sản phẩm sai lệch. Trong cơ thể, ví dụ ở ruồi quả nhiều đột biến đảo đoạn hoặc chuyển đoạn xảy ra là do sự chuyển vị trí của gen ở vùng nhiễm sắc thực sang vùng dị nhiễm sắc. Các đột biến này thường được gọi là đột biến do hậu quả vị trí (position- effect variegation). Rõ ràng rằng trạng thái xoắn và cô đặc của vùng dị nhiễm sắc đã ngăn cản gen hoạt động, bởi vì muốn gen phiên mã (tổng hợp ARN) từ đó dịch mã (tổng hợp protein) thì sợi nhiễm sắc phải tháo xoắn để có thể sử dụng mạch đơn ADN làm khuôn tổng hợp ARN. Có khoảng 30% ADN của ruồi quả là ở trạng thái dị nhiễm sắc. Đa số dị nhiễm sắc định vị xung quanh trung tiết, một số nằm xen kẽ vào vùng nhiễm sắc thực, một số khác định vị ở cuối tiết mút của thể nhiễm sắc. Các vùng dị nhiễm sắc thường chứa nhiều trình tự ADN lặp với tần số cao và trung bình trong đó có các gen nhảy, đặc biệt là các retransposon không hoạt động. Tuy nhiên, trong vùng dị nhiễm sắc có chứa các gen không hoạt động tạm thời và trong điều kiện cần thiết có thể chuyển sang hoạt động, ví dụ các gen mã hóa cho rARN, hay các gen mã hóa cho một số protein. Trong quá trình tái bản các ADN của vùng dị nhiễm sắc thường tái bản chậm hơn so với ADN vùng nhiễm sắc thực. Đối với tế bào soma ở nữ giới, một thể nhiễm sắc X ở trạng thái bất hoạt là dị nhiễm sắc. Nhiều nghiên cứu sinh hóa đã chứng minh là vùng thể nhiễm sắc ở trạng thái dị nhiễm sắc là do ADN của vùng đó bị methyl hóa ở gốc cytozin và bị liên kết với các protein đặc thù do đó phong bế bộ máy phiên mã. Như vậy, sự phân hóa của chất nhiễm sắc thành vùng dị nhiễm sắc và vùng nhiễm sắc thực cũng một phương thức điều chỉnh hoạt động của gen.

##### - Hoạt động của gen trong thể nhiễm sắc đa sợi

Thể nhiễm sắc đa sợi (polyten chromosome) quan sát thấy ở ruồi quả và ở sâu bọ Hai cánh (Diptera) thể hiện sự hoạt động của gen tùy thuộc vào trạng thái cấu trúc của thể nhiễm sắc. Thể nhiễm sắc đa sợi có đặc điểm không chỉ ở chỗ bao gồm rất nhiều sợi nhiễm sắc xếp thành bó mà còn ở chỗ có rất nhiều cấu trúc đĩa ngang (đĩa Balbiani), đó là các gen được nhân đoạn ở trạng thái không hoạt động. Trong quá trình phát triển ở giai đoạn ấu trùng (con dòi) biến thành nhộng, các đĩa ngang đậm đặc biến đổi thành các “búp” thưa hơn, sáng hơn. Các nghiên cứu về di truyền tế bào và sinh hóa đánh dấu phóng xạ đã chứng minh rằng ở vùng các “búp” là các sợi nhiễm sắc được tháo xoắn, các gen đang tích cực phiên mã sản sinh nhiều ARN. Theo tiến trình thời gian các đĩa được lần lượt được “búp” hóa (gen hoạt động) dưới tác động kích hoạt của hormon *ecdixon* do bản thân ấu trùng tiết ra. Thực nghiệm đã chứng minh rằng nhiều nhân tố kích hoạt gen, ví dụ sốc nhiệt (nuôi ấu trùng ở nhiệt độ trên 33°C), gây nên sự “búp” hóa ở các locut của *gen sốc nhiệt* (heat – shock genes).

- *Hoạt động của gen trong thể nhiễm sắc chổi bóng đèn*

Thể nhiễm sắc chổi bóng đèn (lampbrush chromosome) được quan sát thấy ở giai đoạn diplonem của tiền kỳ giảm phân I ở noãn bào các loài ếch nhái và một số loài động vật có xương sống khác cũng thể hiện sự hoạt động của gen có liên quan đến trạng thái dẫn xoắn của sợi nhiễm sắc. Thể nhiễm sắc chổi bóng đèn có kích thước rất lớn đạt tới 400- 800µm chiều dài, gồm một trục sợi nhiễm sắc xoắn mang nhiều búi bên hình số 8. Các nghiên cứu hóa tế bào phóng xạ đã chứng minh rằng, các búi bên gồm các sợi nhiễm sắc dẫn xoắn trong đó các gen đang tích cực phiên mã tổng hợp nhiều ARN. Đa số các gen này là gen mã hóa cho rARN, chúng phiên mã cung cấp rARN tạo nên hàng triệu riboxom, đáp ứng sự tổng hợp protein cần thiết cho noãn bào tích lũy chất dinh dưỡng trong noãn hoàng của trứng.

- *Cấu trúc nucleoxom và phiên mã của gen*

Một vấn đề đặt ra cho các nhà di truyền tế bào phân tử giải quyết là làm sáng tỏ cấu trúc nucleoxom đối với sự phiên mã ở tế bào nhân chuẩn. Khi sử dụng tổng hợp các kỹ thuật nghiên cứu về hóa tế bào, sinh hóa đánh dấu phóng xạ, hiển vi điện tử v.v. trên nhiều đối tượng đặc biệt *trên* hồng cầu gà đối với gen mã hóa β-globulin và gen mã hóa cho albumin, người ta đã giả thiết rằng khi phiên mã ADN xoắn quanh lõi histon (ở nucleoxom) đã được “mở” ra để phiên mã. Sự “mở” để nói lỏng ADN có liên quan đến 2 dạng protein phi histon là HMG14 và HMG17 (HMG - High Mobility Group tên gọi nhóm protein phi histon có tính di chuyển nhanh khi điện di trên gel). Người ta cũng giả thiết rằng các protein này đã tác động đến đoạn ADN nằm trước gen phiên mã hoặc nằm trong vùng ADN của promotor hoặc enhancer của gen phiên mã làm cho ADN nói lỏng khỏi lõi histon và tạo điều kiện cho hoạt động của bộ máy phiên mã.

## 8.5 *Tiến hóa của hệ gen*

### 8.5.1 *Hàm lượng ADN*

Như ta đã biết, gen có bản chất là ADN (hoặc ARN như đối với một số virut), là đơn vị tích thông tin di truyền được tập hợp thành tổ chức hệ gen (genome). Gen cũng như hệ gen được xuất hiện và tiến hóa trong quá trình tiến hóa của sự sống. Như phần trên đã nói có thể là phân tử ARN xuất hiện trước về sau mới chuyển nhiệm vụ tích thông tin di truyền cho ADN còn ARN chỉ đóng vai truyền đạt thông tin di truyền. Hiện nay còn tồn tại nhiều virut sử dụng ARN để tích thông tin di truyền ví dụ virut khảm thuốc lá, virut HIV v.v.. Trong quá trình ký sinh dung hợp trong tế bào vật chủ, virut HIV có thể phiên mã ngược từ ARN thành ADN để tích thông tin di truyền của chúng. Đối với virut và Prokaryota chúng có

ADN là phân tử mạch đơn hoặc mạch kép ở dạng trần không liên kết với histon, có cấu tạo vòng và búi với hàm lượng tương ứng với số lượng gen chứa trong đó. Ví dụ thực khuẩn thể MS2 có ARN mạch đơn chứa 3.569 nucleotit tạo nên 4 gen, thực khuẩn thể X174 có mạch đơn ADN chứa 5.386 nucleotit tạo nên 11 gen. Virut có nhiều gen nhất là thực khuẩn thể T<sub>2</sub>, ADN của chúng chứa tới 150 gen. Đối với Prokaryota thì hàm lượng ADN và số lượng gen nhiều hơn, ví dụ vi khuẩn *E. coli* có mạch kép ADN chứa 4,64 triệu cặp nucleotit tạo nên khoảng 4.000 gen. Đối với Eucaryota thì cấu trúc của gen và tổ chức của hệ gen phức tạp hơn nhiều. Trong lúc Prokaryota có ADN trần và hệ gen đơn bội (gen không có alen tương ứng) thì Eucaryota có ADN ở dạng mạch kép thẳng luôn liên kết với histon tạo thành thể nhiễm sắc và tồn tại ở dạng lưỡng bội (gen có alen tương ứng). Gen cũng như hệ gen ở Eucaryota có cấu trúc rất phức tạp. Hàm lượng ADN rất lớn và không tương ứng với số lượng gen chứa trong đó. Số lượng gen nhiều khi chỉ chiếm từ 10 - 20% hàm lượng ADN. Gen có cấu tạo ngoài những nucleotit mã hóa cho axit amin còn chứa các nucleotit đóng vai trò hỗ trợ và điều chỉnh hoạt động của gen, ở cơ thể tiến hóa càng cao thì yếu tố này càng nhiều, cũng vì vậy mà có một nghịch lý là ở Eucaryota hàm lượng ADN không tương ứng với số lượng gen mà cơ thể có và tuy rằng số lượng gen là tăng theo mức độ tiến hóa và độ phức tạp của cơ thể nhưng hàm lượng ADN thì không thể hiện qui luật đó. Ta hãy xem một vài ví dụ: Nấm men *Saccharomyces* chứa hàm lượng đơn bội ADN là 12,1 triệu cặp nucleotit có khoảng 6.000 gen, ruồi quả *Drosophila* chứa hàm lượng đơn bội ADN là 140 triệu cặp nucleotit nhưng số gen chỉ có khoảng 13.000 gen và con người đỉnh cao nhất của tiến hóa chứa hàm lượng đơn bội 3 tỷ cặp nucleotit nhưng số gen chỉ có khoảng 25.000 - 35.000 gen, nghĩa là chỉ gấp từ 2 đến 2,5 lần so với ruồi quả. Trong lúc đó một số loài ếch nhái lại chứa hàm lượng ADN rất cao, cao hơn nhiều so với động vật có vú. Ví dụ, ếch *Rana esculenta* có ADN đơn bội đạt tới 15 tỷ cặp nucleotit nhiều gấp 5 lần so với con người và đặc biệt là loài sa giông *Salamandra* (một loài ếch nhái có đuôi) có hàm lượng ADN đơn bội đạt tới 90 tỷ cặp nucleotit nghĩa là gấp 6 lần so với ếch (thuộc cùng một lớp) và 30 lần so với con người. Như vậy, rõ ràng rằng không thể dùng hàm lượng ADN để đánh giá mức độ tiến hóa của các loài mà phải căn cứ vào cấu trúc của gen và tổ chức của hệ gen của chúng. Hy vọng rằng khi hệ gen của các cơ thể được giải mã hoàn toàn các nhà tiến hóa luận sẽ lý giải được nghịch lý đã nêu.

Hệ gen của Eucaryota là lưỡng bội, thể nhiễm sắc tồn tại thành cặp tương đồng và gen có alen tương ứng. Cấu trúc của thể nhiễm sắc cũng rất phức tạp, được phân hóa thành thể nhiễm sắc thường (autosome) và thể nhiễm sắc giới tính (gonosome- sexchromosome), vùng tâm động (centromere), vùng cùng tiết (telomere), vùng NOR (vùng chứa các gen rARN) v.v.. Tổ chức như thế thể hiện phương thức đa dạng hóa cơ cấu di truyền (genotip) của cơ thể.

### 8.5.2 Vốn gen (gene pool). Biến dị di truyền trong quần thể

Quần thể (population) là đơn vị sinh học bé nhất chịu tác động của tiến hóa. Nghiên cứu quá trình và phương thức di truyền ở mức độ quần thể là đối tượng của di truyền học quần thể (population genetics). Khái niệm chủ yếu của di truyền quần thể là vốn gen (gene pool) là tập hợp tất cả các gen-alen (kiểu gen) của tất cả các cá thể trong quần thể. Vốn gen của quần thể là nguồn dự trữ cho sự tái lập kiểu gen của các thế hệ cá thể tương lai của quần thể. Nguồn gốc biến dị di truyền trong vốn gen của quần thể là đột biến và biến dị tổ hợp.

Đột biến ở mức độ ADN và thể nhiễm sắc đều có thể dẫn đến tạo nên những alen mới trong vốn gen và chúng có thể được chọn lọc bởi môi trường và phổ biến trong quần thể. Đối với các cơ thể có vòng đời ngắn như vi khuẩn thì đột biến tuy là nguồn biến dị di truyền duy nhất nhưng chúng nhanh chóng được phổ biến trong quần thể.

Đối với các cơ thể sinh sản hữu tính như thực vật và động vật thì biến dị tổ hợp được tạo qua quá trình phân bào giảm nhiễm và thụ tinh, dẫn đến sự hình thành nhiều tổ hợp di truyền đa dạng và phong phú trong quần thể.

Đột biến và biến dị tổ hợp là những quá trình xảy ra ngẫu nhiên và xác suất không mang tính chọn lọc và thích nghi, nhưng nhân tố môi trường đã chọn lọc chúng và phổ biến chúng trong quần thể.

### 8.5.3 Phân tích vốn gen. Công thức Hardy-Weinberg

Năm 1908, nhà toán học người Anh là Hardy và bác sĩ người Đức là Weinberg khi phân tích vốn gen của quần thể qua các thế hệ và đã đề ra qui luật cho rằng *trong điều kiện xác định, đối với một quần thể đủ lớn có giao phối ngẫu nhiên tần số gen-alen (tần số kiểu gen) không đổi qua các thế hệ*. Qui luật đó được biểu diễn bởi công thức:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Trong đó p là tần số của gen và q là tần số của alen tương ứng. Ví dụ, trong quần thể có gen A (trội) và alen a (lặn) thì kiểu gen của quần thể sẽ là AA, aA, Aa và aa.

Tần số của gen A là p và tần số kiểu gen AA là  $p \times p = p^2$ .

Tần số của alen a là q và tần số kiểu gen aa là  $q \times q = q^2$ .

Tần số kiểu gen Aa + aA = 2pq.

Trong quần thể mỗi cá thể chỉ mang một cặp alen, vì vậy  $p + q = 1$  và tần số kiểu gen  $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$ .

Ví dụ, trong một quần thể cây hoa, alen A qui định màu hoa đỏ (trội) và alen a (lặn) qui định màu hoa trắng. Tần số alen A là  $p = 80\%$  hay là 0,8, như vậy tần số alen a là  $q = 0,2$ . Tần số kiểu gen AA là  $p^2 = 0,8 \times 0,8 = 0,64$ , tần số kiểu gen aa là  $q^2 = 0,2 \times 0,2 = 0,04$  và tần số kiểu gen Aa sẽ là  $2pq = 2 \times 0,8 \times 0,04 = 0,32$ . Như vậy, vốn gen của quần thể có tần số là  $0,64 + 0,32 + 0,04 = 1$ .

Công thức Hardy-Weinberg thể hiện trạng thái cân bằng của quần thể. Trạng thái cân bằng của quần thể chỉ đạt được trong điều kiện xác định như sau:

- Không có tác động của đột biến, phiêu bạt gen và dòng gen.
- Không có tác động của chọn lọc tự nhiên.
- Có sự giao phối ngẫu nhiên nghĩa là các kiểu gen có cùng độ thụ tinh và sức sống như nhau.

Đối với quần thể người có thể áp dụng công thức Hardy-Weinberg để tính số phần trăm người mang gen qui định bệnh di truyền. Ví dụ, bệnh Phenylxeton niệu (Phenylketonuria) là bệnh di truyền thể hiện ở chỗ cơ thể không phân giải được phenylalanin do đó làm cho bệnh nhân bị kém phát triển về trí tuệ. Theo thống kê ở Mỹ có 1/10000 ca em bé sinh ra mắc bệnh Phenylxeton. Bệnh do alen lặn qui định và như vậy tần số các cá thể mang bệnh là  $q^2 = 0,0001$  và tần số của alen lặn sẽ là  $q = \sqrt{0,0001} = 0,01$ , và tần số của alen trội là  $p = 1 - q = 1 - 0,01 = 0,99$ . Ta hãy tính tần số các cá thể dị hợp mang alen bệnh. Tần số kiểu gen dị hợp là  $2pq = 2 \times 0,99 \times 0,01 = 0,0198$ . Như vậy, có khoảng 2% dân Mỹ có mang alen gây bệnh Phenylxeton niệu. Những người dị hợp mang alen bệnh không thể hiện bệnh nhưng có thể di truyền gen bệnh cho con cháu. Thống kê và đánh giá được tần số

các alen gây bệnh di truyền nguy hiểm trong quần thể cho phép đề ra các dự án dự phòng và bảo vệ sức khỏe cộng đồng một cách hữu hiệu.

#### 8.5.4 Tiến hóa vi mô (Microevolution)

Học thuyết tiến hóa hiện đại phân biệt hai quá trình tiến hóa là tiến hóa vi mô và tiến hóa vĩ mô.

Tiến hóa vi mô (còn gọi là tiến hóa nhỏ) là quá trình tiến hóa diễn ra trong đơn vị sinh học bé nhất là quần thể và như vậy có thể xác định tiến hóa vi mô là sự biến đổi tần số kiểu gen trong quần thể.

Một quần thể không tiến hóa là quần thể trong đó vẫn giữ cân bằng Hardy-Weinberg nghĩa là vốn gen luôn giữ ổn định qua các thế hệ. Như vậy, muốn có tiến hóa phải có sự biến đổi trong vốn gen của quần thể. Trong tự nhiên ít khi quần thể giữ được cân bằng di truyền bởi vì quần thể luôn bị tác động của nhiều nhân tố gây nên sự biến đổi vốn gen trong quần thể dẫn đến quá trình tiến hóa nhỏ. Thường có 4 nguyên nhân gây nên tiến hóa nhỏ:

##### 1.5.4.1 Biến dị di truyền

Biến dị di truyền dẫn đến làm thay đổi vốn gen của quần thể, làm tăng hoặc làm giảm tần số alen nào đó hoặc làm xuất hiện những alen mới. Những biến dị này có được di truyền và phổ biến qua các thế hệ hay không là còn tùy thuộc vào nhân tố chọn lọc tự nhiên và thông qua sinh sản.

##### 1.5.4.2 Hiện tượng phiêu bạt gen (genetic drift)

Hiện tượng phiêu bạt gen thường xảy ra trong quần thể nhỏ với số lượng cá thể ít và dẫn tới mất cân bằng Hardy-Weinberg, cũng vì vậy mà để có cân bằng thì quần thể phải đủ lớn.

Các cá thể trong thế hệ sau được truyền thụ kiểu gen từ thế hệ trước với tần số gen-alen một cách ngẫu nhiên và theo qui luật xác suất, nghĩa là để có được tần số của thế hệ sau càng giống thế hệ trước thì quần thể phải càng lớn. Quần thể càng bé thì độ sai lệch về tần số càng lớn và dẫn đến mất cân bằng trong vốn gen. Ví dụ, trong một quần thể cây hoa đỏ, hoa trắng chỉ có tất cả 10 cây với vốn gen có tần số alen A (đỏ) là  $p = 0,7$  và tần số alen a (trắng) là  $q = 0,3$  trong đó chỉ có 5 cây là sinh sản và cho ra thế hệ sau 10 cây với tần số  $p = 0,5$  và  $q = 0,5$ , đến thế hệ thứ 3 thì chỉ có 2 cây là sinh sản và cho ra 10 cây với tần số  $p = 1$  và  $q = 0$ . Như vậy, alen a đã bị loại ra khỏi quần thể.

Cơ chế tiến hóa do sự biến đổi vốn gen trong quần thể bé tuân theo qui luật xác suất (may mắn) được gọi là phiêu bạt gen. Phiêu bạt gen có thể làm giảm độ biến dị của quần thể dẫn đến sự bảo tồn các dạng thích nghi hẹp. Phiêu bạt gen cũng có thể tác động sáng tạo dẫn đến tạo nên tiến hóa phân ly hình thành các quần thể mới, ví dụ ở các đảo, các hồ cô lập v.v..

##### 1.5.4.3 Dòng gen (gene flow)

Để duy trì được cân bằng Hardy-Weinberg đòi hỏi quần thể phải có vốn gen cô lập với các quần thể khác. Trong tự nhiên các quần thể không hoàn toàn cô lập mà luôn luôn có sự trao đổi gen giữa các quần thể (dòng gen) thông qua sự di cư hoặc nhập cư của các cá thể

hoặc giao tử hữu thụ từ một quần thể này sang một quần thể khác. Sự di cư hoặc nhập cư dẫn tới làm thay đổi vốn gen của quần thể. Ví dụ với quần thể hoa đỏ, hoa trắng đã dẫn, nếu có trận gió mạnh thổi mang theo toàn phần hoa trắng vào vườn cây hoa bên cạnh sẽ dẫn tới làm tăng tần số gen a trong quần thể cây hoa của vườn.

Đối với quần thể người trong thời hiện đại sự di cư, nhập cư diễn ra trên tất cả quốc gia và dòng gen là nhân tố quan trọng trong sự tiến hóa vi mô của các quần thể người trước đây sống biệt lập.

#### 1.5.4.4 Chọn lọc tự nhiên

Phiêu bạt gen, dòng gen và đột biến đều là nguyên nhân của tiến hóa vi mô nhưng tác động của chúng không nhất thiết dẫn đến thích nghi với môi trường nếu như những biến đổi đó không được chọn lọc và di truyền cho các thế hệ sau. Chỉ có chọn lọc tự nhiên mới tạo nên tiến hóa thích nghi. Như vậy, đặc tính thích nghi của sinh vật không mang tính mục đích luận mà tiến hóa thích nghi là sự phối hợp giữa cái ngẫu nhiên là biến dị trong vốn gen với cái tất yếu là chọn lọc tự nhiên tức là sự sống còn của các cá thể sinh sản hiệu quả nhất (cho nhiều con cháu hữu thụ ở các thế hệ sau). Quan niệm “*đấu tranh sinh tồn*” và “*tồn tại của cá thể thích nghi nhất*” của Darwin về chọn lọc tự nhiên phải hiểu là sự đóng góp của một cá thể này vào vốn gen của thế hệ tương lai nhiều hơn so với các cá thể khác. Nếu chỉ có thích nghi với môi trường mà không để lại con cháu hữu thụ cho thế hệ tương lai thì cũng không thể có tiến hóa. Như vậy, sinh sản ra nhiều con cháu hữu thụ là vấn đề cốt lõi của chọn lọc tự nhiên. Chọn lọc tự nhiên thường thể hiện tác động theo ba phương thức: chọn lọc định hướng, chọn lọc phân ly và chọn lọc ổn định.

Để thấy rõ được vai trò của chọn lọc tự nhiên ta hãy xem xét ba trường hợp sau đây trong di truyền quần thể người:

+ *Di truyền bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm*. Trong quần thể người Mỹ gốc da đen châu Phi có đến 1/500 người bị bệnh. Bệnh do alen lặn gây nên, như vậy chỉ có những người đồng hợp về alen lặn mới thể hiện bệnh. Có một trường hợp trong 11 người Mỹ da đen mang alen bệnh ở trạng thái dị hợp tuy họ không thể hiện bệnh nhưng họ có thể truyền alen bệnh cho con cháu. Một vấn đề đặt ra là tại sao alen bệnh lại rất phổ biến trong quần thể người Mỹ gốc châu Phi so với quần thể người Mỹ nói chung? Các nhà di truyền học tiến hóa giải thích rằng ở châu Phi nhiệt đới alen bệnh là alen đột biến (do sự đột biến trong codon số 6 – GAG- của axit glutamic biến thành codon – GUG- của valin trong gen mã hóa cho mạch beta của hemoglobin) vừa có hại và vừa có lợi. Nếu ở trạng thái đồng hợp chúng sẽ gây nên bệnh, nhưng những người mang alen ở trạng thái dị hợp có khả năng chống chịu bệnh sốt rét là bệnh rất phổ biến ở các vùng nhiệt đới. Nghiên cứu sự phân bố của alen bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm trên thế giới cho thấy tần số của chúng tăng cao trùng hợp với vùng phân bố tăng cao của bệnh sốt rét. Trong các quần thể Người ở vùng nhiệt đới alen lặn đơn thường gặp với tần số từ 0,2 - 20%, như vậy tần số alen đồng hợp lặn sẽ là  $q^2 = 0,2 \times 0,2 = 0,04$  tức là có 4% dân số bị bệnh hồng cầu hình liềm và tử vong và tần số người dị hợp  $2pq = 0,8 \times 0,2 = 0,32$ , có nghĩa là trong dân số có đến 32% mang gen dị hợp không thể hiện bệnh nhưng có khả năng chống chịu bệnh sốt rét. Những người không mang gen bệnh tuy không bị bệnh thiếu máu nhưng dễ dàng bị muỗi sốt rét tấn công và bị bệnh sốt rét. Như vậy, alen lặn tuy có hại nhưng đã được chọn lọc và phổ biến trong quần thể.

+ *Bệnh tim mạch*. Bệnh tim mạch là bệnh rất nguy hiểm và rất phổ biến hiện nay. Những nghiên cứu về di truyền tiến hóa cho thấy rằng bệnh do chế độ dinh dưỡng kết hợp với cơ cấu di truyền do con người thừa hưởng từ tổ tiên xa xưa của mình. Bệnh thể hiện nhiều nhất ở

những nước phát triển cao như Mỹ, châu Âu với chế độ dinh dưỡng giống với cư dân của các bộ lạc người tiền sử dinh dưỡng chủ yếu bằng thịt thú rừng béo nên cơ thể tích nhiều mỡ. Quá trình chọn lọc tự nhiên trong thời kỳ đói rét đã chọn lọc những cá thể thích nghi tích nhiều mỡ được sống sót và tồn tại, vì vậy tập tính đó được di truyền lại cho đến ngày nay (tất cả chúng ta hầu như ai cũng thích ăn chất béo bổ) và khi có điều kiện môi trường dinh dưỡng quá nhiều chất béo bổ thì dễ phát sinh bệnh tim mạch.

+ *Tính kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh.* Nền Y học hiện đại sử dụng chất kháng sinh làm thuốc để điều trị các bệnh nhiễm trùng là một kỳ tích trong sự nghiệp bảo vệ sức khỏe con người. Nhưng chúng ta cũng đang đứng trước một vấn đề nan giải là trong quá trình sử dụng thuốc đã làm xuất hiện những vi khuẩn kháng thuốc trong quần thể. Tính kháng thuốc được xuất hiện do chọn lọc tự nhiên cũng giống như tính kháng thuốc trừ sâu xuất hiện ở bọ sâu bọ có hại, là do có sự chọn lọc các cá thể đột biến trong quần thể.

Vi khuẩn (thường xuyên xuất hiện với tần số rất cao) chống chịu được với tác động của thuốc. Các cá thể đột biến có khả năng tiết ra các enzym có tác động phân hủy thuốc hoặc sử dụng thuốc như là nguồn dinh dưỡng. Tính kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh cũng như của sâu bọ gây hại mùa màng đang đặt ra những vấn đề cấp bách cho y tế công cộng.

*Vấn đề thảo luận ở chương 1:*

1. *Trình bày các hiện tượng và thí nghiệm chứng minh ADN (hoặc ARN) là vật chất mang thông tin di truyền.*

2. *Vẽ và trình bày cấu trúc sợi ADN xoắn kép. Nêu các đặc điểm. Nguyên tắc bổ sung có ý nghĩa gì?*

3. *Vẽ sơ đồ và trình bày cơ chế, mô hình tái bản ADN. Tái bản ở nhân sơ khác nhân chuẩn ở những đặc điểm nào?*

4. *Vẽ sơ đồ và trình bày cơ chế của phiên mã.*

5. *Vẽ sơ đồ và trình bày cơ chế dịch mã. Nêu các sai khác về phiên mã và dịch mã giữa nhân sơ và nhân chuẩn.*

6. *Gen là gì? Hệ gen là gì? Nêu cấu trúc của gen và hệ gen.*

7. *Chứng minh hàm lượng ADN, độ lớn của gen và hệ gen không phản ánh mức độ tiến hóa của loài.*

8. *Trình bày sơ đồ và cơ chế điều hòa hoạt động của gen ở nhân sơ. Nêu đặc điểm điều hòa hoạt động của gen ở nhân chuẩn.*

9. *Nêu cơ sở di truyền quần thể của tiến hóa.*



## Thể nhiễm sắc của tế bào - tổ chức chứa ADN

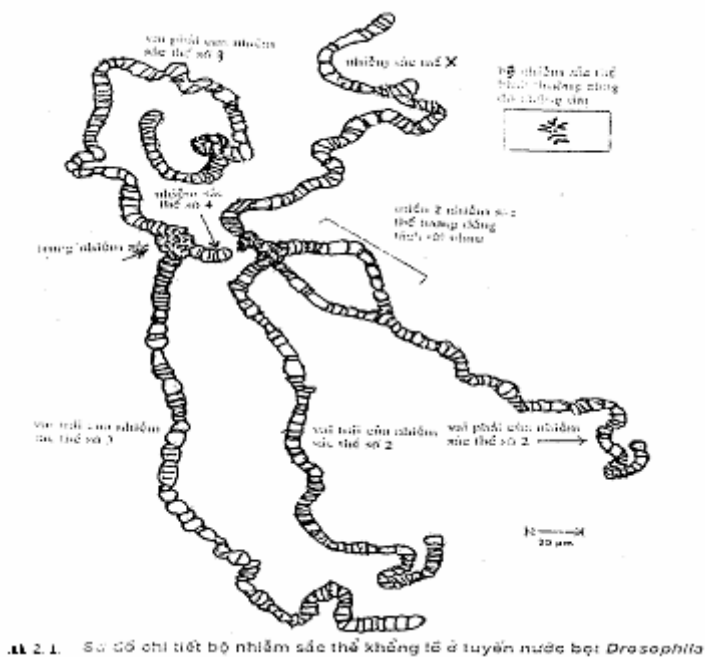
**Mục tiêu:** Sau khi học xong chương này học viên có khả năng:

- Trình bày được cấu trúc hiển vi, siêu hiển vi và phân tử của thể nhiễm sắc.
- Phân biệt được bộ đơn bội, bộ lưỡng bội, bộ đa bội thể nhiễm sắc.
- Phân biệt các cặp thể nhiễm sắc thường và cặp thể nhiễm sắc giới tính và cơ sở thể nhiễm sắc của xác định giới tính.
- Chứng minh được cơ sở thể nhiễm sắc của di truyền.
- Nắm được kỹ thuật làm kiểu nhân và kỹ thuật nhuộm cắt băng.

### 2.1 Hình thái thể nhiễm sắc

#### 2.1.1 Kích thước thể nhiễm sắc

Thể nhiễm sắc của tế bào nhân chuẩn quan sát được ở trung kỳ nguyên phân thường có dạng hình chiasm hoặc hình que và thường có kích thước vào khoảng 0,2 - 3 $\mu\text{m}$  đường kính và 0,2 - 50 $\mu\text{m}$  chiều dài. Ví dụ thể nhiễm sắc ở người, cái bé nhất là thể nhiễm sắc số 21 và 22 có kích thước  $L = 1,5\mu\text{m}$ ; còn chiếc lớn nhất là thể nhiễm sắc số 1 có  $L = 10\mu\text{m}$ . Về kích thước của thể nhiễm sắc nói chung mang tính đặc trưng cho các tế bào và cá thể của cùng một loài. Tuy nhiên, có trường hợp trong các mô khác nhau của cùng một cơ thể có sự biến đổi về hình dạng và kích thước thể nhiễm sắc để thích nghi với chức năng của một giai đoạn phát triển. Ví dụ, trong tế bào của mô tuyến nước bọt ấu trùng loài hai cánh như ruồi quả (*Drosophila*) người ta quan sát thấy các thể nhiễm sắc khổng lồ (còn được gọi là thể nhiễm sắc đa sợi) có kích thước đạt tới  $L = 300\mu\text{m}$  và  $D = 20\mu\text{m}$  nghĩa là lớn gấp hàng chục lần so với thể nhiễm sắc bình thường có ở các mô khác của cơ thể ruồi (xem hình 2.1).



**Hình 2.1**

Sơ đồ chi tiết bộ thể nhiễm sắc khổng lồ ở tuyến nước bọt *Drosophilla*

### 2.1.2 Số lượng thể nhiễm sắc

Về số lượng thể nhiễm sắc thì đó là một chỉ tiêu đặc trưng cho loài và bộ thể nhiễm sắc. Theo quy luật chung, mỗi một cá thể trong cùng một loài có số lượng thể nhiễm sắc đặc trưng cho loài đó. Ví dụ:

Người ( <i>Homo sapiens</i> )	$2n = 46$
Vượn ( <i>Gorilla gorila</i> )	$2n = 48$
Khi ( <i>Macaca rhesus</i> )	$2n = 42$
Bò rừng ( <i>Bos taurus</i> )	$2n = 60$
Chó ( <i>Canis familiaris</i> )	$2n = 78$
Mèo ( <i>Felis domesticus</i> )	$2n = 38$
Ngựa ( <i>Equus calibus</i> )	$2n = 64$
Chuột nhắt ( <i>Mus musculus</i> )	$2n = 40$
Chuột cống ( <i>Rattus norvegicus</i> )	$2n = 42$
Thỏ ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	$2n = 44$
Gà ( <i>Gallus domesticus</i> )	$2n = 78$
Cá sấu ( <i>Alligator mississippiensis</i> )	$2n = 32$
Ếch ( <i>Rana pipiens</i> )	$2n = 26$
Cá chép ( <i>Cyprinus carpio</i> )	$2n = 104$

Tằm dâu ( <i>Bombyx mori</i> )	$2n = 56$
Ruồi nhà ( <i>Musca domestica</i> )	$2n = 12$
Ruồi quả ( <i>Drosophila melanogaster</i> )	$2n = 8$
Đĩa phiến ( <i>Planaria torva</i> )	$2n = 16$
Thủy tức ( <i>Hydra vulgaris</i> )	$2n = 32$
Giun tròn ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	$2n = 11$ (đực), $12$ (cái).
Thuốc lá ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	$2n = 48$
Khoai tây ( <i>Solanum tuberosum</i> )	$2n = 48$
Hành ( <i>Allium cepa</i> )	$2n = 16$
Cà chua ( <i>Lycopersicum solanum</i> )	$2n = 24$
Lúa mì mềm ( <i>Triticum vulgare</i> )	$2n = 42$
Đậu ( <i>Pisum sativum</i> )	$2n = 14$
Ngô ( <i>Zea mays</i> )	$2n = 20$
Tảo lục ( <i>Acetabularia mediteranea</i> )	$2n = 20$
Nấm men ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	$2n = 36$

Tuy nhiên, ta không thể máy móc dựa vào số lượng thể nhiễm sắc để đánh giá mức độ tiến hóa của các loài, vì lẽ rằng các cơ thể ở mức độ tiến hóa cao nhất lại có số lượng thể nhiễm sắc ít hơn (ví dụ: người có 46 thể nhiễm sắc, trong khi đó số lượng thể nhiễm sắc ở vượn là 48 và gà có đến 78 thể nhiễm sắc) cũng giống như hàm lượng ADN, tuy có tính ổn định loài nhưng chưa thể hiện tính logic của bậc thang tiến hóa. Vấn đề là cần phải xem xét mức độ tổ chức và hoạt động của hệ gen trong ADN và trong thể nhiễm sắc.

Số lượng thể nhiễm sắc còn đặc trưng cho bộ thể nhiễm sắc. Người ta phân biệt:

+ *Bộ đơn bội* (haploid) ký hiệu là  $n$  đặc trưng cho các tế bào, cơ thể đơn bội cũng như các tế bào sinh dục chín (các giao tử) ở cơ thể sinh sản hữu tính. Ví dụ ở người, tinh trùng và tế bào trứng có  $n = 23$  thể nhiễm sắc.

+ *Bộ lưỡng bội* (diploid) ký hiệu  $2n$  đặc trưng cho các tế bào và cơ thể lưỡng bội. Trong cơ thể sinh sản hữu tính các tế bào soma có chứa  $2n$  thể nhiễm sắc. Ví dụ ở người  $2n = 46$  là tập hợp 23 thể nhiễm sắc của tinh trùng và 23 thể nhiễm sắc của tế bào trứng sau khi thụ tinh tạo thành hợp tử có  $2n = 46$ .

Như vậy, trong cơ thể lưỡng bội, thể nhiễm sắc tồn tại thành từng cặp (một từ bố và một từ mẹ) được gọi là cặp thể nhiễm sắc tương đồng, cặp được hình thành từ lúc thụ tinh ( $2n$ ) và phân ly lúc phân bào giảm nhiễm ( $n$ ).

+ *Bộ đa bội* (polyploid), đặc trưng cho tế bào và cơ thể đa bội. Số thể nhiễm sắc được tăng lên theo bội số của  $n$ . Ví dụ, tam bội  $3n$  (triploid), tứ bội  $4n$  (tetraploid).

Nhiều trường hợp các loài trong cùng một giống (genus) có số thể nhiễm sắc tạo thành dãy đa bội và người ta phân biệt số đơn bội khởi nguyên là  $x$  từ đó hình thành các dạng đa bội.

Ví dụ: ở lúa mì (*Triticum*) có dãy đa bội là:

*Triticum monococum*  $2n = 14$  ( $n = 7$ )

*Triticum dicocum*  $2n = 28$  ( $n=14$ )

*Triticum vulgare*  $2n = 42$  ( $n = 21$ )

Trong đó số đơn bội khởi nguyên  $x = 7$

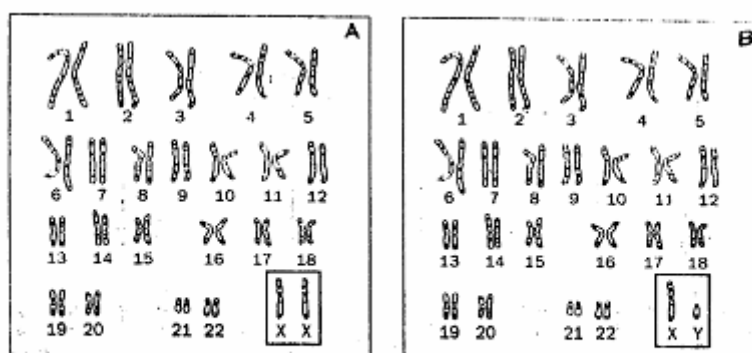
Hiện tượng đa bội thường thấy ở thực vật, còn ở động vật ít có trường hợp đa bội. Ở ếch người ta quan sát thấy có trường hợp bát bội  $8n = 104$  thể nhiễm sắc. Ở động vật có vú trường hợp đa bội quan sát thấy ở chuột đồng (*Cricetus cricetus*). Nói chung, ở động vật bậc cao tế bào hoặc mô đa bội thể hiện tính trạng bệnh lý.

Người ta quan sát thấy chu kỳ xoắn của thể nhiễm sắc thay đổi qua chu kỳ tế bào. Ở gian kỳ các sợi nhiễm sắc ở trạng thái mở xoắn ở nhiều mức độ khác nhau và tồn tại ở dạng chất nhiễm sắc. Ở tiền kỳ của mitosis các sợi nhiễm sắc trở nên xoắn hơn, do đó bị đông đặc và co ngắn lại, đến trung kỳ thấy rõ nhất và ở trạng thái xoắn tối đa (so với đầu tiền kỳ độ co ngắn gấp 2,5 lần) và đến cuối kỳ sẽ được giãn xoắn để bước vào gian kỳ của tế bào con ở trạng thái các sợi chất nhiễm sắc mở xoắn – trạng thái chất nhiễm sắc. Sự giãn xoắn hoặc xoắn lại của thể nhiễm sắc là có liên quan đến chức năng của chúng.

## 2.2 Cấu trúc hiển vi của thể nhiễm sắc

### 2.2.1 Thể nhiễm sắc thường và thể nhiễm sắc giới tính

Trong bộ lưỡng bội, các thể nhiễm sắc tồn tại thành cặp tương đồng, ví dụ ở người có 23 cặp tương đồng, trong cặp 2 thành viên (1 thể nhiễm sắc từ bố, 1 từ mẹ) giống nhau về hình dạng, kích thước. Những cặp như thế được gọi là thể nhiễm sắc thường (autosome). Ngoài ra còn có 1 cặp trong đó 2 thành viên khác nhau về hình dạng, kích thước hoặc trạng thái hoạt động được gọi là thể nhiễm sắc giới tính (sex chromosome). Ví dụ, ở người có 22 cặp thể nhiễm sắc thường và 1 cặp (cặp thứ 23) là thể nhiễm sắc giới tính. Ở nam giới, cặp thể nhiễm sắc giới tính là XY, còn ở nữ giới là XX (xem hình 2.2).



Caryotíp của nam (A), của nữ (B).

Hình 2.2

Kiểu nhân (Caryotíp) của người

Cặp thể nhiễm sắc giới tính là cơ sở di truyền để xác định giới tính và xác định tính di truyền liên kết giới tính ở đa số cơ thể sinh sản hữu tính.

### 2.2.1.1 Cơ sở thể nhiễm sắc của xác định giới tính

Đa số cơ thể đa bào sinh sản bằng phương thức hữu tính và được phân hóa giới tính đực và giới tính cái. Giới tính được biểu hiện ở các tính trạng sinh dục nguyên sinh (có tuyến sinh dục tinh hoàn, buồng trứng) và tính trạng sinh dục thứ sinh (các phần phụ sinh dục và tính trạng khác của cơ thể phân biệt đực cái). Những tính trạng này được qui định bởi nhân tố di truyền và nhân tố môi trường trong cơ thể và môi trường ngoài.

Đối với đa số cơ thể giới tính được xác định bởi thể nhiễm sắc giới tính (sex-chromosome) thể hiện ở 3 kiểu:

+ Kiểu đồng giao tử ( $XX$ ) ở con cái và dị giao tử ( $XY$ ) ở con đực (ví dụ đa số sâu bọ như châu chấu, ruồi quả v.v., động vật có vú, người, một số thực vật có hoa) trong đó con cái có cặp thể nhiễm sắc tương đồng giống nhau  $XX$ , còn con đực có cặp tương đồng khác nhau: một chiếc là  $X$  và một chiếc là  $Y$ . Thể nhiễm sắc  $X$  có kích thước dài hơn chứa nhiều gen hơn thể nhiễm sắc  $Y$  (ví dụ ở người thể nhiễm sắc  $X$  chứa 163 triệu cặp nucleotit với 1.218 gen, trong lúc đó thể nhiễm sắc  $Y$  chỉ chứa có 51 triệu cặp nucleotit với 128 gen). Như vậy, trong thể nhiễm sắc  $X$  có rất nhiều gen không có alen tương ứng so với  $Y$  và giới tính cái được xác định bởi sự có mặt của 2 thể nhiễm sắc  $X$ , còn giới tính đực được xác định bởi sự có mặt của thể nhiễm sắc  $Y$ . Nghiên cứu nhiều trường hợp sai lệch giới tính ở người cho thấy: giới tính được xác định bởi sự có mặt hay không có thể nhiễm sắc  $Y$ . Ví dụ trường hợp hội chứng Turner có kiểu gen  $XO$  (một thể nhiễm sắc  $X$  và không có  $Y$ ) vẫn là nữ giới, còn trong trường hợp hội chứng Clinfenter có kiểu gen  $XXY$  tuy có hai  $XX$  nhưng có  $Y$  nên vẫn là giới tính nam. Rõ ràng là thể nhiễm sắc  $Y$  có tác động trội và quyết định giới tính, thể hiện ở chỗ trong quá trình phát triển sớm của phôi thể nhiễm sắc  $Y$  đã điều khiển sự phát triển của mầm tuyến sinh dục nguyên thủy thành tinh hoàn (tính trạng sinh dục nguyên sinh) và tinh hoàn chế tiết testosterone kích thích hình thành các tính trạng đực thứ sinh. Người ta đã chứng minh là nhân tố xác định tinh hoàn được mã hóa bởi gen  $SRY$  (sex-determining region  $Y$ ) định vị trong vế ngắn của thể nhiễm sắc  $Y$  của người. Có rất nhiều trường hợp sai lệch giới tính thể hiện ở chỗ nam giới có kiểu gen  $XX$  và ngược lại nữ giới có kiểu gen  $XY$ . Trong trường hợp nam  $XX$  là do gen  $SRY$  đã được chuyển đoạn sang  $X$  do đó chúng điều khiển phát triển tinh hoàn, còn trong trường hợp nữ  $XY$  là do trong  $Y$  không có gen  $SRY$  do đó thiếu nhân tố phát triển tinh hoàn và mầm tuyến sinh dục phát triển thành buồng trứng. Nhiều nghiên cứu chứng minh rằng gen  $SRY$  có cả trong thể nhiễm sắc  $Y$  của chuột và đã phát hiện cơ chế phân tử điều khiển phát triển giới tính từ gen  $SRY$  thông qua hệ hormone testosterone và thụ quan của testosterone. Đối với con đực  $XY$  bình thường, gen  $SRY$  sản sinh ra nhân tố xác định tinh hoàn ( $TDF$ - testis determining factor) kích thích vùng tủy mầm tuyến sinh dục phát triển thành tinh hoàn, tinh hoàn chế tiết testosterone kích thích phát triển tính trạng sinh dục thứ sinh ở con đực. Đối với con cái  $XX$  bình thường vì không có  $Y$  (không có gen  $SRY$ ) nên không có nhân tố  $TDF$ , vùng tủy mầm tuyến sinh dục không phát triển thành tinh hoàn mà vùng vỏ của tuyến phát triển buồng trứng, buồng trứng chế tiết hormone estrogen kích thích phát triển tính trạng sinh dục thứ sinh ở con cái. Đối với trường hợp sai lệch giới tính: con cái  $XY$  (có  $Y$  nhưng là con cái) thì tuy có  $Y$  nhưng vẫn phát triển giới tính cái là do  $Y$  mất gen  $SRY$  nên không có nhân tố  $TDF$ , vùng tủy mầm tuyến sinh dục không phát triển thành tinh hoàn, trái lại vùng vỏ mầm sinh dục phát triển thành buồng trứng. Thật ra gen  $SRY$  xác định giới tính đực thông qua sự tương tác với nhiều gen khác định vị trong các thể nhiễm sắc thường và thể nhiễm sắc  $X$ . Ví dụ các gen  $SOX9$ , gen  $SF1$ , gen  $AMH$ ...trong thể nhiễm sắc thường phối hợp với gen  $SRY$  xác định giới

tính đực. Người ta đã phát hiện được gen *DAX1* định vị trong thể nhiễm sắc *X* có vai trò phối hợp với gen *SRY* xác định giới tính đực. Gen *DAX1* mã hóa cho thụ quan của hormon testosterone do đó testosterone có thể được thu nhận và xâm nhập vào tế bào để hoạt hóa các gen có vai trò tạo nên các tính trạng sinh đực đực thứ sinh. Những con đực *XY* có gen *DAX1* bị đột biến sẽ không sản sinh thụ quan do đó testosterone không được thu nhận vào trong tế bào và cơ thể phát triển theo hướng cái hóa. Đối với con cái *XX*, thì gen *DAX1* phối hợp với gen *WNT4* (định vị trong thể nhiễm sắc thường) xác định sự phát triển của buồng trứng. Ở con đực gen *WNT4* bị ức chế, do đó gen *DAX1* phối hợp với gen *SRY* xác định sự phát triển tinh hoàn.

Đối với ruồi quả, tuy có cặp thể nhiễm sắc giới tính là *XX* (con cái) và *XY* (con đực), nhưng cơ chế xác định giới tính khác với động vật có vú vì trong thể nhiễm sắc *Y* của chúng không có gen xác định giới tính *SRY*. Sự xác định giới tính ở ruồi quả diễn ra theo cơ chế: tỷ lệ giữa thể nhiễm sắc *X* với thể nhiễm sắc thường. Ruồi quả có bộ thể nhiễm sắc  $2n = 8$  trong đó có cặp giới tính *XX* (con cái) và *XY* (con đực) và 3 cặp thể nhiễm sắc thường được kí hiệu là *AA*. Tỷ lệ  $X/A$  sẽ qui định giới tính của ruồi (xem bảng sau)

NST giới (X) và NST thường (A)	Tỷ lệ X/A	Kiểu hình về giới
1X 2A	0.5	Con đực
2X 2A	1.0	Con cái
3X 2A	1.5	Siêu cái
4X 3A	1.33	Siêu cái
4X 4A	1.0	Con cái tí bít
3X 3A	1.0	Con cái tam bít
3X 4A	0.75	Trung giới
2X 3A	0.67	Trung giới
2X 4A	0.5	Con đực tí bít
1X 3A	0.33	Siêu đực

Qua bảng trên ta thấy rõ là đối với ruồi kể cả con đực, thể nhiễm sắc *Y* không gây ảnh hưởng lên kiểu hình giới tính. Tuy nhiên, *Y* gây ảnh hưởng lên tính hữu thụ của con đực. Ngày nay người ta biết rằng gen *Sxl* được gọi là gen gây chết giới (Sex-lethal) định vị trong *X* đóng vai trò chủ yếu trong sự xác định giới tính ở ruồi quả theo cơ chế sau:

-  $XY/AA \rightarrow 0.5 \rightarrow$  gen *Sxl* không hoạt động  $\rightarrow$  con đực.

- XX/ AA  $\rightarrow$  1.0  $\rightarrow$  gen *Sxl* hoạt động  $\rightarrow$  con cái.

Nếu gen *Sxl* hoạt động ngược lại (hoạt động ở phôi đực và không hoạt động phôi cái) thì sẽ gây chết cho phôi (nên có tên gọi là gen gây chết).

Trạng thái hoạt động của gen *Sxl* liên kết với *X* (định vị trong *X*) liên quan chặt chẽ với sự hoạt động của các gen khác định vị trong thể nhiễm sắc thường (*AA*). Ví dụ trên thể nhiễm sắc số 3 của ruồi quả có gen lặn *tra* (transformer gene), nếu ở trạng thái đồng hợp sẽ biến ruồi cái lưỡng bội thành ruồi đực bất thụ: các cá thể XX/ *tra*tra có tính trạng giống con những con đực bình thường nhưng bất thụ.

+ Kiểu đồng giao tử là con đực (ZZ) và dị giao tử là con cái (ZW) (quan sát thấy ở các loài bướm, chim và một số loài bò sát), trong đó con đực có 2 thể nhiễm sắc tương đồng giống nhau, còn con đực có cặp tương đồng khác nhau, thể nhiễm sắc W bé hơn và không có đoạn tương đồng với Z.

+ Kiểu xác định giới tính  $2n - n$  (con cái  $\rightarrow 2n$ , con đực  $\rightarrow n$ ) quan sát thấy ở một số sâu bọ sống thành xã hội mà điển hình là ong mật. Con đực đực phát triển từ trứng đơn bội không thụ tinh, có bộ thể nhiễm sắc  $n$ , còn ong thợ và ong chúa là ong cái đực phát triển từ các trứng thụ tinh, có bộ thể nhiễm sắc  $2n$ . Sự điều chỉnh tỷ lệ giới trong quần thể là do ong chúa. Ong chúa đực thụ tinh bởi ong đực và tinh trùng đực tích trữ trong túi chứa tinh của ong chúa. Khi ong chúa đẻ trứng nếu trứng đực thụ tinh bởi tinh trùng từ túi chứa tinh sẽ phát triển thành ong cái  $2n$ , còn khi ong chúa đẻ trứng không đực thụ tinh thì trứng đơn bội sẽ phát triển thành ong đực  $n$ . Ong chúa điều khiển sự sinh sản rất nhiều ong cái thợ tuy có bộ thể nhiễm sắc  $2n$  nhưng bất thụ (không đẻ trứng) chỉ làm nhiệm vụ kiếm ăn, xây tổ, chăm sóc nuôi dưỡng ong chúa và ong đực và sinh sản ít ong đực tuy có bộ thể nhiễm sắc đơn bội nhưng hữu thụ nghĩa là có khả năng giao cấu cung cấp tinh trùng cho ong chúa. Qua quá trình giảm phân các noãn bào của ong chúa phân chia tạo nên trứng đơn bội. Đối với ong đực tinh bào không giảm phân mà thông qua quá trình nguyên phân để tạo nên tinh trùng đơn bội. Ong chúa đực phát triển từ ấu trùng cái đực nuôi dưỡng bằng thức ăn đặc biệt (sữa ong chúa) nên có kích thước lớn hơn và có khả năng sinh sản. Mỗi quần thể (tổ ong) thường chỉ có một ong chúa và chỉ khi san đàn thì ong chúa mới được tạo ra từ ấu trùng cái.

### 2.2.1.2 Sự bù liều của các gen liên kết X

Các cơ thể sinh sản hữu tính ở con đực cũng như con cái, mỗi gen đều có 2 bản (genalen) định vị trong 2 thể nhiễm sắc tương đồng. Nhưng đối với thể nhiễm sắc giới tính, ở con cái có  $2X$  còn ở con đực chỉ có  $1X$  nghĩa là ở con cái các gen trong *X* đều có alen tương ứng, còn ở con đực các gen trong *X* không có alen tương ứng. Để bù đắp cho sự thiếu hụt này có cơ chế bù liều (dosage compensation) thuộc 2 kiểu khác nhau: (1) bất hoạt của một thể nhiễm sắc *X* ở con cái (quan sát thấy ở động vật có vú), (2) tăng cường hoạt động của thể nhiễm sắc *X* ở con đực (quan sát thấy ở ruồi quả).

- Bất hoạt các gen liên kết - *X* ở con cái động vật có vú. Cơ chế bất hoạt một *X* ở con cái động vật có vú được Mary Lyon đề xuất từ năm 1961 khi nghiên cứu trên chuột nhắt. Sự bất hoạt của một *X* xảy ra trong quá trình phát triển phôi chuột khi phôi đạt cỡ vài nghìn tế bào. Sự lựa chọn bất hoạt *X* nào trong  $2X$  là ngẫu nhiên, tùy thuộc vào từng tế bào nhưng kết quả là toàn bộ tế bào của cơ thể đều chứa một *X* bất hoạt (chứa gen không hoạt động). Như vậy, ở con cái động vật có vú chứa hai dòng tế bào khảm di truyền: một dòng chứa *X* bất hoạt đến từ mẹ và một dòng chứa *X* bất hoạt đến từ bố. Cá thể cái là dị hợp tử về gen liên kết - *X* sẽ có khả năng cho ra 2 kiểu hình khác nhau. Ví dụ điển hình là kiểu hình khảm đực quan sát thấy

ở màu lông chuột và mèo. Đối với cả 2 loài, thể nhiễm sắc  $X$  chứa gen qui định màu lông. Con cái là dị hợp về gen này có đặc điểm khảm về màu lông: lông có các đốm sáng (trắng, vàng) xen lẫn các đốm đen (ví dụ mèo đốm, chuột đốm, chó đốm). Màu đốm trắng do một alen qui định, còn màu đốm đen do alen kia qui định. Tuy cơ chế của sự bất hoạt  $X$  còn nhiều vấn đề chưa được sáng tỏ, nhưng nhiều nghiên cứu di truyền đã chứng minh rằng sự bất hoạt xảy ra ở một vùng của vé dài của  $X$  được gọi là trung tâm bất hoạt  $X - XIC$  ( $X$ - inactivation center). Từ vùng  $XIC$  sự bất hoạt sẽ lan ra cả hai vé của  $X$  thể hiện ở sự methyl hóa ADN và sự xoắn lại và cô đặc của sợi nhiễm sắc (dị nhiễm sắc hóa - heterochromatine). Thể nhiễm sắc  $X$  bị dị nhiễm sắc hóa thể hiện ra ở thể *Barr* (được Muray Barr phát hiện lần đầu tiên) trong nhân tế bào soma của con cái (thấy rõ nhất trong tế bào xoang miệng nữ giới). Thể nhiễm sắc  $X$  bất hoạt tồn tại trong tất cả tế bào soma của cơ thể, nhưng trong dòng tế bào mầm (tế bào sinh dục) thì  $X$  bất hoạt được tái hoạt hóa vì sự cần thiết cho quá trình sinh trứng (oogenesis). Ở người trong trường hợp sai lệch thể nhiễm sắc giới tính, nữ giới có số lượng  $XXX$  vẫn là bình thường vì 2 trong 3  $X$  của họ là bất hoạt.

- *Tăng hoạt tính của các gen liên kết thể nhiễm sắc  $X$  ở ruồi quả đục.* Đối với ruồi quả đục sự bù liều gen xảy ra theo cơ chế tăng cường hoạt động của gen trong thể nhiễm sắc  $X$  ở con đục, trong đó có vai trò của gen *Sxl* (gen gây chết) là gen có tác động chủ đạo trong sự xác định giới tính. Ở con cái gen *Sxl* hoạt động, còn ở con đục gen *Sxl* không hoạt động. Khi không có sản phẩm của gen *Sxl* (gen *Sxl* không hoạt động ở con đục), một phức hệ protein sẽ tác động kích thích các gen trong  $X$  tăng cường hoạt động gấp hai lần. Khi gen *Sxl* hoạt động (ở con cái), sản phẩm của gen *Sxl* sẽ kìm hãm phức hệ protein do đó sự tăng cường hoạt động gen trong  $X$  không xảy ra. Bằng cơ chế bù liều như vậy sự hoạt động của các gen liên kết với  $X$  được cân bằng như nhau.

### 2.2.2 Trung tiết (Centromere)

Trung tiết là cấu trúc định khu trên chiều dọc thể nhiễm sắc ở vùng được gọi là eo thắt cấp 1 (primary constriction). Ở trung kỳ ta dễ dàng quan sát thấy trung tiết vì trung tiết là nơi hai nhiễm sắc tử dính kết với nhau. Ở trung kỳ sớm trung tiết phân hóa thành tâm động (kinetochore) để dính với các sợi tâm động của thoi phân bào ở cả 2 phía đối mặt với 2 cực và có chức năng di chuyển nhiễm sắc tử về 2 cực. Nghiên cứu về sinh học phân tử cho biết vùng trung tiết (của thể nhiễm sắc của Nấm men mọc chồi – *Saccharomyces cerevisiae*) được cấu tạo gồm đoạn ADN không có cấu trúc nucleoxom, chứa khoảng 125 cặp nucleotit gồm 3 đoạn, đoạn I và đoạn III ở hai đầu cuối và đoạn II ở giữa, trong đó đoạn II có khoảng 90 cặp nucleotit và giàu A:T (>90%) có khả năng liên kết với protein của sợi tâm động của thoi phân bào tạo thành tâm động. Trung tiết có vai trò vận chuyển nhiễm sắc tử về hai cực tế bào (thông qua sự tạo tâm động). Ngoài ra, người ta cho rằng tâm động còn có chức năng tham gia vào di truyền ngoại sinh (epigenetic) là biến đổi di truyền không do sự biến đổi nucleotit của ADN mà do sự thay đổi sự biểu hiện của gen do sự methyl hóa ADN và do sự liên kết của ADN với protein cũng như do cấu trúc không gian của sợi nhiễm sắc trong thể nhiễm sắc. Đối với Nấm men phân đôi (*Schizosaccharomyces pombe*), ruồi quả cũng như ở người, trung tiết có cấu tạo phức tạp hơn nhiều. Trung tiết của *S. pombe* gồm 110.000 cặp nucleotit, của ruồi quả gồm 420.000 cặp nucleotit và của người gồm từ 300.000 cặp (trung tiết của thể nhiễm sắc  $Y$ ) cho đến 5 triệu cặp nucleotit (trung tiết thể nhiễm sắc số 7), trong đó chứa nhiều ADN satellit là ADN chứa rất nhiều nucleotit lặp.

Trung tiết chia thể nhiễm sắc thành hai vai, chiều dài của hai vai phụ thuộc vào vị trí trung tiết. Người ta thành lập chỉ số trung tiết (centromere index  $I_c$ ) để xác định vị trí của trung tiết và phân loại các thể nhiễm sắc (xem hình 1.7).

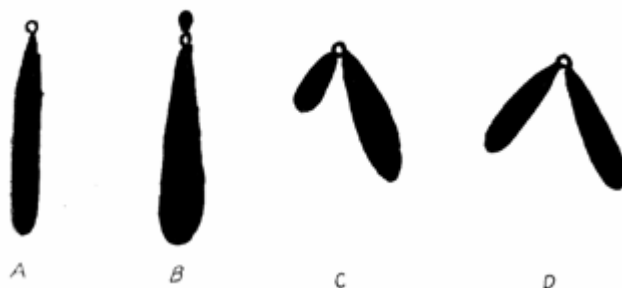


$$Ic = \frac{P}{P+Q}$$

P: chiều dài vai ngắn

Q: chiều dài vai dài

- Thể nhiễm sắc tâm mút (acrocentric chromosome) có trung tiết ở đầu mút của vai ngắn.
- Thể nhiễm sắc cận mút (telocentric chromosome) có trung tiết ở gần đầu mút của vai ngắn.
- Thể nhiễm sắc cận tâm (tâm lệch) (submetacentric chromosome) có trung tiết ở gần chính giữa (vai P ngắn hơn vai Q).
- Thể nhiễm sắc tâm giữa (metacentric chromosome) có trung tiết ở chính giữa chia 2 vai bằng nhau.



**Hình 2.3**

Phân loại các thể nhiễm sắc theo vị trí của trung tiết

A. NST tâm mút; B. NST tâm cận mút; C. NST tâm lệch; D. NST tâm giữa

### 2.2.3 Thể mút (telomere)

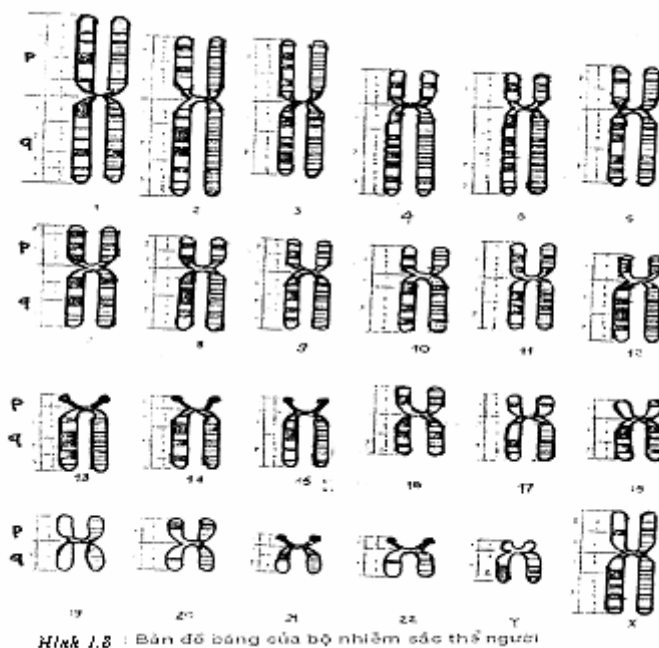
Mỗi thể nhiễm sắc chứa một phân tử ADN liên kết với protein tạo thành các sợi nhiễm sắc xoắn, gấp khúc chạy suốt thể nhiễm sắc. Đầu tận cùng của phân tử ADN ở đầu tận cùng của thể nhiễm sắc được gọi là thể mút. Từ năm 1938, Herman J. Muller gọi đầu tận cùng thể nhiễm sắc là thể mút (telomere) và chứng minh rằng các thể nhiễm sắc bị tác động tia X làm đứt gãy thể mút sẽ không còn khả năng truyền cho thế hệ sau. Khi nghiên cứu trên thể nhiễm sắc của ngô Barbara McClintock đã chứng minh là các thể nhiễm sắc bị đứt gãy thể mút có xu thế dính kết với các đoạn thể nhiễm sắc khác bị mất thể mút và như vậy thể mút có vai trò giữ cho các thể nhiễm sắc trong bộ không dính kết với nhau. Do đó, thể mút có cấu trúc đặc biệt. Những dẫn liệu về cấu trúc phân tử đã chứng minh là thể mút có ba chức năng quan trọng: (1) ngăn cản không cho enzym deoxiribonucleaza phân giải đầu tận cùng của phân tử ADN, (2) ngăn cản không cho các thể nhiễm sắc trong bộ dính kết với nhau và (3) tạo thuận lợi cho sự tái bản ADN ở phần đầu cuối của phân tử. Thể mút có cấu trúc và thành phần nucleotit đặc thù gồm những đoạn lặp nucleotit, tuy ở các loài khác nhau thì khác nhau nhưng thường thể hiện theo phương thức 5' – T<sub>1-4</sub> A<sub>0-1</sub> G<sub>1-8</sub> – 3'. Ví dụ ở người cũng như các động vật có xương sống đoạn lặp đó là TTAGGG, ở bọ đơn bào *Tetrahymena thermophila* có đoạn lặp là

TTGGGG, ở thực vật *Arabidopsis thaliana* có đoạn lặp là TTTAGGG. Đối với động vật có xương sống thì đoạn lặp TTAGGG mang tính ổn định cao và đã được phát hiện thấy trên 100 loài khác nhau bao gồm động vật có vú, chim, bò sát, ếch nhái và cá. Số lượng đoạn lặp thay đổi tùy loài, tùy thể nhiễm sắc trong bộ của loài, hoặc ngay trong một thể nhiễm sắc nhưng ở các tế bào biệt hóa khác nhau. Ở người trong các tế bào soma lành (không bị ung thư) thể mút thường chứa tới 500 – 3.000 đoạn lặp TTAGGG và chúng bị bớt dần theo tuổi thọ. Trái lại trong các tế bào dòng sinh dục và tế bào ung thư thì số lượng đoạn lặp của thể mút không bị bớt đi theo tuổi. Nhiều nghiên cứu về thành phần nucleotit và cấu trúc phân tử của thể mút đã chứng minh rằng các trình tự lặp nucleotit của thể mút được tạo nên với sự tham gia của enzym telomeraza (nếu thiếu enzym telomeraza các điểm mút sẽ bị ngắn dần dần tới làm mất các gen quan trọng) và có các protein đặc thù liên kết với tiết mút tạo nên tính bền vững của thể mút (không cho các thể nhiễm sắc dính nhau). Như vậy, thể mút có vai trò không chỉ là ngăn cản không cho các thể nhiễm sắc trong bộ dính kết lại với nhau nhưng đồng thời còn tham gia vào sự điều chỉnh tần số phân bào. Nhiều dẫn liệu còn cho rằng thể mút còn có vai trò tạo điều kiện cho các thể nhiễm sắc tương đồng nhận biết nhau và bắt cặp ở tiền kỳ giảm phân I.

Đa số các tế bào soma của người thiếu hoạt tính của enzym telomeraza và khi các tế bào soma được đem nuôi cấy *invitro* chúng có số lượng lần phân bào hạn chế (chỉ khoảng 20-70 lần), sau đó đi vào thoái hóa và chết. Người ta đã quan sát thấy tỷ lệ chiều dài của thể mút với số lần phân bào. Tế bào có thể mút dài hơn có số lần phân bào nhiều hơn, tức là sống lâu hơn. Các tế bào ung thư được coi là “bất tử” trong nuôi cấy *invitro*, chúng luôn phân bào vì các tế bào con luôn có hoạt tính telomeraza như tế bào mẹ (thể mút không bị ngắn đi qua mỗi lần phân bào). Cũng có người đề nghị sử dụng enzym telomeraza như là tác nhân chống ung thư vì hoạt tính phân bào của chúng sẽ bị ức chế và giảm dần. Khi nghiên cứu những người bị bệnh già trước tuổi (progeria) đã có biểu hiện sự già ở tuổi 8 - 10 (giống các cụ già 70 - 80) người ta thấy rằng thể mút của các tế bào soma của họ rất ngắn do đó khả năng tăng sinh tế bào *invitro* bị giảm hẳn. Chắc chắn là có sự tương quan giữa chức năng của thể mút với sự già.

#### 2.2.4 Các băng nhiễm sắc (chromosome bands)

Bằng kỹ thuật nhuộm cắt băng – nhuộm bằng các chất huỳnh quang hoặc nhuộm màu kết hợp với xử lý bằng enzym hoặc băng nhiệt sẽ làm xuất hiện các băng trên thể nhiễm sắc (xem phần 2.5). Người ta phân biệt các băng Q, C, G, hoặc R. Sự phân bố của các băng thể hiện đặc tính của từng thể nhiễm sắc trong bộ, cũng như giữa các loài khác nhau.



Hình 2.4

Kiểu nhân của người (nhuộm cắt băng)

Sự hiện diện và phân bố của các băng ở thể nhiễm sắc trung kỳ có thể là sự phản ánh kiểu tổ chức thành nhóm đơn vị của sự hoạt hóa gen. Ví dụ băng C là tương ứng với vùng chứa chất dị nhiễm sắc ổn định chứa ADN lặp liên kết rất chặt với các protein axit. Băng C thường phân bố ở vùng quanh trung tiết (xem hình 2.4).

### 2.3 Cấu trúc siêu vi của thể nhiễm sắc

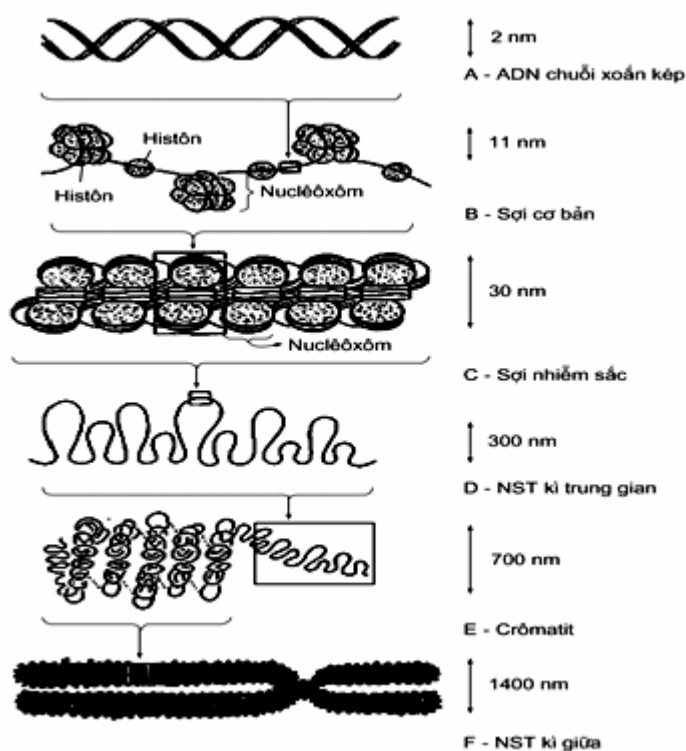
Trong thể nhiễm sắc, ADN liên kết với protein tạo nên cấu trúc sợi xoắn nhiều cấp được gọi là sợi nhiễm sắc (chromonema). Sợi nhiễm sắc cơ bản có đường kính 11nm là chuỗi hạt cườm được gọi là sợi nucleoxom (nucleosome fiber).

Mỗi hạt cườm là một nucleoxom có kích thước 11nm dạng khúc giò gồm lõi được cấu tạo bởi 8 phân tử histon (2H<sub>2</sub>A, 2H<sub>2</sub>B, 2H<sub>3</sub> và 2H<sub>4</sub>); sợi xoắn kép ADN cuốn xung quanh lõi histon với một 3/4 vòng (chứa khoảng 146 đôi nucleotit). Các nucleoxom nối với nhau qua sợi xoắn kép ADN dài khoảng 60 nucleotit. Các sợi nucleoxom 11nm gấp khúc, cuộn lại nhờ các histon H<sub>1</sub> để tạo thành các sợi nhiễm sắc lớn hơn có đường kính 30nm được gọi là sợi solenoid (solenoid fiber), chắc rằng trong nhân gian kỳ các sợi nhiễm sắc tồn tại ở trạng thái các sợi solenoid.

Sợi nhiễm sắc 30nm sẽ gấp khúc tạo nên sợi có cấp độ đường kính lớn hơn (khoảng 300nm) chứa các vòng bên (looped domains). Mỗi vòng bên chứa khoảng 20.000 - 80.000 cặp nucleotit. Các sợi 300nm sẽ cuộn lại tạo nên các sợi nhiễm sắc ở cấp độ lớn hơn từ 700 - 1400nm tức là các nhiễm sắc tử và thể nhiễm sắc thấy rõ ở trung kỳ của phân bào (xem hình 2.5).

Nhiều tác giả cho rằng cấu trúc vòng bên là đơn vị hoạt động của gen và thể hiện rõ nhất ở các cấu trúc vòng bên của thể nhiễm sắc khổng lồ (giant chromosome) hoặc thể nhiễm sắc chổi bóng đèn (lampbrush chromosome). Ngoài protein histon, liên kết với thể nhiễm sắc còn

có các protein axit, chúng rất đa dạng về thành phần và chức năng nhưng chủ yếu là đóng vai trò tham gia điều hòa hoạt động của gen.



**Hình 2.5**

Cấu trúc siêu vi và phân tử của thể nhiễm sắc

Như vậy, ở Eucaryota, cấu trúc thể nhiễm sắc không chỉ là giá thể chứa ADN mà là tổ chức trong đó gen và hệ gen hoạt động một cách có hiệu quả cao nhất đáp ứng sự tồn tại và phát triển của cơ thể.

Trong các tế bào soma và tế bào sinh dục nguyên thủy, thể nhiễm sắc tồn tại thành cặp  $2n$  (ví dụ người  $2n = 46$ ) gồm một chiếc từ bố và một chiếc từ mẹ ( $n=23$ ) do đó dẫn đến các locut gen định vị trên thể nhiễm sắc đều tạo thành cặp gen – alen, chúng phân ly qua phân bào giảm nhiễm và tái tổ hợp qua thụ tinh. Trong tế bào soma, gen - alen phối hợp hoạt động theo quy luật nhất định để tạo nên các tính trạng của cơ thể (Xem phần sau).

Trong mỗi thể nhiễm sắc được phân hóa thành các cấu trúc có vai trò nhất định như vùng chất nhiễm sắc thực (eurochromatine), vùng chất dị nhiễm sắc (heterochromatine), vùng trung tiết hay tâm động (centromere), vùng tận cùng hay thể mút (telomere).

Trong bộ thể nhiễm sắc cũng được phân hóa thành các cặp thể nhiễm sắc thường (autosome) và cặp thể nhiễm sắc giới tính (gonosome), các thể nhiễm sắc có thể kèm và chứa vùng NOR – nơi định khu các gen rARN.

## 2.4 Học thuyết thể nhiễm sắc của Di truyền

### 2.4.1 Thí nghiệm của T. Morgan

Từ năm 1910, các nhà di truyền học giả thiết rằng các nhân tố di truyền Mendel là gen. Gen định khu trong thể nhiễm sắc bởi vì tập tính của thể nhiễm sắc qua phân bào nguyên nhiễm, phân bào giảm nhiễm, thụ tinh thể hiện tập tính của gen, tức là của nhân tố di truyền Mendel qua các thế hệ. Nhưng các nhà di truyền tế bào cần chứng minh bằng thực nghiệm là các gen định khu và liên kết với thể nhiễm sắc.

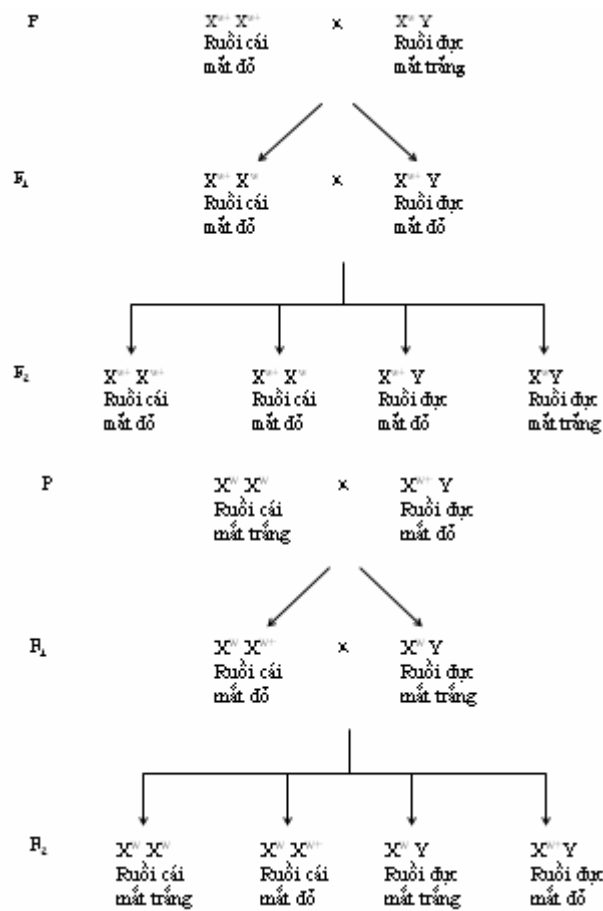
Năm 1909, Thomas H.Morgan đã tiến hành nghiên cứu với đối tượng ruồi quả (*Drosophila melanogaster*). Ruồi quả là đối tượng thí nghiệm lý tưởng về di truyền học do chúng dễ nuôi trong phòng thí nghiệm, sinh sản nhanh và trong thời gian ngắn có thể quan sát được nhiều thế hệ con cháu. Hơn nữa, tế bào của chúng chỉ chứa 4 đôi thể nhiễm sắc ( $2n=8$ ) trong đó có 3 đôi thể nhiễm sắc thường và 1 đôi thể nhiễm sắc giới, đối với ruồi đực là  $XY$  và đối với ruồi cái là  $XX$ , do đó dễ dàng phân tích kiểu nhân (caryotip) của chúng. Một trong các đặc tính rất quý của ruồi là qua các thế hệ con cháu rất dễ quan sát thấy thể đột biến về màu mắt, dạng cánh v.v.. Bằng nhiều thí nghiệm rất tỷ mỉ, Morgan đã chứng minh rằng đột biến về màu mắt ở ruồi quả là có liên quan đến thể nhiễm sắc  $X$  và giả thiết là gen qui định màu mắt là định vị trong thể nhiễm sắc  $X$ .

Khi quan sát các quần thể ruồi quả, Morgan nhận thấy có nhiều ruồi đực mang mắt trắng trong lúc đó ruồi dạng đại mang mắt đỏ. Ruồi đực mắt trắng là dạng đột biến : khi đem lai ruồi đực mắt trắng với ruồi cái mắt đỏ (dạng đại) thì cho  $F_1$  toàn ruồi mắt đỏ. Như vậy, mắt trắng là tính trạng lặn so với tính trạng mắt đỏ. Khi đem lai các ruồi mắt đỏ  $F_1$  với nhau Morgan quan sát thấy sự phân tính đặc biệt ở  $F_2$  : tất cả các ruồi cái đều mang mắt đỏ, trong lúc đó ruồi đực có  $1/2$  là mắt đỏ và  $1/2$  là mắt trắng. Morgan đã giả định là ở ruồi quả tính di truyền của màu mắt là có liên quan đến thể nhiễm sắc giới tính cụ thể là gen qui định màu mắt định vị trong thể nhiễm sắc  $X$ . Như vậy, gen qui định màu mắt có 2 alen: alen  $W$  là alen đột biến (lặn) và alen đại  $W^+$  (trội).

Ruồi cái (kiểu gen  $XX$ ) nếu mang 2 alen  $W^+ W$  sẽ là ruồi cái mắt đỏ (vì alen  $W^+$  trội qui định mắt đỏ). Nếu chúng mang 2 alen  $WW$  sẽ là ruồi cái mắt trắng (vì alen  $W$  là lặn qui định mắt trắng).

Đối với ruồi đực  $XY$ , vì  $X$  không có alen tương ứng (thường được gọi là bán hợp tử - hemizygote) cho nên ruồi đực chỉ cần mang một alen  $W^+$  sẽ có mắt đỏ và khi mang một alen  $W$  sẽ có mắt trắng.

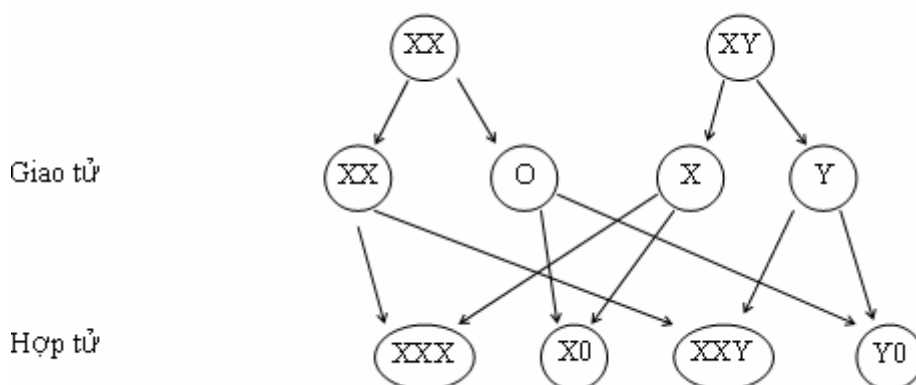
Ta hãy xem xét các công thức lai mà Morgan đã thí nghiệm dưới đây sẽ thấy rõ giả thiết của Morgan:



Di truyền các tính trạng do các gen định vị trong thể nhiễm sắc giới tính được gọi là di truyền liên kết giới tính. Đối với người di truyền các tính trạng bệnh mù màu, bệnh máu khó đông v.v. đều liên kết giới tính, tức là các gen qui định các bệnh đó đều định vị trong thể nhiễm sắc X.

### 2.4.2 Thí nghiệm của C. B. Bridges

Học trò của Morgan là Bridges, ông đã tiến hành nhiều thí nghiệm với ruồi quả mắt đỏ và mắt trắng đã phát hiện ra hiện tượng không phân ly của thể nhiễm sắc X qua giảm phân. Trường hợp bình thường khi giảm phân 2 thể nhiễm sắc X sẽ phân ly vào tế bào trứng đơn bội nghĩa là mỗi tế bào trứng chứa một thể nhiễm sắc X, còn các thể nhiễm sắc XY sẽ phân ly vào tinh trùng (chứa X) và tinh trùng (chứa Y) và khi thụ tinh sẽ cho ra ruồi cái XX và ruồi đực XY. Nhưng khi giảm phân bất bình thường thì cả 2 thể nhiễm sắc XX sẽ không phân ly và sẽ cho ra một loại tế bào trứng có 2 thể nhiễm sắc XX và 1 loại tế bào trứng không có thể nhiễm sắc X và như vậy khi thụ tinh sẽ cho ra loại hợp tử có kiểu gen XXY và loại hợp tử có kiểu gen XO hoặc với hợp tử có kiểu gen XXX và hợp tử với kiểu gen Y



Bridges đã quan sát thấy ruồi cái  $XXX$  mà trong đó có 1  $X^{w+}$  sẽ là ruồi cái mắt đỏ, ruồi cái với  $X^w X^{w+} Y$  hoặc  $X^{w+} X^{w+} Y$  sẽ là ruồi cái mắt đỏ. Ruồi với kiểu gen  $X^{w+} O$  sẽ là ruồi đực mắt đỏ và hữu thụ. Còn các ruồi có kiểu gen  $YO$  tuy là ruồi đực nhưng không có sức sống và chết sớm.

Bridges gọi hiện tượng không phân ly của thể nhiễm sắc qua giảm phân là có liên quan đến các tính trạng do các gen định khu trong thể nhiễm sắc tương ứng, tuy ông chưa nghiên cứu được nguyên nhân của hiện tượng.

Về sau các nhà nghiên cứu di truyền tế bào người đã chứng minh rằng ở người cũng xảy ra hiện tượng không phân ly thể nhiễm sắc qua giảm phân và do đó tạo ra các dạng lệch bội (aneuploide) không chỉ đối với các thể nhiễm sắc giới tính ( $XO$  và  $XXY$ ) mà còn đối với các thể nhiễm sắc thường (ví dụ thể ba nhiễm sắc 21- gây hội chứng Down xem phần sau) và một trong những nguyên nhân là tuổi đời người mẹ quá cao (trên 35 tuổi).

### 2.4.3 Cơ sở thể nhiễm sắc của các quy luật Mendel

Năm 1865, Mendel đã trình bày các thí nghiệm và các quy luật di truyền nhưng phải đến 35 năm sau, năm 1900 thí nghiệm được tái phát hiện bởi H.de Vries, C. Correns và E. Tschermak mới được công nhận rộng rãi, bởi vì chỉ sau những năm 1880 các nhà nghiên cứu mới phát hiện ra thể nhiễm sắc và tập tính của thể nhiễm sắc được tạo thành cặp tương đồng ở bố mẹ ( $2n$ ) và phân ly vào giao tử ( $n$ ) rồi được kết hợp lại ở hợp tử ( $2n$ ) khi thụ tinh.

Nhân tố di truyền mà Mendel giả định là thành cặp ở bố mẹ, chúng cùng tồn tại và quy định nên các tính trạng nhưng không hòa lẫn vào nhau mà phân ly và lại được tổ hợp lại ở thế hệ sau. Các nhân tố di truyền được Mendel giả định về sau này được gọi là gen (Johannsen - 1909). Ví dụ một cặp thể nhiễm sắc tương đồng, trong đó một chiếc (bố) mang alen  $A$  và chiếc kia (mẹ) mang alen  $a$  (hoặc ngược lại). Cơ thể bố mẹ  $2n$  có thể là  $AA$  (đồng hợp trội),  $aa$  (đồng hợp lặn) và  $Aa$  (dị hợp) và khi phân ly sẽ cho ra  $A$  và  $a$ , và khi tổ hợp sẽ lại cho ra  $AA$ ,  $aa$  hoặc  $Aa$ . Đó là qui luật phân ly của Mendel khi nghiên cứu với 1 cặp gen - alen.

Nếu hai cặp gen - alen định khu trong hai cặp thể nhiễm sắc tương đồng khác nhau thì chúng sẽ phân ly độc lập và tổ hợp tự do theo qui luật 2 của Mendel. Ví dụ, cặp gen - alen  $Aa$  ở trong một cặp thể nhiễm sắc tương đồng và cặp gen - alen  $Bb$  ở trong một cặp thể nhiễm sắc tương đồng khác thì chúng sẽ phân ly độc lập và tổ hợp tự do (nghĩa là không phụ thuộc vào nhau) khi tạo giao tử và hình thành hợp tử, nghĩa là sẽ tạo nên bốn loại giao tử khác nhau là  $AB$ ,  $ab$ ,  $Ab$ ,  $aB$  và khi tổ hợp tự do sẽ tạo nên 16 loại hợp tử khác nhau.

Một điều kiện cần cho qui luật 2 là hai cặp gen - alen ( $A-a$  và  $B-b$ ) phải ở trong hai cặp thể nhiễm sắc tương đồng khác nhau.

Hiện tượng di truyền liên kết nghĩa là di truyền các tính trạng được qui định bởi các gen cùng định khu trong một thể nhiễm sắc đã được W. Bateson và R. Punnett nghiên cứu từ đầu thế kỷ XX trên đối tượng cây đậu ngọt. Họ đã chứng minh được rằng, gen qui định màu hoa và gen qui định độ dài hạt phấn được di truyền không độc lập tức không tuân theo định luật phân ly độc lập của Mendel. Về sau, T. Morgan và học trò của ông là H. Sturtevant đã chứng minh rằng hiện tượng di truyền liên kết cũng như di truyền do hoán vị gen đều có liên quan đến thể nhiễm sắc. Di truyền liên kết là do các gen cùng định khu trong cùng một thể nhiễm sắc cho nên qua giảm phân sẽ cùng nhau phân ly về giao tử, còn di truyền do hoán vị gen (hay di truyền liên kết không hoàn toàn) là do có sự hoán vị gen giữa hai thể nhiễm sắc tương đồng ở tiền kỳ của giảm phân I.

Dựa trên các nghiên cứu về di truyền liên kết và di truyền hoán vị, người ta đã chứng minh rằng trong tế bào số thể nhiễm sắc thì ít (ví dụ ở ruồi quả  $2n=8$ ) trong lúc đó số lượng gen thì rất nhiều (ví dụ ở ruồi quả có khoảng 13.000 gen). Vì vậy, trong một thể nhiễm sắc chứa rất nhiều gen. Các gen định khu trong cùng một thể nhiễm sắc được sắp xếp theo dãy dọc liên tiếp nhau tạo thành một nhóm liên kết (ví dụ ở ruồi quả có  $n = 4$  tức có 4 nhóm liên kết) và dựa vào hiện tượng di truyền liên kết và di truyền hoán vị, người ta đã thành lập được bản đồ thể hiện vị trí các gen định vị trong một thể nhiễm sắc theo các dãy dọc.

Ngày nay, di truyền học phân tử đã chứng minh rằng mỗi một thể nhiễm sắc chứa một phân tử ADN rất dài trong đó các gen sắp xếp theo dãy dọc liên tục, tức là theo trình tự sắp xếp của các nucleotit trong phân tử ADN. Với kỹ thuật giải trình tự nucleotit hệ gen, người ta đã xây dựng được bản đồ gen (gen map) của rất nhiều cơ thể sinh vật kể cả người.

## 2.5 Kiểu nhân - Tiến hóa của kiểu nhân

### 2.5.1 Kiểu nhân (caryotype)

Tập hợp tất cả các thể nhiễm sắc ở trung kỳ phân chia của một tế bào gọi là kiểu nhân.

Ở hầu hết các sinh vật, các tế bào có cùng một kiểu nhân. Tuy nhiên, thể nhiễm sắc mang tính đặc thù cho loài về số lượng, hình dạng và kích thước trong trung kỳ của nguyên phân. Thậm chí những sinh vật có quan hệ gần gũi cũng có kiểu nhân khá khác nhau. Ví dụ như bộ thể nhiễm sắc lưỡng bội của người là 46, trong khi đó của tinh tinh là 48, của thỏ là 44, chuột nhà là 40, đậu vườn là 14; bộ thể nhiễm sắc của lục tảo là 16, nấm men bánh mì là 17, nấm mốc xanh bánh mì là 8 v.v..

Kiểu nhân của người gồm 46 thể nhiễm sắc, tạo nên 22 cặp thể nhiễm sắc thường (autosome) và 1 cặp thể nhiễm sắc giới tính. 22 cặp thể nhiễm sắc thường được chia thành bảy nhóm ký hiệu từ  $A-G$ , dựa vào kích thước và vị trí trên thể nhiễm sắc. Như vậy, cặp thể nhiễm sắc số một là lớn nhất sau đó đến cặp số 2 và cứ tiếp tục như vậy, tuy nhiên cặp thể nhiễm sắc số 21 lại nhỏ hơn cặp thể nhiễm sắc số 22 do mang tính lịch sử. Cặp thể nhiễm sắc số 23 quy định giới tính, ở nam gồm 1 thể nhiễm sắc  $X$  và 1 thể nhiễm sắc  $Y$ .  $X$  có kích thước lớn hơn  $Y$  và ở nữ là  $XX$ .

Những hiểu biết về kích thước, hình thái, các kiểu nhuộm băng thể nhiễm sắc cho phép xác định một số đột biến của chúng. Ví dụ như thể nhiễm sắc hiếm khi thay đổi hình dạng như là mất hoặc thêm vào một phần trong một thể nhiễm sắc hoặc thay đổi một số đoạn với một thể nhiễm sắc không tương đồng khác. Mặt khác số lượng thể nhiễm sắc có thể thay đổi trong



kiểu nhân do các sai sót trong quá trình phân chia tế bào, ví dụ thể nhiễm sắc không phân chia, đột biến thể nhiễm sắc.

### 2.5.1.1 Nghiên cứu kiểu nhân ở người

Các chất như giêmsa, orcein là các chất nhuộm đồng hình, do vậy khó có thể phân biệt được các thể nhiễm sắc có kích thước và hình dạng giống nhau. Tuy nhiên, có một số phương pháp nhuộm có thể tạo ra các thể nhiễm sắc bắt màu đậm, nhạt khác nhau, cho các băng nhuộm rất đặc trưng. Nhờ các băng nhuộm đó người ta có thể dễ dàng phân biệt các thể nhiễm sắc có hình dạng và kích thước giống nhau.

Ở tế bào nhân chuẩn, thể nhiễm sắc có sự phân hóa cao về cấu trúc và chức năng. Sự phân hóa về tổ chức cũng như vật chất di truyền ở tế bào nhân chuẩn thể hiện qua sự phân hóa thể nhiễm sắc cả chiều ngang và lẫn chiều dọc. Bằng những phương pháp nhuộm đặc biệt gọi là nhuộm cắt băng (banding techniques) có thể thấy rõ vùng dị nhiễm sắc (heterochromatin) được phân bố riêng và đặc trưng cho từng thể nhiễm sắc ở mỗi loài.

Nhiều nghiên cứu về sinh hóa tế bào cho thấy miền dị nhiễm sắc chỉ chứa một số lượng gen rất nhỏ, sợi nhiễm sắc trong vùng này luôn luôn ở trạng thái xoắn với hàm lượng ADN cao. Chức năng của chất dị nhiễm sắc, như các tác giả đã cho thấy, có ý nghĩa đối với quá trình tiếp hợp và phân ly của các thể nhiễm thể tương đồng, đặc biệt là đối với quá trình tiến hóa, thông qua tái cấu trúc của thể nhiễm sắc và điều hòa hoạt động của gen.

Có thể phát hiện các vùng dị nhiễm sắc (heterochromatin region) trên thể nhiễm sắc bằng các phương pháp nhuộm băng. Rooney đã tổng kết trên 20 phương pháp nhuộm băng điển hình, đó là các băng Giêmsa (G - banding), băng Quinacrin (Q - banding), băng C (C - banding) và băng huỳnh quang (Hoechst - 33258: H - 33258 banding) và còn rất nhiều các phương pháp nhuộm băng khác. Kỹ thuật nhuộm băng giêmsa đã được ứng dụng rộng rãi nhất đối với các nghiên cứu thể nhiễm sắc đặc biệt ở côn trùng.

Chi tiết của phương pháp nhuộm băng được trình bày dưới đây:

#### **a) Phương pháp nuôi cấy tủy xương**

Phương pháp nuôi cấy máu và tủy xương 24 giờ trong môi trường nhân tạo để tìm những thể nhiễm sắc bất thường. Nguyên lý của kỹ thuật này dựa trên sự phân bào tự nhiên của các tế bào non trong máu và tủy mà không cần sử dụng chất kích thích phân bào P.H.A (Phytohaemagglutinin).

##### **\* Tiến hành nuôi cấy**

Nuôi cấy tủy xương trong 24 giờ (dựa theo kỹ thuật của B. Durtillaux và J. Couturier, 1981; C. Harison, 1987).

##### **+ Bước 1: Chuẩn bị dụng cụ**

Các dụng cụ như kim chọc tủy, bơm tiêm, lọ nuôi cấy v.v. đều phải được sấy vô trùng trước khi sử dụng, các thao tác phải được đảm bảo từ khâu lấy bệnh phẩm (lấy tủy hoặc lấy máu) cho đến khi kết thúc nuôi cấy.

##### **+ Bước 2: Thao tác lấy bệnh phẩm**

Đặt bệnh nhân nằm sấp, chân duỗi thẳng, tay để phía trên đầu. Sát trùng vùng mào chậu định chọc tủy bằng cồn iot và cồn 70°. Gây tê điểm chọc tủy để thông lấy tủy. Bơm tiêm vô

trùng được tráng 0,1ml heparin 5000UI/ml để chống đông máu. Hút lấy khoảng 0,5-1ml dịch tủy xương, lắc nhẹ cho tủy hòa đều với heparin để không bị đông.

+ *Bước 3:* Đếm bạch cầu

Dùng một phần nhỏ dịch tủy đã lấy được và tiến hành đếm bạch cầu

+ *Bước 4:* Nuôi cấy dịch tủy

Môi trường nuôi cấy cho mỗi lọ:

Môi trường Parker 199: 6ml

Huyết thanh AB: 2ml

Tủy chống đông được sử dụng để nuôi cấy tủy thuộc vào số lượng bạch cầu với tỉ lệ thích hợp là  $5.10^5$  bạch cầu/1ml môi trường, tức là mỗi lọ cấy khoảng  $40.10^5$  bạch cầu.

Các lọ nuôi cấy được đậy bằng nút cao su đã vô trùng, lắc nhẹ tay cho đều sau đó để tủ ấm  $37^{\circ}\text{C}$  trong 24 giờ.

### **b) Nuôi cấy môu ngoi vi**

Theo kỹ thuật của B. Dutrillaux và J. Couturier, 1981

+ *Bước 1:* Chuẩn bị dụng cụ

Giống như nuôi cấy tủy xương.

+ *Bước 2:* Thao tác lấy bệnh phẩm

Bơm kim tiêm vô trùng, tráng 0,1 heparin 5000UI/ml. Lấy 1-2ml máu tĩnh mạch của người bệnh, lắc nhẹ cho máu hòa đều Heparin để không bị đông.

+ *Bước 3:* Đếm bạch cầu

+ *Bước 4:* Nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy của mỗi lọ cũng giống như nuôi cấy tủy xương 24 giờ. Lọ cấy cũng được để ở tủ ấm  $37^{\circ}\text{C}$  trong 24 giờ.

\* Thu hoạch dịch cấy làm tiêu bản

Tiến trình thu hoạch dịch cấy tủy và máu giống nhau dựa theo các nhà nghiên cứu trên.

+ *Bước 5:* Ức chế phân bào bằng Colchicine

Sau khi nuôi cấy ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong 22 giờ 30 phút, sử dụng Colchicine làm dứt thoi vô sắc, ức chế phân bào ở giai đoạn Metaphase, ở giai đoạn này, các nhà nghiên cứu thấy rằng thể nhiễm sắc có kích thước lớn và hình dạng rõ nhất. Cho vào mỗi lọ nuôi cấy 0,05ml Colchicine nồng độ 4mg/ml. Lắc nhẹ, giữ trong tủ ấm  $37^{\circ}\text{C}$  tiếp trong 1 giờ 30 phút.

+ *Bước 6:* Nhược trương tế bào

Dung dịch nhược trương có nồng độ tương ứng như sau:

Nước cất để ấm: 5ml

Huyết thanh AB: 1ml

KCl 0,07M: 3ml

EDTA: 0.1ml

Chuyển toàn bộ dịch cấy sang ống ly tâm nhọn đáy, đem ly tâm 1000 vòng/phút, hút bỏ phần trên, cho vào mỗi ống 7ml dung dịch nhuộm tương (đã được để ấm 37°C), trộn nhẹ bằng pipet Pasteur. Để ống trong tủ ấm 37°C cho tế bào thấm thấu dung dịch nhuộm tương trong 12 phút. Sau đó cho thêm vào mỗi ống 0,1ml dung dịch Carnoy II trộn nhẹ, lại ly tâm 1000 vòng/phút. Hút bỏ phần trên.

+ *Bước 7: Cố định thể nhiễm sắc*

Để giữ hình dạng thể nhiễm sắc ở metaphase cần định hình bằng hai dung dịch Carnoy có thành phần như sau:

Dung dịch Carnoy I:

+ Cồn 96°: 3 thể tích

+ Axit axetic: 1 thể tích

Dung dịch Carnoy II:

+ Cồn 96°: 6 thể tích

+Clorofoc: 3 thể tích

+ Axit axetic: 1 thể tích

Bước định hình đầu tiên là: Cho 6ml dung dịch Carnoy I vào mỗi ly tâm nhọn đáy, trộn nhẹ, để 5 phút ở nhiệt độ phòng, ly tâm trong 1000vòng/phút trong 5 phút, hút bỏ phần ở trên

Bước định hình tiếp theo bằng dung dịch Carnoy II, cho vào mỗi ống ly tâm nhọn đáy 6ml, trộn nhẹ, để 5 phút ở nhiệt độ phòng, ly tâm 1000vòng /phút trong 5 phút, hút bỏ phần trên, lấy dịch ở đáy ống ly tâm làm tiêu bản.

+ *Bước 8: Làm tiêu bản.*

Sử dụng lam kính sạch, đã để vào ngăn đá của tủ lạnh cho phủ một lớp băng trên mặt lam. Nhỏ một giọt dịch tế bào ở mỗi ống ly tâm lên lam kính sao cho hỗn dịch lan theo mặt băng và tan đều trên mặt lam. Khi đó các thể nhiễm sắc hiện diện trên lam kính thành từng cụm.

### **c) Các kỹ thuật nhuộm tiêu bản thể nhiễm sắc**

#### **1) Nhuộm Giêm sa nguyên chất**

Dung dịch Giêm sa:

Bột Giêm sa nguyên chất: 1g

Methanol: 66ml

Glyxerin: 66ml

Pha loãng dung dịch trên 4%, nhuộm tiêu bản trong 20 phút. Rửa tiêu bản bằng nước thường hoặc nước cất, để khô và đưa lên soi trên kính hiển vi. Bằng phương pháp nhuộm này, các thể nhiễm sắc bắt màu như nhau nên khó quan sát được những tổn thương cấu trúc của thể nhiễm sắc.

Để khắc phục nhược điểm trên có thể áp dụng một số kỹ thuật nhuộm băng thể nhiễm sắc. Nguyên lý của các kỹ thuật này dựa trên tính chất đặc trưng về sự phân bố đoạn ADN giàu A - T hoặc G - C kéo theo sự phân bố các loại gen mã hóa cho các protein đặc trưng trên thể nhiễm sắc đó. Dưới tác dụng của nhiệt độ cao, trong môi trường muối các cặp thể nhiễm

sắc do tính chất trên sẽ bị phân hủy ở những vị trí đặc hiệu, và sau khi nhuộm giêm sa thông thường sẽ tạo nên những băng ngang đậm, nhạt xen kẽ nhau có tính chất đặc trưng riêng cho từng thể nhiễm sắc. Do vậy, có thể nhận định chính xác từng cặp thể nhiễm sắc và từng phần của nó giúp chúng ta phát hiện ra những khác biệt hoặc rối loạn cấu trúc của thể nhiễm sắc.

### 2) Nhuộm băng R ( Reverse-banding technique)

Theo kỹ thuật của B. Dutrillaux và Lurwune (1971), Sehested (1974), và Vowjma và Lubs (1975).

Phương pháp nhuộm này để nhận dạng thể nhiễm sắc Philadelphia trong bệnh Leukemia mãn tính và phát hiện tổn thương cấu trúc của thể nhiễm sắc ở các nhóm Leukemia khác

#### *Phương pháp tiến hành như sau:*

Tiêu bản trước khi nhuộm được sấy khô trong tủ ấm ở 37°C trong 3 ngày cho các thể nhiễm sắc bám chặt trên mặt lam.

Xử lý tiêu bản trong dung dịch đệm Earle pH = 6,5 ở 87°C trong bể men 100ml khoảng 15 - 45 phút.

Rửa nước, để khô, nhuộm Giêm sa 2% trong dung dịch đệm.

Quan sát thể nhiễm sắc với các băng sáng và tối xen kẽ nhau dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 1.000 lần.

### 3) Kỹ thuật nhuộm băng Giemsa (G-banding technique):

Theo kỹ thuật của Sun, N.C; Chu, E.H.Y và Chang, C.C (1973)

+ *Bước 1:* Chuẩn bị các dung dịch

Dung dịch Giêm sa chuẩn (đậm đặc).

Bột Giêm sa nguyên chất:	1g
Methanol:	66ml
Glyxerin:	66ml

Sau khi pha dung dịch được để hai ngày ở nhiệt độ phòng trong lọ màu tối và để trong tủ lạnh trước khi dùng ít nhất hai tuần.

Dung dịch nhuộm băng ( chỉ sử dụng trong 1 ngày)

Dung dịch đệm pH 6,8:	26ml
Methanol:	7ml
Trypsin1/250 ( DIFCO5g/l)+ EDTA:	2g/l
Giêm sa chuẩn:	0.8ml

+ *Bước 2:* Trình tự nhuộm

Ủ tiêu bản trong dung dịch đệm phosphat pH 6,8 ở 56°C trong 8 phút.

Nhuộm tiêu bản ngập trong dung dịch nhuộm 8 phút ở nhiệt độ phòng.

Rửa tiêu bản trong nước cất, để khô.

Soi kính không cần đập lam.

#### d) Kỹ thuật nhuộm băng Q

Kỹ thuật được tiến hành với một chất nhuộm đặc biệt là Qinaclin với quy trình thực hiện phức tạp, kết quả chất nhuộm được gắn vào vùng giàu A - T của ADN và ta có thể quan sát được dưới kính hiển vi huỳnh quang. Màu hồng của các băng rất đặc trưng cho từng cặp thể nhiễm sắc. Đây là những đặc điểm có ích đối với phân tích di truyền và thông tin về các phân chứa gen đặc thù.

Sắp xếp công thức thể nhiễm sắc

Đọc tiêu bản dưới kính hiển vi với độ phóng đại 1.000 lần, quan sát những bất thường nếu có và xếp bộ thể nhiễm sắc theo công thức quy định về danh pháp thể nhiễm sắc đã được thông qua hội nghị Di truyền tế bào học năm 1960 ở Denver - Mỹ.

#### 2.5.2 Tiến hóa kiểu nhân ở tế bào nhân chuẩn (Eukaryota)

Quá trình phân hóa di truyền có thể biểu hiện ở các mức độ khác nhau trong quá trình tiến hóa. Đa hình di truyền biểu hiện ở đa hình thể nhiễm sắc phổ biến trong các quần thể tự nhiên. Baimai cho rằng sự thay đổi di truyền luôn luôn phát hiện ở mức độ thể nhiễm sắc bao gồm tái cấu trúc thể nhiễm sắc (chromosomal rearrangement) và sự phân hóa của vùng dị nhiễm sắc có liên quan đến hàm lượng ADN thông qua sự thay đổi về trật tự phân bố cũng như số lượng của các khối dị nhiễm sắc nằm trên thể nhiễm sắc đó. Sự tiến hóa kiểu nhân của các cơ thể sinh sản hữu tính theo phương thức này đã thu hút sự chú ý của nhiều chuyên gia trong lĩnh vực di truyền học tiến hóa. Các nghiên cứu cho thấy sự khác biệt kiểu nhân cũng được tìm thấy trong bộ côn trùng hai cánh mà đối tượng là *Drosophila* và các loài muỗi *Anopheles*. Hơn 500 loài và phân loài (subspecies) thuộc chi *Drosophila* đã được nghiên cứu về thể nhiễm sắc nguyên phân (mitotic chromosome) và thể nhiễm sắc khổng lồ (polytene chromosome) đã cho thấy những bức tranh thật phong phú về sự đa hình thể nhiễm sắc, dẫn đến việc khám phá ra nhiều loài đồng hình tồn tại trong quần thể tự nhiên của hơn 100 loài muỗi trong tổng số 200 loài muỗi được nghiên cứu kỹ kiểu nhân. Các tác giả đã mô tả hàng loạt các đa hình thể nhiễm sắc bên trong loài (intraspecific polymorphism) và sự khác biệt kiểu nhân giữa các loài (interpecific karyotypic differences). Sở dĩ các loài *Anopheles* được đặc biệt chú ý do nhiều nguyên nhân mà một trong những nguyên nhân phải kể đến là tầm quan trọng của chúng đối với y tế cộng đồng và tính khả thi của vấn đề nghiên cứu được các tác giả nêu rõ:

- Số lượng thể nhiễm sắc lưỡng bội ở các loài muỗi ít ( $2n=6$ ) là một thuận lợi để thu tóm được các đặc điểm trong quá trình phân loại.

- Số lượng  $2n=6$  luôn luôn cố định. Trên thực tế nhìn chung người ta chưa phát hiện ra hiện tượng đa bội thể ở các loài thuộc chi *Anopheles*, tuy nhiên như Belcheva và Baimai cho biết có một vài trường hợp ngoại lệ về hiện tượng thể nhiễm sắc bổ sung được tìm thấy ở loài *An. maculipennis* và *An. messae* hay ở loài *An. indefinitus* ở Đông Nam Á.

- Các thể nhiễm sắc thường (autosomal chromosome) ở các loài *Anopheles* có nhiều đặc điểm giống nhau và thường bắt đôi soma tạo thành 2 cặp thể nhiễm sắc loại tâm giữa (metacentric) và tâm cận giữa (submetacentric). Hai thể nhiễm sắc giới tính đồng hình (XX) ở con cái (homomorphism) và dị hình (XY) ở con đực (heteromorphism).

- Nét đặc trưng khá nổi bật ở kiểu nhân của các loài muỗi *Anopheles* là khối lượng cũng như vị trí phân bố riêng biệt của các vùng dị nhiễm sắc được xác định rõ trên thể nhiễm sắc

nguyên phân và các băng dị nhiễm sắc đặc thù trên thể nhiễm sắc khổng lồ là các dấu hiệu đáng lưu ý để sử dụng cho nghiên cứu về di truyền và phân loại.

Việc phát hiện ra những đặc điểm khác nhau về kiểu nhân thông qua tái cấu trúc thể nhiễm sắc và các biến dị về số lượng của các khối dị nhiễm sắc cũng như sự phân bố của chúng đã giúp ích cho việc nghiên cứu về phân loại và mối quan hệ tiến hóa của nhiều nhóm côn trùng và đặc biệt là các loài thuộc chi *Anopheles*.

### 2.5.2.1 Sự khác biệt kiểu nhân giữa các loài

Khi phân tích sự khác biệt kiểu nhân (interpecific karyotypic differences) đã phát hiện ra nhiều sự khác nhau giữa các loài có quan hệ gần nhau trong quần thể tự nhiên. Ở các loài thuộc chi *Drosophila* người ta đã sớm nhận thấy sự khác nhau về kiểu nhân điển hình ở cặp ruồi quả đã được nghiên cứu kỹ là *D. pseudobscura* (loài A) và *D. persimilis* (loài B) mặc dù hai loài này y hệt nhau về hình thái. Thể nhiễm sắc Y ở loài A có dạng chữ J, trong khi đó ở loài B thể nhiễm sắc này lại có dạng hình chữ V. Việc phát hiện này đã làm tiền đề cho những nghiên cứu kiểu nhân ở các loài thuộc chi *Anopheles* mà một số trường hợp điển hình đã được đề cập đến nhiều trong các tài liệu nghiên cứu.

Nếu như các thể nhiễm sắc thường của các loài *Anopheles* giống nhau về hình thái cũng như kích thước thì thể nhiễm sắc giới tính lại khác nhau ở nhiều khía cạnh. Ba loài đồng hình thuộc phức hợp loài *An. culicifacies* là trung gian truyền bệnh sốt rét ở Ấn Độ được phân biệt trên cơ sở của sự khác biệt ở thể nhiễm sắc Y. Thể nhiễm sắc Y ở loài C là tâm cận nút (acrocentric), còn ở loài A và B là tâm lệch (submetacentric).

Một trường hợp đáng lưu ý ở *An. leucosphyrus* vùng Đông Nam Á có biểu hiện sự khác biệt kiểu nhân được Baimai và cộng sự mô tả chi tiết. Loài *An. leucosphyrus* ở Thái Lan và vùng Kalimanta của Indonesia (loài A) với loài *An. leucosphyrus* ở vùng Summatra của Indonesia (loài B) thực chất là hai loài mà sự khác biệt biểu hiện ở thể nhiễm sắc giới tính. Loài A thể nhiễm sắc giới tính là tâm nút (telocentric), trong khi đó loài B lại là tâm lệch (submetacentric). Theo quan điểm của Baimai kiểu nhân của loài B đã được hình thành trong quá trình tiến hóa nhờ nhận thêm khối dị nhiễm sắc ở thể nhiễm sắc giới tính tại vùng tâm động.

Phức hợp *An. dirus* là một trường hợp điển hình về sự khác biệt ở kiểu nhân mà Baimai đã dựa vào đặc điểm này để nhận biết các thành viên thuộc phức hợp *An. dirus* tại Thái Lan. Khi sử dụng phương pháp nhuộm băng Giem sa (băng G) Baimai đã mô tả đặc điểm thể nhiễm sắc giới tính (XY) của các thành viên thuộc phức hợp loài *An. dirus* là: ở loài A cả thể nhiễm sắc X và Y đều là tâm nút (telocentric) còn ở loài B các thể nhiễm sắc này thuộc tâm cận nút (acrocentric).

Một sự khác biệt khá độc đáo thể hiện ở *An. dirus* loài F mà Baimai và cộng sự đã phát hiện đó là một khối dị nhiễm sắc lớn nằm ở vị trí tâm động của thể nhiễm sắc số III, dấu hiệu đặc biệt này đã tách được loài F ra khỏi tất cả các thành viên khác trong phức hợp *An. dirus*. Việc nhận biết loài F là một loài riêng biệt đã có ý nghĩa lớn đối với các nghiên cứu về dịch tễ cũng như các nghiên cứu về sinh thái và tập tính mà Colless đã đề cập từ trước, mặt khác nó còn là bằng chứng để bổ sung đầy đủ hơn về thành phần loài *An. dirus* (A, B, C, D, F) có mặt ở Thái Lan.

Đối với các loài khác (loài C và *An. takasagoensis*) trong phức hợp được tác giả chỉ ra sự khác biệt dựa trên cơ sở của bốn mức độ phát sáng băng phương pháp nhuộm huỳnh quang (H-33258). Với đặc điểm cấu trúc về kiểu nhân trên Baimai đã chỉ rõ mức độ phân hóa của

chúng trong quá trình tiến hóa: Loài B và loài F đều có chung nguồn gốc phát sinh. Loài F hình thành nhờ nhận thêm khối dị nhiễm sắc ở vị trí tâm động của thể nhiễm sắc số III. Đồng thời tác giả chỉ ra quan hệ giữa loài A và loài C là gần nhau, loài B và loài D cách xa nhau về mặt di truyền. Rõ ràng phương pháp di truyền tế bào dựa trên phân tích kiểu nhân chẳng những phục vụ tốt cho phân loại mà còn làm sáng tỏ mối quan hệ tiến hóa giữa các loài.

Quan điểm đúng đắn về hướng tiến hóa kiểu nhân ở các loài *Anopheles* đã bác bỏ quan niệm cho rằng các loài muỗi hình thành là do quá trình lai tạo đã tồn tại rất lâu trong đầu thế kỷ XIX. Các tác giả khác còn nêu rõ hơn: trên 90% thậm chí 98% các sự kiện dẫn đến hình thành loài có liên quan đến kiểu nhân.

Tiến hóa kiểu nhân ở các loài *Anopheles* nêu trên không theo cơ chế tăng về số lượng thể nhiễm sắc mà thông qua con đường tái cấu trúc thể nhiễm sắc mà cơ sở là nhận thêm các khối dị nhiễm sắc. Sự khác biệt về kiểu nhân còn được biểu hiện ở nhiều loài khác như: *An. maculatus* và *An. balabacensis*.

Ngoài cách nhận thêm khối dị nhiễm sắc, hiện tượng tái cấu trúc thể nhiễm sắc còn biểu hiện thông qua các đa hình về đảo đoạn cũng khá phổ biến ở các loài thuộc chi *Anopheles*. Kết quả nghiên cứu về thể nhiễm sắc khổng lồ của 30 loài *Anopheles* các tác giả đều có chung nhận định về tính đặc thù của các trật tự băng trên thể nhiễm sắc khổng lồ. Đối với các loài đồng hình đặc điểm của các băng phần lớn là giống nhau, vì vậy người ta cũng dễ dàng nhận biết ra các dấu hiệu khác biệt nếu có trong so sánh phân loại. Trên thực tế các tác giả cho biết việc sử dụng thể nhiễm sắc khổng lồ thông qua các đảo đoạn đã thu nhận được kết quả với độ chính xác cao, Coluzzi đã chỉ ra mỗi cặp loài đồng hình khác nhau ít nhất một đảo đoạn, các nghiên cứu khác cho biết trung bình có ít nhất 9 đảo đoạn đối với một cá thể. Theo White, *An. gambiae* là một phức hợp loài mà sự biểu hiện phong phú nhất về đa hình của đảo đoạn, điển hình ở hai loài *An. gambiae* (17 đảo đoạn) và *An. arabiensis* (18 đảo đoạn). Các tác giả đã cho thấy 11 đảo đoạn đã phân biệt được các loài đồng hình trong phức hợp trong đó các đảo đoạn trên thể nhiễm sắc X đóng vai trò chủ đạo trong phân loại. Nếu lấy thể nhiễm sắc X ở loài *An. quadrianulatus* làm chuẩn thì *An. gambiae* có thể phân biệt bởi 2 đảo đoạn và *An. balabacensis* phân biệt bởi 3 đảo đoạn trên thể nhiễm sắc X. Đối với *An. melas*, *An. merus* và các loài còn lại các tác giả phân biệt bởi các đảo đoạn cố định trên thể nhiễm sắc 2R.

Phức hợp *An. dirus* điển hình ở Đông Nam châu Á song về đa hình các đảo đoạn được Baimai mô tả lại có nhiều đặc điểm khác hẳn. Trong bốn loài *An. dirus* A, B, C, D có mặt tại Thái Lan thì ba loài A, B, C có đặc điểm chung là đơn hình về thể nhiễm sắc khổng lồ. Riêng thể nhiễm sắc 3L ở cả bốn loài có cấu trúc như nhau (Baimai và cộng sự). Loài D khác biệt với ba loài A, B, C bởi các đa hình về đảo đoạn. Nếu cho thể nhiễm sắc ở loài A là chuẩn thì giữa hai loài A và D có sự tương phản về hiện tượng đảo đoạn. Sự khác nhau thể hiện rõ ở cả thể nhiễm sắc X và thể nhiễm sắc thường: Thể nhiễm sắc X thâu tóm toàn bộ các đảo đoạn xảy ra ở loài A tuy nhiên tần số đảo đoạn rất thấp (7 trong 18 quần thể nghiên cứu) thì ở loài D các tác giả không hề phát hiện một trường hợp đảo đoạn nào ở trên thể nhiễm sắc này. Ngược lại toàn bộ các thể nhiễm sắc thường ở loài D đặc trưng bởi đa hình đảo đoạn thậm chí ở các thể nhiễm sắc 2L mà theo ý kiến của Baimai đây là trường hợp rất ít gặp, còn ở loài A chúng lại là đơn hình về trật tự băng dị nhiễm.

Nếu 6 loài đồng hình trong phức hợp *An. gambiae* đều tồn tại các đảo đoạn thì ở phức hợp *An. Dirus*, Baimai cho thấy trong tổng số 287 cá thể thuộc loài B thu thập từ 10 địa điểm khác nhau ở Thái Lan không phát hiện bất kỳ một đảo đoạn nào. Tương tự như vậy thể nhiễm sắc khổng lồ ở loài C hoàn toàn đặc trưng bởi các băng chuẩn qua phân tích 367 cá thể nuôi từ các gia đình. Vì vậy, khi nhận biết các loài này tác giả không dựa trên cơ sở của các đảo đoạn

mà là các băng dị nhiễm đặc thù riêng biệt của từng thành viên trong phức hợp. Phân tích kiểu nhân tác giả còn cho biết loài A và C có nhiều điểm giống nhau về trật tự băng trên thể nhiễm sắc khổng lồ, riêng loài D hoàn toàn khác với loài A và các thành viên khác trong phức hợp *An. dirus* mặc dù về hình thái hai loài A và C đặc biệt như nhau.

Hiện tượng tái cấu trúc thể nhiễm sắc khổng lồ thông qua các đảo đoạn còn phổ biến ở nhiều loài khác thuộc chi *Anopheles*. Ba loài đồng hình được phát hiện trong phức hợp *An. culicifacies* (A, B, C) cũng được tách biệt nhau bởi các đảo đoạn nằm trên thể nhiễm sắc X và thể nhiễm sắc số II ở trợ bào trứng. Phức hợp *An. maculipennis* với 6 loài đồng hình cũng được nhận biết qua các đảo đoạn và loài thứ 7 (*An. beklemishevi*), được phát hiện bởi phương pháp di truyền tế bào mà việc phân tích kiểu nhân làm cơ sở. Phức hợp *An. maculatus* cũng đặc trưng bởi sự đa hình các đảo đoạn nổi bật nhất ở loài B.

Nhìn chung, qua phân tích về tần số đảo đoạn các tác giả cho thấy phần lớn các đảo đoạn là xa tâm (paracentric) và cố định (*fixed inversion*) chúng chỉ tồn tại ở trạng thái đồng hợp tử. Dạng này phổ biến ở *An. gambiae*, *An. dirus*, *An. culicifacies* và *An. maculatus*. Dạng đảo đoạn quanh tâm (pericentric inversion) xảy ra ở *An. quadrianulatus* với tần số rất thấp. Một dạng đảo đoạn khác xảy ra ở một số loài của *Anopheles* là đảo đoạn mảng (floating inversion) ở cả trạng thái đồng hợp tử và dị hợp tử. Loại này thường gặp ở loài *An. supictus* Grassi và *An. stephensi*. Colluzzi còn cho biết thêm thể nhiễm sắc là X và thể nhiễm sắc 2R rất nhạy cảm với các đảo đoạn, một số loại thể nhiễm sắc khác lại rất bảo thủ trong việc giữ nguyên trạng thái về cấu trúc.

Mỗi tần số đảo đoạn, như các tác giả đã cho thấy, thường có sự liên quan đến tập tính cũng như khả năng truyền bệnh của muỗi. Tần số đảo đoạn trên thể nhiễm sắc 2R ở *An. gambiae* và *An. arabiensis* có liên quan đến tập tính cũng như điều kiện khí hậu và đặc điểm hình thái. Các đảo đoạn này có xu hướng tăng ở miền Nam Châu Phi trong mùa ẩm, đối với mẫu thu thập được ở ngoài nhà, còn ở miền Tây trong mùa khô tần số đảo đoạn lại cao hơn đối với mẫu thu thập trong nhà.

Tóm lại, ở mỗi khu vực, điều kiện sinh sống tạo ra một sức ép chọn lọc liên tục lên các quần thể của tất cả các loài và buộc chúng phải thích ứng. Vì vậy, các loài trong quần thể tự nhiên khác biệt nhau không những chỉ về các đặc điểm hình thái mà còn về các đặc điểm sinh học khác, ít hay nhiều được chi phối về phương diện di truyền.

Đa hình đảo đoạn đã chi phối đến tập tính của côn trùng truyền bệnh trong quá trình thích nghi đã được các tác giả đề cập đến nhiều trong các tài liệu nghiên cứu. Quá trình tăng cường thích nghi của loài với môi trường trên cơ sở chọn lọc chính là vấn đề tiến hóa. Nghiên cứu đa hình đảo đoạn không chỉ có ý nghĩa đối với việc nghiên cứu các loài đồng hình, mà nó còn làm sáng tỏ về mối quan hệ tiến hóa giữa các loài. Một lần nữa lại tái khẳng định lại quan điểm đúng đắn của White cho rằng trong sự phân hóa kiểu gen để hình thành loài mới, các thay đổi về thể nhiễm sắc đã giữ vai trò chủ đạo, được nhiều các chuyên gia cùng lĩnh vực tán đồng. Ngoài ra, nghiên cứu ứng dụng tái cấu trúc thể nhiễm sắc mà cơ sở là đảo đoạn kết hợp với chuyển đoạn lại có một ý nghĩa thực tiễn vô cùng to lớn trong việc sử dụng các biện pháp di truyền cho mục đích phòng chống các vectơ truyền sốt rét.

### 2.5.2.2 Đa hình thể nhiễm sắc và các biến dị trong loài

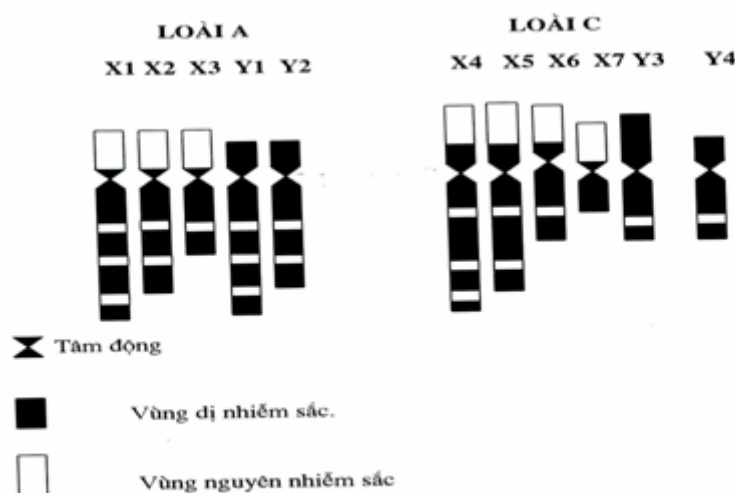
Tính biến dị trong loài thể hiện ở sự thay đổi về vị trí phân bố cũng như số lượng của các vùng dị nhiễm sắc phổ biến ở tế bào nhân chuẩn. Đặc tính này đã giúp ích rất nhiều



cho việc nghiên cứu các loài có quan hệ gần nhau ở cả động vật và thực vật. Hiện tượng này cũng không phải ít gặp ở các loài thuộc chi *Drosophila*.

Rất nhiều công trình nghiên cứu về các biến dị trong loài đã mô tả sự đa hình của các vùng dị nhiễm sắc (heterochromatin polymorphism) ở các loài muỗi *Anopheles* đã giúp ích rất nhiều trong việc nghiên cứu các loài đồng hình. *Anopheles dirus* Peyton và Harrison (*dirus* A) đã được Baimai và cộng sự phát hiện có sự đa hình về thể nhiễm sắc giới tính. Ba dạng (X1, X2, X3) và hai dạng (Y1, Y2) được tác giả phân biệt dựa trên mức độ khác nhau về kích thước và sự phân bố của các vùng dị nhiễm sắc cũng như số lượng của chúng trên thể nhiễm sắc.

Một trường hợp nổi bật về đa hình các biến dị thể nhiễm sắc giới tính trong loài thể hiện ở *An. dirus* (loài B), Baimai và cộng sự đã phát hiện được 9 dạng biến dị thể nhiễm sắc giới tính, trong đó 5 dạng biến dị thuộc thể nhiễm sắc X (X1-X5) và 4 dạng biến dị khác thuộc thể nhiễm sắc Y (Y1-Y4). Phân tích đa hình của thể nhiễm sắc X tác giả đã chỉ ra dấu hiệu khác nhau về vị trí tâm động để phân biệt đối với thể nhiễm sắc X1 là tâm mút (telocentric), X2, X3, X4 là tâm cận mút (acrocentric) và X5 là tâm lệch (submetacentric). Ba thể nhiễm sắc X2, X3, X4 có thể phân biệt dựa trên mức độ khác nhau về kích thước cũng như đặc điểm vùng dị nhiễm sắc. Ngoài ra Baimai còn cho thấy dạng dị hợp tử X1X2 ít phổ biến trong quần thể tự nhiên khác với dạng dị hợp tử X3X4 lại xuất hiện ở hầu hết các gia đình muỗi được nghiên cứu.



**Hình 2.6**

Số khác biệt kiểu nhân giữa loài *Anopheles minimus* (A & C) và đa hình thể nhiễm sắc trong loài

Bốn dạng thể nhiễm sắc Y cũng được nhận biết trên cơ sở các đặc tính tương tự như đối với thể nhiễm sắc X. Dạng dị hợp tử X3Y4, X4Y2 là dạng phổ biến nhất còn dạng X3Y3 và X4Y4 lại rất hiếm tác giả chỉ phát hiện 2 trường hợp trong tổng số 126 gia đình được phân tích.

Nhìn chung các biến dị thể nhiễm sắc giới tính ở kiểu nhân của hai loài *An. dirus* A và B biểu hiện ở quy mô rộng. Các biến dị này theo xu hướng nhận thêm khối dị nhiễm sắc (trường hợp X2, X3, Y2 ở *An. dirus* A và X5, Y3, Y4 ở *An. dirus* B) hoặc mất khối dị nhiễm (trường hợp X1, X3, Y1 ở *An. dirus* B). Thực tế đã cho thấy tiến hóa kiểu nhân thông qua tái cấu trúc

nhận thêm hoặc mất đi khối dị nhiễm sắc là phổ biến cho các loài muỗi ở Phương Đông. Kiểu biến dị trong loài mà biểu hiện ở đa hình của dị nhiễm sắc còn thấy ở các đối tượng khác được các tác giả mô tả rất chi tiết.

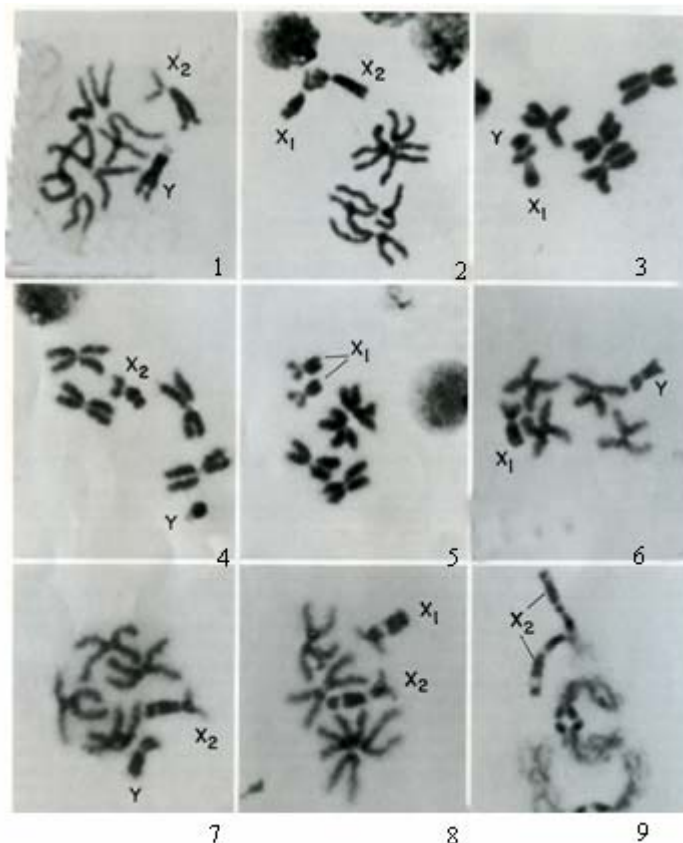
Phức hợp loài *An. gambiae* lại có sự đặc trưng về các đa hình dị nhiễm sắc ở thể nhiễm sắc giới tính. Điểm nổi bật về sự đa hình thể nhiễm sắc X các tác giả chỉ tìm thấy ở các quần thể tự nhiên còn ở phòng thí nghiệm thì thể nhiễm sắc X lại là đơn hình đối với cả hai loài *An. gambiae* và *An. arabiensis*. Với phương pháp nhuộm băng huỳnh quang H-33258 các tác giả đã mô tả các dạng thể nhiễm sắc X và Y khác nhau ở cả hai loài *An. gambiae* và *An. arabiensis*. Hơn nữa Gatti và cộng sự đã chỉ ra kết quả định tính huỳnh quang phản ánh sự phù hợp của sự khác nhau về hóa tế bào và di truyền tế bào ở cả hai loài trong phức hợp.

Rõ ràng các biến dị trong loài giữ vai trò quan trọng trong tiến hóa, tuy nhiên vấn đề sẽ được sáng tỏ hơn khi vai trò sinh lý của các chất dị nhiễm sắc được nghiên cứu đầy đủ. Mặc dù vậy, giả thiết về vai trò của các dị nhiễm sắc trong mối quan hệ giữa vectơ và ký sinh trùng truyền cho người thông qua vectơ đó được nhiều các tác giả đặc biệt quan tâm.

### **2.5.3 Nghiên cứu kiểu nhân ở côn trùng truyền bệnh**

Áp dụng phương pháp làm tiêu bản thể nhiễm sắc trung kỳ (metaphase chromosome) nguyên phân của Baimai, tiến hành mổ lấy tế bào não bọ gậy (tuổi IV). Các bước cụ thể được tiến hành như sau:

Xử lý bọ gậy trong dung dịch Colchicine (catalogue number: Colchicine Sigma cat N0 C. 9754) với nồng độ 0,1% (trong 3 - 4 giờ) ở nhiệt độ phòng. Sau khi xử lý, bọ gậy được vớt ra, chuyển vào dung dịch Citrat - Natri 1%, quá trình mổ lấy não được thực hiện bằng hai kim nhọn, nhỏ, các thao tác được thực hiện dưới kính hiển vi.



**Hình 2.7**

Thụ thể nhiễm sắc thể karyotype nguyên phân của bộ gen muỗi

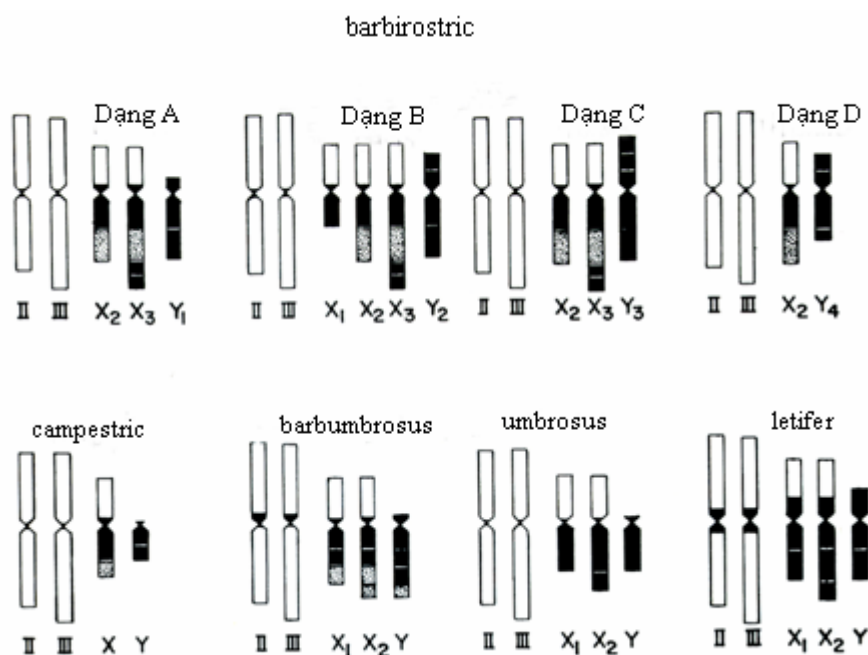
1. Con cái; 2. Con đực - muỗi *Anopheles barbumbrosus*; 3,4. con cái; 5. Con đực - muỗi *Anopheles umbrosus*; 6,7. Con cái; 8,9. Con đực muỗi *Anopheles letifer*

Chuyển não (bao gồm hai khối nhỏ, màu trắng) sang dung dịch nhuộm tương (thời gian nhuộm tương tùy thuộc vào đối tượng).

Định hình não trong dung dịch Carnoy (ở một lam kính khác nhờ vào động tác chuyển não rất khéo léo từ dung dịch nhuộm tương sang dung dịch định hình).

Dùng pipet Pasteur bơm hút tế bào não (còn ở dạng hai khối nhỏ màu trắng) nhiều lần cho đến khi huyền dịch tế bào trở nên đồng nhất.

Cũng dùng những pipet trên nhỏ huyền dịch tế bào lên lam kính sạch, hơi nóng ở máy sấy với nhiệt độ 45°C (5 - 10 phút). Với thời gian như vậy đủ để tế bào bám dính vào lam kính còn axit axetic dư thừa sẽ tự bay hơi. Như vậy, quá trình làm tiêu bản thể nhiễm sắc đã được hoàn thành. Có thể áp dụng phương pháp nhuộm tiêu bản thể nhiễm sắc của muỗi như của người.



Hình 2.8

Đa hình nhiễm sắc thể ở loài *Anopheles*

## 2.5.4 Phương pháp nhận biết loài

Việc nhận biết loài đồng hình bằng biện pháp di truyền tế bào mà cơ sở là thể nhiễm sắc đã được thể hiện rất rõ trong nhiều công trình 10 năm nghiên cứu về phức hợp *An. dirus* ở Thái Lan. Phân tích đa hình thể nhiễm sắc mà cơ sở là đa hình các dị nhiễm sắc (heterochromatic polymorphism), tác giả đã phát hiện được nhiều dạng thể nhiễm sắc giới tính khác nhau. Dựa vào dạng kết hợp của các giao tử (các hợp tử) được tìm thấy trong quần thể tự nhiên, tác giả đã chỉ ra các biến dị bên trong loài hay là sự khác biệt loài.

Quan điểm loài sinh học và định nghĩa loài của Mayr mà cơ chế cách ly sinh sản được xem như một tiêu chuẩn để xác định các cá thể thuộc cùng một loài hay thuộc về hai loài đã được các tác giả quán triệt trong suốt quá trình phân loại. Tuy nhiên, tác giả đã chỉ ra rằng việc áp dụng tiêu chuẩn đó một cách độc lập hay ở dạng kết hợp (với các chỉ tiêu sinh học khác) phải phụ thuộc vào từng trường hợp cụ thể. Trường hợp phổ biến có thể tóm tắt và được trình bày dưới đây.

Các cá thể muỗi (cùng vùng phân bố) có các dạng thể nhiễm sắc khác nhau  $X_1$  và  $X_2$  luôn luôn chỉ tồn tại ở dạng đồng hợp tử ( $X_1X_1$ ) ( $X_2X_2$ ) mà không bắt gặp các cá thể ở dạng dị hợp tử ( $X_1X_2$ ) (quá trình giao phối không xảy ra) vì vậy chúng thuộc về hai loài khác nhau. Về phương diện di truyền học, hai loài này cùng tồn tại trong tự nhiên rất giống nhau về hình thái nhưng cách ly sinh sản với nhau bởi cơ chế tiền giao phối.

Nhưng, cũng các dạng đồng hợp tử trên ( $X_1X_1$ ) ( $X_2X_2$ ) được tìm thấy ở khác vùng phân bố (quá trình giao phối không thể thực hiện được) nhưng như vậy không có nghĩa là chúng thuộc về hai loài. Trong trường hợp này phải kết hợp với các chỉ tiêu khác để kiểm tra kết quả. Mức độ hòa hợp di truyền thể hiện ở kết quả của phép lai ở phòng thí nghiệm sẽ cho ra

kết quả về sự tồn tại về cơ chế cách ly hậu giao phối đem lại độ chính xác cao hơn trong phân loại.

Còn trong trường hợp ngoài các dạng đồng hợp tử ( $X_1X_1$ ) ( $X_2X_2$ ) còn tìm thấy cả dạng dị hợp tử ( $X_1X_2$ ) trong cùng vùng phân bố thì chúng thuộc cùng một loài. Sự có mặt của dị hợp tử chứng tỏ quá trình giao phối giữa hai loài đã xảy ra. Cơ chế giao phối ngẫu nhiên quyết định sự kết hợp ngẫu nhiên của các giao tử. Vì vậy, tần số các hợp tử các đồng hợp tử ( $X_1X_1$ ) ( $X_2X_2$ ) và dị hợp tử ( $X_1X_2$ ) phải phù hợp với định luật Castle - Hardy - Weinberg (1908) C - H - W:

$$p^2X_1X_1 + 2pq X_1X_2 + q^2X_2X_2$$

Ngoài các trường hợp đã được tác giả khái quát và nêu rõ ở trên, trong thực tế các trường hợp ngoại lệ cũng cần lưu ý như việc tìm thấy dạng dị hợp với tỷ lệ không đáng kể hoặc những khó khăn về kỹ thuật trong việc thực hiện phép lai ở phòng thí nghiệm đã không phản ánh được mức độ chính xác của kết quả phân loại. Trong những trường hợp như vậy, phải kết hợp với nhiều các chỉ tiêu khác.

*Vấn đề thảo luận ở chương 2:*

1. *Vẽ sơ đồ và trình bày cấu trúc phân tử của NST.*
2. *Giải thích mối tương quan giữa bộ đơn bội, bộ lưỡng bội và bộ đa bội.*
3. *Phân biệt NST thường và NST giới tính. Trình bày cơ sở NST của xác định giới tính.*
4. *Trình bày đặc điểm và vai trò của trung tiết và tiết nút.*
5. *Nêu và giải thích các thí nghiệm chứng minh cơ sở NST của di truyền.*
6. *Thực hành: làm kiểu nhân của muỗi Anopheles và của người (Homo sapiens).*
7. *Phân tích tiến hóa của các loài muỗi thuộc chi Anopheles trên cơ sở phân tích kiểu nhân.*

## Chương 3

# Cơ sở tế bào của biến dị di truyền

### Mục tiêu:

Sau khi học xong chương này, học viên sẽ có khả năng:

- Phân biệt được hiện tượng thường biến và biến dị di truyền.
- Trình bày được hiện tượng đột biến gen, đột biến thể nhiễm sắc và biến dị tái tổ hợp.
- Trình bày được các dạng đột biến gen và hậu quả của chúng. Cơ sở phân tử của đột biến gen.
- Trình bày được hiện tượng đột biến cấu trúc thể nhiễm sắc, mất đoạn, lặp đoạn, đảo đoạn, chuyển đoạn, hậu quả.
- Mô tả được bộ thể nhiễm sắc và đột biến số lượng thể nhiễm sắc.
- Trình bày được khái niệm đa bội, lệch bội, hậu quả.
- Trình bày được nguyên nhân cơ bản của đột biến, các tác nhân gây đột biến.

### 3.1 Đặc tính biến dị của cơ thể

Cơ thể sống không chỉ có đặc tính di truyền tức là đặc tính thể hiện ở cơ thể con cái có tính trạng giống bố mẹ, nhưng đồng thời còn có các đặc tính biến dị thể hiện ở chỗ cơ thể con cái có nhiều tính trạng khác bố mẹ. Các nhà di truyền học phân biệt hai loại biến dị là thường biến (modification) và biến dị di truyền (genetic variation). Ta hãy xét xem hai loại biến dị này sai khác nhau ở những điểm nào.

#### 8.1.1 Thường biến

Thường biến (modification) là các biến dị biểu hiện ra ở kiểu hình do tác động của điều kiện môi trường. Nó thể hiện mức phản ứng của kiểu gen đối với điều kiện môi trường. Thường biến không di truyền cho con cháu.

Ví dụ, cá bơn sống ở nền cát đen cơ thể có màu sẫm, khi chuyển sang sống ở nền cát trắng da chúng trở nên có màu sáng. Nếu chúng ta chuyển cá bơn có màu sáng sang sống ở nền cát đen chúng trở nên sẫm hơn.

Ví dụ, cây rau mác sống ở nước thường có nhiều dạng lá khác nhau: lá trên không khí có hình mác, còn lá ở mặt nước có hình bản. Nếu chúng ta đem trồng cây rau mác ở môi trường cạn thì lá của chúng chỉ toàn là hình mác. Thường biến thường mang tính thích nghi với môi trường.

### 8.1.2 Biến dị di truyền

Biến dị di truyền (genetic variation) là các biến đổi trong kiểu gen có thể được biểu hiện hoặc không ra kiểu hình. Nguyên nhân có thể do ngẫu nhiên hoặc do cơ chế tái tổ hợp trong hệ gen hoặc do tác động của các tác nhân gây đột biến lên ADN hoặc thể nhiễm sắc, như tác nhân hóa học, vật lý và virus.

Biến dị di truyền có thể xảy ra trong tế bào soma hoặc trong tế bào sinh dục. Nếu xảy ra trong tế bào soma sẽ gây biến dị đối với tế bào, mô và cơ thể (ví dụ gây ung thư). Nếu xảy ra trong tế bào sinh dục sẽ di truyền cho các thế hệ con cháu.

Các nhà di truyền học phân biệt ba dạng biến dị di truyền:

- *Đột biến gen* (gene mutation) hay là đột biến điểm là những biến đổi trong cấu trúc của phân tử ADN.

- *Đột biến thể nhiễm sắc* (chromosome aberration) là những biến đổi trong cấu trúc và số lượng thể nhiễm sắc.

- *Tái tổ hợp di truyền* (genetic recombination) với nghĩa chính thống là những biến đổi trong ADN và thể nhiễm sắc gây ra do cơ chế hoán vị gen giữa hệ gen của bố và mẹ qua tiền kỳ phân bào giảm nhiễm I, do sự phân ly độc lập và tổ hợp tự do của hệ gen bố và mẹ (gen – alen) qua sự tạo giao tử và qua sự tạo hợp tử khi thụ tinh (xem phần trên).

Tuyệt đại đa số cơ thể sống đều sinh sản theo phương thức hữu tính nghĩa là có xảy ra biến dị tái tổ hợp qua mỗi thế hệ và vì lẽ rằng số lượng gen và số lượng thể nhiễm sắc của cơ thể là rất lớn nên tần số đột biến tái tổ hợp là rất lớn.

Nếu một cơ thể có số lượng gen là  $x$ , số thể nhiễm sắc đơn bội là  $n$  thì đột biến tái tổ hợp qua mỗi thế hệ có thể xảy ra với tần số  $2^x \times 2^n \times 2^n$ . Vì vậy, đột biến tái tổ hợp là nguyên liệu chủ yếu của chọn lọc tự nhiên cho quá trình tiến hóa.

Tái tổ hợp di truyền không chỉ xảy ra qua quá trình sinh sản hữu tính mà sự tổ hợp lại các gen hoặc thể nhiễm sắc có thể xảy ra trong nội bộ một thể nhiễm sắc, hoặc trong nội bộ hệ gen (được gọi là tái tổ hợp soma), hoặc giữa hai hệ gen thông qua hiện tượng biến nạp di truyền (genetic transformation) và tải nạp di truyền (genetic transduction). Cho nên các nhà di truyền học quan niệm hiện tượng tái tổ hợp di truyền là rất phổ biến.

## 8.2 Đột biến gen

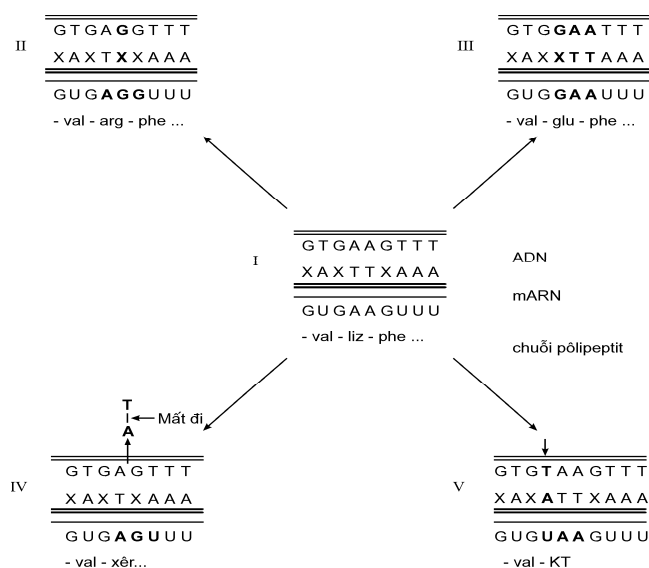
Đột biến gen còn được gọi là đột biến điểm là những biến đổi trong cấu trúc của gen thể hiện ở sự thay thế nucleotit này bằng một nucleotit khác, hoặc đảo vị trí sắp xếp của nucleotit, hoặc mất đi hoặc, thêm vào một hay một số nucleotit trong gen (hình 3.1).

Đột biến gen có thể xảy ra trong tất cả các gen của tất cả cơ thể sống. Đột biến gen cũng như đột biến thể nhiễm sắc dẫn đến hình thành các biến dị di truyền mới và từ đó tạo cho cơ thể có nhiều khả năng thích nghi với các biến đổi của môi trường.

### 8.2.1 Đột biến gen có thể là đột biến soma hay là đột biến mầm

Đột biến soma xảy ra trong các tế bào soma ở bất kỳ giai đoạn nào của quá trình phát triển của cơ thể đa bào. Hậu quả của đột biến gen soma và khả năng biểu hiện của chúng thành các tính trạng biến dị là tùy thuộc vào trạng thái trội, lặn của gen và phụ thuộc vào dạng tế bào mà gen biểu hiện, thời gian của chu kỳ tế bào cũng như chu kỳ sống của cơ thể. Đột biến mầm là các đột biến xảy ra trong dòng tế bào sinh dục là những tế bào có khả năng phân

bào giảm nhiễm để tạo nên các giao tử và thông qua giao tử các đột biến được di truyền cho thế hệ sau.



**Hình 3.1**

Các dạng đột biến gen và sản phẩm polipeptit của chúng; I. gen ban đầu; II. Thay thế nucleotit; III. Đảo nucleotit; IV. Mất nucleotit; V. Thêm nucleotit

Đột biến soma gây nên các biến đổi kiểu hình thể hiện ở mức độ tế bào, mức độ mô hoặc cơ quan trong thể hệ một cá thể chứ không truyền cho thế hệ sau qua giao tử, ví dụ cam có lỗ rốn (navel orange) mềm ngon và táo ngọt lịm (delicious apple) đều là những thể đột biến soma. Người ta phải sử dụng phương pháp sinh sản sinh dưỡng như ghép cành, chiết cành để nhân giống chúng.

Đối với động vật và con người các đột biến soma thường gây nên các hư hỏng ở mức độ tế bào, mô hoặc cơ quan nào đó ví dụ như ung thư.

## 8.2.2 Đột biến gen là ngẫu nhiên hoặc cảm ứng

Đột biến gen ngẫu nhiên là đột biến gây nên bởi nguyên nhân chưa biết rõ, có thể là do sự sai lệch trao đổi chất trong tế bào có thể là do tế bào không tự sửa chữa hết các sai sót xảy ra trước hoặc trong quá trình tái bản mã.

Đột biến cảm ứng là những đột biến xảy ra do tác động của các tác nhân gây đột biến (mutagens) như các tác nhân vật lý, hóa học làm biến đổi cấu trúc phân tử của ADN.

Trong thực nghiệm người ta dễ dàng phân tích các dạng đột biến gen nhưng trong thực tế thật khó phân biệt các đột biến ngẫu nhiên và đột biến cảm ứng. Các nhà di truyền học thường phân tích các đột biến và so sánh chúng ở mức độ quần thể. Nếu người ta cho xử lý quần thể với một tác nhân gây đột biến nào đó mà tần số đột biến tăng lên mức 99 trên 100 đột biến có mặt trong quần thể thì đột biến đó là đột biến cảm ứng. Các nhà nghiên cứu thường sử dụng thống kê sinh học để tính toán so sánh các tần số đột biến cảm ứng với tần số đột biến ngẫu nhiên trong các quần thể được tác động bởi các tác nhân gây đột biến với các quần thể không có tác động bởi tác nhân gây đột biến thử nghiệm.



Các đột biến ngẫu nhiên xuất hiện không thường xuyên, tuy nhiên tần suất của chúng có thể thay đổi từ gen này đến gen khác, từ cơ thể này đến cơ thể khác. Người ta đã tính toán được tần số xuất hiện các đột biến ngẫu nhiên đối với các gen khác nhau là ở mức  $10^{-7}$  đến  $10^{-10}$  đối với một cặp nucleotit và đối với một thể hệ. Nếu ta đem so sánh tần số đột biến đối với một cặp nucleotit với một gen thì tần số đột biến ở mức  $10^{-4}$  đến  $10^{-7}$  (vì trung bình 1 gen chứa khoảng 1.000 đôi nucleotit). Do ở các cơ thể bậc cao số gen là rất lớn nên tần số đột biến là ở mức đáng kể.

### 8.2.3 Đột biến là quá trình ngẫu nhiên không có tính thích nghi

Chúng ta rất quen biết với hiện tượng nhờn thuốc của côn trùng có hại khi xử lý bởi các loại thuốc diệt sâu hoặc vi khuẩn gây bệnh khi xử lý bởi kháng sinh. Trong quá trình tác động giữa cơ thể và thuốc đã xuất hiện cá thể đột biến có đặc tính kháng thuốc. Học thuyết tiến hóa cho chúng ta biết rằng tiến hóa là kết quả của đột biến và chọn lọc tự nhiên. Như vậy, bản chất của đột biến là gì? Có phải đột biến là hoàn toàn ngẫu nhiên và môi trường là yếu tố duy trì các đột biến có sẵn? Hay là đột biến được định hướng bởi nhân tố môi trường? Nhiều nghiên cứu thực nghiệm và khảo sát trong tự nhiên tiến hành trên đối tượng vi khuẩn và cơ thể đa bào đã chứng minh rằng đột biến di truyền luôn xảy ra trong quần thể và nhân tố môi trường đã chọn lọc các đột biến có sẵn và tính thích nghi kiểu hình là kết quả của chọn lọc tự nhiên trên cơ sở các đột biến sẵn có trước đó và như vậy đột biến không hề được định hướng và không mang sẵn tính thích nghi.

Trong thí dụ về tính kháng thuốc của vi khuẩn các nhà di truyền với nhiều thí nghiệm đã chứng minh rằng bản thân vi khuẩn luôn luôn đột biến tạo thành nhiều chủng khác nhau, những chủng mới này không còn bị thuốc tác động do đó chúng mang tính “nhờn” thuốc. Tính kháng thuốc là do đột biến gây nên và các đột biến này xảy ra không hề mang tính đáp ứng với thay đổi của môi trường mà chúng xảy ra một cách ngẫu nhiên. Các nhà di truyền học phân tử đã phát hiện được nhân tố kháng thuốc và chúng có bản chất là ADN.

Một sự kiện đáng quan tâm là trong hệ gen Người là tổ hợp cặp nucleotit bổ sung CG được quan sát thấy ít hơn (so với các cặp bazơ bổ sung khác) và người ta nhận thấy là cặp nucleotit CG là điểm nóng (hot spot) của sự methyl hóa nghĩa là trong phân tử ADN một số Cytosin thường chịu sự biến đổi hóa học là gắn thêm nhóm methyl (bị methyl hóa). Các methyl-cytosin đến lượt nó lại gây nên biến đổi hóa học thứ hai là sự mất đi 1 nhóm hóa học là amin. Các methyl-cytosin bị mất amin sẽ biến thành Thymin. Như vậy, gốc Cytosin (C) đã bị thay thế bằng gốc Thymin (T) và loại đột biến này thường hay gặp và hình như chúng không được kiểm soát và không được sửa chữa, do đó cặp CG trong ADN là điểm nóng của methyl hóa đồng thời cũng là điểm nóng của đột biến. Phải chăng tần số ít gặp cặp CG ở người là có định hướng? Những người theo học thuyết tiến hóa trung lập cho rằng đột biến này cũng là ngẫu nhiên mà thôi.

### 8.2.4 Đột biến là quá trình thuận nghịch

Như chúng ta đã biết nếu đột biến xảy ra đối với gen kiểu dại sẽ sản sinh ra alen đột biến và kết quả sẽ cho ra kiểu hình đột biến bất thường. Alen đột biến lại có thể đột biến nghịch để trở lại kiểu hình dại ban đầu, như vậy đột biến có tính thuận nghịch.

Đột biến gen kiểu dại để tạo nên gen cho kiểu hình đột biến được gọi là đột biến tiến (forward mutation). Nhiều khi sự xác định phân biệt kiểu hình dại và kiểu hình đột biến chỉ là tương đối và có thể xem chúng chỉ là hai kiểu hình khác nhau nhưng là bình thường, ví dụ các nhà di truyền cho rằng các alen qui định màu mắt nâu và xanh ở người đều là kiểu dại. Nhưng

ở mức độ nào đó trong quần thể đại đa số cá thể đều có mắt nâu thì alen qui định màu mắt xanh lại được xem là alen đột biến.

Khi đột biến thứ hai làm khôi phục lại kiểu hình ban đầu đã bị mất đi do đột biến trước đó thì quá trình đó được gọi là đột biến ngược (reverse mutation).

### 8.2.5 Hậu quả kiểu hình của đột biến gen

Đột biến gen gây nên nhiều thay đổi trong kiểu hình của cơ thể từ mức độ phân tử có thể phát hiện bằng kỹ thuật sinh hóa tinh vi, cho đến mức độ cấu tạo hình thái hoặc gây chết cơ thể. Như vậy, đột biến xảy ra trong ADN là nguyên liệu biến dị cho chọn lọc tự nhiên tác động trong quá trình tiến hóa. Một gen là một đoạn trình tự các cặp nucleotit của ADN mã hóa cho một polypeptit nào đó của cơ thể. Bất kỳ đột biến nào đó xảy ra trong một gen nào đó sẽ sản sinh ra alen mới của gen đó. Nếu gen chứa đột biến gây ra hậu quả bé và được phát hiện chỉ bằng kỹ thuật đặc biệt thì được gọi là đồng gen (isoalleles). Các đột biến khác được gọi là alen không (null alleles) khi alen mang đột biến hoàn toàn không hoạt động. Nếu gen mang các đột biến này hoạt động theo yêu cầu của sự phát triển cơ thể thì cá thể mang các đột biến này ở trạng thái đồng hợp sẽ không sống sót. Những đột biến như thế được gọi là đột biến lặn gây chết (recessive lethals). Các đột biến có thể là trội (dominant) hoặc lặn (recessive). Đối với các cơ thể đơn bội như virut và vi khuẩn cả hai dạng đột biến trội và lặn đều có thể phát hiện được bởi hậu quả kiểu hình do chúng gây nên ở cơ thể. Còn đối với cơ thể lưỡng bội như: cây lúa, ruồi quả hay con người thì chỉ có các đột biến lặn ở trạng thái đồng hợp mới thể hiện ra ở kiểu hình đột biến. Như vậy, trong cơ thể lưỡng bội các thể đột biến lặn sẽ không thể nhận biết được nếu cơ thể ở trạng thái dị hợp vì chúng không gây nên sự thể hiện kiểu hình. Tuy nhiên, các đột biến liên kết giới tính là ngoại lệ bởi vì chúng sẽ biểu hiện ra kiểu hình khi ở trạng thái bán hợp tử (hemizyote) trong các cá thể dị giao tử (ví dụ cá thể đực ở ruồi quả hoặc người; cá thể cái ở bướm hoặc chim). Những đột biến gây chết lặn liên kết với *X* sẽ làm thay đổi tỷ số giới tính ở thế hệ con bởi vì các cá thể bán hợp tử mang gen đột biến lặn sẽ không sống sót.

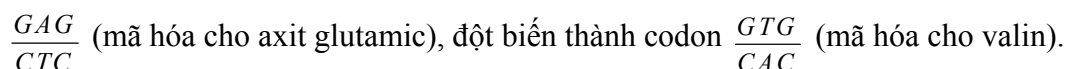
### 8.2.6 Đa số các đột biến đều có hại và lặn

Kết luận đó của các nhà di truyền học khi nghiên cứu khảo sát trên hàng nghìn đột biến khác nhau là căn cứ vào sự hiểu biết về sự kiểm tra di truyền sự trao đổi chất và với nhiều kỹ thuật phát hiện các đột biến. Sự trao đổi chất bao gồm trình tự các phản ứng hóa học trong đó mỗi một giai đoạn được xúc tác bởi các enzym đặc trưng được mã hóa bởi một hay nhiều gen. Đột biến trong các gen này sẽ dẫn tới ức chế một khâu nào đó trong quá trình trao đổi chất. Sự thay đổi trong trình tự các nucleotit của gen dẫn tới thay đổi trong trình tự các axit amin của polypeptit do đó dẫn đến các sản phẩm không có hoạt tính chức năng. Đó là hậu quả thường thấy khi có đột biến gen.

Mã di truyền là thoái hóa nghĩa là một axit amin được mã hóa bởi nhiều codon, cho nên có nhiều đột biến gen không gây hậu quả kiểu hình cho cơ thể, do đó người ta gọi chúng là các đột biến trung tính (neutral mutation). Hơn nữa vai trò của các axit amin trong polypeptit không như nhau, ví dụ các axit amin tạo nên trung tâm hoạt tính của enzym là rất quan trọng do đó nếu đột biến xảy ra ở các codon mã hóa cho các axit amin đó sẽ gây hậu quả tác hại lớn hơn so với các axit amin khác.

Khi nghiên cứu các sai lệch hemoglobin ở người, các nhà di truyền đã chứng minh tính chất gây hại của các đột biến. Người bình thường khỏe mạnh có hồng cầu chứa hemoglobin A, trong lúc đó người bị bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm có hồng cầu chứa hemoglobin S.

Hemoglobin A chứa 2 mạch globin  $\alpha$  và 2 mạch globin  $\beta$ . Mỗi mạch  $\alpha$  gồm 141 axit amin, còn mỗi mạch  $\beta$  chứa 146 axit amin. Khi so sánh mạch  $\beta$  của hemoglobin A với mạch  $\beta$  của hemoglobin S người ta thấy có sự sai khác thể hiện ở chỗ trình tự axit amin ở vị trí số 6 ở mạch  $\beta$  của hemoglobin A là axit glutamic đã bị thay thế bởi valin ở mạch  $\beta$  của hemoglobin S. Trong lúc đó 2 mạch  $\alpha$  ở cả 2 hemoglobin A và S hoàn toàn giống nhau. Như vậy, chỉ do sai lệch một axit amin trong hàng trăm axit amin đã dẫn đến sai lệch trong polypeptit, trong tế bào (hồng cầu hình lưỡi liềm) và cả cơ thể (bị bệnh thiếu máu). Sự thay thế axit glutamic trong hemoglobin A bằng valin trong hemoglobin S là do đột biến trong các codon mã hóa cho axit amin này nghĩa là do sự thay thế nucleotit A bởi nucleotit T dẫn đến codon:



Người ta đã phát hiện được hàng trăm dạng hemoglobin sai lệch do sự thay đổi trong mạch  $\beta$  và thường là do sự thay thế chỉ một axit amin nghĩa là do đột biến trong một codon của gen mã hóa cho mạch  $\beta$ . Ví dụ về sai lệch hemoglobin ở người đã chứng minh rằng đột biến gen là quá trình biến đổi trong cấu trúc của gen và thường là sự biến đổi một hoặc vài cặp nucleotit dẫn đến làm thay đổi trình tự của các axit amin trong polypeptit - Sự thay đổi trong cấu trúc protein đến lượt mình dẫn đến làm thay đổi kiểu hình của cơ thể và cơ thể đó được gọi là thể đột biến (mutant).

Đột biến gen có thể gây hậu quả ức chế một hay vài khâu trong quá trình trao đổi chất do đó dẫn đến làm thay đổi kiểu hình mà ở người thể hiện nhiều bệnh khác nhau vì lẽ rằng đột biến một hay vài gen dẫn đến sự bất hoạt của gen do đó không sản sinh ra enzym (hoặc sản sinh enzym không hoạt tính) dẫn đến ức chế các khâu của quá trình trao đổi chất dẫn đến gây bệnh, ví dụ bệnh phenylxeton niệu (làm chậm phát triển trí não) là do có đột biến lặn trong các gen mã hóa cho các enzym có chức năng chuyển hóa phenylalanin  $\rightarrow$  tyrosin

### 8.2.7 Đột biến gây chết có điều kiện

Bệnh bạch tạng là do thiếu sắc tố melanin trong da, tóc và mắt do sự sai lệch trong các enzym có vai trò chuyển hóa tyrosin thành melanin. Bệnh bạch tạng là bệnh di truyền lặn theo thể nhiễm sắc thường, vì vậy nếu ở trạng thái dị hợp vẫn có màu da bình thường.

Đột biến gây chết có điều kiện là những đột biến gây chết cho cơ thể mang đột biến chỉ trong điều kiện giới hạn nào đó của môi trường, còn khi ở trong điều kiện khác (được gọi là điều kiện chấp nhận) sẽ tồn tại và phát triển. Nghiên cứu các đột biến gây chết có điều kiện cho phép các nhà di truyền học phát hiện và xác định được sự đột biến của gen cần nghiên cứu vì hậu quả của đột biến sẽ thể hiện ở sự thiếu hẳn sản phẩm có hoạt tính của gen đó ở cá thể đơn bội. Đột biến mang đặc tính gây chết có thể tồn tại và phát triển trong các điều kiện chấp nhận và các hiểu biết về chức năng của protein do gen đó mã hóa có thể xác định được khi chúng không thể hiện trong các đột biến có điều kiện giới hạn. Người ta đã sử dụng các đột biến có điều kiện để nghiên cứu làm sáng tỏ nhiều quá trình sinh học như quá trình phát triển cá thể, quá trình quang hợp v.v. hoặc để thành lập bản đồ gen của cơ thể.

Ba thể đột biến gây chết có điều kiện được nghiên cứu nhiều nhất là:

Thể đột biến trợ dưỡng (auxotrophic mutants).

Thể đột biến cảm nhiệt (temperature-sensitive mutants).

Thể đột biến cảm ức chế (suppressor-sensitive mutants).

Các nhà di truyền đã học sử dụng phương pháp phân tích các đột biến gây chết có điều kiện cũng như các đột biến nói chung để làm sáng tỏ nhiều giai đoạn của quá trình phát triển cá thể, quá trình chuyển hóa các chất, quá trình hoạt hóa và điều chỉnh hoạt hóa của gen.

### 8.2.8 Cơ sở phân tử của đột biến gen

Như ta đã biết đột biến gen là đột biến xảy ra do có sự sai lệch trong ADN của gen. Sự sai lệch đó gây nên do sự thay thế nucleotit (được gọi là đột biến thay thế) hoặc do sự mất nucleotit (được gọi là đột biến mất), hoặc do sự thêm nucleotit (được gọi là đột biến thêm), hoặc do sự đảo thứ tự của nucleotit trong mạch ADN cấu tạo nên gen (hình 3.1).

- Đột biến thay thế (substitutions) được gọi là đột biến chuyển (transition) là trường hợp một purin này bị thay thế bởi purin khác (ví dụ, thay thế A bởi G hoặc ngược lại), pirimidin này bởi pirimidin khác (ví dụ, thay thế T bởi C hoặc ngược lại), hay được gọi là đột biến chuyển ngược (transversions) là trường hợp một purin bị thay thế bởi một pirimidin hoặc ngược lại (ví dụ, thay thế A bởi C, thay thế C bởi A; hoặc thay thế G bởi T, thay thế T bởi G).

Cơ chế của các đột biến thay thế có thể là:

Do sự biến dạng của ADN dẫn tới sự bắt cặp bổ sung sai và do các sai sót khi lắp ráp nucleotit do ADN - polymeraza thực hiện.

Do sự dịch chuyển các nguyên tử hydro dẫn tới tạo thành các dạng tautomer của nucleotit và dẫn tới sự lắp ráp sai lệch các cặp khác với A - T và G - C.

Do sự thay đổi hóa học của các nucleotit. Người ta phát hiện được các nucleotit ở dạng thay đổi hóa học như 5-methylcytosin là do sự methyl hóa cytosin bởi enzym methylaza của tế bào. Vì 5-methyl cytosin khi bị khử amin đã chuyển hóa thành thymin do đó dẫn tới sự bắt cặp sai G - T.

- Các đột biến mất hoặc đột biến thêm xảy ra là do sự mất đi hoặc thêm vào một hoặc vài nucleotit trong quá trình tái bản ADN. Các đột biến này thường làm thay đổi trình tự sắp xếp của nucleotit trong ADN do đó làm sai lệch các codon, vì vậy còn được gọi là đột biến dịch khung (frameshift mutations). Các đột biến dịch khung thường gây nên các hậu quả thể hiện ở sự tổng hợp các protein không có hoạt tính. Ngoài ra người ta còn phân biệt dạng đột biến đảo là trường hợp thứ tự của một đoạn nào đó bị đảo thứ tự  $180^\circ$  dẫn tới là sai lệch codon của gen.

Các dạng đột biến gen: đột biến chuyển, đột biến chuyển ngược, đột biến dịch khung hay đột biến đảo đều có nguyên nhân là sự sai lệch trong ADN của gen, là sự trục trặc trong bộ máy tái bản ADN, là sự kém hiệu quả của bộ máy sửa chữa ADN sửa chữa không hết các sai sót xảy ra trước và trong quá trình tái bản ADN và cũng là do tác động của các tác nhân gây đột biến (mutagens) có trong môi trường sống như bức xạ tử ngoại, bức xạ ion hóa, nhiệt hoặc các chất hóa học gây đột biến, virut, v. v..

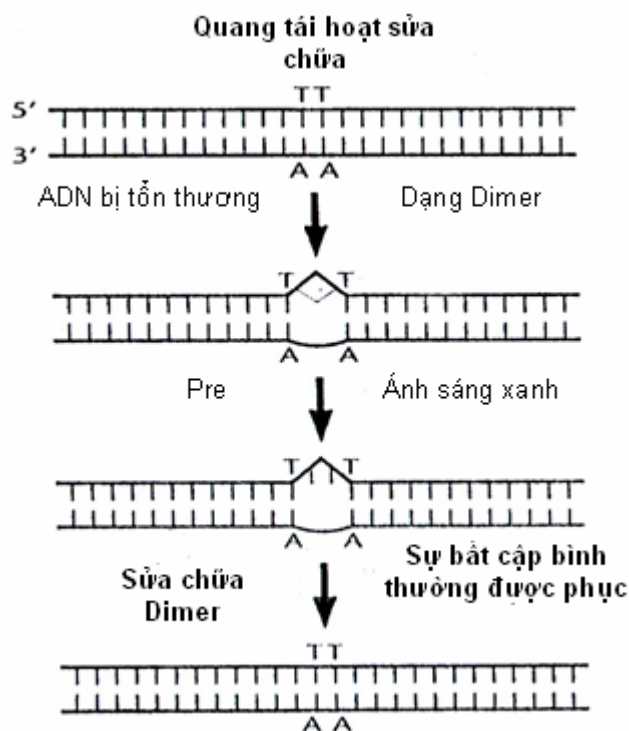
### 8.2.9 Hệ thống sửa chữa và bảo vệ ADN

Phân tử ADN là đối tượng tác động của các gốc tự do trong các phản ứng ion hóa do hóa chất hoặc các chất alkyl hóa tạo ra. Các sai hỏng trong quá trình sao chép ADN có thể được sửa chữa nhờ một hệ thống gọi là hệ thống sửa sai và bảo vệ ADN. Nhờ hệ thống này mà các thông tin di truyền của sinh vật ổn định và sinh vật mới có khả năng sống sót trên trái đất.

### 3.2.9.1 Sự hồi phục sau tác hại của tia UV ở Prokaryote nhờ hiện tượng quang tái hoạt hóa

Dưới tác dụng của tia UV, các đột biến gen sinh ra do tạo các pyrimidine dimer. Nếu sau khi xử lý tia UV, ta đưa mẫu ra ngoài ánh sáng thì phần lớn sai hỏng được phục hồi. Hiện tượng này được gọi là quang tái hoạt hóa (photoreactivation). Năm 1949, Albert Kelner đã phát hiện thấy hiện tượng quang tái hoạt hóa ở *E.coli*. Khi đưa các tế bào *E.coli* vừa được xử lý tia UV ra ngoài ánh sáng thường, hầu như các sai hỏng đều được sửa chữa, các nghiên cứu sau đó đã chứng minh được rằng năng lượng của ánh sáng thường đã hoạt hóa một loại enzym có tên là enzym quang phục hồi (PRE) có khả năng cắt các vòng pyrimidine dimer (thường là các thymin dimer). Đầu tiên, enzym này nhận biết và gắn đặc hiệu vào các dimer (ở trong bóng tối). Khi chỗ sai hỏng được chiếu sáng, năng lượng được sử dụng nhờ phức hệ enzym biến thymin dimer thành các monomer. Sau đó, enzym tách ra (hình 3.2).

Ở người và các sinh vật Eukaryote, người ta chưa phát hiện thấy có enzym này, vậy thì cái gì đảm nhiệm cơ chế sửa chữa ADN do bức xạ ion hóa UV gây ra?



**Hình 3.2**

Cơ chế quang tái hoạt hóa sửa chữa ADN

### 3.2.9.2 Các cơ chế sửa chữa ở Prokaryote và Eukaryote

Vào đầu những năm 1960, ngoài enzym quang tái hoạt hóa PRE, người ta còn phát hiện thấy ở *E.coli* một hệ thống sửa chữa ADN mà không cần sự có mặt của ánh sáng. Hệ thống này được thực hiện trên cơ chế cắt sửa (excision repair), một cơ chế được bảo tồn trong suốt quá trình tiến hóa và có ở cả Prokaryote và Eukaryote, gồm các bước cơ bản sau:

1- Phát hiện lỗi và cắt bỏ lỗi nhờ một enzym. Phản ứng có thể cắt một bazơ, một nucleotit hoặc vài nucleotit gần chỗ lỗi. Kết quả để lại một lỗ trống trên chuỗi xoắn kép.

2. Enzym polymeraza I lấp chỗ trống bằng cách chèn d-ribonucleotit bổ sung với nucleotit trên mạch đối. Những bazơ bổ sung này sẽ được đưa vào gắn phía đầu 3'-OH trên mạch đang sửa.

3- Enzym nối ADN ligaza sẽ hàn gắn khe hở phía sau đầu 3' - OH của bazơ vừa đưa vào và lấp trống được khép kín.

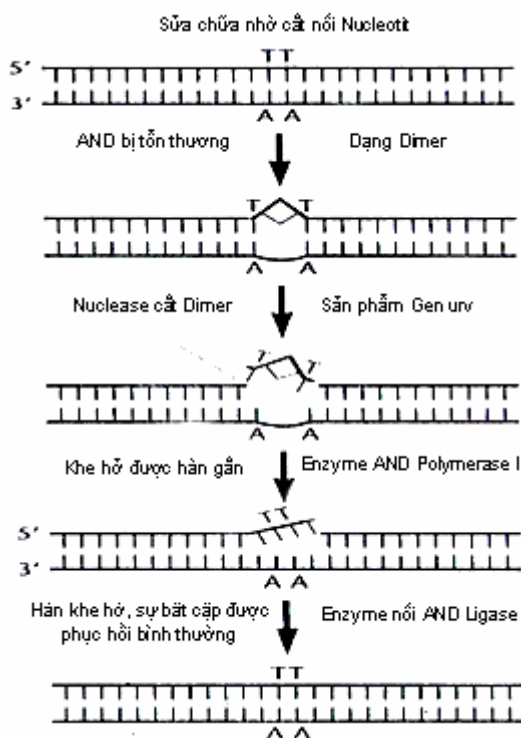
ADN polymeraza I được phát hiện bởi Arthur Kornberg, khi ông đang nghiên cứu vai trò của enzym sửa chữa đột biến polAI ở *E.coli* do tác nhân gây đột biến tia UV gây ra. Các tế bào mang đột biến polAI không có enzym polymeraza I và rất nhạy cảm với bức xạ UV. Rất nhiều khả năng các tế bào này cũng không thể tự lấp lỗ trống sau phản ứng cắt thimin dimer.

Hiện nay, có hai cơ chế cắt sửa được biết tới đó là: cắt bazơ và cắt sửa nucleotit. Cơ chế cắt sửa bazơ (BER) có chức năng phục hồi các bazơ nitơ sau khi bị biến đổi do thủy phân ngẫu nhiên do các tác nhân hóa học. Đầu tiên, hệ thống BER nhận dạng các bazơ bị biến đổi enzym ADN glycosylaza đặc hiệu với từng loại bazơ. Ví dụ, enzym uracil-ADN glycosylaza nhận biết bazơ uracil lạ trong ADN. Sau đó, enzym này sẽ cắt liên kết glycosid giữa bazơ với đường, tạo một vị trí apyrimidin (AP) là vị trí bị mất pyrimidine. Tiếp đến, enzym AP endonucleaza sẽ nhận biết phân tử đường bị mất bazơ và cắt khung đường ngay tại vị trí AP. Lỗi sai vừa tạo ra sẽ được enzym ligaza hoàn thành nốt phần còn lại (hệ thống BER hoạt động thông qua enzym ADN glycosylaza, AP endonucleaza, ADN ligaza. Trên hình, U không phải là bazơ bổ sung với G, bị cắt và thay bằng bazơ C).

Mặc dù enzym glycosylaza được nhắc tới nhiều ở *E.coli* nhưng ở Eukaryote nó vẫn chưa được biết nhiều. Hiện nay, chưa có mô hình cụ thể nào về hoạt động của BER trong các bệnh ở người và động vật nên việc đánh giá cơ chế BER ở Eukaryote còn là vấn đề cần làm sáng tỏ.

Cơ chế sửa sai thứ hai là cơ chế cắt sửa nucleotit (NER), khác với cơ chế trên, cơ chế này sửa các lỗi sai lớn hơn. Lần đầu tiên được Howard-Flanders và các cộng sự đã tìm ra cơ chế này ở *E. coli*. Đầu tiên ADN bị gây đột biến (tia UV) tạo ra các pyrimidine dimer.

Sau đó có một nhóm gen *uvr* (gen sửa chữa đột biến do tia UV gây ra). Có 3 kiểu đột biến *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, sẽ nhận biết và cắt bỏ các sai hỏng trên ADN. Quá trình được hoàn tất nhờ enzym polymeraza I và ADN ligaza (hình 3.3).



**Hình 3.3**

Sửa chữa sự sai khác ADN do tia UV gây ra

### 3.2.9.3 Bệnh lở da loét đỏ và cơ chế cắt sửa nucleotit

Cơ chế cắt sửa nucleotit (NER) ở Eukaryote phức tạp hơn rất nhiều so với ở Prokaryote. Người ta phát hiện thấy ở những người bị bệnh lở da loét đỏ (xeroderma pigmentosum-XP), một hiện tượng rối loạn di truyền rất hiếm gặp, không có hệ thống NER. Do đó, khi tiếp xúc với tia tử ngoại có trong ánh sáng mặt trời, bệnh XP sẽ biểu hiện ra dưới hiện tượng nổi đốm trên da, sau đó ăn loét da và tiếp đó phát triển thành ung thư da.

Mặc dù việc phát hiện sớm và bảo vệ cá thể mang rối loạn di truyền này có thể ngăn cản hiện tượng XP, nhưng biểu hiện của bệnh vẫn có thể rất xấu và có thể gây chết. Do trong ánh nắng mặt trời có chứa bức xạ UV nên người ta nghĩ có nhiều khả năng có một liên quan nào đó giữa thymin dimer và XP. Tiến hành nghiên cứu khả năng sửa chữa những tổn thương do tia UV gây ra trên những người thường và bị bệnh XP, kết quả cho thấy kiểu hình XP có thể do nhiều gen đột biến gây nên.

Năm 1988, James Cleaver nhận thấy ở cá thể XP thiếu một quá trình tổng hợp ADN không có lịch trình (unscheduled DNA synthesis) nào đó so với các cá thể bình thường. Tác giả cho rằng quá trình tổng hợp bất thường này có liên quan tới hệ thống cắt sửa.

Để hồi phục hệ thống sửa chữa ở các tế bào XP, người ta tiến hành phương pháp lai tế bào soma. Khi lai hai nguyên bào sợi của hai bệnh nhân XP khác nhau, kết quả tạo thành một dạng heterokaryon (trong 1 tế bào chất có chứa hai nhân). Bình thường, khi mỗi tế bào tồn tại ở trạng thái riêng lẻ, cả hai đều không có hệ thống sửa sai lỗi này. Nhưng ở dạng

heterokaryon lại xuất hiện quá trình cắt sửa ADN, chứng tỏ lúc này đã có hiện tượng bổ sung nào đó giữa hai thể đột biến.

Tổng hợp nhiều nghiên cứu khác người ta dự đoán có ít nhất 7 gen khác nhau tham gia vào quá trình cắt sửa, do đó các bệnh nhân được chia thành 7 nhóm “bổ sung” để khảo sát. Hiện nay, các gen và sản phẩm protein tương ứng đã được biết rõ nhưng chúng lại nằm trên các vùng genom khác hẳn nhau. Theo tính toán, có khoảng 20% các bệnh nhân không thuộc 7 nhóm trên. Họ cũng có triệu chứng tương tự nhưng vẫn chưa tìm ra thiếu sót trong hệ thống cắt sửa ADN.

Nghiên cứu trên các khiếm khuyết ở thể XP, người ta đã tìm ra cơ chế NER chống lại tổn thương ADN ở người như thế nào. Đầu tiên, một protein đặc hiệu XPA (do genA trong thể XP tổng hợp nên) nhận dạng tổn thương ADN. Khi XPA liên kết với chuỗi xoắn kép ADN sẽ kéo theo một loạt các protein khác bắt đầu vào cuộc. Điều ngạc nhiên là nhân tố sao chép TFIIH cũng tham gia vào quá trình này. Khi TFIIH bám vào vị trí tổn thương, các protein cũng bám vào theo và tạo thành một phức hệ sửa chữa, có khả năng cắt một đoạn dài 28 nucleotit trong đó có chứa vùng hư hại. Có nhiều khả năng TFIIH tham gia vào quá trình duỗi xoắn phần ADN bị tổn thương, còn XPF và XPG làm nhiệm vụ cắt bỏ đoạn nucleotit đó (hình 3.3).

#### 3.2.9.4 Đọc lỗi và sửa chữa bắt cặp sai

Như đã được đề cập trên nhiều tài liệu, polymeraza III có chức năng đọc sửa. Trong suốt quá trình polymer hóa khi một nucleotit được đưa vào phần nhâm lẫn thì hệ thống enzym này sẽ sửa lỗi bằng cách cắt bỏ nucleotit đó và thay thế nó bằng một nucleotit thích hợp. Ở vi khuẩn, nếu tỷ lệ bắt cặp sai ban đầu là  $1/10^5$  cặp nucleotit thì sau khi qua hệ thống đọc sửa, tỷ lệ bắt cặp sai chỉ còn là  $1/10^7$ .

Cơ chế đọc sửa đối với các bazơ bắt cặp sai được thực hiện trong sao chép ADN. Trước khi thực hiện phản ứng polymer nối các nucleotit, nucleotit triphosphate mới phải bắt cặp bổ sung với bazơ tương ứng trên mạch khuôn. Nếu sự bắt cặp là sai, ADN polymerase III sẽ loại bỏ bắt cặp sai này. Thậm chí, trước khi nucleotit mới gắn vào, enzym dò lại cặp bazơ cuối cùng, nếu chúng không bắt cặp đúng thì sự polymer hóa dừng lại. Cặp nucleotit ở cuối đầu 3' bắt cặp sai sẽ bị loại bỏ nhờ hoạt tính *exonucleaza* 3' đến 5' của ADN polymeraza. Khi sự bắt cặp trên cấu trúc mạch kép đã được sửa đúng, quá trình polymer hóa nucleotit mới tiếp tục.

Ở vi khuẩn, trong đó có *E.coli*, quá trình này còn liên quan tới hoạt động methyl hóa ADN. Ví dụ, một enzym có trong vi khuẩn là adenin methylaza có khả năng nhận biết trình tự

5' ... GATC.... 3'.

3' ... CTAG.... 5'

như một cơ chất, sau đó nó gắn nhóm methyl vào mỗi gốc A. Đây là hoạt động mang tính ổn định trong suốt chu trình tế bào.

Sau mỗi một vòng sao chép ADN, mạch mới được tổng hợp tạm thời chưa được methyl hóa. Đây chính là điểm chốt để enzym có thể nhận biết mạch cần sửa sai. Một loại protein endonucleaza sẽ rạch một khe hở ở đầu 5' hoặc 3' tại chỗ bắt cặp sai trên mạch mới. Đoạn mạch này sẽ duỗi ra và sửa lỗi bắt cặp sai. Các protein tham gia trong phản ứng trên thay đổi tùy theo khe hở được tạo ra trên mạch có nucleotit bắt cặp sai đó.



### 3.2.9.5 Cơ chế sao chép vượt và hệ thống SOS

Khi ADN polymeraza gặp thymine dimer hay một số sai lệch khác trên mạch ADN khuôn, có hai khả năng xảy ra: một là, polymeraza lấp dần lỗ hổng bằng sao chép không theo khuôn. Hai là, polymeraza dừng lại và huy động rất nhiều nucleotit phía dưới lỗ trống gián đoạn được lấp đầy với mạch bổ sung từ mạch kép chị em do tái tổ hợp tương đồng (Homologous recombination repair). Trong cả hai trường hợp, chỗ sai lệch vẫn còn và sẽ được cắt bỏ sau đó.

Các cơ chế sửa sai có nhiều phản ứng khác nhau với môi trường và được điều hòa do các gen của ít nhất bốn operon, trong đó có hệ thống SOS. Hệ thống này hoạt động khi tế bào bị tác động mạnh bởi các tác nhân gây đột biến tạo nhiều sai hỏng trên ADN. Trong trường hợp ADN bị ngừng sao chép, phản ứng SOS hồi phục sao chép và sửa sai theo kiểu úp sập. Ở *E.coli* đã quan sát thấy sự phá huỷ ADN làm mở ra khoảng 20 gen của hệ thống SOS, được kiểm soát âm bởi chất kim hãm *lexA*. Chất này gắn vào hộp SOS chống lấp các promotor của các gen SOS.

Trong trường hợp cấp bách có nhiều sai hỏng cần cấp cứu, *lexA* bị kích thích, thay đổi cấu hình tự cắt và mất hoạt tính kim hãm. Lúc đó các gen SOS được mở ra. Nếu sửa sai không kịp tế bào phải chấp nhận hoặc bị đột biến hoặc chết.

### 3.2.9.6 Cơ chế sửa chữa ADN kép bị đứt gãy ở động vật có vú

Các cơ chế sửa sai ADN ở trên đều được thực hiện trên một mạch ADN, vậy khi cả hai mạch của ADN đều bị hư hại thì cơ chế nào đảm nhận nhiệm vụ sửa chữa này? Đó là cơ chế sửa chữa ADN kép (DSB).

Cũng giống như cơ chế sửa chữa nhờ sao chép vượt, cách thức sửa sai nhờ tái tổ hợp tương đồng cũng có tác dụng sửa các hư hỏng. Phân tử ADN hư hại được tái tổ hợp và thay thế bằng một phân tử ADN tương đồng nhưng không có tổn thương. Cần phải có quá trình này vì cả hai mạch của ADN đều bị hỏng nên không mạch nào có thể được dùng làm mạch đối bổ sung suốt trong quá trình sửa chữa. Các vùng tương đồng không bị hư hại cuối cùng sẽ được tái tổ hợp sang cho phân tử ADN đang cần sửa. Thường thì quá trình này xảy ra ở cuối pha S/G2 và có sự tham gia của ít nhất năm protein được gọi là phức hợp RAD52.

Để sửa lỗi sai này còn có một cơ chế khác là sửa chữa nhờ tái tổ hợp không tương đồng. Cơ chế này cũng tương tự cơ chế trên nhưng khác là không có sự tham gia của vùng ADN tương đồng và chỉ có hai phức hệ protein làm nhiệm vụ xúc tác.

## 3.3 Đột biến thể nhiễm sắc (chromosome aberration)

Bằng kỹ thuật phân tích kiểu nhân (caryotype) ở nguyên phân (mitosis) và giảm phân (meiosis) của nhiều cơ thể thường và cơ thể đột biến các nhà di truyền học tế bào đã phát hiện ra các đột biến thể nhiễm sắc. Các đột biến đó có thể là các sai lệch về số lượng thể nhiễm sắc trong bộ hoặc là các sai lệch về cấu trúc của từng thể nhiễm sắc trong bộ.

### 3.3.1 Đột biến về số lượng thể nhiễm sắc

Mỗi một loài có số lượng thể nhiễm sắc ổn định trong bộ thể nhiễm sắc (ploidy) của mình. Tế bào chứa bộ thể nhiễm sắc với số lượng ổn định của loài được gọi là chuẩn bội (euploid). Ví dụ, ở Người bộ chuẩn bội của bộ đơn bội (haploid)  $n = 23$  và chuẩn bội của bộ lưỡng bội (diploid)  $2n = 46$ . Số lượng thể nhiễm sắc trong bộ có thể bị biến đổi sai lệch so với

bộ chuẩn bội. Khi số lượng thể nhiễm sắc trong bộ tăng lên theo bội số của  $n$  - người ta gọi là bộ đa bội (polyploid) (ví dụ  $3n$ ,  $4n$ ), còn khi số lượng thể nhiễm sắc thay đổi nhiều hơn hay ít hơn một vài thể nhiễm sắc - người ta gọi là bộ lệch bội (aneuploid).

### 3.3.1.1 Đa bội (Polyploid)

Hiện tượng đa bội là hiện tượng khi số lượng thể nhiễm sắc trong bộ tăng lên theo bội số của  $n$  ( $3n$ ,  $4n$  v.v.) là hiện tượng thường xuyên quan sát thấy ở thực vật và hiếm thấy ở động vật. Khoảng có  $1/2$  số loài thực vật hiện biết được là các loài đa bội. Đối với cây thảo thì có đến  $2/3$  loài là đa bội. Đa số các loài thực vật đa bội đều có thể sinh sản bằng sinh dưỡng (sinh sản vô tính). Đối với động vật là các cơ thể có phương thức sinh sản hữu tính là chủ yếu cho nên hiện tượng đa bội là hiếm, chắc chắn là có liên quan đến cơ chế sinh sản hữu tính, tức liên quan đến giảm phân và thụ tinh vì các bộ đa bội qua giảm phân đều cho ra các giao tử mất cân bằng về bộ thể nhiễm sắc nên sẽ tạo ra các hợp tử kém sức sống hoặc chết.

Thường các cơ thể đa bội có tế bào lớn hơn, chứa các chất hữu cơ nhiều hơn, do đó các cây đa bội có cơ thể, cơ quan kể cả cơ quan như hạt, quả, củ to hơn và chứa nhiều chất hữu cơ hơn, vì vậy các dạng đa bội được các nhà chọn giống trong trồng trọt quan tâm đặc biệt.

Các cây lương thực quý như: lúa mì, khoai tây; cây thực phẩm như: cà chua, chuối, dâu tây; cây công nghiệp như: cà phê, bông, dâu tằm; các cây cảnh như: hồng, cúc, tulip, v.v. đều là các cây đa bội.

Người ta thường phân biệt hai dạng đa bội là đa bội cùng nguồn hay là tự đa bội (autopolyploid) và đa bội khác nguồn hay là dị đa bội (allopolyploid). Dạng tự đa bội là do hiện tượng nội phân (endomitosis) tạo nên, tức là trường hợp tế bào đã trải qua giai đoạn S - hàm lượng ADN đã được nhân đôi và số lượng thể nhiễm sắc đã gấp đôi nhưng không xảy ra hiện tượng phân bào dẫn tới sự tăng bội số thể nhiễm sắc trong bộ và vì chúng có cùng nguồn gốc nên được gọi là đa bội cùng nguồn và còn được gọi là đa bội mitosis. Ví dụ, một cơ thể có kiểu gen  $2n = 4$  (AABB), trải qua giai đoạn S, số lượng thể nhiễm sắc tăng gấp đôi nhưng chúng không phân ly, chúng ở lại trong nhân và tạo nên dạng đa bội  $4n = 8$  (AAAABBBB).

Các mô khác nhau trong cơ thể đa bào có thể tự đa bội hóa với mục đích phục vụ cho chức năng nào đó của cơ thể đa bào, ví dụ mô rễ đa bội dự trữ nhiều chất dinh dưỡng. Nhờ phương pháp sinh sản sinh dưỡng, từ các mô hoặc từ cơ quan đa bội có thể cho ra các cây đa bội.

Dạng dị đa bội có nguồn gốc lai từ hai loài khác nhau tức là phải thông qua sinh sản hữu tính (thông qua giảm phân và thụ tinh) nên được gọi là đa bội khác nguồn hoặc đa bội meiosis. Ví dụ, một loài có kiểu gen  $2n = 2$  (AA) và một loài khác có kiểu gen  $2n = 2$  (BB), qua giảm phân do phân ly không cân bằng nên có thể cho ra các loại giao tử khác nhau và khi tạo hợp tử sẽ hình thành các cơ thể dị đa bội  $4n = 4$  (AABB) hoặc  $3n = 3$  (AAB) (hoặc ABB). Các cơ thể dị đa bội có thể sinh sản sinh dưỡng cho ra các cơ thể thế hệ sau đều là dị đa bội và trường hợp này được gọi là song lưỡng bội (amphidiploid).

Mặc dù các dạng đa bội có nhiều đặc tính về năng suất cao nhưng chúng thường bất thụ khi sinh sản hữu tính, bởi vì qua giảm phân thường tạo nên các giao tử không cân bằng về bộ thể nhiễm sắc (giao tử mang bộ thể nhiễm sắc lệch bội), nếu các giao tử này được thụ tinh sẽ tạo nên các hợp tử chết. Ví dụ, một loài tam bội  $3n$  khi giảm phân lần I có thể tạo nên các tiếp hợp ở dạng lưỡng trị (bivalent), nhưng cũng có thể là tam trị (trivalent) hoặc đơn trị (univalent) và qua giảm phân II sẽ tạo nên các giao tử không cân bằng từ  $0 - 3n$ . Hợp tử do các giao tử không cân bằng tạo ra sẽ không có sức sống và thường chết. Vì vậy, trong chọn

giống người ta phổ biến và nhân giống cây đa bội bằng phương pháp sinh dưỡng (trồng bằng chiết cành, ghép cành, đâm củ v.v.) hoặc bằng công nghệ nhân bản vô tính.

Tuy vậy, cũng có nhiều dạng đa bội có khả năng sinh sản hữu tính, đó là những dạng đa bội qua giảm phân hình thành các giao tử cân bằng hoặc các cơ thể lai đa bội không cân bằng, tuy bất thụ nhưng qua sự nhân đôi thể nhiễm sắc chúng trở thành đa bội cân bằng và sẽ hữu thụ. Ví dụ, nếu ta đem lai hai loài lưỡng bội  $2n$  gần gũi là AA và BB ta sẽ được con lai  $2n$  (AB) bất thụ, vì khi giảm phân A không thể bắt cặp tiếp hợp với B. Khi bộ thể nhiễm sắc  $2n$  của con lai nhân đôi sẽ cho ra dạng tứ bội  $4n$  (AABB), vì vậy qua giảm phân các thể nhiễm sắc tương đồng là AA và BB sẽ bắt cặp tiếp hợp và sẽ cho ra các giao tử cân bằng (AB), từ đó sẽ tạo nên hợp tử  $4n$  (AABB) hữu thụ. Một trong nhiều ví dụ điển hình là loài lúa mì lục bội  $6n = 42$  hiện nay (*Triticum aestivum*) được hình thành bằng con đường như vậy.

Khi lai 2 loài lúa mì lưỡng bội  $2n = 14$  là AA với loài  $2n = 14$  là BB sẽ cho ra lúa mì lưỡng bội  $2n = 14$  là AB sẽ bất thụ, nhưng cơ thể lai AB sẽ nhân đôi thể nhiễm sắc để tạo dạng tứ bội  $4n = 28$  là AABB. Khi dạng tứ bội này lai với dạng lưỡng bội  $2n = 14$  là DD sẽ tạo ra dạng tam bội  $3n = 21$  là ADB sẽ bất thụ, nhưng khi chúng nhân đôi thể nhiễm sắc tạo ra dạng lúa mì lục bội  $6n = 42$  là AABBDD sẽ hữu thụ.

Hiểu rõ cơ chế hình thành các dạng đa bội cùng đặc tính của chúng các nhà di truyền và chọn giống đã thành công trong việc lai tạo các giống đa bội thực nghiệm có ý nghĩa kinh tế cao. Ngay từ năm 1920, nhà nghiên cứu di truyền tế bào người Nga là Karpechenko đã chỉ ra rằng bằng phương pháp lai thực nghiệm nhiều loài khác nhau có thể tạo ra các loài đa bội hữu thụ. Ví dụ, ông đã tạo ra giống cải mới hoàn toàn tứ bội  $4n = 36$  được đặt tên là *Raphano brassica*, do lai giữa 2 loài lưỡng bội  $2n = 18$  là loài cải củ *Raphanus sativus* với loài cải *Brassica oleracea*.

Các nhà thực nghiệm đã kết hợp phương pháp lai với phương pháp tự tạo đa bội bằng sử dụng hóa chất gây đột biến ví dụ dùng chất colchicine là chất alkaloid chiết xuất từ cây *Colchicum autumnale*. Chất colchicine có tác dụng ức chế sự tạo thành thoi phân bào do đó nó ức chế phân bào cho nên tạo ra tế bào và cơ thể tự đa bội và bằng phương pháp sinh sản sinh dưỡng người ta có thể nhân giống nhanh các cây đa bội. Ví dụ, năm 1940 J.O.Beasley đã thành công tạo ra loại bông *Gossypium* sp. tứ bội  $4n = 52$  có năng suất cao. Đem lai bông châu Âu  $2n = 26$  với bông châu Mỹ  $2n = 26$ , ông thu được bông lai  $2n = 26$  bất thụ. Đem xử lý bông lai với cochincine ông thu được bông tứ bội  $4n = 52$  hữu thụ.

Bằng phương pháp lai và gây đột biến thực nghiệm các nhà chọn giống đã tạo được nhiều giống cây trồng đa bội có năng suất cao đáp ứng nhu cầu lợi ích của nông nghiệp.

Tần số và tính phổ biến của hiện tượng đa bội trong tự nhiên ở thực vật đã nói lên tầm quan trọng của hiện tượng đa bội trong tiến hóa của thực vật. Các loài Mộc tặc và Thông đất có độ đa bội rất cao. Trong thực vật hạt trần độ đa bội ít hơn nhưng ở Dương xỉ và thực vật hạt kín thì lại rất phổ biến. Đối với cây hạt kín độ đa bội có thể có đến 30 – 35%, ở một số cây hòa thảo có thể có tới 75% cây là đa bội. Rõ ràng là các dạng đa bội thường có sức sống cao và dễ dàng thích nghi với điều kiện sinh thái thay đổi tạo ưu thế cho sự phổ biến của chúng ra các vùng sinh thái khác nhau.

Đối với động vật ít khi quan sát thấy cơ thể đa bội, mà chỉ quan sát thấy đa bội trong các mô hoặc tế bào. Các tế bào và mô đa bội đều do hiện tượng nội phân (endomitosis) tạo nên. Ví dụ, trong gan và thận người quan sát thấy các tế bào tứ bội. Trong nhiều trường hợp hiện tượng đa bội là biểu hiện bệnh lý, ví dụ các tế bào ung thư thường là tế bào đa bội.

Một dạng đa bội hóa đặc biệt được gọi là dạng đa sợi hóa (politenisation) sẽ dẫn tới tạo thành các thể nhiễm sắc đặc biệt là thể nhiễm sắc đa sợi (politene chromosome) hay còn gọi là thể nhiễm sắc khổng lồ (gigant chromosome). Được gọi như thế bởi vì thể nhiễm sắc được cấu tạo gồm rất nhiều sợi nhiễm sắc (có thể tới hàng nghìn sợi) xếp song song sát nhau và có kích thước rất lớn và rất dài so với kích thước của thể nhiễm sắc bình thường. Thể nhiễm sắc đa sợi lần đầu tiên được phát hiện vào cuối thế kỉ XIX bởi nhà tế bào học Italia E.G.Balbani vào năm 1881 ở muỗi lác (*Chironomus*), nhưng mãi đến những năm 30 của thế kỉ XX nhờ công trình nghiên cứu của T. Painter, C.B. Bridges trên đối tượng ruồi quả (*Drosophila melanogaster*) thì cấu trúc và chức năng của thể nhiễm sắc đa sợi mới được làm sáng tỏ. Thể nhiễm sắc đa sợi thường được quan sát thấy trong các tế bào tuyến nước bọt của ấu trùng của sâu bọ 2 cánh. Ở *Drosophila melanogaster* vào giai đoạn ấu trùng muộn (giai đoạn tuổi III) thì các thể nhiễm sắc trong nhân tế bào tuyến nước bọt có kích thước dài gấp 100 lần (đạt  $1000\mu\text{m}$ ) so với thể nhiễm sắc ở trung kỳ bình thường (có độ dài khoảng  $7,5\mu\text{m}$ ). Ở muỗi lác *Chironomus* thể nhiễm sắc đa sợi trong tuyến nước bọt có đường kính  $20\mu\text{m}$  và chiều dài  $270\mu\text{m}$ . Một đặc điểm nữa của cấu trúc thể nhiễm sắc đa sợi không chỉ thể hiện ở kích thước khổng lồ của chúng mà còn thể hiện ở sự tiếp hợp soma (tức là tiếp hợp không qua giảm phân). Đối với ruồi quả bộ thể nhiễm sắc  $2n = 8$  gồm 3 cặp tương đồng autosome và 1 cặp giới tính, ở con cái là XX và ở con đực là XY. Nhưng do hiện tượng tiếp hợp soma cho nên trên tiêu bản thể nhiễm sắc đa sợi có cấu tạo rất đặc biệt gồm 1 dải ngắn và 5 dải tỏa ra từ một thể cố định được gọi là tâm nhiễm sắc (chromocenter) chính là vùng tâm động của các thể nhiễm sắc dính với nhau (xem hình 1.5). Người ta có thể phân biệt các dải này bằng cách sau: dải ngắn nhất là thể nhiễm sắc thường số 4 là thể nhiễm sắc bé nhất, một dải có chiều dài lớn hơn là thể nhiễm sắc X (đây là bộ thể nhiễm sắc của Ruồi cái và 2 thể nhiễm sắc X tiếp hợp với nhau nên trông thành một), còn lại 4 dải dài nhất là 4 vé của các thể nhiễm sắc thường số 2 và số 3. Nếu ta quan sát tiêu bản bộ thể nhiễm sắc của Ruồi đực ta sẽ thấy một thể nhiễm sắc X còn thể nhiễm sắc Y rất khó phát hiện vì chúng thường bắt màu kém và lẫn vào vùng tâm nhiễm sắc. Cần chú ý là trên hình vẽ vé (vai) phải của thể nhiễm sắc số 2 có chỗ tạo nên hình vòng là vùng mà 2 thể nhiễm sắc tương đồng không tiếp hợp tách rời nhau. Người ta đã theo dõi được sự hình thành các thể nhiễm sắc đa sợi từ các tiền thân soma của chúng. Qua giai đoạn S của gian kỳ ADN được tái bản, các sợi nhiễm sắc trong thể nhiễm sắc đều được nhân đôi và trong trường hợp bình thường ở các mô của cơ thể dẫn tới mỗi thể nhiễm sắc đều được nhân đôi nghĩa là mỗi thể nhiễm sắc đều gồm 2 nhiễm sắc tử chị em (khi đó  $2n = 8 \times 2$ ) và đến hậu kỳ và mạt kỳ phân bào các nhiễm sắc tử chị em sẽ phân ly về 2 tế bào con do đó mỗi tế bào con lại có bộ thể nhiễm sắc  $2n = 8$  đặc trưng cho ruồi quả. Nhưng trong các tế bào tuyến nước bọt của ấu trùng ruồi, do một cơ chế nào đó ADN được tái bản rất nhiều lần và tích lại trong thể nhiễm sắc dẫn tới tăng cao số lượng sợi nhiễm sắc trong từng thể nhiễm sắc (tạo nên thể nhiễm sắc đa sợi) trong lúc đó số lượng thể nhiễm sắc của bộ vẫn giữ nguyên ( $2n = 8$ ) (ví dụ, ở ruồi quả số lượng sợi nhiễm sắc trong mỗi thể nhiễm sắc đạt tới 1.024 sợi).

Một đặc điểm nữa trong cấu trúc của thể nhiễm sắc đa sợi là cấu trúc đĩa băng. Trên tiêu bản ta có thể quan sát thấy rõ là mỗi vé của thể nhiễm sắc đều có xen kẽ các đĩa nhuộm màu sẫm được gọi là đĩa Balbiani (do nhà khoa học Balbiani phát hiện). Ví dụ, thể nhiễm sắc X có đến 1.000 đĩa và người ta đã tính được tất cả các thể nhiễm sắc có đến 5.000 – 6.000 đĩa. Trước đây người ta cho rằng các đĩa là tương ứng với số gen có trong bộ thể nhiễm sắc của ruồi quả, nhưng khi nghiên cứu kĩ cấu trúc siêu vi và phân tử cũng như chức năng của thể nhiễm sắc đa sợi thì các đĩa chỉ là thể hiện trạng thái hoạt động khác nhau của tập hợp của các họ gen trong hệ gen (hiện nay người ta đã tính được số gen của ruồi quả là khoảng 13.000 gen). Điều lý thú là thể nhiễm sắc đa sợi thay đổi về độ lớn và cấu trúc đĩa qua sự phát triển của ấu trùng qua các giai đoạn. Khi ấu trùng chuyển từ giai đoạn II sang giai đoạn III các thể

nhuộm sắc đa sợi không chỉ to ra dài ra đạt kích thước tối đa mà cấu trúc của các đĩa cũng bị biến đổi. Các đĩa được nở rộng phình ra, người ta nói là chúng được “búp” hóa (tạo nên các búp hoa- puff). Nơi các đĩa được búp hóa là nơi ở đó các sợi nhuộm sắc được mở xoắn và các gen đang hoạt động nghĩa là đang xảy ra sự phiên mã (tổng hợp ARN) và dịch mã (tổng hợp protein). Nhiều nghiên cứu thực nghiệm đã chứng minh rằng hormon ecdison có tác dụng làm búp hóa các nhiễm sắc đa sợi (có tác dụng hoạt hóa các gen) phục vụ cho quá trình biến thái từ giai đoạn ấu trùng sang giai đoạn nhộng của sâu bọ 2 cánh.

Thể nhuộm sắc đa sợi không chỉ được quan sát thấy ở trong mô tuyến nước bọt của bọ 2 cánh mà còn được quan sát thấy trong nhiều loại mô khác nhau ở nhiều động vật và thực vật khác nhau. Ví dụ, từ các mô ruột giữa, trực tràng, ống Malpigi, mô dinh dưỡng của buồng trứng v.v..

### 3.3.1.2 Lệch bội (Aneuploid)

Hiện tượng lệch bội xảy ra khi có sự thay đổi số lượng thể nhiễm sắc ở một cặp nào đó dẫn đến thay đổi làm tăng thêm hoặc bớt đi một số thể nhiễm sắc trong bộ. Ví dụ, bộ chân bội  $2n$  khi có một cặp nào đó không phải là 2 mà là 3 ta sẽ có lệch bội thể ba  $2n + 1$  (trisomi), và khi có 1 cặp nào đó không phải là 2 mà chỉ là 1 ta sẽ có lệch bội thể một  $2n - 1$  (monosomi). Trường hợp khi một thể nhiễm sắc bị mất hẳn 1 vế (vai) vẫn được xem là lệch bội.

Trường hợp lệch bội được phát hiện đầu tiên là ở cà độc dược (*Datura stramonium*). Loài cà lưỡng bội  $2n = 24$  có 12 cặp thể nhiễm sắc. Người ta quan sát thấy có đến 12 dòng đột biến khác nhau. Khi nghiên cứu bộ thể nhiễm sắc của 12 dòng đột biến thì chúng đều có liên quan đến thể ba ( $2n + 1$ ) của một trong 12 cặp thể nhiễm sắc (tức  $24 + 1 = 25$ ).

Lệch bội được phát sinh do nhiều cơ chế như sự phân ly không cân bằng của các thành viên trong cặp tương đồng về giao tử qua giảm phân (ví dụ một giao tử có cả 2 thể nhiễm sắc còn giao tử kia không có, nếu giao tử mang 2 thể nhiễm sắc được thụ tinh với giao tử bình thường mang 1 thể nhiễm sắc sẽ tạo nên hợp tử mang 3 thể nhiễm sắc tức là thể ba, nếu giao tử bình thường mang 1 thể nhiễm sắc thụ tinh với giao tử không mang thể nhiễm sắc sẽ tạo nên thể một). Lệch bội cũng có thể được hình thành qua nguyên phân do sự trục trặc nào đó trong cơ chế phân ly thể nhiễm sắc, ví dụ sự đảo thái của nhiễm sắc tử khi phân ly và như vậy nhiễm sắc tử đó không được chuyển về hai cực.

Sự phân ly không cân bằng của các thành viên trong cặp tương đồng qua giảm phân dẫn tới tạo thành lệch bội được các nhà di truyền tế bào nghiên cứu kỹ thể hiện ở bảng sau đây:

Bảng thể hiện sự tổ hợp dị thường trong các hợp tử do sự phân ly không cân bằng của cặp thể nhiễm sắc giới.

*Ghi chú:* các tổ hợp OO, YO và YY chắc chắn là không có khả năng sống, còn các tổ hợp bất thường khác đều là bệnh lý.

Như vậy, dạng lệch bội  $2n + 1$  được gọi là thể ba (trisomi) tức là trường hợp có một cặp thể nhiễm sắc trong bộ bị tăng lên 3, được xem là ưu bội (hyperploidy). Trường hợp  $2n-1$  tức là trong bộ có 1 cặp chỉ còn 1 thể nhiễm sắc được gọi là thể một (monosomi) và được xem là nhược bội (hypoploidy).

+	Tình trạng	+	Giảm phân	+	Khung phôi li	+	Khung phôi ly
---	------------	---	-----------	---	---------------	---	---------------

+ Trùng	+ Bõnh thòng	+ Trong giôm phõn I	trong giôm phõn II
+	+ X Y	+ XY O	+ XX YY O
+ Giôm phõn bõnh thòng X	+ XX XY	+ XXY XO	+ XXX XYY XO
+ Khụng phõn ly trong giôm phõn I hoặc II	+ XXX XXY	+ XXXY XX	+ XXXX XXYY XX
+ O	+ XO YO	+ XY OO	+ XX YY OO

+ Hiện tượng thể ba. Hiện tượng thể ba đã được nghiên cứu kỹ ở cà độc dược, ngô, cà chua thuốc lá và ruồi quả. Các cơ thể mang thể ba có kiểu hình rất đặc thù. Đối với ruồi quả thường xảy ra thể ba ở thể nhiễm sắc bé số 4, chúng vẫn có sức sống. Sự phân ly của các tính trạng trong thế hệ con của những ruồi này là có cơ sở ở sự phân ly các thể thể nhiễm sắc khi không có sự đảo thải các giao tử không cân bằng. Cho nên nếu có con ruồi cái với 3 thể nhiễm sắc số 4 mang những gen ++ ey (eyless- không mắt) được tạp giao với ruồi đực ey ey thì tỷ ở thế hệ con sẽ là 5+ : 1ey. Tỷ số này là kết quả của phân ly của thể nhiễm sắc số 4 có 3 chiếc với sự tạo thành bốn kiểu giao tử theo tỷ lệ 2+ : 2+ey : 1++ : 1ey. Đối với thực vật, các hạt phấn mang bộ thể nhiễm sắc không cân bằng hoặc hoàn toàn không tham gia vào quá trình thụ phấn vì không mọc ống phấn, hoặc trong trường hợp ống phấn mọc được nhưng cũng mọc chậm nên không thể cạnh tranh với các ống phấn mọc bình thường. Đối với cây ngô, chỉ có khoảng 1 – 2% hạt phấn mang thể thể nhiễm sắc ba cho ra thế hệ con nhưng đối với tế bào trứng thì số lượng này đạt tới 25 – 50%. Những thể nhiễm sắc dư thừa có thể bị mất đi do chúng không tham gia vào trao đổi chéo hoặc do sự phân ly chậm trễ ở hậu kỳ nên không có mặt trong nhân tế bào con. Sự mất đi thể nhiễm sắc dư như vậy dẫn đến làm tăng tần số các giao tử đơn bội bình thường. Sự nghiên cứu các thể ba ở cây cà độc dược có ý nghĩa đặc biệt. Cà độc dược *Datura* có  $2n = 12$  và như trên đã nói có thể có đến 12 dạng thể ba. Người ta đã phát hiện ra là mỗi dạng thể ba có kiểu hình đặc trưng cho phép phân biệt giữa chúng dễ dàng.

Các nhà nghiên cứu di truyền tế bào Người đã phát hiện nhiều trường hợp lệch bội và có liên quan đến nhiều hội chứng bệnh. Ví dụ, năm 1866 Langdon Down đã quan sát thấy hội chứng ngu đần hay được gọi là hội chứng Down mà ở người mắc phải. Hội chứng Down được quan sát thấy với tần số 1/700 trẻ sơ sinh và là hội chứng do sai lệch thể nhiễm sắc bất gặp cao nhất. Hội chứng lâm sàng thể hiện ở chỗ: cơ thể thấp bé, đầu bé, cằm dẹt, lỗ mũi rộng, lưỡi dày có xu thế thò ra ngoài, vành tai biến dạng, ngón tay ngắn biến dạng, đường vân tay thay đổi rõ rệt, nhược cơ, tăng động khớp và chậm phát triển trí tuệ. Năm 1959 Lejeune đã lần đầu tiên mô tả cơ sở thể nhiễm sắc của hội chứng Down có bộ thể nhiễm sắc lệch bội thể ba ở thể nhiễm sắc 21. Như vậy,  $2n$  của họ là  $2n + 1 = 47$  trong đó cặp 21 có đến ba chiếc thay vì hai chiếc như bình thường. Một trong những nguyên nhân là tuổi mẹ đã quá cao (từ 35 đến 44 tuổi) gây ảnh hưởng đến sự không phân ly của cặp thể nhiễm sắc 21 về giao tử, vì vậy có giao tử chứa 2 thể nhiễm sắc và khi chúng thụ tinh với giao tử bình thường chứa 1 thể nhiễm sắc sẽ tạo thành hợp tử chứa thể ba về thể nhiễm sắc 21.

Hiện tượng thể ba ở Người còn quan sát thấy ở các cặp thể nhiễm sắc khác trong bộ. Ví dụ, thể ba 18 (hội chứng Edwards), thể ba 13 (hội chứng Patau) v.v..

Thể ba không chỉ gặp ở các cặp thể nhiễm sắc thường mà còn gặp ở thể nhiễm sắc giới tính. Ví dụ, hội chứng Klinefelter gặp ở nam giới (được mô tả bởi H.F.Klinefelter, năm 1942) có kiểu gen  $2n + 1 = 47$ , trong đó cặp thể nhiễm sắc giới có 3 chiếc là XXY (được Jacob và Strong chứng minh năm 1959). Trong trường hợp hội chứng siêu nam thì kiểu gen là XYY. Người ta cũng quan sát thấy hội chứng thể ba đối với nữ giới có kiểu gen là XXX. Các chàng trai XYY và các cô gái XXX đa số sinh con bình thường.

+ *Hiện tượng thể một.* Các cơ thể mang thể một là do có sự mất đi một trong một số các thể nhiễm sắc trong bộ lưỡng bội, do đó thể một thường gây hại nhiều hơn so với thể ba. Thường thì trường hợp thể một cũng hiếm quan sát thấy và nếu có chúng thường không có sức sống.

Các hội chứng thuộc thể một ( $2n-1$ ) cũng quan sát thấy ở Người. Ví dụ, hội chứng Turner (do H. Turner mô tả vào năm 1938) quan sát thấy ở nữ giới. Năm 1959, Ford đã xác định các cô gái bị hội chứng Turner có kiểu gen  $2n-1=45$  trong đó thể đơn thuộc thể nhiễm sắc X (kiểu gen X0). Người bệnh thường thấp bé, thừa da ở gáy, mặt hình tam giác, mí sụp, mép sệ, lẹm cằm, tai thấp, tuyến sinh dục không phát triển và vô sinh. Trong nhân tế bào niêm mạc miệng không có thể Barr với kiểu gen X0, còn đối với kiểu gen thể ba XXX thì trong nhân tế bào niêm mạc miệng có đến 2 thể Barr. Như vậy, căn cứ vào test thể Barr người ta có thể xác định được các thể ba XXX, XYY và thể đơn X0. Đối với hội chứng “tiếng mèo kêu” (người bệnh phát ra tiếng giống tiếng mèo kêu và kéo theo trí tuệ chậm phát triển) thì kiểu nhân  $2n=46$  nhưng vẫn được các nhà di truyền Người liệt kê vào hội chứng thể một 5p (Monosomi 5p) vì có một thể nhiễm sắc số 5 bị mất đi 1 vế (vai) là vế p.

+ *Thể nhiễm sắc phụ.* Một kiểu lệch bội khác là sự xuất hiện thêm trong bộ thể nhiễm sắc các thể nhiễm sắc phụ. Dạng lệch bội này cũng khá phổ biến trong giới thực vật cũng như động vật. Các cơ thể mang dạng lệch bội này chịu đựng khá tốt sự có mặt của các thể nhiễm sắc phụ, chắc rằng vì chúng thường ở trạng thái dị nhiễm sắc. Nhưng khi số lượng các thể nhiễm sắc phụ khá nhiều ví dụ ở lúa (có thể đến 6) sẽ dẫn đến sự phát triển yếu ớt của cây và làm giảm sản lượng. Sự có mặt các thể nhiễm sắc phụ ở cây mã đề *Plantago coronopus* gây nên những hậu quả di truyền nghiêm trọng: tất cả những cây mang thể nhiễm sắc phụ đều có tính bất thụ đực. Nhiều trường hợp các thể nhiễm sắc phụ chỉ có trong một số mô ví dụ trong hoa mà không có trong các mô rễ, điều đó gợi ý rằng chúng có thể có một vai trò chức năng nào đó liên quan đến sinh sản.

Bảng liệt kê sau đây thể hiện các dạng lệch bội do không phân ly ở Người:

+ Kiểu nhôn	+ Cặp TNS	+ Hội chứng lâm sàng	+ Tần số gặp	+ Kiểu hình
+ 47,+21	+ 2n+1	+ Down	+ 1/700	+ Tay ngắn vòi bàn tay to ngón khóp lồng, trở khun hông, đầu to mắt trần, mí mắt lợ và lưỡi dài.
+ 47,+13	+ 2n+1	+ Patau	+ 1/20000	+ Đầu, mắt,

				teo cõ, sõt mụi, tim dõ dõng và gút lũi to.
+ 47,+18	+ 2n+1	+ Edward	+ 1/8000	+ Dõ dõng bõm sinh ñ nhiõu cõ quan, ññn, 90% chõt ñ thông thõ 6 sau khi sinh.
+ 45,X	+ 2n-1	+ Turner	+ 1/2500 lõn sinh con gỏi.	+ Con gỏi vũi cõ quan sinh dõc chõm phõt triõn, lụn, vụ sinh, da cõ nhõn nheo, dõ dõng tim mõch và nghõng nõng.
+ 47,XXY + 48,XXXY + 48,XXYY + 49,XXXX Y + 50,XXXX XY	+ 2n+1 + 2n+2 + 2n+2 + 2n+3 + 2n+4	+ Klinefelter	+ 1/500 lõn sinh con trai	+ Con trai vũi tinh hoàn bộ, vỹ phõt triõn, dõng nõ, ññu gũi nhũ và tay chõn dài. +
+ 47,XXX	+ 2n+1	+ Triplo-X	+ 1/700	+ Con gỏi vũi cõ quan sinh dõc bõnh thõõng, sinh sõn bõ hõn chõ và trở khụn giõm nhõ.

### 3.3.2 Đột biến cấu trúc thể nhiễm sắc

Mỗi một loài được đặc trưng không chỉ bởi số lượng thể nhiễm sắc trong bộ mà còn đặc trưng bởi cấu trúc của từng thể nhiễm sắc của bộ. Ví dụ loài *Drosophila melanogaster* có 4 cặp thể nhiễm sắc trong đó có một cặp thể nhiễm sắc giới tính (sex chromosomes) và ba cặp thể nhiễm sắc thường (autosomes) gồm 2 cặp thể nhiễm sắc cân tâm (metacentric chromosomes) và một cặp thể nhiễm sắc hình chấu bé, còn loài *Drosophila virilis* có sáu cặp thể nhiễm sắc trong đó có một cặp giới tính và bốn cặp thể nhiễm sắc thường mút tâm (acrocentric chromosomes) và một cặp thể nhiễm sắc thường hình chấu. Như vậy, các loài thuộc cùng một chi có thể có số lượng và cấu trúc thể nhiễm sắc khác nhau, và trong quá trình tiến hóa đã xảy ra sự sắp xếp và tổ chức lại bộ thể nhiễm sắc. Các nhà di truyền tế bào thường xác định các dạng đột biến cấu trúc thể nhiễm sắc sau đây:

#### 3.3.2.1 Mất đoạn (Deletion)



Mất đoạn là trường hợp một đoạn nào đó của thể nhiễm sắc bị đứt ra và mất đi và hậu quả là thể nhiễm sắc bị mất đi một số gen (ADN) mà đoạn đó chứa. Ví dụ, một thể nhiễm sắc có các đoạn ABCDEGH, khi bị đứt gãy ở giới hạn đoạn E và G thì sẽ gây mất đoạn GH và thể nhiễm sắc chỉ còn lại các đoạn ABCDE và đoạn bị mất là đoạn GH. Nếu đoạn mất là đoạn cuối của thể nhiễm sắc thì đoạn đó sẽ không có tâm động, ví dụ đoạn GH nên thường không phân ly được về hai cực và sẽ bị phân huỷ, còn khi thể nhiễm sắc bị đứt và mất cả hai đoạn mút thì hai đầu sẽ dính liền với nhau tạo nên thể nhiễm sắc vòng. Tùy theo đoạn mất có chứa nhiều gen quan trọng hay không sẽ gây ảnh hưởng nhiều hay ít đến sự biểu hiện tính trạng của cơ thể. Tùy theo độ dài của đoạn mất, người ta chia đoạn mất lớn, đoạn mất vừa đoạn mất bé. Đoạn mất lớn thường gây chết cho cơ thể. Đoạn mất vừa sẽ gây chết ở trường hợp đồng hợp tử và có khả năng sống ở trường hợp dị hợp tử. Đoạn mất nhỏ có thể tồn tại ở trạng thái đồng hợp và gây ảnh hưởng lên kiểu hình giống với đột biến gen nhưng sai khác ở chỗ chúng không có tính đột biến ngược chiều.

Hậu quả ảnh hưởng lên kiểu hình của mất đoạn được xác định bởi các nguyên nhân sau:

1. Mất hẳn chức năng của một số gen.
2. Thay đổi số lượng vật chất di truyền (ADN).
3. Phá huỷ sự cân bằng gen và điều chỉnh trong hệ gen.

Tế bào và cơ thể có mất đoạn lớn thường dẫn đến tới sự rối loạn trong hoạt động chức năng của tế bào và sự phát triển của phôi, do đó gây chết cho tế bào và cho cơ thể.

Người ta có thể phát hiện các mất đoạn nhờ các phương pháp nghiên cứu tế bào học qua kiểu nhân (caryotype) hoặc phương pháp di truyền học qua lai thể đột biến với kiểu dại. Đối với ruồi quả có thể phát hiện mất đoạn qua hiện tượng hình thành các vòng không tiếp hợp của thể nhiễm sắc đa sợi. Ví dụ, ở vế phải của thể nhiễm sắc số 2 ta thấy một vòng ở gần vùng tâm nhiễm sắc (hình 1.5), là biểu hiện của một đoạn thể nhiễm sắc đã bị mất đi nên không có sự bắt cặp và cơ thể ở dạng dị hợp về mất đoạn.

Đối với thực vật ở đại đa số trường hợp mất đoạn là yếu tố gây chết cho thể giao tử (gametophyte) dẫn đến tạo thành các hạt phấn rụng sớm. Trong trường hợp nếu mất đoạn thông qua thể giao tử truyền lại được cho thế hệ lưỡng bội tiếp theo, dường như chúng chỉ gây hại đến các locut của các gen mà thiếu chúng thì chức năng của hạt phấn vẫn không bị tác hại. Người ta đã chứng minh rằng ở thực vật các thể nhiễm sắc với mất đoạn được bảo tồn qua dòng cái, còn đối với dòng đực các thể nhiễm sắc mất đoạn thường bị loại trừ do sự hình thành các hạt phấn không có sức sống hoặc do những hạt phấn mang chúng sẽ không có khả năng cạnh tranh sinh trưởng với các hạt phấn bình thường.

Đối với động vật, ví dụ đối với ruồi quả *Drosophila* các cá thể đồng hợp tử về mất đoạn ở thể nhiễm sắc X còn sức sống chỉ trong trường hợp đoạn mất chỉ là một phần nhỏ của tiết mút (telomere). Sự mất các gen *yellow*, *achaete* và *scute* rõ ràng là không dẫn đến mất sức sống kể cả trong trường hợp đồng hợp tử hoặc bán hợp tử (hemizygote) vì các gen này chỉ chiếm một phần rất nhỏ và chắc rằng chúng không có vai trò quyết định về sức sống của ruồi.

Đối với cơ thể Người thì các mất đoạn gây nên nhiều dị hình bẩm sinh, ví dụ bệnh căn của bệnh bạch cầu tủy mãn tính là có liên quan đến thể nhiễm sắc được gọi là thể nhiễm sắc Philadelphia (Ph1), đó là thể nhiễm sắc thứ 21 đã bị mất một phần lớn của vế dài. Hội chứng “tiếng mèo kêu” như phần trên đã nói có liên quan đến sự mất vế ngắn của thể nhiễm sắc số 5 (cũng được liệt kê vào dạng lệch bội thể một 5p).

### 3.3.2.2 Nhân đoạn hoặc thêm đoạn (Duplication)

Nhân đoạn hoặc thêm đoạn là trường hợp một đoạn nào đó của thể nhiễm sắc được nhân lên gấp đôi hoặc nhiều lần. Đoạn được nhân lên có thể ở bất cứ vị trí nào hoặc chen vào giữa hoặc ở phần cuối thể nhiễm sắc. Các nhà di truyền tế bào cho rằng nhân đoạn có ý nghĩa quan trọng đối với tiến hóa vì lẽ rằng các kiểu gen được phức tạp hóa là do hiện tượng nhân đoạn thể nhiễm sắc. Ví dụ, thể nhiễm sắc ABCDEGH khi có thêm đoạn EG sẽ trở thành ABCDEGEGH. Hiện tượng nhân đoạn có thể xảy ra do sự nhân lên của một đoạn nào đó trong thể nhiễm sắc hoặc do hai thể nhiễm sắc tương đồng bắt cặp và trao đổi đoạn cho nhau, kết quả một thể nhiễm sắc mất đoạn và một thể nhiễm sắc tương ứng thêm đoạn. Cơ thể có nhân đoạn ít bị ảnh hưởng hơn so với mất đoạn, tuy nhiên, nếu đoạn thêm lớn sẽ gây ảnh hưởng đến sức sống của cơ thể. Hiện tượng nhân đoạn được nghiên cứu nhiều ở ruồi quả, ví dụ đột biến *Bar* (có mắt hình sọc ngang thay cho hình cầu) là dạng đột biến trội liên kết giới tính X, từ những năm 1930, C. B. Bridges đã phân tích thể nhiễm sắc X mang đột biến *Bar* và phát hiện thấy rằng đoạn 16A nơi chứa gen qui định hình dạng mắt ruồi trong thể nhiễm sắc X đã bị nhân đôi lên. Ở ruồi quả các đột biến trội thể hiện cánh nhiều lông (Hairy Wing) hoặc đột biến mắt bé (Asteroid) đều do hiện tượng nhân đoạn gây nên. Người ta đã phát hiện được đột biến nhân ba đoạn 16A và ruồi mang đột biến có mắt rất bé được gọi là đột biến *Bar* kép. Người ta dễ dàng phát hiện đột biến nhân đoạn ở ruồi quả thông qua bộ thể nhiễm sắc đa sợi. Ngày nay với kỹ thuật phân tích phân tử người ta đã dễ dàng phát hiện các đột biến nhân đoạn, mất đoạn rất bé ở hàng loạt cơ thể khác nhau. Ví dụ, sự phân tích các nhân đoạn trong họ gen mã hóa cho protein hemoglobin ở động vật có vú.

Hiện tượng nhân đoạn tương đối phổ biến và có vai trò là nguồn biến dị di truyền đáng kể của tiến hóa.

### 3.3.2.3 Đảo đoạn (Inversion)

Đảo đoạn là trường hợp một đoạn nào đó của cơ thể nhiễm sắc bị đứt và quay ngược  $180^\circ$  rồi nối lại dẫn đến thay đổi sự sắp xếp của gen trong đoạn đó. Ví dụ, thể nhiễm sắc ABCDEGH khi bị đảo đoạn ở DEG sẽ trở thành ABCGEDH. Đảo đoạn có thể xảy ra do sự di chuyển của các gen nhảy (transposons) từ thể nhiễm sắc này sang thể nhiễm sắc khác. Như vậy, để xảy ra đảo đoạn phải có hai điểm đứt, còn khi chỉ có một điểm đứt ở đoạn mút có thể xảy ra đảo đoạn nhưng rất hiếm. Người ta phân biệt hai dạng đảo đoạn:

Đảo đoạn ngoại tâm (đảo đoạn không đối xứng) là trường hợp đoạn đảo không bao gồm tâm động.

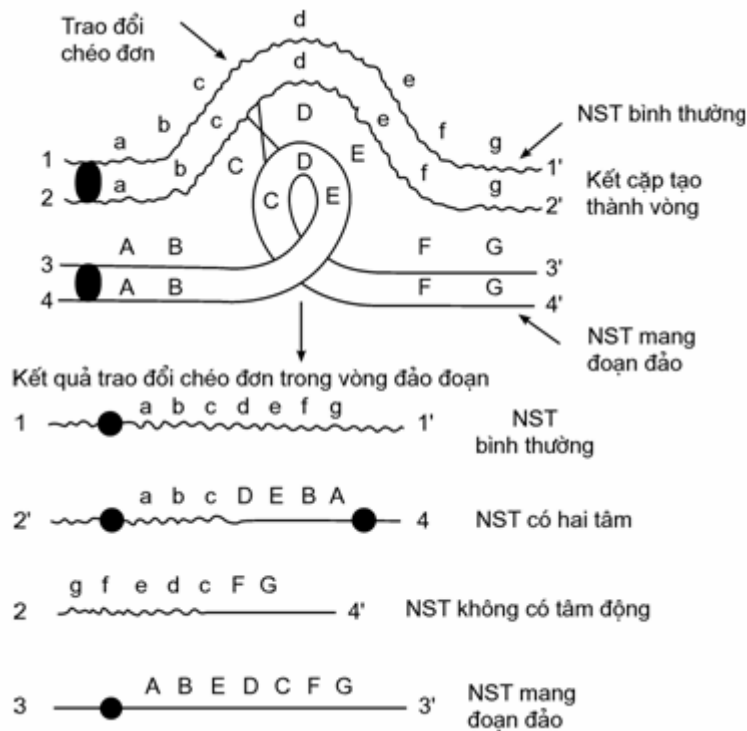
Đảo đoạn quanh tâm (đảo đoạn đối xứng) là trường hợp đoạn đảo có mang tâm động.

Đảo đoạn có thể ở trạng thái đồng hợp tử hoặc dị hợp tử. Khi ở trạng thái đồng hợp tử hoặc bán bán hợp tử thì đảo đoạn thường gây ảnh hưởng chết cho cơ thể do làm thay đổi vị trí của các gen (hiệu ứng vị trí) và đứt gãy thể nhiễm sắc sẽ dẫn tới gây chết.

Khi ở trạng thái dị hợp tử thì đảo đoạn gây nên một số thay đổi về di truyền và tế bào, do đó người ta có thể dễ dàng phát hiện ra đoạn đảo. Khi có đảo đoạn ngoại tâm sẽ không làm thay đổi vị trí hai vế, còn khi có đảo đoạn quanh tâm sẽ dẫn đến thay đổi vế của thể nhiễm sắc, có thể biến thể nhiễm sắc tâm cận mút (acrocentric chromosome) thành thể nhiễm sắc cân tâm (metacentric chromosome) và ngược lại.

Trong các quần thể thực vật (ví dụ, lúa mạch) hoặc động vật (ruồi quả) thường gặp ở các dạng đảo đoạn với tần số cao, tuy nhiên đa số đều ở trạng thái dị hợp nên không gây chết.

Trong trường hợp đảo đoạn ở trạng thái dị hợp người ta có thể phát hiện được chúng bằng phương pháp di truyền học hoặc tế bào học. Người ta có thể phát hiện được hiện tượng đảo đoạn thông qua sự tạo thành các nút vòng đặc trưng trong tiền kỳ giảm phân I, khi các thể nhiễm sắc tương đồng bắt cặp. Các nút vòng đó thể hiện sự đảo đoạn dị hợp (hình 3.4).



**Hình 3.4**

Hiện tượng đảo đoạn và trao đổi chéo diễn ra khi có đảo đoạn

Người ta cũng dễ dàng phát hiện được đảo đoạn thông qua các kiểu nhân nhuộm cắt băng hoặc thông qua các nút vòng của thể nhiễm sắc đa sợi.

Đảo đoạn có vai trò nhất định trong tiến hóa. Công trình phân tích về đảo đoạn trên các loài ruồi quả thuộc giống *Drosophila* của nhà khoa học Dowjansky, ông chứng minh rõ vai trò của đảo đoạn trong sự phân hóa của loài trong các quần thể khác nhau.

### 3.3.2.4 Chuyển đoạn (Translocation)

Chuyển đoạn là hiện tượng thay đổi trong cấu trúc thể nhiễm sắc khi một thể nhiễm sắc có đoạn bị đứt và được nối kết vào một thể nhiễm sắc khác không tương đồng. (Cần phân biệt với hiện tượng trao đổi chéo qua giảm phân là trao đổi đoạn giữa hai thành viên trong cặp tương đồng). Ví dụ, có hai thể nhiễm sắc không tương đồng là ABCDEGH và A'B'C'D'E'G'H', khi có chuyển đoạn chéo ở đoạn EG và E'G' ta sẽ có hai thể nhiễm sắc chuyển đoạn là ABCDE'G'H' và A'B'C'D'EGH'. Chuyển đoạn có thể xảy ra do sự di chuyển của các gen nhảy từ một thể nhiễm sắc này sang thể nhiễm sắc khác. Hậu quả của chuyển đoạn là làm thay đổi nhóm gen liên kết trong thể nhiễm sắc. Người ta phân biệt các dạng chuyển đoạn sau đây:

*Chuyển đoạn chéo*: là trường hợp có sự chuyển một đoạn của một thể nhiễm sắc này sang một thể nhiễm sắc khác và xảy ra trao đổi chéo các đoạn giữa hai thể nhiễm sắc không tương đồng (có khi có thể là giữa hai thể nhiễm sắc tương đồng).

*Chuyển đoạn đơn tâm và chuyển đoạn hai tâm*: là chuyển đoạn đơn tâm là khi đoạn chuyển vẫn giữ nguyên thứ tự các locut như cũ so với tâm động, còn chuyển đoạn hai tâm là khi đoạn chuyển quay  $180^\circ$  so với tâm động.

*Chuyển đoạn đối xứng và không đối xứng*: là chuyển đoạn đối xứng là trường hợp sau khi nối các đoạn chuyển sẽ tạo nên hai thể nhiễm sắc đơn tâm, còn chuyển đoạn không đối xứng là khi nối các đoạn chuyển sẽ tạo nên một thể nhiễm sắc hai tâm và một thể nhiễm sắc không có tâm động.

*Chuyển đoạn thể nhiễm sắc và chuyển đoạn nhiễm sắc tử*: là trường hợp chuyển đoạn xảy ra ở mức thể nhiễm sắc toàn vẹn khi chưa được nhân đôi, hoặc xảy ra ở mức nhiễm sắc tử (tức là thể nhiễm sắc đã được nhân đôi cho ra các nhiễm sắc tử).

*Chuyển đoạn nêm*: là khi đoạn chuyển được nối xen vào đoạn giữa thể nhiễm sắc.

*Chuyển đoạn bên*: là khi đoạn chuyển từ một thể nhiễm sắc này được nối vào bên cạnh thể nhiễm sắc khác.

*Chuyển đoạn vòng*: là khi có sự chuyển đoạn của ba thể nhiễm sắc khác nhau xảy ra theo kiểu thay thế đoạn chuyển chứ không phải trao đổi chéo.

Như vậy, hiện tượng chuyển đoạn xảy ra rất đa dạng rất khó phát hiện và phân biệt. Đối với thực vật chuyển đoạn có thể gây chết hoặc có sức sống, nhưng đối với động vật (ruồi quả) thì chuyển đoạn thường gây chết cho hợp tử hoặc ở giai đoạn phôi sớm.

Các nhà di truyền tế bào thường sử dụng các đột biến cấu trúc thể nhiễm sắc để lập bản đồ gen. Ví dụ, căn cứ vào đột biến chuyển đoạn chéo giữa thể nhiễm sắc số 14 với thể nhiễm sắc  $X$  ở Người, các nhà di truyền học đã xác lập được gen *HPRT* (gen mã hóa cho enzym hypoxantin photphoribosyl transferaza) là định vị trong vế dài của thể nhiễm sắc  $X$ . Một trong những thành tựu đáng chú ý của di truyền y học gần đây là sự phát hiện ra gen gây nên hội chứng nhược cơ Duchen (Duchene muscular dystrophy) ở Người là gen *DMD*. Hội chứng nhược cơ Duchen là bệnh thần kinh cơ rất nguy hiểm. Bệnh bắt đầu từ 6 tuổi và thường chết ở tuổi từ 12 – 20. Các nhà di truyền tế bào học đã phát hiện bệnh là do đột biến chuyển đoạn của thể nhiễm sắc  $X$  sang thể nhiễm sắc số 5 và khi nghiên cứu so sánh thể nhiễm sắc  $X$  bình thường bất hoạt với thể nhiễm sắc  $X$  bị chuyển đoạn trở thành hoạt động, họ đã xác định được vị trí định khu của gen *DMD* ở vùng p21 của thể nhiễm sắc  $X$ .

### 3.4 Phương pháp phát hiện đột biến

#### 3.4.1 Sử dụng các kỹ thuật di truyền, nuôi cấy tế bào và phân tích phả hệ trong phát hiện các đột biến

Để nghiên cứu quá trình đột biến trước hết các nhà di truyền phải phát hiện các đột biến đó. Việc phát hiện các đột biến một cách dễ dàng và hiệu quả là một trong các tiêu chuẩn chủ yếu để chọn lựa sinh vật nghiên cứu. Dưới đây là một số mô hình minh họa các cách phát hiện đột biến.

##### 3.4.1.1 Phát hiện đột biến ở nấm và vi khuẩn

Các đột biến lặn ở các sinh vật đơn bội có thể phát hiện một cách dễ dàng hơn so với các sinh vật lưỡng bội. Ở vi khuẩn và nấm, đột biến được phát hiện dựa trên các hệ thống phân tách các tế bào đột biến ra khỏi các tế bào không bị đột biến. Ví dụ, nấm mốc *Neurospora crassa* bình thường phát triển được trên bánh mì và có thể nuôi cấy được trong phòng thí nghiệm. Loại nấm mốc nhân chuẩn này tồn tại ở dạng lưỡng bội trong pha dinh dưỡng của chu kỳ sống. *Neurospora* có một dạng đột biến dinh dưỡng gọi là albino. Bình thường, chủng hoang dại *Neurospora* phát triển trên môi trường nuôi cấy tối thiểu có chứa glucozo, một vài axit vô cơ và muối, có nguồn nitơ là ammonium nitrat và vitamin biotin. Thể đột biến dinh dưỡng nhân tạo của chủng này lại không thể phát triển trên môi trường tối thiểu nhưng có thể sinh trưởng được trên môi trường đầy đủ hoặc có bổ sung một số chất như: axit amin, vitamin, các dẫn xuất của axit nucleic và các chất hóa học khác. Các sinh vật dinh dưỡng theo kiểu hoang dại như trên được gọi là các thể nguyên dưỡng hay các sinh vật ăn chất vô cơ (prototroph), còn các sinh vật mà cần phải bổ sung thêm một số chất khác gọi là các thể khuyết dưỡng, còn gọi là các sinh vật dinh dưỡng thụ động (auxotroph).

Chúng ta có thể phát hiện được các bào tử đơn bội và phân tách chúng ra dựa vào việc mất khả năng phát triển trên môi trường tối thiểu do không tổng hợp được một số chất cần thiết nhưng lại không có trong môi trường đó, chúng chỉ có thể sinh trưởng được trên môi trường đầy đủ. Một khi đã phân lập được các thể đột biến, ta dễ dàng biết được chúng bị khuyết dưỡng chất nào. Tiến hành nuôi chủng đột biến trên nhiều ống nghiệm, mỗi ống có bổ sung thêm một chất nhất định, nếu ở ống nào tế bào phát triển được thì chứng tỏ thể đột biến này đã khuyết dưỡng chính chất bổ sung vào ống đó. Ví dụ, nếu ống đó bổ sung tyrozin thì thể đột biến là thể khuyết dưỡng tyrozin (tyr). Phát hiện trên đây cũng chính là nghiên cứu mở đầu, đưa ra giả thuyết “một gen, một enzym” của Beadle và Tatum.

### 3.4.1.2 Phương pháp phát hiện đột biến ở ruồi quả *Drosophila*

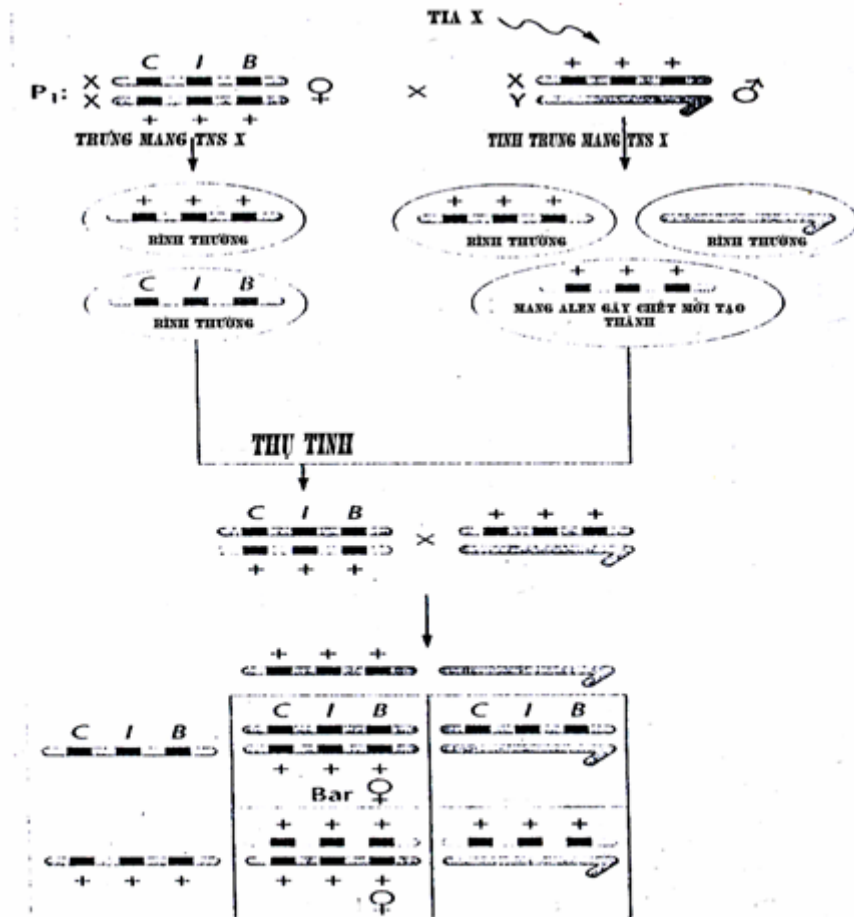
Hermann J. Muller đã cải tiến một số phương pháp phát hiện và ước tính tỷ lệ đột biến lặn gây chết tự nhiên và nhân tạo trên TNS thường và TNS X ở ruồi quả *Drosophila melanogaster*. Đây cũng là phương pháp chứng minh tia X là một trong tác nhân gây đột biến. Hai phương pháp hiệu quả trong phát hiện này đó là phương pháp CIB và gắn B. Phương pháp CIB (hình 3.1) phát hiện tỷ lệ các đột biến lặn gây chết nằm trên TNS X: C- là một vùng đảo đoạn ngăn cản quá trình trao đổi chéo; I- là alen lặn gây chết; B - gen trội quy định mắt Bar (hình thoi). Trong phương pháp này, người ta cho các cá thể đực chủng hoang dại đã qua xử lý bằng tia X giao phối với các cá thể cái CIB dị hợp tử không bị xử lý đột biến. Ở thế hệ thứ nhất, người ta chọn lựa các con cái có kiểu hình Bar, nhận một TNS X từ mẹ (là TNS có chứa CIB) và một TNS X từ bố. Do cá thể bố ban đầu bị gây đột biến nhân tạo nên trong các TNS X từ bố, có một vài TNS mang đột biến lặn gây chết. Khi cho con cái Bar F1 dị hợp tử lai ngược trở lại với một cá thể bố thuộc chủng hoang dại thì không thấy con đực nào còn sống. Một nửa số con đực chết là do có kiểu gen bán hợp tử (XY) mang TNS CIB gây chết, một nửa con đực còn lại chết là do mang alen lặn gây chết mới xuất hiện trong kiểu gen bán hợp tử.

Theo tính toán, cứ 500 bình nuôi cấy thì có 25 bình chỉ có con cái, tỷ lệ đột biến nhân tạo là 5%. Bằng phương pháp này, ta cũng có thể xác định được các đột biến hình thái nằm trên TNS X. Nếu có đột biến này xảy ra thì sẽ được phát hiện thấy ở các con đực F2.

Phương pháp thứ hai là phương pháp gắn thêm TNS X vào con cái. Đây là phương pháp đơn giản hơn dùng để phát hiện các đột biến hình thái lặn vì ta chỉ cần một thế hệ là phát hiện được đột biến này. Trong kỹ thuật này, thay vì con cái có bộ TNS bình thường, nó có hai

TNS X cùng gắn với nhau ở tâm động và một TNS Y. Sau khi cho con cái gắn X giao phối với con đực bình thường, kết quả thế hệ con có kiểu gen gồm 4 loại: Kiểu XX ở con cái gây chết, kiểu XXY ở con cái có khả năng sống sót, kiểu con đực YY chết và con đực XY sống sót (về quá trình truyền thông tin di truyền từ đời bố F1 bị xử lý đột biến sang cá thể đực đời con F1).

Phương pháp thứ hai cũng được sử dụng để phát hiện đột biến lặn trên TNS thường ở *Drosophila* và các biến dị trội marker sẽ được theo dõi suốt qua 3 thế hệ. Tuy kỹ thuật này đòi hỏi nhiều công sức và tốn thời gian nhưng lại có hiệu quả.



Hình 3.5  
 Phương pháp CIB của Muller xác định đột biến lặn gây chết có gắn thể nhiễm sắc X

### 3.4.1.3 Phát hiện đột biến ở thực vật

Hiện tượng biến dị di truyền rất phổ biến ở thực vật. Những nghiên cứu trên cây đậu Hà Lan của Mendel đã trở thành cơ sở trong chuyên gen. Hàng loạt công trình nghiên cứu trên thực vật sau đó đã cho chúng ta một khối kiến thức về tương tác gen, hiện tượng đa gen, liên kết gen, xác định giới tính, sắp xếp lại TNS và thể đa bội. Nhiều biến dị có thể phát hiện được

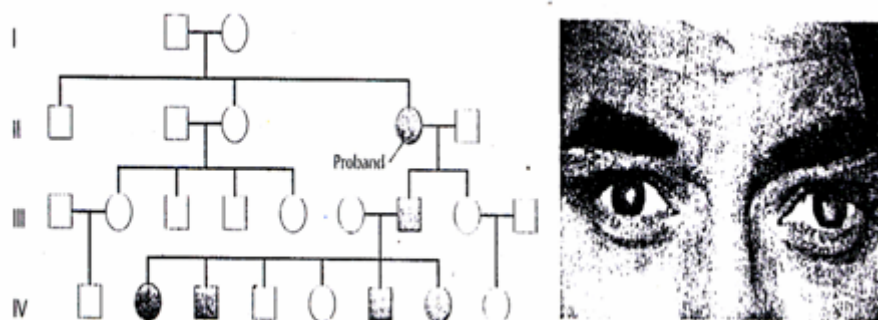
bằng mắt thường song nhiều trường hợp phải dùng các kỹ thuật, đặc biệt là các đột biến sinh hóa.

Dưới đây là một kỹ thuật thường được dùng để phát hiện các thành phần sinh hóa ở thực vật. Ví dụ ở ngô, đầu tiên người ta tách protein ra khỏi nội nhũ, sau đó thủy phân protein đó, cuối cùng là xác định các thành phần axit amin. Ở trường hợp thể đột biến opaque -2, người ta thấy có hàm lượng lyzin cao so với bình thường. Điều này rất có ý nghĩa trong chọn giống các loại ngô cốc.

#### 3.4.1.4 Phát hiện đột biến ở người

Con người không thể coi như một sinh vật thí nghiệm nên không thể áp dụng các kỹ thuật phát hiện đột biến ở các sinh vật như ruồi quả *Drosophila*. Để xác định các đột biến sai hỏng về hình thái, các nhà di truyền học phải phân tích phả hệ và theo dõi ngược trở lại lịch sử dòng họ đó. Bất kỳ một tính trạng nào được di truyền cho thế hệ con cháu đều có thể là đột biến trội hay đột biến lặn, có thể nằm trên TNS thường hoặc trên TNS X.

Đột biến trội dễ phát hiện nhất nếu chúng nằm trên TNS X và người bố mang alen đột biến này thì tất cả con gái của họ đều biểu hiện ra kiểu hình. Nếu đột biến nằm trên TNS thường thì có 50% thế hệ con dị hợp tử về alen này và có thể được biểu hiện ở các thế hệ sau. Trên hình 2 là sơ đồ phả hệ minh họa quá trình di truyền alen trội nằm trên TNS thường quy định bệnh đục nhân mắt. Bố mẹ thế hệ I không bị bệnh nhưng một trong ba người con (thế hệ II) bị bệnh đục nhân mắt.



Hình 3.6

Cây phả hệ gia đình về bệnh đục nhân mắt do di truyền ở người

Như vậy, tính trạng đột biến này có thể do một trong hai bố mẹ truyền lại. Người con gái bị bệnh lập gia đình, sinh hai con trong đó có một bé nam bị bệnh (thế hệ III). Trong sáu người con (thế hệ IV) có bốn người bị bệnh. Tỷ lệ con cháu bị bệnh với tỷ lệ cao ở thế hệ IV, nhưng trong những người con gái, nhận TNS X từ bố, lại có người không bị bệnh đã chứng tỏ rằng tính trạng đục nhân mắt được di truyền theo phương thức di truyền trội nằm trên TNS thường.

Bằng phương pháp phân tích phả hệ, ta cũng có thể phát hiện được các đột biến lặn liên kết X. Ví dụ, bệnh máu khó đông phát hiện thấy ở đời con cháu của nữ hoàng Anh Victoria là trường hợp đột biến nằm trên TNS X. Nghiên cứu cho thấy Victoria có kiểu gen dị hợp tử (Hb) về tính trạng trên. Bố của bà không bị bệnh, người mẹ cũng không có cơ sở gì để kết luận là mang alen đột biến này. Tuy đây là bệnh rất hiếm thấy ở quần thể người nhưng trong gia đình bà Victoria lại có một số trường hợp mắc phải.

Các alen lặn nằm trên TNS thường cũng có thể được phát hiện bằng phương pháp phân tích phá hệ. Do đây là một đột biến lặn (im lặn) khi tồn tại ở trạng thái dị hợp tử nên tính trạng phải qua một số thế hệ mới có cơ hội biểu hiện. Khi cho một cá thể bị bệnh giao phối với một cá thể bình thường đồng hợp tử thì tất cả đời con đều không bị bệnh nhưng dị hợp tử về alen đó. Nếu cho đời con giao phối với nhau thì có một phần tư thế hệ tiếp sau bị bệnh.

Ngoài phương pháp trên, một phương pháp rất hay được dùng đó là nuôi cấy invitro các tế bào người. Phương pháp này rất hiệu quả trong việc phát hiện nhiều đột biến. Phương pháp phân tích hoạt động của enzym, khả năng di chuyển protein trong điện trường và giải trình tự ADN đã chứng minh trong quần thể người xuất hiện nhiều cá thể mang biến dị di truyền.

### 3.4.2 Tần số đột biến ngẫu nhiên

Dựa trên các cách phát hiện đột biến trên, các nhà di truyền học có thể ước tính được các tần số đột biến. Tuy nhiên, chúng ta chỉ có thể xác định được tần số đột biến nhân tạo khi nó cao hơn với tỷ lệ đột biến ngẫu nhiên vì tỷ lệ đột biến ngẫu nhiên là cơ sở, là ranh giới để tính toán tần số đột biến nhân tạo.

Khi so sánh tần số đột biến ngẫu nhiên giữa các sinh vật, người ta phát hiện thấy có rất nhiều điểm thú vị. Thứ nhất, tần số đột biến ngẫu nhiên ở các sinh vật nghiên cứu rất thấp. Thứ hai, tỷ lệ này thay đổi đáng kể giữa các sinh vật. Thứ ba, trong cùng một loài, tỷ lệ đột biến ngẫu nhiên của các gen khác nhau cũng rất khác nhau.

**Bảng 3.3** Tần số đột biến ngẫu nhiên ở các sinh vật

Sinh vật	Đặc điểm	Gen đột biến	Tần số	Đơn vị
<i>Bacteriophage T2</i>	- ức chế lyzin	$r \rightarrow r^+$	$1 \times 10^{-8}$	
	- vùng Host	$b \rightarrow b^+$	$3 \times 10^{-9}$	
	- lên men lactozơ	$lac \rightarrow lac^+$	$2 \times 10^{-7}$	Trên một lần sao chép gen
	- lên men lactozơ	$lac^+ \rightarrow lac^-$	$2 \times 10^{-6}$	
	- kháng phage T <sub>1</sub>	$Tl-s \rightarrow Tl-r$	$2 \times 10^{-8}$	
	- mất khả năng tổng hợp histidin	$bis^+ \rightarrow bis^-$	$2 \times 10^{-6}$	
	- tổng hợp được histidin	$bis^- \rightarrow bis^+$	$4 \times 10^{-8}$	
<i>E.coli</i>	- phụ thuộc streptomycin	$str-s \rightarrow str-d$	$1 \times 10^{-9}$	
	- nhạy với streptomycin			
	- kháng tia bức xạ	$str-d \rightarrow str-s$	$1 \times 10^{-8}$	Trên một lần phân bào
	- tổng hợp leuxin	$rad-s \rightarrow rad-s$	$1 \times 10^{-5}$	
	- tổng hợp arginin	$leu^- \rightarrow leu^+$	$7 \times 10^{-10}$	
	- tổng hợp triphthophan	$arg^- \rightarrow arg^+$	$4 \times 10^{-9}$	
		$try^- \rightarrow try^+$	$6 \times 10^{-8}$	



<i>Salmonella typhimurium</i>	- tổng hợp triptophan	$try^- \rightarrow try^+$	$5 \times 10^{-8}$	Trên một lần phân bào
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	- kháng penicilin	$pen^s \rightarrow pen^r$	$1 \times 10^{-7}$	Trên một lần phân bào
<i>Chlamydomonas reinhardi</i>	- nhạy với streptomycin	$str^r \rightarrow str^s$	$1 \times 10^{-6}$	Trên một lần phân bào
<i>Neurospora crassa</i>	- cần inositol	$inos^- \rightarrow inos^+$	$8 \times 10^{-8}$	Trên một bào tử vô tính
	- tổng hợp được adenin	$ade^- \rightarrow ade^+$	$4 \times 10^{-8}$	
<i>Zea mays</i>	- hạt teo	$sb^+ \rightarrow sb^-$	$1 \times 10^{-6}$	
	- màu tía	$pr^+ \rightarrow pr^-$	$1 \times 10^{-5}$	
	- không màu	$c^+ \rightarrow c$	$2 \times 10^{-6}$	Trên một giao tử
	- vị ngọt	$su^+ \rightarrow su$	$2 \times 10^{-6}$	
<i>Drosophila melanogaster</i>	- thân vàng	$y^+ \rightarrow y$	$1.2 \times 10^{-6}$	
	- mắt trắng	$w^+ \rightarrow w$	$4 \times 10^{-5}$	
	- mắt nâu	$bw^+ \rightarrow bw$	$3 \times 10^{-5}$	Trên một giao tử
	- thân đen	$e^+ \rightarrow e$	$2 \times 10^{-5}$	
	- không mắt	$ey^+ \rightarrow ey$	$6 \times 10^{-5}$	
<i>Mus musculus</i>	- lông đốm	$s^+ \rightarrow s$	$3 \times 10^{-5}$	
	- lông màu nhạt	$d^+ \rightarrow d$	$3 \times 10^{-5}$	
	- lông nâu	$b^+ \rightarrow b$	$8.5 \times 10^{-4}$	Trên một giao tử
	- mắt hồng	$p^+ \rightarrow p$	$8.5 \times 10^{-4}$	
<i>Homo sapiens</i>	- máu khó đông	$b^+ \rightarrow b$	$2 \times 10^{-5}$	
	- bệnh Huntington	$Hu^+ \rightarrow Hu$	$5 \times 10^{-6}$	Trên một giao tử
	- retinoblastoma	$R^+ \rightarrow R$	$2 \times 10^{-6}$	
	- epiloia	$Ep^+ \rightarrow Ep$	$1 \times 10^{-5}$	
	- aniridia	$An^+ \rightarrow An$	$5 \times 10^{-6}$	
	- achondroplasia	$A^+ \rightarrow A$	$5 \times 10^{-5}$	

Tần số đột biến gen ở vi khuẩn và virut là 1/100 triệu lần phân bào ( $10^{-8}$ ). Ở *Neurospora*, tỷ lệ này cũng tương tự như ở ngô, ruồi quả *Drosophila*. Ở người có nhiều trường hợp tần số đó tương đối cao, trung bình 1/100.000 tới 1/1.000.000 đột biến trên một giao tử. Ở chuột, tỷ lệ này trung bình từ 1/10.000 đến 1/100.000. Người ta vẫn chưa thể giải thích một cách rõ ràng tại sao đột biến này lại gây ra nhiều hiện tượng biến dị như vậy, thông qua đó nó cũng

phản ánh mức độ hoạt động hiệu quả của hệ thống enzym sửa sai trong quá trình sao chép ADN.

### 3.5 Nguyên nhân gây đột biến

Đột biến gen và đột biến thể nhiễm sắc có thể được gây nên do các nhân tố hóa chất. Ngày nay người ta đã phát hiện nhiều loại hóa chất là tác nhân gây đột biến như: chất iprit, ethylenimin, glixidol, formaldehit, urethan, chlorit aluminium, các hóa chất trừ sâu, diệt cỏ, các hóa chất dùng trong công nghiệp hóa mỹ phẩm, công nghiệp hóa thực phẩm và công nghiệp nhuộm màu.

Vụ nổ bom nguyên tử của Mỹ tại Hiroshima và Nagasaki năm 1945 và chất độc màu da cam (chất diệt cỏ 2,4 D và 2,4,5 T có chứa dioxin) mà Đế quốc Mỹ sử dụng trong cuộc chiến tranh xâm lược Việt Nam đã gây cho nhân dân Nhật bản cũng như nhân dân Việt Nam những hậu quả nặng nề để lại những căn bệnh như: quái thai, ung thư cũng như đột biến thể nhiễm sắc qua nhiều thế hệ.

#### 3.5.1 Tia tử ngoại và Thymin dimer

Purin và pyrimidin hấp thụ tia tử ngoại ở bước sóng 260nm mạnh nhất. Đặc điểm này đã được ứng dụng rất nhiều trong phát hiện cũng như phân tích ADN. Năm 1943, trong một thí nghiệm liên quan đến ruồi quả *Drosophila*, người ta đã phát hiện thấy tia UV cũng là một tác nhân gây đột biến. Tia UV tác động chủ yếu lên pyrimidin, tạo hợp chất dimer do hai gốc thymin gắn lại. Các dimer cytosin-cytosin và cytosin-thymin cũng được tạo ra nhưng rất ít. Tất cả các dimer đều có khả năng ngăn cản quá trình sao chép ADN. Đó cũng chính là lý do tại sao tia UV có thể giết chết được các vi sinh vật.

#### 3.5.2 Nhân tố bức xạ

##### 3.5.2.1 Khả năng đâm xuyên tế bào và gây đột biến của các tia bức xạ có năng lượng cao

Trong phổ điện từ, năng lượng nghịch đảo với độ dài bước sóng. Tia X, tia gamma và các tia vũ trụ khác có bước sóng ngắn hơn tia UV nên có chứa năng lượng cao hơn. Do đó, chúng có khả năng đâm xuyên sâu vào các mô, làm ion hóa các phân tử mà chúng gặp trên đường đi. Vào những năm 1920, Hermann J. Muller và Lewis J. Stadler đã chứng minh rằng các bức xạ ion hóa là các tác nhân gây đột biến. Trong đó, ảnh hưởng của bức xạ ion hóa của tia X được quan tâm rất nhiều.

Khi tia X đâm xuyên các tế bào, nó va vào phân tử nào sẽ làm cho các electron trong nguyên tử của các phân tử đó bắn ra, tạo các gốc hay các ion tự do. Chính các ion tự do này là mở đầu cho một loạt các phản ứng hóa học, về mặt trực tiếp hay gián tiếp đều ảnh hưởng tới vật chất di truyền, làm thay đổi các purin và các pyrimidin trong ADN, gây ra các đột biến điểm. Các bức xạ ion hóa cũng có khả năng phá vỡ liên kết phosphodiester, dẫn đến những sai hỏng trên TNS.

Trên hình 3 là đồ thị tương quan giữa tỷ lệ đột biến lặn gây chết nằm trên TNS X và cường độ chiếu xạ tia X. Trên đồ thị, khi cường độ chiếu xạ tăng gấp đôi thì tỷ lệ đột biến cũng tăng gấp đôi. Các nét đứt gần gốc tọa độ chứng tỏ dù chiếu xạ với liều lượng rất nhỏ, khả năng đột biến vẫn xảy ra.

Các lập luận trên cũng giải thích phần nào cho lý thuyết “target” của J.A. Crowther và F. Dessauer được đưa ra vào năm 1924. Theo lý thuyết này thì dù chiếu xạ một hay nhiều vị trí, tế bào đều bị nguy hại và bị đột biến. Thuyết này còn cho biết tia X ảnh hưởng trực tiếp tới vật chất di truyền.

Về ảnh hưởng của chiếu xạ, có hai vấn đề đáng quan tâm. Thứ nhất, ở nhiều sinh vật nghiên cứu, cường độ chiếu xạ ít nhiều gây tác động đột biến khác nhau và cường độ này mang tính tích lũy. Nếu chiếu 100 ronghen cùng một lúc hay rải rác thì ảnh hưởng vẫn giống nhau. Tuy nhiên, trong khoảng thời gian giữa các lần chiếu xạ có thể có quá trình sửa sai ADN.

Thứ hai, có một nhóm tế bào dễ bị tổn thương hơn khi chiếu xạ so với các loại tế bào khác. Như chúng ta đã biết, tia X có thể gây đột biến chuyển đoạn TNS, mất đoạn hay đảo đoạn TNS. Những tác động này sẽ rất lớn nếu tế bào đang trong giai đoạn phân bào. Đây cũng là một trong các nguyên nhân tại sao việc chiếu xạ lên con người rất nguy hiểm. Lúc này, việc hình thành các khối u với khả năng phân chia tế bào nhanh chóng hơn so với bình thường sẽ đem lại hậu quả nghiêm trọng, dễ gây đến tử vong.

Có nhiều dạng bức xạ tác động lên tế bào và cơ thể trong điều kiện tự nhiên và trong điều kiện *invitro* như tia tử ngoại, tia Ronghen, tia  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , các proton, các neutron. Khi tế bào và cơ thể bị chiếu xạ, nhiều quá trình thay đổi đảo ngược và không đảo ngược xảy ra như sự hoại tử nhân, dính kết thể nhiễm sắc, phân đoạn thể nhiễm sắc, hình thành nhân khổng lồ, tế bào đa nhân, sai lệch phân ly thể nhiễm sắc về nhiều cực tạo nên các tế bào lệch bội.

Tần số và đặc tính của các đột biến thể nhiễm sắc tùy vào liều chiếu xạ và vào giai đoạn của chu kỳ tế bào bị chiếu xạ tức là tùy vào giai đoạn G1, giai đoạn khi thể nhiễm sắc chưa nhân đôi và ở giai đoạn G2 và phân bào là giai đoạn mà ở đó thể nhiễm sắc đã được nhân đôi. Tần số và mức độ đột biến thể nhiễm sắc còn tùy thuộc vào thời gian chiếu xạ. Tác hại của chiếu xạ gây nên các đứt gãy thể nhiễm sắc do đó gây nên các mất đoạn (deletion) và qua thời gian chiếu xạ sẽ xảy ra các đột biến khác như: nhân đoạn, đảo đoạn và chuyển đoạn. Tác hại của chiếu xạ cũng có thể gây nên các trao đổi đoạn giữa các thể nhiễm sắc do đó tạo nên các đột biến chuyển đoạn. Đặc tính nhạy cảm phóng xạ của các cơ thể khác nhau thì khác nhau, ví dụ liều gây chết đối với một số vi sinh vật là  $6 - 10^6 r$ , còn đối tượng động vật chỉ vài trăm r. Để gây được đột biến thể nhiễm sắc ở thực vật bậc cao (ví dụ đối với *Vicia* và *Lilium*) chỉ cần chiếu xạ với liều 20r là đủ, còn đối với động vật đơn bào có roi chiếu xạ với liều 20.000r vẫn chưa gây được đột biến. Đối với các mô khác nhau tính nhạy cảm với chiếu xạ cũng khác nhau, ví dụ mô tủy đỏ xương nhạy cảm hơn mô dịch hoàn.

### 3.5.3 Đột biến tạo các dẫn xuất của bazơ (chất tương tự bazơ)

#### 3.4.1.1 Nhân tố hóa chất

Các phân tử có khả năng thay thế purin hay pyrimidin trong quá trình sinh tổng hợp axit nucleic được gọi là những chất tương tự bazơ và thường là những tác nhân gây đột biến hóa học. Ví dụ: 5-bromuraxin (BU), là các bazơ đồng đẳng của thymin. Chúng thường ở dạng keto (C = O), nhưng ngẫu nhiên đôi khi chuyển sang dạng enol (-OH) và có khả năng bắt cặp với guanin. Do đó, BU có thể xâm nhập và bắt cặp bổ sung với A và ở vòng sao chép tiếp theo gắn bắt cặp với G. Như vậy, A = T được thay bằng G = C. BU cũng có thể xâm nhập và ở vòng sao chép tiếp A bắt cặp với T thành A - T. Trong cả hai trường hợp, chất đồng đẳng bromuraxin (BU) đều có khả năng tạo thay đổi trên ADN, cặp A = T thành cặp G = C và ngược lại.

### 3.5.3.2 Các tác nhân alkyl hóa

Các tác nhân alkyl hóa còn được coi là các tác nhân gây đột biến hóa học. Ví dụ, các khí ngạt có chứa sulfur như: etyl-metansulfur (EMS), metyl- metansulfur (MMS) v.v. có khả năng gây đột biến bằng cách gắn thêm nhóm  $-CH_3$  và  $-C_2H_5$  vào các nhóm amino hoặc keto của các nucleotit tạo nên các đồng đẳng dẫn đến các bắt cặp bổ sung sai.

Phẩm nhuộm acridine cũng là một trong các tác nhân gây đột biến hóa học, có khả năng thêm hoặc mất một hoặc vài cặp bazơ trong chuỗi polynucleotit, tạo lên các lỗ hổng trên ADN, gây đứt mạch trong quá trình sao chép.

### 3.5.3.3. Các vị trí Apurinic và một số tổn thương khác

Một loại đột biến khác gây hiện tượng mất bazơ, chủ yếu là guanin và adenin trong chuỗi xoắn kép ADN, gọi là hiện tượng đột biến tạo vị trí AP. Đây là chữ viết tắt của apurinic site, chỉ những vị trí xảy ra hiện tượng mất purin do bị đứt liên kết glycosit giữa 1'-C của đường d-ribozơ và 9-N trong vòng purin, ngăn cản quá trình sao chép ADN. Song, may mắn là hệ thống sửa chữa ADN có thể sửa được lỗi sai này.

Axit nitric cũng là một tác nhân gây sai hỏng ADN, nó làm cho cytozin và adenin bị de amin hóa thành dạng keto, lúc này cytoxin bị chuyển hóa thành uraxin, adenin bị chuyển thành hypoxanthin, từ đó dẫn đến hiện tượng bắt cặp bổ sung không đặc hiệu của hai phân tử trong sao chép. Ví dụ, C thường bắt cặp với G, nhưng khi đột biến thành U, nó lại bắt cặp với A và như vậy, đột biến đã làm thay thế cặp  $G \equiv C$  thành cặp  $A = T$  và đột biến lại làm thay thế cặp  $A = T$  thành  $G \equiv C$ .

Ngoài các tác nhân trên, các dạng có chứa ôxy hoạt động như  $H_2O_2$ ,  $O_2$  (thông qua phản ứng ôxy hóa) cũng có khả năng gây nguy hại tới các bazơ và dẫn đến hiện tượng bắt cặp sai trong quá trình sao chép ADN.

*Vấn đề thảo luận ở chương 3:*

1. Phân tích, so sánh, nêu ví dụ thường biến và đột biến.
2. Trình bày đặc điểm phân biệt đột biến gen, đột biến NST và đột biến tổ hợp.
3. Trình bày các dạng đột biến gen, đặc tính và hậu quả.
4. Trình bày các dạng đột biến NST, đặc tính và hậu quả.
5. Liệt kê các phương pháp phát hiện đột biến gen.
6. Trình bày các nguyên nhân gây đột biến

## Chương 5

### Chu kỳ sống của tế bào và sự phân bào

Mục tiêu: Sau khi học xong chương này học viên có khả năng:

- Trình bày được chu kỳ tế bào và các hiện tượng xảy ra trong các kỳ.
- Vẽ được sơ đồ các kỳ phân bào nguyên nhiễm và các hiện tượng xảy ra trong các kỳ.
- Vẽ được các kỳ của phân bào giảm nhiễm và các hiện tượng xảy ra trong các kỳ.
- Làm bảng so sánh phân bào nguyên nhiễm và phân bào giảm nhiễm.

#### 5.1 Các thời kỳ của chu kỳ tế bào

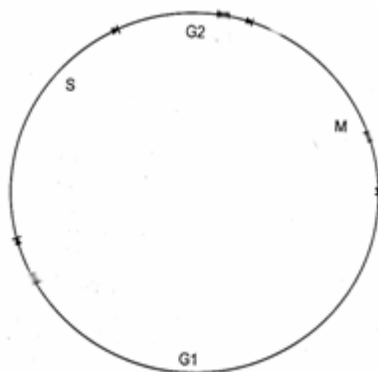
Chu kỳ sống của tế bào là thời gian diễn ra kể từ thời điểm tế bào được hình thành nhờ phân bào của tế bào mẹ và kết thúc bởi sự phân bào để hình thành tế bào mới (xem hình 5.1).

Người ta chia chu kỳ tế bào ra hai thời kỳ chính:

Thời kỳ giữa hai lần phân chia được gọi là gian kỳ (interphase) được ký hiệu là I là thời gian tế bào trao đổi chất, sinh trưởng và chuẩn bị cho phân bào.

Thời gian tiếp theo là kỳ phân bào (mitosis) được ký hiệu là M, là thời kỳ tế bào mẹ phân đôi cho ra hai tế bào con.

Trong cơ thể đa bào các tế bào soma được biệt hóa khác nhau để thực hiện chức năng khác nhau nên thời gian kéo dài của chu kỳ sống của chúng có nhiều thay đổi, đặc biệt là thời kỳ gian kỳ. Ví dụ, tế bào ruột phân bào hai lần qua một ngày, tế bào gan phân bào hai lần qua một năm, còn tế bào neuron ở cơ thể trưởng thành hầu như không phân bào mà gian kỳ kéo dài cho đến khi tế bào chết hoặc cơ thể chết. Trung bình chu kỳ sống của đa số tế bào kéo dài từ 8 giờ đến 100 ngày.



Hình 5.1

## Chu kỳ tế bào

### 5.1.1 Gian kỳ

Trong gian kỳ tế bào thực hiện các chức năng trao đổi chất, các hoạt động sống khác nhau, tổng hợp ARN, ADN, các protein, các enzym v.v. và chuẩn bị cho phân bào. Tùy theo đặc điểm chức năng người ta chia gian kỳ ra ba giai đoạn hay là pha liên tiếp nhau: giai đoạn G1 (gap 1), giai đoạn S (synthesis) và giai đoạn G2 (gap 2) (xem hình 5.1). Thời gian kéo dài của gian kỳ tùy thuộc vào thời gian của 3 pha  $G1 + S + G2$  đặc biệt tùy thuộc vào G1 vì ở các loại tế bào khác nhau thì thời gian G1 là rất khác nhau, còn giai đoạn S và G2 tương đối ổn định.

### 5.1.2 Pha G1

Pha G1 được tiếp ngay sau phân bào.

- *Thời gian của G1.*

Thời gian của G1 kéo dài từ ngay sau khi tế bào được tạo thành do phân bào, cho đến khi bắt đầu pha S là pha tổng hợp ADN. Thời gian của G1 tùy thuộc vào chức năng sinh lý của tế bào, ví dụ đối với tế bào phôi thì thời gian của G1 = 1 giờ, đối với tế bào gan động vật có vú G1 = 1 năm, còn đối với tế bào neuron G1 có thể kéo dài suốt đời sống cơ thể. Đối với tế bào ung thư thời gian của G1 bị rút ngắn rất nhiều. Người ta còn phân biệt pha G0 là pha trong đó tế bào đi vào trạng thái biệt hóa vĩnh viễn hoặc thoái hóa.

Khi kết thúc G1 tế bào đi vào pha S và G2 để vào thời kỳ phân bào và tùy thuộc vào các điều kiện môi trường. Vào cuối pha G1 có một thời điểm được gọi là điểm hạn định (restriction point), điểm R.

Nếu tế bào vượt qua điểm R chúng tiếp tục đi vào pha S. Nhân tố điều chỉnh thời điểm R là phức hệ protein không bền vững có tác dụng kìm hãm gồm có cyclin D và kinaza phụ thuộc cyclin. Pha G1 là pha sinh trưởng của tế bào vì trong pha này xảy ra sự tổng hợp các ARN và protein. Đối với các tế bào biệt hóa thì tế bào không vượt qua R mà đi vào quá trình biệt hóa tế bào để tạo nên các dòng tế bào soma khác nhau có chức năng khác nhau.

- *Tổng hợp chất trong pha G1.*

Trong pha G1 hàm lượng ADN và số lượng thể nhiễm sắc là ổn định (ví dụ ở người là  $2n = 46$  thể nhiễm sắc). Mỗi một thể nhiễm sắc chứa một phân tử ADN liên kết với histon và ở pha G1 các sợi nhiễm sắc của thể nhiễm sắc và cũng chính trong pha G1 các ADN ở trạng thái hoạt động nghĩa là tổng hợp các ARN (phiên mã) và tổng hợp protein (dịch mã). Vì vậy người ta xem pha G1 là pha sinh trưởng tế bào và thực hiện hoạt động sinh lý khác nhau. Khi nhân phiên mã (transcription) thì các gen chứa trong vùng chất nhiễm sắc thực (euchromatine) (có chứa các codon gồm bộ ba deoxyribonucleotit) sẽ tổng hợp nên phân tử mARN (mang các codon gồm bộ ba ribonucleotit) và như vậy mã của một protein nào đó (trình tự các codon) trong ADN đã được “phiên” sang mARN. Phân tử mARN sẽ đi ra tế bào chất đến riboxom, ở đây nhờ các tARN, các axit amin được lắp ghép đúng theo các codon của mARN để cho ra phân tử protein mà tế bào cần.

### 5.1.3 Pha S

Pha S là pha tiếp theo pha G1 nếu tế bào vượt qua được điểm hạn định R. Trong pha G1 tế bào chuẩn bị điều kiện cho pha S, vào cuối pha G1 tế bào tổng hợp một loại protein đặc trưng là cyclin A và nhanh chóng tích lũy trong nhân tế bào. Protein cyclin A cùng với kinaza sẽ xúc tiến sự tái bản ADN. Được gọi là pha S vì trong pha này chủ yếu xảy ra sự tổng hợp ADN và nhân đôi thể nhiễm sắc.

Protein cyclin A (nhân tố hoạt hóa tổng hợp ADN) tác động cho tới cuối pha S thì biến mất.

Thời gian kéo dài của pha S tương đối cố định (từ 6 đến 8 giờ). Sự tổng hợp ADN mới có cấu trúc và đặc tính giống với ADN cũ nên được gọi là sự tái bản ADN (replication).

#### **5.1.4 Pha G2**

Tiếp theo pha S là pha G2, thời gian của G2 ngắn từ 4-5 giờ. Trong pha G2 các ARN và protein được tổng hợp chuẩn bị cho phân bào. Cuối pha G2 một protein được tổng hợp là cyclin B và được tích lũy trong nhân cho đến tiền kỳ phân bào. Cyclin B hoạt hóa enzym kinaza và đóng vai trò quan trọng trong công việc thực hiện quá trình phân bào như sự tạo thành các vi ống tubulin để tạo thành thoi phân bào.

#### **5.1.5 Phân bào**

Tiếp theo pha G2 là thời kỳ tế bào mẹ phân chia thành hai tế bào con. Sự phân bào là phương thức sinh sản của tế bào, đồng thời là phương thức qua đó tế bào mẹ truyền thông tin di truyền chứa trong ADN (đã được nhân đôi qua pha S) cho hai tế bào con. Sự phân bào cùng với sự tổng hợp các chất nội bào và gian bào là cơ sở của sự tăng trưởng của các mô, các cơ quan và cơ thể đa bào. Người ta phân biệt ba dạng phân bào sau đối với tế bào soma:

##### **5.1.2.1 Trục phân (Amitosis)**

Dạng phân bào này đặc trưng cho các tế bào đã biệt hóa cao, các tế bào bệnh lý, các tế bào bị tác hại đang đi vào quá trình thoái hóa.

Trong trục phân, nhân được phân đôi một cách đơn giản không xuất hiện thể nhiễm sắc cũng như thoi phân bào (vì vậy còn được gọi là phân bào không tơ - amitosis); nhiều khi nhân phân thành hai nửa không đều nhau, hoặc phân thành nhiều mảnh, mọc chồi (trục phân bệnh lý hoặc bị tác hại). Tế bào chất có thể được phân đôi cùng với nhân hoặc không phân chia tạo thành tế bào hai nhân hoặc đa nhân (ví dụ tế bào gan).

##### **5.1.2.2 Nội phân (Endomitosis)**

Nội phân là một dạng biến đổi của mitosis, trong đó thể nhiễm sắc được nhân đôi nhưng không phân chia về các tế bào con mà ở lại trong tế bào, do đó tạo thành tế bào đa bội (polyploide) có số thể nhiễm sắc tăng cao nhiều lần. Trong trường hợp các sợi nhiễm sắc được nhân đôi nhiều lần (do nhân đôi của ADN) nhưng số lượng thể nhiễm sắc không đổi sẽ dẫn đến hiện tượng đa sợi (Politenisation) và thể nhiễm sắc đa sợi (Politen chromosome).

##### **5.1.2.3 Phân bào nguyên nhiễm (Mitosis)**

Phân bào nguyên nhiễm còn gọi là gián phân hoặc phân bào có tơ (tên gọi trước đây để phân biệt với dạng phân bào trực phân hay là phân bào không tơ là dạng phân bào bệnh lý không xuất hiện thể nhiễm sắc và thoi), là dạng phân bào chuẩn, phổ biến cho tất cả các dạng tế bào soma, qua đó các tế bào có nguyên bộ thể nhiễm sắc như tế bào mẹ ( $2n$ ).

#### 5.1.2.4 Phân bào giảm nhiễm (Meiosis)

Phân bào giảm nhiễm là dạng phân bào đặc trưng cho các tế bào sinh dục đang đi vào quá trình hình thành giao tử qua đó các tế bào con (giao tử) có bộ thể nhiễm sắc bị giảm đi một nửa so với tế bào mẹ ( $2n \rightarrow n$ ).

## 5.2 Phân bào nguyên nhiễm

### 5.3.1 Đặc điểm của phân bào nguyên nhiễm

- Phân bào nguyên nhiễm là dạng phân bào phổ biến ở Eucaryota.
- Kết quả của phân bào hình thành hai tế bào con có chứa số lượng thể nhiễm sắc giữ nguyên như tế bào mẹ (cho nên có tên là phân bào nguyên nhiễm).
- Xuất hiện thể nhiễm sắc và phân chia thể nhiễm sắc về hai tế bào con.
- Xuất hiện trong tế bào chất bộ máy phân bào tức là thoi phân bào có vai trò hướng dẫn các thể nhiễm sắc con di chuyển về hai cực tế bào.
- Trong tiến trình phân bào màng nhân và hạch nhân biến mất và lại được tái tạo ở 2 tế bào con.

### 5.3.2 Các kỳ của phân bào

Quá trình phân bào diễn ra theo sáu kỳ liên tiếp nhau bắt đầu thời gian tiếp theo pha G2 của gian kỳ và kết thúc khi hình thành hai tế bào con.

Sự phân nhân (caryokinesis) là tiến trình phân đôi của nhân bao gồm năm kỳ là tiền kỳ, tiền trung kỳ, trung kỳ, hậu kỳ và mạt kỳ. Còn sự phân tế bào chất (cytokinesis) là tiến trình phân đôi tế bào chất, là kỳ cuối cùng - kỳ phân tế bào chất.

Trong thực tế, trong tế bào sống rất khó phân biệt giới hạn chuyển tiếp giữa các kỳ. Mỗi kỳ được đặc trưng bởi cấu trúc, tập tính của thể nhiễm sắc, bộ máy phân bào, màng nhân, v.v. (xem hình 5.2).

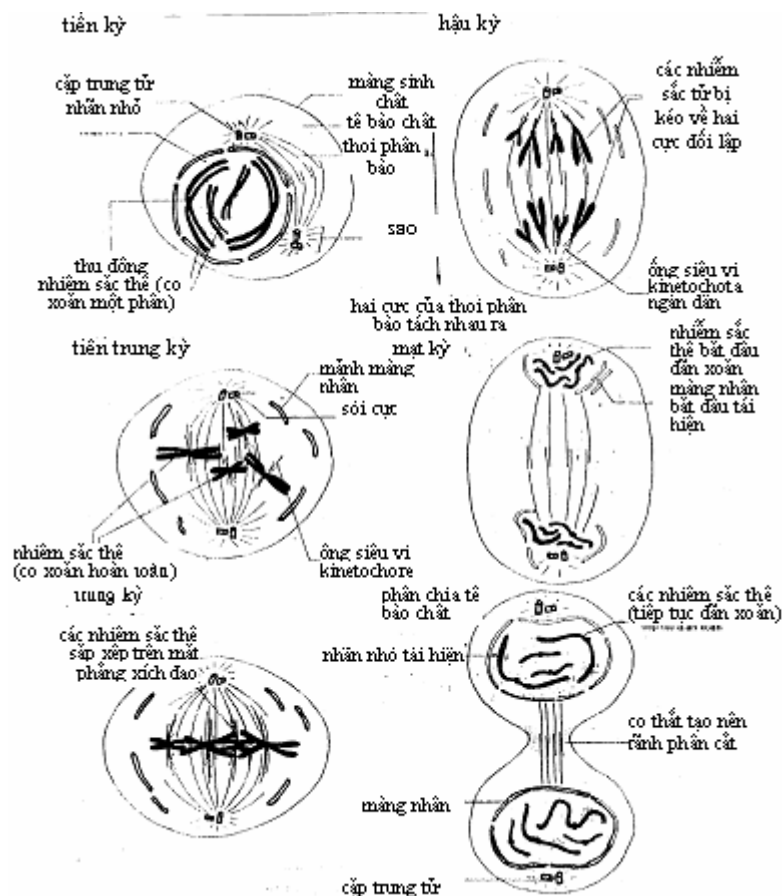
#### 5.3.2.1 Tiền kỳ (Prophase)

Tiền kỳ được tiếp theo sau pha G2 của gian kỳ. Rất khó phân biệt một cách chính xác điểm chuyển tiếp này, các hiện tượng đặc trưng cho tiền kỳ là:

- *Hình thành thể nhiễm sắc*: Chất nhiễm sắc ở gian kỳ bao gồm các sợi nhiễm sắc đã được nhân đôi qua pha S, trở nên xoắn và cô đặc lại hình thành các thể nhiễm sắc thấy rõ dưới kính hiển vi, thường có số lượng và hình thái đặc trưng cho loài.

Mỗi một thể nhiễm sắc gồm hai nhiễm sắc tử chị em (sister chromatid) được dính với nhau bởi một vùng được gọi là trung tiết (centromere). Hai nhiễm sắc tử chị em trong một thể nhiễm sắc chứng tỏ rằng thể nhiễm sắc đã được nhân đôi qua pha S.





**Hình 5.2**

Các kỳ của phân bào nguyên nhiễm

- *Màng nhân và hạch nhân có nhiều thay đổi*: Hạch nhân giảm thể tích, phân rã và biến mất. Tấm lamina của màng nhân bị phân giải, màng nhân đứt ra thành nhiều đoạn và biến thành các bóng không bào bé phân tán trong tế bào chất tạo điều kiện cho thể nhiễm sắc di chuyển ra ngoại vi tế bào.

- *Hình thành bộ máy phân bào*: Như ta đã biết đa số tế bào động vật có trung thể gồm hai trung tử (centriole) và vùng quanh trung tử (pericentriole), qua pha S trung tử được nhân đôi tạo thành hai đôi trung tử con. Mỗi đôi trung tử con trở thành trung thể mới. Do sự hoạt hóa của chất quanh trung tử các đơn hợp tubulin trong tế bào chất trùng hợp hóa thành các vi ống tubulin. Các vi ống xếp phóng xạ quanh trung tử mới tạo thành sao phân bào (aster). Hai sao di chuyển về hai cực tế bào. Giữa hai sao các vi ống phát triển sắp xếp thành hệ thống sợi có dạng hình thoi được gọi là thoi phân bào. Cấu tạo nên thoi có hai dạng sợi (vi ống) chạy từ sao của cực này đến cực kia. Các vi ống cực (hay sợi cực) chạy liên tục từ cực này đến cực kia, còn các vi ống tâm động (hay sợi tâm động) là các sợi nối với tâm động của thể nhiễm sắc ở vùng xích đạo của tế bào. Đến cuối tiền kỳ khi màng nhân biến mất thì bộ máy thoi có hai sao đã được hình thành.

Như ta đã biết, ở tế bào thực vật bậc cao không quan sát thấy trung tử, nhưng ở vùng cạnh nhân vẫn có vùng đậm đặc tương tự vùng quanh trung tử và vai trò của chúng là hoạt hóa sự trùng hợp tubulin để tạo thành thoi phân bào ở tế bào thực vật (vì vậy được gọi là phân bào không sao).

### 5.3.2.2 Trung kỳ sớm (Prometaphase)

Trung kỳ sớm bắt đầu khi màng nhân tiêu biến thành các bóng nhỏ phân tán trong tế bào chất quanh thoi phân bào. Thoi phân bào hình thành lúc đầu ở vùng cạnh màng nhân, khi màng nhân biến mất thì nó di chuyển chiếm ngay vị trí trung tâm. Các thể nhiễm sắc mang trung tiết (centromere) là nơi dính hai nhiễm sắc tử. Trung tiết phân hóa thành tâm động (kinetochore) có cấu tạo gồm trung tiết ở giữa và hai tâm protein hai bên kẹp lấy trung tiết (có kích thước khoảng 1µm) và dính với các sợi tâm động của thoi. Qua tâm động thể nhiễm sắc được dính với các sợi tâm động của thoi. Như vậy, thể nhiễm sắc được xếp nằm thẳng góc với các sợi tâm động của thoi còn tâm động có vị trí đối mặt với hai sao ở hai cực.

### 5.3.2.3 Trung kỳ (Metaphase)

Thể nhiễm sắc ở trung kỳ xoắn, cô đặc và co ngắn tối đa. Mỗi thể nhiễm sắc dính với sợi tâm động qua tâm động và do tác động của các sợi tâm động các thể nhiễm sắc sắp xếp cùng trên một mặt phẳng xích đạo tạo nên cái gọi là tấm trung kỳ. Tấm trung kỳ nằm thẳng góc với trục dọc của thoi. Tâm động dính với các sợi tâm động ở cả hai phía đối mặt với sao. Ngoài các sợi tâm động là sợi dính tâm động ở mặt phẳng xích đạo và kéo dài tới vùng quanh sao nhưng không dính với trung tử, thì thoi còn có các sợi cực - sợi cực của thoi không dính với tâm động, sợi cực có hai loại: một loại liên tục chạy từ cực này đến cực kia, một loại chỉ chạy từ cực đến miền xích đạo.

### 5.3.2.4 Hậu kỳ (Anaphase)

Đặc điểm của hậu kỳ là sự tách đôi của hai nhiễm sắc tử chị em khỏi nhau và trở thành thể nhiễm sắc con độc lập, sự tách của hai nhiễm sắc tử chị em là do sự tách rời của trung tiết. Mỗi nhiễm sắc tử mang một trung tiết riêng và 2 trung tiết dính với nhau nhờ protein cohesin. Bước vào hậu kỳ cohesin bị phân giải và 2 trung tiết tách khỏi nhau, mỗi nhiễm sắc tử có một tâm động riêng dính với sợi tâm động. Tất cả các nhiễm sắc tử chị em cùng tách khỏi nhau trở thành thể nhiễm sắc con và cùng thời gian di chuyển về hai cực nhờ sự co ngắn của sợi tâm động (do sự giải trùng hợp của vi ống tubulin) phối hợp với sự kéo dài của các sợi cực và hẹp lại của thoi. Người ta đã tính được tốc độ di chuyển về cực của thể nhiễm sắc con khoảng 1µm trong 1 phút.

### 5.3.2.5 Mạt kỳ (Telophase)

Trong kỳ này các thể nhiễm sắc con đã di chuyển tới hai cực, giãn xoắn, dài ra và biến dạng trở thành chất nhiễm sắc. Thoi phân bào biến mất, đồng thời hình thành màng nhân bao quanh chất nhiễm sắc. Hạch nhân được tái tạo hình thành hai nhân con trong khối tế bào chất chung.

### 5.3.2.6 Phân tế bào chất (Cytokinesis)

Sự phân tế bào chất được bắt đầu từ cuối hậu kỳ hoặc đầu mạt kỳ và diễn ra suốt mạt kỳ. Ở tế bào động vật sự phân tế bào chất được bắt đầu bởi sự hình thành một eo thắt ở vùng xích đạo ở vùng giữa hai nhân con. Sự hình thành eo thắt và lõm sâu của eo tiến tới cắt đôi tế bào chất là do sự hình thành một vòng co rút ở vùng xích đạo được cấu tạo vì sợi actin. Khi vòng sợi actin co rút kéo theo phần màng sinh chất lõm thắt vào trung tâm và khi màng nối với

nhau sẽ phân tách tế bào chất thành hai nửa, mỗi nửa chứa một nhân con. Mặt phẳng phân cắt tế bào chất thẳng góc với trục của thoi phân bào.

Đối với tế bào thực vật được bao bởi lớp vỏ xenlulozo làm cho tế bào không vận động được nên sự phân tế bào chất xảy ra khác với tế bào động vật. Sự phân tế bào chất ở tế bào thực vật được bắt đầu bằng sự xuất hiện một vách ngang ở vùng trung tâm xích đạo, vách ngang phát triển dần ra ngoại vi cho đến khi liên kết với vách bao tế bào và như vậy phân tách tế bào chất thành hai nửa chứa nhân con. Trên vách ngang phân tách hai tế bào con phát triển hệ thống cầu nối tế bào chất tạo thành cấu trúc plasmodesma đặc trưng cho tế bào thực vật. Tham gia vào sự tạo thành vách ngang có phức hệ Golgi, mạng lưới nội chất và vi ống cực của thoi còn tồn dư lại ở vùng xích đạo.

Ở hậu kỳ, các bào quan như: ty thể, lục lạp, mạng lưới nội chất v.v. được phân về 2 tế bào con. Nói chung trong thời kỳ phân bào các hoạt động tổng hợp chất, hoạt động sinh lý của tế bào bị đình chỉ hoặc giảm bớt nhằm phục vụ cho sự phân bào.

### 5.3.3 Thời gian của các kỳ và sự điều chỉnh phân bào

Trong cơ thể đa bào trong các chủng quần tế bào đổi mới, nghĩa là các chủng quần mà ở đó các tế bào luôn được đổi mới nhờ tế bào duy trì một nhịp điệu phân bào ổn định. Bình thường, đối với động vật có vú chu kỳ tế bào kéo dài từ 10 giờ đến 20 giờ thì thời gian phân bào có thể kéo dài từ 1 giờ đến 2 giờ. Tuy nhiên, thời gian của M không phụ thuộc vào thời gian của chu kỳ. Thời gian của chu kỳ có thể dài hơn nhiều nhưng thời gian của M tương đối ổn định.

Tiền kỳ thường kéo dài từ 10 đến 15 phút, trung kỳ sớm và trung kỳ kéo dài từ 25 đến 35 phút. Thời gian của hậu kỳ là ngắn nhất chỉ kéo dài từ 5 đến 8 phút, còn mặt kỳ diễn ra trong khoảng 20 đến 25 phút.

Để xác định nhịp điệu phân bào của một chủng quần tế bào người ta xác định chỉ số phân bào hay chỉ số mitosis (mitotic index). Chỉ số mitosis được tính bằng số phần nghìn của số tế bào đang phân bào (tổng cộng số tế bào ở các kỳ phân bào) trên 1000 tế bào quan sát được với kính hiển vi thường.

Thật ra để tính toán xác định được thời gian của các pha trong chu kỳ tế bào không phải là một việc đơn giản. Với phương pháp đánh dấu phóng xạ và máy phân tích huỳnh quang tự động người ta đã xác định được tương đối thời gian của các pha trong chu kỳ tế bào ở một số chủng quần tế bào được nghiên cứu đặc biệt là ở động vật có vú mà ta đã nêu ở các phần trên đây. Chắc chắn rằng ở các dạng tế bào biệt hóa khác nhau, ở các chủng quần tế bào khác nhau, dưới ảnh hưởng của các nhân tố điều chỉnh khác nhau, chu kỳ sống và nhịp điệu phân bào của chúng biến đổi rất linh hoạt, rất khác nhau.

Khi đề cập đến các nhân tố kiểm tra sự phân bào người ta thấy một nhân tố quyết định là tế bào phải trải qua pha S nghĩa là ADN và thể nhiễm sắc phải được nhân đôi: như ta đã biết ở phần trên, tế bào ở pha G1 muốn đi vào pha S phải vượt qua điểm R ở cuối pha G1. Như vậy sự điều chỉnh phân bào phụ thuộc vào sự điều chỉnh chu kỳ tế bào nói chung, trong đó có rất nhiều nhân tố nội bào và ngoại bào tham gia đặc biệt là hệ protein cyclin và kinaza (xem phần điều chỉnh chu kỳ tế bào).

Vượt qua pha G2 cũng là điều kiện cần cho sự phân bào vì trong pha G2 tế bào tổng hợp các protein cần thiết cho sự phân bào, đặc biệt sự trùng hợp hóa các tubulin để tạo thành vi ống. Chất ức chế trung kỳ colchicin ức chế sự trùng hợp các vi ống do đó ức chế sự tạo

thoi phân bào và tế bào dừng lại ở trung kỳ. Sự chuyển tiếp từ pha G2 vào pha M còn tùy thuộc vào một protein đặc trưng được gọi là cyclin B, có tác dụng hoạt hóa một kinaza tạo điều kiện cho việc hình thành thoi và sự tiêu biến màng nhân.

Người ta đã phát hiện nhiều nhân tố ức chế sự phân bào: đó có thể là hóa chất hoặc các bức xạ có tác động trực tiếp hoặc gián tiếp lên sự phân bào, có thể tác động lên sự tái bản ADN, lên sự tạo thành thoi, lên thể nhiễm sắc hoặc lên sự phân tế bào chất. Các chất kháng sinh ví dụ như actinomycin D, daunomycin, nogalomycin có tác dụng liên kết với ADN do đó ức chế sự tổng hợp ADN. Các chất cycloheximid, puromycin ức chế sự tổng hợp protein bằng cách tác động lên ribosom. Streptomycin ức chế tế bào ở pha G2. Các chất chống chuyển hóa (antimetabolite) chất alkylant, các thuốc nhuộm đều có tác động ức chế hoặc làm sai lệch sự tái bản ADN dẫn đến ức chế phân bào.

Các chất có nguồn gốc thực vật như colchicin, colcemid, podophylin, vinblastin v.v. đều có tác dụng ức chế sự tạo thành thoi phân bào, tế bào dừng lại ở trung kỳ và tạo thành các nhân đa bội. Nhiều chất có tác động lên thể nhiễm sắc làm đứt gãy thể nhiễm sắc hoặc phân ly không chính xác về hai cực, ví dụ các chất yperit, các bức xạ ion hóa v.v. lithium, cysteamin, cytochalasin ức chế sự phân tế bào chất dẫn đến tạo thành tế bào đa nhân.

### 5.3 Phân bào giảm nhiễm

#### 5.3.1 Sinh sản vô tính và sinh sản hữu tính

##### 5.3.1.1 Sinh sản vô tính

Sinh sản vô tính đặc trưng cho vi khuẩn, các loài động vật đơn bào, nhiều loài thực vật và động vật. Các hình thức sinh sản vô tính tuy đa dạng như phân đôi, nảy chồi, tái sinh v.v. nhưng bản chất là hiện tượng phân bào nguyên nhiễm qua đó một cơ thể mẹ (hoặc tế bào mẹ) sinh ra những cơ thể con (hoặc tế bào con) giống mẹ về mặt di truyền. Trong cơ thể động vật bậc cao như loài động vật có vú và người các mô tăng trưởng, đổi mới nhờ sự sinh sản vô tính của tế bào (phân bào nguyên nhiễm). Sự sinh đôi cùng trứng ở người có thể xem là một hình thức sinh sản vô tính của tế bào hợp tử vì hợp tử được thụ tinh có bộ nhiễm sắc 2n qua phân bào nguyên nhiễm cho ra tế bào con (2 phôi bào) giống nhau và từ mỗi tế bào con này phát triển thành cơ thể riêng biệt giống hệt nhau về mặt di truyền. Sinh sản vô tính là phương thức sinh sản đơn giản, cho phép tăng nhanh số lượng cá thể trong môi trường sống nhất định, nhưng đặc tính di truyền không được thay đổi qua nhiều thế hệ, điều đó không tạo nên đa dạng di truyền cho chọn lọc tự nhiên.

##### 5.3.1.2 Sinh sản hữu tính

Sự xuất hiện sinh sản hữu tính là bước tiến hóa lớn của sinh vật. Nó đảm bảo cho sự xuất hiện đa dạng di truyền bằng cách tổ hợp hai genom của hai cá thể trong loài vào một cá thể mới, đồng thời qua các thế hệ sinh sản hữu tính tái tổ hợp lại genom của các cá thể thế hệ tiếp theo.

Trong sinh sản hữu tính xảy ra sự xen kẽ thể đơn bội và lưỡng bội. Phân bào giảm nhiễm bảo đảm cho sự hình thành thể hệ tế bào đơn bội (các giao tử) và qua thụ tinh, hai tế bào đơn bội hòa hợp với nhau tạo thành hợp tử lưỡng bội và đối với cơ thể đa bào hợp tử lưỡng bội phát triển thành cơ thể. Phương thức sinh sản hữu tính đơn giản xuất hiện ở một số vi khuẩn, động vật đơn bào, tảo v.v.. Ở động vật và thực vật bậc cao, hình thức sinh sản hữu

tính phức tạp hơn nhiều, đòi hỏi sự phân hóa giới tính ở cơ thể bố mẹ, chúng có cơ quan sinh sản chứa các tế bào sinh dục. Thông qua phân bào giảm nhiễm tạo thành các giao tử đực và cái. Tuy ở các loài khác nhau, chu kỳ sinh sản diễn ra khác nhau nhưng cơ chế và bản chất của phân bào giảm nhiễm diễn ra giống nhau theo một sơ đồ chung.

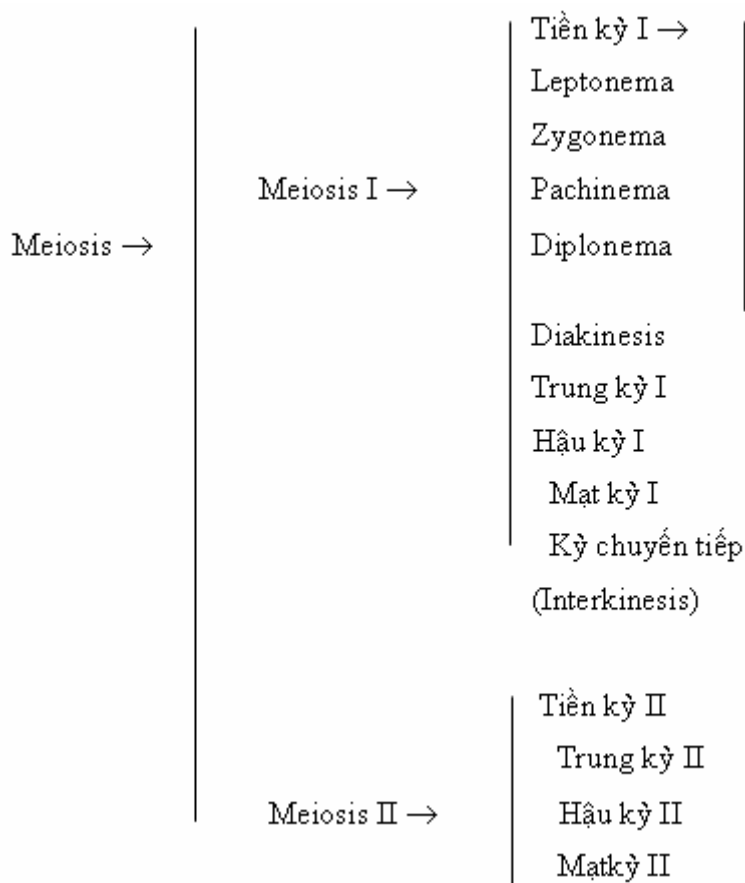
### 5.3.2 Sơ đồ chung của phân bào giảm nhiễm

Phân bào giảm nhiễm (Meiosis) do Boveri phát hiện lần đầu tiên vào năm 1887, nhưng mãi đến những năm 30 - 40 của thế kỷ XX các nhà tế bào học và di truyền học mới làm sáng tỏ vai trò quan trọng của chúng.

Qua phân bào giảm nhiễm các tế bào con có số lượng thể nhiễm sắc giảm đi 1/2 so với tế bào mẹ (do từ meo là 1/2).

#### 5.3.2.1 Sơ đồ chung

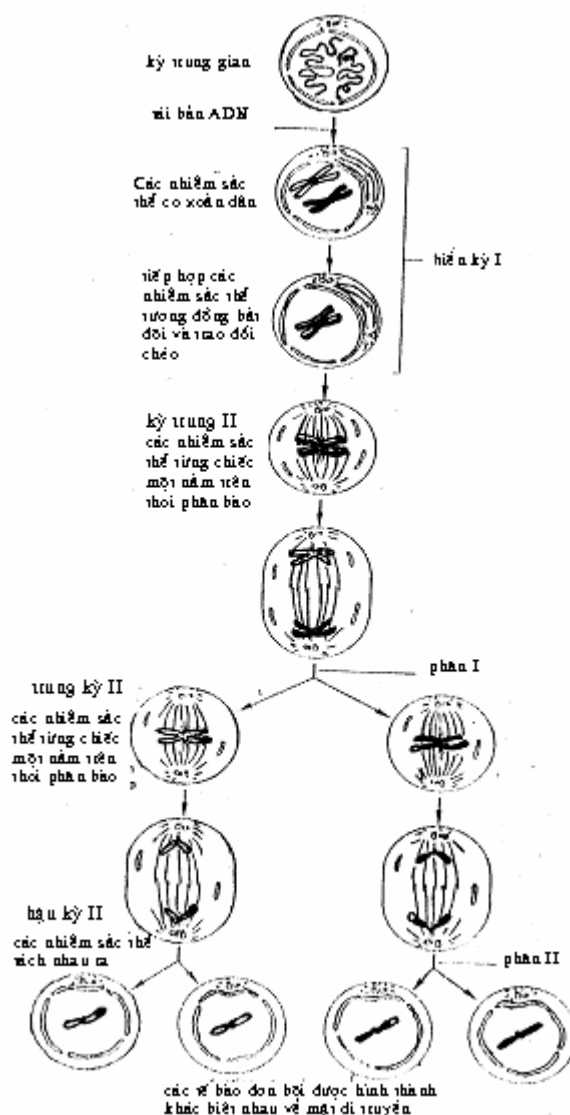
Phân bào giảm nhiễm gồm hai lần phân bào diễn ra theo sơ đồ sau:



#### 5.3.2.2 Phân bào giảm nhiễm I

Phân bào giảm nhiễm I được gọi là lần phân bào giảm nhiễm thực thụ vì qua lần phân I, hai tế bào con được tạo thành có số lượng thể nhiễm sắc đơn bội kép, còn lần phân bào II

được gọi là phân bào cân bằng diễn ra giống mitosis, trong đó một tế bào đơn bội kép phân chia thành hai tế bào đơn bội (các giao tử).



**Hình 5.3**

Các kỳ của phân bào giảm nhiễm

Phân bào giảm nhiễm I có thời gian kéo dài và rất phức tạp, đặc biệt là tiền kỳ I có thể kéo dài tới hàng ngày, hàng tháng thậm chí hàng năm.

Tiền kỳ I được phân thành năm giai đoạn tùy theo tập tính của thể nhiễm sắc:

*a. Giai đoạn Leptonema:* Xuất hiện các sợi nhiễm sắc xoắn, co ngắn có mang trung tiết, sắp xếp định hướng thành hình bó hoa và đính vào màng nhân.

*b. Giai đoạn Zygonema:* Sự sắp xếp có định hướng của các sợi nhiễm sắc tạo điều kiện cho sự tiếp hợp cặp đôi của các thể nhiễm sắc tương đồng. Cặp thể nhiễm sắc tương đồng là cặp gồm một chiếc có nguồn gốc từ bố và một chiếc có nguồn gốc từ mẹ. Sự tiếp hợp của các cặp tương đồng xảy ra rất chính xác: mỗi trung tiết tiếp hợp tương ứng với nhau, các về tiếp

hợp tương ứng trong đó các gen tiếp hợp tương ứng nhau. Sự tiếp hợp tương ứng, chính xác này chuẩn bị cho sự trao đổi chéo xảy ra ở giai đoạn tiếp.

*c. Giai đoạn Pachinema:* Được đặc trưng bởi hiện tượng trao đổi chéo (crossing over) giữa hai thể nhiễm sắc trong cặp tương đồng. Mỗi thể nhiễm sắc lúc này gồm hai nhiễm sắc tử chị em dính với nhau qua trung tiết (đã được nhân đôi qua pha S của gian kỳ).

Như vậy, một cặp tiếp hợp gồm hai thể nhiễm sắc tương đồng được gọi là lưỡng trị (bivalent), nhưng vì một thể nhiễm sắc lại gồm hai nhiễm sắc tử chị em nên còn được gọi là tứ tử (tetrad). Sự trao đổi chéo xảy ra giữa các nhiễm sắc tử không phải là chị em của cặp tương đồng. Qua sự trao đổi chéo các nhiễm sắc tử không phải chị em trao đổi các đoạn cho nhau - tức là trao đổi gen cho nhau giữa thể nhiễm sắc bố và mẹ, là quá trình được gọi là tái tổ hợp di truyền (genetic recombination).

Sự tiếp hợp (synapsis) và sự trao đổi chéo xảy ra là nhờ sự tạo thành phức hệ tiếp hợp (synapsis complex) ngay từ giai đoạn Zygonema. Phức hệ tiếp hợp bao gồm một trục protein ở trung tâm và hai giải protein ở hai bên dính kết với nhiễm sắc tử. Sự trao đổi chéo xảy ra được là nhờ hoạt động của nút tái tổ hợp (recombination nodule) có cấu trúc hình cầu hoặc ellip, có đường kính khoảng 90nm chứa một tập hợp protein. Ở vùng trao đổi chéo có xảy ra sự tổng hợp bổ sung một số lượng ADN.

Sự trao đổi chéo xảy ra ở đoạn nào của thể nhiễm sắc sẽ được biểu hiện rõ ở giai đoạn tiếp theo với các dạng bắt chéo (chiasma) khi các thể nhiễm sắc trong cặp tương đồng tách khỏi nhau.

Giai đoạn Pachinema có thể kéo dài hàng ngày.

*d. Giai đoạn Diplonema:* Đặc trưng bởi sự phân ly của các cặp tương đồng, phức hệ tiếp hợp biến mất. Hai thành viên của cặp tương đồng trong lưỡng trị tách khỏi nhau, tuy nhiên chúng vẫn còn dính nhau ở một vài điểm được gọi là điểm chéo (chiasma). Điểm chéo chính là vùng mà ở đó hai thể nhiễm sắc tương đồng trao đổi gen cho nhau. Trong noãn bào (oocyte) giai đoạn diplonema có thể kéo dài đến hàng tháng hoặc hàng năm vì lẽ rằng ở giai đoạn này thể nhiễm sắc dần xoắn, tạo nên một dạng thể nhiễm sắc đặc biệt gọi là thể nhiễm sắc chổi bóng đèn (lampbrush chromosome) với mục đích tổng hợp ARN và từ đó tổng hợp các chất dinh dưỡng cần thiết để tạo noãn hoàng cho trứng trong giai đoạn sinh trưởng.

*e. Giai đoạn Diakinesis:* Đặc trưng của giai đoạn này là các thể nhiễm sắc ngừng tổng hợp ARN, xoắn lại, cô đặc và dày lên. Trong mỗi nhóm tứ tử ta thấy rõ bốn nhiễm sắc tử: trong đó hai nhiễm sắc tử chị em vẫn dính với nhau qua trung tiết, còn các nhiễm sắc tử không phải chị em có trao đổi chéo thì dính với nhau qua điểm chéo. Điểm chéo là bằng chứng về tế bào học của hiện tượng trao đổi chéo và hoán vị gen giữa hai nhiễm sắc tử không phải chị em của cặp tương đồng. Do sự hình thành các điểm chéo nên ta thấy các dạng khác nhau của các cặp lưỡng trị: dạng chữ X (khi có một điểm chéo), dạng O (khi có hai điểm chéo) và dạng số 8 khi có ba điểm chéo).

Các thể nhiễm sắc tách khỏi màng nhân. Màng nhân, hạch nhân biến mất. Xuất hiện thoi và sao phân bào. Khi tiền kỳ I kết thúc, tế bào chuyển vào trung kỳ I, hậu kỳ I, mặt kỳ I và phân tế bào chất để hoàn thành phân chia I tạo ra hai tế bào đơn bội. Sự giảm nhiễm từ  $2n$  kép (với ý nghĩa là bốn nhiễm sắc tử của hai thể nhiễm sắc tương đồng) thành  $n$  kép (với ý nghĩa là hai nhiễm sắc tử chị em của một thể nhiễm sắc bố hoặc mẹ) là do cơ chế sắp xếp ở trung kỳ I và phân ly ở hậu kỳ I của các thành viên trong cặp tương đồng. Ở trung kỳ I, mỗi thành viên với hai nhiễm sắc tử chị em của cặp tương đồng xếp song song với mặt phẳng xích đạo theo cách xếp đối mặt với nhau, trung tiết dính với các sợi của thoi và như vậy, cả hai thành viên

xếp thẳng góc với trục của thoi và mỗi thành viên đôi mặt với một cực. Mặt phẳng cắt dọc giữa hai thể nhiễm sắc tương đồng chính là mặt phẳng phân ly ở hậu kỳ I.

Ở hậu kỳ I, mỗi thành viên của cặp tương đồng với hai nhiễm sắc tử chị em dính nhau ở trung tiết sẽ di chuyển về mỗi cực tế bào để qua mặt kỳ I và phân tế bào chất tạo thành hai tế bào con: trong đó mỗi tế bào con chỉ chứa thành viên của bố hoặc chỉ của mẹ (nghĩa là mang bộ đơn bội), nhưng mỗi thành viên vẫn có hai nhiễm sắc tử (nên gọi là đơn bội kép), do đó cần có lần phân II để phân chia nhiễm sắc tử chị em về hai tế bào cháu mang số thể nhiễm sắc đơn bội.

### 5.3.2.3 Phân bào giảm nhiễm II

Thường thường tiếp theo phân bào I, hai tế bào con trải qua một kỳ chuyển tiếp rất ngắn, trong đó không có sự nhân đôi thể nhiễm sắc, rồi chuyển sang phân bào II.

Lần phân bào II cũng trải qua các kỳ: tiền kỳ II, trung kỳ II, hậu kỳ II, mặt kỳ II và phân tế bào chất để tạo thành hai tế bào cháu mang thể nhiễm sắc đơn bội. Người ta nói lần phân bào II là phân bào cân bằng và nó tương tự với phân Mitosis vì sự phân ly ở hậu kỳ II giống hệt Mitosis, nghĩa các yếu tố phân ly là hai nhiễm sắc tử chị em tách khỏi nhau và di chuyển về hai cực theo mặt phẳng cắt dọc giữa hai nhiễm sắc tử chị em.

So với tiến trình phân bào I thì phân bào II xảy ra nhanh chóng với thời gian chỉ chiếm 1 – 10%.

Kết quả là qua hai lần phân bào, từ một tế bào  $2n$  kép đã tạo nên bốn tế bào chứa số lượng thể nhiễm sắc đơn bội  $n$  tức là các giao tử.

### 5.3.3 So sánh phân bào giảm nhiễm và phân bào nguyên nhiễm

Ta có thể so sánh sự khác biệt chủ yếu giữa sự phân bào giảm nhiễm và phân bào nguyên nhiễm theo các đặc điểm sau: (xem bảng sau).

**Bảng 5.1:** So sánh phân bào giảm nhiễm và phân bào nguyên nhiễm

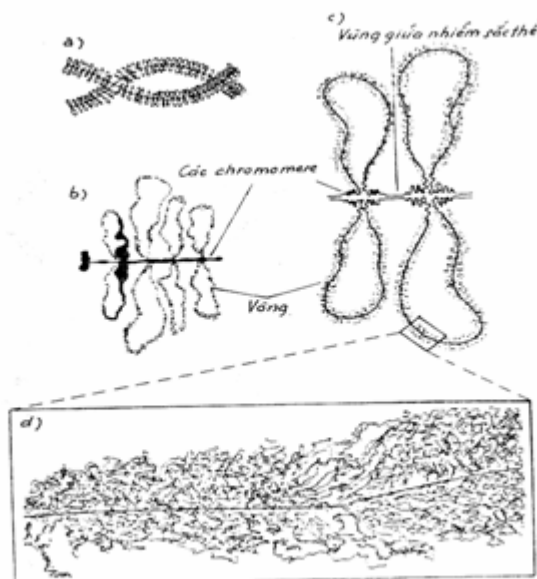
Mitosis	Meiosis
- Đặc trưng cho tất cả các dạng tế bào.	- Chỉ đặc trưng cho tế bào sinh dục đi vào quá trình chín để tạo giao tử.
- Tế bào con có bộ thể nhiễm sắc như tế bào mẹ ( $2n \rightarrow 2n$ ).	- Tế bào con có bộ thể nhiễm sắc giảm đi $1/2$ ( $2n \rightarrow n$ ).
- Gồm một lần nhân đôi thể nhiễm sắc và một lần phân chia.	- Phức tạp hơn, gồm một lần nhân đôi thể nhiễm sắc nhưng có hai lần phân chia: I và II.
- Gian kỳ giữa hai lần phân bào nguyên nhiễm có nhân đôi ADN và nhân đôi thể nhiễm sắc.	- Kỳ chuyển tiếp giữa phân chia I và phân chia II không có sự nhân đôi ADN và thể nhiễm sắc



<p>- Tiền kỳ ngắn, không có tiếp hợp và trao đổi chéo.</p>	<p>- Tiền kỳ I kéo dài (hàng tháng, hàng năm) có tiếp hợp và trao đổi chéo giữa hai thể nhiễm sắc tương đồng.</p>
<p>- Hậu kỳ: yếu tố phân ly về hai cực là hai nhiễm sắc tử chị em của một thể nhiễm sắc, phân ly khỏi nhau, mỗi nhiễm sắc tử đi về một cực.</p>	<p>- Hậu kỳ I: yếu tố phân ly là thành viên trong cặp tương đồng. Mỗi thành viên là thể nhiễm sắc bố hoặc mẹ (với hai nhiễm sắc tử chị em) phân ly khỏi lưỡng trị và di chuyển về hai cực.</p>
<p>- Phương thức sinh sản vô tính, vẫn giữ nguyên genom không đổi qua các thế hệ.</p>	<p>- Phương thức sinh sản hữu tính: bảo đảm khâu tạo thành giao tử. Nhờ tái tổ hợp di truyền tạo nên đa dạng trong genom qua các thế hệ.</p>

### 5.3.4 Thể nhiễm sắc chổi bóng đèn (Lampbrush chromosome)

Khi nghiên cứu phân bào giảm nhiễm của noãn bào ếch ở giai đoạn Diplonema người ta quan sát thấy dạng thể nhiễm sắc có cấu tạo đặc biệt được gọi là thể nhiễm sắc chổi bóng đèn. Thể nhiễm sắc chổi bóng đèn có thể đạt tới kích thước  $d = 20 - 40\mu\text{m}$  và  $l = 0,5\mu\text{m}$  có cấu trúc giống cái chổi để lau chùi bóng đèn thấp bằng dầu hỏa (nên có tên gọi chổi bóng đèn - lampbrush), hoặc giống cái chổi ống nghiệm. Thể nhiễm sắc gồm hai sợi trục mang các vòng bên xếp theo hình số 8 mà số lượng đạt tới hàng vạn chiếc. Nếu quan sát dưới kính hiển vi điện tử thì sợi trục gồm hai sợi nhiễm sắc ở dạng xoắn, còn các vòng bên là các sợi nhiễm sắc mở xoắn (hình 5.4).



Hình 5.4

Thể nhiễm sắc chổi bóng đèn

Trong các vòng bên mở xoắn các đơn vị hoạt động của gen đang tích cực tổng hợp nên ARN phục vụ cho việc tổng hợp các chất cần thiết cho sự phát triển của tế bào trứng về sau này. Thể nhiễm sắc chồi bóng đèn không chỉ được quan sát thấy ở noãn bào của giai đoạn tiền kỳ I ở con cái loài ếch nhái mà còn quan sát thấy ở cả tinh bào con đực tại giai đoạn tiền kỳ I của rất nhiều nhóm động vật không xương sống như: nhuyễn thể, tôm cua, côn trùng, loại thể nhiễm sắc này cũng tìm thấy ở noãn bào cá, lưỡng thê, chim, động vật có vú và người. Người ta cũng tìm thấy thể nhiễm sắc dạng chồi bóng đèn ở cả thực vật bậc thấp và thực vật bậc cao. Điều đó chứng tỏ tổ chức vòng bên của sợi nhiễm sắc (looped domains) được xem như là đơn vị tổ chức của hoạt động gen trong thể nhiễm sắc.

### 5.3.5 Ý nghĩa của phân bào giảm nhiễm

#### 5.3.5.1 Phân bào giảm nhiễm với sinh sản hữu tính

Phân bào giảm nhiễm tạo điều kiện cho sự hình thành giao tử mang bộ thể nhiễm sắc đơn bội của quá trình sinh sản hữu tính. Khi hai giao tử đực và giao tử cái thụ tinh hòa hợp để tạo thành hợp tử, bộ lưỡng bội được khôi phục do đó bảo đảm sự ổn định bộ thể nhiễm sắc qua các thế hệ nhờ sự luân phiên - phân bào giảm nhiễm (n) - thụ tinh (2n) - phân bào giảm nhiễm (n) - thụ tinh (2n) v.v..

Nếu không có phân bào giảm nhiễm thì theo đà thụ tinh qua các thế hệ thể bộ nhiễm sắc của loài sẽ tăng từ  $2n \rightarrow 4n \rightarrow 8n$  v.v..

#### 5.3.5.2 Phân bào giảm nhiễm với biến dị tổ hợp

Phân bào giảm nhiễm phối hợp với thụ tinh (tức là sinh sản hữu tính) để tạo nên đa dạng di truyền một cách có quy luật và tất yếu làm cơ sở cho chọn lọc tự nhiên và mở ra những hướng tiến hóa muôn màu muôn vẻ của Eucaryota. Sự đa dạng di truyền có được là do hiện tượng tái tổ hợp di truyền đem lại. Đối với cơ thể đơn bội cũng như tế bào lưỡng bội, sinh sản vô tính bằng phân bào nguyên nhiễm thì qua các thế hệ genom vẫn giữ nguyên không đổi nghĩa là không có biến dị di truyền, hoặc có biến dị thì chúng xảy ra ngẫu nhiên (do tác nhân bên trong hoặc do tác nhân môi trường) không theo quy luật, vì vậy ít tạo được đa dạng di truyền do đó hạn chế sự tiến hóa. Để khắc phục thiếu sót này, ở Prokaryota và ở Eucaryota bậc thấp đã xuất hiện hiện tượng tiếp hợp (conjugaison) giữa hai cá thể qua đó hai thể nhiễm sắc của hai cá thể có thể trao đổi gen cho nhau với mục đích đổi mới genom của mình tạo ra đa dạng di truyền. Có thể xem đó là hình thức sinh sản hữu tính sơ khai. Sự sinh sản hữu tính tiến hóa theo phương cách phối hợp phân bào giảm nhiễm - bảo đảm điều kiện cho sự trao đổi gen ngay trong cùng một tế bào dòng tế bào sinh dục và thụ tinh - bảo đảm sự tái tổ hợp lại toàn bộ genom của cá thể.

##### a. Sự trao đổi chéo

Sự trao đổi gen qua phân bào giảm nhiễm giữa hai cặp thể nhiễm sắc tương đồng bảo đảm sự đổi mới thành phần gen trong từng thể nhiễm sắc của bố và cả của mẹ. Sự trao đổi chéo xảy ra trong giai đoạn tiền kỳ I là nhờ sự tiếp hợp chính xác của hai thể nhiễm sắc tương đồng nhờ phức hệ tiếp hợp, có sự tổng hợp thêm ADN cần thiết và hoạt động của các protein SSB (protein giữ ổn định mạch đơn ADN); protein Rec A cũng như các enzym đặc trưng cho quá trình trao đổi gen giữa 2 đoạn ADN tương đồng. Nhờ hiện tượng trao đổi chéo kết hợp với hiện tượng phân ly không phụ thuộc của các cặp gen alen về giao tử sẽ dẫn đến hiện tượng, các giao tử được hình thành qua phân bào giảm nhiễm mang genom khác biệt với genom của thể hệ giao

từ trước đó. Số lượng giao tử khác biệt nhau xuất hiện qua Meiosis tùy thuộc vào sự phân ly độc lập của các thành viên trong cặp tương đồng, tức là tùy thuộc vào số đơn bội ( $n$ ): ví dụ nếu  $n = 2$  thì số giao tử khác biệt nhau sẽ là 4, nếu  $n = 3$  thì số giao tử khác biệt sẽ là 8. Khái quát chung số giao tử khác biệt được tạo thành sẽ bằng  $2^n$ , ví dụ ở người  $n = 23$  thì qua Meiosis sẽ tạo ra số lượng giao tử khác biệt nhau là  $2^{23}$ .

*b. Sự tái tổ hợp lại toàn bộ genom của hợp tử khi thụ tinh*

Khi thụ tinh có sự hòa hợp genom của giao tử đực và giao tử cái tạo thành một genom chung đặc trưng cho cơ thể tương lai. Sự tổ hợp hai genom này xảy ra một cách tự do và sự đa dạng di truyền của chúng tùy thuộc vào số giao tử tham gia tổ hợp. Nếu  $n = 2$  thì số giao tử khác biệt là 4 và số hợp tử đa dạng sẽ là  $4 \times 4 = 16$ . Nếu  $n = 3$  thì số giao tử sẽ là 8 và số hợp tử sẽ là  $8 \times 8 = 64$ . Khái quát hóa ta có số thể nhiễm sắc đơn bội là  $n$  thì số giao tử khác biệt là  $2^n$  và số hợp tử đa dạng là  $= 2^n \times 2^n$ . Ví dụ, ở người số giao tử khác biệt nhau được tạo thành là  $2^{23}$  và số hợp tử đa dạng là  $2^{23} \times 2^{23}$ .

Sự trao đổi chéo và tái tổ hợp gen xảy ra trong tiền kỳ của phân bào giảm nhiễm (meiosis) là đặc trưng cho sự sinh sản hữu tính khi hình thành giao tử của dòng tế bào sinh dục. Nhưng trong quá trình phát triển và biệt hóa các tế bào soma người ta đã quan sát thấy hiện tượng trao đổi chéo và tái tổ hợp gen giữa hai thành viên của cặp tương đồng qua mitosis được gọi là tái tổ hợp soma (somatic recombination).

### 5.3.5.3 Tái tổ hợp soma ở nấm *Aspergillus*

Nấm *Aspergillus nidulans* ở dạng các khuẩn ty (mixel) thường là đơn bội nhưng nhiều khi chúng liên kết tạo thành khuẩn ty lưỡng bội  $2n$  và trong nhiều trường hợp là cá thể dị hợp tử (heterozygote) về một gen nào đó. Khi những tế bào này phân chia mitosis thường quan sát thấy hiện tượng trao đổi chéo và tái tổ hợp gen. Sự trao đổi chéo xảy ra ở *Aspergillus* cho phép tạo nên những tổ hợp di truyền thích hợp để nấm có thể thích nghi dễ dàng với các thay đổi của môi trường sống. Bằng phương pháp đánh dấu gen có thể xác định được tần số tái tổ hợp gen xảy ra qua trao đổi chéo soma cũng như tần số đột biến soma.

### 5.3.5.4 Tái tổ hợp soma ở ruồi quả *Drosophila*

Ở Ruồi quả *Drosophila melanogaster* qua phân bào mitosis đã quan sát thấy có trao đổi chéo giữa các nhiễm sắc tử không phải chị em ở tiền kỳ. Có những con ruồi cái dị hợp về các gen lặn  $y$  (thân có màu vàng) và  $sn$  (lông cong):

$$\frac{y\ sn^+}{y^+\ sn}$$

Đây là những gen liên kết định khu trong thể nhiễm sắc X. Những cá thể cái này thường có thân màu xám và lông thẳng nhưng đôi khi xuất hiện những cá thể cái dị hợp mang một số bộ phận khảm tức là có phần thân màu vàng và phần thân mang lông cong. Xuất hiện phần thân thể với các tính trạng lặn rõ ràng là có liên quan tới hiện tượng trao đổi chéo trong tế bào soma. Khi làm tiêu bản tế bào mitosis, ta quan sát thấy sự kết hợp của các cặp thể nhiễm sắc tương đồng và các điểm trao đổi chéo ở tiền kỳ. Tùy thuộc vào miền trao đổi chéo xảy ra giữa gen  $sn$  và trung tiết (centromere) hoặc giữa gen  $y$  và  $sn$  - sẽ xuất hiện 2 điểm ( $sn$  và  $y$ ) hoặc 1 điểm (chỉ có  $sn$  hoặc  $y$ ). Điểm chéo đơn thường hiếm gặp bởi vì gen  $y$  và gen  $sn$  định khu gần nhau do đó trao đổi chéo giữa chúng xảy ra với tần số thấp.

Đối với ruồi quả, trao đổi chéo mitosis xảy ra không chỉ đối với thể nhiễm sắc giới tính mà còn quan sát thấy ở các thể nhiễm sắc thường, ví dụ thể nhiễm sắc số II và III. Sự hình thành thể nhiễm sắc đa sợi ở tuyến nước bọt ấu trùng ruồi quả không chỉ thể hiện đặc tính tăng cao số lượng sợi nhiễm sắc, đặc tính lặp đoạn (chứa nhiều đĩa và gian đĩa) mà còn thể hiện đặc tính trao đổi chéo soma. Trên tiêu bản số lượng thể nhiễm sắc chỉ có bốn dài dài dính với nhau tại trung nhiễm sắc (chromocentre) và dính với hạch nhân (ở ruồi quả  $2n = 8$ ) chứng tỏ các cặp thể nhiễm sắc tương đồng xếp tiếp hợp với nhau. Trên hình 2.1, cần chú ý là ở vai phải của thể nhiễm sắc số hai có hình vòng ở đó hai thể nhiễm sắc không có sự tiếp hợp.

### 5.3.5.5 Tái tổ hợp soma ở động vật có vú và người

Để làm sáng tỏ một dạng tái tổ hợp soma xảy ra trong quá trình biệt hóa tế bào soma, ví dụ về sự tái tổ hợp các gen mã hóa cho globulin miễn dịch trong các dòng tế bào limpho.

- Globulin miễn dịch (Ig-immunoglobulin) hay còn gọi là kháng thể (antibody) là loại glycoprotein được sản xuất bởi các tương bào có nguồn gốc từ tế bào limpho B. Khi có protein lạ được gọi là kháng nguyên (antigen) xâm nhập vào cơ thể thì cơ thể sẽ đáp ứng lại bằng chuỗi các đáp ứng miễn dịch tế bào và miễn dịch thể dịch. Cơ sở của đáp ứng miễn dịch là tổng hợp các Ig đặc trưng phản ứng liên kết với kháng nguyên làm trung hòa và mất độc tính của chúng. Bất kỳ một loại kháng nguyên đặc trưng nào xâm nhập vào cơ thể đều bị các kháng thể đặc trưng tương ứng làm trung hòa, như vậy nếu có hàng tỷ kháng nguyên đặc trưng khác nhau thì cơ thể phải sản xuất hàng tỷ kháng thể đặc trưng tương ứng khác nhau và trong hệ gen của tế bào limpho phải có đến hàng tỷ gen mã hóa cho các kháng thể đó. Trong thực tế trong tế bào người (kể cả tế bào limpho)  $2n$  chứa  $6 \times 10^9$  cặp nucleotit về lý thuyết có thể mã hóa cho 1 - 2 triệu gen (nếu tính trung bình một gen dài từ 1500 - 1800 cặp nucleotit), nhưng thực chất chỉ có 25.000 - 35.000 gen được hoạt hóa. Như vậy, phải có một cơ chế nào đó đảm bảo cho tế bào sản xuất đủ kháng thể đặc trưng đáp ứng đủ các dạng kháng nguyên.

Di truyền miễn dịch phân tử đã cho chúng ta câu trả lời:

+ Trong hệ gen của tế bào limpho có tồn tại họ gen gồm nhiều gen mã hóa cho mỗi một vùng (domaine) của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (khoảng 100 - 200 gen).

+ Có sự đột biến soma trong gen V nguyên gốc trong quá trình phát triển cá thể của tế bào limpho B.

+ Có sự tái tổ hợp soma giữa các gen trong họ gen mã hóa cho các vùng V (vùng biến đổi) và vùng C (vùng ổn định) của mạch L (mạch nhẹ) và mạch H (mạch nặng) của phân tử Ig. Sự tái tổ hợp gen xảy ra trong quá trình phát triển và biệt hóa của tế bào B để đạt tới sự tổng hợp các phân tử kháng thể đặc trưng đủ đáp ứng với tính đặc trưng đa dạng của kháng nguyên. Sự tái tổ hợp soma để tạo nên những gen mới từ những thành phần gen thuộc cùng họ gen cũng được quan sát thấy trong các họ gen mã hóa cho các họ protein phức tạp, ví dụ protein thụ thể tế bào limpho T (TCR) hoặc tế bào B (BCR). Tính đa dạng của thụ thể có thể đạt tới  $10^9$  loại phân tử khác nhau. Nhờ sự sắp xếp lại các gen tạo nên những tổ hợp gen mới đủ đáp ứng sự tổng hợp các thụ thể đa dạng đó.

- Sự tái tổ hợp lại các gen có sẵn để tạo nên những gen mới với sự xử lý chế biến các tiền mARN sau phiên mã để tạo nên các mARN chín khác nhau là cơ sở tạo nên sự đa dạng trong các họ protein của tế bào và cơ thể.

*Vấn đề thảo luận ở chương 5*

1. *Vẽ chu kỳ tế bào, liệt kê các kỳ và phân tích các hiện tượng xảy ra trong các kỳ G1, S, G2 và M của chu kỳ.*
2. *Vẽ sơ đồ phân bào nguyên nhiễm, mô tả các hiện tượng xảy ra trong tiền kỳ, trung kỳ, hậu kỳ, mạt kỳ và phân tế bào chất. Theo cơ chế nào mà các tế bào con vẫn giữ nguyên bộ NST như tế bào mẹ.*
3. *Phân tích sai khác giữa hình thức phân bào của động vật và thực vật.*
4. *Vẽ sơ đồ phân bào giảm nhiễm, nêu các đặc điểm của PBGN.*
5. *So sánh PBGN I với PBGN II. Phân tích sai khác.*
6. *Nêu ý nghĩa tiến hóa của PBGN và sinh sản hữu tính.*
7. *Làm bảng so sánh PBNN với PBGN.*

## Chương 6

### Điều chỉnh chu kỳ tế bào

Mục tiêu: Sau khi học xong chương này học viên có khả năng:

- Giải thích được cơ chế điều chỉnh chu kỳ trên cơ sở gen.
- Vẽ được sơ đồ điều chỉnh nhờ phức hợp cyclin- Cdk qua các giai đoạn của chu kỳ.
- Trình bày và giải thích được các yếu tố nội bào và ngoại bào tham gia điều chỉnh chu kỳ.

#### 6.1 Điều chỉnh chu kỳ tế bào ở cơ thể đa bào

Đối với cơ thể đơn bào thì chu kỳ sống của tế bào cũng là chu kỳ sống của cơ thể và chúng được kiểm soát trực tiếp bởi các yếu tố của môi trường. Đối với cơ thể đa bào tồn tại nhiều chủng quần tế bào soma, mỗi chủng quần được đặc trưng bởi nhịp điệu sinh trưởng và phân bào ổn định, được kiểm soát bởi mối tương quan giữa các tế bào, các mô và cơ thể. Sự ức chế tiếp xúc hay ức chế bề mặt dẫn đến sự kìm hãm quá trình phân bào. Bình thường tế bào gan không phân bào nhưng gan khi bị cắt bỏ một phần thì ở phần bị cắt bỏ các tế bào gan sẽ phân bào tích cực để bù đắp lại phần cắt bỏ. Có thể là các tế bào chết đã tiết ra một chất có tác động kích thích sự phân bào và sự phân bào diễn ra cho đến khi khối lượng gan đạt tới khối lượng nhất định thì dừng lại. Đó cũng là kiểu điều chỉnh theo cơ chế “liên hệ ngược”. Sự ung thư hóa là sự trục trặc trong cơ chế điều chỉnh phân bào, các tế bào khi bị mất sự ức chế phân bào sẽ phân bào tự do không chịu sự kiểm soát chung và di căn trở thành có hại cho cơ thể.

Như vậy, dù là cơ thể đơn bào hay cơ thể đa bào thì chu kỳ sống của chúng đều được điều chỉnh bởi nhiều cơ chế khác nhau. Chúng ta hãy xem xét một số cơ chế cơ điều chỉnh mà di truyền tế bào học phân tử đã làm sáng tỏ.

##### 6.1.1 Một hệ thống trung tâm phát động các quá trình cần thiết của chu kỳ

Để hiểu được cơ chế điều chỉnh của chu kỳ tế bào ta hãy xem xét tế bào như là một chiếc máy giặt quần áo. Chức năng giặt quần áo của máy gồm nhiều công đoạn nối tiếp nhau: lấy nước cùng bột giặt, vò quần áo, xả nước bẩn, vắt khô. Mỗi công đoạn diễn ra trong một thời gian nhất định và nối tiếp nhau. Cũng giống như vậy chu kỳ tế bào cũng gồm nhiều giai đoạn nối tiếp nhau như: sinh trưởng, nhân đôi ADN và phân bào. Mỗi giai đoạn diễn ra trong một thời gian nhất định và nối tiếp nhau. Giai đoạn trước phải được hoàn thành mới có thể tiếp theo giai đoạn sau và điều kiện của giai đoạn sau cũng đã được chuẩn bị trong giai đoạn trước. Trong cả hai trường hợp: chu kỳ tế bào và máy giặt, đều có nhân tố điều chỉnh trung tâm khiến cho các quá trình xảy ra liên tiếp nhau theo trình tự, theo thời gian trong đó nhân tố điều chỉnh hoạt động như một chiếc đồng hồ qui định nên thời gian hoạt động mỗi quá trình (giai đoạn) thông qua các điểm chốt (check points). Điểm chốt thể hiện cơ chế điều chỉnh theo mối liên hệ ngược nghĩa là sự hoàn thành quá trình trước là điều kiện phát động cho quá trình sau. Tuy nhiên, cơ chế điều chỉnh của chu kỳ tế bào phức tạp hơn nhiều, bởi vì các nhân tố

điều chỉnh như chúng ta đã biết là các phức hợp sinh hóa phức tạp hoạt động trong mối tương quan với nhau, với môi trường nội bào và ngoại bào.

Hệ thống điều chỉnh chu kỳ tế bào gồm các phức hệ sinh hóa tác động theo chu kỳ và đó là các phức hệ protein hoạt động tương tác và kích thích, phối hợp với các quá trình tiền thân cần thiết cho sự nhân đôi ADN và phân ly của ADN. Trong chu kỳ hệ thống điều chỉnh đến lượt mình lại được kiểm tra bởi các “phanh” có tác động phanh hãm chu kỳ ở các điểm chốt đặc biệt.

Như vậy, khi các quá trình tiền thân đã hoàn thành là điều kiện cần cho sự khởi động quá trình tiếp theo của chu kỳ, nhưng cũng có thể bị ách lại ở các điểm chốt. Hệ thống “phanh” rất quan trọng, bởi vì nó cho phép kiểm tra hệ thống điều chỉnh của chu kỳ bởi các tín hiệu đến từ môi trường.

Các tín hiệu của môi trường tác động lên hệ thống điều chỉnh bởi hai điểm chốt chủ yếu: một ở giai đoạn G1 ngay trước khi vào giai đoạn S và một điểm chốt ở G2 là điểm mà ở đó hệ thống điều chỉnh thực hiện quá trình có tác động khởi động sự phân bào ở M. Đối với các tế bào không đi vào phân bào thì chu kỳ bị phanh ngay ở điểm chốt ở G1.

Đối với tế bào nấm men điểm chốt ở G1 thường được gọi là điểm xuất phát - điểm S (start point), còn đối với tế bào động vật điểm chốt này được gọi là điểm hạn định - điểm R (restriction point).

### 6.1.2 Hệ thống điều chỉnh chu kỳ - phức hệ các protein-kinaza

Đã có nhiều nghiên cứu trên các đối tượng khác nhau như: nấm men, tế bào phôi sớm, tế bào động vật có vú, trong nuôi cấy *invitro* đều chứng minh rằng hệ thống điều chỉnh chu kỳ tế bào là gồm hai họ protein chủ yếu. Họ thứ nhất là các kinaza phụ thuộc cyclin - Cdk (cyclin dependant kinaza) có tác dụng phát động các quá trình tiền thân bằng cách gây photphorin hóa nhiều protein đặc trưng tại gốc serin và threonin. Họ protein thứ hai là các protein đặc biệt được gọi là cyclin (được gọi như thế vì chúng xuất hiện theo chu kỳ tế bào - cell cycle), các cyclin đóng vai trò kiểm tra hoạt tính photphorin hóa của Cdk đối với các protein đích.

Khi cyclin liên kết với Cdk thành một phức hệ thì Cdk ở trạng thái hoạt tính và khi cyclin tách khỏi Cdk thì Cdk không có hoạt tính. Như vậy, bằng cơ chế tổng hợp và phân giải protein cyclin cùng với cơ chế tạo phức hệ và giải thể phức hệ cyclin-Cdk tế bào điều chỉnh chu kỳ sống của mình. Có thể có nhiều loại cyclin khác nhau nhưng người ta xếp chúng vào hai loại chủ yếu là các cyclin mitosis là các cyclin liên kết với Cdk trong giai đoạn G2 và cần thiết để tế bào đi vào mitosis và loại cyclin G1 là các cyclin liên kết với Cdk trong giai đoạn G1 và cần thiết cho tế bào đi vào giai đoạn S.

Người ta cho rằng đối với nấm men chỉ có một loại Cdk hoạt động ở cả hai điểm chốt G1 và G2, còn đối với động vật có vú có thể có tối thiểu là hai loại Cdk khác nhau, mỗi loại tác động cho một điểm chốt.

Sự hoạt hóa và không hoạt hóa của Cdk trong mỗi giai đoạn của chu kỳ thể hiện sự chuyển giai đoạn của chu kỳ và cũng là thể hiện hiệu quả của hệ điều chỉnh lên chu kỳ bằng cách phát động các phản ứng dẫn tới sự chuyển sang giai đoạn kế tiếp sau đó của chu kỳ. Sự hình thành phức hệ cyclin - Cdk ở G1 cho phép tế bào chuyển từ G1 sang S và sự hình thành phức hệ cyclin - Cdk ở G2 cho phép tế bào chuyển từ G2 sang giai đoạn M. Để hiểu rõ hơn cơ chế điều chỉnh trên đây người ta đã phân tích và lý giải bằng các nghiên cứu trên nhiều đối tượng khác nhau.

### 6.1.3 Chu kỳ của tế bào phôi sớm và vai trò của MPF

Đối với các tế bào có chu kỳ chuẩn thì tế bào phải trải qua G1 là giai đoạn sinh trưởng đủ dài mới chuyển sang giai đoạn S để nhân đôi hàm lượng ADN và chỉ sau khi quá trình nhân đôi ADN hoàn thành thì tế bào mới bước vào giai đoạn G2 và M để phân bào. Như vậy, chu kỳ chuẩn phải kéo dài trong một thời gian đủ dài để hoàn thành các giai đoạn cần thiết trước khi phân bào và hệ thống điều chỉnh của chu kỳ hoạt động thích ứng với thời gian đó.

Các tế bào của phôi ở giai đoạn phát triển sớm của nhiều động vật có chu kỳ bất thường. Chúng phân bào rất nhanh và bỏ qua giai đoạn sinh trưởng G1 và như vậy đòi hỏi sự hoạt động của hệ điều chỉnh phải thích ứng với trạng thái đó, nghĩa là cho phép tế bào trong thời gian ngắn nhất phải hoàn thành được các quá trình tối ưu cần thiết là nhân đôi hệ gen và phân ly hệ gen về hai tế bào con.

Các nhà nghiên cứu đã sử dụng phôi sớm của ếch Châu phi (*Xenopus*) để xem xét hệ thống điều chỉnh như vậy.

Tế bào trứng của ếch là một tế bào rất lớn, đạt đường kính khoảng 1mm, chứa một nhân bé nhưng chứa tế bào chất với khối lượng 100.000 lần nhiều hơn tế bào bình thường, bởi vì trong tế bào chất của trứng chứa nhiều chất dinh dưỡng cần thiết đủ cho sự phát triển của trứng đến giai đoạn nòng nọc.

Noãn bào (ovocyte - tiền thân của tế bào trứng) sau khi đã qua Meiosis I, trong đó số lượng thể nhiễm sắc đã giảm thành đơn bội (n) và như chúng ta đã biết đặc trưng cho Meiosis là có một lần nhân đôi ADN nhưng trải qua hai lần Meiosis (I và II). Sự sinh trưởng của noãn bào để tích lũy các chất dinh dưỡng trải qua thời gian rất dài, vì vậy tiến trình Meiosis bị ách lại ở pha G2 của chu kỳ chuẩn.

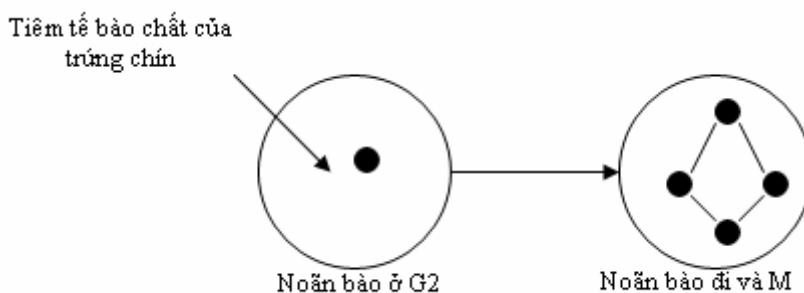
Để noãn bào có thể vượt qua điểm chốt để hoàn thành chu kỳ và trở thành trứng chín, đòi hỏi phải có hormon tác động đến noãn bào.

Khi trứng được thụ tinh, trứng nhanh chóng phân bào nguyên nhiễm liên tục cho ra một phôi có hàng nghìn tế bào bé mà không cần tăng trưởng và điều kiện cần độc nhất là tổng hợp và nhân đôi ADN qua một chu kỳ. Chu kỳ phân bào đầu tiên kéo dài khoảng 90 phút, nhưng 11 chu kỳ phân bào tiếp theo với khoảng cách chỉ 30 phút và trong khoảng 7 giờ đã hình thành phôi với  $2^{12}$  (4096) tế bào con. Mỗi chu kỳ bao gồm giai đoạn M → 15 phút và gian kỳ (interphase - giữa hai lần M) kéo dài 15 phút đủ để nhân đôi ADN, như vậy coi như không có G1 và G2.

Nhân tố điều chỉnh có trong tế bào chất kiểm tra cửa đi vào M. Vấn đề đặt ra là tại sao các tế bào phôi sớm lại vượt qua được các điểm chốt dừng G1 và G2 để đi vào M nhanh như vậy? Hai thí nghiệm chủ yếu cho phép người ta giả thiết là có nhân tố tồn tại trong tế bào chất của tất cả các tế bào đang ở trạng thái phân chia và nhân tố đó đã phát động cho tế bào đi vào M.

Thí nghiệm thứ nhất sử dụng các noãn bào của ếch đang bị ách lại ở G2 của Meiosis I tức là không đi được vào M. Người ta tiêm tế bào chất của trứng ếch đã chín nhưng chưa thụ tinh vào trong noãn bào đang ở giai đoạn G2 của Meiosis I bị ách lại ở G2, thì noãn bào này sẽ chuyển vào M để tiếp tục hoàn thành phân bào và trở thành tế bào trứng chín. Nhân tố có hoạt tính đó có trong tế bào chất được đặt tên là nhân tố phát động trứng chín - MPF (Maturation Promoting Factor) cũng là nhân tố phát động mitosis hoặc meiosis (Mitosis Promoting Factor - MPF). Bởi vì, nhiều thí nghiệm đã chứng minh chính MPF cũng là nhân tố phát động để tế bào vượt qua điểm chốt G2 để tiến vào M (xem hình 1.7)





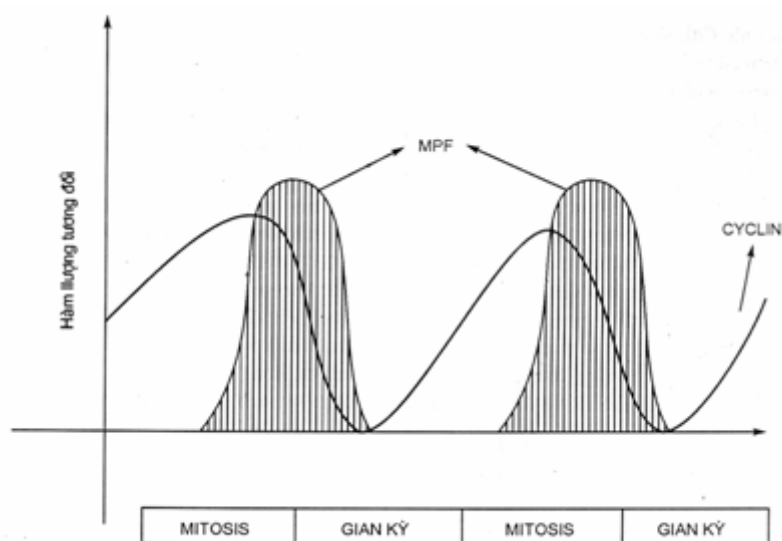
**Hình 6.1**

Thí nghiệm tiêm tế bào chất của trứng ếch đã chín có chứa MPF vào noãn bào ếch ở giai đoạn G2 của Meiosis I

Loại thí nghiệm thứ hai được tiến hành với các tế bào động vật có vú. Vì tế bào động vật có vú rất bé (từ 10 - 30 $\mu$ m) nên khó sử dụng phương pháp tiêm, cho nên thông thường người ta nuôi cấy *invitro* chung nhau các tế bào ở các giai đoạn khác nhau của chu kỳ, tạo điều kiện cho chúng hòa hợp lẫn nhau (bằng phương pháp lai tế bào soma). Ví dụ, đem các tế bào đang ở giai đoạn M (giai đoạn phân bào) nuôi chung với tế bào ở giai đoạn G1 hoặc giai đoạn S, hoặc giai đoạn G2 thì các tế bào này (dù ở giai đoạn nào của I  $\rightarrow$  gian kỳ) sẽ đi vào giai đoạn M, thể hiện ở chỗ nhân của chúng có xu thế cô đặc, xoắn ngắn lại giống như thể nhiễm sắc của các tế bào đang ở giai đoạn phân bào.

Như vậy, nhân tố MPF không chỉ có tác dụng phát động để vượt qua điểm chốt dừng ở G2 và có thể cũng là nhân tố phát động vượt qua điểm chốt dừng ở G1 cho phép tế bào đi vào S.

Nhiều thí nghiệm đã chứng minh rằng đối với tế bào phôi ếch sớm thì hoạt tính của MPF được tăng cao ở giai đoạn phân bào và giảm bớt ở giai đoạn gian kỳ theo chu kỳ đỉnh cao 30 phút, như vậy hoạt tính phân bào là tùy thuộc vào hoạt tính của MPF. Nhiều thí nghiệm loại bỏ nhân tế bào cũng đã chứng minh được rằng hoạt tính của MPF là đến từ tế bào chất và không phụ thuộc vào sự có hay không của quá trình nhân đôi ADN trong nhân. Nhưng khi quá trình tổng hợp protein ở G1 bị ức chế thì hoạt tính của MPF và cả tiến trình phân bào cũng bị ức chế, như vậy hoạt tính của MPF là có liên quan mật thiết đến sự tổng hợp protein đặc trưng trong gian kỳ. Để chứng minh, người ta làm thí nghiệm với phôi sớm của cầu gai, có chu kỳ tế bào giống phôi sớm của ếch. Sử dụng phương pháp đánh dấu bằng phóng xạ ( $S^{35}$  methionin) để theo dõi sự tổng hợp protein qua các chu kỳ tế bào người ta chứng minh rằng một loại protein đặc biệt được tích lũy theo tiến trình của chu kỳ: trong giai đoạn gian kỳ chúng được tích lũy nhiều cho tới giai đoạn phân bào ở bước chuyển trung kỳ - hậu kỳ và sau đó giảm đi đột ngột, vì vậy người ta đặt tên cho loại protein này là cyclin (xem hình 6.2).



**Hình 6.2**

Sự tăng và giảm MPF và Cyclin qua các chu kỳ tế bào phôi ếch sớm

Người ta giả thiết rằng có tồn tại một số cyclin, khi hàm lượng của chúng đạt tới ngưỡng nào đó sẽ tác động hoạt hóa MPF và khi chúng bị phân hủy sẽ làm bất hoạt MPF và ức chế phân bào.

Để làm sáng tỏ vai trò của cyclin, người ta theo dõi chu kỳ tế bào *invitro*. Người ta tách chiết tế bào chất của các phôi ếch đang phát triển và cho vào nuôi cấy *invitro*. Người ta tách nhân của tinh trùng ếch và cho các nhân đó vào môi trường nuôi cấy *invitro* có tế bào chất của phôi bào. Qua một thời gian các nhân tinh trùng trương phồng và nhân đôi ADN và trong tế bào đã được thụ tinh, người ta có thể dùng phản ứng đó làm chỉ thị để xác định các giai đoạn của chu kỳ tế bào mà từ chúng tế bào chất được chiết xuất và sử dụng.

Nếu người ta đem phân hủy hết mRNA trong tế bào chất được nuôi cấy *invitro* thì chu kỳ tế bào bị đình chỉ ở gian kỳ giống như trường hợp có sự ức chế tổng hợp protein ở các phôi bào. Trái lại nếu ta đem cho thêm mRNA mã hóa cho cyclin được tinh chế thì hoạt tính MPF được khôi phục và phát động phân bào. Điều đó chứng tỏ rằng hoạt tính của MPF phát động phân bào phụ thuộc vào cyclin được tổng hợp và tích lũy đến một ngưỡng nào đó. Tuy nhiên, hoạt tính của MPF không chỉ phụ thuộc vào cyclin mà còn phụ thuộc vào sự tác động của một số protein khác nữa và cyclin chỉ được xem là một phần của phức hệ, đóng vai trò điều chỉnh hoạt tính của protein kinaza (Cdk) trong phức hệ MPF.

Như vậy, sự tích lũy là cần thiết cho sự đi vào mitosis và sự phân hủy đột ngột cyclin là cần thiết cho sự thoát ra khỏi mitosis. Thường thì cyclin bị phân hủy ở mitosis khi chuyển từ trung kỳ sang hậu kỳ.

Có nhiều loại (có thể có đến 5 loại) cyclin tác động qua chu kỳ tế bào khi liên kết với Cdk.

Như chúng ta đã nêu ở trên, phức hệ MPF gồm hai cấu thành là cyclin đóng vai trò điều chỉnh, cấu thành kia là Cdk (protein kinaza) đóng vai trò là enzym kinaza là phân mang hoạt tính. Cdk sẽ thể hiện hoạt tính photphorin hóa các protein khác cần thiết cho chu kỳ tế bào

bao gồm các protein có vai trò làm thể nhiễm sắc co đặc lại, làm phân hủy màng nhân (tác động đến tấm lamina), tạo thoi phân bào v.v..

Một quá trình quan trọng nhất đòi hỏi phải có đủ thời gian xảy ra trước khi mitosis là sự tái bản ADN phải được hoàn thành, như vậy phải có cơ chế kiểm tra ngược đến từ ADN đang được tái bản nhằm ngăn hệ thống kiểm tra tích cực làm cho tế bào tiến vào M và như vậy ngăn chặn cho tế bào rơi vào tình trạng nguy hiểm “phân bào tự diệt” (vì không đủ lượng ADN để phân cho hai tế bào con). Tuy nhiên, ở phôi ếch sớm trong các chu kỳ tế bào đầu tiên diễn ra trong khoảng 30 phút đầu thì hầu như bỏ qua G1 và G2, như vậy không có tính hiệu kiểm tra ngược. Người ta cho rằng ở đây các điều kiện cho sự tái bản ADN đã có đầy đủ từ môi trường dinh dưỡng trong tế bào trứng, đủ để thực hiện 12 chu kỳ phân bào mà không cần chuẩn bị trước và sau thời gian đó, cơ chế kiểm tra ngược sẽ hoạt động giống như ở chu kỳ tế bào chuẩn. Ngoài ra, còn tồn tại cơ chế kiểm tra tác động ức chế tái bản ADN xảy ra nhiều lần nếu như ADN đó đã được tái bản qua một chu kỳ trước khi vào M

#### 6.1.4 Điều chỉnh chu kỳ tế bào ở nấm men - Các gen mã hóa cyclin và Cdk

- Nấm men thuộc giới Nấm (Fungi) là cơ thể đơn bào, đồng thời là đối tượng rất thích hợp trong nghiên cứu di truyền tế bào và sinh học phân tử. Do chúng sinh sản rất nhanh chóng và dễ nuôi trong điều kiện invitro, vì vậy sử dụng chúng để thực hiện các nghiên cứu về di truyền như: xác định, chọn dòng các gen chịu trách nhiệm điều chỉnh chu kỳ tế bào, bởi vì về cơ chế điều chỉnh chu kỳ tuy ít nhiều khác với động vật nhưng cùng có chung nguyên tắc.

Hai loài nấm men thường được sử dụng để nghiên cứu về chu kỳ tế bào là nấm men mọc chồi (*Saccharomyces cerevisiae*) và nấm men phân đôi (*Schizosaccharomyces pombe*). Chúng đều tồn tại ở dạng đơn bội hoặc lưỡng bội và có chu kỳ sinh sản vô tính và hữu tính xen kẽ nhau. Khi trong môi trường đủ dinh dưỡng nấm men mọc chồi ở các dạng tế bào lưỡng bội sẽ phân bào nguyên nhiễm (bằng cách mọc chồi con và lớn lên, sau đó tách ra thành hai tế bào) với chu kỳ khoảng 2 giờ. Khi môi trường nghèo chất dinh dưỡng, các tế bào lưỡng bội sẽ phân bào giảm nhiễm (bằng nảy chồi) cho ra các bào tử đơn bội. Bào tử sẽ nảy mầm thành cơ thể đơn bội và khi điều kiện môi trường thuận lợi chúng có thể phân bào nguyên nhiễm (bằng nảy chồi) cho ra các tế bào đơn bội hoặc các tế bào đơn bội kết hợp hữu tính ở giai đoạn G1 cho ra tế bào lưỡng bội.

Trái lại, nấm men phân đôi thường sinh sản vô tính (phân bào bằng cách phân đôi) ở dạng các tế bào đơn bội khi môi trường thuận lợi, nếu môi trường nghèo chất dinh dưỡng chúng sẽ kết hợp hữu tính cho ra các tế bào lưỡng bội. Các tế bào lưỡng bội nhanh chóng đi vào giảm phân cho ra các bào tử và bào tử sẽ tái sinh thành cơ thể đơn bội khi có điều kiện thuận lợi.

Chu kỳ tế bào nấm men kéo dài khoảng 2 giờ và nói chung phức tạp hơn so với chu kỳ tế bào phôi sớm của ếch, bởi vì đối với nấm men cũng như đa số tế bào là cần có thời gian để sinh trưởng trước khi đi vào phân bào nghĩa là chúng cần có giai đoạn G1 và G2 trong chu kỳ. Ở giai đoạn G1 có điểm chốt là điểm S (start) giữ cho tế bào đủ thời gian sinh trưởng và tăng khối lượng gấp đôi cũng như chuẩn bị điều kiện trước khi vào giai đoạn S (tức giai đoạn synthesis-nhân đôi ADN). Trong trường hợp có điểm chốt G2 thì tế bào cần vượt qua chốt này trước khi vào M.

Đối với nấm men mọc chồi thì điểm S (điểm chốt G1) là quan trọng nhất vì nó kiểm tra độ sinh trưởng về kích thước tế bào và chịu ảnh hưởng của môi trường. Trong lúc đó, đối với nấm men phân đôi thì điểm chốt G2 lại là quan trọng hơn, nó kiểm soát cửa vào M.

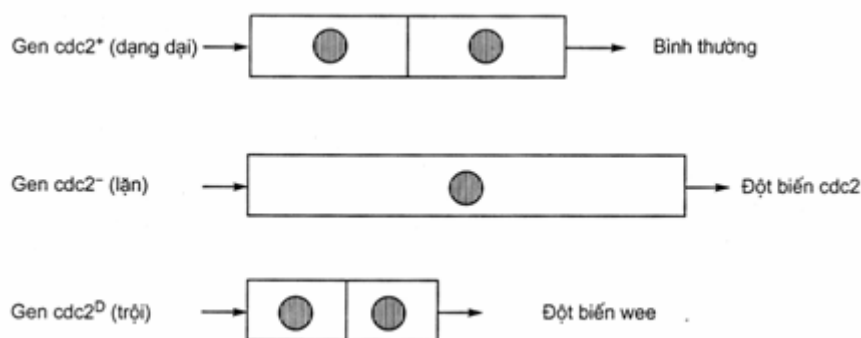
- Khi sử dụng nấm men (*Schizosaccharomyces pombe*) làm thí nghiệm để nghiên cứu chu kỳ tế bào, người ta phát hiện nhiều thể đột biến (mutant) trong đó hai thể đột biến về kiểu hình được quan tâm là thể đột biến cảm nhiệt và có nguồn gốc là do đột biến gen gây nên. Những gen đột biến này gây ảnh hưởng lên chu kỳ tế bào nấm men phân đôi.

Đột biến thứ nhất được gọi là đột biến *cdc2* (do gen đột biến *cdc2* gây nên) làm cho tế bào to hơn, dài hơn bình thường, vì chúng không phân đôi (không vượt qua điểm chốt G2 vào M).

Đột biến thứ hai được gọi là đột biến *wee* (do gen đột biến *wee* gây nên) làm cho tế bào bé hơn tế bào bình thường vì tế bào mẹ lớn chưa đủ độ đã phân đôi trở thành tế bào con bé hơn (vượt qua điểm chốt G2 sớm hơn để vào M).

Bằng phương pháp di truyền phân tử và công nghệ gen, người ta đã chứng minh được rằng gen đột biến *cdc2* và *wee* là dạng đột biến của gen dại (gen gốc) là *cdc2<sup>+</sup>*. Những tế bào nấm men phân đôi dạng dại, tức là dạng bình thường (có chu kỳ tế bào bình thường) sẽ sinh trưởng và phân đôi cho ra các tế bào con có kích thước bình thường.

Người ta quy định protein do gen *cdc2* mã hóa là protein *Cdc2* (với chữ C đầu viết hoa). Nghiên cứu protein này ở các thể đột biến cho thấy trong trường hợp đột biến *wee* (đột biến bé) hoạt tính của protein *Cdc2* rất cao dẫn đến phân bào sớm hơn (tức là vượt qua chốt G2 sớm hơn nên cho ra tế bào con bé hơn bình thường), còn trong trường hợp đột biến *cdc2* (đột biến dài) thì không có hoạt tính của protein *Cdc2*, do đó tế bào bị ách lại không vượt qua điểm chốt G2 nên không phân bào và trở thành dài, lớn hơn bình thường (xem hình 6.3)



**Hình 6.3**

Sơ đồ các gen *cdc2* và kiểu hình *S.pombe*

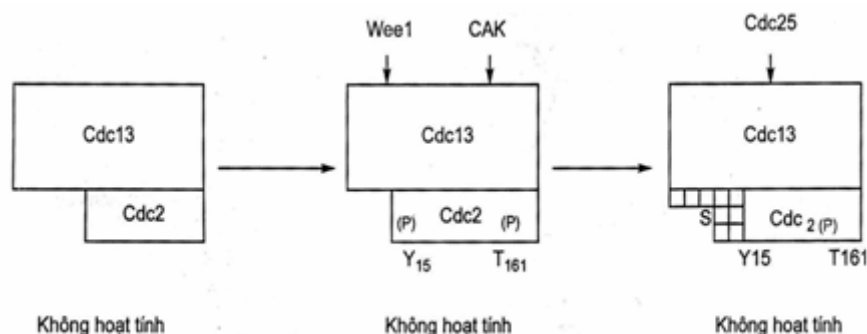
Như vậy, đột biến gen *wee* là dạng đột biến trội của *cdc2* (được ký hiệu là *cdc2<sup>D</sup>*) tức là sinh sản ra nhiều protein *Cdc2* hơn bình thường, còn đột biến *cdc2* là đột biến lặn (được ký hiệu là *cdc2<sup>-</sup>*) tức sẽ không sinh sản ra protein *Cdc2* (hoặc sinh sản ra *Cdc2* không có hoạt tính) và do vậy protein *Cdc2* là protein đóng vai trò điều chỉnh chủ chốt trong chu kỳ tế bào từ G2 sang M. Bằng phương pháp thay thế và tái tổ hợp gen, người ta đã chứng minh được rằng *Cdc2* là protein kinaza tức là phần hoạt tính của phức hệ MPF.

Nghiên cứu trên nấm men *S.pombe* người ta còn phân lập được gen *cdc13<sup>+</sup>* có vai trò cho phép tế bào đi vào mitosis và gen này mã hóa cho protein tương tự cyclin B ở phôi ếch và cầu gai. Chính cyclin *Cdc13* liên kết với *Cdc2* để tạo thành phức hệ MPF ở nấm men có tác động để nấm men chuyển chu kỳ tế bào từ G2 sang M.

Nghiên cứu trên các thể đột biến của nấm men *S.pombe*, người ta còn phát hiện ra hai gen khác nữa là gen *cdc25* và gen *wee1*. Gen *cdc25* mã hóa cho protein *Cdc25* có tác dụng kích hoạt phức hệ MPF, trong lúc đó sản phẩm của gen *wee1* là protein *Wee1* lại đóng vai trò ức chế hoạt tính của MPF. Như vậy, bản thân phức hệ MPF (*Cdc2-Cdc13*) chưa có hoạt tính ngay, mà hoạt tính của chúng còn được kiểm tra bởi *Cdc25* và *Wee1*. Nghiên cứu sinh hóa protein cho phép xác định protein *Cdc25* của MPF là protein photphataza có tác động giải photpho hợp phần *Cdc2* của MPF do đó kích hoạt chúng và *Wee1* là protein kinaza có tác động photphorin hóa đối với một kinaza khác CAK. Kinaza CAK đóng vai trò photphorin hóa *Cdc2* của MPF.

Như vậy, ở *S. pombe* tham gia vào sự điều chỉnh hoạt tính của MPF có đến 3 loại protein là *Cdc25*, *Wee1* và CAK. Người ta sơ bộ đưa ra mô hình điều chỉnh hoạt tính của MPF như sau: Khi nồng độ cyclin B (tức *Cdc13*) đủ sẽ liên kết với *Cdk* (tức *Cdc2*) tạo thành phức hệ MPF. Hợp phần *Cdc2* trong MPF có thể được photphorin hóa (liên kết với photpho) ở hai vị trí điều chỉnh là vị trí tyrosin15 (Y15) và vị trí threonin161 (T161). Ở trạng thái này MPF vẫn chưa có hoạt tính, chỉ khi vị trí T161 của *Cdc2* bị giải photpho (bị lấy mất photpho) do tác động của *Cdc25* là một photphataza thì MPF mới trở thành có hoạt tính, nghĩa là có khả năng liên kết với cơ chất tức là protein mà nó cần photphorin hóa. Người ta cho rằng hợp phần cyclin (*Cdc13*) không chỉ có vai trò cố định *Cdc2* mà chúng còn tham gia vào tạo hình liên kết của MPF với cơ chất (xem hình 6.4).

Người ta tìm thấy gen đột biến *wee* sinh sản ra protein kinaza *Cdc2* bị sai lệch ở chỗ vị trí tyrosin 15 bị thay thế bởi phenylalanin không thể photphorin hóa dẫn tới tăng cao hoạt tính của *Cdc2* và kết quả tế bào vào M sớm hơn cho ra các tế bào có kiểu hình bé hơn (thể đột biến *wee*).



**Hình 6.4**

Sơ đồ hoạt hóa của phức hệ MPF (*Cdc2* + *Cdc13*)

(P) - photphat; Y15-Tyrosin; T161 Threonin; S - bề mặt liên kết

- Đối với nấm men mọc chồi *S. cerevisiae* thì điểm chốt quan trọng của chu kỳ là điểm G1, là điểm mà tế bào cần vượt qua để vào S. Để vượt qua điểm S ở nấm men mọc chồi tối thiểu có ba điều kiện quan trọng là kích thước tế bào phải đủ lớn, các chất dinh dưỡng cung cấp đủ và nhu cầu giao phối hữu tính. Nếu tế bào thiếu chất dinh dưỡng thì chúng sẽ dừng lại ở G1 lâu hơn. Và khi tế bào đòi hỏi phải tiếp hợp hữu tính thì chúng cũng dừng lại ở G1 để chuẩn bị tiếp hợp với các tế bào khác để sinh sản hữu tính cho ra tế bào 2n.

Khi nghiên cứu các dạng đột biến cảm nhiệt ở *S. cerevisiae*, người ta phát hiện ra các dạng sau: dạng không chồi, dạng có chồi kích thước trung gian và dạng chồi lớn. Các dạng đột biến

này đều do đột biến trong gen *cdc* đặc biệt gây nên. Như ta đã biết ở *S.cervisiae* người ta quy định kiểu dại được ký hiệu là *CDC28*, còn gen đột biến lặn là *cdc28* và protein do chúng mã hóa được ký hiệu là *Cdc28*.

Gen kiểu dại *CDC28* được tách chiết và chúng được dùng để thay thế cho gen đột biến không chồi nghĩa là các thể đột biến không chồi được thay thế bằng gen *CDC28* sẽ mọc chồi bình thường và chuyển từ G1 sang S và đi vào phân bào. Sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen *CDC28*, kỹ thuật chuyển gen vào *E.coli* và nghiên cứu protein *Cdc28* mã hóa bởi gen *CDC28* người ta cho rằng chúng là protein kinaza, chúng có hoạt tính và tương tự *Cdc2* ở *S. pombe*. Bằng thực nghiệm gen *CDC28* có thể thay thế cho gen *cdc2<sup>-</sup>* ở thể đột biến của *S. pombe*.

Như vậy, các gen *CDC<sup>28</sup>* và *cdc28* ở *S.cervisiae* đều mã hóa cho protein kinaza phụ thuộc cyclin (tức là *cdk*) nhưng hai kiểu hình đột biến cảm nhiệt khác nhau: đột biến *cdc2<sup>-</sup>* ở *S.pombe* bị ách lại ở G2, trong lúc đó kiểu hình đột biến *cdc28* bị ách lại ở G1. Vì protein *Cdk* là hợp phần hoạt tính của phức hệ MPF cho nên sai khác trên đây là do hợp phần điều chỉnh tức là protein cyclin của MPF. Phức hợp MPF ở *S. pombe* tác động ở G2 là do Cdc2-cyclin B (cyclin của G2) còn đối với *S. cervisiae* người ta đã giả thiết là có phức hệ SPF (S-Phase Promoting Factor) bao gồm hai hợp phần là *Cdc28* và cyclin của G1 tác động trong giai đoạn G1. Các nhà nghiên cứu đã phát hiện ra 3 gen mã hóa cho các cyclin của G1 là các gen *CLN1*, *CLN2*, và *CLN3*. Khi giải trình tự các gen này người ta thấy chúng mã hóa cho các cyclin thân thuộc. Mỗi một protein *Cln* (cyclin G1) đều có vùng chứa khoảng 100 gốc axit amin tương đồng với cyclin của mitosis ở cầu gai, ở *S. pombe* và ở người.

Những thí nghiệm loại bỏ gen (gene knockout) đã chứng minh rằng các tế bào của *S. cervisiae* có thể sinh trưởng trong môi trường giàu chất dinh dưỡng nếu như chúng mang một trong ba gen *CLN*. Nếu cả ba gen đó bị loại bỏ thì chúng sẽ chết và khi loại bỏ gen *cln3* giai đoạn G1 sẽ kéo dài thêm vài giờ.

Như vậy, phức hệ SPF bao gồm protein *Cdc28* và ba dạng cyclin (*cln1*, *cln2*, *cln3*) là phức hệ có hoạt tính kinaza cần thiết cho giai đoạn G1 chuyển sang giai đoạn S đối với *S. cervisiae*, trong đó có cyclin *cln* nào đó sẽ làm giảm tỷ lệ số tế bào ở lại giai đoạn G1 và khi hàm lượng Cdc28-cyclin G1 được tăng cao sẽ làm cho tế bào vượt qua điểm chốt S sớm hơn để vào giai đoạn S. Trong lúc đó nếu thiếu bất kỳ dạng *Cln* nào đó thì tế bào đều bị ách lại ở G1, chứng tỏ Cdc28-cyclin G1 (tức phức hệ SPF) là cần thiết cho tế bào nắm men đi vào giai đoạn S.

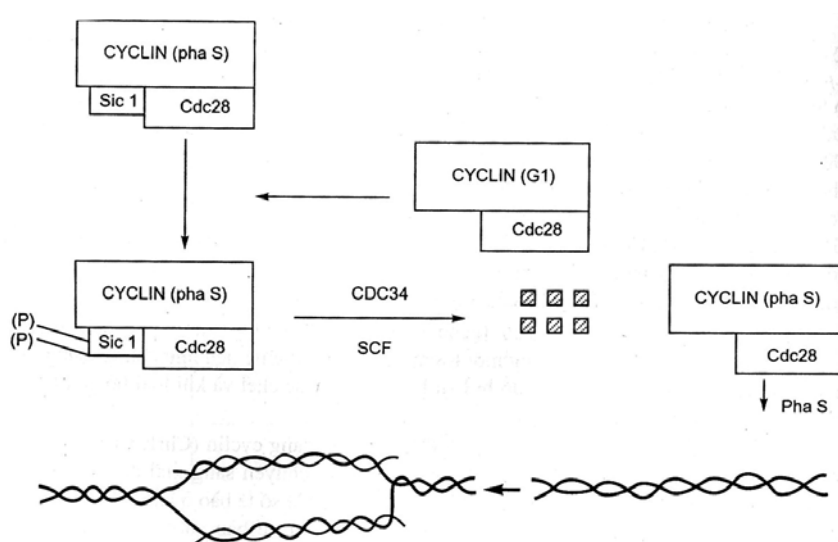
Đối với nấm men dạng cyclin *Cln3* được biểu hiện suốt cả chu kỳ với mức độ gần như ổn định, trong lúc đó cyclin *Cln1* và *Cln2* được biểu hiện ở nửa sau của giai đoạn G1 và khi hàm lượng của chúng tăng cao nhanh chóng cho đến tối đa khi tế bào đã vượt qua điểm chốt của G1 để vào S sau đó hàm lượng của chúng giảm dần và bị giảm tối thiểu ở giai đoạn mitosis. Người ta chứng minh rằng Cdc28-*Cln1* và Cdc28-*Cln2* có vai trò photphorin hóa APC (phức hệ phát động hậu kỳ - Anaphase Promoting Complex) là bất động chúng, cho phép tích lũy các cyclin *clb5*-*Clb6* ở cuối G1.

Nhiều thí nghiệm đã chứng minh rằng hoạt tính của Cdc28-*Cln3* có tách động lên kích thước tế bào thông qua cơ chế điều chỉnh mà hiện nay chưa được biết rõ. Khi được hoạt hóa Cdc28-*Cln3* sẽ photphorin hóa và làm hoạt hóa hai nhân tố phiên mã là SBF và MBE và dẫn đến phiên mã các gen *CLN1* và *CLN2* và một số gen mã hóa cho các đơn vị bé của ADN-polimeraza, RPA, ADN ligaza và các enzym cần thiết cho sự tổng hợp triphosphat deoxyribonucleosit.

Ngoài ra người ta còn tìm thấy ở nấm men *S. cerevisiae* hai gen mã hóa cho dạng cyclin B là *CLB5* và *CLB6*, hai gen này mã hóa cho cyclin Clb5 và Clb6 và được biểu hiện ở cuối G1. Các phức hệ Cdc28-Clb5 và Cdc28-Clb6 được tích lũy ở cuối G1 và bị bất hoạt do chúng liên kết với một nhân tố ức chế là *Sic1*. *Sic1* có mặt ở cuối mitosis và đầu G1. *Sic1* đóng vai trò là nhân tố ức chế giai đoạn S, đặc biệt là ức chế phức hệ Cdc28-cyclin B nhưng không có tác động với phức hệ Cdc28-Cln. Khi tế bào vào giai đoạn S và khi nhân tố ức chế *Sic1* bị phân giải thì phức hệ Cdc28-Clb5 và Cdc28-Clb6 trở nên có hoạt tính và phát động sự tái bản ADN. (hình 6.8).

Nhân tố ức chế *Sic1* bị phân giải bởi proteasome bằng con đường ubiquitin hóa bởi các enzym *Cdc34* và *SCF* (hình 6.5).

Vào thời gian cuối giai đoạn S có sự phiên mã của 2 gen mã hóa cho dạng cyclin B là *Clb3* và *Clb4* và chúng liên kết với *Cdc28* tạo thành phức hệ kinaza Cdc28-Clb3 và Cdc28-Clb4 có vai trò phối hợp với Cdc28-Clb5 và Cdc28-Clb6 duy trì sự tái bản ADN, nhưng đồng thời chúng có vai trò phát động sự tạo thành thoi phân bào khi bắt đầu mitosis.



**Hình 6.5**

Cơ chế kiểm tra G1----> S ở *S. cerevisiae*

Khi sự tái bản ADN kết thúc và tế bào đi vào G2 còn có hai dạng cyclin B được biểu hiện là *Clb1* và *Clb2* đóng vai trò là cyclin của M. Chúng liên kết với *Cdc28* tạo thành phức hệ cần thiết cho sự phân ly của thể nhiễm sắc và phân đôi nhân ở M.

Như vậy, các nghiên cứu ở nấm men *S. cerevisiae* đã chứng tỏ có nhiều nhóm cyclin định hướng cho kinaza *Cdc28* hoạt động với các giai đoạn khác nhau của chu kỳ tế bào.

Ba dạng cyclin hoạt động trong G1 là *Cln1*, *Cln2* và *Cln3*. Hàm lượng của *Cln3* giữ ở mức ổn định suốt chu kỳ nhưng hoạt tính của chúng bị kiểm tra bởi kích thước tế bào. Khi cdc2-Cln3 hoạt động, chúng photphorin hóa hai nhân tố phiên mã dẫn đến sự hình thành ở cuối G1 các cyclin *Cln1* và *Cln2*, các enzym và các protein khác cần thiết cho sự tái bản ADN, cũng như sự hình thành *Clb5* và *Clb6* ở cuối G1. Các cyclin *Cln1* và *Cln2* tạo phức hệ với *Cdc28* có vai trò ức chế phức hệ APC, do đó cho phép tích lũy *Clb5* và *Clb6* ở cuối G1. Phức hệ Cdc28-Clb5 và Cdc28-Clb6 xuất hiện ở cuối G1 lúc đầu bị ức chế bởi *Sic1*. *Sic1*

được tạo thành ở đầu G1. Khi *Sic1* bị phân hủy *Cdc28-Clb5* và *Cdc28-Clb6* trở thành có hoạt tính và dẫn đến các phát động tái bản ADN ở S và tạo thành thoi phân bào ở đầu M.

Các cyclin *Clb1* và *Clb2* được biểu hiện ở G2 sẽ liên kết với *Cdc28* tạo thành phức hệ phát động các quá trình ở M.

Tất cả các cyclin dạng B bị phân hủy ở cuối hậu kỳ phân bào bởi phức hệ APC đó được hoạt hóa. Hoạt tính của *Cdc28-Clb* giảm dần tới sự chuẩn bị điều kiện sẽ diễn ra ở G1 cần thiết cho sự tái bản ADN.

Sự ức chế tái phát động tái bản ADN (sẽ diễn ra ở chu kỳ tiếp) trước khi hậu kỳ được hoàn thành và thể nhiễm sắc đó phân ly về hai cực là để duy trì sự phân ly chính xác số thể nhiễm sắc con về hai tế bào con.

### 6.1.5 Điều chỉnh chu kỳ tế bào động vật có vú

Đối với động vật có vú cũng như các cơ thể đa bào phức tạp khác được đặc trưng bởi sự phát triển cá thể (ontogenesis) là quá trình đa giai đoạn diễn ra theo thời gian, theo đó từ hợp tử thông qua sự sinh sản của tế bào và biệt hóa tế bào sẽ hình thành các mô, các cơ quan và cơ thể toàn vẹn đặc trưng cho loài về kiểu hình và kiểu gen. Sự sinh sản và kiểm soát tế bào được diễn ra bởi một mạng lưới tín hiệu đến từ các tế bào của mô, của các cơ quan trong cơ thể, từ môi trường và phối hợp với các tín hiệu nội bào về sự tăng trưởng và phát triển theo đúng chương trình phát triển kiểu gen. Như vậy, chu kỳ tế bào và cơ chế điều chỉnh các chu kỳ là không như nhau đối với các tế bào biệt hóa khác nhau của cơ thể.

Các tế bào phôi sớm sinh sản rất nhanh, chu kỳ tế bào ngắn, trong lúc đó các tế bào biệt hóa của cơ thể trưởng thành rất khác nhau về thời gian kéo dài của chu kỳ, của từng giai đoạn của chu kỳ. Đối với tế bào gốc trong mô luôn được đổi mới như biểu mô ruột, da, mô tuỷ xương đỏ. Chúng luôn phân bào để thay thế các tế bào bị mất đi. Đối với đa số tế bào của mô thì chúng thường dừng lại ở giai đoạn G1 để biệt hóa thành các tế bào đặc trưng cho mô, như mô gan, mô thận, mô cơ, mô thần kinh và người ta bảo chúng ở giai đoạn G0. Trong điều kiện nào đó các tế bào đã biệt hóa của các mô (ví dụ tế bào gan, tế bào lympho, nguyên sợi bào v.v.) có thể trở thành G1, hoàn thành chu kỳ và đi vào sinh sản và sau đó lại đi vào biệt hóa khi ở giai đoạn G1. Ví dụ, tế bào gan ở phần gan bị cắt sẽ trở lại G1 và phân bào cho ra các tế bào gan mới để tái sinh lại phần bị cắt. Hoặc như tế bào lympho khi có kích thích của kháng nguyên sẽ trở lại G1 và phân bào, sau đó biệt hóa cho ra các tế bào có thẩm quyền và miễn dịch.

Có loại tế bào như tế bào noron sau khi được biệt hóa chuyển vào G0 thì chúng ở trạng thái đó để thực hiện chức năng dẫn truyền thần kinh suốt đời. Có loại tế bào như hồng cầu ở động vật có vú sau khi được biệt hóa mất nhân, chứa Hb thì chúng chỉ hoạt động một thời gian và sẽ bị chết đi.

Như vậy, khi nghiên cứu cơ chế điều chỉnh tế bào ở động vật có vú ta phải đặt các vấn đề sau đây:

- Bản chất của hệ thống điều chỉnh chu kỳ tế bào là gì?
- Sự sinh sản của tế bào được kiểm tra như thế nào và bằng phương pháp nào để nghiên cứu chúng?



- Những nhân tố ngoại bào nào tác động lên sự sinh trưởng và sinh sản của tế bào? Và bằng hệ thống cơ chế nào các nhân tố ngoại bào tác động lên hệ thống điều chỉnh chu kỳ tế bào?

Nhờ các công trình nghiên cứu về di truyền tế bào, về sinh học phân tử và công nghệ nuôi cấy tế bào *invitro* các nhà khoa học đã làm sáng tỏ nhiều vấn đề của các câu hỏi trên đây.

Các nhà nghiên cứu rất khó quan sát cụ thể sự sinh trưởng và sinh sản của tế bào động vật *invivo* (trong cơ thể). Đa số các nghiên cứu về sự điều chỉnh sự sinh sản của tế bào động vật có vú và người được tiến hành với các tế bào nuôi cấy *invitro*. Như vậy có một số khó khăn nhất định, các tế bào được tách ra từ các mô đem nuôi cấy *invitro* do trong điều kiện thuận lợi chúng chỉ phân bào trong một số lần nhất định (ví dụ tế bào người là khoảng 50 chu kỳ) sau đó chúng ngừng phân bào đi vào thoái hóa và chết. Điều lý thú là có một số tế bào (đặc biệt là ở một số loài Gặm nhấm) không đi vào thoái hóa mà sẽ phân bào vô hạn định trở thành các tế bào bất tử và tạo thành một dòng tế bào riêng. Đó là những tế bào đột biến, chúng cũng giống như các tế bào đột biến được tách ra từ các mô ung thư (ví dụ tế bào Hela-tế bào tách ra từ mô ung thư cổ dạ con của chị Henrietta Lack bị ung thư dạ con chết từ năm 1950). Những dòng tế bào bất tử này được nuôi cấy *invitro* trong tất cả các phòng thí nghiệm sinh học và y tế được học, cung cấp cho các nhà nghiên cứu một mô hình thực nghiệm rất có ích cho sinh học, y được nói chung và cho các nghiên cứu về chu kỳ tế bào nói riêng.

- Nhân tố sinh trưởng: Trong nhiều năm các nhà nghiên cứu đã không thành công nuôi cấy các tế bào động vật *invitro* mặc dù người ta tạo được môi trường nuôi cấy vô trùng có chứa đầy đủ các chất dinh dưỡng cần thiết. Chúng sẽ không sinh trưởng và không sinh sản nếu như người ta không cho thêm vào môi trường nuôi cấy "chất huyết thanh" (serum), là dịch được chiết xuất từ máu sau khi để máu ngưng kết. Các tế bào sống trong môi trường không có serum thì chúng sẽ không phân bào mà chuyển sang trạng thái G0. Người ta đã chứng minh chất cần thiết có trong serum là những protein rất đặc trưng được gọi là nhân tố sinh trưởng (Growth factor) và chúng tác động với một nồng độ rất bé (vào khoảng  $10^{-9}$  đến  $10^{-11}$ M).

Một trong những nhân tố sinh trưởng đầu tiên được xác định là nhân tố sinh trưởng từ tiểu cầu được gọi là PDGF (Platelet-Derived Growth Factor). Lúc đầu người ta sử dụng huyết tương (plasma) cho vào môi trường thì tế bào không sinh trưởng, sinh sản, nhưng nếu ta thay thế bằng serum thì chúng nhanh chóng sinh sản, bởi vì khi người ta chế tạo huyết tương bằng cách tách bỏ các tế bào máu trước khi chúng chưa kịp ngưng kết. Khi máu ngưng kết các tiểu cầu sẽ tiết ra nhân tố PDGF vào serum. Khi người ta tách chiết các chất PDGF trực tiếp từ tiểu cầu thì chúng cũng có tác dụng kích thích sinh sản tế bào. PDGF là một loại protein được tiết ra từ các bóng tiết có trong tiểu cầu, chúng có tác dụng kích thích sự sinh sản của tế bào để tái sinh các mô bị hỏng trong cơ thể, ví dụ sự hàn gắn và tạo sẹo vết thương trong cơ thể.

Hiện nay người ta biết được trên 50 chất có tác động như nhân tố sinh trưởng và chúng còn được gọi là chất mitogen vì chúng kích thích phân bào (mitosis). Các tế bào đáp ứng lại với các nhân tố sinh trưởng bằng các thụ quan màng đặc trưng (membrane receptor). Ngoài các nhân tố sinh trưởng là protein thì một số loại phân tử khác có vai trò như thế, ví dụ hormon steroid. Chúng tác động bằng cách liên kết với các thụ quan nội bào (trong tế bào chất hoặc trong nhân). Người ta thường chia các nhân tố sinh trưởng thành hai loại: loại đặc trưng rộng và loại đặc trưng hẹp. Loại đặc trưng rộng, ví dụ như PDGF và EPGR (nhân tố sinh trưởng biểu bì - Epidermal Growth Factor) là loại tác động lên nhiều dạng tế bào – thần kinh giao, tế bào biểu mô v.v.. Trong lúc đó loại đặc trưng hẹp, ví dụ như erythropoietin chỉ tác động kích thích sinh sản dòng hồng cầu.

Các nhân tố sinh trưởng tác động lên tế bào theo nhóm và rất đa dạng có thể là kích thích hoặc ức chế sự sinh sản của tế bào tùy thuộc theo nồng độ và tùy trường hợp chúng có thể tách động lên sinh sản, sự tồn vong, sự biệt hóa, sự di cư của tế bào trong cơ thể đa bào.

Như vậy, các nhân tố sinh trưởng là sản phẩm của tế bào nhưng chúng có tác động điều chỉnh hoạt động của các tế bào một cách đa dạng. Có nhân tố vừa kích thích sinh trưởng đồng thời kích thích sự sinh sản của tế bào. Một số nhân tố có tác động kích thích sinh trưởng nhưng không cho phép vượt qua điểm chốt R (tương đương điểm S ở nấm men) của G1, trong lúc đó lại có nhân tố cho phép vượt qua điểm R nhưng không có tác động kích thích sinh trưởng. Như vậy, đối với các tế bào động vật có vú không tồn tại mối tương quan chặt chẽ giữa kích thước tế bào với sự phân bào như ở nấm men.

Các tế bào đã biệt hóa như tế bào noron có thể sinh trưởng để tăng thêm các phần tế bào chất, các phần phân nhánh mà không phân bào. Sự sinh trưởng của chúng được kiểm soát bởi nhân tố sinh trưởng thần kinh là NGF (Nerve Growth Factor) tiết ra do các tế bào đích được phân bố thần kinh. Tế bào đích càng tiết nhiều NGF thì noron càng lớn nhanh, có khi lớn gấp hàng nghìn, hàng chục nghìn lần so với các tế bào khác của cơ thể, mặc dù chúng vẫn chứa một hàm lượng ADN như nhau.

- Đối với chu kỳ tế bào động vật có vú điểm chốt ở G1 (được gọi là điểm R-restriction point) tương tự điểm S ở nấm men là điểm chốt quan trọng tế bào vượt qua để vào giai đoạn S và hoàn thành chu kỳ kéo dài từ 14 - 16 giờ, S kéo dài từ 6 - 8 giờ, G2 từ 1 - 2 giờ và M kéo dài khoảng 1 giờ. Tất nhiên như ta đã biết trong cơ thể các quần chủng tế bào biệt hóa khác nhau có thời gian chu kỳ khác nhau. Đa số bị dừng lại ở G1 và chuyển sang trạng thái G0 tạm thời (như tế bào gan, tế bào biểu mô, biểu mô ruột, tế bào lympho v.v.) hoặc vĩnh viễn (như tế bào noron). Người ta thường gọi G0 là giai đoạn nghỉ – giai đoạn “ngủ đông” hoặc đi vào thoái hóa của tế bào, thực chất tế bào không nghỉ hoàn toàn mà giảm cường độ hoạt động tổng hợp protein nhiều khi chỉ còn 20% và thực hiện các chức năng của mô, cơ quan mà tế bào đó là thành viên.

- Nhiều loại *Cdk* tham gia điều chỉnh chu kỳ. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng khác với nấm men là bọn chỉ sinh sản một loại *Cdk* tham gia điều chỉnh chu kỳ, thì ở tế bào động vật có vú có nhiều loại *Cdk* tham gia điều chỉnh chu kỳ. Theo nguyên tắc hoạt động của các *Cdk* ở trong tế bào động vật có vú có thể phân ra các loại *Cdk1*, *Cdk2*, *Cdk3*, *Cdk4*, *Cdk5* và *Cdk6* (theo thứ tự phát kiến ra chúng).

*Cdk1* ở người được phát hiện đầu tiên khi sử dụng phương pháp chọn dòng gen *cdk* và thay thế, bổ trợ cho nấm men *S. pombe* đột biến *cdc2<sup>-</sup>* lúc đầu gọi là *cdc2* (ví tương đương với *cdc2* của *S. pombe*) và bây giờ có tên là *Cdk1*. Gen *Cdk1* cũng có khả năng thay thế bổ trợ cho đột biến *cdc28* ở *S. cerevisiae*. *Cdk4* và *Cdk6* đã được tách chiết và tác dụng của chúng cũng tương tự *Cdk1*. Còn các dạng *Cdk3* và *Cdk5* ít có tác dụng đối với chu kỳ tế bào mà có thể có vai trò khác.

Cũng giống như nấm men *S. cerevisiae*, tế bào động vật có vú cũng sử dụng nhiều loại cyclin tham gia điều chỉnh hoạt tính *Cdk*, trong đó cyclin A và B có tác dụng trong giai đoạn S, G2 và mitosis sớm (xem hình 6.8 và 6.9).

Ở động vật có vú cũng tìm thấy ba loại cyclin D (D1, D2, D3) và cyclin E có tác dụng ở giai đoạn G1 tương tự với các loại cln ở nấm men *S. cerevisiae*.

Các loại cyclin khác nhau liên kết với các loại *Cdk* khác nhau tạo thành các phức hệ có tác dụng điều chỉnh chu kỳ ở các giai đoạn khác nhau. Ví dụ phức hệ Cdk4-cyclin D và Cdk6-

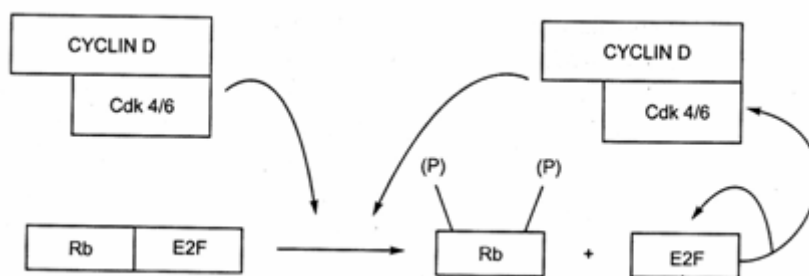
cyclin D với Cdk2-cyclin E tác động ở G1. Phức hệ Cdk2-cyclin A tác động ở giai đoạn S. Các phức hệ Cdk1-cyclinA và phức hệ Cdk1-cyclinB tác động ở giai đoạn G2 và M. Khi có nhân tố sinh trưởng các phức hệ Cdk-cyclin sẽ kích thích các tế bào đang ở giai đoạn G0 trở lại G1 và vượt qua G1 để hoàn thành chu kỳ. Trong môi trường nuôi cấy invitro khi thiếu nhân tố sinh trưởng thì tế bào ở giai đoạn G0 không sản xuất *Cdk* và cyclin.

Tác động của nhân tố sinh trưởng là gây cho tế bào có hai đáp ứng: đáp ứng sớm và đáp ứng chậm.

Trong đáp ứng sớm thì sau khi được thêm nhân tố sinh trưởng chỉ vài phút hàm lượng các mARN bắt đầu tăng. Như vậy, có sự phiên mã của nhiều gen chủ yếu là các gen mã hóa cho các nhân tố phiên mã như *c-Fos* và *c-Jun* hoạt động. Người ta chứng minh được rằng các dạng đột biến của các gen *c-Fos* và *c-Jun* do tác động của retrovirus đã dẫn đến tạo nên protein (*v.Fos* và *v.Jun*) có tác động chuyển hóa tế bào lành thành tế bào ung thư. Như vậy, các nhân tố phiên mã trên có vai trò trong việc điều chỉnh chu kỳ tế bào.

Sau 30 phút, nồng độ các mARN tăng tối đa và sau đó giảm dần và các protein được tổng hợp trong giai đoạn đáp ứng sớm là những protein không bền vững cho nên nồng độ của chúng cũng giảm dần. Các protein được tổng hợp trong giai đoạn đáp ứng sớm có tác động hoạt hóa các gen ở giai đoạn đáp ứng chậm. Một số gen này là các gen mã hóa cho các nhân tố phiên mã như *E2F*. Một số gen khác trong đáp ứng chậm là các gen mã hóa cho các loại cyclin D, A, cyclin E, các gen mã hóa cho các loại *Cdk2*, *Cdk4* và *Cdk6* cũng được hoạt hóa và biểu hiện. Cho đến khi nào nồng độ các protein này tích lũy đủ thì tế bào mới vượt qua điểm R để vào S và tái bản ADN.

Một số nhân tố phiên mã *E2F* là cần thiết cho sự phiên mã các gen trên đây, cũng như các gen mã hóa cho nhiều protein tham gia vào sự tổng hợp ADN và nhân tố *E2F* cũng kích thích sự phiên mã các gen mã hóa cho bản thân chúng. Khả năng kích thích phiên mã của *E2F* lại bị ức chế bởi protein liên kết với chúng *Rb* và bởi hai protein thân thuộc khác là *p107* và *p130*. Protein *Rb* đầu tiên được xác định như là sản phẩm của gen ức chế, do đó dẫn đến sự hoạt hóa các gen cần thiết bởi *E2F* để đi vào giai đoạn S. Ta hãy hình dung một cơ chế phức tạp như sau: Sự photphorin hóa protein *Rb* gây bởi các phức hệ cdk4-cyclin D và cdk6-cyclin D ở giữa G1 và khi *cdk2* và cyclin E được sản xuất thì phức hệ Cdk2-cyclin E lại photphorin hóa *Rb* ở cuối G2. Đến lượt mình khi *E2F* có hoạt tính sẽ kích thích sự phiên mã của mình (theo mối liên hệ ngược dương) và đồng thời dẫn đến sản sinh cdk2-cyclin E, đến lượt mình phức hệ này sẽ tăng cường photphorin hóa *Rb* (xem hình 6.6).



**Hình 6.6**

Vai trò ức chế của Rb đối với E2F

Đến thời điểm này chu kỳ diễn ra không còn phụ thuộc vào hoạt tính của Cdk4/6-cyclin D, bởi vì cùng với tiến trình khi các nhân tố sinh trưởng không được tăng thêm thì mức cyclin D cũng giảm đi và khi đó tế bào vượt qua điểm R của G1 để đi vào S.

Như vậy, sự photphorin hóa của protein *Rb* có tác động điều chỉnh để tế bào vượt qua điểm R để đi vào S là rõ ràng và người ta cũng thấy rằng các tế bào có mang gen *Rb*<sup>-/-</sup> sẽ bị giữ lại ở G1 không phụ thuộc vào nhân tố sinh trưởng.

Protein *Rb* được duy trì ở trạng thái photphorin hóa suốt giai đoạn S, G2 và M bởi phức hệ Cdk2/1-cyclin. Sau khi tế bào hoàn thành phân bào và đi vào G1 sớm hoặc G0 thì mức Cdk-cyclin giảm sẽ dẫn tới làm giải photpho protein *Rb* bởi các protein photphataza. Protein *Rb* lại tác động ức chế hoạt tính của *E2F* ở giai đoạn sớm của G1 của chu kỳ tiếp theo.

Cyclin A được tổng hợp ở cuối giai đoạn G1 và G1 sắp chuyển sang S. Thiếu cyclin A thì tổng hợp ADN bị ức chế. Phức hệ Cdk2-cyclin A ở động vật có vú cũng giống như Cdc28-Cln5/6 có vai trò phát động sự tái bản ADN. Hoạt tính của Cdk2-cyclin A có thể bị ức chế bởi loại protein tương tự như protein *Sic1* ở *S.cerevisiae*.

Ở động vật có vú loại *Cdk* tác động trong G2 là *Cdk1*. *Cdk1* mang tính tương đồng cao với *Cdc2* của *S. pombe* và đồng thời người ta có thể sử dụng mRNA mã hóa cho *Cdk1* của động vật có vú để kích thích sự chín của noãn bào ếch.

Hoạt tính MPF của phức hệ Cdk1-cyclin A và Cdk2-cyclin B của động vật có vú có vai trò chuyển chu kỳ từ G2 vào M cũng được điều chỉnh bởi các protein tương tự như *Wee1*, *CAK* và *Cdc25* như ở *S. pombe* và theo cùng cơ chế tương tự nghĩa là có các kinaza tương tự như *Wee1* và *CAK* có tác động ức chế hoạt tính của *Cdk* bằng cách photphorin hóa chúng và chúng sẽ được hoạt hóa bởi các photphataza (tương tự *Cdc25*) bằng cách giải phóng nhóm photphat ức chế.

Đối với các tế bào có chu kỳ đổi mới thường xuyên (ví dụ phôi sớm) thì Cyclin B bắt đầu được tổng hợp ở S và tăng cao hàm lượng qua G2 đạt đỉnh cao ở M và giảm mạnh sau hậu kỳ phân bào. Ở tế bào người, cyclin B đầu tiên được tích lũy trong tế bào chất và sau đó được chuyển vào nhân ở tiền kỳ sớm ngay khi màng nhân bắt đầu phân rã. Như vậy, hoạt tính của MPF không chỉ điều chỉnh bởi sự photphorin hóa (gắn photphat) và giải photphat (tách photphat) mà còn do sự vận chuyển cyclin B vào nhân.

Cyclin A và cyclin B sẽ bị phân huỷ trong proteasome bằng con đường ubiquitin hóa nhờ phức hệ APC (Anaphase Promoting Complex) dẫn tới giảm hoạt tính của MPF cho phép tế bào hoàn thành mitosis để đi vào chu kỳ mới.

Ở động vật có vú cũng có các nhân tố ức chế hoạt tính của phức hệ cyclin-kinaza và chúng cũng tham gia vào điều chỉnh chu kỳ tế bào giống như *Sic1* ở nấm men. Người ta giả thiết rằng các chất ức chế hoạt tính cyclin-kinaza được gọi là *CKI* (Cyclin-Kinaza Inhibitor) và chúng có hai lớp:

Một lớp được gọi là CIP (Cdk Inhibitor Protein) chúng liên kết và ức chế tất cả các phức hệ *Cdk1*-, *Cdk2*-, *Cdk4*- và *Cdk6*-cyclin.

Một lớp khác được gọi là *INK4* (kinaza 4 inhibitor) liên kết và ức chế chỉ với phức hệ *Cdk4*-Cyclin D và *Cdk6*-cyclin D. Người ta đã biết được một loại protein *INK4* là *p16* có tác động như một chất ức chế ung thư (tumor suppressor). Người ta cũng đã biết được ở động vật có vú có ba lớp protein CIP được gọi là *p21*, *p27* và *p57*.

Các protein ức chế như *INK4* và các *CIP* như *p21*, *p27* và *p57* đóng vai trò ức chế hệ MPF từ đó ức chế chu kỳ tế bào. Vai trò của *CIP p21* là đáp ứng lại sự hư hỏng của ADN ở tế bào động vật có vú. Chúng cũng có vai trò ức chế sự tăng sinh tế bào trong phát triển phôi sinh. Ví dụ, trong phôi phát triển của ruồi quả, trong các tế bào mầm sẽ cho ra biểu bì. Người ta tách chiết được protein Dacapo tương tự như *CIP* được sản sinh ra ở đầu G2 của chu kỳ phân bào 16, chúng liên kết và ức chế phức hệ Cdk2-cyclin E làm tế bào phôi bị ách lại ở G1 của chu kỳ 17, nhằm hạn chế sự tăng sinh của tế bào mầm biểu bì. Các thể đột biến dacapo vì không có Dacapo (protein tương tự *p21*) tế bào vượt qua G1 và phân bào tạo ra những ngoại chu kỳ bất bình thường.

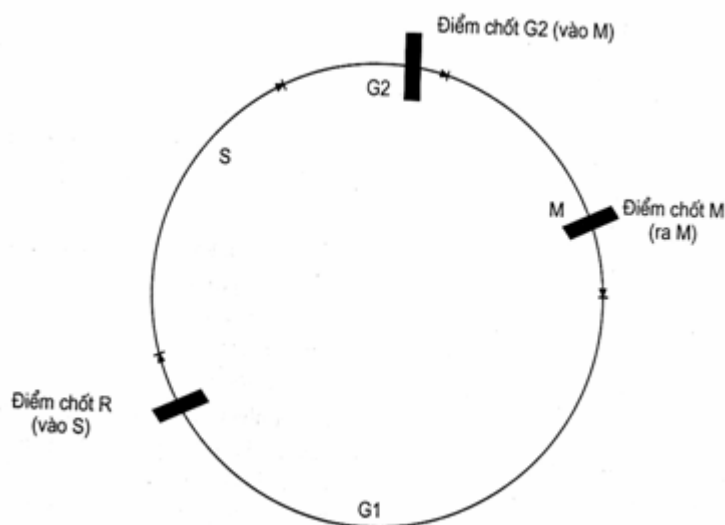
Vai trò của các *CIP p27* và *p57* cũng đã được xác định bằng phương pháp loại trừ gen ở chuột. Các chuột đồng hợp *p27*<sup>-/-</sup> phát triển phôi và sinh ra bình thường nhưng qua một vài tuần tuổi, chuột đột biến lớn vượt lên so với chuột bình thường hơn 30% vì người ta thấy có sự tăng sinh vượt trội của tế bào trong đa số cơ quan. Như vậy, protein *CIP p27* rõ ràng là có vai trò ức chế chu kỳ tế bào và điều chỉnh sự tăng sinh tế bào trong cơ thể ở giai đoạn phôi và thai.

Protein *CIP p57* được biểu hiện trong các tế bào được biệt hóa của đa số mô của cơ thể trưởng thành. Các con chuột bị loại bỏ gen không sản sinh ra *p57* sẽ bị chết sau khi sinh với nhiều dị dạng do sự tăng sinh quá tải của các mô trong quá trình biệt hóa.

+ Các điểm chốt của chu kỳ và cơ chế tác động phân tử của MPF.

Như trên đã nói sự điều chỉnh chu kỳ tế bào theo thời gian chuyển từ giai đoạn trước sang giai đoạn sau xảy ra ở các điểm kiểm tra (control points) hay còn gọi là điểm chốt (check points). Cơ chế kiểm tra ở điểm chốt là cơ chế kiểm tra theo mỗi liên hệ ngược nghĩa là công việc ở giai đoạn sau chỉ được bắt đầu khi công việc của giai đoạn trước đó đã hoàn thành, cũng có nghĩa là công việc sẽ xảy ra ở giai đoạn sau đã được chuẩn bị đầy đủ, tiền đề cần thiết diễn ra ở giai đoạn trước đó. Nếu như công việc của giai đoạn trước chưa hoàn thành thì dẫn đến đình chỉ sự chuyển sang giai đoạn sau và tế bào phải kéo dài và ở lại giai đoạn trước đó cho đến khi công việc giai đoạn được hoàn tất.

Tác động lên điểm chốt có các tín hiệu nội bào và các tín hiệu đến từ các tế bào và các mô khác trong cơ thể cũng như tín hiệu đến từ môi trường

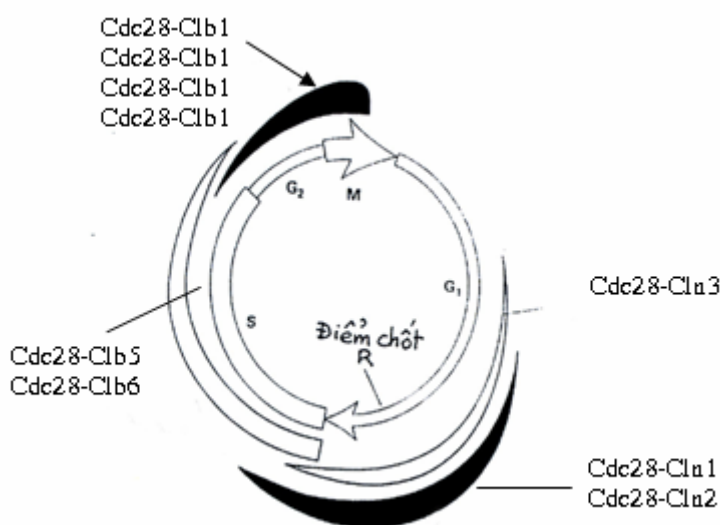


**Hình 6.7**

Chu kỳ tế bào và các điểm chốt

Người ta thường phân biệt ba điểm chốt quan trọng: đó là điểm chốt từ G1 sang S [ở nấm men được gọi là điểm xuất phát S (start), còn ở động vật bậc cao được gọi là điểm hạn định R (restriction)], khi tế bào vượt qua được điểm chốt G1 chúng sẽ đi vào S để tổng hợp ADN. Điểm chốt thứ hai là điểm chốt G2 để kiểm tra cửa vào M của tế bào, và điểm chốt thứ ba là điểm chốt M ở thời kỳ từ trung kỳ chuyển sang hậu kỳ phân bào thường được gọi là điểm cửa ra của phân bào nghĩa là khi tế bào vượt qua điểm này sẽ hoàn tất phân bào và đi vào G1 tiếp tục chu kỳ mới (hình 6.7)

Điểm chốt G1 báo hiệu rằng quá trình ở G1 đã được hoàn tất như quá trình tăng trưởng, quá trình chuẩn bị cho sự tái bản ADN. Như vậy, điểm chốt G1 rất quan trọng và đối với các tế bào có chu kỳ chuẩn và liên tục thì điểm chốt G1 là điểm kiểm tra các quá trình diễn ra ở G1 mà khi hoàn tất sẽ phát động sự tái bản ADN và tiếp tục chu kỳ. Đối với các tế bào G1 thì do các tế bào bị ách lại ở G1, các nhân tố sinh trưởng GF (Growth Factor) cũng như các chất kích thích phân bào (mitogen) thường tác động lên điểm chốt G1. Chúng phát động sự biểu hiện của các gen mã hóa cho nhiều protein, nhiều enzym tác động đáp ứng sớm của tế bào, trong đó có các gen mã hóa cho các nhân tố phiên mã ví dụ như c-Fos, c-Jun. Các protein và enzym của đáp ứng sớm sẽ kích thích hoạt hóa các gen của giai đoạn đáp ứng chậm, trong đó quan trọng nhất là các gen mã hóa cho các nhân tố phiên mã E2F.

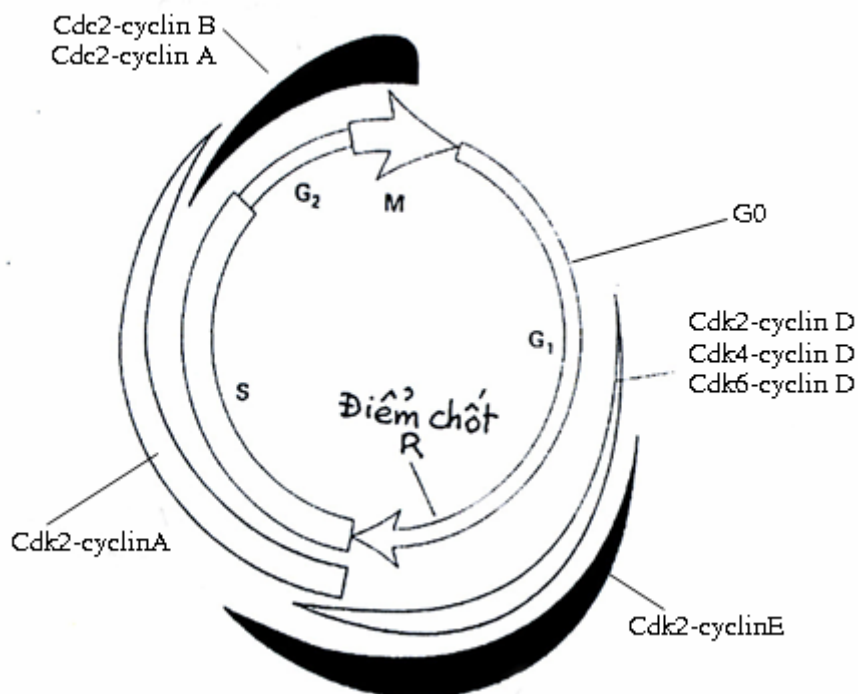
**Hình 6.8**

Hoạt tính của phức hệ Cdk 28-cyclin qua chu kỳ tế bào ở *S. cerevisiae*

Một số gen khác trong đáp ứng chậm là các gen mã hóa cho các dạng cyclin của G1 và một phần của S-cyclin D, E và A, các gen mã hóa cho các dạng Cdk tác động trong G1 và S như *Cdk2*, *Cdk4* và *Cdk6*. (Xem hình 6.9).

Nhân tố phiên mã *E2F* có tác động kích thích sự phiên mã các gen mã hóa cho các protein và enzyme cần thiết cho sự tái bản ADN. Khi tế bào chưa vượt qua điểm chốt G1 thì *E2F* bị ức chế do liên kết với các protein ức chế ví dụ protein *Rb*. Khi protein *Rb* bị

phosphorin hóa nhờ các phức hệ kinaza (tức MPF) như Cdk4/6-cyclin D và Cdk2-cyclin E thì *E2F* được giải phóng, chúng sẽ tác động cùng với Cdk2-cyclin A lên hệ tái bản ADN và như vậy G1 được chuyển vào S.



**Hình 6.9**

Hoạt tính của phức hệ Cdk-cyclin qua chu kỳ tế bào động vật có vú

Nhiều nguyên nhân gây tác động làm tế bào bị ách lại ở G1, ví dụ khi phân tử ADN bị hư hỏng do các tác nhân phóng xạ hoặc hóa chất thì tế bào bị ách lại ở G1 cho tới khi các hư hỏng đó được sửa chữa. Sự ách lại ở G1 là để phòng ngừa sự tái bản các ADN bị đột biến sẽ dẫn đến đột biến trong các tế bào con.

Người ta đã phát hiện ra protein *p53* (gọi như vậy vì khối lượng 53kD) có vai trò ức chế tế bào người ở G1 khi có sự hư hỏng ADN. Khi protein không hoạt động các tế bào với hư hỏng ADN sẽ vượt qua G1 vào S để tái bản ADN, hoàn thành chu kỳ và sẽ cho ra các tế bào con có thể chuyển dạng thành tế bào ung thư. Vì vậy, người ta gọi gen mã hóa cho protein *p53* là gen ức chế ung thư (tumor suppressor gene).

Trong trường hợp bình thường protein *p53* là một nhân tố phiên mã, chúng rất không bền vững, chúng không tồn tại với lượng rất ít vừa đủ để bám vào yếu tố kiểm tra tương ứng của ADN và hoạt hóa sự phiên mã. Sự hư hỏng ADN làm bền vững hóa protein *p53* và do đó nồng độ của chúng tăng cao, chúng sẽ tích cực kích thích phiên mã. Một trong các gen được chúng kích thích phiên mã là gen mã hóa cho protein ức chế CIP *p21* là protein ức chế hoạt tính của phức hệ cyclin-kinaza. CIP *p21* liên kết và ức chế tất cả Cdk-cyclin ở động vật có vú và kết quả là các tế bào bị ách lại ở G1 (hoặc G0) cho tới khi ADN hư hỏng đã được sửa chữa và nồng độ *p53* và CIP *p21* giảm xuống.

Nếu ADN bị hư hại quá nặng thì protein *p53* sẽ hoạt hóa các gen dẫn đến quá trình tự chết của tế bào (apoptosis). Quá trình apoptosis là quá trình tự chết của tế bào theo chương trình xảy ra một cách bình thường trong quá trình phát triển cá thể ở động vật đa bào. Đối với

động vật có xương sống protein *p53* có vai trò đáp ứng lại các hư hỏng nặng của ADN bằng cách tự chết là để ngăn ngừa sự đột biến ADN có thể sẽ dẫn đến phát triển các tế bào ung thư. Những tế bào chứa đột biến gen *p53* ở cả hai alen sẽ vượt qua G1 để vào S khi ADN bị hư hỏng nhẹ và sẽ không tự chết đi khi ADN bị hư hỏng nặng và như vậy trường hợp khi các tế bào đó bị hư hỏng ADN, chúng vẫn vượt qua G1 vào S và ADN bị hư hỏng vẫn tái bản tạo ra đột biến và tái sắp xếp lại ADN dẫn đến phát triển ung thư.

Hậu quả của đột biến trong gen *p53* là ví dụ điển hình trong ý nghĩa của điểm chốt của chu kỳ tế bào đối với sức khỏe của động vật và con người chúng ta.

Điểm chốt G2 báo hiệu là các quá trình cần thiết cho sự phân bào phải được hoàn tất như sự tái bản ADN, sự đông đặc và tăng xoắn của thể nhiễm sắc, sự tạo thành các vi ống chuẩn bị cho sự tạo thành thoi phân bào, giúp tế bào vượt qua chốt để vào tiền kỳ của phân bào. Nếu các quá trình đó chưa được hoàn tất hoặc có xảy ra sự hư hỏng ADN thì tế bào cũng bị ách lại ở G2 và không vào được M, như vậy là để ngăn chặn không để xảy ra sự hư hỏng trong hệ gen của thế hệ tế bào con cháu.

Phức hệ Cdk1-cyclin A và Cdk1-cyclin B phát huy tác dụng trong G2 và cả ở trong mitosis sớm. Hoạt tính của chúng cũng được điều chỉnh các protein ức chế và bởi sự photphorin hóa nhờ các kinaza và giải photpho nhờ các photphataza.

Phức hệ Cdk1-cyclin G2 (A và chủ yếu là B) khi được hoạt hóa sẽ photphorin hóa các protein đóng vai trò chủ yếu trong sự cô đặc và tăng xoắn thể nhiễm sắc (như protein condensin), các protein có vai trò tạo nên các vi ống của thoi phân bào (như các tubulin), các protein có vai trò trong sự phân giải và tái tạo màng nhân (như các lamin), v.v..

Điểm chốt của giai đoạn M ở vào trung kỳ chuyển sang hậu kỳ. Nếu các quá trình như tan rã màng nhân, tạo thoi phân bào và các trung tiết (tức tâm động) bám gắn thể nhiễm sắc vào sợi của thoi chưa hoàn tất thì tế bào bị ách lại ở trung kỳ, chất colchicin có tác dụng ức chế sự trùng hợp hóa vi ống tubulin dẫn đến không tạo được thoi phân bào do đó tế bào bị ách lại ở trung kỳ tạo nên các tế bào đa bội và hậu kỳ, mặt kỳ không xảy ra.

Phức hệ Cdk-cyclin có tác động hoạt hóa phức hệ APC (Anaphase Promoting Complex), phức hệ APC cần thiết cho sự tác động hậu kỳ cũng như phân hủy các cyclin không chỉ để hoàn tất sự phân ly thể nhiễm sắc về hai cực mà còn để phân đôi tế bào chất tạo ra hai tế bào con.

Khi APC được photphorin hóa nhờ phức hệ Cdk-cyclin, chúng sẽ có hoạt tính và sẽ tác động hướng dẫn theo con đường ubiquitin hóa để các protein ức chế hậu kỳ (ví dụ protein cohesin có vai trò gắn hai nhiễm sắc tử với nhau ở tâm động) bị phân giải bởi proteasome, do đó các nhiễm sắc tử tách khỏi nhau và vận động về hai cực nhờ sự giải trùng hợp các vi ống của sợi thoi. Khi các cyclin chưa bị phân hủy thì phức hệ Cdk-cyclin sẽ tác động để tái tạo lại màng nhân, cũng như tác động gây co thắt eo phân bào (do tác động photphorin hóa protein miozin-actin) làm cho tế bào bị phân thành hai.

Vào mặt kỳ, APC bằng con đường ubiquitin hóa sẽ tác động lên cyclin nhờ proteasome. Nồng độ cyclin giảm, Cdk mất hoạt tính và tế bào ra khỏi mitosis.

*Vấn đề thảo luận ở chương 6:*

1. So sánh thời gian của chu kỳ ở các chủng quần khác nhau ở cơ thể đa bào.
2. Vẽ sơ đồ tổng kết thể hiện cơ chế điều chỉnh chu kỳ nhờ phức hệ cyclin- Cdk ở động vật có vú.



3. *Nêu và phân tích cơ sở gen và hoạt động của gen tham gia điều chỉnh chu kỳ.*

4. *Nêu và phân tích các yếu tố nội bào và ngoại bào tham gia điều chỉnh chu kỳ ở động vật có vú.*

## Chương 7

### Di truyền tế bào Lai Soma

Mục tiêu: Sau khi học xong chương này học viên có khả năng:

- Trình bày được khái niệm tế bào soma và sự biệt hóa của chúng.
- Giải thích được lai soma khác lai ghép mô và cơ quan, khác lai hữu tính.
- Trình bày được hình thái và hoạt động sống của các tế bào lai *invitro*.
- Biết được nguyên lý và qui trình ứng dụng lai tế bào trong công nghệ tế bào.

#### 7.1 Sự biệt hóa các tế bào soma

Quá trình phát triển phôi và hình thành các mô, các cơ quan bao gồm hai quá trình chủ yếu là sự phân bào mitosis và biệt hóa tế bào (cell differentiation). Sự phân bào mitosis bảo đảm cho tất cả tế bào của một chủng quần cũng như toàn bộ cơ thể có bộ thể nhiễm sắc ổn định  $2n$ , xảy ra trong giai đoạn M của chu kỳ tế bào. Trong cơ thể đã trưởng thành, các tế bào soma vẫn phân bào mitosis trong các chủng quần đổi mới như: biểu mô nền của da, biểu mô ruột, các tế bào gốc tủy đỏ xương. Trong các chủng quần ổn định (ví dụ gan) các tế bào soma không phân bào nhưng khi có nhân tố kích thích chúng vẫn có khả năng phân bào mitosis (khi hàn gắn vết thương). Đối với thực vật các tế bào và mô soma có thể phân bào và tái biệt hóa thành cây trưởng thành theo kiểu sinh sản sinh dưỡng.

Sự biệt hóa tế bào là quá trình tạo thành các tế bào biệt hóa khác nhau về hình thái và chức năng - tức là tạo thành các tế bào của các mô và cơ quan khác nhau. Trong quá trình phát triển phôi ở động vật sự biệt hóa thấy rõ nhất khi tạo thành ba lá phôi: lá phôi ngoài (ngoại phôi bì), lá phôi trong (nội phôi bì) và lá phôi giữa (trung phôi bì) và từ ba lá phôi các tế bào sẽ biệt hóa tạo thành các mô khác nhau. Sự sinh trưởng và biệt hóa xảy ra trong giai đoạn G1 của chu kỳ sống của tế bào.

#### 7.6.2 Sự biệt hóa về hình thái và chức năng

Các tế bào soma khác biệt nhau về hình thái và chức năng. Có khoảng 200 dạng tế bào soma tập hợp thành 20 dạng mô khác nhau trong cơ thể người. Ví dụ, tế bào hồng cầu không nhân có dạng cầu lõm hai mặt, có chức năng chuyên chở  $O_2$  và  $CO_2$ , tế bào biểu mô ruột có dạng hình khối trụ có nhiều vi nhung mao, có chức năng hấp thụ chất dinh dưỡng; bạch cầu có dạng cầu có chân giả có khả năng thực bào; tế bào cơ có dạng hình thoi, chứa nhiều tơ cơ có khả năng co rút; tế bào thần kinh có dạng hình sao, có nhiều sợi dài có chức năng dẫn truyền xung động.

#### 7.6.2 Sự biệt hóa về sinh hóa

Các tế bào soma khác nhau về mặt sinh hóa, chúng tổng hợp các protein đặc thù cho mình, ví dụ hồng cầu chứa hemoglobin, tế bào biểu mô da chứa keratin, tế bào cơ chứa myoglobin, actin và miozin, tế bào thần kinh chứa các chất trung gian thần kinh v.v.. Chỉ có tế bào  $\alpha$  và  $\beta$  của đảo tụy tổng hợp insulin và glucagon và chỉ có tế bào tuyến giáp tổng hợp thyroxin. Đó là những protein đặc thù được tổng hợp trong quá trình biệt hóa của các tế bào.

### 7.6.2 Sự biệt hóa- hoạt động biệt hóa của hệ gen

Hoạt động của gen thể hiện ở ba quá trình:

Tự tái bản ADN và nhân đôi thể nhiễm sắc ở giai đoạn S của chu trình tế bào, đó là cơ sở cho sự phân bào, phương thức truyền thông tin di truyền qua các thế hệ.

Phiên mã các ARN (mARN, rARN và tARN)

Dịch mã - sự tổng hợp protein theo khuôn mẫu mARN trên riboxom và lắp ráp axit amin nhờ tARN.

Sự phiên mã và dịch mã xảy ra trong giai đoạn G1 khi tế bào đi vào tiến trình biệt hóa, tức là tổng hợp các protein đặc thù để tạo thành các tổ hợp trên phân tử, các siêu cấu trúc đặc thù cho hình thái và chức năng của tế bào biệt hóa.

Sự phiên mã và dịch mã xảy ra theo thời gian và không gian (vị trí của các phần của phôi) của quá trình phát triển cá thể, nghĩa là các gen và hệ gen hoạt động đóng hay mở theo một cơ chế điều hòa ở nhiều cấp độ. Như vậy vấn đề biệt hóa trong hoạt động của hệ gen là vấn đề điều hòa hoạt động của gen (xem phần trước).

## 7.2 Lai tế bào soma

Trong quần thể sinh sản hữu tính tế bào hợp tử là tế bào lai hình thành do sự kết hợp giữa hai giao tử - đó là lai hữu tính. Trong nuôi cấy tế bào *invitro* người ta có thể tạo thành tế bào lai bằng cách kết hợp hai tế bào soma với nhau - đó là lai soma. Sự lai soma rất hiếm xảy ra trong cơ thể sống ở thực vật và động vật.

### 7.6.2 Lai ghép ở thực vật

Lai ghép hay là lai dinh dưỡng từ lâu đã được thực hiện ở thực vật và có ý nghĩa lớn trong thực tiễn trồng trọt các cây ăn trái, cây cảnh v.v. và một số nhà nghiên cứu cho rằng lai dinh dưỡng bằng ghép là lai soma, nhưng thực chất thì cây “lai dinh dưỡng” chẳng qua là một loại cơ thể khảm vừa mang các tế bào và mô của gốc ghép và cành ghép. Giữa các tế bào và mô của gốc ghép và cành ghép có thể có sự trao đổi thông tin điều chỉnh sự trao đổi chất tạo cho cành ghép có một số tính chất của gốc ghép, nhưng không thể xảy ra sự hòa hợp nhân để tạo nên tế bào lai thực sự vì màng sinh chất và màng xenlulozo là hàng rào ngăn cản sự hòa hợp đó. Hơn nữa các tính trạng trung gian chỉ có ở thể hệ cành ghép, còn khi đem gieo các hạt của cành ghép thì thế hệ sau không còn có tính trạng trung gian vì hạt được hình thành chỉ từ genom của cành ghép. Tính phổ biến hiện tượng đa bội trong thế giới thực vật chủ yếu là do lai hữu tính hoặc do nội phân (endomitosis) tạo thành, rất hiếm có trường hợp do lai soma. Nhiều nhà nghiên cứu cho rằng hiện tượng các mixel đơn bội của nấm *Aspergillus* cho ra các mixel lưỡng bội, hoặc trong thụ tinh kép dẫn tới tạo thành các tế bào tam bội là một dạng lai soma

## 7.6.2 Cây ghép mô ở động vật

Nghiên cứu cây ghép mô và cơ quan ở động vật không chỉ có ý nghĩa thực tiễn trong miễn dịch y học, trong phẫu thuật cây ghép mô và cơ quan mà còn có ý nghĩa đối với di truyền, di truyền tế bào soma và di truyền ung thư v.v.. Bản chất của cây ghép mô và cơ quan là hiện tượng tương hợp hay không tương hợp giữa các mô và cơ quan của người nhận và người cho, được xác định bởi đặc tính di truyền của chúng. Các nhân tố di truyền (các gen) được di truyền theo các qui luật Mendel.

Đặc tính tương hợp hay không tương hợp được xem như một cặp tính trạng đối lập. Nguyên nhân của tính không tương hợp là do người nhận lặn đã hình thành kháng thể chống kháng nguyên xác định bởi các gen trội của người cho.

Nói một cách khác nếu ta cấy ghép mô có tính khác biệt về kháng nguyên giữa người cho và người nhận thì chỉ sau một thời gian mảnh mô ghép sẽ bị chết hoặc bị bong đi. Vì vậy, miếng ghép hoặc cơ quan ghép tồn tại chỉ khi ghép các mô của cùng cơ thể hoặc giữa các cơ thể sinh đôi cùng trứng

Người ta phân biệt các kiểu ghép sau:

*Ghép tự hợp* (autotransplantation) là trường hợp ghép mô của một cá thể, ví dụ ghép da bụng vào da mặt của cùng một người (hoặc nuôi cấy tế bào da của người đó để dùng làm mảnh ghép cho người đó) khả năng sống đạt 100%.

*Ghép đồng hợp* (isotransplantation) là trường hợp ghép mô, cơ quan giữa hai người sinh đôi cùng trứng hoặc giữa các cá thể thuộc một dòng lai nội dòng (inbreeding), khả năng sống gần 100%.

*Ghép đồng hợp* (homotransplantation) là trường hợp ghép mô, cơ quan giữa các cá thể thuộc các dòng của cùng một loài, thường xảy ra không tương hợp và ghép sẽ không kết quả nếu không sử dụng biện pháp ức chế tính không tương hợp mô.

*Ghép dị hợp* (heterotransplantation) là trường hợp ghép mô, cơ quan giữa hai cá thể thuộc hai loài khác nhau và ghép không có kết quả.

*Ghép lai* (hybridotransplantation) là trường hợp cá thể lai giữa hai dòng nội lai còn cá thể nhận là cá thể lai giữa hai dòng nội lai đó. Mảnh ghép tồn tại trong một số trường hợp.

Tính tương hợp hay không tương hợp mô được qui định bởi phức hệ các protein đặc thù được gọi là phức hệ tương hợp mô chủ yếu (MHC – Major Histocompatibility Complex), phức hệ protein này được mã hóa bởi các gen được gọi là gen tương hợp mô (histocompatibility genes) là hệ thống gồm nhiều gen, nhiều alen và biểu hiện đồng trội. Ở người phức hệ MHC được gọi là phức hệ HLA (Human Leucocyte Antigens) được mã hóa bởi họ đa gen định khu trong vế ngắn của thể nhiễm sắc số 6.

Sự cấy ghép mô ở động vật không gây ra hiện tượng dung hợp tế bào *in vivo* vì không vượt qua tính không tương hợp, ngay như đối với động vật có vú có nhau thai thì phôi phát triển trong dạ con được xem như một cơ quan lạ cấy ghép vào cơ thể mẹ, tuy không bị loại thải nhờ những cơ chế đặc biệt ức chế được tính không tương hợp mô nhưng không xảy ra sự dung hợp tế bào của thai và mẹ.

## 7.3 Lai tế bào soma động vật invitro

### 7.6.2 Sự tạo thành ngẫu nhiên tế bào lai soma invitro

Như ta đã biết *in vivo* sự tạo thành tế bào lai soma là vô cùng hiếm. Bằng phương pháp nuôi cấy tế bào *invitro* người ta có thể nuôi cấy các loại tế bào của cùng một mô hoặc của các mô khác nhau của cùng một cơ thể hoặc các cơ thể khác nhau của cùng một loài hoặc thuộc các loài khác nhau thậm chí rất xa nhau.

Lần đầu tiên năm 1960 các tác giả Barski, Sorieul, Cornefert thông báo là đã tạo được tế bào lai soma *invitro* khi họ nuôi cấy trộn lẫn các tế bào sarcoma của chuột thuộc hai dòng khác nhau. Các dòng tế bào được nuôi cấy khác biệt nhau ở các đặc điểm: (1) khả năng tạo thành u khi tiêm chúng vào chuột mang tính tương hợp mô và (2) số lượng và hình thái thể nhiễm sắc.

Khi phân tích bộ thể nhiễm sắc của các tế bào lai thấy rõ sự tổ hợp của hai bộ thể nhiễm sắc của cả hai dòng tế bào khởi nguồn (xem bảng 7.1).

**Bảng 7.1 Bộ thể nhiễm sắc của dòng tế bào khởi nguồn N1 và N2 và của tế bào lai M**

	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	M
Số lượng thể nhiễm sắc	55	62	115-116
Số lượng thể nhiễm sắc cân tâm	0	9-19	9-15

Khi nuôi cấy trộn lẫn các tế bào dòng L (từ chuột C3H) với các tế bào dòng MT1 (từ chuột SWR) người ta thu nhận được các tế bào lai. Sử dụng đặc tính về khả năng gây ung thư khi tiêm tế bào vào chuột mang tính tương hợp mô người ta thấy khi tiêm tế bào lai cho chuột C3H hoặc SWR đều không gây được ung thư, nhưng khi tiêm tế bào lai cho chuột lai (giữa C3H và SWR) thì gây được ung thư.

Điều đó chứng tỏ tế bào lai chứa cả hai loại kháng nguyên bề mặt của cả hai dòng tế bào khởi nguồn do đó chúng đã bị thải loại khi tiêm cho mỗi một dòng chuột khởi nguồn, (xem bảng 7.2).

**Bảng 7.2 Khả năng tạo ung thư của tế bào lai (1)**

Tế bào	Nguồn tế bào	Tạo ung thư		
		Chuột C <sub>3</sub> H	Chuột SWR	Chuột lai C <sub>3</sub> H x SWR
L	Chuột C <sub>3</sub> H	có	không	đôi khi có
MT1	Chuột SWR	không	Có	có
Lai	Tế bào L x MT1	không	không	có

Dẫn theo Ringert và Savage (1979)

Bằng phương pháp chọn lọc dòng tế bào khởi nguồn mang đặc tính đặc trưng nào đấy để đánh dấu tế bào, ví dụ thiếu một loại enzym đặc thù nào đấy và nuôi cấy chúng với các tế bào bình thường (có enzym đó) trong môi trường chọn lọc (có hoặc không sản phẩm tác động bởi enzym nào đó), người ta dễ dàng tạo dòng tế bào lai *invitro*.

Khi tế bào lai được hình thành từ các tế bào cùng một khởi nguồn, thì tế bào lai được gọi là tế bào đồng nhân (homocaryon), còn khi các tế bào được nuôi cấy thuộc các cơ thể khác nhau về bậc phân loại, tức các loài, giống hoặc họ, bộ v.v. khác nhau ta thu được tế bào lai dị nhân (heterocaryon). Với nghĩa đúng đắn thì các heterocaryon mới thực sự là tế bào lai.

Trong nuôi cấy *invitro*, khi nuôi cấy trộn lẫn các tế bào thuộc hai loài khác nhau, ví dụ tế bào chuột + tế bào người, vẫn thu được tế bào lai một cách ngẫu nhiên, tuy xảy ra với tần số rất thấp. Khi sử dụng các nhân tố kích thích ví dụ hóa chất, virus v.v. thì lai tế bào xảy ra dễ dàng hơn và với tần số lai cao hơn

### 7.6.2 Lai tế bào khi sử dụng virus kích thích

Năm 1965 các nhà nghiên cứu Harris, Watkins, Okada và Murayama đã sử dụng virus Sendai đã bị bất hoạt bởi bức xạ tử ngoại, làm tác nhân kích thích trong nuôi cấy, họ đã tạo được các tế bào lai heterocaryon giữa chuột với người, giữa lợn với người. Các tế bào lai này có thể tăng sinh để cho ra các thể hệ tế bào lai hợp nhân (syncaryon). Lúc đầu tế bào lai còn chứa cả hai nhân - được gọi là heterocaryon. Heterocaryon có thể tồn tại một thời gian hoặc bị chết (trường hợp lai ngẫu nhiên), hoặc heterocaryon sẽ biến thành syncaryon khi 2 nhân hòa hợp tạo thành một nhân chung. Các syncaryon có khả năng phân bào mitosis cho ra các thể hệ nối tiếp tạo nên dòng tế bào lai.

Ngày nay trong nghiên cứu lai tế bào *invitro*, việc sử dụng virus làm tác nhân kích thích đã trở thành phổ biến và thông dụng. Nhiều dạng virus có khả năng kích thích sự hòa hợp tế bào invitro như các virus chứa ADN (nhóm virus *Herpes*, virus đậu mùa v.v.), các virus chứa ARN (virus lợn, virus Niu-cát-xon, virus Sendai v.v.), các virus gây ung thư (virus *Sarcoma rous*) v.v..

Nhưng gây hiệu quả nhiều nhất là virus Sendai là loại virus chứa ARN có tác động ngưng kết hồng cầu tìm thấy ở Nhật Bản nên có tên gọi là virus HVJ vì lần đầu tiên được phân lập tại trường Đại học Tohoky ở Sendai (Nhật bản) nên có tên gọi là virus Sendai.

Virus Sendai được cấu tạo bởi lõi ARN và được bao bởi các phân tử glicoprotein có khả năng làm ngưng kết máu và dung hợp tế bào, ngoài cùng là màng lipoprotein có nguồn gốc từ màng sinh chất tế bào vật chủ. Virus Sendai ký sinh trong các tế bào động vật bằng cách liên kết với màng sinh chất tế bào vật chủ và bằng hiện tượng nhập bào và tạo thành các bóng nhập bào để xâm nhập vào tế bào vật chủ.

Do tính chất của virus liên kết với màng tế bào nên chúng làm liên kết các màng hồng cầu với nhau tạo nên ngưng kết máu. Trong nuôi cấy invitro virus Sendai làm liên kết màng sinh chất của hai tế bào với nhau tạo điều kiện cho sự dung hợp hai tế bào tạo thành heterocaryon. Tuy nhiên, sự dung hợp tế bào còn tùy thuộc vào đặc tính của tế bào, vào số lượng hạt virus, vào nồng độ các ion, vào độ pH, vào nguồn năng lượng v.v.. Để tăng tính liên kết người ta thường sử dụng virus kết hợp với một loại hóa chất cũng có khả năng tạo sự dung hợp tế bào là polyethylen glycol.

### 7.6.2 Các tế bào lai heterocaryon

Chúng ta hãy xem xét một số công trình nghiên cứu về các đặc tính di truyền và biến dị, sự tái bản mã, phiên mã và dịch mã của tế bào lai, cũng như đặc tính biệt hóa tế bào của chúng.

#### 7.3.3.1 Sự hoạt hóa của nhân

Khi lai các tế bào mang nhân hoạt hóa như limpho bào (lymphoblast) của chuột, tế bào ung thư Hela (là tế bào ung thư cổ tử cung của chị Henrietta được tách ra để nuôi cấy từ năm 1951 khi chị bị tử vong) của người với tế bào mang nhân bất hoạt, ví dụ tế bào hồng cầu của

gà, người ta thu được tế bào lai có chứa cả nhân của hồng cầu gà và nhân của tế bào chuột (khi lai với tế bào chuột) hoặc người (khi lai với tế bào Hela).

Trong môi trường tế bào chất của tế bào lai, nhân của hồng cầu gà được hoạt hóa thể hiện ở các hiện tượng sau:

- Khối lượng nhân tăng lên, nhân ở dạng xốp hơn và chứa chất nhiễm sắc ở dạng phân tán.
- Có sự xâm nhập của các protein đặc trưng cho người từ tế bào chất vào nhân.
- Có sự hoạt hóa các ARN-polymeraza và tổng hợp các dạng ARN.
- Có sự tạo thành hạch nhân và tạo nhiều riboxom.
- Có sự tổng hợp nhiều loại protein đặc trưng cho gà bao gồm các enzym, các protein kháng nguyên bề mặt và các protein thụ thể.
- Có sự tổng hợp ADN.
- Tạo thành tế bào lai syncaryon chứa một nhân, trong đó đa số thể nhiễm sắc của gà bị thải loại.

Ta xem xét một số hiện tượng trong các biến đổi trên đây:

#### *Tổng hợp ARN và ADN trong tế bào lai*

+ Trong tế bào lai giữa hồng cầu gà với tế bào Hela diễn ra sự tổng hợp ARN, tức là phiên mã từ nhân hồng cầu. Sử dụng H<sup>3</sup>-uridin để đánh dấu và theo dõi sự tổng hợp ARN thì sự tổng hợp ARN tăng lên theo sự tăng thể tích và tăng độ xốp của chất nhiễm sắc của nhân hồng cầu vào những ngày đầu tiên sau khi dung hợp, dạng ARN được tổng hợp là các mARN và chỉ sau đó các rARN mới được xuất hiện sau khi xuất hiện hạch nhân.

+ Khoảng 10 - 15 giờ sau khi dung hợp thì nhân hồng cầu trong tế bào lai heterocaryon tăng cao thể tích nhưng vẫn còn ở giai đoạn G<sub>1</sub>. Sử dụng H<sup>3</sup>-timidin để đánh dấu và theo dõi sự tổng hợp ADN thì quan sát thấy sau 48 giờ hàm lượng ADN trong nhân hồng cầu được tăng lên. Sự tăng cao thể tích của nhân không tương ứng với sự tổng hợp ADN, nhưng cần có sự tác động của các nhân tố (các protein) đến từ tế bào chất của tế bào Hela vào nhân hồng cầu.

+ Khi sử dụng các tế bào nhân bất hoạt nhưng ở mức độ vừa phải so với nhân hồng cầu, ví dụ các đại thực bào. Bình thường các đại thực bào không tổng hợp ADN và tế bào ở giai đoạn biệt hóa G<sub>1</sub>, chúng chứa hạch nhân nhỏ và tổng hợp một ít ARN. Khi nuôi cấy các đại thực bào (từ thỏ hoặc chuột) với các tế bào hoạt hóa như tế bào Hela hoặc tế bào melanom của người, sẽ tạo nên các tế bào lai heterocaryon, trong đó nhân đại thực bào tăng cao thể tích và chúng tổng hợp ARN tăng 4 - 10 lần so với bình thường chỉ một giờ sau dung hợp và sau ba giờ xảy ra tổng hợp ADN. Điều đó chứng tỏ so với nhân của hồng cầu gà, nhân của đại thực bào bất hoạt ở mức thấp hơn.

Khi nghiên cứu tiến trình tổng hợp các ARN và ADN trong tế bào lai giữa đại thực bào và tế bào melanom, người ta đã chứng minh là sự tổng hợp ADN trong nhân đại thực bào không phụ thuộc vào sự tổng hợp ARN và protein trong nhân đại thực bào mà phụ thuộc vào các nhân tố đến từ tế bào chất của tế bào melanom.

+ Sử dụng virut Sendai làm tác nhân kích thích có thể tạo được tế bào lai từ các tế bào soma (2n) với các tế bào giao tử (n) như tinh trùng hoặc tế bào trứng.

Khi lai với tinh trùng thì nhân của tinh trùng tồn tại trong tế bào lai rất lâu (có thể tới vài tháng) và vẫn ở trạng thái bất hoạt, nhưng khi đem lai tinh tử (spermatide) với tế bào soma (ví dụ lai tinh tử chuột cống với tế bào soma chuột nhắt) thì tạo nên các tế bào lai có khả năng phân bào.

Khi đem tế bào trứng chưa thụ tinh của chuột nhắt lai với các tế bào soma khác nhau như: tế bào chuột cống, khi hoặc người sẽ tạo nên tế bào lai và tế bào lai này có thể phát triển tới giai đoạn phôi dâu (morula).

Sự thụ tinh là sự dung hợp giữa tinh trùng và trứng để tạo nên hợp tử chứa cả nhân tinh trùng và nhân trứng - có thể được xem như một tế bào lai giữa hai tế bào đơn bội cùng loài hoặc đôi khi khác loài xảy ra *invitro* trong ống dẫn trứng của con cái (hoặc ở phần nào đó trong xoang bụng ngoài ống dẫn trứng) là đã được chương trình hóa trong bộ gen của chúng. Trong nuôi cấy *invitro* để thực hiện được sự thụ tinh giữa tinh trùng và trứng thì tinh trùng phải được xử lý để làm thay đổi tính chất sinh lý của chúng được gọi là sự khả năng hóa (capacitation), nhưng khi sử dụng virus Sendai thì tinh trùng không cần phải “khả năng hóa” vẫn thực hiện được thụ tinh với trứng.

#### *Sự điều hòa tổng hợp ADN và ARN trong tế bào lai*

Khi sử dụng các dạng tế bào soma có đặc tính hoạt hóa hay bất hoạt khác nhau về tổng hợp ARN và ADN trong nhân để tạo tế bào lai và nghiên cứu sự tổng hợp ADN và ARN ở tế bào lai người ta thấy:

**Bảng 7.3 Sự tổng hợp ARN và ADN trong các tế bào bố mẹ I và II và tế bào lai heterocaryon (I x II)**

Heterocaryon						ARN		ADN	
Tế bào I	ARN	ADN	Tế bào II	ARN	ADN	I	II	I	II
Hela (người)	+	+	Đại thực bào (thỏ)	+	-	+	+	+	+
Hela (người)	+	+	Tế bào limpho (chuột)	+	-	+	+	+	+
Hela (người)	+	+	Hồng cầu (gà)	-	-	+	+	+	+
Đại thực bào (thỏ)	+	-	Hồng cầu (gà)	-	-	+	+	-	-
Nguyên bào cơ (chuột)	+	+	Hồng cầu (gà)	-	-	+	+	+	-
Tế bào cơ (chuột)	+	-	Hồng cầu (gà)	-	-	+	+	-	-
Melanocyt (chuột)	+	+	Đại thực bào (thỏ)	+	-	+	+	+	+

Ghi chú: + có; - không, +- khi có khi không



Tế bào có hoạt tính càng cao tham gia vào tế bào lai sẽ kích thích nhân tế bào không có hoạt tính hoặc có hoạt tính thấp tổng hợp ADN và ARN càng tích cực hơn (trừ trường hợp nhân tế bào ít hoạt tính lớn hơn nhiều lần so với nhân tế bào hoạt tính cao, hoặc khi heterocaryon được tạo thành từ các tế bào quá già).

Nhân không có hoạt tính hoặc có hoạt tính thấp sẽ đạt mức tổng hợp ADN và ARN như ở nhân có hoạt tính.

Ví dụ, khi dùng tế bào chỉ có hoạt tính tổng hợp ARN mà không tổng hợp ADN (tế bào cơ, đại thực bào) thì trong tế bào lai, nhân không hoạt tính chỉ tổng hợp có ARN (xem bảng 7.3).

Tín hiệu phát động sự tổng hợp ARN và ADN đến từ tế bào chất của tế bào có hoạt tính cao và không mang tính đặc trưng mô hoặc loài.

Cơ chế và nguyên tắc điều hòa sự tổng hợp ADN (tái bản mã) và ARN (phiên mã) diễn ra trong tế bào lai tương tự ở tế bào bình thường. Nhiều gen là bất hoạt trong các tế bào không có hoạt tính vẫn giữ trạng thái bất hoạt trong tế bào lai chứng tỏ chúng không mang tính ngược chiều, nhưng nhiều gen bất hoạt đã trở lại hoạt động trong tế bào lai chứng tỏ chúng có tính ngược chiều. Những công trình cấy ghép nhân hoặc nhân bản vô tính từ tế bào soma chứng tỏ là tùy loại tế bào, tùy mức độ và giai đoạn biệt hóa mà tính ngược chiều của hoạt động gen thể hiện khác nhau từ các gen riêng lẻ, các họ gen hay toàn bộ genom.

### 7.3.3.2 Biến đổi của bộ thể nhiễm sắc trong tế bào lai

Phân tích bộ thể nhiễm sắc của tế bào lai có tầm quan trọng trong việc xác định các tế bào dung hợp có thực sự là tế bào lai hay không và cho phép nghiên cứu các vấn đề về cấu trúc, tập tính của thể nhiễm sắc như là cấu trúc hiển vi chứa thông tin di truyền của tế bào. Bằng phương pháp đánh dấu thể nhiễm sắc và các phương pháp tế bào học khác như xây dựng kiểu nhân, nhuộm cắt băng phương pháp lai ADN v.v. người ta đã làm sáng tỏ nhiều vấn đề di truyền và biến dị của các tế bào lai soma.

Trong tế bào lai khác loài, ví dụ giữa chuột và người, giữa chuột với khỉ, giữa chuột với gà v.v. khi hai bộ thể nhiễm sắc của hai tế bào bố mẹ tổ hợp lại với nhau sẽ xảy ra sự biến mất một số thể nhiễm sắc của một trong hai bộ hoặc của cả hai bộ thể nhiễm sắc (xem bảng 7.4).

Theo dõi sự biến đổi bộ thể nhiễm sắc trong dòng tế bào lai qua các thế hệ thấy các quần thể tế bào lai chứa bộ thể nhiễm sắc rất đa dạng về mức bội thể (heteropolyploid) và tùy thuộc không chỉ về loài mà còn tùy thuộc vào loại mô bố mẹ (tim, gan, thận, tuỷ xương, tuyến ức, lách, não, v.v.) và còn tùy thuộc vào trạng thái của thể nhiễm sắc của tế bào bố mẹ trước khi đem lai (bị đột biến do chiếu xạ, hóa chất hoặc ung thư v.v.) và cả trạng thái hoạt động của gen. Xu thế là thể nhiễm sắc nào bị tổn thương, hoặc thể nhiễm sắc chứa nhiều gen hoạt động sẽ bị thải loại trong tế bào lai.

**Bảng 7.4 Sự biến mất thể nhiễm sắc trong tế bào lai khác loài**

Tế bào lai	Loài bị mất thể nhiễm sắc
------------	---------------------------

Người + Chuột nhắt	Người
Người + Chuột hamster	Người
Chuột nhắt + Khi	Khi
Chuột nhắt + Chuột cống	Chuột nhắt, chuột cống
Chuột nhắt + Gà con	Gà con
Chuột hamster + Gà con	Gà con

Số lượng thể nhiễm sắc bị mất cũng như tốc độ mất tùy thuộc vào sự khác biệt chủng loại giữa tế bào bố mẹ và tùy thuộc vào dòng tế bào lai qua các thế hệ sống còn. Ví dụ, trong tế bào lai giữa chuột nhắt với chuột hamster sự thải loại thể nhiễm sắc xảy ra chậm, còn trong tế bào lai giữa người với gà, thải loại thể nhiễm sắc xảy ra nhanh hơn trong giai đoạn sống đầu tiên nhưng càng về sau sự thải loại xảy ra chậm dần cho tới khi tế bào lai mang số thể nhiễm sắc ổn định (giữ lại từ một đến ba thể nhiễm sắc của người). Trong một dòng tế bào lai sự thải loại thể nhiễm sắc diễn ra cũng rất khác nhau, ví dụ tế bào lai giữa chuột và người có dòng vẫn giữ nguyên bộ thể nhiễm sắc người trong suốt bốn tháng, trong thời gian đó có dòng bị thải loại tới 50% thể nhiễm sắc người. Để thuận tiện phân tích bộ thể nhiễm sắc các nhà nghiên cứu thường sử dụng tế bào chuột hamster Trung Quốc ( $2n = 22$ ) lai với tế bào người ( $2n = 46$ ). Các tế bào lai chỉ qua thời gian sống từ 1 - 2 tuần đã cho các dòng ổn định với toàn bộ thể nhiễm sắc của chuột và 1 - 2 thể nhiễm sắc người và như vậy rất thích hợp cho việc nghiên cứu.

Sự giữ lại hoặc thải loại thể nhiễm sắc nào trong bộ thể nhiễm sắc bố hoặc mẹ trong tế bào lai xảy ra không phải ngẫu nhiên mà chắc chắn là tuân theo các cơ chế tương tác giữa hai genom trong trạng thái tế bào chất chung của tế bào lai và với môi trường nuôi cấy *invitro*.

Trong tế bào lai xảy ra sự biến đổi về cấu trúc thể nhiễm sắc. Các tế bào bố mẹ được dùng để lai trong nuôi cấy có thể ở các giai đoạn khác nhau của chu kỳ tế bào: có tế bào ở giai đoạn M (Mitosis - giai đoạn phân bào), có tế bào ở giai đoạn gian kỳ I (Interphase - gian kỳ gồm G1, S, và G2). Khi các tế bào bố mẹ dung hợp tạo thành tế bào lai heterocaryon chứa một nhân dung hợp thống nhất với hai hoặc vài bộ thể nhiễm sắc, thường quan sát thấy sự biến đổi về cấu trúc trong các thể nhiễm sắc như sự đông đặc hóa, đứt đoạn v.v.. Nếu tế bào bố mẹ một ở giai đoạn M thì nhân của tế bào bố mẹ hai có thể đang ở giai đoạn G1, S hoặc G2. Nếu ở G1 người ta quan sát thấy các sợi nhiễm sắc qua tế bào một ở dạng đông đặc sợi đơn, nếu ở G2 tức là giai đoạn sau tổng hợp ADN, các sợi nhiễm sắc đông đặc ở dạng sợi đôi gần giống như ở tiền kỳ của mitosis bình thường. Nếu ở S thì dạng đông đặc ở dạng các mảnh vụn. Người ta cho rằng dưới ảnh hưởng của các nhân tố phân bào của tế bào hai đã làm biến đổi cấu trúc của thể nhiễm sắc của tế bào một, sang dạng đông đặc gần giống với dạng đông đặc và co ngắn của thể nhiễm sắc ở kỳ giữa trong phân bào mitosis bình thường. Các thể nhiễm sắc bị đông đặc và đứt mảnh sẽ bị thải loại qua các kỳ phân bào của tế bào lai syncaryon.

Trong nuôi cấy, các syncaryon có xu thế đồng thời hóa (synchronisation) các pha qua các thế hệ phân bào và để thuận tiện cho việc nghiên cứu tế bào lai các nhà nghiên cứu thường thực hiện phương pháp làm đồng thời hóa các pha của các tế bào bố mẹ trước khi đem nuôi cấy để lai để loại trừ hiện tượng đông đặc hóa. Nhưng khi cần nghiên cứu so sánh trạng thái mở xoắn và xấp hóa của chất nhiễm sắc ở gian kỳ với trạng thái xoắn và đông đặc của thể nhiễm sắc ở phân bào, cũng như khi cần nghiên cứu ảnh hưởng của các tác nhân gây đột biến (như bức xạ, hóa chất) lên cấu trúc của chất nhiễm sắc ở gian kỳ thì các nhà nghiên cứu thường sử dụng các tế bào lai mang các thể nhiễm sắc đông đặc.

## 7.6.2 Sự hoạt hóa của gen ở tế bào lai

Khi ta cho lai hai loại tế bào soma khác loài *invitro* ta thu được tế bào lai ở dạng heterocaryon chứa hai nhân hoặc vài nhân riêng biệt, về sau các nhân trong heterocaryon dung hợp tạo nên một nhân độc nhất chứa tổ hợp các bộ thể nhiễm sắc trong một tế bào lai được gọi là syncaryon. Các heterocaryon có thể tồn tại rất lâu hoặc chết đi hoặc biến thành syncaryon. Người ta theo dõi số phận và đời sống của các tế bào lai qua các đặc tính như: biểu hiện của hệ gen thành các tính trạng kiểu hình (phenotip) chủ yếu là tổng hợp các protein, các enzym, sự tạo thành các siêu cấu trúc, sự biệt hóa tế bào về hình thái và một số đặc tính sinh lý sinh hóa khác như phản ứng với các tác nhân kích thích, sự sinh sản và phát triển v.v..

Để nghiên cứu sự biểu hiện tính trạng của các tế bào lai syncaryon người ta thường sử dụng: các tế bào bố mẹ có các đặc tính như tính toàn năng (totipotential) hoặc đa năng (multipotential) ví dụ tế bào trứng đã thụ tinh, tế bào phôi ở giai đoạn sớm, tế bào teratoma (tế bào ung thư trong cơ quan sinh dục) hoặc các tế bào phôi ở giai đoạn phát triển muộn, tế bào của các mô ở động vật trưởng thành; hoặc các tế bào dị bội (heteroploide) chưa biệt hóa và sẽ không biệt hóa trong nuôi cấy lâu dài. Điển hình cho hai loại tế bào này là tế bào Hela ở người và tế bào L ở chuột nhắt.

Để theo dõi sự biểu hiện tính trạng của tế bào lai người ta thường dựa vào sự phân tích các tính chất sau được xem là kiểu đánh dấu:

- + Đặc tính hình thái, tốc độ tăng trưởng, ức chế tiếp xúc và sự già (kiểu đánh dấu A).
- + Các đặc tính sinh lý và miễn dịch, nhu cầu chất dinh dưỡng (kiểu đánh dấu B).
- + Các protein đặc trưng, ví dụ các enzym, globulin miễn dịch, hormon (kiểu đánh dấu C).
- + Đặc tính nhạy cảm với chất có hoạt tính sinh học (kiểu đánh dấu D).

Ta cần chọn hai dạng tế bào bố mẹ khác nhau một trong các đặc tính nêu trên thì ta xem đó là kiểu đánh dấu để theo dõi và phân tích ở tế bào lai. Ví dụ, khi ta chọn tế bào bố mẹ một có một trong các tính chất ABCD và tế bào bố mẹ hai không có một trong các tính chất đó (ta ký hiệu abcd) và dựa vào từng cặp tính chất (kiểu đánh dấu ABCD và abcd) để phân tích ở tế bào lai ở các dòng khác nhau có hay không có các tính trạng đó.

Một trong các kiểu đánh dấu được sử dụng nhiều nhất là phân tích protein gồm các enzym, các protein đặc thù và các hormon. Enzym là protein đóng vai trò chất xúc tác sinh học có vai trò rất quan trọng trong các quá trình trao đổi chất đặc trưng cho toàn bộ cơ thể, ví dụ các enzym của đường phân (glycolyse), của chu trình Krebs, các enzym tham gia tái bản mã và phiên mã v.v.. Các enzym được dùng như là kiểu đánh dấu thường là lactatdehydrogenaza, malatdehydrogenaza,  $\beta$ -glucoronidaza, glucozo-6-phosphat dehydrogenaza cùng các dạng isoenzym của chúng. Các protein đặc thù được sử dụng làm kiểu đánh dấu thường là globulin miễn dịch, các kháng nguyên bề mặt, các chất hoạt tính thần kinh (như protein S-100, axetilcholinesteraza), các protein cấu trúc như: hemoglobin, actin, albumin, collagen v.v.. Các hormon được sử dụng làm kiểu đánh dấu thường là hormon sinh trưởng v.v..

Sử dụng các protein đặc thù làm kiểu đánh dấu người ta theo dõi được sự biểu hiện của gen mã hóa cho protein đó và quá trình biệt hóa của tế bào lai, ví dụ hemoglobin là protein đặc thù cho hướng biệt hóa của hồng cầu, protein S-100 là protein sẽ dẫn tới biệt hóa tế bào thần kinh v.v.. Nhưng cần phải lưu ý là: protein actin là đặc thù tế bào cơ, nhưng actin cũng có mặt trong rất nhiều dạng tế bào tạo nên cấu trúc vi sợi có chức năng là bộ khung xương tế

bào và tham gia các kiểu vận động nội bào như vận động tế bào chất, vận động amip quan sát thấy ở bạch cầu, đại thực bào v.v.. Vì vậy, để đánh giá trạng thái biệt hóa của tế bào lai cần sử dụng kiểu đánh dấu hình thái và sinh lý ví dụ để đánh giá dạng biệt hóa nơron cần phân tích các cấu trúc như vi sợi thần kinh, các sợi lông tế bào chất, cũng như hoạt tính điện sinh lý v.v., dạng biệt hóa tế bào cơ là các cấu trúc tơ cơ v.v..

Đặc tính nhạy cảm với các chất có hoạt tính sinh học đặc biệt được sử dụng thường là các tác nhân gây đột biến (mutagen), là kiểu đánh dấu để phân tích khi nuôi cấy và lai các tế bào bố mẹ đã bị đột biến.

Sử dụng các kiểu đánh dấu ta có thể theo dõi sự biểu hiện của các gen trong các thể nhiễm sắc thường (autosome) hoặc các gen trong các thể nhiễm sắc giới tính đặc biệt là thể nhiễm sắc X. Ví dụ, khi lai tế bào người với tế bào chuột nhất ta dùng các kiểu đánh dấu như enzym lactatdehydrogenaza hoặc  $\beta$ -glucoronidaza hoặc kháng thể HLA người và kháng thể H2 chuột, ta có thể theo dõi sự biểu hiện trội hoặc lặn hoặc biểu hiện tương tác của các gen mã hóa cho các protein đó trong tế bào lai qua các thế hệ. Nhiều kết quả nghiên cứu chứng minh là trong tế bào lai các gen này của chuột thường ở trạng thái trội (tức là có tổng hợp các protein), còn các gen này của người thường ở trạng thái lặn (tức là không tổng hợp protein).

Khi sử dụng enzym glucozo-6-phosphat dehydrogenaza là enzym di truyền liên kết với thể nhiễm sắc X (gen mã hóa nằm trong X) để theo dõi biểu hiện của gen trong tế bào lai thì thấy là trong tế bào lai quan sát được cả hai dạng enzym của bố và mẹ, đồng thời còn xuất hiện cả dạng enzym tổ hợp gồm các tiểu đơn vị của cả hai enzym bố và mẹ. Điều đó chứng tỏ rằng một thể nhiễm sắc X bị bất hoạt hóa trong quá trình phát triển phôi (quan sát được ở dạng chất nhiễm sắc giới tính - thể Barr) đã được tái hoạt hóa trong tế bào lai.

Để nghiên cứu quá trình biệt hóa của tế bào lai người ta thường sử dụng tế bào bố mẹ đặc biệt là các tế bào ung thư của các mô như tế bào melanom (tế bào ung thư sắc tố), hepatom (tế bào ung thư gan), teratom (tế bào ung thư sinh dục), neuroblastom (tế bào ung thư thần kinh), hoặc các tế bào của các chủng quần biệt hóa cao ổn định như: tế bào limpho, tế bào sợi, tế bào dòng hồng cầu v.v.. Ví dụ khi lai tế bào melanom của chuột hamster (là tế bào có chứa sắc tố melanin ở dạng các hạt đen trong tế bào chất) với tế bào L (là tế bào được nuôi giữ invitro không chứa melanin của chuột, ta thu được tế bào lai với các dòng khác nhau đều không chứa melanin. Bình thường melanin xuất hiện trong các tế bào sắc tố (melanocyte) là sự chuyển hóa của tirozin thành melanin dưới sự xúc tác của enzym diphenoloxydaza và gen mã hóa cho enzym này phải ở trạng thái hoạt động tức là phiên mã và dịch mã. Như vậy, trong tế bào lai không xuất hiện melanin chứng tỏ các gen đó của tế bào melanom đã bị ức chế.

Ví dụ, khi đem lai tế bào hepatom của chuột nhất (là tế bào tích cực tổng hợp albumin) với tế bào bạch cầu người (là tế bào không tổng hợp albumin) người ta thu được tế bào lai trong đó bộ thể nhiễm sắc của chuột nhất được giữ nguyên nhưng đa số thể nhiễm sắc của người bị thải loại, người ta quan sát thấy trong một số tế bào lai tổng hợp cả hai loại albumin chuột và người. Điều đó chứng tỏ dưới ảnh hưởng của trạng thái hoạt động của gen chuột đã làm hoạt hóa gen mã hóa albumin của người trong tế bào lai.

Để nghiên cứu các đặc tính biệt hóa về hình thái người ta thường sử dụng các tế bào ung thư thần kinh - neuroblastom. Trong nuôi cấy invitro các tế bào neuroblastom thể hiện hàng loạt đặc tính biệt hóa của nơron như: đặc tính điện thế màng, hoạt tính axetylcholinesteraza cao, xuất hiện các cấu tạo hình thái như vi sợi thần kinh, các phân nhánh tế bào chất v.v.. Khi sử dụng tế bào neuroblastom chuột nhất lai với các loại tế bào khác nhau như tế bào L chuột nhất, nguyên sợi bào (fibroblast) người ta thu nhận được quần thể tế bào lai đa dạng về kiểu đánh dấu tế bào nơron, ví dụ tế bào lai từ neuroblastom chuột nhất với fibroblast người, thể

hiện hoạt tính cholinaxetyltransferaza cao hơn hàng 100 lần so với tế bào bố mẹ và khi phân tích bộ thể nhiễm sắc của tế bào lai thì thấy chúng chỉ giữ lại thể nhiễm sắc người số 9 trong tế bào lai. Sự xuất hiện các đặc tính của noron ở tế bào lai rất đa dạng từ hoạt tính các enzym đến các cấu trúc như: vi sợi thần kinh, nhánh lõi thần kinh, điều đó chứng tỏ trong quá trình biệt hóa noron, các đặc tính xuất hiện theo từng giai đoạn và có sự điều hòa phối hợp lẫn nhau.

### 7.6.2 Các bào quan trong tế bào lai

Trong quá trình hình thành và phát triển của tế bào lai *invitro* xảy ra nhiều biến đổi của các bào quan như sự dính kết hai màng sinh chất của hai tế bào bố mẹ để tạo thành màng sinh chất chung, sự dung hợp hai nhân để tạo thành nhân độc nhất với bộ thể nhiễm sắc hỗn hợp, sự biến đổi trong hoạt động của riboxom, của ty thể v.v..

Ta xem xét một số vấn đề có liên quan đến biến đổi của riboxom và ty thể:

Khi theo dõi sự tổng hợp rARN-28S trong tế bào lai giữa tế bào chuột nhắt và tế bào người với sự sử dụng phương pháp nguyên tử đánh dấu bằng H<sup>3</sup>-hipoxantin người ta quan sát thấy: nếu tế bào lai khi còn chứa gần đủ bộ thể nhiễm sắc của người và chuột thì khi đó tế bào lai tổng hợp cả hai loại rARN người và chuột, nhưng trong các dòng tế bào lai chỉ chứa đủ bộ thể nhiễm sắc của chuột còn thể nhiễm sắc của người bị thải loại nhiều thì rARN được tổng hợp chỉ là của chuột và khi phân tích bộ thể nhiễm sắc trong các tế bào lai này thì chúng không còn chứa các thể nhiễm sắc có thể kèm (thể nhiễm sắc số 13, 14, 15, 21 và 22) là những thể nhiễm sắc có chứa vùng NOR (Nucleolus Organizing Region) tức là chứa các gen rARN - 45S từ đây sẽ phiên mã thành rARN 45S và sau đó được chế biến để tạo thành các rARN 28S; 5,8S và 18S của riboxom. Các thể nhiễm sắc đó bị thải loại thì các gen đó cũng bị thải loại.

Nghiên cứu hoạt động của ty thể (Mitochondria) trong tế bào lai đã đóng góp nhiều dẫn liệu cho nghiên cứu di truyền ty thể - một bào quan tuy nằm trong tế bào chất và bị sự kiểm tra của hệ gen trong nhân nhưng chúng vẫn giữ đặc tính di truyền tự lập vì chúng có chứa ADN và hệ tổng hợp protein riêng (rARN và tARN).

Ty thể của chuột hoặc người chứa các phân tử ADN kép, trần, dạng vòng có kích thước dài khoảng 5 micron chứa vài chục gen mã hóa cho khoảng 13 protein riêng của ty thể (chiếm 5% tổng số protein ty thể), các rARN và tARN của ty thể. Loại ADN có trong ty thể được gọi là ADN-ty thể (mtADN) có tính tự tái bản và phiên mã diễn ra trong ty thể.

Khi theo dõi các chủng quần tế bào lai giữa chuột nhắt và người và theo dõi mtADN người ta thấy có sự tương quan giữa sự thải loại thể nhiễm sắc và thải loại mtADN. Ở các chủng quần tế bào lai còn có đủ bộ thể nhiễm sắc chuột và đa số thể nhiễm sắc người thì còn có cả mtADN chuột và người, và theo đà thể nhiễm sắc người bị thải loại dần thì mtADN người bị thải loại tương ứng và ở tế bào lai không còn chứa thể nhiễm sắc người thì chỉ tìm thấy mtADN chuột mà thôi. Điều đó chứng tỏ có sự tương quan mật thiết giữa bộ gen trong nhân với mtADN của ty thể. Điều lý thú là trong tế bào lai mà trong đó có cả hai loại mtADN chuột và người, đã phát hiện ra loại mtADN lai tức là mtADN tái tổ hợp giữa người và chuột.

Khi nghiên cứu tế bào lai người ta cũng đã xác định được hệ enzym ty thể do gen của nhân kiểm soát và hệ enzym ty thể do gen của ty thể (mtADN) kiểm soát.

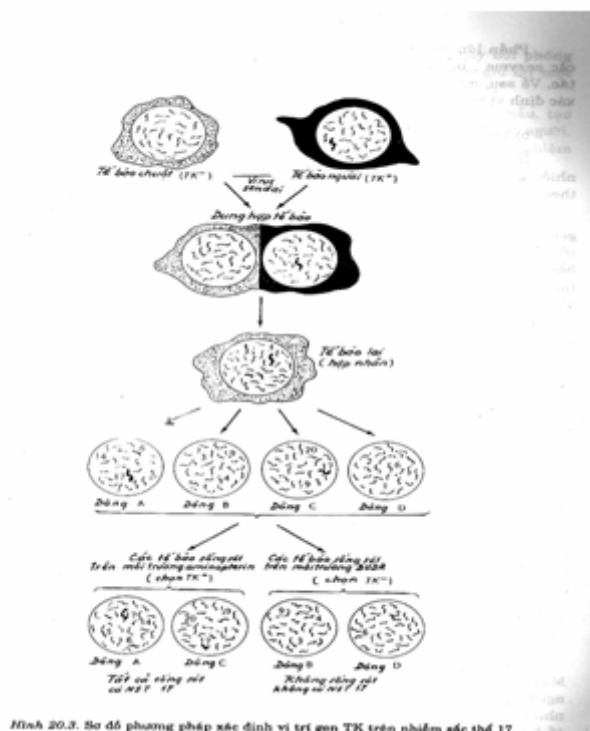
## 7.4 Lập bản đồ gen

Nghiên cứu các đặc tính di truyền và biến dị của các tế bào lai soma đã cung cấp nhiều dẫn liệu làm sáng tỏ nhiều vấn đề của di truyền tế bào, di truyền phân tử như tập tính của thể nhiễm sắc trong chu kỳ tế bào, sự tái tổ hợp soma, sự điều hòa hoạt động của gen; của phôi sinh học như vấn đề lai các loài rất xa nhau, vấn đề biệt hóa tế bào, đồng thời phương pháp lai tế bào soma được áp dụng để giải quyết những vấn đề thực tiễn như lập bản đồ gen, nghiên cứu ung thư, nghiên cứu các tác nhân độc hại của môi trường (virut, chất độc) cũng như trong công nghệ nuôi cấy tế bào mô và công nghệ gen.

Để lập bản đồ gen các nhà di truyền học sử dụng rất nhiều phương pháp trong đó có phương pháp lai tế bào soma. Khi lai các tế bào khác loài thì trong tế bào lai xảy ra sự đồng đặc và thải loại có chọn lọc các thể nhiễm sắc của một trong hai loài. Vì vậy căn cứ vào phân tích kiểu hình và bộ thể nhiễm sắc cho phép ta xác định được gen định khu trong thể nhiễm sắc nào, xác định các nhóm liên kết gen từ đó xác lập được bản đồ gen của mỗi một thể nhiễm sắc trong bộ. Hơn nữa có thể sử dụng tế bào lai để phân tích tính hỗ trợ của gen tức là các sai lệch di truyền trong tế bào có liên quan đến một hoặc nhiều locut gen khác nhau.

Người ta sử dụng các tế bào lai để lập bản đồ gen của nhiều loài động vật thuộc các bậc phân loại xa nhau hoặc gần nhau như chuột nhắt, chuột cống, thỏ, ngựa, lừa, khỉ thấp, khỉ cao và con người để nghiên cứu cơ sở phân tử và di truyền của tiến hóa và phân loại.

Ngay từ năm 1975 các nhà nghiên cứu đã phát hiện và kiểm tra lại hàng trăm gen định khu trong tất cả 22 đôi thể nhiễm sắc thường cũng như hàng chục gen định khu trong thể nhiễm sắc X và Y của người bằng phương pháp lai tế bào soma giữa tế bào người với tế bào các động vật khác như: chuột nhắt, chuột cống, chuột hamster v.v.. Ví dụ, để xác định gen TK (gen mã hóa cho enzym thymidin kinaza) định vị trong thể nhiễm sắc nào trong 23 thể nhiễm sắc của người, M. C. Weiss và H. Green đã thực hiện phép lai tế bào chuột (mang gen TK- không có khả năng tổng hợp thymidin kinaza, với tế bào người TK+ có khả năng tổng hợp thymidin kinaza). Trong các dòng tế bào lai chuột- người, đa số thể nhiễm sắc của người bị loại bỏ chỉ còn giữ lại một số ít thể nhiễm sắc trong đó có thể nhiễm sắc số 17. Dem nuôi các tế bào lai trong môi trường chọn lọc có chất aminopterin thì thấy: các tế bào lai TK- sẽ không mọc được (vì không có thymidin kinaza nên không thể chuyển hóa thymidin cần cho tổng hợp ADN). Đối với các dòng TK+, chúng mọc bình thường (vì có thymidin kinaza), đem phân tích kiểu nhân của các tế bào lai này người ta thấy chúng đều chứa thể nhiễm sắc số 17 của người. Điều đó chứng tỏ rằng gen TK nằm trong thể nhiễm sắc 17 (hình 7.1). Để kiểm chứng thêm, người ta đem nuôi các dòng tế bào lai trong môi trường có chứa chất bromodeoxiuridin (BUDR) (là chất được chuyển hóa bởi thymidin kinaza và có khả năng gắn vào ADN làm tế bào chết), người ta thấy những dòng tế bào mọc được (chúng tỏ không có thymidin kinaza) đều không có thể nhiễm sắc 17 (hình 7.1). Bằng phương pháp phân tích các dòng tế bào lai và kiểu nhân, người ta đã phát hiện được 19 gen và vị trí phân bố của chúng trong thể nhiễm sắc số 1.



Hình 7.1

Sơ đồ phương pháp xác định vị trí gen TK trong thể nhiễm sắc số 17 bằng tế bào lai soma

## 7.5 Lai tế bào soma và công nghệ tế bào thực vật

Tế bào thực vật khác biệt với tế bào động vật về nhiều đặc tính, trong đó có đặc điểm tồn tại ở tế bào thực vật lớp thành vỏ xenlulozơ bao ngoài màng sinh chất. Vỏ xenlulozơ ngăn cản các tế bào thực vật dung hợp với nhau *invitro*.

Bằng các phương pháp cơ học (vi phẫu thuật) hoặc hóa học (xử lý bằng enzym) người ta có thể tách bỏ lớp vỏ xenlulozơ và tế bào trở thành nguyên bào hay còn gọi là tế bào trần (protoplast). Trong nuôi cấy *invitro* các tế bào trần dễ dàng dung hợp tạo các tế bào lai giống như tế bào động vật và còn có ưu thế hơn ở chỗ các tế bào lai có thể phát triển thành các khối tế bào đa năng (callus) và từ đó tạo thành phôi (được gọi là phôi soma) và sẽ phát triển thành cây hoàn chỉnh.

### 7.6.2 Phương pháp tạo tế bào trần (protoplast)

*Phương pháp cơ học - vi phẫu thuật.* Người ta cho miếng mô vào dung dịch ưu trương để khối tế bào chất cùng màng sinh chất tách khỏi vỏ xenlulozơ. Sử dụng kim nhọn và dao phẫu thuật để tách cắt các mô cùng lớp vỏ và sau đó ngâm vào môi trường nuôi cấy pha loãng, tế bào chất sẽ phồng to và tách khỏi vỏ xenlulozơ ra ngoài và tạo thành các tế bào trần tự do.

*Phương pháp sử dụng enzym.* Người ta có thể sử dụng các enzym: xenlulaza, pectinaza và hemixenlulaza để phân huỷ lớp vỏ xenlulozơ tạo tế bào trần. Enzym sử dụng phải tinh khiết nếu còn chứa ít nhiều các proteaza hoặc peroxydaza sẽ làm hỏng tế bào trần. Hiệu quả tạo tế bào trần còn tùy thuộc vào loại mô và cây được sử dụng.

Cũng cần chú ý là các tế bào trần có thể sống *invitro* và tái tạo lại vỏ xenlulozơ và trở thành tế bào nhiều nhân hoặc nhân đa bội do hiện tượng nội phân, hoặc do hiện tượng liên kết của hai hoặc vài tế bào cùng loại vì tế bào thực vật có đặc tính liên kết tế bào chặt với nhau qua cầu nối tế bào chất (plasmodesma) và chúng dễ dàng hợp nhất với nhau khi mất lớp vỏ xenlulozơ để tạo thành tế bào đa nhân. Vì vậy khi nuôi cấy *invitro* các tế bào trần thuộc các loài hoặc chi khác nhau ta cần phải xác định chính xác các tế bào lai heterocaryon thực sự trong đó có chứa bộ gen của cả hai loài.

### 7.6.2 Sự liên kết và dung hợp tế bào trần

Sự liên kết và dung hợp tế bào trần để tạo thành các tế bào lai heterocaryon giữa các mô cùng một loài hoặc thuộc các loài khác nhau tùy thuộc vào nồng độ các ion natri, kali và canxi cũng như độ pH của môi trường nuôi cấy, đồng thời tùy thuộc vào một số chất có tác dụng tăng cường liên kết tế bào như lysozym và đặc biệt là polyethylen glycol do cấu trúc phân tử của chúng có thể tạo nên các liên kết ion với các chất có ở bề mặt màng sinh chất của tế bào. Sử dụng polyethylen glycol (với nồng độ 0,2 - 0,3M) có thể tạo các tế bào lai đạt từ 25 - 50% và các tế bào lai có thể tồn tại qua nhiều thế hệ. Sự tạo thành mô sẹo (callus) và tái sinh cây từ tế bào lai syncaryon không phụ thuộc vào phương pháp tạo tế bào lai.

### 7.6.2 Sự phát triển của tế bào lai

Các tế bào trần được nuôi cấy *invitro* có thể chết, có thể dung hợp thành tế bào lai chứa 2 nhân khác loài - heterocaryon. Nếu heterocaryon tái sinh thành vỏ xenlulozơ và phân bào sẽ được xem như chúng sống và phát triển. Điều lý thú đối với lai tế bào trần ở thực vật là chúng không những có khả năng biểu hiện hoạt động của gen và sinh trưởng và biệt hóa giống như tế bào lai động vật mà còn có khả năng tái sinh thành cây toàn vẹn được xem như cây lai soma.

Khi heterocaryon phân chia thì nhân ở thế hệ tế bào con chưa dung hợp thành một nhân lai độc nhất tuy chúng có xu thế đồng thời hóa mitosis, một số heterocaryon qua vài thế hệ nhanh chóng bị chết đi. Trong các heterocaryon có nhân ở cạnh nhau thì qua mitosis hai bộ thể nhiễm sắc sẽ hợp nhất để cho ra một nhân lai và ở các thế hệ sau các tế bào con đều là tế bào lai chứa một nhân lai độc nhất - các syncaryon. Tất cả các tế bào phát triển từ một syncaryon tạo nên một dòng lai (clon line): Các tế bào lai syncaryon cũng giống như các tế bào soma thực vật cho ra khối mô đa tiềm năng (mô sẹo - callus) và khi nuôi cấy chúng với các hormon thực vật và chế độ chiếu sáng khác nhau sẽ biệt hóa thành chồi lá và rễ và sẽ tái sinh thành cây toàn vẹn và ra hoa kết quả như cây lai hữu tính. Ví dụ, khi lai tế bào trần giữa hai loài thuốc lá *Nicotiana* đã tạo được các cây lai soma giống như cây lai hữu tính.

### 7.6.2 Chọn lọc và xác định các dòng tế bào lai và mô sẹo

Để xác định các dòng tế bào lai soma thực vật các nhà nghiên cứu cũng sử dụng các đánh dấu như ở tế bào lai động vật. Các chỉ tiêu hình thái thường được dùng để đánh dấu cho các giai đoạn phát triển của tế bào lai, của mô sẹo cho tới khi tái sinh cây toàn vẹn như sự có mặt hay không các loại tạp thể (bach tạp, sắc tạp, lục tạp), sự sinh trưởng của mô sẹo tùy thuộc vào hormon auxin, mức độ phát triển biểu mô, hình dạng lá khi tái sinh cây v.v.. Các đánh dấu như: số lượng thể nhiễm sắc, bản chất các isoenzym, sự biểu hiện của gen v.v. đều được sử dụng để theo dõi, xác định và chọn lọc các dòng tế bào lai. Phân tích kiểu nhân ở tế bào lai thực vật cũng đóng vai trò quan trọng như ở tế bào lai động vật mà ta đã xem xét.



Sử dụng các đột biến và hỗ trợ gen làm chỉ tiêu đánh dấu người ta có thể phát hiện trạng thái hoạt động của gen khi so sánh tế bào lai và cây lai soma với tế bào bố mẹ và cây lai hữu tính. Ví dụ, khi đem lai soma từ các tế bào trung mô lá của hai thể đột biến cây thuốc lá *Nicotiana tobacum* (đều không có khả năng tổng hợp chlorophyl nên sinh trưởng chậm và không có màu xanh) người ta thu nhận được các tế bào lai và từ đó tái sinh thành cây toàn vẹn, cây lai soma này cũng giống các cây lai hữu tính (giữa 2 thể đột biến) về các đặc điểm như: tổng hợp chlorophyl, có màu xanh và sinh trưởng bình thường. Khi nghiên cứu hiện tượng hỗ trợ gen các nhà nghiên cứu phát hiện thấy trong tế bào lai soma giữa hai loài thuốc lá *Nicotiana* xuất hiện phức hệ enzym diphosphoribulocacboxilaza (có khối lượng phân tử 550.000D) là enzym tham gia vào quá trình quang hợp (cố định CO<sub>2</sub>) trong lục lạp là phân tử lai. Phức hệ chứa hai đơn vị mã hóa bởi gen của lục lạp thuộc một loài bố mẹ, còn các đơn vị còn lại của enzym được mã hóa bởi cả hai gen của hai loài bố mẹ. Điều đó chứng tỏ có sự hoạt động hỗ trợ và ức chế của gen thuộc hai loài khi chúng phối hợp hoạt động.

### 7.6.2 Ưu thế của lai soma ở thực vật

Trong tự nhiên ở mức độ cơ thể rất khó vượt qua hàng rào giới tính để xảy ra lai hữu tính giữa các cá thể thuộc các loài khác nhau để cho ra con lai hữu thụ, nhưng khi trong điều kiện *invitro* với phương pháp lai soma người ta có thể tạo ra nhiều dạng lai giữa các loài rất xa nhau thậm chí giữa các chi, họ và bộ. Ưu thế của tế bào lai thực vật so với tế bào lai động vật không chỉ về phương diện phương pháp, về phân tích di truyền v.v. mà quan trọng là về ứng dụng thực tiễn, vì từ tế bào lai thực vật người ta dễ dàng tái sinh được cây toàn diện và có thể sử dụng trong việc tạo giống mới và tăng năng suất cây trồng. Ta xem xét một số ưu thế đó:

Sử dụng mô hình tế bào lai thực vật có thể nghiên cứu nhiều vấn đề về di truyền tế bào như đối với tế bào lai động vật: sự biểu hiện và điều chỉnh hoạt động của gen trong quá trình biệt hóa, sự hỗ trợ và tái tổ hợp gen.

Đồng thời kỹ thuật lai các tế bào trần thực vật không đòi hỏi phức tạp như: lai động vật về môi trường dinh dưỡng, về hoạt chất kích thích sự dung hợp phức tạp như virus, mà chỉ cần sử dụng polyethylen glycol kết hợp với sự xử lý bằng ion canxi là dễ dàng tạo tế bào lai với hiệu suất cao.

Từ các mô của thực vật có thể thu nhận được nhiều loại tế bào trần đơn bội, lưỡng bội, đa bội và lệch bội và từ đây có thể dễ dàng chọn lọc nguyên liệu đồng nhất để nghiên cứu mà không cần phải sử dụng kỹ thuật chọn dòng (clonning) phức tạp như đối với tế bào động vật.

Các dòng tế bào trần sống lâu và dễ dàng tạo tế bào lai.

Đối với tế bào lai thực vật có thể sử dụng nhiều đặc tính hình thái để quan sát làm kiểu đánh dấu như: sự có mặt lục lạp, đặc tính mô callus và các đặc tính hình thái của cây tái sinh.

Ưu thế trội nhất của tế bào lai thực vật là ở chỗ không chỉ các tế bào trần mà tế bào lai khi nuôi cấy *invitro* đều có thể phát triển thành mô callus và từ đó tái sinh thành cây toàn vẹn, do đó có thể nghiên cứu sự biểu hiện của gen trong quá trình phát sinh hình thái (morphogenesis) và ứng dụng vào công nghệ tế bào và công nghệ gen để tạo các giống lai với đặc tính mong muốn, có năng suất cao, có khả năng chống chịu bệnh tật, thích nghi với các điều kiện ngoại cảnh v.v..

## 7.6 Công nghệ tế bào lai và thực tiễn sản xuất

Ở đây chúng ta chỉ đề cập đến một số ứng dụng thực tiễn của công nghệ lai tế bào soma trong việc tạo giống cây trồng và thực tiễn y học.

### 7.6.2 Tạo và chọn lọc giống cây trồng

Như ta đã biết trong thế giới thực vật và động vật sinh sản hữu tính thì cá thể mới được hình thành từ sự thụ tinh giữa hai cá thể bố mẹ, là cá thể lai hữu tính và chúng chỉ hữu thụ khi lai trong loài và sự lai hữu tính khó vượt qua hàng rào phân loại. Sự lai soma *in vitro* tạo điều kiện cho phép lai các tế bào thực vật và động vật thuộc các bậc phân loại rất xa nhau.

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào trần cũng như lai tế bào trần thực vật cho phép tái sinh các dạng cây lai theo những tính trạng mà nhà chọn giống đã thiết kế trước.

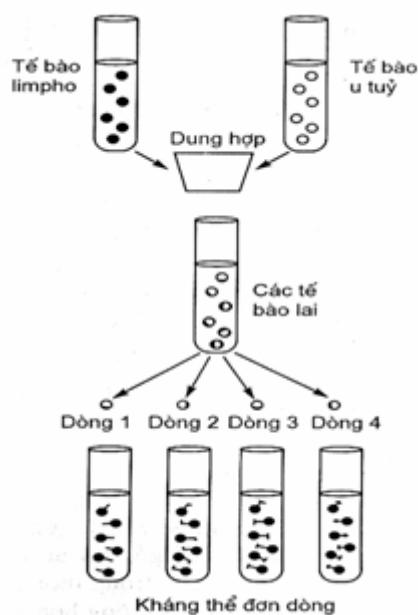
Tế bào trần cũng như tế bào lai là những mô hình lý tưởng để thực hiện kỹ thuật chuyển gen, chuyển các bào quan (ty thể, lục lạp), vi khuẩn và virus vào tế bào, vào nhân và từ đó tạo nên các dạng lai, tái tổ hợp khác nhau.

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào trần và tế bào lai có ý nghĩa đặc biệt quan trọng trong công tác tạo và chọn giống cây trồng nhất là đối với các giống ít khi sinh sản hữu tính như: chuối, mía, khoai tây, sắn, v.v.. Ví dụ bằng phương pháp kỹ thuật tế bào trần và lai soma người ta đã tạo được giống cải lai giữa *Brassica napus*, *Brassica campestris* và *Raphanus sativus* trong đó có mang các đặc tính di truyền của kiểu nhân *B. napus* và các gen tái tổ hợp giữa ty thể (*R. sativus*) với lục lạp (*B. campestris*). Cây lai không những có năng suất cao mà còn có khả năng chống chịu với thuốc diệt cỏ.

### 7.6.2 Sản xuất kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody)

Kỹ thuật lai tế bào soma động vật *in vitro* không chỉ để nghiên cứu di truyền tế bào soma mà còn được ứng dụng trong thực nghiệm y học để sản xuất kháng thể đơn dòng là kháng thể có tính đồng nhất về cấu trúc và tính chất được sử dụng trong miễn dịch học để nhận dạng và phân tích các kháng nguyên đặc thù, sử dụng trong kỹ thuật cấy ghép mô và cơ quan, trong chẩn đoán ung thư, dẫn dắt định hướng thuốc đến nơi cần đến v.v..

Kỹ thuật sản xuất kháng thể đơn dòng có thể tóm tắt như sau (hình 7.2):



**Hình 7.2**

Mô hình sản xuất kháng thể đơn dòng

- Chuột nhất được gây miễn dịch bằng một kháng nguyên nào đó, trong huyết thanh miễn dịch của chuột sẽ có chứa các kháng thể đa dòng khác nhau tuy mỗi dòng tế bào limpho B chỉ sản xuất một loại kháng thể đơn dòng.

- Bằng kỹ thuật nuôi cấy *invitro* với môi trường chọn lọc có chứa HAT (gồm Hypoxantin, Aminopterin và Timidin) người ta nuôi các tế bào limpho B được tách từ lách chuột đã được miễn dịch với các tế bào u tủy myeloma và người ta thu nhận được các tế bào lai (hybridoma).

- Các tế bào limpho B có khả năng tổng hợp kháng thể có thể chống chịu được môi trường chứa HAT nhưng chúng không sống được lâu và nhanh chóng bị chết đi. Các tế bào u tủy myeloma không có khả năng tổng hợp kháng thể nhưng chúng có khả năng sống rất lâu trong điều kiện nuôi cấy *invitro*, nhưng vì trong môi trường chọn lọc có HAT là chất chúng không chống chịu được cho nên chúng cũng bị chết. Trái lại các tế bào lai vừa có khả năng tổng hợp kháng thể, sống được trong môi trường chứa HAT lại vừa có khả năng phân bào và sống lâu dài. Bằng kỹ thuật chọn dòng (cloning) để tạo ra quần thể tế bào xuất phát từ chỉ một tế bào lai và mỗi dòng tế bào lai sẽ chỉ sản xuất ra một loại phân tử kháng thể hoàn toàn giống nhau - đó là kháng thể đơn dòng.

Kháng thể đơn dòng được sản xuất hàng loạt và có nhiều ứng dụng thực tiễn. Chúng có thể được dùng để chẩn đoán và chữa trị các bệnh nhiễm trùng, dùng để thử nghiệm miễn dịch để phát hiện các kháng nguyên với nồng độ thấp. Các kháng thể đơn dòng chống kháng nguyên ung thư được sử dụng để chẩn đoán và điều trị ung thư đặc biệt có hiệu quả khi dùng kết hợp với các hóa chất độc như ricin chẳng hạn. Có thể dùng kháng thể đơn dòng dẫn dắt hướng chất thuốc đến đúng mô ung thư để tiêu diệt chúng do đó không gây ảnh hưởng tác hại đến mô lành. Kết hợp với kỹ thuật chuyển gen với kỹ thuật lai soma, người ta đã chế được các kháng thể đơn dòng đặc hiệu của người do đó không gây nên phản ứng miễn dịch có hại khi dùng chúng

*Vấn đề thảo luận ở chương 7:*

- 1. Trình bày tiêu chí phân biệt tế bào soma và tế bào sinh dục.*
- 2. Giải thích cơ chế của sự biệt hóa tế bào ở mức độ hình thái chức năng và hoạt hóa của gen.*
- 3. Tế bào lai soma là gì? Nêu các đặc điểm của tế bào lai soma.*
- 4. Nêu một số ví dụ về công nghệ tế bào và công nghệ tế bào lai soma.*
- 5. Thực hành về kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật và thực vật, về công nghệ tế bào trần, tạo tế bào lai và tái sinh cây ở thực vật.*

## Chương 8

### Di truyền tế bào Soma và ung thư

Mục tiêu: Sau khi học xong chương này học viên có khả năng:

- Phân biệt sai khác giữa tế bào lành và tế bào ung thư.
- Giải thích được cơ chế chuyển hóa tế bào lành thành tế bào ung thư.
- Trình bày được cơ sở di truyền tế bào của ung thư.
- Trình bày được các yếu tố gây ung thư.
- Có ý thức áp dụng kiến thức để phòng chống ung thư.

Nghiên cứu di truyền tế bào soma, đặc biệt là lai soma có liên quan đến nhiều vấn đề quan trọng của y học như vấn đề ung thư và các bệnh liên quan đến virus. Trong chương này ta sẽ xem xét cơ sở tế bào soma của ung thư được xem như là một bệnh: bệnh ung thư.

#### 8.1 Bệnh ung thư (cancer)

Theo quan điểm của R. Virchow (1864) về "bệnh học tế bào" thì bệnh ung thư là bệnh của tế bào. Ngày nay bệnh ung thư được xem là một nhóm bệnh thể hiện sự biến đổi bất bình thường trong các đặc tính của tế bào về di truyền, sinh lý, sinh hóa, miễn dịch cũng như sinh trưởng và sinh sản không chịu kiểm soát chung của cơ thể dẫn tới tạo thành những khối mô bệnh được gọi là u (tumor).

Các u này không thực hiện một chức năng gì có ích cho cơ thể, trái lại chúng phá huỷ cấu trúc và chức năng của mô và cơ quan bình thường dẫn tới tử vong.

Người ta phân biệt 2 loại u: u lành và u ác

*U lành* (benign tumor) chứa các tế bào ung thư sinh sản chậm và bám vào mô liên kết tại chỗ nên chưa gây nguy hiểm. Nếu phát hiện sớm và điều trị bằng phẫu thuật hoặc chiếu xạ sẽ có kết quả tốt.

*U ác* (malignant tumor) chứa các tế bào ung thư sinh sản rất nhanh và đặc biệt là chúng có khả năng giải phóng khỏi mô và di chuyển đến các phần khác nhau của cơ thể được gọi là di căn (metastasis). Các tế bào ung thư di căn vào máu và theo dòng máu xâm nhập vào các mô khác và ở đây chúng sinh sản phát triển thành khối u mới gây rối loạn và phá huỷ các tế bào và mô của phần đó. Các tế bào ung thư có nguồn gốc từ đâu?

Nhiều nghiên cứu về tế bào ung thư *invitro* cũng như *in vivo* đã chứng minh rằng tế bào ung thư là do sự chuyển hóa của các tế bào lành của mô thành tế bào ung thư và nguyên nhân gây chuyển hóa là rất nhiều. Vì vậy, các nhà ung thư học thường căn cứ vào tít mô để phân loại khối u: ví dụ khối u xuất hiện ở mô gan được gọi là hepatom, ở mô liên kết là sarcom, ở mô tạo máu là leuco và leukemia, ở mô thần kinh là neuroblastom v.v.. Người ta

còn phân biệt dạng u rắn và u báng. U báng xuất hiện ở dạng thể dịch trong đó chứa các tế bào ung thư và đó là một dạng tồn tại tự do của tế bào ung thư trong thể dịch của cơ thể rất nguy hiểm.

## 8.2 Sự chuyển hóa ung thư

Để phân tích và nghiên cứu tế bào ung thư người ta xem xét so sánh các đặc tính của tế bào ung thư so với tế bào lành *invitro* cũng như *in vivo*.

Trong cơ thể các tế bào của các mô khác nhau có thể chuyển hóa thành tế bào ung thư mang nhiều đặc tính về cấu trúc, sinh lý và di truyền khác với tế bào lành của mô đó. Trong nuôi cấy các tế bào lành của các mô *invitro* với thời gian lâu dài hoặc có tác động của các tác nhân gây ung thư (hóa chất, bức xạ, virus) đều có thể chuyển hóa thành tế bào ung thư.

### 8.2.1 Tế bào lành và tế bào ung thư *invitro*

Trong điều kiện nuôi cấy *invitro* các tế bào lắng xuống đáy bình, bám vào bề mặt đáy để sinh trưởng và sinh sản bằng phân bào, như vậy mặt tiếp xúc coi như điều kiện cần thiết cho tế bào sinh sản. Chúng thường phát triển thành lớp tế bào trật tự cho tới khi bám hết giá thể chúng ngừng sinh sản và không di động được do lực ức chế tiếp xúc bề mặt. Trái lại tế bào ung thư có thể phát triển và sinh sản trong môi trường nuôi cấy dạng lỏng sệt hoặc dạng huyền phù và tạo thành các quần thể tế bào vô trật tự hoặc nhiều lớp chồng lên nhau trên giá thể. Điều đặc biệt là các tế bào ung thư không chịu tác động của lực ức chế tiếp xúc, chúng có thể di động chiếm một không gian nào đó cho đến khi chúng ngừng sinh sản.

Như vậy, *in vivo* cũng như *invitro* tế bào lành của các mô chịu tác động của lực ức chế tiếp xúc cũng như lực định vị, trái lại tế bào ung thư không chịu tác động của các lực đó. Điều này có thể là do thay đổi trong chương trình di truyền cũng như trong cấu trúc và tính chất của màng sinh chất của các tế bào ung thư đặc biệt là trong cấu trúc của các receptor màng đóng vai trò nhận biết và đánh dấu.

Về bộ máy di truyền có sự khác biệt giữa tế bào lành và tế bào ung thư: Tế bào lành thường giữ bộ thể nhiễm sắc ổn định là  $2n$ , trong lúc đó các tế bào ung thư thường có bộ thể nhiễm sắc dị bội (heteroploide) với các sai lệch rất đa dạng về số lượng và cấu trúc. Trong genom của tế bào ung thư đã quan sát thấy các gen đột biến mang tên "gen ung thư".

Tế bào ung thư còn khác biệt với tế bào lành trong nhiều đặc tính sinh lý khác như chỉ số mitosis cao hơn, phân bào không hạn định nếu môi trường nuôi cấy được cấy chuyển đổi mới, ví dụ tế bào fibroblast của người nuôi cấy *invitro* chỉ phân bào tối đa 50 - 70 lần dù có được cấy chuyển nhiều lần, trong lúc đó các tế bào Hela trong nuôi cấy *invitro* được xem như bất tử và từ tế bào ung thư đầu tiên của chị Henrietta Lack được nuôi cấy *invitro* cho tới nay, khối lượng sinh sôi nảy nở của chúng trong các phòng thí nghiệm trên toàn thế giới đã lớn hơn cả trọng lượng cơ thể của chị.

### 8.2.2 Sự chuyển hóa ung thư khi lai tế bào

Trong nuôi cấy các tế bào *invitro* để tạo các tế bào lai, người ta quan sát thấy có hai trường hợp dựa vào các biểu hiện kiểu hình để đánh giá tế bào ung thư. Biểu hiện kiểu hình (phenotip) để đánh giá chủ yếu dựa vào tính không bị ức chế tiếp xúc tạo thành nhiều lớp tế bào, phát triển tốt trong môi trường lỏng sánh.

Trường hợp tế bào lai là tế bào bị chuyển hóa thành tế bào ung thư. Khi lai tế bào ung thư (ví dụ fibroblast người bị chuyển hóa ung thư do virus SV40) với fibroblast lành của người hoặc chuột nhắt, người ta thu nhận được các tế bào lai đều là tế bào bị chuyển hóa thành tế bào ung thư, chúng đều có các đặc tính như sinh sản nhanh thành đồng tế bào nhiều lớp, phát triển tốt trong môi trường lỏng sánh và có đời sống kéo dài hơn và đều có kháng nguyên T đặc thù cho virus SV40. Một số dòng tế bào lai bị chuyển hóa ung thư chỉ còn mang thể nhiễm sắc số 7 của người. Khi đem nuôi cấy những tế bào ung thư này cho chuột lành đã lây cho chuột nhiễm ung thư và xuất hiện kháng nguyên T. Các dẫn liệu trên chứng tỏ virus SV40 đã gây ung thư cho fibroblast người, và ADN của virus đã xâm nhập khu trú trong thể nhiễm sắc số 7 và với sự biểu hiện là kháng nguyên T, và trong các tế bào lai có mang thể nhiễm sắc số 7 của người sẽ biểu hiện là tế bào bị chuyển hóa ung thư *in vitro* cũng như *in vivo* khi nhiễm các tế bào lai này cho chuột lành.

Trường hợp tế bào lai không thể hiện kiểu hình (phenotip) chuyển hóa. Khi đem lai fibroblast của chuột hamster bị chuyển hóa ung thư bởi virus SV40 với fibroblast lành của chuột nhắt 3T3, người ta thu được tế bào lai đa dạng: có dòng tế bào lai bị chuyển hóa ung thư và dòng tế bào lai không bị chuyển hóa ung thư. Khi phân tích thể nhiễm sắc của tế bào lai dòng không bị chuyển hóa, người ta thấy chúng đã mất hết thể nhiễm sắc chuột hamster (đã bị thải loại hết) là thể nhiễm sắc có mang nhân tố gây chuyển hóa ung thư SV40. Trong các tế bào lai bị chuyển hóa ung thư đều còn giữ lại các thể nhiễm sắc của chuột hamster (hoặc ít hoặc nhiều). Điều đó chứng tỏ nhân tố gây chuyển hóa ung thư là virus SV40 biến nạp vào bộ thể nhiễm sắc của chuột hamster.

### 8.2.3 Sự chuyển hóa ung thư *in vivo*

Để nghiên cứu tính chất ung thư của các tế bào u hoặc các tế bào bị chuyển hóa ung thư (kể cả các tế bào lai) người ta thường tiêm hoặc cấy các tế bào đó vào cơ thể động vật. Động vật thí nghiệm chuẩn thường là chuột nhắt thuộc dòng đồng gen, tức là các cá thể đều có típ di truyền tương tự và khi cấy ghép các tế bào và mô giữa chúng sẽ không bị thải loại, còn khi cấy ghép tế bào và mô giữa các cá thể khác nhau về di truyền (dị gen) sẽ xảy ra thải loại và như ta đã biết đó là do các kháng nguyên tương hợp mô qui định nên. Nếu cá thể cho và nhận có kháng nguyên khác nhau thì tế bào cấy ghép sẽ bị thải loại. Đa số tế bào ung thư đều chứa kháng nguyên đặc thù riêng của mình và kháng nguyên này đã gây ảnh hưởng đến sự “sống còn” của tế bào ung thư khi cấy ghép chúng cho các chuột đồng gen. Các tế bào ung thư do virus gây ung thư chuyển hóa thường chứa các kháng nguyên nhân hoặc bề mặt đặc trưng cho virus, do đó chúng thường bị thải loại khi cấy ghép chúng cho chuột đồng gen. Những tế bào ung thư do tác động của hóa chất thường chứa các kháng nguyên rất khác nhau và nhiều dòng ung thư có thể tồn tại khi cấy ghép chúng cho chuột đồng gen.

Nói chung, các tế bào bị chuyển hóa ung thư khi cấy ghép cho động vật thí nghiệm thường gây nên ung thư *in vivo* và kết quả động vật nhận sẽ chết. Tuy nhiên tính gây ung thư *in vivo* còn tùy thuộc vào nhiều yếu tố như: dòng động vật nhận, đặc tính miễn dịch của động vật thí nghiệm cũng như đặc tính của tế bào bị chuyển hóa ung thư (do virus hoặc hóa chất v.v.)

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh là *in vivo* các tế bào ung thư có thể dung hợp với các tế bào lành và chuyển hóa chúng thành tế bào ung thư.

### 8.3 Cơ sở di truyền tế bào của ung thư

Nguyên nhân gây ung thư không chỉ có một mà rất nhiều, do đó việc chẩn đoán và chữa trị ung thư còn gặp nhiều khó khăn. Hiện nay, người ta cho rằng các nhân tố môi trường như: hóa chất, bức xạ, virus v.v. đều là những nhân tố tác động gây chuyển hóa tế bào lành thành tế bào ung thư - các nhân tố được gọi là tác nhân gây ung thư (carcinogen). Nhưng bản chất của sự chuyển hóa ung thư là có sự thay đổi trong bộ máy di truyền của tế bào cụ thể là thể nhiễm sắc và phân tử ADN của tế bào - đột biến thể nhiễm sắc và đột biến gen - từ đó dưới tác động của các tác nhân gây ung thư tế bào thể hiện các kiểu hình đặc thù cho tế bào ung thư.

#### 8.3.1 Đột biến thể nhiễm sắc và ung thư

Từ đầu thế kỷ XX, các nhà khoa học đã quan sát thấy hiện tượng sai lệch thể nhiễm sắc trong các tế bào ung thư. Nhưng đó là nguyên nhân hay là hậu quả? thật khó mà khẳng định. Nhiều người cho rằng các sai lệch thể nhiễm sắc chỉ là hậu quả của ung thư. Nhưng một số nhà nghiên cứu lại khẳng định là các sai lệch số lượng cũng như sai lệch cấu trúc đều là nguyên nhân gây nên ung thư. Vấn đề nghi ngờ kéo dài, mãi đến những năm 70 của thế kỷ XX mới được giải quyết dứt điểm khi mà kỹ thuật làm kiểu nhân (caryotip) bằng phương pháp nhuộm cắt băng phát huỳnh quang bộ thể nhiễm sắc của nhiều dạng tế bào ung thư được hoàn thiện, người ta đã chứng minh rằng các sai lệch thể nhiễm sắc là cơ sở di truyền gây nên ung thư. Ví dụ, điển hình nhất là khi nghiên cứu kiểu nhân của các bệnh nhân bị ung thư máu trắng dạng tủy trường diễn (Leucemie Myeloide Chronique - LMC) cho thấy trên 90% đều có sai lệch chuyển đoạn giữa thể nhiễm sắc số 9 và số 22. Thể nhiễm sắc số 22 bị mất đoạn, trước đây được gọi là thể nhiễm sắc Philadelphi (Ph') đầu tiên được phát hiện tại thành phố Philadelphi ở nước Mỹ (năm 1960). Về sau người ta đã phát hiện được hàng loạt các sai lệch chuyển đoạn thể nhiễm sắc điển hình cho các loại ung thư máu trắng khác nhau, ví dụ ung thư máu trắng limphô cấp có chuyển đoạn giữa thể nhiễm sắc số 9 và số 11, ung thư máu trắng dạng tủy cấp có chuyển đoạn giữa thể nhiễm sắc số 8 và số 21, ung thư limphô Burkitt có chuyển đoạn giữa thể nhiễm sắc số 8 và số 14 v.v.. Mỗi tương quan logic giữa dạng sai lệch thể nhiễm sắc với dạng ung thư đặc trưng chứng tỏ rằng sai lệch thể nhiễm sắc là nguyên nhân gây nên ung thư. Sai lệch thể nhiễm sắc trở thành tiêu chí lâm sàng để các nhà ung thư học dựa vào để chẩn đoán các dạng ung thư.

Các tế bào ung thư trong cơ thể cũng như trong nuôi cấy *in vivo* là các chủng quần tế bào có bộ thể nhiễm sắc rất đa dạng từ lưỡng bội đến lệch bội hoặc đa bội lệch. Trong các tế bào ung thư cũng quan sát thấy các dạng sai lệch cấu trúc thể nhiễm sắc như mất đoạn hoặc chuyển đoạn v.v..

#### 8.3.2 Các gen gây ung thư (oncogenes) và phát sinh ung thư

Vấn đề đặt ra là đột biến gen có phải là nguyên nhân gây ung thư không? và ung thư có di truyền không?

Một thành tựu vĩ đại của di truyền học phân tử của nửa sau thế kỷ XX là việc phát hiện ra các gen gây ung thư (oncogen). Nhờ các kỹ thuật gen hiện đại và sự hợp tác của nhiều nước, hiện nay người ta đã phát hiện và xác định được khoảng 70 gen gây ung thư và bước đầu làm rõ cơ chế tác động của chúng lên quá trình tăng sinh của tế bào, lên chu kỳ phân bào, lên quá trình tự chết theo chương trình của tế bào là những quá trình có liên quan đến sự chuyển hóa tế bào lành thành tế bào ung thư.



Ngày nay người ta đã phát hiện là các ung thư bàng quang, ung thư xương, ung thư phổi và ung thư buồng trứng v.v. đều có liên quan đến các gen gây ung thư. Ví dụ người ta đã phát hiện bốn gen gây ung thư gây nên sự tiến triển của ung thư kết tràng và ung thư trực tràng ở người. Gen gây ung thư thứ nhất xuất hiện trong thể nhiễm sắc số 5 gây nên u lành bé trong lớp biểu mô. Gen thứ hai xuất hiện trong thể nhiễm sắc số 12 và gen thứ 3 xuất hiện trong thể nhiễm sắc số 18 và khi chúng hoạt hóa làm cho khối u lớn dần lên nhưng vẫn giữ là u lành. Gen gây ung thư thứ tư xuất hiện trong thể nhiễm sắc 17 và khi tế bào mang đủ cả bốn gen gây ung thư thì u lành biến thành u ác và các tế bào ung thư bắt đầu di căn.

Gen gây ung thư từ đâu đến? Tùy theo nguồn gốc và cơ chế tác động, người ta phân biệt ba loại gen gây ung thư.

Gen gây ung thư xuất hiện có thể do sự đột biến gen xảy ra trong quá trình tái bản gen mà không được sửa chữa, hoặc có thể là các gen điều chỉnh lúc đầu hoạt động bình thường nhưng do rối loạn cơ chế điều chỉnh nên đã biến thành gen gây ung thư.

Gen gây ung thư xuất hiện do hiện tượng chuyển đoạn thể nhiễm sắc (ví dụ giữa thể nhiễm sắc 14 và 18) gây ra dạng ung thư lymphoma nang.

Nếu các gen gây ung thư tồn tại trong bộ gen của tinh trùng và trứng thì các gen đó sẽ di truyền cho thế hệ sau. Các dạng ung thư vú, ung thư kết tràng, trực tràng, ung thư tuyến tiền liệt thường hay gặp trong các thành viên cùng một gia đình.

Các gen ung thư có thể được xuất hiện từ virus gây ung thư.

#### 8.3.4.1 Virus - tác nhân gây ung thư

- Các gen gây ung thư có nguồn gốc virus được gọi là v-oncogen.

Virus là cơ thể sống không có cấu tạo tế bào, chúng được cấu tạo gồm một lõi axit nucleic (ADN hoặc ARN) chứa thông tin di truyền của virus và một vỏ bọc bằng protein có vai trò bảo vệ hoặc tạo điều kiện cho virus xâm nhập vào tế bào vật chủ. Virus chỉ tồn tại và phát triển khi chúng sống ký sinh trong tế bào vật chủ. Khi virus xâm nhập vào tế bào có thể có hai khả năng:

- Virus sinh sản và phá hủy tế bào.

- ADN của virus (hoặc ARN của virus được phiên mã ngược cho ra ADN) sẽ biến nạp và gắn vào ADN của tế bào vật chủ và chúng sẽ được tái bản cùng với ADN của tế bào. Chính ở trạng thái biến nạp này mà các gen virus biến thành các gen gây ung thư và các tế bào mang các gen này sẽ bị chuyển hóa thành tế bào ung thư. Các virus gây ung thư có thể là virus ADN như virus SV40, virus *polio*, virus *Epstein-Barr* và cũng có thể là virus ARN. Ví dụ virus B, virus C gây ung thư gan, virus papilloma gây ung thư cổ tử cung v.v.. Từ lâu người ta đã biết một số lớn virus ARN (retrovirus) là nguyên nhân gây nên ung thư đối với động vật và cả con người. Từ những năm 70 của thế kỷ XX người ta đã biết rõ cơ chế tác động của virus trong tế bào chủ: chúng có thể được nhân lên thành nhiều virus và phá hủy tế bào, hoặc chúng có thể ở trạng thái tiềm tàng bằng cách xâm nhập và gắn vào thể nhiễm sắc của tế bào chủ. Hai nhà virus học là Temmin và Baltimore đã chứng minh khi retrovirus xâm nhập vào tế bào chủ thì ARN của chúng được phiên mã ngược thành ADN nhờ một loại enzym được gọi là enzym revertaza, sau đó ADN của chúng sẽ xâm nhập và gắn vào thể nhiễm sắc của tế bào chủ. (Hai ông đã được giải thưởng Noben về công trình này). Các ADN lạ này sẽ gây đột biến cho ADN chủ và chính các gen đột biến này đã trở thành gen gây ung thư: đó chính là các v-oncogen. Ngày nay người ta đã phát hiện được hàng chục loại adenovirus (virus chứa ADN)

và retrovirut có thể gây ung thư cho động vật và người thông qua các v- oncogen. Đối với người, các retrovirut như virut viêm gan B, C v.v. không chỉ gây bệnh viêm gan siêu vi mà còn gây nên ung thư gan.

Các nghiên cứu về lai tế bào soma đã chứng minh ADN của virut SV40 khi biến nạp vào ADN của tế bào trong thể nhiễm sắc số 7 của người đã biến thành các gen gây ung thư và là tác nhân gây chuyển hóa tế bào lành thành tế bào ung thư *in vivo* cũng như *in vivo*.

Những gen ung thư (oncogenes) do virut gây nên được gọi là v-oncogen để phân biệt với các gen gây ung thư tồn tại ngay trong bản thân hệ gen của tế bào - được gọi là c-oncogen hay còn gọi là proto-oncogen.

#### 8.3.4.2 Các proto-oncogen

Các gen gây ung thư có nguồn gốc từ đột biến trong ADN của tế bào được gọi là c-oncogen.

Các c- oncogen là dạng đột biến của gen được gọi là proto- oncogen (gen tiền ung thư). Các gen tiền ung thư vì lý do nào đấy (có thể do ngẫu nhiên, hoặc do tác động của các tác nhân gây đột biến như hóa chất, phóng xạ v.v.) biến đổi thành gen gây ung thư. Các sai lệch thể nhiễm sắc gây nên ung thư đã biết ở phần trên đây chính là đã tạo nên các oncogen. Ngày nay các nhà ung thư học đã phát hiện và xác định được hàng chục loại c- oncogen gây nên các dạng ung thư khác nhau.

Người ta đã phát hiện được trong tế bào tồn tại nhiều protein có vai trò quan trọng trong cơ chế điều chỉnh hoạt tính phân bào, giống với protein do các v-oncogen mã hóa. Những protein đó được mã hóa bởi các gen của bản thân của hệ gen của tế bào được gọi là các proto-oncogen và khi chúng đột biến sẽ trở thành c-oncogen. Những c-oncogen này sai khác với các v-oncogen (tức là các gen ung thư có nguồn gốc từ virut) ở chỗ chúng có chứa các đoạn *intron*; trong lúc đó các v-oncogen không chứa *intron*. Nhưng điểm sai khác quan trọng nhất thể hiện ở chỗ các v-oncogen khi hoạt hóa sẽ sản xuất một lượng lớn protein có tác động gây nên sự sinh sản không kiểm soát được của tế bào do đó biến tế bào lành thành tế bào ung thư trong lúc đó các c-oncogen bình thường không gây ung thư mà chỉ trong trường hợp chúng bị đột biến mới dẫn tới phát triển ung thư. R. Weinberg khi nghiên cứu ung thư bóng đá ở người đã phát hiện thấy c-oncogen đột biến có liên quan đến phát triển ung thư đó là gen c-H.ras bị đột biến (được gọi là c-H.ras vì nó tương ứng với v-H.ras). Gen c-H.ras đột biến đã sản xuất một số lượng lớn protein đột biến có tác dụng hoạt hóa và kích thích sự tăng sinh tế bào không kiểm soát do đó dẫn tới ung thư hóa.

Các dạng ung thư khác nhau ở người như ung thư phổi, ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư kết tràng, ung thư bóng đá, v.v. đều có liên quan đến đột biến trong các v-oncogen của tế bào soma.

Tác động gây ung thư của các v- oncogen và c- oncogen thể hiện ở chỗ: khi chúng hoạt động (nghĩa là chúng được phiên mã dịch mã) chúng sẽ sản sinh ra các protein và enzym có tác động làm rối loạn nhịp điệu tăng sinh của tế bào trong các mô và cơ quan từ đây dẫn đến phát triển ung thư.

#### 8.3.4.3 Các gen ức chế ung thư (Tumor suppressor genes)

Các gen ức chế ung thư là các gen có trong ADN của tế bào mã hóa cho nhiều loại protein có vai trò kiểm soát (thường là ức chế) chu kỳ tế bào ở các mô và cơ quan đã trưởng

thành để duy trì một nhịp điệu tăng sinh tế bào nhất định, hoặc kiểm soát sự tự chết theo chương trình của tế bào. Khi các gen này bị đột biến hay thay đổi cách hoạt động dẫn đến làm sai lệch trong các protein và enzym có vai trò ức chế sự tăng sinh tế bào, do đó tế bào không bị kiểm soát sẽ tự do phân bào và dẫn tới làm tăng sinh khối lượng mô của cơ quan gây ra ung thư.

Ngày nay người ta đã phát hiện được trên 20 gen ức chế ung thư.

Bình thường các gen ức chế ung thư khi hoạt hóa sẽ sản xuất các protein đóng vai trò quan trọng trong các quá trình như phân bào, biệt hóa tế bào, chết của tế bào, sửa chữa ADN v.v.. Các nhà di truyền phân tử đã phát hiện hàng loạt gen ức chế ung thư như: gen RB-mã hóa cho protein pRB, khi bị đột biến sẽ gây ra ung thư võng mạc (retinoblastoma), ung thư xương, ung thư bóng đá, ung thư cổ dạ con, ung thư tuyến tiền liệt, vì protein pRB có vai trò trong sự điều chỉnh chu kỳ tế bào.

Được nghiên cứu nhiều nhất là protein *p53* (được gọi như vậy vì protein có khối lượng 53 kilodalton) được mã hóa bởi gen ức chế ung thư là *TP53*. Sự đột biến soma xảy ra trong gen *TP53* dẫn tới phát triển nhiều dạng ung thư.

Người ta đã chứng minh sự đột biến trong gen *TP53* đều có liên quan đến đa số dạng ung thư ở người. Protein *p53* đóng vai trò chủ đạo trong quá trình đáp ứng của tế bào đối với stress. Trong các tế bào bình thường mức *p53* rất ít nhưng khi bị xử lý bởi các nhân tố gây ung thư, ví dụ phóng xạ ion hóa, thì mức *p53* tăng lên đột ngột và chúng trở nên rất bền và hoạt hóa và chúng có vai trò ngăn chặn chu kỳ tế bào hoặc gây nên tự hoại tế bào (apoptosis) (tùy vào các nhân tố trung gian). Sự đột biến bất hoạt của *p53* là tiền đề chính dẫn tới phát triển ung thư.

Nguyên nhân gây đột biến có thể do các tác nhân gây ung thư như: các hóa chất, phóng xạ, hoặc do virus, hoặc do sự sai lầm trong tái bản ADN không được sửa chữa, hoặc do các nguyên nhân khác mà người ta chưa biết rõ. Các tác nhân gây ung thư có thể tạo nên các gen đột biến từ gen lành, hoặc làm hoạt hóa các gen gây ung thư. Ví dụ, khói thuốc lá có thể gây biến đổi gen lành thành gen đột biến gây ung thư phổi, nhưng khói thuốc lá cũng là nguyên nhân làm hoạt hóa các gen gây ung thư phổi đã sẵn có của cơ thể. Biết như vậy để thấy rằng dù trong trường hợp nào chúng ta tuyệt đối không được hút thuốc lá, chứ đừng như một số người cho rằng ta cứ hút, ta không có gen ung thư thì không việc gì, hay bị quan tin vào số mệnh cho rằng đã mang gen ung thư thì thế nào cũng bị ung thư ta cứ hút trước sau gì cũng chết.

Như ta đã nói ở phần trên, bệnh ung thư là bệnh của tế bào soma nghĩa là xảy ra ở các tế bào và mô của các cơ quan sinh dưỡng như gan, phổi, da, máu v.v.. Những đột biến này có thể xảy ra khi phôi và thai nhi còn ở trong bụng mẹ và như vậy, khi em bé sinh ra đã mang gen ung thư trong cơ thể. Ta thường gọi các trường hợp này là bệnh bẩm sinh. Như vậy bệnh bẩm sinh khác với bệnh di truyền ở chỗ bệnh di truyền được truyền lại từ bố mẹ (gen đột biến đã có sẵn trong tinh trùng hoặc trứng) chứ không phải xuất phát từ giai đoạn phát triển phôi và thai nhi. Trên cơ sở lý luận này thì rõ ràng là bệnh ung thư không di truyền qua các thế hệ con cháu. Tuy nhiên, không loại trừ trường hợp nếu các đột biến gen gây ung thư xảy ra ở dòng tế bào sinh dục và tồn tại trong giao tử thì rõ ràng là chúng sẽ được di truyền cho đời con thông qua hợp tử. Khi hợp tử phân bào để cho ra các tế bào của cơ thể trưởng thành thì các tế bào con cháu đều mang gen đột biến gây ung thư. Các điều tra thống kê cho biết nhiều dạng ung thư như ung thư vú, ung thư kết tràng, trực tràng, ung thư tuyến tiền liệt đều mang tính gia đình nghĩa là được di truyền từ đời này qua đời khác.

Sau đây chúng ta xem xét một số bệnh ung thư điển hình và các gen có liên quan của bệnh.

### 8.3.3 Ung thư vú (breast cancer)

Ở các nước phát triển có khoảng 2 – 10% phụ nữ sau tuổi 50 bị ung thư vú và khoảng 2/3 số bệnh nhân bị tử vong. Hàng năm ở Mỹ có 46.000 phụ nữ chết và 180.000 phụ nữ được chẩn đoán là mắc bệnh ung thư vú. Trên 90% ca ung thư vú có xuất xứ từ các tế bào biểu mô của ống tiết sữa. Lúc đầu các u được hình thành trong ống tiết, về sau một số tế bào thoát ra ngoài ống và tạo u ở phía ngoài ống. Các tế bào ung thư có thể di căn xâm nhập vào xoang ngực, phổi, gan, xương và não. Các ung thư vú thuộc tuyến sữa và da của vú là rất hiếm.

Nghiên cứu trên nhiều gia đình, người ta đã phát hiện thấy ung thư vú được di truyền theo gen ô tô xôm trội biểu hiện khá sớm (ở tuổi dưới 40) và có liên quan đến về q của thể nhiễm sắc số 17. Người ta đã xác định được đó là gen *BRCA1* và là gen đầu tiên gây ung thư vú được phát hiện. Gen *BRCA1* mã hóa cho một protein có 1863 axit amin và thường được dịch mã trong tinh hoàn, trong tuyến ức (thymus), trong vú và buồng trứng. Tiếp theo người ta đã phát hiện gen thứ hai là gen *BRCA2* nằm trong về q của thể nhiễm sắc số 13. Gen này mã hóa cho một protein có 3418 axit amin. Các gen *BRCA1* và *BRCA2* đều thuộc loại gen ức chế ung thư, các protein của chúng đóng vai trò nhân tố phiên mã và tham gia vào sự sửa chữa các ADN hỏng. Gen *BRCA1* và *BRCA2* đột biến đều liên quan đến ung thư vú, ngoài ra gen *BRCA2* còn liên quan đến ung thư buồng trứng. Gần đây các nhà khoa học còn phát hiện thêm gen *BRCA3* có liên quan đến ung thư vú.

### 8.3.4 U xơ thần kinh (neurofibromatose)

Người ta phân biệt hai tip u xơ thần kinh tip 1 và tip 2.

#### 8.3.4.4 U xơ thần kinh tip 1

U xơ thần kinh tip 1 (NF1 hay là bệnh Recklindhausen) là một bệnh ung thư da- thần kinh ngoại biên gây nên, biểu hiện triệu chứng lâm sàng ở sự xuất hiện hàng trăm nốt màu sẫm cà phê sữa có đường kính khoảng 15mm khắp cơ thể cũng như hàng trăm u ác ở da vùng thân, chân và mặt và cuối cùng là con người mất mọc nhiều nốt sần. Trong một số trường hợp còn quan sát thấy nhiều triệu chứng khác tổn thương ở thành mạch máu, vẹo cột sống, to đầu, chậm lớn, hư hỏng ở phần thân não. Bệnh thường gặp với tần số 1/ 3500 người, có tính gia đình và do gen ô tô xôm trội qui định.

Về phương diện tế bào học thì gen đột biến gây bệnh có trong các tế bào là hậu duệ của các tế bào của mào thần kinh của phôi. Trong quá trình phát triển phôi sinh, các tế bào của mào thần kinh có đặc tính di cư và biệt hóa phát triển thành các hạch thần kinh và giầy thần kinh ngoại biên, tế bào sắc tố của da. Bệnh được phát từ 10 – 40 tuổi và có thể tử vong vì sự di căn của các tế bào u ác. Những phân tích di truyền cho biết gen có liên quan đến bệnh NF1 nằm trong về q của thể nhiễm sắc số 17. Gen *NF1* là tương đối lớn có 360.000 cặp nucleotit và gồm 60 *exon*. Gen *NF1* mã hóa cho protein gồm 2818 axit amin được gọi là neurofibromin và có trong tất cả các tế bào, nhưng nhiều nhất là trong noron và tế bào thần kinh đệm. Neurofibromin có vai trò quan trọng trong sự ức chế tăng sinh tế bào, vì vậy nếu gen *NF1* đột biến sẽ không hoạt động hoặc hoạt động kém dẫn tới không có hoặc có lượng neurofibromin quá ít nên tế bào tăng sinh mạnh dẫn tới ung thư. Như vậy, ta có thể xem gen *NF1* là một loại gen ức chế ung thư.

Nhiều nhà ung thư học cho rằng bệnh u xơ thần kinh có biểu hiện rất đa dạng về triệu chứng lâm sàng và không chỉ có gen *NF1*, mà có thể có nhiều gen đột biến khác có liên quan đến bệnh. Người ta đã phát hiện ra thêm các gen *NF3A*, *NF3B*, *NF4* và *NF6* là những biến dạng của gen *NF1* có liên quan đến các dạng lâm sàng khác nhau của bệnh u xơ thần kinh tip 1.

#### 8.3.4.5 U xơ thần kinh tip 2

U xơ thần kinh tip 2 (*NF2* hay là u xơ thần kinh trung ương) biểu hiện các triệu chứng lâm sàng là tạo nên các khối u ở trung ương thần kinh. Các khối u ở trung ương thần kinh phổ biến là các u noron thính giác (auditif neurinome) phát triển bao quanh giầy thần kinh thính giác (giầy VIII hay giầy tiền đình - ốc tai) của não. U noron thính giác là u xuất phát từ các tế bào Soan, một loại tế bào thần kinh đệm tạo nên bao miêlin của giầy thần kinh. Đối với u noron thính giác thì cả chức năng thính giác và chức năng cân bằng đều bị tổn thương, do đó người bệnh thường bị điếc, mất thăng bằng. Có dạng *NF2* biểu hiện ở u trong màng não (u màng não- meningiome) tức là các màng bao não thất của não và tủy sống. Người bệnh bị mờ và đục thủy tinh thể, rối loạn thị giác. Nói chung người bệnh *NF2* nếu nặng thì chỉ sống đến tuổi 25 nếu nhẹ cũng không sống quá tuổi 50.

Người ta đã phát hiện được gen *NF2* nằm trong vế q của thể nhiễm sắc số 22 có liên quan đến bệnh u xơ *NF2*. Gen *NF2* mã hóa cho protein được gọi là merlin có vai trò liên kết màng tế bào với bộ xương của tế bào. Merlin có nhiều trong tế bào của trung ương thần kinh, trong thủy tinh thể, trong tế bào que và tế bào nón của võng mạc, trong màng sắc tố của mắt và trong tế bào cơ. Người ta biết rằng gen *NF2* là một loại gen ức chế ung thư nhưng chưa rõ tại sao gen *NF2* bị đột biến và merlin sai lệch lại dẫn đến ung thư *NF2* trong hệ trung ương thần kinh.

#### 8.3.5 Ung thư võng mạc (retinoblastome)

Ung thư võng mạc là dạng ung thư mang tính di truyền, là dạng u ác tính thường gặp ở trẻ em trên 7 tuổi với tần số khoảng 1/20.000. Các u mạc trong 2 mắt bệnh nhân không thể phẫu thuật cắt bỏ nên bệnh nhân chịu nhiều tổn thương nặng. Cũng giống như đa số các ung thư khác, các gen đột biến gây ung thư vừa mang tính gia đình (khoảng 40%- do bố mẹ di truyền lại) vừa mang tính tự phát (xuất hiện mới trong đời sống cá thể). Người ta đã xác định được gen có liên quan đến bệnh ung thư võng mạc là gen *RB1* là một gen ức chế ung thư. Trong các ca bệnh mang tính di truyền, người ta thấy bệnh nhân chỉ mang một alen đột biến của gen *RB1* đã gây nên ung thư, như vậy đột biến là ô tôxôm trội, nhưng trong trường hợp ung thư tự phát thì đột biến xảy ra ở một alen hoặc cả 2 alen. Trong một số trường hợp bệnh phát triển thành ung thư xương (osteosarcome), ung thư bóng đá, ung thư phổi, ung thư tụy và cả ung thư vú ở phụ nữ.

Người ta đã xác định được gen *RB1* nằm trong vế q của thể nhiễm sắc số 13. Gen có độ lớn 180.000 cặp nucleotit, mã hóa cho protein *RB1* là một protein của nhân tế bào đóng vai trò đa chức năng rất quan trọng. Một trong các chức năng của protein *RB1* là điều chỉnh các nhân tố phiên mã của các gen có vai trò chuyển từ pha G1 sang pha S của chu kỳ tế bào, như vậy chúng có vai trò ức chế sự phân bào và tăng sinh tế bào. Ngoài ra người ta còn cho rằng gen *RB1* ức chế hoạt động của các gen gây ung thư. Từ đây ta thấy rõ là nếu người nào mang gen *RB1* đột biến sẽ dẫn đến sự tăng sinh tế bào trong các mô và hoạt hóa các gen gây ung thư và như vậy phát sinh ung thư. Có điều người chưa hiểu tại sao chỉ có ung thư võng mạc phát triển mạnh nhất? Có thể là gen *RB1* hoạt động đặc trưng cho các tế bào võng mạc của mắt.

### 8.3.6 Ung thư thận

Ung thư thận (nephroblastome) hay còn gọi ung thư Wilms (WT) là ung thư của thận thường gặp 1/10.000 trẻ em. Ngoài biểu hiện u ở thận, u còn biểu hiện ở tinh hoàn hoặc các cơ quan khác. Bệnh mang tính di truyền chỉ gặp khoảng 1% trong tổng số ca. Người ta đã phát hiện được 4 locut gen liên quan đến bệnh; đó là các gen *WT1* và *WT2* nằm trong vế p của thể nhiễm sắc số 11, gen *WT3* nằm trong vế q của thể nhiễm sắc số 16 và gen *WT4* nằm trong vế q của thể nhiễm sắc số 17. Chúng đều là những gen ức chế ung thư. Người ta đã làm sáng tỏ được cơ chế gây ung thư của chúng. Khi chúng bị đột biến đều dẫn đến ung thư. Ví dụ, người ta đã phát hiện được ở các em bé tuổi 26 – 40 tháng sau khi sinh mang các u lành (dạng di truyền cũng như tự phát), gen *WT1* đột biến đều có mặt trong tế bào thận. Nếu phẫu thuật cắt bỏ sớm các u đó thì bệnh nhân có thể khỏi bệnh. Nếu không thì 15% ca bệnh sẽ bị di căn và không tránh khỏi tử vong. Rõ ràng là cần thiết phải tìm kiếm các phương pháp chẩn đoán ung thư sớm ở mức độ phát hiện các gen đột biến và trạng thái hoạt động của chúng, để có thể đề ra trị liệu thích hợp ngăn chặn ung thư phát triển. Đó cũng là một trong các hướng nghiên cứu của các nhà ung thư học hiện nay.

Gen *WT1* gồm khoảng 50.000 cặp nucleotit có chứa 10 *exon* và được dịch mã trong các tế bào của nhiều cơ quan như: thận, cơ, tinh hoàn, lách, tủy sống, não, buồng trứng, tim và phổi. Protein do gen *WT1* mã hóa, có vai trò trong sự điều hòa quá trình phiên mã của nhiều gen tác động trong chu kỳ tế bào. Đột biến trong gen *WT1* dẫn đến làm rối loạn chu kỳ, rối loạn sự biệt hóa cũng như quá trình tự chết của tế bào, do đó dẫn đến ung thư.

### 8.3.7 Ung thư kết - trực tràng (colorectal cancer)

Ổng tiêu hóa gồm xoang miệng, hầu họng, thực quản, dạ dày, ruột non và ruột già. Mỗi phần đều có thể phát sinh ung thư như: ung thư vòm họng, ung thư dạ dày và ung thư ruột già (ung thư kết – trực tràng).

Ruột già là phần ruột gồm phần kết tràng (colon) là đoạn ruột có hình chữ n rất dài và đoạn tận cùng là phần trực tràng đổ ra hậu môn.

Ung thư kết - trực tràng (CRC) có thể gặp ở người trẻ. Nhưng ở tuổi 70 thì đa số (khoảng 1/2 số người) chúng ta đều mang u lành CRC. Nói chung, có khoảng 10% ca sẽ phát triển thành u ác tính di căn gây tử vong. Nếu được phát hiện sớm, được điều trị hoặc cắt bỏ kịp thời có thể tránh được nguy hiểm.

Những triệu chứng lâm sàng đầu tiên của ung thư là đi ra phân có máu, đi tháo lỏng hoặc táo bón, thường đau lâm râm và khó chịu ở vùng bụng. Khi u phát triển mạnh và di căn sẽ gây nhiều biến chứng ở các cơ quan khác như: dạ dày, ruột non, não, phổi và xương.

Thành ruột kết tràng và trực tràng gồm lớp cơ trơn ở ngoài (tạo nhu động của ruột) và lớp niêm mạc ở phía trong gồm nhiều loại tế bào của biểu mô tuyến có vai trò tạo nên các nhung mao để chế tiết, thu nhận, hấp thụ. Trong đa số trường hợp u thường phát triển ở biểu mô tuyến của ruột. Bắt đầu là sự tăng sinh quá mức của biểu mô tuyến tạo nên các u lồi hình ngón tay (polip) mọc thò vào ống ruột và cắm sâu tận lớp cơ của ruột. Có khoảng 40% ca u lồi polip (được gọi là polipose – adenome) phát triển thành ác tính di căn. Ngoài ra người ta còn quan sát thấy dạng ung thư kết- trực tràng không mọc u polip mà ở dạng nhiều khối mô tăng sinh quá mức nằm trong thành ruột (được gọi là u không polip). Các tế bào có thể bong ra và di căn đến các phần khác của cơ thể gây nguy hiểm.

Ung thư kết - trực tràng đều mang tính di truyền và người ta đã phát hiện được các gen có liên quan đến bệnh. Một trong các gen gây u polip là gen *APC* nằm trong vế q của thể nhiễm sắc số 5 (5q21) di truyền theo kiểu ô tô xôm trội. Gen này mã hóa cho protein APC gồm 2843 axit amin là loại protein có nhiều trong các tế bào kể cả ruột già và não. Protein này có vai trò đa chức năng đặc biệt là có ảnh hưởng tới sự tăng sinh của tế bào. Chắc rằng gen *APC* đột biến đã làm hỏng protein APC và dẫn tới ung thư polip. Gen *APC* cũng là một loại gen ức chế ung thư. Tuy nhiên trong sự phát triển của ung thư người ta thấy còn có sự tham gia của nhiều gen đột biến khác như các gen *KRAS*, *DCC* và *TP53* nằm trong các thể nhiễm sắc khác cùng phối hợp tác động. Gen *TP53* cũng là một loại gen ức chế ung thư.

Trong trường hợp ung thư không polip (còn được gọi là hội chứng Lynch) có thể gặp với tần số 1/200 là dạng ung thư mang tính di truyền rất phổ biến. Hơn nữa trong các gia đình có thành viên bị ung thư không polip, còn quan sát thấy các thành viên bị các dạng ung thư khác như: ung thư buồng trứng, dạ con, thận, não, tuyến tụy, dạ dày, tụy ở thể nhẹ hơn. Bệnh thường xuất hiện trước tuổi 45. Nhiều nghiên cứu về cơ sở gen của ung thư kết - trực tràng không polip cho thấy gen đột biến qui định bệnh rất đa dạng. Người ta đã chứng minh được là các đột biến của các gen sau đây có liên quan đến ung thư:

Gen	Định vị trong thể nhiễm sắc
MSH2	2p22.p21
MLH1	3p21.3
PMS1	2q31.q33
PMS2	7p22
MSH6	2p16

Điều đặc biệt là các đột biến gen phát sinh từ các gen lành đều là các thay đổi bé trong nucleotit của ADN chứ không phải do sự đứt và mất lớn. Người ta chưa hiểu rõ được cơ chế tác động của các gen đột biến gây nên các dạng ung thư kết- trực tràng không polip, nhưng người ta giả thiết rằng các gen hoạt động theo kiểu dây chuyền. Một gen bị đột biến gây nên một triệu chứng lâm sàng, tiếp theo gen thứ hai bị đột biến gây thêm triệu chứng lâm sàng nặng hơn, rồi gen thứ ba, gen thứ tư v.v. cho đến khi u lành biến thành u ác.

#### 8.4 Ung thư thất điều dẫn mạch (ataxie telangiectasie)

Ung thư thất điều dẫn mạch (AT) còn được gọi là hội chứng Louis - Bar, là bệnh di truyền theo kiểu ô tô xôm lặn, bắt gặp với tần số 1/70.000 trẻ sơ sinh. Biểu hiện triệu chứng lâm sàng rất đa dạng, bước đi nghiêng về trái và vôi vàng (thất điều) giọng nói bị rối loạn, phát âm khó khăn. Thoái hóa chức năng vận động diễn ra nhanh chóng không đi được phải ngồi xe lăn và có thể chết vào khoảng 20 - 30 tuổi. Sự không điều hòa được cử động có nguyên căn ở tổn thất tiểu não, thoái hóa chức năng thần kinh. Ngoài ra bệnh còn thể hiện ở triệu chứng dẫn và tổn thương mạch máu (dẫn mạch) trong mắt, giảm khả năng miễn dịch, dễ bị nhiễm trùng, dễ bị nhiễm phóng xạ, vì vậy kéo theo ung thư bạch cầu hoặc ung thư limphô ác tính.

Người ta đã xác định được gen đột biến gốc liên quan đến bệnh AT được gọi là gen *ATM* nằm trong vé q của thể nhiễm sắc số 11 (11q22.23). Từ dạng gen đột biến gốc này, có thể biến đổi thành nhiều dạng gen đột biến khác hợp thành họ gen *AMT*. Các protein do gen *AMT* tổng hợp đều bị sai lệch và tác động gây ung thư của chúng liên quan đến protein p53 là protein có chức năng trong quá trình tự chết theo chương trình của tế bào và sửa chữa ADN. Người ta cho rằng chúng đều là các gen ức chế ung thư.

## 8.5 Chẩn đoán và chữa trị ung thư

Điềm qua một số bệnh ung thư thường gặp và cơ sở gen có liên quan, người ta đi đến kết luận:

Ung thư là bệnh do rối loạn trong sự điều hòa quá trình tăng sinh tế bào trong các mô của cơ thể. Có thể nói cơ thể có bao nhiêu loại mô thì có thể có từng ấy dạng ung thư.

Ung thư do đột biến trong các gen có vai trò điều chỉnh quá trình tăng sinh của tế bào. Nguyên nhân xuất hiện của những đột biến này có thể do virus, do đột biến trong bản thân các gen của cơ thể. Các gen đột biến này được gọi chung là gen gây ung thư (oncogen). Khi chúng hoạt động sẽ gây nên ung thư. Ngoài ra còn có đột biến trong các gen bình thường của cơ thể được gọi là gen ức chế ung thư. Thực ra các gen này có vai trò trực tiếp hay gián tiếp điều chỉnh sự phân bào ở một nhịp điệu nhất định theo chương trình đã được qui định nghiêm ngặt của cơ thể. Các gen ức chế ung thư một khi bị đột biến sẽ sinh ra protein sai lệch sẽ dẫn đến làm rối loạn cơ chế phân bào và sinh ra ung thư.

Các đột biến gen có liên quan đến ung thư có thể là do sự sai lệch trong quá trình tự tái bản ADN, do quá trình sửa sai không hết, hoặc do các tác nhân gây ung thư đến từ môi trường như virus, chất độc hóa học, phóng xạ v.v..

Các đột biến có thể xảy ra trong tế bào soma của cơ thể ở giai đoạn phôi thai trong bụng mẹ hoặc của cơ thể trưởng thành sau khi sinh (được gọi là tự phát). Đột biến có thể xảy ra trong dòng tế bào sinh dục, khi đó chúng được di truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác và mang tính gia đình.

Khi cơ thể mang gen gây ung thư do di truyền từ bố mẹ, nếu biết giữ gìn, tránh được các điều kiện để gen ung thư không biểu hiện thì khả năng bị ung thư sẽ bị hạn chế. Cũng có thể không mang gen ung thư, nhưng với sống không lành mạnh không giữ gìn, dễ bị các tác nhân ngoại cảnh như: virus, hóa chất và phóng xạ v.v. tác động gây đột biến cho hệ gen của mình và có thể bị ung thư. Nếu đột biến xảy ra trong tế bào dòng sinh dục sẽ di truyền cho đời con cháu.

Vì vậy, cần thiết phải có hiểu biết đầy đủ về ung thư để có thể tư vấn, dự đoán, chẩn đoán sớm ung thư mới có thể có liệu pháp thích hợp để điều trị bệnh ung thư một cách hiệu quả. Đặc biệt là mỗi một người chúng ta không được chủ quan với bệnh ung thư, bất kỳ ai cũng có thể bị ung thư, vì vậy điều đầu tiên là bản thân mỗi một chúng ta phải duy trì cuộc sống lành mạnh, tránh được các tác nhân độc hại gây ung thư và luôn cảnh giác khi chớm có dấu hiệu phải đến khám bệnh kịp thời. Nếu để chậm sẽ không tránh khỏi tổn thất về tiền bạc, sức khỏe và tử vong đáng tiếc.

Thường có ba liệu pháp chữa trị ung thư phổ biến là phẫu thuật cắt bỏ khối u, chiếu xạ và sử dụng hóa chất chống ung thư.

Theo đà phát triển của di truyền học phân tử và công nghệ gen, ngày nay người ta đã kết hợp các phương pháp chẩn đoán, chữa trị ung thư cổ điển với liệu pháp gen trong chẩn đoán



và chữa trị ung thư. Các nhà công nghệ di truyền kết hợp với công nghệ vi tính đã phát hiện công nghệ chip gen, nhằm phát hiện sớm các gen sai lệch, phát hiện virut, phát hiện sự biểu hiện gen bất thường trong tế bào và mô bệnh. Sử dụng các chip gen để phát hiện virut HIV gây bệnh AIDS, phát hiện các đột biến trong cấu trúc của gen ức chế ung thư p53 ở người đã được áp dụng tại nhiều bệnh viện và chip gen đã trở thành hàng hóa thương phẩm.

Liệu pháp gen được sử dụng để chữa trị nhiều bệnh di truyền cũng như ung thư. Công nghệ nuôi cấy và điều khiển biệt hóa các tế bào gốc thành các tế bào của các mô, kết hợp với kỹ thuật chuyển gen, các tế bào hồng, cũng như các gen hồng trong cơ thể người bệnh sẽ được thay thế bằng các tế bào lành, các gen lành giống như các nhà kỹ thuật thay thế các chi tiết, các phụ tùng hỏng của một cái máy, đặng khôi phục sự hoạt động bình thường của chúng.

## 8.6 Điều trị bệnh di truyền bằng liệu pháp gen (Genetic therapy)

### 8.5.1 Nguyên lý của liệu pháp gen

Trước năm 1990 những bệnh do gen qui định và cơ chế tác động của gen gây bệnh còn là điều bí mật. Hơn nữa đa số các bệnh do gen qui định đều là bệnh di truyền đa gen, biểu hiện lâm sàng rất đa dạng đòi hỏi phối hợp nhiều liệu pháp chữa trị khác nhau như sử dụng thuốc, phẫu thuật, chế độ dinh dưỡng, truyền thay máu, ghép tủy xương, ghép cơ quan v.v.. Nhưng tiếc thay thực tiễn điều trị cho thấy những liệu pháp kể trên cũng chỉ là tạm thời, rất tốn kém, nhiều khi không đem lại kết quả mong muốn, nhất là trường hợp bệnh nhân bị phát hiện chậm ở giai đoạn nguy kịch. Nhiều trường hợp bệnh nhân được cứu sống, nhưng sống đau khổ, nằm một chỗ không thể tự phục vụ, hoặc vô sinh đem lại đau buồn cho bệnh nhân và gia đình.

Thực tiễn đòi hỏi Y học phải nghiên cứu những liệu pháp mới có hiệu quả hơn.

Từ khi kỹ thuật di truyền ra đời người ta phân lập, tách chiết được gen, chọn dòng gen tái tổ hợp và cấy ghép gen vào các tế bào khác nhau, vào những năm 80 của thế kỷ XX, người ta đã đề nghị áp dụng liệu pháp gen trong chữa trị các bệnh di truyền.

Nguyên lý của liệu pháp gen bao gồm: tách chiết tạo các gen hoặc ADN mong muốn, chọn dòng gen, chuyển gen vào tế bào đích để chúng tái bản và tạo nên các protein lành cho cơ thể.

Như vậy, liệu pháp gen có thể chữa bệnh từ gốc, là liệu pháp đơn giản để triệt tiêu các triệu chứng bệnh. Nhiều người khăng định xét về mặt khoa học, kinh tế và cả đạo lý thì liệu pháp gen là tiến bộ nhất và hiệu quả nhất.

Từ năm 1990 sau khi thăm dò dư luận quần chúng và các cơ quan có thẩm quyền, liệu pháp gen được thử nghiệm ở Mỹ trên hai bé gái bị bệnh SCID là bệnh suy giảm miễn dịch có liên quan đến sai lệch trong enzym adenosin deaminaza (ADA). Kỹ thuật của liệu pháp gồm 3 bước:

*Bước thứ nhất:* người ta phân lập và chọn dòng gen mã hóa cho enzym ADA.

*Bước thứ 2:* tách các tế bào limphô của người bệnh chuyển gen ADA vào tế bào limphô và đem nuôi cấy các limphô đã được chuyển gen.

*Bước thứ 3:* truyền các limphô được nuôi cấy cho người bệnh liên tục cách quãng thời gian trong suốt hai năm.

Sau bốn năm kể từ ngày bắt đầu điều trị, ở cả hai em bị bệnh, người ta đều quan sát thấy bệnh thuyên giảm đáng kể và tìm thấy các gen ADA lành trong các tế bào limphô. Tiếp theo

nhiều trường hợp bị bệnh SCID được chữa bằng liệu pháp gen tương tự. Tuy nhiên do một vài lý do chăm sóc, nhiều kết quả chưa đạt được mong muốn, nhưng dù sao cũng đã chứng minh liệu pháp gen có thể ứng dụng có hiệu quả và không gây nguy hiểm.

Liệu pháp gen được thử nghiệm tại nhiều nước đối với nhiều bệnh khác nhau. Đến năm 1999 đã có trên 275 ca được thử nghiệm đối với nhiều bệnh di truyền trong đó có bệnh ung thư (melanome, ung thư trực tràng, ung thư thận, ung thư buồng trứng, ung thư vú, ung thư thần kinh đệm, ung thư da vẩy nến v.v.), bệnh không đông máu, bệnh AIDS, bệnh nhày nhót, bệnh tăng cholesterol, bệnh thiếu máu v.v..

Vì lý do bảo đảm an toàn y tế nên các qui định về các thử nghiệm điều trị bệnh ở Mỹ rất nghiêm ngặt cho nên hiện nay chỉ có các bệnh di truyền trong tế bào soma (sai lệch gen trong các tế bào của cơ quan dinh dưỡng) mới được áp dụng, còn các bệnh di truyền qua tế bào sinh dục (tức là được truyền từ đời này qua đời khác) chưa được phép áp dụng. Tại nhiều nước liệu pháp gen đối với các bệnh mang tính di truyền cho đời sau, bị pháp luật cấm áp dụng trong thực tiễn lâm sàng, bởi vì người ta chưa thể theo dõi được hoạt động của gen thay thế trong cơ thể nhận qua nhiều thế hệ.

Về nguyên lý như ta đã biết liệu pháp gen soma là sự thay thế gen lành cho tế bào đích để tế bào tự chữa cho cơ thể. Nhưng nhiều vấn đề phức tạp được đặt ra: Làm thế nào để nhận dạng đúng tế bào đích? Làm thế nào tách được gen dùng để chữa bệnh? Tỷ lệ tế bào đích cần thay thế là bao nhiêu để có hiệu quả? Phải điều chỉnh sự hoạt động của gen chữa như thế nào để có hiệu quả? Sự hoạt động của gen chữa có gây hậu quả sinh lý xấu cho cơ thể? Các tế bào nhận được gen thay thế hoạt động lâu dài hay phải thay thế theo thời gian?.

Mặc dầu liệu pháp gen vẫn còn ở giai đoạn thử nghiệm, nhưng nhiều vấn đề nêu trên đang lần lượt được giải quyết đối với một số bệnh.

Song song với liệu pháp thay thế gen hỏng, nhiều liệu pháp công nghệ gen khác cũng được áp dụng như sử dụng các antisens (một đoạn ADN nhỏ đặc hiệu) để ức chế hoạt động của gen đột biến, các ribozym (các ARN có tính chất xúc tác như enzym) để phân giải các mARN sai lệch, như vậy bệnh được ngăn chặn không tiến triển.

Liệu pháp gen được áp dụng bằng 2 phương thức: phương thức *in vivo* (trong cơ thể bệnh nhân) là phương thức đưa trực tiếp gen chữa bệnh vào cơ quan đích của bệnh nhân. Phương thức thứ hai là phương thức *ex vivo* (ngoài cơ thể) là phương thức chuyển gen thông qua các tế bào nuôi cấy *invitro* ngoài cơ thể.

### 8.5.2 Liệu pháp gen *ex vivo*

Công nghệ ghép gen, thay thế gen chữa bệnh bằng phương thức *ex vivo* bao gồm nhiều bước:

- Lấy các tế bào của cơ thể nuôi cấy chúng *invitro* (trong ống nghiệm).
- Tách chiết, phân lập gen chữa bệnh.
- Chuyển gen chữa bệnh vào các tế bào nuôi cấy, chọn dòng và cho chúng tăng sinh.
- Cấy ghép các tế bào này cho bệnh nhân.

Người ta sử dụng các tế bào của bản thân bệnh nhân để ghép cho bệnh nhân (tự ghép), do đó không xảy ra hiện tượng đáp ứng miễn dịch chống tế bào ghép. Các gen chữa bệnh sẽ hoạt động ổn định và liên tục. Để chuyển và ghép gen chữa bệnh vào tế bào người ta có thể dùng phương pháp vi tiêm hoặc bắn gen trực tiếp vào tế bào, nhưng thông thường phải dùng vector

chuyển gen. Hiện nay nhiều phòng thí nghiệm thường sử dụng retrovirut của chuột nhất làm vectơ để chuyển gen chữa bệnh vào tế bào người trong nuôi cấy và đã cho kết quả tốt. Tuy nhiên có một số trường hợp gây hậu quả xấu. Nhờ nghiên cứu sâu và tỷ mỉ về hoạt động của hệ gen của retrovirut, các nhà nghiên cứu đã tìm được cách khắc phục nhược điểm này và tạo được vectơ cũng như dòng tế bào mang gen chữa bệnh với hiệu quả cao và an toàn.

Phương pháp ghép tủy xương là liệu pháp gen quan trọng để chữa các bệnh di truyền. Ngày nay đã có trên 20 bệnh được chữa bằng phương pháp ghép tủy xương trong đó có các bệnh thiếu máu và nhiều bệnh ung thư khác nhau.

Chúng ta đều biết rằng tủy xương đỏ là cơ quan quan trọng để tạo máu cho cơ thể. Trong tủy xương có các tế bào gốc soma đa tiềm năng nghĩa chúng có khả năng phân bào và biệt hóa cho ra các dạng tế bào máu như hồng cầu, các dạng bạch cầu, tiểu cầu, các đại thực bào và cả tế bào hủy xương. Ví dụ, nếu có đột biến trong dòng biệt hóa nào đấy của tủy xương thì liệu pháp chuyển gen *ex vivo* và ghép tủy xương cho người bệnh sẽ giúp cơ thể tránh được bệnh. Nhưng ở đây có một trở ngại là các tế bào gốc đa tiềm năng trong tủy xương có với tỷ lệ vô cùng nhỏ (chỉ vào khoảng 1/10.000 - 100.000). Các nhà khoa học đang tích cực nghiên cứu để phân lập và tăng cao số lượng các tế bào gốc tủy xương.

Người ta cũng tích cực sử dụng các loại tế bào gốc khác nhau như tế bào máu của cuống rốn, tế bào nhau thai, hoặc tế bào tái tổ hợp để chuyển gen và ghép tế bào mang gen chữa bệnh cho các bệnh nhân bị SCID và bệnh nhân tăng cholesterol thu được kết quả khả quan. Sử dụng các tế bào gốc để chuyển ghép gen chữa bệnh được gọi là công nghệ tế bào gốc.

Bệnh tăng cholesterol (hypercholesterolemie) là bệnh khá phổ biến mang tính gia đình và được di truyền theo kiểu đồng hợp lặn. Người bệnh thiếu thụ quan màng đối với lipoprotein dạng tỷ trọng thấp (Low Density Lipoprotein-LDL) trong tế bào gan và hậu quả là các chất béo có chứa LDL- cholesterol không được gan thu nhận chuyển hóa, chúng tích lại trong dòng máu dẫn tới xơ cứng mạch máu và là nguyên nhân của đột tử mạch vành tim (nhồi máu cơ tim).

Những bệnh nhân này rất khó chữa trị bằng thuốc và liệu pháp phẫu thuật nong mạch vành cũng chỉ là tạm thời. Nhiều thử nghiệm liệu pháp gen cho bệnh tăng cholesterol đem lại hiệu quả tốt. Người ta lấy tế bào gan của bệnh nhân đem nuôi cấy *invitro*, chuyển ghép ADN tái tổ hợp (vectơ retrovirut có mang gen thụ quan LDL) vào các tế bào gan nuôi cấy. Tiếp theo người ta chuyển ghép các tế bào chuyển gen vào gan của bệnh nhân. Bệnh nhân được theo dõi qua 18 tháng, gen được chuyển hoạt động và sản sinh thụ quan LDL, hàm lượng lipit trong máu giảm, cơ thể không có phản ứng miễn dịch và tình trạng bệnh được cải thiện rõ rệt. Bệnh nhân đã được cứu sống.

Công nghệ sử dụng các dòng tế bào tự thân của bệnh nhân có nhiều ưu điểm như không gây ra đáp ứng miễn dịch, nhưng lại bị hạn chế ở chỗ không có đủ tế bào để nuôi cấy hoặc không đáp ứng kịp thời về nguồn tế bào. Vì vậy, người ta phải sử dụng các nguồn tế bào không tự thân (của người khác) như các sợi bào, tế bào da, tế bào thần kinh đệm, tế bào gan, cơ bào v.v. để nuôi cấy và chuyển gen. Để tránh hiện tượng chống lại tế bào ghép các nhà được học đã cho các tế bào ghép vào trong vỏ bọc như kiểu viên thuốc nhộng và sau đó chuyển vào cơ quan đích của bệnh nhân. Protein được gen chữa bệnh được sản xuất và giúp cho bệnh nhân chống lại bệnh, các tế bào ghép không bị thải loại, tồn tại và hoạt động. Tuy nhiên, cũng gặp khó khăn khi phải ghép thường xuyên các viên nhộng như kiểu ta phải uống thuốc thường xuyên vậy.

Để hoàn thiện kỹ thuật cấy ghép gen *ex vivo* các nhà công nghệ tế bào gốc đã cố gắng phân lập xác định các dòng tế bào gốc phôi cũng như tế bào gốc thân, nuôi cấy chọn dòng,

lưu giữ lâu dài và khi cần có thể sử dụng. Gần đây những dòng tế bào gốc người đã được phân lập và chọn dòng tại Trường Đại học Havard (Mỹ) và Đại học Seoul (Hàn Quốc).

### 8.5.3 Liệu pháp gen *in vivo*

Trong liệu pháp gen *in vivo*, các gen chữa bệnh được đưa thẳng vào cơ thể bệnh nhân vào các tế bào của cơ quan đích, ví dụ gan, tủy xương bị bệnh. Trong liệu pháp gen *in vivo*, vấn đề quan trọng là phương thức nạp gen chữa bệnh vào cơ thể bệnh nhân. Người ta có thể dùng các vectơ để nạp gen. Người ta sử dụng kỹ thuật gen tái tổ hợp nghĩa là tạo nên các ADN tái tổ hợp bao gồm gen sửa chữa liên kết với vectơ chuyển. Nhờ có vectơ chuyển nên gen (tức là ADN tái tổ hợp) mới được chuyển vào nhân tế bào và gắn vào thể nhiễm sắc của tế bào và gen chuyển sẽ hoạt động. Các vectơ thường được sử dụng là các *plasmid* (loại ADN có trong tế bào vi khuẩn) hoặc là adenovirut (virut chứa ADN) hoặc retrovirut (virut chứa ARN). Do đó, khi sử dụng virut như là vectơ chuyển gen người ta phải làm mất độc tính gây bệnh của chúng hoặc sử dụng loại virut không gây bệnh.

Ngoài ra người ta có sử dụng phương pháp chuyển gen trực tiếp như sử dụng phương pháp vi tiêm (dùng vi phẫu thuật để tiêm ADN) hoặc dùng súng bắn gen. Đạn là các viên nhôm vô bằng vàng bên trong chứa gen sửa chữa (có kích cỡ khoảng 1- 3 micron) được súng bắn nạp thẳng vào tế bào đích. Tuy nhiên xác suất để gen vào được nhân của tế bào đích là không cao.

Nhiều bệnh do sai lệch gen kể cả ung thư đã được thử nghiệm bằng phương pháp *in vivo* mở ra nhiều khả năng khả quan, nhưng các nhà Y học vẫn luôn khuyến cáo là phải rất thận trọng để tránh hậu quả xấu vì nhiều vấn đề về hoạt động của gen chuyển trong cơ thể nhận vẫn chưa được hoàn toàn sáng tỏ.

### 8.5.4 Liệu pháp gen sử dụng các oligonucleotit

Oligonucleotit là các đoạn ADN hoặc ARN ngắn được thiết kế và chọn lọc và được sử dụng như một loại thuốc chữa bệnh đặc biệt là các bệnh sai lệch về gen. Thuốc được tiêm, cấy hoặc uống vào cơ thể để chúng phát tán vào các mô, tế bào. Chúng có tác dụng sửa chữa, tiêu diệt các gen hỏng, tiêu diệt các mARN sai lệch hoặc protein sai lệch, do đó hạn chế bệnh phát sinh. Các nhà dược học đã điều chế các antisens ADN hoặc ARN-ribozym là những thuốc oligonucleotit đặc thù có tác dụng chữa được nhiều bệnh do sai lệch gen.

*Vấn đề thảo luận ở chương 8:*

1. *Nêu các tiêu chí để phân biệt u lành và u ác, tiêu chí phân biệt tế bào lành và tế bào ung thư.*
2. *Giải thích cơ sở di truyền tế bào của phát sinh ung thư.*
3. *Nêu và phân tích các gen gây ung thư, gen ức chế ung thư.*
4. *Nêu các nhân tố của môi trường gây ung thư.*
5. *Nêu các nguyên tắc chữa trị ung thư. Nêu nguyên lý của liệu pháp gen trong chữa trị ung thư.*

## Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Như Hiền (2002). *Di truyền và công nghệ tế bào soma*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội.
2. Nguyễn Như Hiền, Trịnh Xuân Hậu (2004). *Tế bào học (in lần thứ 2)*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội. Hà Nội.
3. Nguyễn Như Hiền, Chu Văn Mẫn (2002). *Sinh học Người*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội.
4. Nguyễn Như Hiền (2005). *Sinh học phân tử và tế bào- cơ sở khoa học của công nghệ sinh học*. Nhà xuất bản Giáo dục. Hà Nội.
5. Phạm Thành Hồ (2004). *Di truyền học*. Nhà xuất bản Giáo dục. Hà Nội.
6. Võ Thị Thương Lan (2000). *Sinh học phân tử*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội. Hà Nội.
7. Vũ Văn Vụ, Nguyễn Mộng Hùng, Lê Hồng Điệp (2005). *Công nghệ sinh học tế bào*. Nhà xuất bản Giáo dục. Hà Nội.
8. Xoanson. C., Mecz T., Jang W. (1977). *Di truyền học tế bào*. (Sách dịch do Nguyễn Tường Anh dịch, Nguyễn Như Hiền hiệu đính). Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội.
9. Albert B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. Watson (1994). *Molecular Biology of the Cell*. 3<sup>d</sup> ed. Garland Publishing, Inc. New York.
10. Biotechnologies d' aujourd' hui (1993). *Sous la direction de R. Julien*. Publin. Paris.
11. Blanquet S (1997). *Biologie moléculaire*. Cours de Biologie. Ecole polytechnique. Paris.
12. Brown T. A (1999). *Genomes*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
13. Baimai, V., R. G. Andre nd B. A. Harrison (1984). *Heterochromatin variation in the sex chromosomes in Thailand population of Anopheles dirus A (Diptera: culicidae)*. Can.J.Genet. Cytol. 26: 633-636.
14. Baimai, V (1997). *Chromosomal polymorphisms of constitutive heterochromatin and inversion in Drosophila*. Genetics 85: 85-93.
15. Cau P., Seite R (2002). *Cours de Biologie cellulaire*. 3<sup>d</sup> ed. Ellipses edition Marketing S.A. Paris.
16. Gilbert S. F. (2000). *Developmental Biology*. 6<sup>th</sup> ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
17. D. L. Hartl, E. W. Jones (2003). *Genétique. Les gènes principes*. (Traduction par E. Dequier) 3<sup>d</sup> ed. Dunod. Paris.
18. Lodish H., D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaria, J. Darnell (2001). *Molecular Cell Biology*. 5<sup>th</sup> ed. Scientific American Books. New York.

19. Hartwell L. H., L. Hood, M. L. Goldberg, A. E. Reynolds, L. M. Silver, R. C. Veres (2000). *Genetics*. From genes to genomes. Mc Graw-Hill companies, Inc. New York.
20. Pasternak. J (2003). *Genetique moleculaire humaine*. (Traduction par D. C. Bensimon). Ed. De Boeck Universite. Paris.
21. Pollard T. D., Earnshaw W. C (2004). *Cell Biology*. Saunders. An Imprint of Elsevier. Philadelphia.
22. Smith C. A. , Wood E. J. (1999). *Cell Biology*. 2<sup>d</sup> ed. Chapman & Hall. New York.
23. Snustad D. P., Simons M. J (2000). *Principles of Genetics*. 2<sup>d</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc. New York.
25. Watson J. D. (1965). *Molecular Biology of the Gene*. New York. Amsterdam.
26. White, M. J. D (1973). *Animal cytology and evolution*, 3 rd ed. Cambridge Univ. Press, London.