

GS. TSKH. ĐÁI DUY BAN

Công nghệ

Gen



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT



GS.TSKH ĐÁI DUY BAN

# CÔNG NGHỆ GEN



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

HÀ NỘI - 2006

## LỜI GIỚI THIỆU

*Di truyền học phân tử* nghiên cứu cấu trúc các gen và sự vận hành các sản phẩm của chúng trong một tế bào. Lĩnh vực này không ngừng được phát triển là nhờ kỹ thuật liên quan đến sự thao tác ADN, ARN và protein thay đổi mau lẹ và mạnh mẽ mà các kỹ thuật đó ngày nay được gọi là **công nghệ gen**.

Công nghệ gen ra đời đã dẫn tới những tiến bộ phi thường trong thực tiễn y khoa và trong nông nghiệp. Công nghệ gen là sợi chỉ đỏ của Công nghệ sinh học. Nhờ công nghệ gen người ta đã và đang tạo ra các loại cây trồng, vật nuôi biến đổi gen nhằm cung cấp lương thực thực phẩm một cách dồi dào và đa dạng; tạo ra các loại thuốc, các sinh phẩm quý giá đắt tiền để chữa bệnh; sản xuất ra các bộ kit chẩn đoán sớm và chính xác các bệnh; tạo ra các vaccine (vacxin) phân tử tái tổ hợp để phòng các bệnh virus (virut) và nhiễm khuẩn.

Đặc biệt liệu pháp gen – là phương pháp chữa bệnh bằng gen và thuốc gen đang được thịnh hành, đã góp phần điều trị và chữa khỏi một số một số bệnh nan y như: xơ nang, thiếu máu hồng cầu liềm, bệnh máu khó đông, ung thư v.v... Như vậy, rõ ràng công nghệ gen đóng vai trò chủ đạo. Gần đây vấn đề sản xuất tế bào phôi gốc (tế bào mầm phôi) để phục vụ nghiên cứu và điều trị cũng đang được bàn cãi và phát triển rầm rộ thì công nghệ gen cũng góp phần quan trọng, vai trò của cừu Dolly và kỹ thuật tế bào gốc phôi đã đẩy việc điều trị y học lên một tầm cao hơn nữa.

Tế bào gốc phôi tạo từ phôi nhân bản với tế bào sinh dưỡng của người bệnh có các lợi thế như:

- + Không bị hàng rào miễn dịch cản trở khi ghép vào cơ thể.
- + Có thể nhân nhanh và biệt hoá tất cả các tế bào và cơ quan để thay thế.

Dùng tế bào gốc có thể điều trị các bệnh hiểm nghèo và xã hội như: bệnh tiểu đường, bệnh Parkinson, bệnh ung thư máu các loại v.v...

*Công nghệ gen là gì? Các nguyên lý cơ bản của công nghệ gen và ứng dụng công nghệ gen trong các lĩnh vực kinh tế quốc dân như thế nào?*

*Trong những năm qua, chúng tôi đã có một số công trình nghiên cứu cấp Bộ và cấp Nhà nước về chẩn đoán sớm ung thư gan, ung thư vòm họng, ung thư vú và một số bệnh virus nên có điều kiện tiến hành các kỹ thuật về công nghệ gen. Do đó để góp phần làm sáng tỏ những vấn đề trên đồng thời để đáp ứng được nhu cầu của các sinh viên đại học, các học viên cao học, các nghiên cứu sinh và nhu cầu tham khảo của các cán bộ giảng dạy, cán bộ nghiên cứu trong các ngành công nghệ sinh học, y dược, nông lâm thủy sản; chúng tôi biên soạn cuốn sách "Công nghệ gen".*

*Nội dung cuốn sách gồm 16 chương được sắp xếp theo thứ tự logic từ nguyên lý cơ bản đến kỹ thuật, từ đơn giản đến phức tạp của một ngành khoa học hiện đại. Riêng phần ứng dụng chỉ đề cập rất ngắn gọn, vì nhiều bài báo nhiều sách khác liên quan đều đã đề cập đến. Trong quá trình biên soạn chắc không tránh khỏi những thiếu sót. Chúng tôi xin cảm ơn sự đóng góp của các bạn đọc.*

*Chúng tôi xin cảm ơn sự đóng góp của GS. Lê Đình Lương, GS Nguyễn Đình Huyền, TS Hồ Huỳnh Thủy Dương, PGS Hoàng Thị Bích Ngọc và nhiều tác giả khác đã ghi trong phần "tài liệu tham khảo" đã cung cấp cho chúng tôi nhiều tài liệu bổ ích để cuốn sách hoàn chỉnh hơn.*

*Chúng tôi cũng chân thành cảm ơn Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật và Biên tập viên đã biên tập và cho xuất bản để cuốn sách được sớm đến bạn đọc xa gần trong cả nước.*

# MỞ ĐẦU

## CÔNG NGHỆ HƯỚNG TỚI TƯƠNG LAI

Thế kỷ XXI là thế kỷ của công nghệ cao, mười công nghệ mới sẽ dẫn chúng ta vào thế kỷ này, theo như VS.News, TS. Dương Huyền tổng hợp từ báo chí.

Loài người đang đặt chân vào thế kỷ XXI có lẽ tương lai còn nhiều điều kỳ diệu mà thậm chí đến các nhà tiên tri, các nhà tiên đoán tài tính nhất cũng không hình dung ra được. Thế kỷ XXI là kỷ nguyên của *công nghệ gen, kỹ thuật vật liệu siêu dẫn, bionics, siêu vi điện tử, công nghệ siêu nhỏ...* và còn biết bao nhiêu những tiến bộ khác của khoa học và công nghệ. Sự kết hợp của khoa học kỹ thuật với các ý tưởng của những cái đầu vĩ đại. Khả năng vô hạn của loài người và các nhu cầu phát triển đã đẩy cuộc cách mạng khoa học công nghệ lên đến đỉnh cao mới.

Mới hôm nay thôi nó còn là ý tưởng của một ai đó thì ngày mai nó đã có thể là một công nghệ được đưa vào cuộc sống. Mười công nghệ được coi là có triển vọng nhất trong thập niên sắp tới của thế kỷ XXI là:

1. Công nghệ gen,
2. Công nghệ nano hay còn gọi là công nghệ siêu nhỏ,
3. Sinh học điện tử hay còn gọi là Tin sinh học (bioinformatics),
4. Điện tử quang học,
5. Xe hơi hydro,
6. Kỹ thuật mô phỏng siêu thực,
7. Siêu dẫn nhiệt độ cao,
8. Công nghệ tái sinh thế giới động vật cổ đại,
9. Máy tính thông minh,
10. Những vật liệu mới.

Với nội dung của cuốn sách này, tác giả chỉ tập trung trình bày về các

khái niệm, những nguyên lý cơ bản của *gen và công nghệ gen* một trong mười hướng của công nghệ cao:

- Sinh học phân tử của gen và công nghệ gen
- Các khái niệm và nguyên lý cơ bản của công nghệ gen
- Công nghệ gen trong ngành y và dược học cũng như ngành nông nghiệp hiện đại.

## MỤC LỤC

Công nghệ gen	
Lời giới thiệu	3
Mở đầu	5
<b>PHẦN A – KHÁI NIỆM VỀ GEN VÀ CÔNG NGHỆ GEN</b>	<b>11</b>
<i>Chương I. KHÁI NIỆM VỀ GEN VÀ CÔNG NGHỆ GEN</i>	12
<i>Chương II. SỰ SAO CHÉP – SINH TỔNG HỢP ADN</i>	17
I. Sinh tổng hợp ADN ở các tế bào sinh vật nhân sơ	17
1. Nguyên lý của sự sao chép ADN	17
2. Các enzym tham gia trong các quá trình sao chép ADN	20
3. Các giai đoạn sao chép ADN	22
II. Sinh tổng hợp ADN ở các tế bào sinh vật nhân chuẩn	24
1. Giai đoạn G1	25
2. Giai đoạn S	25
3. Giai đoạn G2	28
4. Giai đoạn nguyên phân	28
III. Sự sửa chữa sai sót trong quá trình sao chép sinh tổng hợp ADN	28
1. Các tác nhân sinh, lý, hoá gây thương tổn ADN	29
2. Các hệ thống sửa chữa thương tổn và cơ chế sửa chữa	30
<i>Chương III. SỰ PHIÊN MÃ- SINH TỔNG HỢP ARN</i>	33
I. Sinh tổng hợp ARN ở sinh vật nhân sơ	34
1. Một số đặc điểm về enzym ARN polymeraza	34
2. Sự mở đầu, kéo dài và kết thúc sự sao các chuỗi polyribonucleotid	38

II. Sinh tổng hợp ARN ở sinh vật nhân chuẩn	40
1. Một số đặc điểm cần phân biệt	40
2. Các giai đoạn mở đầu, kéo dài và kết thúc sự phiên mã	42
3. Các chất ức chế sự tổng hợp ARN	43
4. Sự hoàn thiện ARN ribosom	44
5. Sự hoàn thiện ARN thông tin	45
<b>Chương IV. MẬT MÃ DI TRUYỀN, SỰ DỊCH MÃ – SINH TỔNG HỢP PROTEIN</b>	48
I. Mật mã di truyền	48
1. Các phân tử bảo quản và vận chuyển thông tin di truyền	48
2. Cách bảo quản và vận chuyển thông tin di truyền trong ADN và mARN, các bằng chứng về mã bộ ba	48
3. Giải mã di truyền	51
4. Các đặc điểm của mã di truyền	52
II. Sự dịch mã- sinh tổng hợp protein	55
1. Các chất tham gia tổng hợp protein	55
2. Vai trò của một số yếu tố quan trọng tham gia quá trình sinh tổng hợp protein	57
3. Các giai đoạn của quá trình sinh tổng hợp protein	64
<b>Chương V. ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG BIỂU HIỆN GEN</b>	68
I. Mô hình điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở tế bào nhân sơ	69
II. Mô hình điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở tế bào nhân chuẩn	72
III. Mô hình điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở cơ thể đa bào bậc cao	80
IV. Mô hình điều hoà hoạt động biểu hiện gen thông qua màng tế bào trong sự phân chia tế bào	86
<b>PHẦN B – CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH GEN VÀ CÔNG NGHỆ BIỂU HIỆN GEN</b>	<b>93</b>
<b>Chương VI. CÁC ENZYM CẮT, BIẾN ĐỔI VÀ NỐI ADN</b>	<b>94</b>



I. Các enzym hạn chế	95
II. Những enzym khác liên quan đến các thao tác trên ADN	98
<i>Chương VII. PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT AXIT NUCLEIC</i>	109
I. Sự chuẩn bị ADN của toàn bộ tế bào	110
II. Sự chuẩn bị ADN của plasmid	112
III. Sự chuẩn bị ADN của thực khuẩn thể	114
IV. Các phương pháp tách chiết axit nucleic cụ thể	116
<i>Chương VIII. PHƯƠNG PHÁP LAI PHÂN TỬ VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH DẤU PHÂN TỬ</i>	124
I. Phương pháp lai axit nucleic	124
II. Phương pháp đánh dấu axit nucleic	126
<i>Chương IX. CÁC LOẠI VẬT CHỦ THU NHẬN VÀ CÁC LOẠI VECTƠ CHỌN DÒNG</i>	129
I. Các loại vật chủ thu nhận	129
1. Vật chủ là <i>E.coli</i> và các vi khuẩn khác	129
2. Vật chủ là nấm men và nấm mốc	129
3. Vật chủ là thực vật bậc cao	130
4. Vật chủ là các tế bào động vật có vú	131
II. Các vectơ chọn dòng	131
<i>Chương X. CÁC LOẠI VECTƠ TRONG TẠO DÒNG</i>	141
I. Những vấn đề chung	141
II. Các loại vectơ	143
<i>Chương XI. SỰ TẠO DÒNG GEN VÀ PHÁT HIỆN DÒNG CẦN TÌM</i>	149
I. Các bước của tạo phương pháp dòng	149
II. Sự phát hiện dòng gen cần tìm	151
<i>Chương XII. PHƯƠNG PHÁP PCR DÙNG TRONG TẠO DÒNG INVITRO</i>	153
I. Phản ứng chuỗi polymeraza	153

II. Các chỉ tiêu ảnh hưởng đến phản ứng PCR	160
III. Các ứng dụng chủ yếu của phương pháp PCR	161
<i>Chương XIII. KỸ THUẬT BIẾN NẠP VÀ KỸ THUẬT LÂY NHIỄM</i>	163
I. Kỹ thuật biến nạp-đưa các ADN của plasmid vào tế bào vi khuẩn	164
II. Sự chọn lựa đối với các tế bào tái tổ hợp	165
III. Kỹ thuật lây nhiễm-đưa các ADN của phage vào các tế bào vi khuẩn	166
IV. Kỹ thuật biến nạp vào các tế bào không phải của vi khuẩn	168
<i>Chương XIV. CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ CỦA AXIT NUCLEIC</i>	171
I. Phương pháp Maxam và Gilbert	171
II. Phương pháp Sanger	173
<i>Chương XV. CÔNG NGHỆ BIỂU HIỆN GEN</i>	176
I. Những vấn đề chung của công nghệ	176
II. Công nghệ biểu hiện gen trong E.coli	178
III. Công nghệ biểu hiện gen trong nấm men	181
<b>PHẦN C – ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ GEN</b>	<b>183</b>
<i>Chương XVI. KHÁI QUÁT VỀ ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ GEN</i>	184
I. Khái quát về ứng dụng của công nghệ gen	184
II. Điều trị gen	185
III. Chẩn đoán gen	195

**PHẦN A**  
**KHÁI NIỆM VỀ GEN VÀ**  
**CÔNG NGHỆ GEN**

## CHƯƠNG 1

# KHÁI NIỆM VỀ GEN VÀ CÔNG NGHỆ GEN

*Cơ sở sinh học phân tử của gen chính là acid nucleic (axit nucleic).* Nó gồm có acid deoxyribonucleic (ADN) và acid ribonucleic (ARN). Acid nucleic đóng vai trò quan trọng trong việc bảo tồn nòi giống và truyền thông tin di truyền cho thế hệ sau. Trong tế bào, acid nucleic có thể kết hợp với protein thành nucleoprotein. Trước kia người ta cho rằng, acid nucleic chỉ có trong nhân tế bào nhưng bây giờ chúng phổ biến ở cả ngoài nhân.

Cả ADN và ARN đều là những phân tử polyme dài gồm nhiều monome nối với nhau. Trong ADN, monome đó có tên là *deoxyribonucleotid*, còn ở ARN, monome đó có tên là *ribonucleotid*. Mỗi nucleotid có một bazơ nitơ (dẫn xuất purin hay pyrimidin) một đường pentoza và một nhóm photphat.

Bạn đọc có thể tìm thấy công thức của các nucleotid và cấu trúc ADN, ARN ở bất kỳ một cuốn sách hoá sinh học hoặc sách di truyền học cũng như các sách sinh học phân tử nào đó nên ở đây chúng tôi thiết nghĩ không cần phải nhắc lại. Đúng về phương diện phân tử mà xét thì các acid nucleic nói trên đáp ứng đầy đủ các tiêu chuẩn của vật chất di truyền.

1. Vì nó chứa đựng thông tin ở dạng bền vững, có thể sao chép một cách chính xác để di truyền cho các thế hệ sau.

2. Chúng có thể tạo thành những phân tử khác một cách có cơ sở để cần cho cấu trúc và hoạt động của tế bào.

3. Đồng thời các acid nucleic cũng có khả năng biến đổi- mà di truyền và biến đổi là hai mặt của di truyền học hiện đại.

Ngày nay, người ta chứng minh được rằng ADN là vật chất di truyền của hầu hết sinh vật, còn ARN và vật chất di truyền của một số virus (virut).

Các vật chất di truyền của tế bào nằm trong các nhiễm sắc thể, có thể

phân biệt được ba loại nhiễm sắc thể dưới đây:

1. *Với các phage*, nhiễm sắc thể của chúng là những ADN trần, chuỗi kép (sợi kép), mạch vòng không có protein (đó là phage).

2. *Với vi khuẩn*, nhiễm sắc thể cũng là những phân tử ADN trần chuỗi kép, mạch vòng siêu xoắn và tập trung ở một vùng gọi là vùng nhân không có màng bao bọc. Bên cạnh đó vi khuẩn còn có một loại ADN khác dạng vòng kép nhỏ, đó là các plasmid – mà chúng ta sẽ được đọc nhiều ở phần nói về các vectơ plasmid ở công nghệ gen.

3. *Với các sinh vật nhân chuẩn* (eukaryote) như nấm men, cơ thể đa bào thì nhiễm sắc thể là những phân tử ADN sợi kép nằm trong nhân có màng bao bọc hẳn hoi. Ngoài ADN trong nhân, những loài sinh vật nhân chuẩn khác nhau có kiểu nhân khác nhau cả về số lượng và hình dáng và tập hợp thành bộ nhiễm sắc thể. Ở động vật, ngoài nhiễm sắc thể thường còn có nhiễm sắc thể giới tính đực và giới tính cái (Y và X).

Tất cả nhiễm sắc thể đó bó chặt giữa ADN và năm *protein histon* các loại cũng như gần *100 protein không histon* tạo ra thể nhân (nucleosom). Lượng histon gần bằng lượng ADN trong nhiễm sắc thể. Protein histon hiện nay giữ vai trò quan trọng trong sự điều hoà hoạt động gen và biệt hoá tế bào. Còn protein không phải histon thì gồm các enzym cần cho quá trình sao chép, phiên mã, dịch mã, các polymeraza ADN, ARN nên luôn luôn biến động trong suốt chu trình của tế bào và rất khác nhau ở các tế bào đã được biệt hoá. Các nhiễm sắc thể thường ở các sinh vật cùng loài thì giống nhau. Ở người, nam giới có 44 nhiễm sắc thể thường và hai nhiễm sắc thể giới tính là X, Y và ở nữ giới cũng có 44 nhiễm sắc thể thường và hai nhiễm sắc thể giới tính là X, X.

Trong tế bào của sinh vật nhân chuẩn, ngoài ADN nhiễm sắc thể nhân người ta còn thấy có một số ADN ở ty thể và lạp thể ở dạng ADN trần, mạch kép và đóng vòng nằm ở ngoài nhân. Hiện nay người ta cũng chú ý khai thác các ADN này nhất là của ty thể trong phân biệt chủng loại giun sán, trong phân biệt hải cốt, mồ mả và cả trong chẩn đoán ung thư.

Chúng ta biết rằng, trong nucleosom và ADN trong nhiễm sắc thể dài hơn nhiều so với nhiễm sắc thể nó đã được thu gọn ít nhất gần 100 lần và gắn với histon tạo nhiễm sắc thể có kích thước 100 nm và 300 nm ở pha nghỉ hay lớn hơn nữa ở pha giữa.

Ở pha nghỉ, khi nhuộm người ta thấy chất nhiễm sắc chia thành hai

loại rõ rệt: một loại được nhuộm màu rất nhạt gọi là *chất nguyên nhiễm sắc*, còn loại kia được nhuộm màu rất đậm gọi là *chất dị nhiễm sắc*. Chất nguyên nhiễm sắc là chất chứa ADN ở *trạng thái hoạt động – phiên mã*. Chất dị nhiễm sắc là chất chứa ADN ở *trạng thái không phiên mã* được và nó sẽ sao chép muộn trong chu kỳ sinh sản của tế bào.

Cần phân biệt ở đây nhiễm sắc thể vi khuẩn chỉ mang một trình tự ADN duy nhất, trong khi đó nhiễm sắc thể ở cơ thể đa bào (nhân chuẩn) lại có nhiều đoạn lặp lại. Các sinh vật khác nhau có số ADN lặp lại khác nhau. Có đoạn từ vài cặp đến vài trăm cặp bazơ lặp lại hàng triệu lần trong gen và thường nằm gần tâm động hoặc ở hai đầu của nhiễm sắc thể, chúng được sao chép muộn và không được phiên mã. Còn các đoạn lặp lại hàng chục đến vài ngàn lần thì được phiên mã và cũng thường là ARN ribosom, ARN vận chuyển và histon.

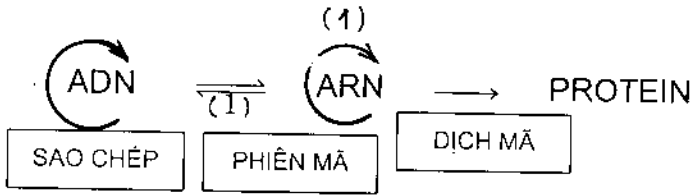
Một điểm nữa là ở cơ thể sinh vật nhân chuẩn, đa bào có các đoạn không mã hoá acid amin được gọi là *intron* và đoạn được mã hoá gọi là *exon*. Cả hai đoạn đều phiên mã ra phân tử tiền chất của mARN, nhưng sau đó tiền chất mARN của intron bị cắt đi còn lại tiền chất mARN của exon được nối lại với nhau thành phân tử mARN để đi vào ribosom dịch mã thành protein.

Hiện nay, người ta xác định được *intron có một vai trò trong quá trình biệt hoá* của sinh vật đa bào, chứ không phải những đoạn ADN dư thừa như đã nghĩ sai về nó như những năm trước đây.

Trên nhiễm sắc thể của các sinh vật nhân sơ (prokaryote) cũng như sinh vật nhân chuẩn người ta còn thấy một hiện tượng như sau: ngoài các gen chiếm vị trí cố định trên nhiễm sắc thể thì còn có những gen lưu động từ vị trí này đến vị trí khác của bộ gen, người ta gọi đó là những "*yếu tố di truyền vận động*" hay còn gọi là "*gen nhảy*". Đó là những đoạn ADN có khả năng xen vào một số vị trí trong bộ gen và cũng có thể tách rời khỏi bộ gen. Khi chúng xen vào bộ gen thì làm biến đổi di truyền còn khi tách khỏi bộ gen thì những biến đổi không còn nữa.

Ngày nay, người ta xác nhận những gen nhảy đó tồn tại một cách phổ biến ở tất cả mọi sinh vật làm thay đổi cấu trúc của hệ gen, do đó ảnh hưởng đến hoạt động gen.

Dòng thông tin di truyền chảy theo một chiều như sơ đồ hình 1.1



Hình 1.1. Sơ đồ lý thuyết trung tâm của Crick về vận chuyển thông tin di truyền. (1) Những mũi tên được Crick bổ sung thêm vào năm 1970.

Quá trình phiên mã (transcription) và dịch mã (translation) và sao chép ADN (replication) tuân theo quy luật này. Ở một số virus loại ARN thì có quá trình phiên mã ngược (revertranscription) tạo ra bản sao ADN từ ARN hệ gen của chúng.

Gen là đơn vị cơ sở của thông tin di truyền, mà cụ thể là một đoạn ADN của thông tin di truyền được phiên mã sang phân tử mRNA, rồi sau đó dịch mã thành một protein nhất định. Các gen nằm trên các nhiễm sắc thể và gen nào định vị ở đâu thì đó gọi là locut của gen đó. Ở các sinh vật lưỡng bội, các nhiễm sắc thể sắp xếp thành các cặp tương đồng. Trên nhiễm sắc thể tương đồng, tại các vị trí tương ứng tồn tại các dạng khác nhau của cùng một gen gọi là alen.

Nói đến cấu trúc của một gen, tức là nói đến đơn vị phiên mã tạo ra mRNA nằm giữa điểm khởi đầu và điểm kết thúc phiên mã. Bên trong đơn vị phiên mã là một đoạn trình tự mã hoá còn hai đầu của đơn vị phiên mã còn có vùng điều hoà ngược hoặc điều hoà xuôi chứa yếu tố tăng cường (enhance) hoặc điểm chỉ huy cùng với promoter phát động và điểm bám của enzym polymeraza ARN.

Cấu trúc gen của sinh vật nhân sơ như vi khuẩn, các gen thường sắp xếp thành nhóm trong operon. Trong các operon có ba loại nhóm gen: các gen cấu trúc (S), gen phát động (P) và gen chỉ huy (O) đi liền nhau.

Nằm ngoài operon còn có gen ức chế mã hoá protein ức chế để tác động lên gen chỉ huy. Kiểm soát âm tính đối với operon, qua ngăn chặn không cho enzym polymereza ARN bám vào.

Trong các gen cấu trúc của vi khuẩn thường bố trí theo nhóm nên sản phẩm phiên mã mRNA thường mang thông tin dùng cho nhiều protein, đó gọi là đa cistron. Các phân tử được tổng hợp cùng một lúc phù hợp với nhu

cấu của tế bào trong mỗi thời điểm xác định và đáp ứng được nhanh chóng với điều kiện môi trường luôn biến đổi. Operon *lac* là ví dụ điển hình về cách bố trí cấu trúc hoạt động của gen vi khuẩn (sẽ nói ở phần điều hoà hoạt động gen).

Còn cấu trúc gen của sinh vật nhân chuẩn thì phức tạp hơn nhiều và nhân chuẩn có màng nhân bao bọc, nên ADN nằm cách biệt khỏi dịch mã ở bào tương. Việc phát hiện ở nhân chuẩn có các đoạn intron và exon làm việc hoạt động gen của chúng lại càng phức tạp. Việc tạo ra tiền mRNA phải qua xử lý gọi là *quá trình xử lý ARN* (ARN processing) mới tạo ra được sản phẩm mRNA có hoạt tính chức năng để chui ra khỏi nhân tham gia vào quá trình dịch mã.

Công nghệ gen <sup>(1)</sup> liên quan chặt chẽ đến quá trình biểu hiện gen tức là quá trình phiên mã và dịch mã của gen. Phiên mã gồm một số giai đoạn, đó là bắt đầu enzym polymeraza ARN bám vào ADN, sau đó bước đầu tổng hợp kéo dài và kết thúc chuỗi, cuối cùng giải phóng ARN ra. Khi ARN giải phóng ra thì được sử dụng ngay vào quá trình dịch mã để tạo ra polypeptid. ARN có ba loại: ARN thông tin (mARN), loại ARN vận chuyển (tARN) có gắn acid amin và loại ARN ribosom (rARN). Ribosom là nơi diễn ra quá trình tổng hợp protein. Nó là chỗ để cho codon của mARN gặp anticodon của tARN acid amin và như vậy acid amin tương ứng được tham gia vào chuỗi polypeptid đang được tổng hợp: Quá trình dịch mã cũng trải qua một số giai đoạn như giai đoạn tARN được hoạt hoá gắn acid amin, giai đoạn mở đầu, kéo dài và kết thúc tổng hợp protein.

Công nghệ gen còn liên quan đến quá trình tách gen, phóng đại gen, tái tổ hợp gen, dòng hoá gen, phân tích gen và gá lắp gen mà các nguyên lý sẽ lần lượt được làm sáng tỏ ở tất cả các chương sau.

---

(1) Hiện nay, trên toàn thế giới có một số thuật ngữ khác (tổng số là 12 thuật ngữ khác nhau) cũng được dùng để chỉ khái niệm này.

Tham khảo tên các thuật ngữ này ở cuốn "Nguyên lý kỹ thuật di truyền do Nxb. KH&KT xuất bản năm 2001, tr 5. BTV.



## CHƯƠNG II

# SỰ SAO CHÉP - SINH TỔNG HỢP ADN

Phân tổng hợp gen tức là tổng hợp acid nucleic thì cuốn sách hoá sinh nào cũng giới thiệu, ở đây chỉ trình bày một số vấn đề khác biệt về tổng hợp gen ở các tế bào sinh vật nhân sơ và tế bào sinh vật nhân chuẩn.

1. Tổng hợp gen ở các tế bào của sinh vật nhân sơ (prokaryote)
2. Tổng hợp gen ở các tế bào của sinh vật nhân chuẩn (eukaryote)
3. Sự sửa chữa sai sót trong quá trình sao chép tổng hợp gen, sinh tổng hợp ADN

## I. SINH TỔNG HỢP ADN Ở CÁC TẾ BÀO CỦA SINH VẬT NHÂN SƠ

### 1. Nguyên lý của sự sao chép ADN

Gen là thông tin di truyền của mọi sinh vật mà cơ sở phân tử của nó là ADN. Thông tin này được bảo tồn trong quá trình phân chia tế bào, do vậy sự phân chia tế bào được tiến hành sau quá trình tổng hợp ADN.

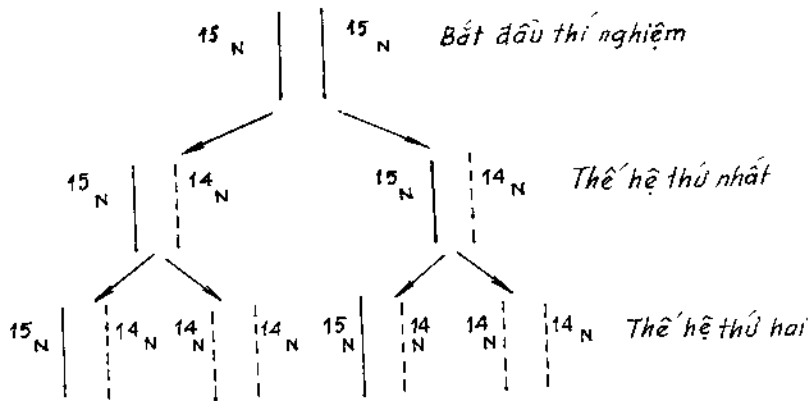
*Sự tổng hợp ADN hay còn gọi là sự sao chép* (replication) cần cho sự bảo tồn thông tin di truyền từ ADN sang ADN.

Dựa trên mô hình cấu trúc của ADN, Watson và Crick cho rằng mỗi sợi của ADN xoắn kép được dùng làm khuôn mẫu để tổng hợp một sợi bổ sung theo quy luật đôi base. Như vậy từ một phân tử ADN sẽ tạo ra hai phân tử ADN giống hệt nó. Đó là sự sao chép ADN theo kiểu bán bảo tồn (semi-conservation).

Thí nghiệm cổ điển của Meselson và Stahl (1957-1958) đã chứng minh giả thiết trên *E.coli* được nuôi cấy qua nhiều thế hệ, trong môi trường chỉ chứa  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $^{15}\text{N}$  là đồng vị nặng của nitrogen) làm nguồn nitrogen duy

nhất. Như vậy những ADN được tổng hợp trong các thế hệ thí nghiệm chứa  $^{15}\text{N}$ . Sau đó thay đổi môi trường nuôi cấy, dùng ( $^{14}\text{N}$ ) là  $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ , vi khuẩn được phát triển trên môi trường này qua vài thế hệ. Như vậy những phân tử ADN được tổng hợp trong các thế hệ có thể chứa  $^{14}\text{N}$ . ADN được chiết xuất và tinh chế. Tỷ trọng ADN được xác định bằng siêu ly tâm và người ta đã phân biệt được ADN nặng chứa  $^{15}\text{N}$ , ADN thường chứa  $^{14}\text{N}$ , ADN trung gian chứa  $^{14}\text{N}$  và  $^{15}\text{N}$ .

Các thí nghiệm ở trên cho thấy đầu tiên ADN đều thuộc loại ADN nặng  $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ ; ở thế hệ thứ nhất (nuôi trong  $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ ) ADN thuộc loại trung gian  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ; ở thế hệ thứ hai, một nửa ADN thuộc loại trung gian  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  và một nửa ADN thuộc loại bình thường  $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$  (hình 2.1).



Hình 2.1. Thí nghiệm của Meselson và Stahl (1957-1958).

Thí nghiệm đã chứng tỏ rằng, ADN được dùng làm khuôn mẫu cho sự tổng hợp ADN mới và người ta không thấy sự khác nhau giữa ADN tổng hợp được và ADN tự nhiên làm mẫu vì các tính chất lý hoá: độ lắng trầm, độ nhớt, trọng lượng phân tử, thành phần các base. Ở trong các mô cũng vậy, sự tổng hợp ADN mới xảy ra trên cơ sở những phân tử ADN có sẵn với sự xúc tác của ADN polymerase. Trước tiên hai sợi của phân tử ADN bị tách ra từ một đầu mút, rồi mỗi đoạn của những sợi đã tách ra được dùng làm khuôn mẫu cho sự tổng hợp một sợi nucleotid bổ sung với đoạn ADN tương ứng: nguyên liệu được sử dụng là các nucleotid triphotphat, enzym xúc tác là ADN polymerase, cơ chế tổng hợp là nguyên lý bổ sung đôi base (A-T, G-C). Như vậy từ một phân tử ADN cũ (ADN mẹ) xuất hiện hai phân tử ADN

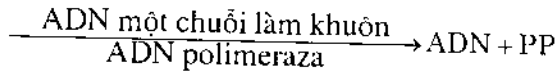
mới (ADN con). Trong mỗi phân tử ADN con, một sợi là của ADN mẹ và một sợi do tổng hợp (hình 2.2).

d ATP

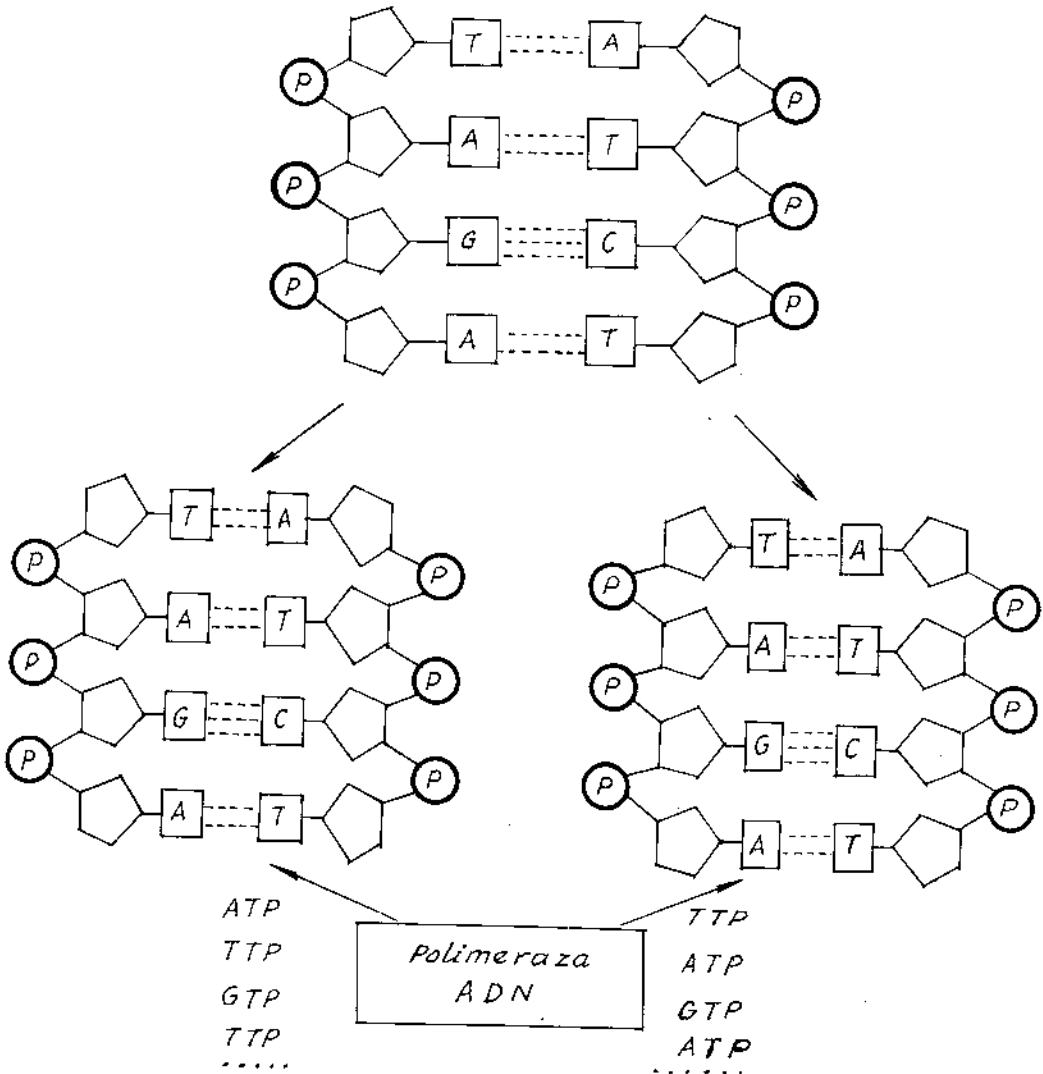
d GTP

d CTP

d TTP



Trình bày sơ đồ sao chép ADN theo cơ chế bán bảo tồn.



Hình 2.2. Sơ đồ trình bày cơ chế sao chép - sinh tổng hợp ADN theo Kornberg.

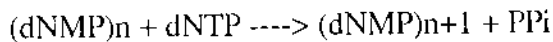
Do nguyên lý bổ sung đôi base, *phân tử ADN con* có cấu trúc hoàn toàn giống *ADN mẹ*. Việc tái sinh chính xác cấu trúc của ADN trong quá trình tổng hợp có ý nghĩa sinh học rất lớn trong việc giữ gìn tính đặc hiệu và tính chất di truyền của mỗi loài động vật từ tế bào này sang tế bào khác, từ thế hệ này sang thế hệ khác.

## 2. Các enzym tham gia trong quá trình sao chép ADN

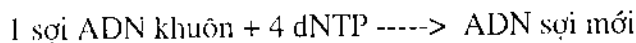
### 2.1. ADN polymeraza

Ở *E.coli* có ba loại ADN polymeraza tham gia vào tổng hợp ADN theo chiều 5'-3' gọi là *Pol I*, *Pol II* và *Pol III* và được mã hóa trong các gen tương ứng là *Pol A*, *PolB*, *Pol C*. Cả ba enzym đều có hoạt tính exonucleaza 3' - 5' nên chúng có thể cắt bỏ những chuỗi polynucleotid mới được tổng hợp và hoạt động như một cái máy sửa sai để giúp cho sao chép được chính xác. Hiện tượng đó gọi là hiện tượng đọc sửa (proofreading) .

*Pol I* do Kernberg chiết xuất từ *E.coli* xúc tác tổng hợp ADN từ các deoxyribonucleotid triphotphat với sự có mặt của ADN làm mẫu, đủ cả bốn deoxyribonucleotid triphotphat và ion  $Mg^{++}$



cụ thể là:



theo hướng 5'-3' được kéo dài

*Pol I* có tác dụng cả hai chiều, chiều 5'-3' và chiều 3'-5'. Chiều 3'-5' có tác dụng đọc và sửa chữa những nucleotid sai, chiều 5'-3' còn có tác dụng tách primer.

*Pol II* chưa rõ vai trò nhưng hình như tham gia trong sửa chữa.

*Pol III* có vai trò chủ yếu trong kéo dài chuỗi ADN mới theo chiều 5'-3' ở *E.coli*, cần có ADN khuôn và mẫu và không có tác dụng khởi đầu cho sự tổng hợp.

### 2.2. ADN helicaza

Cấu trúc của ADN helicaza gồm ba protein có chức năng mở xoắn kép ADN là: *DnaA*, *DnaB*, *DnaC* với các nhiệm vụ khác nhau:

***DnaA***: nhận biết vị trí đặc biệt ở điểm mở đầu.

**DnaB:** mở xoắn kép

**DnaC:** cần thiết để Dna B gắn vào điểm mở đầu.

Xoắn kép mất đi khi ADN helicaza di chuyển theo chiều dài của một sợi đơn ADN

### 2.3. Toposomeraza

Chức năng của toposomeraza là ngăn không cho ADN xoắn kép trở lại. Có hai loại topoisomeraza:

**Topoisomeraza loại I** tháo dạng siêu xoắn. Chúng gắn vào phân tử ADN và cắt một trong hai mạch để tháo xoắn. Sau tháo xoắn, enzym này lại nối lại chỗ đứt.

**Topoisomeraza loại II** có khả năng tháo các nút nảy sinh do các biến đổi cấu trúc của xoắn kép và cắt cả hai mạch. Nó chính là ADN lygaza trong *E.coli* giúp cho helicaza tháo vòng dễ dàng với tốc độ 4500 vòng/phút.

### 2.4. ARN primaza

ARN primaza có chức năng tổng hợp những sợi ARN mới còn lại là DnaG protein là enzym xúc tác tổng hợp những sợi ARN mới ngắn khoảng từ 10-60 nucleotid trên chuỗi chậm.

Primaza phối hợp với sáu protein khác tạo thành cấu trúc khác gọi là primosom và có chức năng tổng hợp ARN mới nhờ năng lượng của sự thủy phân ATP. Thành phần các protein trong primosom có DnaT protein, protein n, protein n', protein n'', DnaC protein và Dna B protein (helicaza tháo xoắn ADN). DnaG protein là primaza nó tổng hợp ARN mới.

Ở đây cần nhấn mạnh một điểm là không có một enzym Pol nào trong số ba enzym Pol nói trên có thể khởi đầu cho việc tổng hợp các sợi ADN mới nên đòi hỏi phải có một đoạn mới ngắn để các deoxyribonucleotid đính vào và trên cơ sở đó các enzym Pol mới hoạt động được. Đoạn mới ngắn đó ở *E.coli* chính là một đoạn ARN được sinh ra bởi enzym primaza. Trình tự các bazơ trong đoạn mới được định ra bởi các nucleotid của sợi khuôn ADN.

### 2.5. ADN ligaza

ADN ligaza là enzym nối các mẫu ADN kép, xúc tác việc nối các mẫu ADN kép, tạo thành liên kết phosphodieste giữa đầu tận 3'OH của mẫu ADN

kép này với 5'P của mẫu ADN kép khác. ADN ligaza không nối được hai sợi đơn.

ADN ligaza có thể tham gia sửa chữa nhánh ADN bị đứt, nối kín các ADN kép vòng.

## 2.6. Protein đính với sợi đơn ADN

Protein đính với sợi đơn ADN (SSB = Single strand ADN binding protein ) này có tác dụng:

- Protein đính với sợi đơn để ổn định cấu trúc sợi đơn, không bị gấp khúc
- Protein này đính với sợi đơn, nhưng không phủ lên các bazơ để các bazơ sẵn sàng làm nhiệm vụ khuôn.

## 3. Các giai đoạn sao chép ADN

Có ba giai đoạn là: giai đoạn mở đầu, giai đoạn kéo dài và giai đoạn kết thúc sao chép ADN

### 3.1. Giai đoạn mở đầu

Đó là giai đoạn nhận diện điểm mở đầu. Các protein tham gia vào giai đoạn này gọi là những protein mở đầu và giúp cho việc gắn enzym primaza vào khuôn ADN.

- Các protein mở đầu gồm:

\* *Đoạn ori C* chứa 245 cặp bazơ trong đó có đoạn chìa khoá gắn ADN tạo phức hợp mở đầu.

\* *Protein HU* giống histon tạo phức hợp mở.

\* *Dna B* và *Dna C* tạo phức hợp mới.

- Như vậy hàng nghìn cặp bazơ được tháo xoắn dưới tác dụng của các protein nối trên thuộc helicaza và gyraza. Đồng thời tháo xoắn có protein đính sợi đơn SSB liên kết trên đó để ổn định cấu trúc không bị xoắn trở lại và có sự tham gia của năng lượng tháo xoắn qua thủy phân ATP.

- ARN primaza (ADN G protein) gắn vào phức hợp trên tạo thành primosom và bắt đầu tổng hợp ARN mỗi khoảng từ 10 - 60 mononucleotid.

Các mẫu ARN mỗi này cũng rất cần xúc tác sự tổng hợp các đoạn Okazaki.

### 3.2. Giai đoạn kéo dài

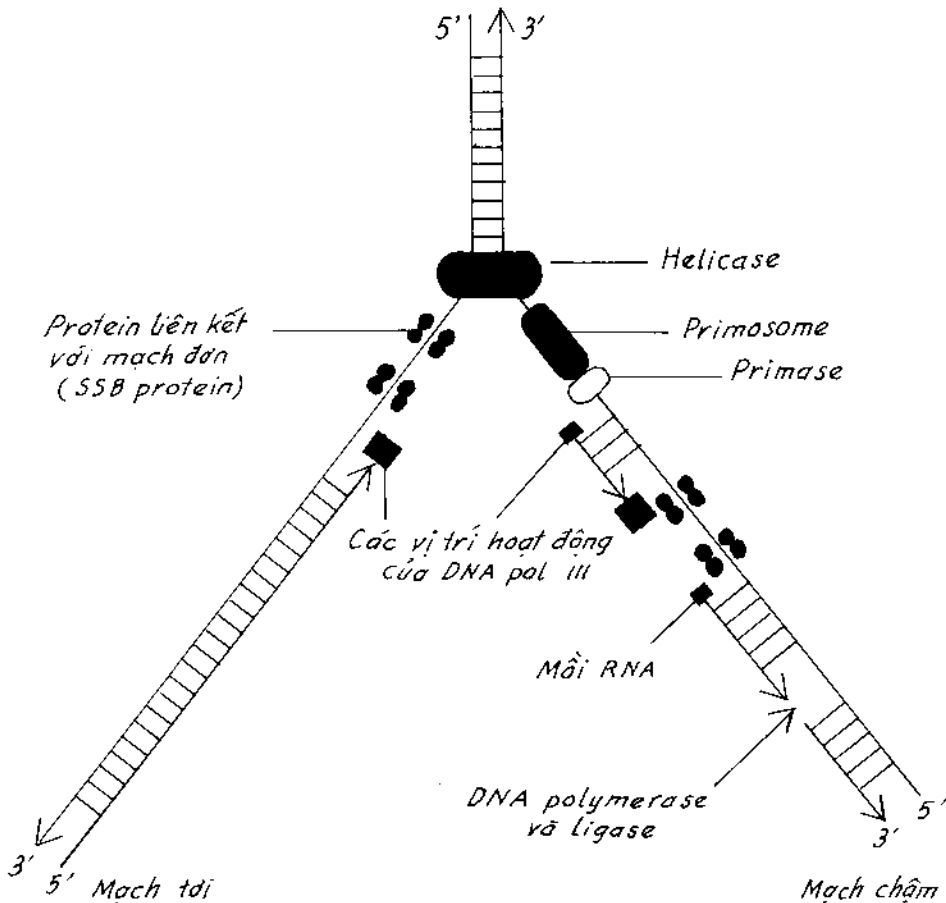
- Enzym Pol III tổng hợp đoạn Okazaki nối tiếp ARN mỗi, đoạn này kéo dài đến đoạn ARN mỗi tiếp theo.

- ARN mới đầu được tách ra do tác dụng exonucleaza của Pol I. Cũng chính Pol I xúc tác kéo dài ADN thế chỗ cho ARN mỗi.

- Enzym ADN ligaza nối các đoạn Okazaki lại với nhau bằng liên kết phosphodieste.

### 3.3. Giai đoạn kết thúc

- Giai đoạn này còn nhiều vấn đề chưa được sáng tỏ, đó là:



Hình 2.3. Sơ đồ sao chép sinh tổng hợp ADN ở *E. coli*. Kornberg, 1988.

- \* Sự sao chép kết thúc ra sao?
- \* Tại sao sự sao chép không tiếp tục nữa?
- \* Sợi ADN được tổng hợp tách ra như thế nào?

- Chỉ biết khi sao chép kết thúc, các ARN mới bị enzym RNA phân hủy. Các chỗ hỏng do enzym này gây ra trên mạch mới sẽ lấp lại nhờ hoạt động của enzym ADN polymeraza I. Còn các chỗ gián đoạn trên các mạch mới thì được enzym ligaza nối lại. Toàn bộ các giai đoạn nói trên là đối với tổng hợp chuỗi chậm, còn chuỗi nhanh tức là tốc độ tổng hợp nhanh hơn thì có lẽ nó được tổng hợp một cách liên tục dưới sự xúc tác của Pol III (hình 2.3).

**Bảng 2.1. Tóm tắt các enzym và protein tham gia trong các giai đoạn sao chép - sinh tổng hợp ADN**

Giai đoạn mở đầu	Giai đoạn kéo dài	Giai đoạn kết thúc
ADN helicaza (Dna A, B, C) ADN gyraza (topoisomeraza) ARN primaza (ADN G) Protein đính sợi đơn (SSB) - Các enzym và protein này làm nhiệm vụ cởi xoắn kép, ổn định cấu trúc sợi đơn tách ra và gắn được ARN primaza vào sợi khuôn ADN để tổng hợp đoạn ngắn ARN mới.	- Pol III tổng hợp đoạn Okazaki nối tiếp ARN mới.  - Pol I với tác dụng exonucleaza tách ARN mới và xúc tác tổng hợp ADN thế vào chỗ ARN mới bị tách ra.	Chưa biết rõ chi tiết: - Sao chép kết thúc - Tại sao không tiếp tục sao chép nữa - ADN được tách ra như thế nào? - ARNaza phân hủy ARN mới - Pol I có tác dụng lấp đầy các chỗ hỏng do ARNaza gây ra. - ADN ligaza nối các đoạn Osaki trên mạch mới tổng hợp

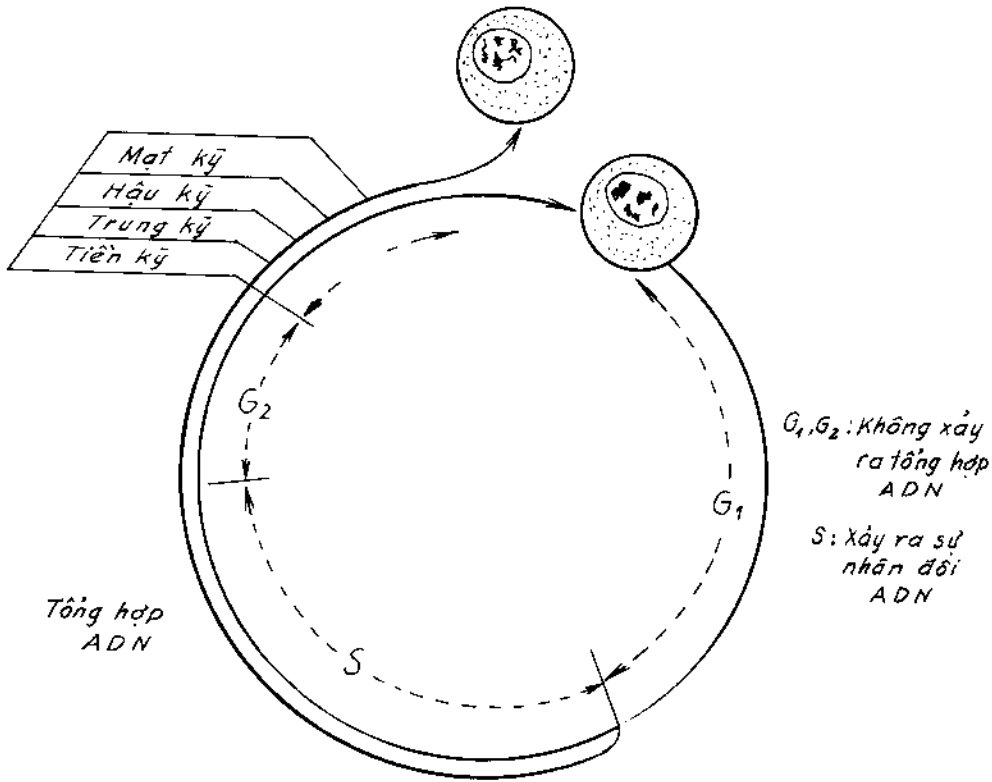
## II. SINH TỔNG HỢP ADN Ở CÁC TẾ BÀO CỦA SINH VẬT NHÂN CHUẨN

Trong các sinh vật nhân chuẩn (eukaryote), sự sinh sản của tế bào là cả một quá trình sinh trưởng, phân chia theo một chu kỳ tế bào. Ở các tế bào soma (tế bào thân) chu kỳ tế bào gồm bốn giai đoạn (hình 2.4).

G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M ba giai đoạn đầu là giai đoạn nghỉ hay còn gọi là gian kỳ. Tiếp theo G<sub>2</sub> là giai đoạn M (mitosis) tế bào phân chia nguyên phân cho hai tế bào con. Sau đó các tế bào con lại bắt đầu sinh sản theo một chu kỳ tế bào



mới. Về thời gian đối với mỗi sinh vật khác nhau thì các giai đoạn và chu kỳ tế bào có khác nhau. Chu kỳ tế bào ở sinh vật nhân chuẩn điển hình thay đổi trong phạm vi: giai đoạn  $G_1$  từ 6 - 20 giờ, giai đoạn S từ 6 - 10 giờ, giai đoạn  $G_2$  khoảng 4 giờ và giai đoạn M khoảng 1 giờ.



Hình 2.4. Sơ đồ vòng sinh tổng hợp ADN trong sự phân chia tế bào.

## 1. Giai đoạn $G_1$

Các nhiệm sắc thể ít xoắn vận hơn diễn ra hoạt động sao chép. Hoạt động này giúp cho việc tổng hợp hàng loạt các enzym và protein khác khởi đầu cho việc tổng hợp ADN để cần thiết cho việc nhân đôi nhiễm sắc thể.

## 2. Giai đoạn S

Giai đoạn S là giai đoạn tổng hợp ADN

- Sự sao chép - sinh tổng hợp ADN ở sinh vật nhân chuẩn cũng diễn ra như ở sinh vật nhân sơ (prokaryote) là theo kiểu nửa gián đoạn (bán bảo tồn), tạo thành từng đoạn Okazaki ngắn khoảng 100 nucleotid. Sau đó chúng nối lại với nhau thành chuỗi dài.

## 2.1. Các enzym và protein tham gia sao chép ADN ở giai đoạn S

### a. Các enzym tham gia sao chép ADN

Các enzym ADN polymerase tham gia trong giai đoạn này gồm các loại ADN polymerase  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . Chúng khác nhau nhiều về các đặc tính lý, hoá, khả năng sao chép trên những khuôn khác nhau và số lượng thay đổi tùy theo từng loại sinh vật (bảng 2.2).

**Bảng 2.2. Các enzym ADN polymeraza**

Các ADN polymeraza	Chức năng
ADN polymeraza $\alpha$	Tổng hợp ARN mới (giống enzym primaza ở sinh vật nhân sơ)
ADN polymeraza $\beta$	Tổng hợp ADN, sửa chữa sai và hoàn chỉnh mạch mới sau khi các mồi ARN tách ra (giống ADN polymerase I ở sinh vật nhân sơ)
ADN polymeraza $\delta$	Tổng hợp đoạn Okazaki nối tiếp ARN mới (giống ADN polymerase III ở sinh vật nhân sơ)
ADN polymeraza $\gamma$	Sao chép hệ gen ở ty thể

Người ta có quan niệm chung cho rằng, polymeraza  $\alpha$  được sử dụng để tổng hợp ARN mới; polymeraza  $\beta$  là enzym sửa chữa sai sót trong quá trình sao chép, polymeraza  $\delta$  tổng hợp đoạn *Okazaki*; còn polymeraza  $\gamma$  thì sử dụng sao chép hệ gen ở ty thể. Ở sinh vật nhân chuẩn bậc thấp như nấm men thì các ADN polymeraza ở trong nhân giống như enzym này ở trong vi khuẩn và có đặc tính đọc sửa (proof reading)

### b. Các protein tham gia sao chép ADN

Trong hệ thống sao chép ADN ở sinh vật nhân chuẩn còn có sự tham gia của nhiều protein khác nhau bên cạnh các polymeraza kể trên đó là:

- Protein kháng nguyên nhân tế bào đang phân chia (PCNA-proliferating cell nuclear antigen) có chức năng hoạt hoá polymeraza  $\delta$ .

- Các nhân tố sao chép A (replication factor A-RFA) và C (RFC) có chức năng cần cho hoạt động của polymeraza  $\alpha$  và  $\delta$ .

## 2.2. Các giai đoạn sao chép ADN

### a. Giai đoạn đầu

ADN được tháo xoắn nhờ topoisomeraza và nhân tố sao chép RFA.

### b. Giai đoạn hai

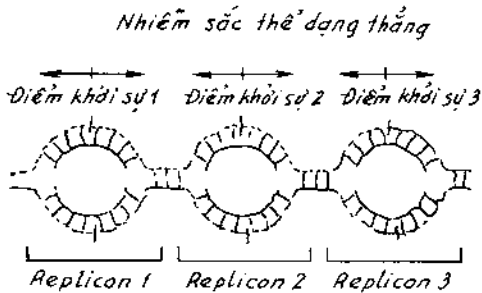
ARN mỗi (độ 10 nucleotid) được tổng hợp nhờ polymeraza  $\alpha$  và RFA. Sau đó nối dài thêm 20 nucleotid nhờ RFC.

### c. Giai đoạn ba

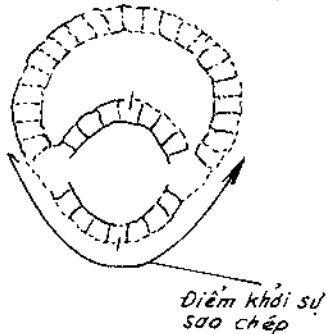
PCNA- ATP chặn polymeraza  $\alpha$  lại và thúc đẩy polymeraza  $\delta$  gắn vào tổng hợp đoạn **Okazaki**. Polymeraza  $\alpha$  được giải phóng sang mạch đối diện tổng hợp liên tục mạch mới.

## 2.3. Các replicon

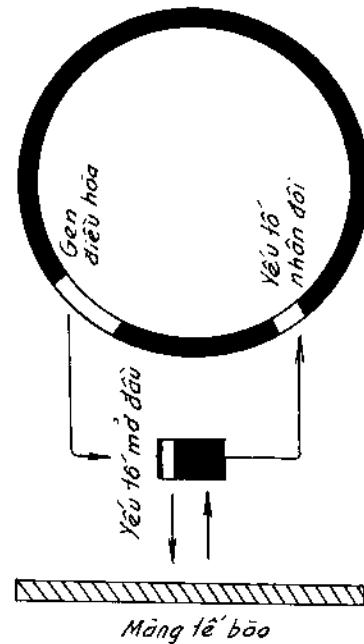
Ở nhiễm sắc thể của tế bào sinh vật nhân chuẩn, quá trình sao chép



### Nhiễm sắc thể dạng vòng



Hình 2.5a. Sự sao chép ADN ở sinh vật nhân chuẩn và sinh vật nhân sơ



Hình 2.5b. Replicon của vi khuẩn

ADN xảy ra trên nhiều đơn vị sao chép gọi là replicon. (hình 2.5a). Mỗi replicon có một điểm khởi đầu và hai điểm kết thúc và chứa khoảng 100-200kb ở người. Đối với sinh vật nhân chuẩn nhiễm sắc thể chứa nhiều đơn vị sao chép như vậy là cần thiết để kịp thời nhân đôi một số lượng khổng lồ ADN trước lúc phân chia trong khi đó ở *E.coli* chỉ có một điểm khởi đầu sao chép duy nhất trên nhiễm sắc thể và sao chép diễn ra hai chiều ngược nhau xuất phát từ điểm đó (hình 2.5b).

Ở người có từ 20 đến 30.000 điểm khởi đầu sao chép. Tế bào Hela có tới 100 đơn vị sao chép. Tốc độ sao chép khoảng 1.000 đến 15.000 nucleotid trong một phút. Đoạn ADN giàu các bazơ GC được sao chép trước, còn ADN giàu AT được sao chép sau trong giai đoạn S.

- Phân tử ADN sau khi được sao chép thì chỉ vài phút sau được tổ chức thành nucleosom trong đó có mặt các loại histon cũng vừa mới được tổng hợp ra. Và sau đó khó phân biệt giữa thể nhiễm sắc vừa sao chép với thể nhiễm sắc chưa sao chép.

### 3. Ở giai đoạn $G_2$

Giai đoạn  $G_2$  là giai đoạn kết đặc nhiễm sắc thể. Kết đặc là quá trình cuộn xoắn nhiễm sắc thể ở mức độ cao hơn để chuẩn bị cho nguyên phân. Đồng thời ở giai đoạn này cũng tổng hợp ra nhiều tubulin. Các tubulin được trùng hợp hoá để tạo ra vi ống của bộ các thoi phân nhiễm.

### 4. Ở giai đoạn nguyên phân

Giai đoạn nguyên phân ( $M = \text{mitosis}$ ) là giai đoạn phân chia tế bào thành hai tế bào con giống hệt nhau về mặt di truyền. Khi nguyên phân bắt đầu thì sự tổng hợp giảm đi sau đó dừng lại ở kỳ giữa và rồi lại tiếp tục ở kỳ cuối. Sở dĩ có hiện tượng trên vì lúc đầu do kết đặc cao nên thiếu những điểm khởi đầu sao chép, rồi màng nhân, hạch nhân cũng bị vỡ.

## III. SỰ SỬA CHỮA SAI SÓT TRONG QUÁ TRÌNH SAO CHÉP - SINH TỔNG HỢP ADN

Sự sửa chữa trong quá trình sao chép ADN là để đảm bảo tính ổn định của ADN. Tính ổn định của ADN là kết quả của hai quá trình sao chép và sửa sai.

- Người ta thấy rằng quá trình sao chép ADN ở *E. coli* sai lầm chỉ ở  $10^{-9}$  -  $10^{-10}$  nucleotid, mà ở *E. coli* có  $4,5 \cdot 10^6$  cặp base, nên sự sao chép ADN xảy ra ở 10.000 tế bào, mới có sai sót một nucleotid.

- Một thông tin khác trong quá trình sinh tổng hợp ADN cho biết trên các mạch tổng hợp mới, tỷ lệ sai sót chỉ khoảng  $10^{-8}$  -  $10^{-9}$ . Lúc đầu người ta tưởng sự chính xác đó là do sự kẹp đôi chính xác của các bazơ khi sao chép. Nhưng thực chất sự kẹp đôi, chính xác đó cũng chỉ ở mức sai sót  $10^{-5}$  -  $10^{-6}$ .

- Mặt khác người ta biết ADN polymeraza III có tỷ lệ sai sót là  $10^{-4}$

Từ những thông tin trên sở dĩ có sự sai khác nói trên là do ADN polymeraza có khả năng nhận biết các sai sót của mình và lập tức sửa sai nên mới có sự sai sót xảy ra ở mức độ rất thấp; enzym ADN polymeraza vừa có hoạt tính tổng hợp (từ đầu 5') vừa có hoạt tính phân hủy (từ đầu 3'). Nhờ hoạt tính phân hủy (tức là hoạt tính exonucleaza), nó loại bỏ ngay nucleotid bị gắn nhầm và nhờ hoạt tính tổng hợp (tức là hoạt tính polymeraza) nó gắn ngay vào bằng nucleotid đúng của nó. Đó là sự sửa chữa tức thời các sai sót nêu trên.

## 1. Các tác nhân sinh, lý, hoá gây thương tổn ADN

Có nhiều tác nhân gây thương tổn ADN.

- Thương tổn do bổ sung đôi bazơ nhầm trong quá trình sao chép như đã nói ở trên. Ở *E. coli* sự kẹp đôi chính xác cũng như ở mức độ sai sót khoảng  $10^{-5}$ - $10^{-6}$ .

- Thương tổn do nhiệt độ làm gãy liên kết N - glycosyl deoxyriboza do đó phân tử purin tách khỏi ADN. Người ta tính mỗi ngày trên mỗi tế bào người có tới 5.000 bazơ purin bị tách ra theo kiểu thương tổn này.

- Thương tổn do tia tử ngoại khử amin của các bazơ như biến cytosin thành Uracil, adenin thành hypoxantin, guamin thành xantin. Sự khử amin của cytosin thành uracil xảy ra với tỷ lệ khoảng 100 bazơ / 1 gen/ 1 ngày. Tia tử ngoại của ánh sáng mặt trời còn gây ra sự dime hoá hai thymin cạnh nhau:  $C_5 - C_5$  và  $C_6 - C_6$  tạo thành hai liên kết đồng hoá trị. Điều này làm thymin mất khả năng tham gia liên kết với các adenin của mạch bổ sung. Ngoài  $T = T$  ra ánh sáng mặt trời còn gây ra liên kết dime  $T = C$ ,  $C = C$  nữa.

- Thương tổn do các tia vũ trụ và phóng xạ có năng lượng cao gây trực tiếp cắt đứt các mạch làm biến đổi các bazơ hoặc gây gián tiếp bằng cách tạo

ra các ion superoxide  $O^{\cdot -}$  có hoạt tính rất cao. Chính các ion này mới đi vào tấn phá các gen.

- Thương tổn do các tác nhân hoá học thì rất đa dạng.

- Chẳng hạn như acid nitơ ( $HNO_2$ ) và các tiền chất của nó như  $NaNO_3$ ,  $NaNO_2$ , Nitrosamin gây sự khử amin của các bazơ có amin như adenin, guanin, cytosin để thành hypoxantin, xantin, uracil tương ứng.

- Sản phẩm chuyển hoá của tế bào ví dụ như ion  $H^+$  và chuyển động nhiệt có thể loại ra đến 10.000 bazơ purin/ 1 tế bào / 1 ngày/ 1 người.

- Những chất alkyl hoá như dimethyl sulfat có thể methyl hoá guanin thành 6 - oxymethyl guanin.

- Các chất tương tự bazơ như 5 - bromouracyl, 2-aminopurin... dễ gây sự nhầm lẫn cho ADN polymeraza cấp nhầm trong quá trình tổng hợp.

- Thương tổn công kênh do xuất hiện các mạch cacbon dài như benzopyren làm méo mó, biến dạng sự xoắn kép trên phân tử ADN.

- Thương tổn ADN có thể do hoá chất có khả năng gắn vào giữa các bazơ của phân tử ADN hay trực tiếp tạo các liên kết cộng hoá trị giữa hai mạch đơn v.v...

## 2. Các hệ thống sửa chữa thương tổn và cơ chế sửa chữa

### 2.1. Hệ thống phòng ngừa các tác hại vào gen

- Enzym superoxyt dismutaza phân hủy các ion superoxyd ( $O^{\cdot -}$ )
- Hệ thống điều hòa cân bằng acid - bazơ thì phân hủy các ion  $H^+$
- Hệ thống khử như  $NADPH_2$ , glutathion, sinh tố E, A, C thì sẽ phá bỏ các phản ứng oxy hoá có hại.
- Hệ thống gan thận thì tham gia khử được và loại bỏ nhiều hoá chất gây độc.

### 2.2. Hệ thống sửa chữa các thương tổn trong ADN

Để sửa chữa các thương tổn trong ADN, tế bào có hàng loạt các enzym, protein tham gia. Ở *E. coli* người ta biết có bốn hệ thống sửa chữa, đó là:

#### a. Hệ thống sửa chữa 1

Sửa chữa bổ sung đôi bazơ không đúng trong quá trình sao chép. Hệ

này gồm 9 enzym và protein như: dimer methylaza, ADN helicaza II, ADN polymeraza III, exonucleaza I, ADN ligaza, protein Mut-H, protein Mut L, protein Mut S, protein SSB.

#### *b. Hệ thống sửa chữa 2*

Sửa chữa từng bazơ bất thường có nghĩa là khi thiếu một bazơ (như purin bị khử chính tác dụng của nhiệt chẳng hạn) hoặc xuất hiện các bazơ không bình thường xanthin, hypoxanthin, sự alkyl hoá các bazơ, sự tạo thành dimer pyridin do tác dụng tử ngoại. Tham gia sửa chữa hệ thống này có bốn enzym: ADN glycosylaza, AP endonucleaza, ADN polymeraza I, ADN ligaza.

#### *c. Hệ thống sửa chữa 3*

Sửa chữa cả một đoạn cấu trúc của ADN. Tham gia sửa chữa hệ thống này có ba enzym chính ABC exonucleaza, ADN polymeraza I, ADN ligaza.

#### *d. Hệ thống sửa chữa 4*

Sửa chữa trực tiếp đối với thương tổn dimer thymidin do tác động tia tử ngoại và thương tổn guanin bị biến đổi tạo thành G - O - methyl guanin do đột biến bởi hoá chất. Đột biến này hay xảy ra nhất.

Tham gia sửa chữa hệ thống này có các enzym ADN photolyaza, enzym G - O - methylguanin - ADN methyltransferaza.

\* Enzym photolyaza, trọng lượng phân tử 54.000 dùng năng lượng nhận được từ hấp thụ ánh sáng, có hai cofacteur là 5,10 - methyltetrahydrofolat và FADH<sub>2</sub>. Dạng kích thích của FADH<sub>2</sub> sẽ chuyển một điện tử đến thymidin dimer và liên kết.

\* Còn enzym methyltransferaza thì xúc tác sự vận chuyển nhóm methyl của G - O - methylguanin đến nhóm cystein của một phân tử protein. Do đó làm mất nhóm methyl của guanin.

### **2.3. Chú ý**

1. Ngoài ra tế bào còn có một cơ chế đối phó đối với các thương tổn ào ạt trước sự tấn công của môi trường. Cơ chế này gọi là cơ chế sửa chữa khẩn cấp SOS. Nghiên cứu sự trả lời khẩn cấp SOS ở *E. coli* người ta thấy các dấu hiệu tăng sao chép hơn 15 gen khác nhau có chứa các thông tin sửa chữa ADN. Sản phẩm protein của các gen này là RecA, RecB, RecC, RecF, RecJ, RecK...

2. Sự hiểu biết về các hệ thống sửa chữa ở sinh vật nhân chuẩn còn hạn chế. Song biết chắc cũng có những điểm tương đồng với hệ thống sửa chữa ở *E. coli*.

3. Mặc dù hệ thống sửa chữa sai sót hoạt động rất hiệu quả nhưng đôi khi ADN cũng chịu nhiều biến động vượt ra ngoài tầm kiểm soát của hệ thống sửa chữa sai sót làm cho hệ thống bất lực để xảy ra đột biến như trong trường hợp 5 - methyl cytosin desamin, người ta biết không có một glycosylaza nào có khả năng nhận biết sai sót để loại bỏ và khi sao chép bazơ này nó nhận biết như một thymin.

Một khác hiện tượng tái tổ hợp và sự tồn tại các gen nhảy cũng đều làm cho ADN mất ổn định, thông tin di truyền thay đổi. Sự biến đổi của ADN này có thể xảy ra ở cả tế bào sinh dưỡng lẫn tế bào sinh dục. Nếu biến đổi xảy ra ở tế bào sinh dục thì lại được di truyền lại cho thế hệ sau.



## CHƯƠNG III

### SỰ PHIÊN MÃ-SINH TỔNG HỢP ARN

Sự phiên mã - sinh tổng hợp ARN là những quá trình chuyển thông tin di truyền từ phân tử ADN sang phân tử ARN. Bản chất hoá học của quá trình này và quá trình sinh tổng hợp ADN rất giống nhau nhưng chúng lại mang một ý nghĩa sinh học khác biệt.

- *Sự giống nhau giữa sinh tổng hợp ARN với sinh tổng hợp ADN là:*

+ Chiều của tổng hợp là 5'-3'

+ Năng lượng tổng hợp nhờ thuỷ phân ATP.

- *Sự khác nhau giữa hai quá trình sinh tổng hợp đó lại là:*

+ Khuôn ADN được bảo tồn trong quá trình tổng hợp ARN.

+ ARN polymeraza không có hoạt động của nucleaza.

+ Quá trình sinh tổng hợp ARN không có sự có mặt của chất mồi.

+ Quá trình sinh tổng hợp ADN có tính ổn định cao, đảm bảo việc truyền đạt nguyên vẹn bộ gen, trong khi đó sự sinh tổng hợp ARN lại liên quan đến tính đa dạng và biến động trong sự biểu hiện các tính trạng di truyền.

Giữa tế bào ở sinh vật nhân sơ và tế bào ở sinh vật nhân chuẩn, quá trình tổng hợp ARN cũng có khác nhau. Tuy đều gồm ba giai đoạn: khởi động, kéo dài và kết thúc, nhưng sự khác nhau lại là:

- Bộ gen tế bào ở sinh vật nhân sơ nằm tự do trong tế bào chất, còn bộ gen tế bào ở sinh vật nhân chuẩn thì nằm trong nhân được bao bọc bởi màng nhân.

- Các yếu tố tham gia vào quá trình khởi động, kéo dài và kết thúc ở các tế bào khác nhau.

- Enzym tổng hợp tế bào ở sinh vật nhân sơ chỉ có một loại enzym là ARN polymeraza, còn ở sinh vật nhân chuẩn có tới ba enzym.

- Ở sinh vật nhân chuẩn mARN tạo ra không hoạt động ngay như là mARN ở sinh vật nhân sơ - mà phải qua một loạt biến đổi mới thể hiện chức năng hoạt động của mình.

- mARN của sinh vật nhân chuẩn chỉ mã hoá cho một protein còn mARN của sinh vật nhân sơ có nhiều đoạn trình tự và mỗi đoạn trình tự lại mã hoá cho một protein.

Dưới đây là chi tiết của quá trình sinh tổng hợp ARN ở mỗi loại tế bào của sinh vật nhân sơ và tế bào của sinh vật nhân chuẩn<sup>(1)</sup>.

## I. SINH TỔNG HỢP ARN Ở SINH VẬT NHÂN SƠ

### 1. Một số đặc điểm về enzym ARN polymeraza

1. ARN được tổng hợp trên một mạch đơn của ADN cởi xoắn theo nguyên tắc bổ sung đôi bazơ. enzym ARN polymeraza tham gia quyết định việc tổng hợp ra ARN trên khuôn ADN.

2. ARN được tổng hợp ra chỉ trên một trong hai mạch ADN dùng làm khuôn. Đầu tiên là gắn một trình tự đặc biệt trên mạch chọn làm khuôn, trình tự đó gọi là promotor.

Sự phiên mã diễn ra theo chiều xác định (5'-3'). Chiều di chuyển của ARN polymeraza sẽ quyết định mạch đơn nào sử dụng để phiên mã.

Như vật chuỗi thứ hai đóng vai trò gì trong chuỗi thứ nhất đang bị sao chép. Chúng ta không thể nói rằng, chuỗi thứ hai đó không hoạt động. Người ta đã chứng minh rằng, ARN được tổng hợp nhờ enzym ARN polymeraza dưới sự hướng dẫn của ARN tự nhiên có thể nhanh chóng tổng hợp protein trong hệ thống vô bào. Nhưng ngược lại, ARN thu được khi sử dụng ADN biến tính hoặc ADN một chuỗi làm khuôn thì nói chung hoạt động rất yếu trong quá trình tổng hợp protein. Như vậy chuỗi thứ hai của phân tử ADN tuy không bị sao chép nhưng sự có mặt của nó trong chuỗi có tác dụng là cái khung để giữ cho chuỗi kia được sao chép tạo ra ARN hoạt động. Như vậy

---

<sup>(1)</sup> Từ đây trở đi, các thuật ngữ sinh vật nhân sơ (prokaryote) và sinh vật nhân chuẩn (eukaryote) tác giả gọi tắt là nhân sơ và nhân chuẩn - BTV.

cấu trúc phân tử ARN vẫn tồn tại dạng hai chuỗi nhưng chuỗi ra là quan trọng đối với việc tạo ra ARN có hoạt tính sinh học. Hình 3.2 và 3.3 trình bày sơ đồ cơ chế tổng hợp ARN trên khuôn một chuỗi của ADN xoắn kép trong tế bào và chỉ ra chỗ mở đầu trong chuỗi ADN được sao chép.

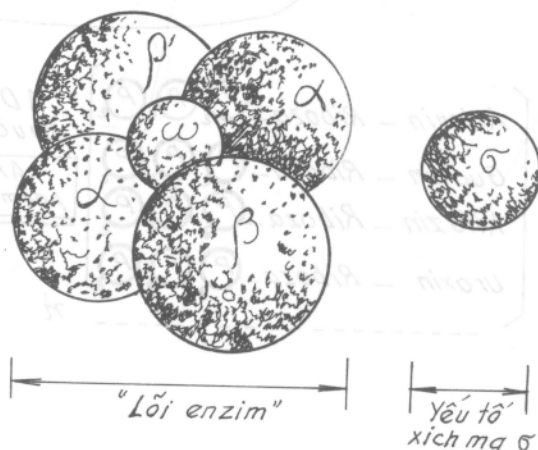
3. Sự phiên mã tuy có mang tính chất chính xác cao song ARN polymeraza không có cơ chế sửa sai đi kèm nên độ chính xác vẫn kém xa so với quá trình sao chép. Cũng may mắn là ARN được phiên mã không bao giờ sao chép lại nên có sai sót cũng không thể ảnh hưởng đến thế hệ sau.

4. Enzym ARN polymeraza ở đây còn gọi là ARN polymeraza phụ thuộc ADN (vì có phiên mã trên khuôn ADN). Enzym này tổng hợp cả ba loại ARN (mARN, tARN, và rARN).

5. Cấu trúc của phân tử ARN polymeraza có cấu trúc bậc bốn cực kỳ phức tạp, hàng số lẳng 15S và gồm năm chuỗi polypeptit. Đó là:

Chuỗi $\beta'$ (beta phẩy)	trọng lượng phân tử	160.000
Chuỗi $\beta$ (beta)	trọng lượng phân tử	150.000
Chuỗi $\alpha$ (alpha)	trọng lượng phân tử	40.000
Chuỗi $\omega$ (ômega)	trọng lượng phân tử	10.000
Chuỗi $\sigma$ (xích ma)	trọng lượng phân tử	90.000

Các chuỗi này hợp nhất lại với nhau bằng các liên kết năng lượng yếu như liên kết hydro, liên kết ion, liên kết Van der Van (Van der Waals). Trong phân tử enzym ARN polymeraza có hai chuỗi ( $\alpha$ ) và công thức cấu tạo tắt là: ( $\beta'$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ,  $\alpha_2$ ,  $\sigma$ ) trọng lượng phân tử vào khoảng 500.000 dalton. Chuỗi  $\sigma$  dễ dàng tách khỏi phức hợp trên. Nhóm đặc hiệu của enzym là ( $\beta'$ ,  $\beta$ ,  $\omega$ ,  $\alpha_2$ ) gọi là "lõi enzym", làm nhiệm vụ xúc tác tạo thành liên kết photphodiester giữ các nucleotid

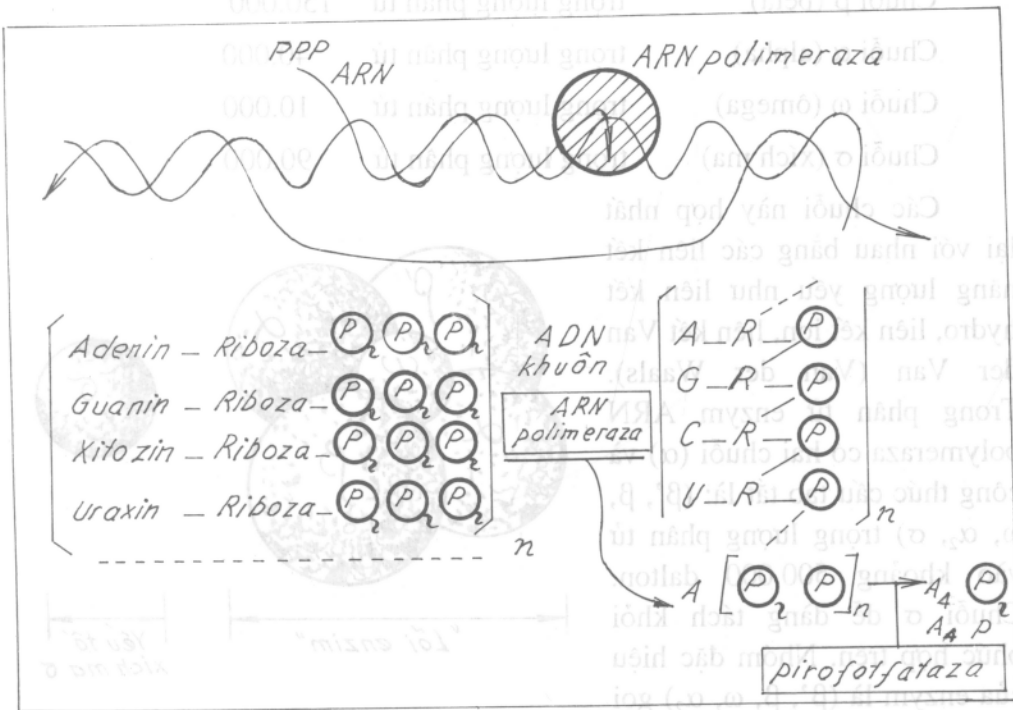


Hình 3.1. Trình bày một phân tử ARN polymeraza gồm năm đơn vị nhỏ tạo nên lõi enzym và yếu tố xích ma tham gia trong mở đầu các chuỗi của quá trình phiên mã.

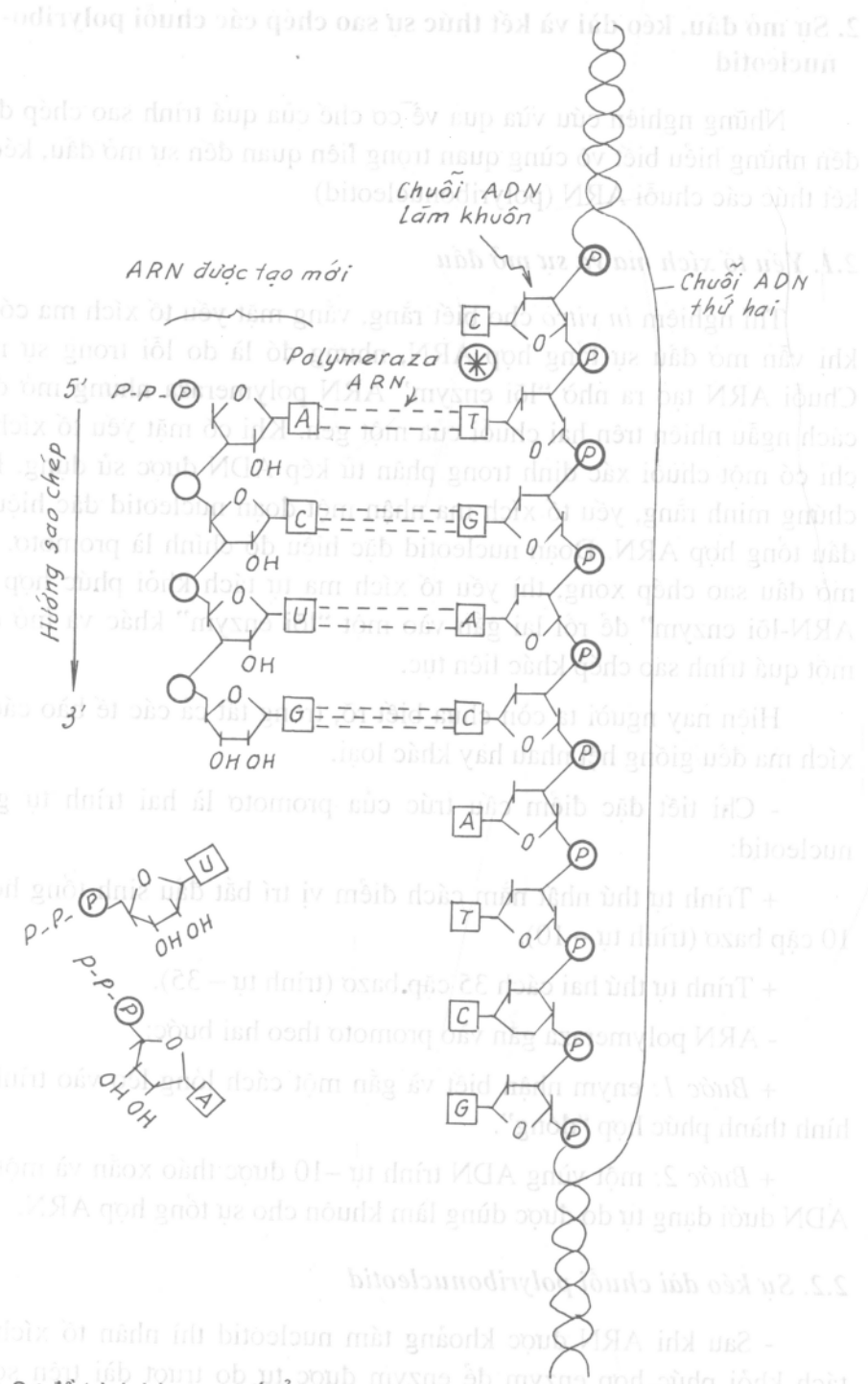
ngay cả khi vắng mặt yếu tố xích ma ( $\sigma$ ). Phân tích chi tiết hơn nữa, người ta thấy rằng enzym này làm được nhiệm vụ xúc tác tối thiểu chỉ cần hai loại chuỗi chủ yếu là  $\alpha$  và  $\beta$  (hình 3.1).

Một cấu trúc khác có bản chất hoá học là protein, gọi là yếu tố rô ( $\rho$ ). Nó hình như không liên kết với ARN polymeraza và tham gia trong mở đầu các chuỗi của quá trình kết thúc các chuỗi polynucleotid đã được chiết ra từ dịch chiết *E.coli*.

6. Sơ đồ tổng hợp ARN trên khuôn ADN nhờ ARN polymeraza: tất cả các ARN tế bào, bất cứ có chức phận gì đều là sản phẩm của sự sao chép di truyền. Cơ chế của quá trình đó rất phổ biến: một enzym là ARN polymeraza có mặt ở tất cả các cơ thể có tế bào, xúc tác bốn triphotphat nucleotid thành ARN, nhưng cấu trúc ARN đó thì in hình trên một trong hai chuỗi của ADN (hình 3.2 và 3.3).



Hình 3.2. Sơ đồ tổng hợp ARN trên khuôn ADN nhờ enzym ARN polimeraza.



Hình 3.3. Sơ đồ trình bày cơ chế tổng hợp ARN trên khuôn một chuỗi của ADN xoắn kép trong tế bào. Vị trí hoa thị (\*) chỉ nơi mở đầu trong chuỗi ADN được sao chép.

## 2. Sự mở đầu, kéo dài và kết thúc sự sao chép các chuỗi polyribonucleotid

Những nghiên cứu vừa qua về cơ chế của quá trình sao chép đã mang đến những hiểu biết vô cùng quan trọng liên quan đến sự mở đầu, kéo dài và kết thúc các chuỗi ARN (polyribonucleotid)

### 2.1. Yếu tố xich ma và sự mở đầu

Thí nghiệm *in vitro* cho biết rằng, vắng mặt yếu tố xich ma có thể đôi khi vẫn mở đầu sự tổng hợp ARN, nhưng đó là do lỗi trong sự mở đầu. Chuỗi ARN tạo ra nhờ “lỗi enzym” ARN polymeraza nhưng mở đầu một cách ngẫu nhiên trên hai chuỗi của một gen. Khi có mặt yếu tố xich ma thì chỉ có một chuỗi xác định trong phân tử kép ADN được sử dụng. Điều đó chứng minh rằng, yếu tố xich ma nhận một đoạn nucleotid đặc hiệu để mở đầu tổng hợp ARN. Đoạn nucleotid đặc hiệu đó chính là promotơ. Sau khi mở đầu sao chép xong, thì yếu tố xich ma tự tách khỏi phức hợp “ADN-ARN-lỗi enzym” để rồi lại gắn vào một “lỗi enzym” khác và mở đầu cho một quá trình sao chép khác liên tục.

Hiện nay người ta còn chưa biết rõ, trong tất cả các tế bào các yếu tố xich ma đều giống hệt nhau hay khác loại.

- Chi tiết đặc điểm cấu trúc của promotơ là hai trình tự gồm sáu nucleotid:

+ Trình tự thứ nhất nằm cách điểm vị trí bắt đầu sinh tổng hợp ARN 10 cặp bazơ (trình tự - 10).

+ Trình tự thứ hai cách 35 cặp bazơ (trình tự - 35).

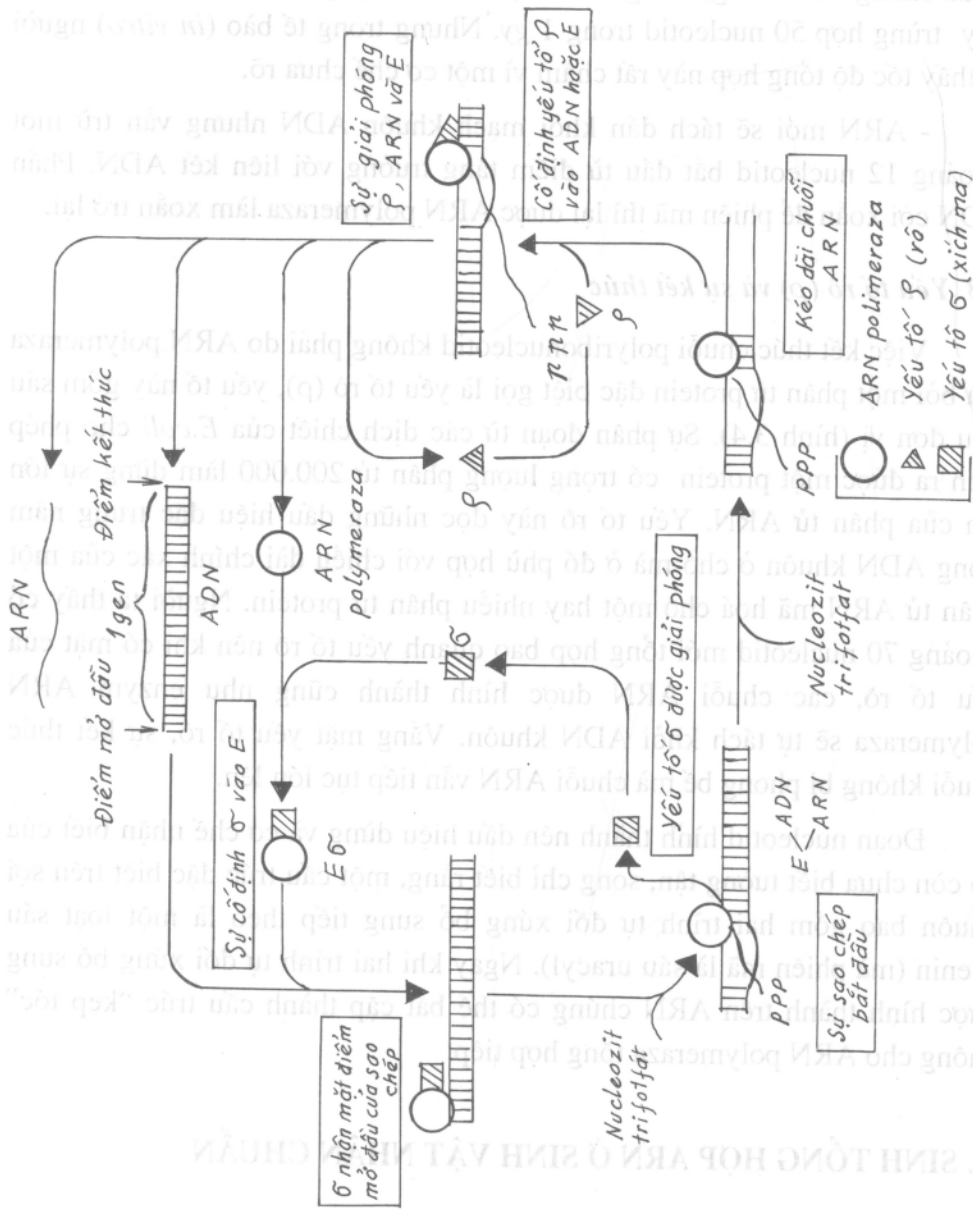
- ARN polymeraza gắn vào promotơ theo hai bước:

+ *Bước 1:* enzym nhận biết và gắn một cách lỏng lẻo vào trình tự -35 hình thành phức hợp “đóng”.

+ *Bước 2:* một vùng ADN trình tự -10 được tháo xoắn và một sợi đơn ADN dưới dạng tự do được dùng làm khuôn cho sự tổng hợp ARN.

### 2.2. Sự kéo dài chuỗi polyribonucleotid

- Sau khi ARN được khoảng tám nucleotid thì nhân tố xich ma ( $\sigma$ ) tách khỏi phức hợp enzym để enzym được tự do trượt dài trên sợi khuôn ADN với nhân tố kéo dài (EF) tham gia.



Hình 3.4. Sơ đồ tổng hợp ARN nhờ enzym ARN polymeraza và các yếu tố xích ma và rô.

- Giai đoạn này, tiếp sau giai đoạn mở đầu làm cho chuỗi ARN lớn lên theo hướng 5'-3' thì được đảm bảo bởi "lõi enzym" ARN polymeraza. Người ta đã chứng minh rằng, trong điều kiện tối đa một phân tử của "lõi enzym" này trùng hợp 50 nucleotid trong 1 gy. Nhưng trong tế bào (*in vitro*) người ta thấy tốc độ tổng hợp này rất chậm vì một cơ chế chưa rõ.

- ARN mới sẽ tách dần khỏi mạch khuôn ADN nhưng vẫn trừ một khoảng 12 nucleotid bắt đầu từ điểm tăng trưởng với liên kết ADN. Phần ADN cởi xoắn để phiên mã thì lại được ARN polymeraza làm xoắn trở lại.

### 2.3. Yếu tố rô ( $\rho$ ) và sự kết thúc

Việc kết thúc chuỗi polyribonucleotid không phải do ARN polymeraza mà bởi một phân tử protein đặc biệt gọi là yếu tố rô ( $\rho$ ), yếu tố này gồm sáu tiểu đơn vị (hình 3.4). Sự phân đoạn từ các dịch chiết của *E.coli* cho phép tách ra được một protein có trọng lượng phân tử 200.000 làm dừng sự lớn lên của phân tử ARN. Yếu tố rô này đọc những dấu hiệu đặc trưng nằm trong ADN khuôn ở chỗ mà ở đó phù hợp với chiều dài chính xác của một phân tử ARN mã hoá cho một hay nhiều phân tử protein. Người ta thấy có khoảng 70 nucleotid mới tổng hợp bao quanh yếu tố rô nên khi có mặt của yếu tố rô, các chuỗi ARN được hình thành cũng như enzym ARN polymeraza sẽ tự tách khỏi ADN khuôn. Vắng mặt yếu tố rô, sự kết thúc chuỗi không bị phong bế mà chuỗi ARN vẫn tiếp tục lớn lên.

Đoạn nucleotid hình thành nên dấu hiệu dừng và cơ chế nhận biết của nó còn chưa biết tường tận, song chỉ biết rằng, một cấu trúc đặc biệt trên sợi khuôn bao gồm hai trình tự đối xứng bổ sung tiếp theo là một loạt sáu adenin (mà phiên mã là sáu uracyl). Ngay khi hai trình tự đối xứng bổ sung được hình thành trên ARN chúng có thể bắt cặp thành cấu trúc "kẹp tóc" không cho ARN polymeraza tổng hợp tiếp.

## II. SINH TỔNG HỢP ARN Ở SINH VẬT NHÂN CHUẨN

### 1. Một số đặc điểm cần phân biệt

#### 1.1. Phân biệt một số đặc điểm phiên mã giữa nhân sơ và nhân chuẩn



**Bảng 3.1. Một số đặc điểm phiên mã**

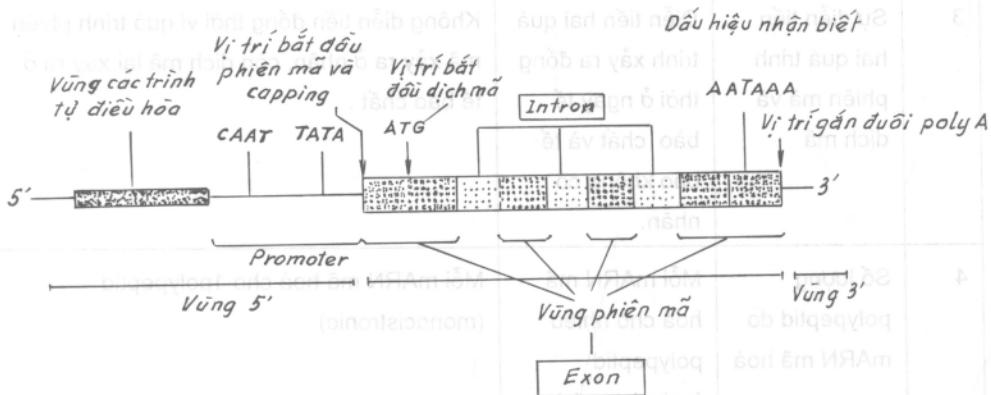
STT	Các đặc điểm	Nhân sơ	Nhân chuẩn
1	Enzym tổng hợp ARN, ARN polymeraza (ARN pol)	Chỉ có một loại ARN polymeraza phiên mã cho cả ba loại gen rARN, mARN và tARN	Có ba loại ARN polymeraza phiên mã cho cả ba loại gen khác nhau: -ARN pol I cho các gen rARN -ARN pol II cho các gen mARN -ARN pol III cho các gen tARN và 5S ARN
2	Các mARN và rARN	Các mARN, rARN vừa phiên mã ra là được tham gia vào dịch mã	Các mARN, rARN hình thành trong nhân dưới dạng tiền thân. Sau đó cần có một số biến đổi hoá học để hoàn thiện rồi mới chuyển ra tế bào chất để tham gia vào dịch mã
3	Sự diễn tiến hai quá trình phiên mã và dịch mã	Diễn tiến hai quá trình xảy ra đồng thời ở ngay tế bào chất và tế bào không có nhân.	Không diễn tiến đồng thời vì quá trình phiên mã xảy ra ở nhân, còn dịch mã lại xảy ra ở tế bào chất.
4	Số lượng polypeptid do mARN mã hoá	Mỗi mARN mã hoá cho nhiều polypeptid (polycistronic)	Mỗi mARN mã hoá cho 1 polypeptid (monocistronic)
5	Tính đáp ứng của sự phiên mã	Đáp ứng ngay	Không đáp ứng ngay tức thời với điều kiện ngoại cảnh do cấu trúc phức hợp histon protein quá bền chặt, buộc phải trải qua quá trình biến đổi dài mới lỏng lẻo để hoạt động được.

### 1.2. Phân biệt chức năng các vùng của gen phiên mã

Gen thường gặp nhất mã hoá cho một protein gồm ba vùng là vùng 5', vùng được phiên mã và vùng 3' được phân biệt các chức năng như sau (hình 3.5).

**Bảng 3.2. Chức phận ba vùng gen**

STT	Vùng gen	Chức năng
1	Vùng 5'	Có đoạn điều hoà hoạt động gen và đoạn hoạt hoá sự phiên mã (vùng promotơ có hộp TATA)
2	Vùng được phiên mã	Có các intron và exon; - intron được phiên mã nhưng bị loại bỏ trong quá trình hoàn thiện sợi mARN - exon được phiên mã và tạo thành mARN ở tế bào chất để dịch thành protein.
3	Vùng 3'	Chưa rõ chức năng, có một gen vùng này mang tính điều hoà chuyên biệt



**Hình 3.5. Sơ đồ một gen mã hoá một protein**

\* Capping: phản ứng gắn một 7-metyl guanin vào nucleotide đầu tiên của mọi mRNA.

## 2. Các giai đoạn mở đầu, kéo dài và kết thúc phiên mã

### 2.1. Giai đoạn mở đầu

ARN polymeraza II muốn hoạt động phiên mã được phải gắn với nhiều yếu tố phiên mã (transcription factor - TF) có bản chất protein đó là:

\* Đầu tiên là TF<sub>H</sub>IID nhận biết và gắn vào trình tự hộp TATA- mà hộp này nằm trước vị trí bắt đầu phiên mã độ 25-35 nucleotid (ở một số gen hộp này được thay thế bằng trị giàu GC) rồi lại gắn tiếp TF-IIA

\* Lúc đó enzym ARN polymeraza II lại liên kết với TF-IIIB để gắn vào được phức hợp trên- phức hợp TFIID- TFIIA.

\* ADN được tách thành hai mạch nhờ năng lượng từ ATP phân giải ra.

\* Cuối cùng nhân tố TFIIE cho phép enzym khởi động sự phiên mã.

## 2.2. Giai đoạn kéo dài

Enzym ARN polymeraza II di chuyển trên mạch khuôn ADN nhờ nhân tố TFIIIS để tổng hợp phân tử ARN.

## 2.3. Giai đoạn kết thúc

- Sự phiên mã kết thúc trước điểm gắn đuôi polyA còn xa.

Hình như kết thúc có liên quan đến những cấu trúc dạng “kẹp tóc” tiếp sau trình tự giàu GC (hình 3.6).

(ADN) 5'-CCCA GCCCGCCCTAATGAGGCCGC TTT TTTT GAACAAAA-3'  
 3'-GGGTCGGGCCGATTACTCCCGGAAAAAAA CTGTGTTT-5'

5'-CCCA GCCCGCCCUAAUGAGCGGCUUUUUUUU-OH 3'



Hình 3.6. Trình tự trên là một trình tự kết thúc trên phân tử ADN. Trình tự giữa là ARN, sản phẩm phiên mã của trình tự trên. Cấu trúc dưới là sự cuộn gấp của trình tự ARN trên tạo thành dạng “kẹp tóc”.

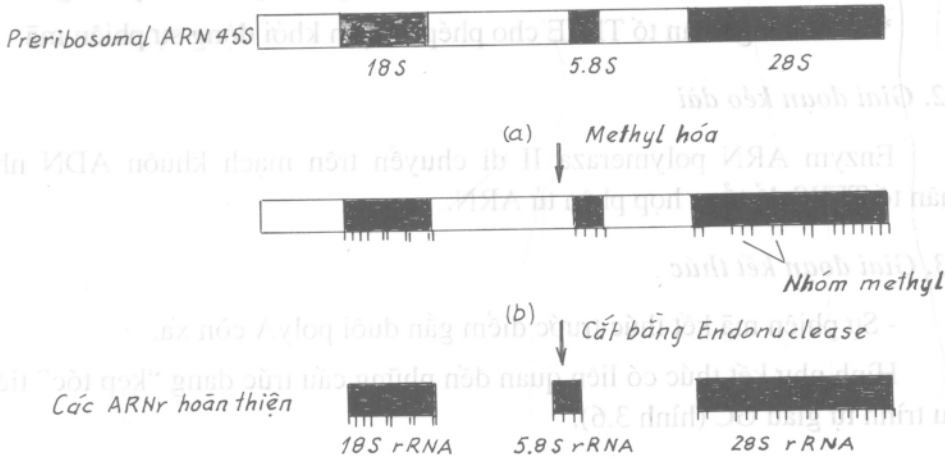
## 3. Các chất ức chế sự tổng hợp ARN

- α Manitin ức chế ARN polymeraza các loại- còn ở tế bào nhân sơ thì

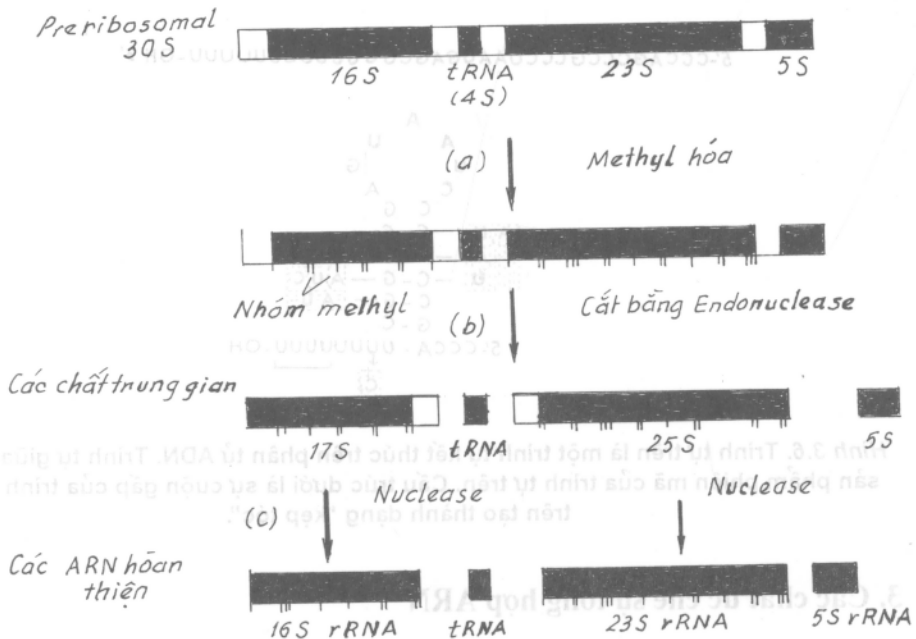
tác nhân ức chế là rifampicin.

- Actomycine D chứa nhân phenoxazon chêm vào hai bazơ guanin và cytosin gây biến dạng khuôn, làm ngăn trở tổng hợp ARN.

#### 4. Sự hoàn thiện ARN ribosom



Hình 3.7. Hoàn thiện các ARN ribosom ở tế bào nhân chuẩn



Hình 3.8. Hoàn thiện các ARN ribosom và ARNt ở tế bào nhân sơ

Ở tế bào nhân chuẩn sau phiên mã tạo thành preribosom ARN 45S. Phân tử này được methyl hoá tới hơn 100 nhóm tạo ra các rARN 18S, 58S và 28S. Các rARN này sẽ ghép lại với nhau tạo nên cấu trúc bậc bốn phức tạp. Phần các nucleotid không được methyl hoá sẽ bị phân huỷ. Ở tế bào nhân sơ preribosom là rARN 30S. Phân tử này cũng được methyl hoá một số bazơ và tạo nên rARN 16S, 23S, 5S và tARN, phần không methyl hoá cũng bị thuỷ phân để loại bỏ (hình 3.7 và 3.8).

## 5. Sự hoàn thiện ARN thông tin

Kết thúc sự phiên mã lập tức các tiền mRNA trải qua một quá trình biến đổi ngay trong nhân để thành mRNA hoạt động. Quá trình này gồm tạo mũ chụp 7-methylguanin vào đầu 5' gắn đuôi polyA vào đầu 3' và cắt bỏ các intron nối lại các exon.

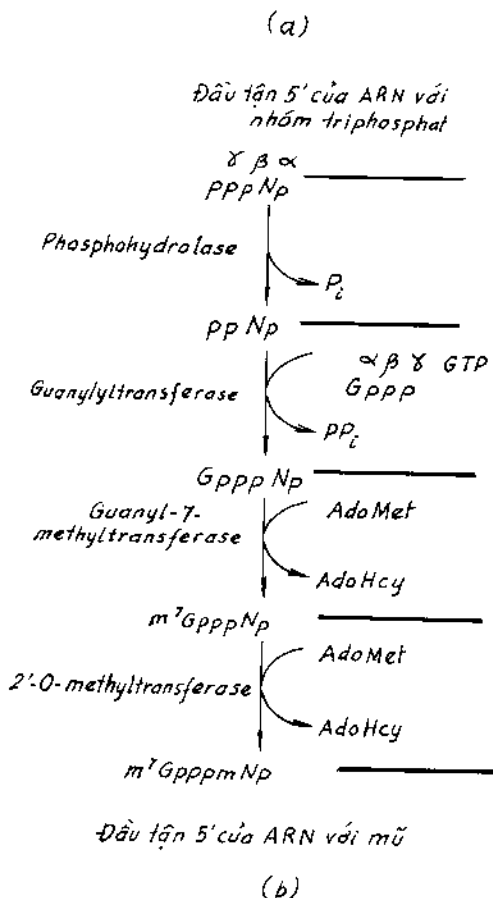
### 5.1. Gắn mũ chụp 7-methylguanin

- Đầu 5' của chuỗi tiền mRNA là nucleotid triphotphat chịu tác động của enzym photphohydrolaza tách acid phosphoric còn lại nhóm diphotphat.

- Dưới tác động của enzym guanosyl transferaza GTP được gắn vào và giải phóng pyrophotphat.

- Sau đó enzym guanosyl -7 -transferaza gắn nhóm methyl vào vị trí 7 của guanin ở đầu 5' của mRNA

Mũ chụp này là tối cần thiết cho quá trình dịch mã sau này (hình 3.9).



Hình 3.9. Tạo thành mũ 7 - methylguanin

## 5.2. Gắn đuôi poly A

- Tiền mRNA sẽ bị cắt bỏ khoảng 20 nucleotid nằm trước một trình tự AAUAAA nhận biết phản ứng cắt.

- Rồi enzym polyA- polymeraza có sẵn trong nhân sẽ gắn khoảng 100 adenin ở tế bào nhân chuẩn bậc thấp, hoặc khoảng 250 adenin ở động vật có vú vào đầu 3' của mRNA (riêng mRNA của histon thì không gắn đuôi polyA).

- Một protein gọi là protein liên kết với polyA (polyA binding protein - PABP) sẽ gắn tiếp vào đuôi polyA. Đuôi polyA kết hợp với PABP làm cho mRNA trong thể ổn định và khởi sự dễ dàng cho việc dịch mã.

## 5.3. Cắt bỏ các intron và nối lại các exon với nhau

- Quá trình này nhờ ba trình tự nằm trong intron đóng vai trò quan trọng:

+ Trình tự “cho” GU ở đầu 5' của intron.

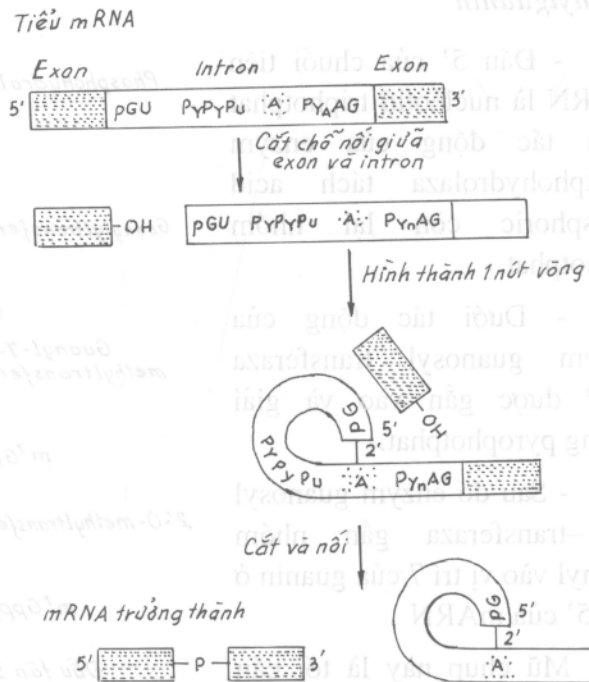
+ Trình tự giàu các bazơ pyrimidin bao quanh 1 A ở gần đầu 3'.

+ Trình tự “nhận” AG ở đầu 3'.

- Quá trình cắt nối lần lượt xảy ra như sau: (hình 3.10).

+ Đầu tiên mRNA được cắt ngay điểm nối giữa exon 1 và đầu 5' của intron.

+ Sau đó guanylat ở đầu 5' của intron nối với adenylat nằm gần 3' của intron tạo ra “nút”



Hình 3.10. Quá trình cắt nối intron và exon của tiền mRNA thành mRNA hoạt động.

thông lọng” của intron.

+ Cuối cùng điểm nối giữa exon 2 và đầu 3' của intron được cắt rời, rồi intron bị loại ra và các exon 1 và 2 nối lại với nhau hình thành mARN hoạt động và qua lỗ nhân ra tế bào chất tham gia quá trình dịch mã. Quá trình cắt nối này có vai trò của sáu phân tử từ  $U_1$  đến  $U_6$  do các ARN nhỏ của nhân (snARN) kết hợp với một số protein chuyên biệt trong nhân.

## CHƯƠNG IV

# MẬT MÃ DI TRUYỀN, SỰ DỊCH MÃ - SINH TỔNG HỢP PROTEIN

## I. MẬT MÃ DI TRUYỀN

### 1. Các phân tử bảo quản và vận chuyển thông tin di truyền

ADN thì chứa chất bảo quản và truyền đạt thông tin di truyền, còn mRNA thì vận chuyển thông tin di truyền. Sở dĩ có sự vận chuyển thông tin di truyền vì ADN chứa chất thông tin thì nằm trong nhân, mà tổng hợp protein theo chương trình định sẵn lại nằm ở bào tương, vì vậy phải cần một yếu tố vận chuyển thông tin di truyền từ nhân ra bào tương, *yếu tố đó chính là mRNA*.

### 2. Cách bảo quản và vận chuyển thông tin di truyền trong ADN và mRNA; các bằng chứng về mã bộ ba

Ta biết rằng ADN cũng như mRNA chỉ có bốn loại bazơ, trong khi đó protein lại có tới 20 acid amin khác nhau. Vậy bằng cách nào để có bốn bazơ đó dịch được 20 acid amin này. Do đó buộc người ta phải giải quyết hàng loạt những vấn đề lý luận và thực nghiệm như sau:

#### 2.1. Số bazơ biểu thị một acid amin

Bằng toán học người ta thấy:

- Cứ một bazơ biểu thị một acid amin thì bốn bazơ chỉ biểu thị được có bốn acid amin.

- Nếu hai bazơ biểu thị một acid amin thì bốn bazơ sẽ biểu thị là  $4^2=16$ .

- Nếu ba bazơ biểu thị một acid amin thì bốn bazơ sẽ biểu thị là  $4^3=64$ .



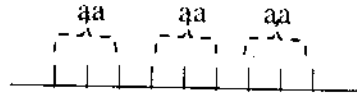
Như vậy, bộ ba (triplet) bazơ đủ và thừa để biểu thị cho tất cả các acid amin trong cơ thể sinh vật.

Về sau, về thực nghiệm người ta càng thừa nhận về mã bộ ba này (sẽ nói sau).

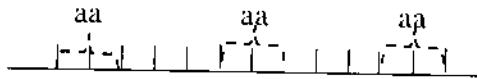
## 2.2. Cách sắp xếp bộ ba mật mã trên phân tử ADN và mARN

Điều kiện đầu tiên và tất yếu là bộ ba mật mã này phải gắn nhau, nhưng có bốn cách sắp xếp:

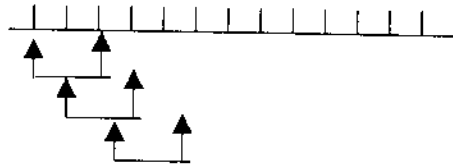
1. Các bộ ba nối tiếp nhau



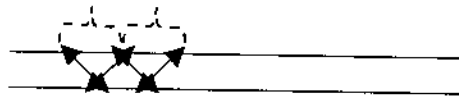
2. Các bộ ba cách nhau bằng một nhóm không có ý nghĩa



3. Trong bộ ba nucleotid, mỗi nucleotid của nó đều có thể tham gia vào ba bộ ba khác nhau.



4. Bộ ba nucleotid nằm trên hai chuỗi khác nhau.



Crick đã dùng riboflavin và các loại acridin khác nhau để có khả năng thêm hoặc bớt một nucleotid trong chuỗi mARN, do đó mà có thể nhận định được cách sắp xếp nào trong bốn cách trên là đúng: để trên một chuỗi ARN thay một nucleotid thì protein tạo thành chỉ có một acid amin thay đổi mà thôi. Như vậy chỉ có cách thứ nhất mà thôi.

Cũng bằng chứng trực tiếp chứng minh mã bộ ba được rút ra từ thí nghiệm rII ở thực khuẩn thể T<sub>4</sub>. Trong thí nghiệm này người ta gây tạo những đột biến mất (-) và thêm (+) một cặp bazơ trên ADN.

Ví dụ: ta có đoạn ARN thông tin có thành phần dưới đây và khi đó trên phân tử protein tương ứng sẽ chỉ có một loại acid amin



khuẩn thể  $T_4$  đã chứng tỏ lập luận trên là đúng. *Vây mã di truyền là mã bộ ba với 3 bazơ nối tiếp nhau liên tục không ngắt quãng dọc theo một chiều và bắt đầu từ một điểm xác định.*

### 3. Giải mã di truyền

Biết được bộ ba nucleotid xác định một acid amin và phải đi liền nhau theo một hướng chưa đủ, mà còn phải biết bộ ba nucleotid nào xác định acid amin nào.

Công việc này hoàn thành được nhờ thành tựu của Ochoa (1955) chiết xuất được enzym polynucleotid phosphorylaza từ vi khuẩn nên đã giúp M.Nirenberg và Mathae (1961) dùng enzym này tổng hợp được mARN toàn poly U trong ống nghiệm. Về sau M.Nirenberg đã sử dụng một hệ thống tổng hợp vô bào (không có cấu trúc tế bào) để giải mã di truyền. Hệ thống đó là dịch chiết tế bào *E.coli* có chứa các ribosom, các ARN vận chuyển, các enzym aminoacyl synthetaza, ARN thông tin, các axit amin và một số phụ gia khác. Trong hệ thống vô bào các axit amin có thể dính lại với nhau để tạo thành protein. Phản ứng này chỉ diễn ra trong vòng vài phút rồi dừng lại, nhưng nếu bổ sung thêm ARN thông tin mới thì việc tổng hợp protein lại tiếp diễn.

*Phản ứng này là một phát minh cực kỳ quan trọng*, vì sau khi ARN thông tin tự nhiên có sẵn trong dịch vô bào được sử dụng hết thì có thể đưa ARN thông tin nhân tạo có thành phần định trước vào hệ thống vô bào và xác định xem loại protein nào được tổng hợp. Các tác giả thấy rằng, khi đưa ARN thông tin chỉ chứa toàn uraxin (U) vào hệ thống thì protein được tổng hợp chỉ chứa toàn axit phenylalanin. Tương tự như vậy, nếu mARN đưa vào hệ thống chỉ mang toàn adenin (A) thì protein được tổng hợp chỉ chứa toàn lysin, nếu mARN chỉ mang toàn cytosin (C) thì protein tương ứng chỉ có prolin. Vây UUU là bộ ba mã hoá phenylalanin, AAA là bộ ba mã hoá lysin và CCC là bộ ba mã hoá prolin.

Tiếp sau đó các tác giả đã tổng hợp các mARN có thành phần như UCUCUCUCUCU..., AAGAAGAAGAAG... và đã tìm ra các bộ ba mã hoá axit amin như: serin là UCU, leucin là CUC, lysin là AAG, arginin là AGA và axit glutamic là GAA. Cứ tiếp tục thí nghiệm theo cách như vậy và kết hợp với một vài kỹ thuật khác, người ta đã tìm ra toàn bộ 61 bộ ba mã hoá các axit amin. Ba bộ ba còn lại (UAA, UAG và UGA) như ngày nay chúng ta đã biết, là những dấu hiệu kết thúc chuỗi, còn gọi là *bộ ba vô nghĩa*



Codon có thay đổi từ C → U nhưng không ảnh hưởng thông tin di truyền vì vẫn biểu hiện cho glyxin (gly).

- Trong các codon đồng nghĩa chỉ có nucleotit thứ ba khác nhau; như vậy nếu như axit amin nào có tới bốn codon thì khi thay đổi nucleotit thứ ba, bản chất thông tin di truyền không thay đổi.

**4.2. Những axit amin nào hay gặp trong phân tử protein** thì nhiều codon đồng nghĩa, trừ his và cys, tuy ít gặp nhưng quan trọng vì có nhóm imidazol và nhóm -SH nên mỗi nó đều có hai codon.

**4.3. Những axit amin có đặc tính lý hoá gần giống nhau** thì codon của chúng cũng gần giống nhau chỉ khác nhau ở nucleotit thứ ba. Ví dụ:

Asp	GAU	GAC
Glu	GAG	GAU

**4.4. Trong trường hợp axit amin có hai codon** thì nucleotit thứ ba thuộc cùng một nhóm hoặc purin hoặc pyrimidin.

Ví dụ: phe: UUU và UUC, nucleotit thứ ba của hai codon này thuộc nhóm pyrimidin.

Leu: UUA và UUG, nucleotit thứ ba của hai codon này thuộc nhóm purin.

Từ ý nghĩa này nếu ta thay một bazơ trong cùng một nhóm thì gọi là transition, còn nếu thay khác nhóm thì gọi là transversion.

**4.5. Những codon vô nghĩa**

Có ba codon là UAA, UAG và UGA không ứng với một axit amin nào cả gọi là codon vô nghĩa nhưng lại đóng vai trò báo hiệu kết thúc tổng hợp chuỗi protein.

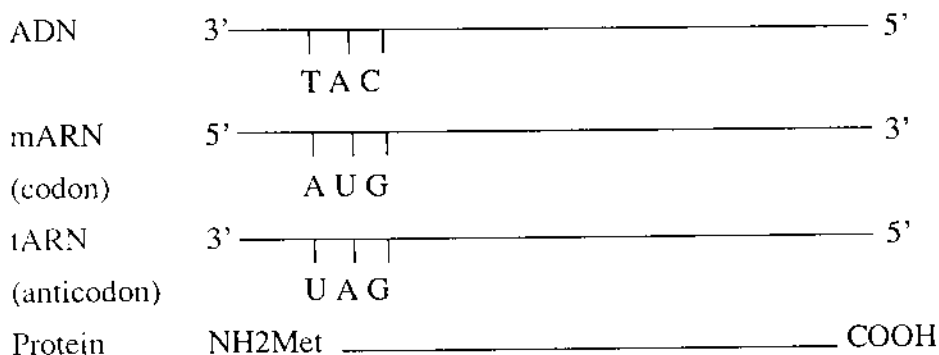
Codon AUG – met báo hiệu mở đầu.

N formyl Met mở đầu cho sự tổng hợp chuỗi protein của vi khuẩn.

**4.6. Mã bộ ba mang tính phổ biến**

Ở vi khuẩn động vật, thực vật đều cùng có bộ ba mã di truyền giống hệt nhau.

**4.7. Sự đọc thông tin di truyền** thì tuân theo định luật đôi bazơ bổ sung của bộ ba mã giữa ADN và mRNA và của bộ ba đối mã của tARN như sau:



#### 4.8. Tính linh hoạt của mã di truyền

- Inosin (I) trong anticodon có thể bổ sung vào U, C, A, G đều được cả (wobble hypothesis of Crick 1966). Đó gọi là tính linh hoạt “trong kết cặp”.

#### 4.9. Đột biến và mã di truyền

Có một số tác nhân đột biến hoá học gây ra đồng hoán, dị hoán, làm mất hoặc bổ sung thêm bazơ và dẫn đến thay đổi axit amin trên mạch polypeptit.

Có ba kiểu đột biến cơ bản làm sản sinh ra các protein không hoạt động biểu hiện ra kiểu hình:

##### a. Đột biến nhầm nghĩa

Một cặp bazơ riêng lẻ trên ADN bị biến đổi làm thay đổi cụm mã tương ứng trên mARN, do đó dẫn đến một axit amin khác trên chuỗi polypeptit.

##### b. Đột biến vô nghĩa

Một cặp bazơ riêng lẻ trên ADN bị biến đổi làm thay đổi cụm mã tương ứng trên mARN vô nghĩa (tức là một tín hiệu kết thúc chuỗi trên mARN), do đó dẫn đến mạch polypeptit ngắn hơn bình thường và không hoạt động theo đúng chức năng cũ.

##### c. Đột biến dịch khung

Một cặp bazơ riêng lẻ trên ADN bị mất hoặc thêm làm thay đổi một bazơ trên mARN, mà ở đó khung đọc dịch chuyển đi một nucleotit, do đó dẫn đến tạo ra một polypeptit khác thường.

## II. SỰ DỊCH MÃ-SINH TỔNG HỢP PROTEIN

### 1. Các chất tham gia tổng hợp protein

Quá trình dịch mã - sinh tổng hợp protein có hàng loạt các yếu tố tham gia, trước hết kể cả các yếu tố truyền đạt thông tin di truyền, các acid amin rồi đến các enzym, các yếu tố mở đầu, kéo dài và kết thúc, các phân tử cung cấp năng lượng, các ion v.v... Dưới đây là bảng liệt kê các chất tham gia và vai trò chức năng của chúng trong sinh tổng hợp protein (bảng 4.2).

**Bảng 4.2.** Các chất tham gia và vai trò - chức năng của chúng trong sinh tổng hợp protein

STT	Các chất	Vai trò - chức năng
1	Các acid amin (gồm 20 acid amin khác nhau)	Nguyên liệu để tổng hợp nên polypeptid, protein
2	ADN	Gen điều hoà, gen khởi động, gen cấu trúc tham gia vào phiên mã, dịch mã.
3	Các ARN (gồm ba loại: mRNA, rARN, tARN)	- mRNA vận chuyển thông tin từ ADN bằng bộ ba mã di truyền đến chỗ tổng hợp protein. - rARN là nơi tổng hợp protein - tARN vận chuyển acid amin tương ứng đến nơi tổng hợp protein.
4	Các enzym (có ba enzym quan trọng) - Aminoacyl-tARN syntetaza - Peptidyl syntetaza - Peptidyl transferaza	- Gắn các acid amin với tARN tương ứng. - Gắn acid amin thêm vào peptid. - Vận chuyển peptid
5	Các yếu tố mở đầu (initiation factors: IF) - IF1 - IF3 - IF2	Mở đầu sự tổng hợp chuỗi polypeptid
6	Các yếu tố kéo dài (elongation Factors- EF) - EFT (Tu, Ts) - EFG (G)	Kéo dài sự tổng hợp chuỗi polypeptid

7	Các yếu tố kết thúc còn gọi là yếu tố giải phóng release factors- RF) - RF1 - RF2 - RF3	Kết thúc sự tổng hợp chuỗi polypeptid
8	Các chất cung cấp năng lượng - ATP  - GTP	- Cung cấp năng lượng cho quá trình hoạt hoá acid amin. - Cung cấp năng lượng cho sự gắn formyl Met-ARN và các aminoacyl-tARN khác vào ribosom. - Cung cấp năng lượng cho sự chuyển vị trí của peptidyl-tARN từ vị trí A→B
9	Các ion: Mg <sup>2+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	Cần cho sự hoạt động của các enzym

Các loại ARN: ARN gồm ba loại là mRNA, tARN, rARN có một số đặc điểm chính được tóm tắt trong bảng 4.3.

**Bảng 4.3. Các đặc điểm chính của mRNA, tARN và rARN**

	mARN	rARN	tARN
Tỷ lệ %	5	80	15
Thời gian sống trung bình	Nhanh chóng được tổng hợp và thoái hoá (khoảng hai giờ ở đa bào còn 5-10 phút ở vi khuẩn).	Lâu hơn và bền hơn	Lâu và bền
Trọng lượng phân tử	Không đồng nhất tùy thuộc vào chuỗi polypeptid mà nó mã hoá	70 S ở vi khuẩn và 80 S ở đa bào	4S (25.000 dalton)
Hình dáng	Một sợi thẳng	Có hai tiểu đơn vị gắn với các protein	Cuộn thành hình lá ba chẽ
Nguồn gốc được tổng hợp	Từ một sợi của ADN ở nhân	Từ một sợi của ADN vắt qua hạch nhân	Từ phần sợi ADN ở ngoài hạch nhân
Vai trò	Bộ ba mã hoá của (codon) mang mã di truyền trong nhân ra bào tương để tổng hợp protein	Nơi diễn ra tổng hợp protein	Mang đối mã (anticodon) và mang acid amin tương ứng đến chỗ tổng hợp protein.



## 2. Vai trò của một số yếu tố quan trọng tham gia quá trình sinh tổng hợp protein

Có rất nhiều yếu tố tham gia quá trình sinh tổng hợp protein. Riêng về các đại phân tử đã có tới hàng trăm loại khác nhau (các acid, nucleic, enzym, protein đặc hiệu...) tham gia quá trình này.

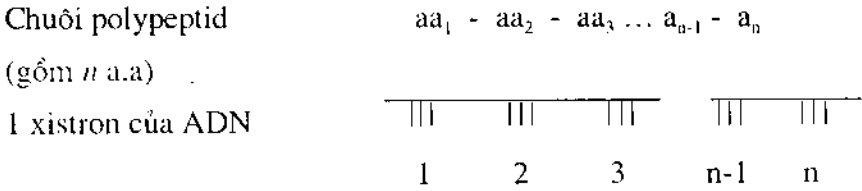
### 2.1 Vai trò của ADN

Như chúng ta đã biết ADN tập trung chủ yếu ở trong nhân và là thành phần cơ bản của thể nhiễm sắc. Vai trò của ADN trong quá trình tổng hợp protein được xác minh chủ yếu bởi những nghiên cứu về di truyền. Thực nghiệm đầu tiên chứng minh ADN là cơ sở vật chất của di truyền là công trình của Avery, Mac Load và Mac Carthy (1944): đưa ADN chiết xuất từ phế cầu khuẩn độc vào môi trường nuôi cấy chủng phế cầu khuẩn không độc thì chủng không độc biến thành chủng độc. Vậy ADN có liên quan chặt chẽ với tính đặc hiệu của các protein của vi khuẩn (các protein này quyết định tính độc hay không độc của vi khuẩn).

Thí nghiệm Krauss lại chứng minh cụ thể hơn mối liên quan giữa cấu trúc của protein với vai trò của ADN: đưa ADN chiết xuất từ hồng cầu non của người bình thường (hồng cầu này tổng hợp hemoglobin A) vào tuỷ xương bệnh nhân thiếu máu hình liềm (có hemoglobin S) thì hồng cầu non trong tuỷ xương bệnh nhân tổng hợp được hemoglobin A (bình thường). Qua các dữ kiện trên ta có thể kết luận rằng **ADN quyết định cấu trúc đặc hiệu của protein được tổng hợp**. Người ta làm thí nghiệm với hệ thống vô bào không có nhân tế bào hoặc ADN thì thấy quá trình tổng hợp protein vẫn xảy ra. Vậy ADN không trực tiếp tham gia quá trình tổng hợp protein.

Ngày nay người ta đã xác nhận được rằng, ADN là chất liệu bảo quản thông tin di truyền, phân tử ADN chứa đựng toàn bộ các "tin tức" về cấu trúc của các protein đặc hiệu của tế bào và các "tin tức" đó được di truyền lại thế hệ sau.

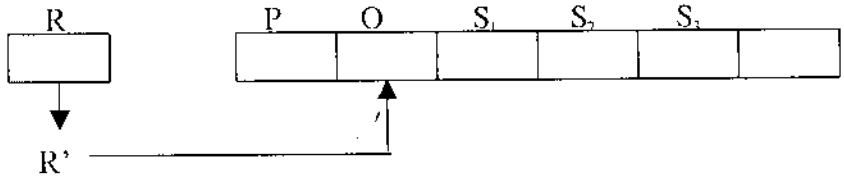
Mỗi protein ứng với một đoạn của phân tử ADN gọi là *xistron* hay *gen cấu trúc*, trong đó mỗi acid amin được mã hoá bằng một bộ ba mononucleotid gọi là bộ ba mật mã, thứ tự của các acid amin trong chuỗi polypeptid (protein) ứng với thứ tự các mononucleotid trong chuỗi ADN (hình 4.1).



**Hình 4.1. Sự tương ứng giữa chuỗi polypeptid và chuỗi các bộ ba mononucleotid của ADN.**

Ghi chú: a.a: acid amin  
 1: một mononucleotid

Nhiều protein liên quan đến nhau về mặt hoạt động (thí dụ các enzym xúc tác nhiều phản ứng của một quá trình thoái hoá một chất nào đó) ứng với một khúc phân tử ADN gồm nhiều xistron. Những xistron đó (gen cấu trúc) chịu sự điều khiển của một gen gọi là gen tác động. Trên phân tử ADN còn có gen điều hoà sinh sản ra chất kìm hãm ảnh hưởng tới gen tác động (ức chế hay kích thích trạng thái của chất kìm hãm). Bên cạnh gen tác động còn có gen khởi động là nơi tiếp nhận ARN- polymeraza (enzym xúc tác sự sinh tổng hợp mARN) (hình 4.2).



**Hình 4.2. Các gen của ADN**

- R: gen điều hoà
- R': chất kìm hãm
- O: gen tác động
- P: gen khởi động
- S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>...: gen cấu trúc

ADN có hai hướng hoạt động

- *Hướng thứ nhất*: là sự sao chép hay nhân đôi ADN xảy ra ở nhân tế bào khi phân chia (xem chương tổng hợp ADN).

- *Hướng thứ hai*: là điều khiển quá trình sinh tổng hợp protein thông qua sự tổng hợp ARN được tổng hợp dựa trên mẫu là một sợi ADN (mang thông tin về cấu trúc protein). Các thông tin từ ADN được chuyển sang ARN và quá trình này gọi là *sự phiên mã* (xem chương tổng hợp ARN). Sau đó

mARN được dùng làm khuôn mẫu cho sự tổng hợp protein, các thông tin từ mARN được chuyển sang chuỗi polypeptid, quá trình này gọi là *sự dịch mã*.

## 2.2 Vai trò của mARN

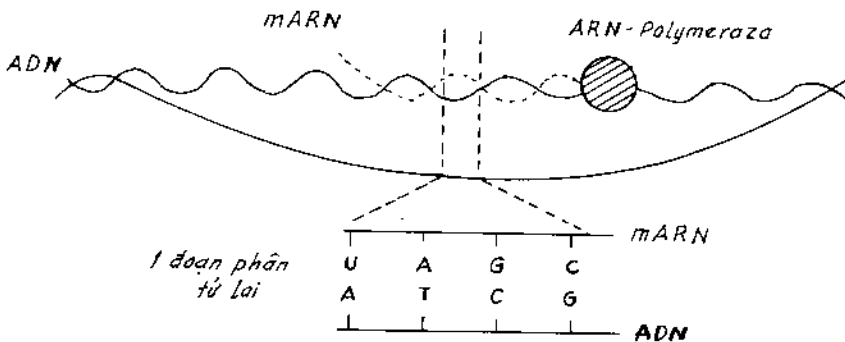
mARN là yếu tố vận chuyển thông tin về cấu trúc protein theo mã di truyền quy định từ một đoạn sợi ADN để đến ribosom tổng hợp protein.

Bắt đầu từ năm 1961, Jacob và Monod nêu có một loại ARN có đặc điểm: chuyển hoá nhanh chóng và có cấu trúc hoá học tương tự với ADN. ARN này có tác dụng như khuôn mẫu để tổng hợp protein và được gọi là ARN thông tin (mARN). Đời sống của mARN rất ngắn: chỉ 2-3 phút ở vi khuẩn và 2-3 giờ ở động vật. mARN chiếm gần 5% tổng ARN của tế bào.

Vai trò của mARN đã được xác minh bằng thực nghiệm. Khi ủ mARN chiết xuất từ gan chuột với dịch tế bào nguồn gốc động vật khác thì thấy có sự tạo thành protein đặc hiệu của gan chuột. Như vậy mARN trực tiếp tham gia quá trình tổng hợp protein.

Nó chính là chất trung gian truyền thông tin từ ADN sang chuỗi polypeptid. Với nguyên liệu là các mononucleotid tương ứng, enzym xúc tác là ARN polymeraza phụ thuộc ADN (hay transcriptase), mARN được tổng hợp dựa theo khuôn mẫu là một sợi ADN. Sự tổng hợp này tuân theo quy luật đôi bazơ nên phân tử lai mARN-ADN. Quá trình đó được gọi là sự phiên mã (hình 4.3).

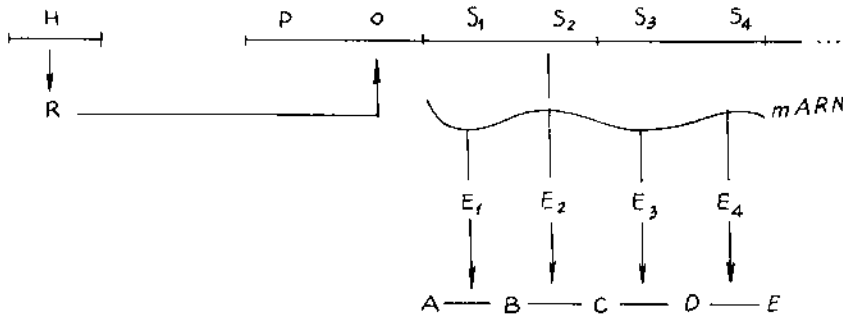
Như vậy các thông tin ở ADN về cấu trúc của protein nhất định đã được chuyển sang mARN và mARN được coi như bản sao của một đoạn



Hình 4.3. Sự phiên mã

ADN tương ứng. Sau khi được tổng hợp xong mARN tách khỏi phân tử lai và được chuyển (dưới dạng kết hợp với protein thành phức hợp gọi là informosom) ra bào tương tới ribosom.

Những gen cấu trúc hay xistron điều khiển sự tổng hợp những protein có liên quan với nhau về mặt hoạt động (thí dụ xúc tác một quá trình chuyển hoá gồm nhiều phản ứng liên tiếp) tập hợp lại thành một đơn vị chức năng gọi là đơn vị tác động (operon) dưới sự điều khiển của gen tác động. Sự sao chép thực hiện cho toàn bộ các xistron của đơn vị tác động tạo nên mARN polyxistronic mARN là khuôn mẫu cho sự tổng hợp nhiều chuỗi polypeptid tương ứng (hình 4.4).



Hình 4.4. ARNm polyxistronic ( $E_1, E_2, \dots$  các enzym).

mARN monoxistronic (hiếm hơn) ứng với một gen cấu trúc. Sự sao chép bắt đầu ở gen khởi động (nơi tiếp nhận ARN polymeraza). Sự kéo dài chuỗi mARN đi theo chiều 5'-3' và được thực hiện ở đoạn ADN nằm ngoài phạm vi hạch nhân. Các thông tin ở đoạn ADN ứng với chuỗi polypeptid

nhất định được chuyển sang mRNA. Số bộ ba mã ở đoạn ADN tương ứng và bằng số acid amin của chuỗi polypeptid.

Kích thước của mRNA tùy thuộc vào các chuỗi polypeptid mà nó mã hoá. Nó gồm 900 - 12000 mononucleotid có trọng lượng phân tử bằng  $3 \times 10^5 - 4 \times 10^6$ , dài 5-50- $10^5 \text{A}''$

### 2.3. Vai trò của ARN

Hoagland và các cộng sự (1958) làm các thí nghiệm tổng hợp protein với một hệ thống vô bào gồm ribosom (tách từ *E.coli*) acid amin ghi dấu,  $\text{MgCl}_2$ , ATP và ARN chiết xuất từ pha lỏng của tế bào. Họ nhận thấy trước khi được sử dụng để tổng hợp protein, các acid amin kết hợp với ARN hoà tan, còn gọi là ARN vận chuyển, viết tắt là tARN (hình 4.5).

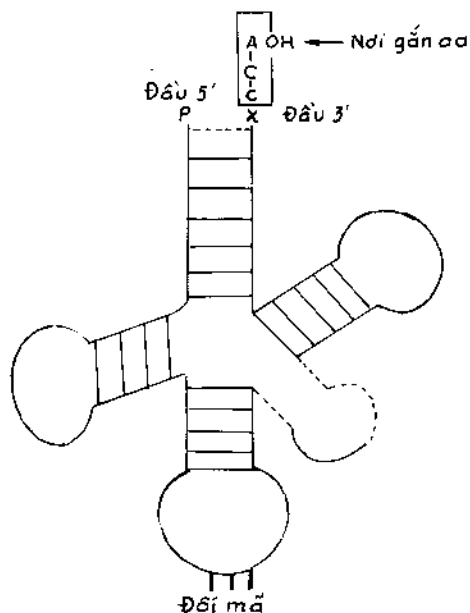
Chức năng tARN được thực hiện nhờ các enzym đặc hiệu là các aminoacyl - tARN synthetaza. Có 20 amino-acyl-tARN synthetaza tương ứng với 20 acid amin.

Các enzym này có khả năng nhận biết các acid amin đặc hiệu và cả tARN tương ứng. Quá trình gắn acid amin vào tARN với sự tham gia của các enzym trải qua hai bước và cần năng lượng kích hoạt:

- Acid amin + enzym + ARP  $\rightarrow$  enzym aminoacyl-AMP +  $\text{P}_i$ .
- Enzym-aminoacyl-AMP + tARN  $\rightarrow$  tARN-aminoacyl + AMP + enzym.

Như vậy, chức năng của tARN là vận chuyển các acid amin một cách đặc hiệu đến nơi tổng hợp protein. Vì vậy có ít nhất 20 loại tARN, ứng với 20 acid amin.

Ngày nay người ta đã biết khoảng 40 loại tARN và đã xác định được cấu trúc bậc 1, 2, 3 của nhiều loại tARN. Phân tử tARN có khoảng 75-85



Hình 4.5. Cấu trúc tổng quát của tARN

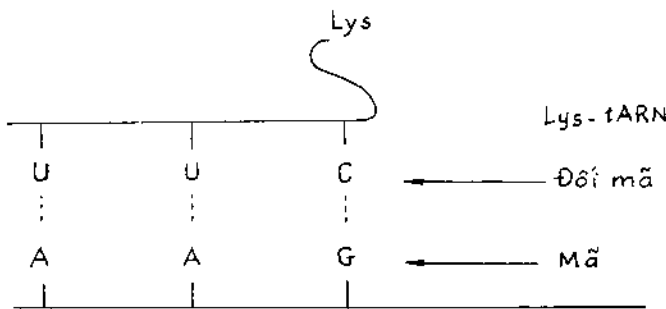
mononucleotit và có trọng lượng phân tử bằng 25000-30000. Cấu trúc tổng quát của tARN như hình 4.5, trong đó chúng ta chú ý hai điểm:

\* Đầu 5' thường là p và đầu 3' bao giờ cũng là bộ ba mononucleotit CCA trong đó A (AMP) ở tận cùng và là nơi trực tiếp gắn acid amin (aa).

\* Đối mã: là một cuộn gồm bảy mononucleotit, trong đó có bộ ba mononucleotit ứng với acid amin mà ARN có nhiệm vụ vận chuyển một cách đặc hiệu. tARN có năm trung tâm chức năng:

- trung tâm nhận acid amin;
- trung tâm được nhận biết bởi enzym (aminoacyl-tARN synthetaza);
- trung tâm tương tác với ribosom;
- trung tâm nhận biết bởi các yếu tố EF-G trong quá trình chuyển vị;
- trung tâm đối mã đặc hiệu đối với acid amin được vận chuyển.

Khi tARN nhận acid amin tương ứng thì trở thành aminoacyl-tARNs (aa-tARN). Phức hợp này được đưa tới ribosom và “đối mã” nhận biết mã tương ứng ở tARN theo quy luật đối bazơ, thí dụ: Lys-tARN bổ sung với mã của lysin ở tARN<sub>m</sub> (hình 4.6).



Hình 4.6. Đối mã nhận biết mã tương ứng

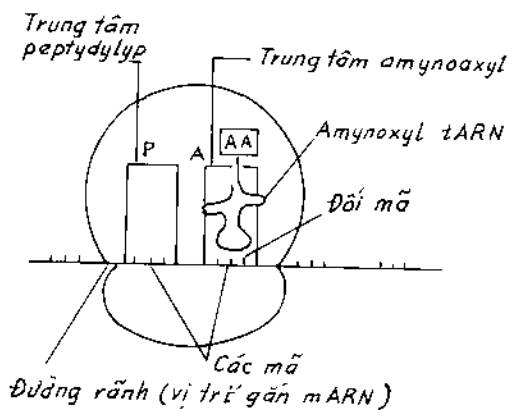
tARN được tổng hợp dựa trên khuôn mẫu là một sợi ADN nằm ngoài phạm vi hạch nhân. Sau đó chúng được chuyển ra ngoài bào tương. Chúng chiếm khoảng 15% tổng ARN của tế bào.

#### 2.4. Vai trò của ARN ribosom

rARN chiếm khoảng 80% tổng ARN của tế bào. Chúng được tổng hợp

ở hạch nhân, dựa theo khuôn mẫu là một sợi ARN. Sau đó chúng được chuyển ra màng lưới nội nguyên sinh và tham gia cấu tạo ribosom - nơi xảy ra quá trình tổng hợp protein.

Ribosom là những tiểu phần ribonucleoprotein bám vào mạng lưới nội nguyên sinh. Ribosom gồm hai đơn vị nhỏ có hàng số lằng khác nhau. Bảng 4.4 trình bày một số đặc điểm về thành phần hoá học của ribosom (bảng 4.4).



Hình 4.7. Các trung tâm của ribosom ở *E.coli*

Bảng 4.4. Thành phần hoá học của các ribosom ở tế bào nhân sơ và nhân chuẩn

Các loại ribosom	Đơn vị lớn	Đơn vị nhỏ
Ribosom của tế bào nhân sơ, loại: 70S	50S 34 protein; RNAr: 23 S RNAr: 5S	30S RNAr: 16 S 21protein
Ribosom của tế bào nhân chuẩn, loại: 80S	60S 50 protein RNAr: 28 S RNAr: 5,8S RNAr: 5S	40S 34 protein RNAr: 18 S
Ribosom của ty thể động vật, loại: 55 - 60S	40 - 45S RNAr: 16 S 70 protein	30-34S 100 protein RNAr: 12 S

Ở vi khuẩn (là những tế bào nhân sơ), ribosom là tiểu thể có hàng số lằng là 70S, trọng lượng phân tử khoảng  $3.10^6$  gồm hai đơn vị nhỏ có hàng số lằng lần lượt 50S và 30S. Hai đơn vị nhỏ này có thể tự do hoặc kết hợp với nhau thành ribosom 70S.

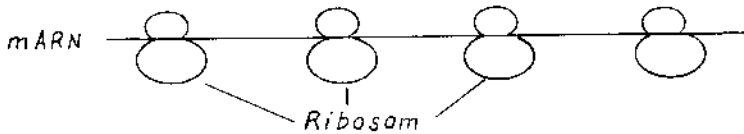
$$\text{Ribosom 70S} = \text{Ribosom 50S} + \text{Ribosom 30S}$$

Ở tế bào nhân chuẩn (thí dụ tế bào động vật), ribosom là tiểu thể có

hằng số lãng là 80S, có trọng lượng phân tử bằng khoảng  $4,5 \cdot 10^6$  và gồm hai đơn vị nhỏ 60S và 40S:

$$\text{Ribosom 80S} = \text{Ribosom 60S} + \text{Ribosom 40S}$$

- Ribosom 50S có hai vị trí A và P, vị trí A là vị trí nhận acid amin (aminoacyl), vị trí P là vị trí nhận peptid (peptidyl tARN).
- Ribosom 30S gắn mARN.
- Còn polysom là nhiều ribosom gắn vào sợi mARN (hình 4.8).



Hình 4.8. Polysom

Như chúng ta biết hiệu suất của quá trình dịch mã có khi đạt tới một triệu liên kết peptid trong một giây. Nhưng nếu để va chạm tự nhiên trong môi trường lỏng của tất cả các thành phần tham gia phản ứng thì xác suất tạo được một liên kết peptid là cực kỳ hiếm hoi. Cho nên trong thực tế các thành phần này, chủ yếu như mARN thông tin mã hoá và aminoacyl-tARN... phải được tiếp xúc với nhau thông qua mối liên kết của các thành phần ribosom (ribo-nucleoprotein) nói trên thì mới đạt được hiệu năng dịch mã cực kỳ như đã trình bày.

### 3. Các giai đoạn của quá trình sinh tổng hợp protein

Quá trình sinh tổng hợp protein (polypeptid) trải qua ba giai đoạn: giai đoạn mở đầu; giai đoạn kéo dài và giai đoạn kết thúc.

#### 3.1. Giai đoạn mở đầu

- Lần lượt trải qua bốn bước như hình 4.9.
- Ribosom 70S không hoạt động (gồm tiểu đơn vị 50S và tiểu đơn vị 30S).
- Dưới tác dụng của IF3, tiểu phần 30S tách khỏi 50S và rồi IF3 gắn với 30S và làm 30S gắn với mARN. Như vậy trên bề mặt 30S có bộ ba mặt mã AUG của mARN sẽ mã hoá cho acid amin là Met.
- Dưới tác dụng của IF1, formyl-Met-tARN và GTP gắn vào 30S.



- Dưới tác dụng của IF2, GTP thủy phân thành GDP và P giải phóng năng lượng cần thiết gắn 50S vào 30S và giải phóng ra cả ba yếu tố IF1; IF2 và IF3.

- Kết quả là formyl Met-tARN gắn vào vị trí P trên tiểu phần 50S, tương ứng với bộ ba mở đầu AUG.

### 3.2. Giai đoạn kéo dài

Giai đoạn này cũng trải qua bốn bước tiếp theo như hình 4.10.

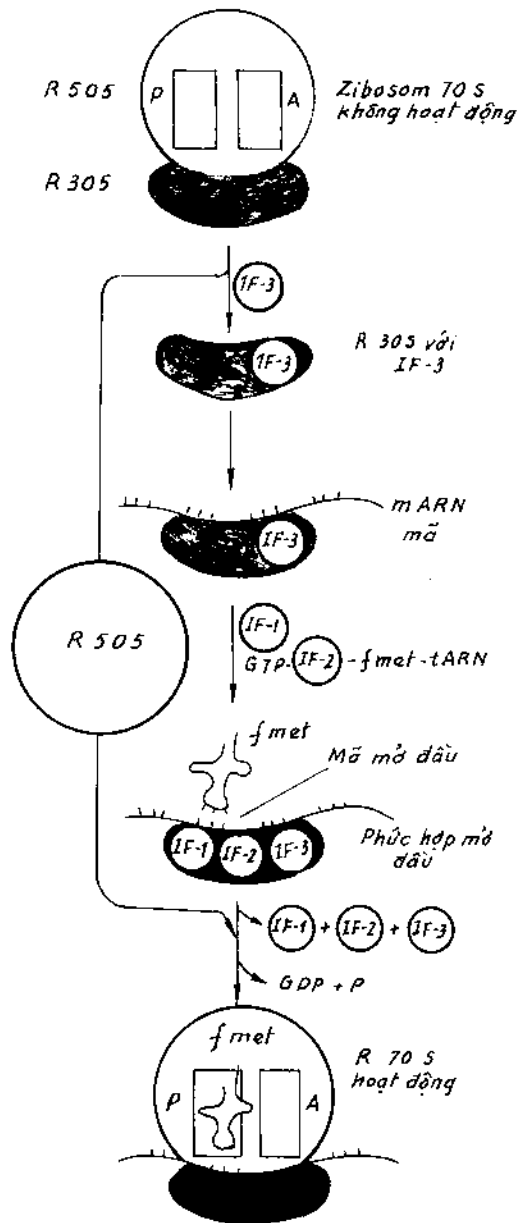
- Khi fMet-tARN gắn vào vị trí P của tiểu phần 50S thì vị trí A trống nhưng ở đó có một bộ ba mật mã tương ứng với một acid amin nào đó.

- Dưới tác dụng của EFT (Tu, Ts) aminoacyl-tARN (mà nó có bộ ba đối mã trên mARN ở vị trí A của ribosom) sẽ gắn vào ribosom.

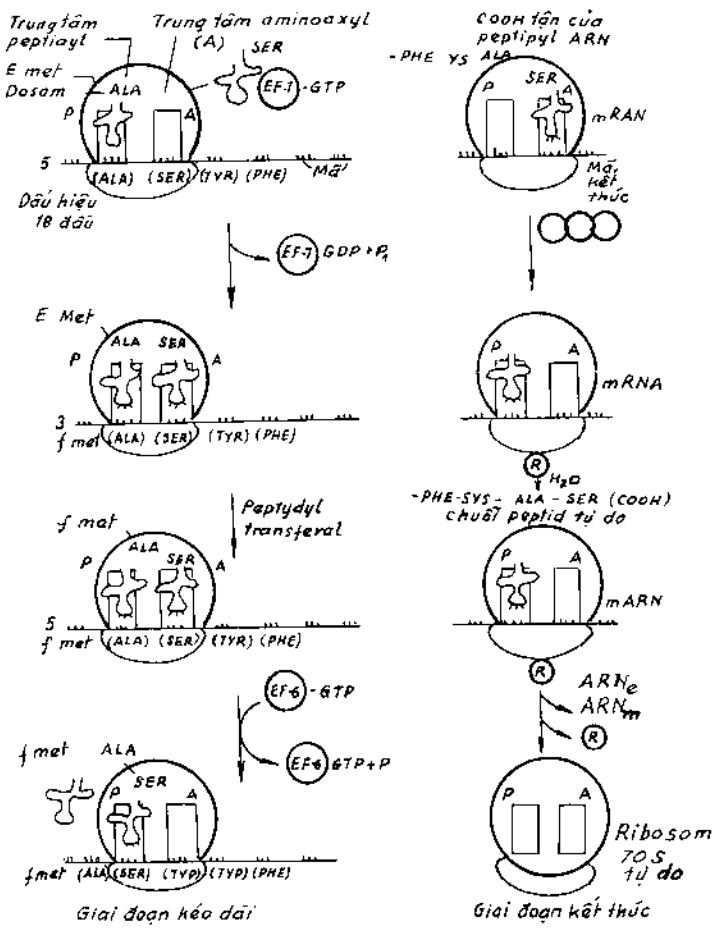
\* Năng lượng của liên kết giữa fMet với tARN bị chặt đứt vừa đủ cung cấp cho việc tạo thành liên kết peptid giữa fMet với acid amin vừa tới.

- Dưới tác dụng của EFG (G), GTP bị thủy phân giải phóng năng lượng để cung cấp cho sự chuyển vị của peptidyl-tARN (ở đây chính là f-Met-aa mới-tARN) sang khu vị trí P của ribosom.

\* Sự chuyển này chính là sự trượt của ribosom trên vị trí A. Mỗi một lần trượt tương đương với độ dài một mã (ba mononucleotid trên mARN).



Hình 4.9. Giai đoạn mở đầu



Hình 4.10. Các giai đoạn kéo dài và kết thúc chuỗi polypeptid

- Vị trí A lại trống, bộ ba mã ở khu A lại mã hoá tiếp tục với acid amin khác.

Quá trình tiếp theo lại lặp lại như trên, nhờ các yếu tố kéo dài và như vậy chuỗi polypeptid được kéo dài.

### 3.3. Giai đoạn kết thúc

- Khi xuất hiện bộ ba kết thúc UAA, UAG hoặc UGA các yếu tố kết thúc RF1, RF2, RF3 gắn vào ribosom và gây ra sự chuyển peptidyl-tARN từ

vị trí A sang P.

- Lúc này ở vị trí A chứa bộ ba kết thúc sẽ không có amino-acyl-tARN gắn vào ribosom nữa.

- Liên kết giữa polypeptid và tARN cuối cùng bị thủy phân dưới tác dụng của peptidyl transferaza. Như vậy chúng ta có polypeptid, tARN cuối, mARN tách khỏi ribosom.

- Ribosom 70S lại được tự do và trở lại giai đoạn khởi đầu tách thành 30S và 50S.

Tóm tắt bằng các thành phần cần thiết cho sự hoạt hoá acid amin, cho ba giai đoạn trong quá trình tổng hợp protein và sự hoàn thiện cuối cùng (bảng 4.5).

**Bảng 4.5. Tóm tắt các thành phần tham gia tổng hợp protein ở nhân sơ và nhân chuẩn**

Các bước	Các thành phần cần thiết ở tế bào nhân sơ	Các thành phần cần thiết ở tế bào nhân chuẩn
1. Sự hoạt hoá acid amin	20 loại acid amin 20 loại aminoacyl tARN synthetaza 20 loại hoặc nhiều hơn tARN	20 loại acid amin 20 loại aminoacyl tARN synthetaza 20 loại hoặc nhiều hơn tARN
2. Giai đoạn mở đầu	mARN Nfomylmethionyl tARN Mã AUG trên mARN ribosom 30S; 50S Các yếu tố mở đầu: IF <sub>1</sub> , IF <sub>2</sub> , IF <sub>3</sub> ; GTP, Mg <sup>++</sup>	Met-mARN Mã AUG trên mARN ribosom 40S; 60S Các yếu tố mở đầu: eIF <sub>2</sub> , eIF <sub>2a</sub> , eIF <sub>4b</sub> ; eIF <sub>4c</sub> ; eIF <sub>3</sub> ; eIF <sub>5</sub> ; GTP, Mg <sup>++</sup>
3. Giai đoạn kéo dài	Ribosom 70S hoạt động (phức hợp mở đầu) Aminoacyl-tARN tương ứng với mã Yếu tố kéo dài: EF.Tu; EF.Ts; EF.G; peptidyl transferaza; GTP, Mg <sup>++</sup>	Ribosom 80S hoạt động (phức hợp mở đầu) Aminoacyl-tARN tương ứng với mã Yếu tố kéo dài: eIF <sub>1α</sub> ; eIF <sub>1β</sub> ; eIF <sub>2</sub> ; peptidyl transferaza; GTP, Mg <sup>++</sup>
4. Giai đoạn kết thúc và tách rời	Mã kết thúc trên mARN Các yếu tố tách rời: RF <sub>1</sub> , RF <sub>2</sub> , RF <sub>3</sub> , ATP.	Mã kết thúc trên mARN Các yếu tố tách rời: eRF, peptidyl, transferaza; GTP.
5. Sự gấp khúc và hoàn thiện cuối cùng	Các enzym đặc biệt và các yếu tố cho sự tách rời của đoạn mở đầu.	Các enzym đặc biệt và các yếu tố cho sự tách rời của đoạn mở đầu.

## CHƯƠNG V

# ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG BIỂU HIỆN GEN

Biểu hiện của gen phải trải qua ba quá trình thiết yếu: *sao chép, phiên mã* và *dịch mã*. Nhưng ba quá trình này diễn ra trong tế bào luôn luôn phải thích ứng với môi trường mà môi trường thì luôn luôn thay đổi. Vậy sự biểu hiện gen phải được điều hoà để phù hợp với biến đổi của môi trường.

Điều hoà hoạt động biểu hiện gen có nhiều điểm khác nhau giữa tế bào nhân sơ và tế bào nhân chuẩn, đó là:

1. Ở *vi khuẩn*, cơ thể chỉ là một tế bào nên điều hoà biểu hiện gen ở vi khuẩn có nghĩa là điều hoà hoạt động gen ở tại tế bào đó và như vậy là để đảm nhiệm mọi chức năng sống còn của vi khuẩn. Nhưng ở cơ thể đa bào, mỗi tế bào chỉ là một bộ phận của cơ thể nên điều hoà hoạt động gen xảy ra với các yếu tố trong bản thân tế bào còn chịu sự điều hoà của toàn bộ cơ thể qua nội tiết và thần kinh. Mặt khác cơ thể đa bào có khả năng biệt hoá - nghĩa là mỗi loại tế bào chỉ đảm nhiệm một số chức năng nhất định, cho nên sự sống còn của cơ thể không phải chỉ do một tế bào quyết định như ở vi khuẩn mà phải do một tập hợp tế bào đảm nhiệm.

2. Ở *cơ thể bậc cao*, ngay bộ gen trong tế bào cũng có hàng loạt những đặc trưng riêng của nó khác với tế bào vi khuẩn. Chẳng hạn, số lượng ADN trong tế bào động vật thì lớn hơn nhiều số lượng ADN trong vi khuẩn và virus. Đồng thời trong ADN của các tế bào động vật phổ biến chứa những đoạn nucleotid được nhắc lại mà không có trong vi khuẩn. Mặt khác, tế bào động vật khác với tế bào vi khuẩn là có khả năng biệt hoá, điều đó chứng tỏ có sự thay đổi của hoạt động gen.

Dựa trên nhiều quan sát về hiện tượng này, người ta thấy có các yếu tố, đặc biệt là các loại ARN khác nhau trong các mô khác nhau, mặc dù rằng các tế bào của những mô này có một bộ gen giống hệt nhau. Người ta quan sát thấy những tế bào động vật có bộ gen bao quanh màng nhân, một phần

đoạn gen của những tế bào đó là cái khuôn đối với loại ARN riêng của mình mà không bị phiên dịch hoặc chỉ có trong vùng nhân. Ngoài ra còn có protein acid và bazo- đặc biệt là histon khu trú thể nhiễm sắc.

3. Ở vi khuẩn do không có màng nhân nên mARN được phiên mã ra tiếp xúc ngay với bộ máy dịch mã để tổng hợp protein. Sự phiên mã, dịch mã xảy ra đồng thời do đó sự điều hoà biểu hiện gen chủ yếu ở giai đoạn phiên mã. Còn ở sinh vật đa bào vì có màng nhân nên phiên mã xảy ra trong nhân, dịch mã xảy ra ngoài nhân. Mặt khác phiên mã và dịch mã không xảy ra đồng thời do đó rõ ràng sự điều hoà biểu hiện gen có những giai đoạn khác nhau và phức tạp hơn nhiều.

Dưới đây là mô hình biểu hiện gen ở tế bào nhân sơ và tế bào nhân chuẩn.

## I. MÔ HÌNH ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG BIỂU HIỆN GEN Ở TẾ BÀO NHÂN SƠ

Sự điều hoà biểu hiện gen ở tế bào nhân sơ chủ yếu xảy ra ở giai đoạn phiên mã. Cơ chế điều hoà được thực hiện chủ yếu thông qua các operon (O). Có hai loại operon: operon cảm ứng tổng hợp và operon kìm hãm tổng hợp.

Mối liên quan về mặt phân tử và tính di truyền giữa hiện tượng gây cảm ứng sinh tổng hợp enzym đã được Monod và Jacob sắp xếp thành một hệ thống như sau: trên mã di truyền ADN của nhiễm sắc thể tế bào vi sinh vật *E.coli* hoặc vi khuẩn khác có chứa ba loại gen hoạt động khác nhau.

- *Gen cấu trúc (S)* quyết định cấu trúc thứ tự của chuỗi polypeptid của enzym cần tổng hợp qua mã thông tin di truyền mà nó sẽ chuyển sao chép sang mARN (ARN thông tin).

- *Gen điều hành (O)* khởi động quá trình sao chép mARN theo mẫu gen cấu trúc ADN, vị trí của gen điều hành nằm ngay cạnh phía trước gen cấu trúc.

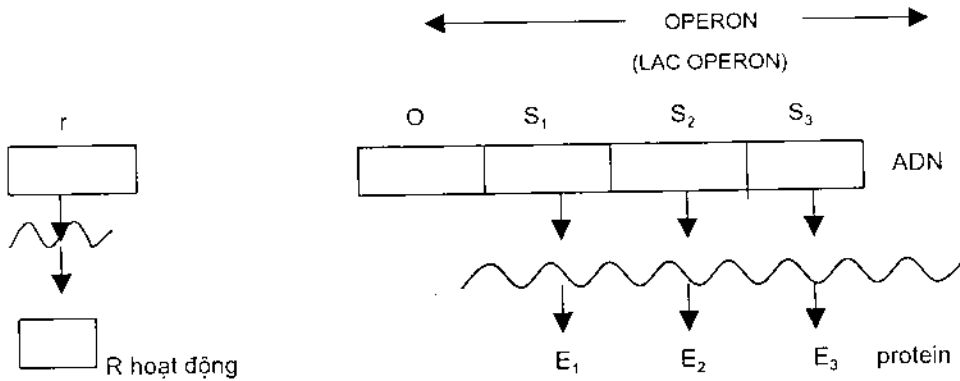
Nhiều gen cấu trúc tập hợp gắn với gen điều hành tạo thành một operon.

- *Gen điều hoà (r)* mã hoá cho sự tổng hợp một protein đặc hiệu gọi là chất kìm hãm R (repressor). Gen điều hoà nằm xa operon chứ không nhất thiết phải nằm ngay bên cạnh.

# 1. Operon cảm ứng tổng hợp

Chất điều hoà R bình thường ở trạng thái hoạt động, sẽ gắn đặc hiệu lên vị trí của gen điều hành O, kìm hãm sự sao chép của gen cấu trúc. Nếu xuất hiện trong môi trường một chất đặc biệt, ở đây gọi chất gây cảm ứng I, thì chất I sẽ gắn vào phân tử R và R không gắn được với gen điều hành O. Gen điều hành O ở trạng thái tự do sẽ tác động trên quá trình sao chép khởi động sự tổng hợp mRNA theo khuôn mẫu ADN của nhiễm sắc thể.

Một ví dụ rất quen thuộc của trường hợp gây cảm ứng tổng hợp enzym là sự tổng hợp cảm ứng  $\beta$ -galactozidaza ở *E.coli* với chất gây cảm ứng là  $\beta$ -D-galactozid (hình 5.1)



Hình 5.1. LAC OPERON

Khi I gắn với R sẽ làm cho R mất tác dụng kìm hãm và O được giải phóng sẽ cho phép quá trình sao chép mật mã và quá trình tổng hợp protein theo thông tin di truyền đã ghi lại trên mRNA.

Khi ta cho thêm  $\beta$ -D- galactozid (chất I) vào môi trường nuôi cấy tế bào *E.coli*, sẽ có sự tổng hợp không những enzym  $\beta$ -galactozidaza mà cả hai enzym có liên quan là  $\beta$ -galactozid permeaza và  $\beta$ -thiogalactozid axetyl transferaza.

Ba gen cấu trúc S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> tương ứng là z, y, a cộng với gen điều hành O hợp thành một đơn vị operon có tên là *Lac operon*.

Chất kìm hãm của R *Lac operon*, có tác dụng điều hoà quá trình tổng hợp  $\beta$ -galactozidaza cùng hai enzym có liên quan, đã được tinh chế và kết tinh từ năm 1967. Đó là một protein có phân tử lượng 150000 và được cấu

tạo bởi sự kết hợp của bốn đơn vị nhỏ.

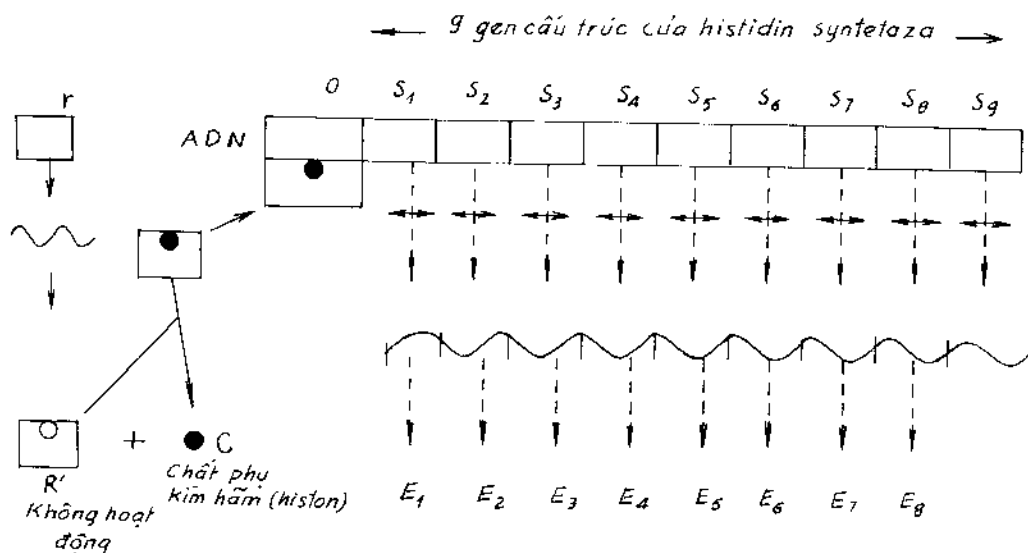
## 2. Operon kìm hãm tổng hợp

Chất kìm hãm được tạo ra trong trường hợp này mang ký hiệu là R' và bình thường nó không hoạt động vì nó đứng riêng hoàn toàn không có ái lực với operator. Khi nhân tố kìm hãm kết hợp với acid amin đặc trưng của operon sẽ làm thay đổi cấu hình không gian khiến nó có ái lực cao với operator.

Với sự có mặt của một chất gọi là phụ kìm hãm C (corepressor), R' sẽ chuyển sang dạng R hoạt động được. Phức chất này sẽ gắn vào vị trí đặc hiệu của gen điều hành O, chặn tác động của gen điều hành này trên quá trình sao chép gen cấu trúc.

Một ví dụ thường được nêu nên trong trường hợp kìm hãm tổng hợp enzym là sự kìm hãm tổng hợp histidin syntetaza bởi sự có mặt của histidin (histidin là chất phụ kìm hãm C).

Operon sinh tổng hợp histidin đã được tách từ *S.typhimurim*. Nó bao gồm chín gen cấu trúc mã hoá cho cùng một hoạt động xúc tác quá trình



**Hình 5.2. Operon kìm hãm tổng hợp histidin syntetaza bởi histidin**

C: Chất phụ kìm hãm, khi nó gắn vào R' sẽ chuyển thành dạng phức chất R hoạt động.  
R: gắn với O và chặn sự sao chép 9 gen cấu trúc của histidin syntetaza không có sự tổng hợp enzym nữa.

sinh tổng hợp histidin. Sự có mặt của histidin trong môi trường nuôi cấy sẽ kìm hãm sự tạo thành tất cả chín enzym cần thiết cho việc tổng hợp histidin.

Một kiểu operon kìm hãm tổng hợp khác là operon tryptophan (hình 5.2).. Khi trong môi trường có tryptophan, repressor kết hợp với tryptophan gắn lên operator. Các gen cấu trúc của operon không được phiên mã. Khi môi trường thiếu tryptophan, repressor không gắn được vào operator do đó operator thúc đẩy tổng hợp các enzym tạo tryptophan.

## II. MÔ HÌNH ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG BIỂU HIỆN GEN Ở TẾ BÀO NHÂN CHUẨN

### 1. Sự khác biệt về mô hình điều hoà hoạt động biểu hiện gen

Sự điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở tế bào nhân chuẩn khác biệt lớn so với tế bào nhân sơ cả về tín hiệu cũng như cơ chế điều hoà. Bảng 5.1 chỉ ra sự khác biệt đó.

**Bảng 5.1. Sự khác biệt về điều hoà hoạt động biểu hiện gen giữa tế bào nhân sơ và tế bào nhân chuẩn**

Sự điều hoà hoạt động biểu hiện gen	Tế bào nhân sơ	Tế bào nhân chuẩn
Tín hiệu điều hoà	Các yếu tố tín hiệu gồm: - Yếu tố dinh dưỡng và yếu tố vật lý của môi trường.	Các phân tử tín hiệu gồm các hocmon và các nhân tố tăng trưởng được sản sinh ra từ các cơ quan chuyên biệt rồi di chuyển đến cơ quan đích điều chỉnh biểu hiện gen theo chương trình định sẵn cho phù hợp với sự phát triển cơ thể.
Cơ chế điều hoà	Chủ yếu ở giai đoạn phiên mã và cơ chế điều hoà biểu hiện gen thông qua các operon.	Điều hoà biểu hiện gen thể hiện trong mọi giai đoạn như: phiên mã, dịch mã, sau dịch mã và cơ chế điều hoà thay đổi theo mọi giai đoạn đó.

### 2. Cơ chế điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở tế bào nhân chuẩn

Cơ chế điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở tế bào nhân chuẩn thì phức tạp hơn và bao gồm nhiều giai đoạn, đó là:



- Điều hoà bằng cách biến đổi cấu trúc nhiễm sắc chất hay cấu trúc phân tử ADN.

- Điều hoà ở giai đoạn phiên mã: kiểu dạng Cis và kiểu dạng Trans.

- Điều hoà ở giai đoạn dịch mã.

- Điều hoà ở giai đoạn sau dịch mã.

Đặc biệt trong điều hoà ở giai đoạn phiên mã, chúng tôi sẽ giới thiệu một mô hình điều hoà hoạt động gen có ở cơ thể đa bào bậc cao và liên quan tới vấn đề này chúng tôi cũng sẽ giới thiệu mô hình điều hoà biểu hiện gen thông qua màng tế bào.

Dưới đây sẽ trình bày chi tiết các vấn đề mô hình điều hoà hoạt động biểu hiện gen đó:

## **2.1. Điều hoà hoạt động biểu hiện gen bằng biến đổi cấu trúc**

### *a. Biến đổi cấu trúc nhiễm sắc chất*

Nhiễm sắc chất là cấu trúc liên kết của ADN và protein trong thời kỳ hai lần phân chia của tế bào. Khi sự phân chia nhân bắt đầu, người ta thấy nhiễm sắc chất chứa nhiều vùng "nhạy cảm". Các vùng đó chính là tương ứng với các gen hoạt động của tế bào. Khi cần biểu hiện, các gen đó sắp xếp lại trong một cấu trúc nhiễm sắc chất đặc trưng thuận lợi cho quá trình sao chép của phiên mã.

Đó cũng chính là sự điều hoà đầu tiên bằng cách biến đổi cấu trúc. Điển hình của kiểu điều hoà biến đổi này được biết rõ là gia đình các gen  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\beta$  của beta-globin. Các gen này được sắp xếp lại liền nhau trong một cấu trúc nhiễm sắc chất đặc trưng. Ở đầu 5' của cấu trúc nhiễm sắc chất có trình tự gọi là LCR (locus control region).

Trình tự này chịu trách nhiệm điều hoà hoạt động biểu hiện của các beta globin. Nó mang bốn vị trí nhạy cảm có khả năng tiếp nhận các protein điều hoà để phát động việc hoạt động phiên mã.

### *b. Biến đổi phân tử ADN*

Đó là sự metyl hoá xảy ra trên gốc cytosin nằm trong cặp CG ở đầu 5' sẽ làm giảm hoạt động phiên mã.

Cũng có một số gen chỉ biểu hiện được khi có sự sắp xếp lại trình tự ADN như các gen của kiểu giới tính ở nấm men.

## 2.2. Điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở giai đoạn phiên mã

Trong giai đoạn này biểu hiện hai kiểu điều hoà hoạt động biểu hiện gen

1. Điều hoà kiểu dạng *cis*, tức là bản thân các trình tự ADN tham gia vào quá trình biểu hiện gen.

2. Điều hoà kiểu dạng *trans*, tức là các protein điều hoà tương tác vào các trình tự ADN để biểu hiện gen.

### a. Điều hoà dạng *cis*

Các trình tự ADN tham gia vào quá trình biểu hiện gen gồm có: promotơ (promoter), enhanxơ (enhancer) và silenxơ (silencer). Bảng 5.2 phân biệt ba trình tự đó.

**Bảng 5.2. Điều hoà dạng Cis**

Các trình tự Cis	Trình tự promoter	Trình tự enhancer	Trình tự silencer
Vị trí và cấu trúc	<ul style="list-style-type: none"><li>- Trình tự nằm ở vùng đầu 5' (vùng không phiên mã của gen)</li><li>- Cách xa vùng phiên mã có khi hàng ngàn cặp bazơ.</li><li>- Cấu trúc gồm hai phân tử đối ứng nhau vì chính các trình tự này lại kết hợp với protein điều hoà dạng dimer.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Trình tự ở đầu 5' hoặc 3' hoặc ở giữa hoặc ngay trong intron.</li><li>- Hướng xuôi hay đảo ngược cũng không làm mất hoạt tính.</li></ul>	Trình tự vị trí cũng giống enhancer
Vai trò	<ul style="list-style-type: none"><li>- Điều khiển sự phiên mã của gen (gen nào trong tế bào được biểu hiện thời điểm biểu hiện, và chịu sự tác dụng của nhân tố điều hoà nào).</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Gọi là nhóm trình tự khuếch đại nghĩa là làm tăng biểu hiện của gen lên.</li></ul>	Gọi là nhóm trình tự dập tắt, tức là kìm hãm hay dập tắt sự biểu hiện của gen.

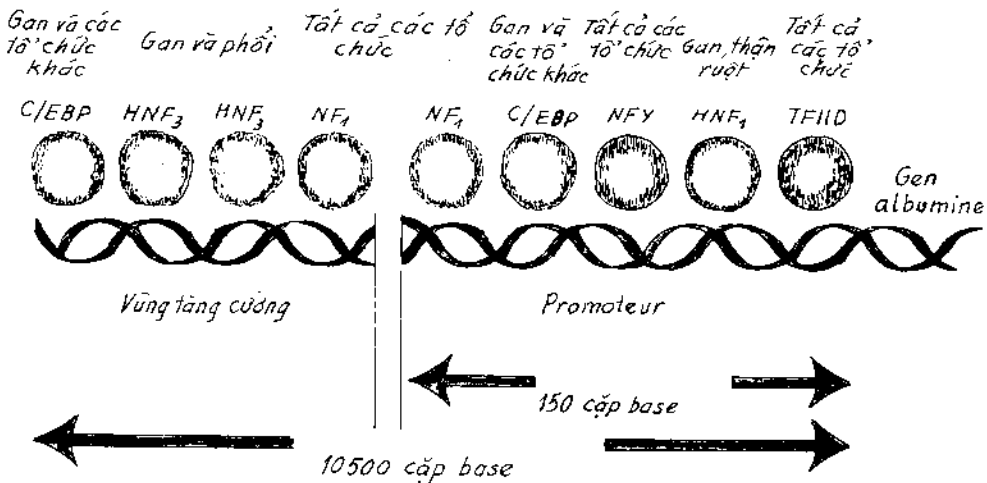
### b. Điều hoà dạng *trans*

Các nhân tố protein tham gia vào quá trình điều hoà hoạt động biểu hiện gen gọi là protein điều hoà hay còn gọi là nhân tố *trans*. Các nhân tố này có nhiều vùng cấu trúc chức năng độc lập nhau như vùng chịu trách nhiệm gắn nhân tố *trans* vào trình tự ADN ở gần gen cấu trúc; vùng tác động lên phiên mã bằng cách thay đổi hoạt động của ARN polymeraza; vùng gắn hocmon; vùng gắn các ion để trả lời những tín hiệu xuất phát ở ngoài hoặc

trong tế bào từ đó ảnh hưởng tới hoạt động của gen.

Bộ gen đơn bội ở người có khoảng 30.000 – 40.000 gen. Mỗi một protein được mã hoá trong một gen, tức là một đoạn ADN. Tất cả các gen trong một cơ thể đa bào không cùng được mã hoá, bởi vì như vậy tất cả các tế bào sẽ không khác gì nhau. Điều này thực tế cũng đã không xảy ra. Người ta coi bộ gen đơn bội như một bộ sách lớn, mỗi trang là một gen. Mỗi tế bào là một cuốn sách. Phương thức đọc bộ sách này được giám sát một cách chặt chẽ, đến mức mỗi một loại tế bào chỉ đọc một số trang nào đó. Việc giám sát đó chính là “protein điều hoà”.

Một protein điều hoà có thể tác động lên nhiều gen và một gen chịu ảnh hưởng của nhiều protein điều hoà. Các protein điều hoà nhận biết chính xác ADN và cố định vào ARN nhờ các dạng cấu trúc đặc biệt của nó tạo thành vùng cố định, tại đó các protein điều hoà sẽ liên kết với các vị trí tương ứng trên ADN bằng những liên kết yếu như liên kết hydro, liên kết Van-der Waals... Trong protein điều hoà còn có vùng tác động, chính vùng này hoạt hoá ARN polymerase nhưng vùng này còn ít được biết đến.



**Hình 5.3.** Mỗi một gen chịu sự điều khiển của nhiều protein điều hoà

Gen albumin được trang bị bởi nhiều đoạn điều hòa ở gần gen hoặc ở cách xa vùng gen gọi là enhancer. Trên mỗi đoạn được cố định một protein điều hòa như HNF<sub>1</sub>, NFY... Những protein này chỉ cùng có mặt trong gan, ở đó gen của albumin được bộc lộ và hoạt động.

Thí dụ sự điều hoà tổng hợp albumin ở tế bào gan chịu sự điều khiển của nhiều protein điều hoà (hình 5.3). Gen albumin có nhiều đoạn điều hoà ở gần gen hoặc ở cách xa vùng gen cấu trúc gọi là vùng tăng cường. Trên mỗi đoạn được cố định một protein điều hoà như HNF<sub>1</sub>, NFY... những protein này chỉ có mặt trong gan, chỉ ở trong gan có đầy đủ các protein điều hoà gen albumin mới hoạt động tổng hợp ra albumin.

*c. Sự tương tác cis-trans*

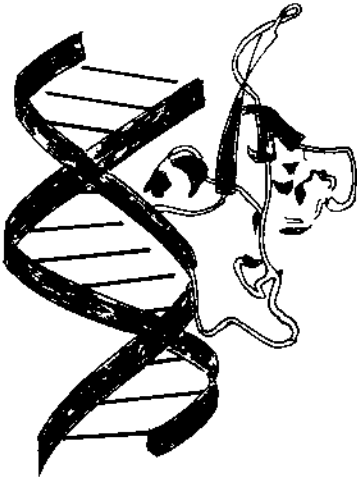
Trình tự cis và nhân tố trans có thể tương tác đặc hiệu do sự tạo thành những liên kết yếu giữa các nucleotit của nhân tố trans và các bazơ của trình tự cis.

Vì phân tử ADN có cấu trúc xoắn kép cố định trong không gian nên các nhân tố trans cũng phải có cấu trúc không gian cố định tương ứng thì mới đạt được sự tương tác bền vững đó là cấu trúc như đã giới thiệu ở trên xoắn - vòng - xoắn (helix - turn - helix), xoắn - nút - xoắn (helix - loop - helix) hoặc ngón tay kềm (zinc - finger) hoặc dây kéo dimer (leucine - zipper) v.v... Các cấu trúc này ở dạng dimer khi gắn lên trình tự cis (hình 5.4, 5.5, 5.6 và 5.7).

Dưới đây là bảng các dạng protein điều hoà (bảng 5.3)

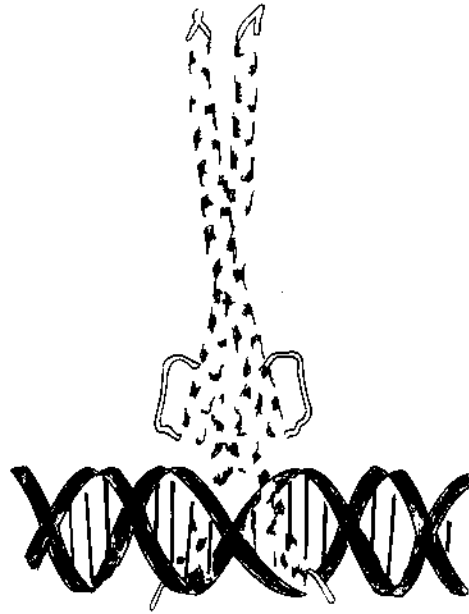
**Bảng 5.3. Các dạng protein điều hoà**

TT	Đặc điểm Các dạng protein điều hoà	Đặc điểm cấu trúc	Thí dụ, chức năng
1	Dạng "xoắn-vòng-xoắn" (Helix-turn-helix)	Protein có cấu hình không gian xoắn-vòng-xoắn để vững chắc.	Protein HNF <sub>3</sub> trong hoạt hoá operon ở gan
2	Dạng "xoắn-nút-xoắn" (Helix-loop-helix)	Protein có cấu hình không gian xoắn-nút-xoắn.	Protein MAX kiểm tra sự biệt hoá và tăng sinh tế bào cơ.
3	Dạng "ngón tay kềm" (Zinc-finger)	Protein có chứa nguyên tố Zn bao quanh bởi bốn acid amin.	- Protein GATA <sub>1</sub> tham gia biệt hoá globin hồng cầu. - Protein thụ thể của hormone steroid.
4	Dạng "dây kéo lợxin" (Leucine - zipper)	Protein có chứa lợxin dạng dây kéo fermetur	- Protein GCN <sub>4</sub> tham gia chuyển hoá acid amin ở men bia. - Protein Jun và protein Fos kiểm tra sự tăng sinh tế bào.



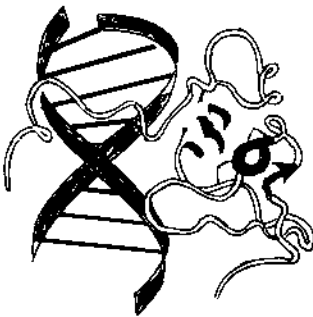
**Hình 5.4. Protein điều hòa HNF<sub>3</sub>**

có dạng "xoắn - vòng - xoắn" HNF<sub>3</sub>, có vai trò trong việc phân hóa chức năng của tế bào gan (tổng hợp albumin).



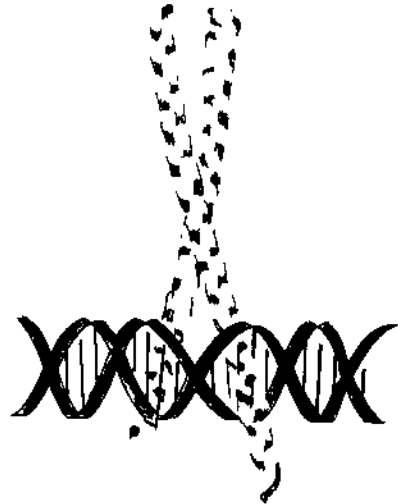
**Hình 5.5. Protein điều hòa MAX**

có dạng "xoắn - nút - xoắn" kiểm tra sự tăng sinh và sự biệt hóa của tế bào.



**Hình 5.6. Protein điều hòa GATA<sub>1</sub>**

có dạng "Zinc-finger" tham gia vào sự biệt hóa của những globin hồng cầu



**Hình 5.7. Protein điều hòa GCN<sub>4</sub>**

có dạng "Fermeture éclair à leucines" tham gia vào sự chuyển hóa các acid amin ở men bia

Hoạt động của hocmon (hormon) trên biểu hiện gen hocmon tuyến giáp, hocmon steroid phải thông qua thụ thể của chúng. Các thụ thể hocmon này gắn vào trình tự cis của gen đích. Khi có hocmon gắn vào vùng tiếp nhận hocmon của thụ thể, sẽ làm thay đổi cấu hình thụ thể dẫn đến hoạt hoá gen đích (đó chính là do thay đổi cấu hình không gian của thụ thể).

*- Sự tương tác protein - protein*

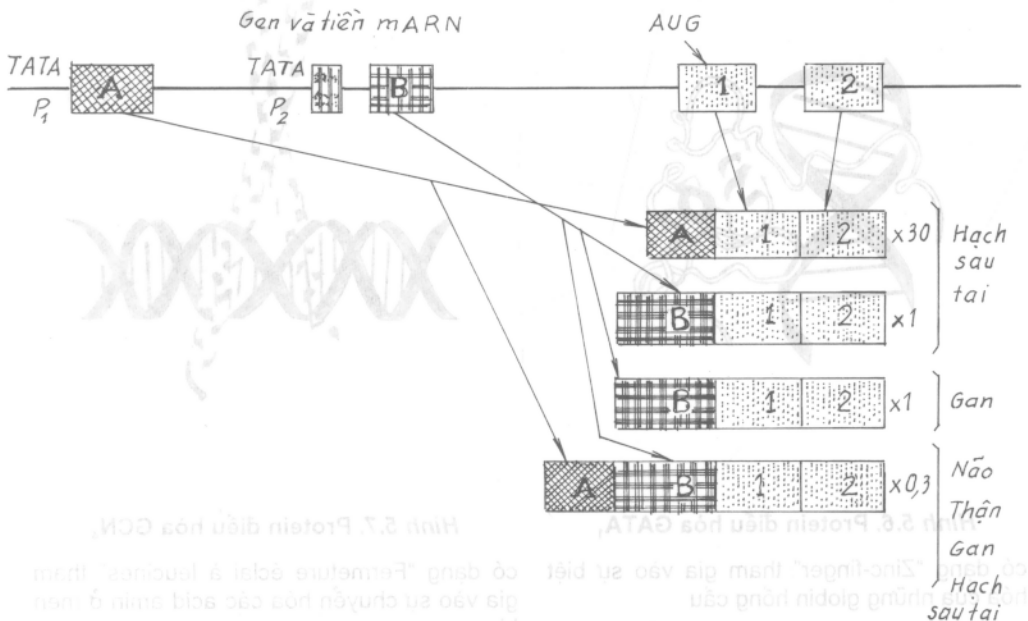
Protein trans một mặt gắn vào trình tự cis ở đầu 5' của gen đích, mặt khác tương tác với những protein điều hoà khác.

Sự tương tác giữa protein trans và các protein điều hoà khác cùng với sự gặp lại của nhiễm sắc chất sẽ tạo ra một cấu trúc thuận lợi cho sự gắn enzym ARN polymeraza vào promotơ của gen đích. Lúc đó sự phiên mã của gen đích bắt đầu.

*- Điều hoà hoạt động biểu hiện gen bằng chọn lọc promotơ*

Đây cũng là kiểu điều hoà ở tế bào nhân chuẩn dựa vào sự tương tác cis - trans nhưng cơ chế hơi khác là điều hoà bằng chọn lọc promotơ.

Điển hình là gen  $\alpha$  - amylaza, gen này có hai promotơ, mỗi promotơ có hoạt tính phiên mã khác nhau và chịu trách nhiệm phiên mã một loại mARN nhất định đặc trưng cho mô (hình 5.8).



**Hình 5.8. Mô hình điều hoà biểu hiện gen  $\alpha$ - amylaza**

Còn sự chọn lọc promotor hoạt động lại tùy thuộc các nhân tố trans hiện diện trong từng loại mô ấy. Như vậy chính sự tương tác giữa trình tự cis và nhân tố trans đặc trưng cho mô sẽ quy định loại mARN được phiên mã ở đó.

#### - Các chất ức chế sự tổng hợp ARN

Người ta biết một số chất ức chế sự sao chép ARN là cơ sở nhân chuẩn giống như rifampicin ức chế ARN polymeraza ở vi khuẩn, đó là:

+ Alpha manitin ức chế ARN polymeraza ở tế bào có nhân, mà chất này có trong nấm độc *Amanita phalloid* ức chế các enzym, ARN polymeraza tổng hợp mARN, rARN, tARN với nồng độ khác nhau.

+ Actinomycine D có nhân phenoxazone. Nếu nó chêm vào giữa hai bazơ guanin và cytosin gây ra sự biến dạng ADN khuôn, ngăn trở sự chuyển dịch của ARN polymeraza trong tổng hợp ARN.

### 2.3. Điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở giai đoạn sau phiên mã

mARN vừa được phiên mã ra không được dịch mã ngay mà phải trải qua một chặng đường dài để trưởng thành. Ở chặng đường này có nhiều cơ chế để điều hoà về chất cũng như về lượng các mARN sẽ được dịch mã. Đó là:

- Loại bỏ intron và cách nối exon của mARN cũng là một kiểu điều hoà sự ghép nối khác biệt các exon của mARN sơ cấp để dẫn tới mARN có thể đưa đến hình thành các mARN để dịch mã khác nhau và do đó dẫn đến các protein tạo thành có chức năng biểu hiện khác nhau.

- Gắn đuôi poly A làm cho mARN trưởng thành ở thể ổn định.

- Làm tăng khả năng dịch mã nhờ khởi sự dễ dàng.

- Gắn mã chạp 7 - metyl guanin làm cho mARN càng bền vững càng sống lâu thì số lượng protein tương ứng được sản sinh ra càng nhiều. *Điều này có liên quan đến khả năng sinh sản vô tận của tế bào ung thư.*

- Sự dự trữ các mARN trong các tế bào cũng là một phương tiện điều hoà. Có gen phiên mã ra mARN nhưng mARN đó được dự trữ chờ thời cơ có tín hiệu xuất hiện thì mARN ở đó mới được dịch ra.

### 2.4. Điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở giai đoạn dịch mã

Dịch mã là một dạng tiêu thụ dự trữ mARN. Tăng cường dịch mã để

hình thành nhiều các protein có chức năng hoạt động trong tế bào. Đó cũng là một cách điều hoà hoạt động biểu hiện gen.

Quá trình điều hoà này phụ thuộc nhiều vào các yếu tố mở đầu (IF), yếu tố kéo dài (EF) và yếu tố kết thúc (RF) mà trong phần sinh tổng hợp protein đã giới thiệu.

### 2.5. Điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở giai đoạn sau dịch mã

Các protein được tạo ra sau dịch mã có thể trải qua nhiều giai đoạn hoàn thiện hoá học như glycosyl hoá, phosphoryl hoá, axetyl hoá... xoắn alpha, xoắn beta, tạo cấu trúc bậc hai, bậc ba, bậc bốn v.v... để có chức năng thực sự trong tế bào đòi hỏi phải có sự điều hoà hoạt động rất tinh vi và phức tạp.

*Chú ý:* Ngoài các loại cơ chế điều hoà hoạt động trên còn có cơ chế làm suy yếu sự sao chép và cơ chế SOS (cơ chế cấp cứu ngừng ngay sự sao chép một cách khẩn cấp).

## III. MÔ HÌNH ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG BIỂU HIỆN GEN Ở CƠ THỂ ĐA BÀO BẬC CAO

Các thành phần cis và trans và sự tương tác giữa chúng trong quá trình phiên mã được sắp xếp trong một mô hình điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở cơ thể đa bào bậc cao đã được Georger, Britten và Davidson (1969) mô tả trong cuốn sách "*Tế bào và sự phát triển*" xuất bản năm 1981. Ở đây sẽ trình bày vắn tắt, nhấn mạnh một số điểm chính của các mô hình này:

Bộ gen trong tế bào của cơ thể đa bào bậc cao có hàng loạt những đặc trưng riêng của nó khác với tế bào vi khuẩn. Chẳng hạn:

- số lượng gen nhiều gấp bội;
- các gen này đều kết hợp với protein;
- khu trú trong nhân và có màng nhân bao bọc;
- có nhiều đơn vị nhân lên đồng thời (replicons);
- có thể dễ dàng trao đổi những đoạn gen trong thời kỳ phân bào giảm nhiễm.

Ngay tổ chức phân tử của bộ gen tế bào cơ thể bậc cao cũng khác với vi khuẩn.



- chứa nhiều những đoạn ADN nhắc lại (tỷ lệ coi là 1);
- chứa ARN nhân (0,05 - 0,25);
- chứa protein kiềm như histon (tỷ lệ 0,7 - 1);
- chứa các protein acid (tỷ lệ 0,25 - 1).

Những đặc điểm riêng kể trên của tổ chức bộ gen ở tế bào cơ thể bậc cao đưa đến giả thuyết rằng, cơ chế điều hoà hoạt động gen ở những tế bào này thì khác với cơ chế điều hoà hoạt động gen ở vi khuẩn.

Trong những năm gần đây, sự điều hoà hoạt động gen ở cơ thể bậc cao được hướng về vai trò của histon, các ADN nhắc lại, các protein acid và các ARN nhân vì bốn lý do sau đây:

- Chúng là những thành phần phân tử, được sắp xếp cấu tạo nên bộ máy di truyền của tế bào bậc cao.
- Chúng có mặt ở gen thường xuyên.
- Chúng được sản xuất ra bởi gen.
- Chúng có thể tham gia vào các hoạt động của gen theo một cơ chế lý hoá xác định.

Năm 1969, Britten và Davidson đã nêu ra một mô hình giả thuyết về điều hoà hoạt động gen ở cơ thể bậc cao. Trong mô hình này kết cấu hoạt động có hai kiểu:

*Kiểu 1*, gồm nhiều gen tiếp nhận và một gen hợp nhất nằm trong một hệ thống gen tham gia điều hoà và tổng hợp một loại protein nhất định.

*Kiểu 2*, ngược lại, tổ chức hệ thống gen là bao gồm một gen tiếp nhận và nhiều gen hợp nhất.

Cả hai kiểu bố trí đó của mô hình đã giải thích rõ sự có mặt của những phân tử ARN nhân và ADN nhắc lại. Một lượng lớn những đoạn nucleotit được nhắc lại đây có thể đóng vai trò của những gen đồng hoá hay tiếp nhận trong mô hình hai kiểu này.

Trong số những khái niệm khác, còn có giả thuyết tổ chức chức phận gen của Georgiev (1969). Trong mô hình này những gen điều hoà liên lạc với gen cấu trúc qua các phân tử protein điều hoà. Điểm giống nhau của mô hình này với mô hình của Britten và Davidson ở chỗ chỉ ra được vai trò những đoạn nucleotit nhắc lại trong bộ gen. Những đoạn đó nằm trong vùng *gen điều hoà*. Điểm khác nhau giữa hai mô hình là chất điều hoà hoạt động

các gen trong mô hình Georgiev là các protein điều hoà, còn ở mô hình Britten và Davidson là những phân tử ARN nhân.

Nhìn chung, mỗi một mô hình tổ chức chức phận gen nói trên đều chú ý đặc biệt đến phân tử ADN nhắc lại. Còn ARN nhân, các protein điều hoà thì có mô hình đề cập chất này, có mô hình đề cập chất kia. Vì vậy, sự thật ra còn rất nhiều sự kiện đòi hỏi phải làm sáng tỏ.

Hiện nay, dựa trên những tài liệu thu thập được từ các lĩnh vực nghiên cứu khác nhau của sinh học phân tử ta có thể hình dung một sự điều hoà hoạt động gen ở cơ thể bậc cao với sự tham gia của các thành phần phân tử ADN nhắc lại, ARN nhân, histon và protein acid. Các phân tử này đã được phân tích kỹ mặt lý học, hoá học và cấu trúc dưới kính hiển vi điện tử. Sự chuyển hoá và vai trò sinh học của chúng cũng được nghiên cứu tỷ mỉ. Dựa vào những thành tựu đó, một mô hình điều hoà chức phận gen có thể được tổ chức hoạt động như sau:

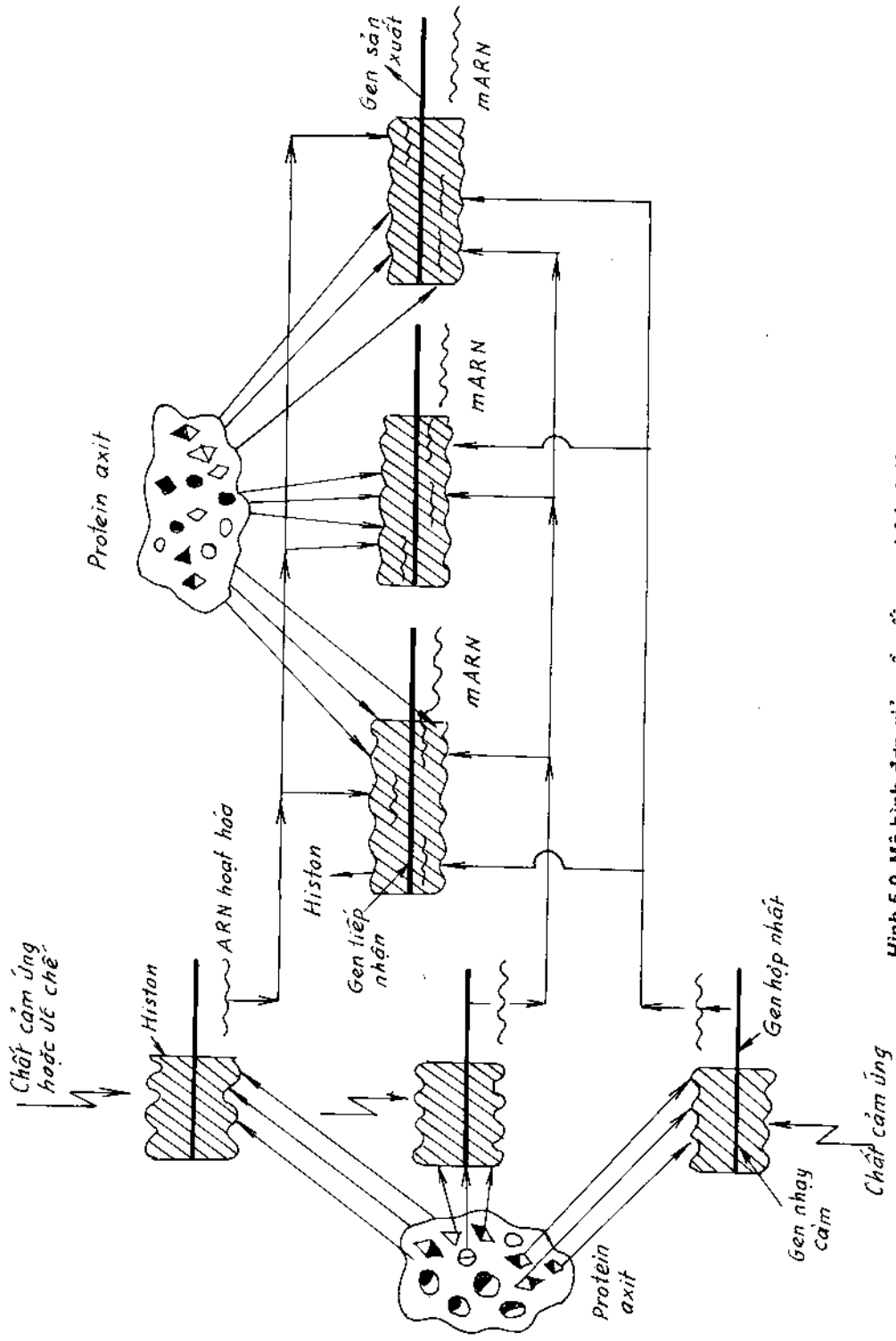
Về phương diện tổ chức hệ thống điều hoà thì mô hình gồm các loại gen khác nhau, các phân tử điều hoà khác nhau, các chất gây cảm ứng và ức chế và các sản phẩm của các hoạt động gen.

Các gen khác nhau được mô tả trong mô hình (hình 5.9) làm người ta nhớ lại một mô hình gồm một gen hợp nhất và nhiều gen tiếp nhận của Britten và Davidson, nghĩa là mô hình gồm bốn loại gen:

- gen nhạy cảm;
- gen hợp nhất;
- gen tiếp nhận;
- gen sản xuất.

Song, trên bản đồ kết cấu hệ thống điều hoà hoạt động gen thì mỗi gen nhạy cảm đi liền với mỗi gen hợp nhất, còn mỗi gen sản xuất lại dính liền với mỗi gen tiếp nhận.

Các phân tử điều hoà bao gồm histon acginin bao phủ theo gen nhạy cảm và gen tiếp nhận, còn phân tử histon giàu lizin thì cắt ngang các gen, duy trì cấu trúc xoắn đôi của ADN. Protein acid và các enzym thì đi vào các gen ở chỗ có mặt của histon. ARN nhân - loại phân tử nhỏ - sản phẩm của gen hợp nhất thì đi vào các gen tiếp nhận.



Hình 5.9. Mô hình đơn giản về mối quan hệ hai dòng gen mạng

Các chất gây cảm ứng và ức chế là những chất nội tiết, chất cảm ứng bào thai, chất gây phân bào, v.v... đi vào và kích thích phức hợp của histon giàu arginin và gen nhạy cảm.

Còn sản phẩm hoạt động của các gen là các loại ARN. ARN nhân phân tử nhỏ là sản phẩm của gen hợp nhất, ARN nhân phân tử lớn không đồng nhất là sản phẩm của các gen tiếp nhận và ARN thông tin là sản phẩm của gen sản xuất.

## 1. Nguyên tắc hoạt động của mô hình

Các dấu hiệu từ ngoài vào liên kết với histon acginin ở gen nhạy cảm theo hiệu ứng dị không gian và làm thức tỉnh gen này trong tình trạng đang ngái ngủ. Do đó toàn bộ hệ thống gen trong tình trạng mở. Lúc đó protein acid bao gồm cả ARN polymeraza được tích tụ ở gen hợp nhất. Gen này được kích thích và sản xuất ra SnARN. Sau đó các SnARN đồng thời với protein acid được chuyển tới các gen tiếp nhận, mà ở đây có histon giàu acginin loại khác (chẳng hạn F2a1) sẽ bị biến đổi. Những gen tiếp nhận được giải phóng và SnARN có thể nhận biết được chính gen của mình và do đó HnARN được sản xuất và ARNm càng được tạo ra qua gen sản xuất HnARN có thể là chất tiền thân của SnARN, nhưng cũng có thể đóng vai trò khác là mã hoá những protein điều hoà trong vùng nhân chẳng hạn.

## 2. Một số nhận xét về mô hình

Mô hình nói trên biểu hiện một cách chặt chẽ hơn trong hoạt động điều hoà gen. Một biểu hiện cụ thể là không có một gen nào trong hệ thống là không được kiểm tra. Có sự điều hoà tại chỗ trong những gen dính kết nhau trên bản đồ gen bởi histon và protein acid, đồng thời cũng có một sự điều hoà chung trong toàn bộ hệ thống và nhiều hệ thống bởi SnARN. Như vậy sự điều hoà tại chỗ phụ thuộc vào sự điều hoà của toàn bộ hệ thống. Cả hai sự điều hoà (tại chỗ của mỗi gen và toàn bộ hệ thống của nhiều gen) thì lại phụ thuộc bởi dấu hiệu của môi trường bên ngoài (phân bào tương). Như vậy mô hình này thiết lập từng bước của sự điều hoà.

Ở cơ thể sinh vật cần phải có một cơ chế điều hoà phức tạp và chặt chẽ nói trên để bảo vệ nói giống và phát triển một cách bình thường trong môi trường mà ở đây thường xuyên có nhiều những yếu tố thuận lợi hoặc không thuận lợi đối với các gen. Ở đây còn biểu hiện rằng, bên cạnh chức phận điều hoà, histon còn đóng một vai trò làm bền và bảo vệ những gen quan

trọng trong hệ thống di truyền.

Trong mô hình này, sự thật ra gen nhạy cảm và histon giàu acginin thì quan trọng bậc nhất trong hệ thống điều hoà. Những phần còn lại của hệ thống thì chỉ hoạt động với vai trò thụ động. Gen nhạy cảm thì có khả năng phân phối dấu hiệu đơn giản đến một gen sản xuất bởi sử dụng những đường mạch như đã chỉ ra trong mô hình, mà dấu hiệu đó là một phần của chương trình đã được chương trình hoá sẵn từ bào thai. Histon giàu acginin bao phủ lên gen nhạy cảm thì có hiệu ứng dị không gian.

Điểm trung tâm của giả thuyết này là vai trò của bốn phân tử: ADN nhắc lại, ARN nhân, histon và protein acid. Những phân tử này đã thể hiện được vai trò của chúng trong mô hình tổ chức và điều hoà hoạt động gen này.

Mô hình hiện nay cũng nói lên được mối quan hệ chặt chẽ giữa nhân, bào tương và môi trường bên ngoài tế bào tác động qua lại trên hệ thống gen. Bởi vì sự hoạt động được của các gen trong hệ thống điều hoà phải lệ thuộc vào các chất cảm ứng, ức chế từ ngoài, các phân tử protein điều hoà từ bào tương vào nhân, v.v...

Những điều khác nhau của mô hình này với các mô hình trước đây cũng đã được xác định rõ. Mô hình của Britten và Davidson thì chú ý nhiều đến phân tử ADN nhắc lại, ARN nhân và đặc biệt là vai trò của ARN nhân trong điều hoà. Mô hình của Georgiev thì xác định vai trò của ADN nhắc lại và protein acid. Còn mô hình hiện nay đều chú ý đến cả bốn loại phân tử tham gia trong tổ chức hình thái của thể nhiễm sắc.

Trong mô hình hiện nay, mức độ thông tin được phóng đại gấp bội - mà điều đó không tìm thấy trong mô hình của Jacob và Monod. ở đây một dấu hiệu thì được trả lời nhiều hướng. Điều đó có nghĩa là một dấu hiệu có thể kéo theo nhiều hoạt động enzym và một hoạt động enzym thì lại kéo theo nhiều dấu hiệu.

Sự trả lời đa hướng trong đa bào, hình như được biểu hiện ở vai trò của histon acginin vì hiệu ứng dị không gian của nó. Ở đây vai trò của histon acginin rất giống như vai trò của chất áp chế trong mô hình của Jacob và Monod. Như vậy có thể nghĩ rằng chất áp chế trong mô hình Jacob và Monod tuy không phải là histon, nhưng có lẽ giống histon. Thêm vào đó hệ điều hoà này về cơ bản không khác với hệ điều hoà trong vi khuẩn vì nó cũng có hệ gen điều hoà và hệ gen thông tin. Từ những bằng chứng đó có thể

nghĩ rằng: tế bào vi khuẩn là tổ tiên của những tế bào đa bào.

Một điều nữa cũng cần phân biệt ở đây là hệ gen ở vi khuẩn theo Jacob và Monod thì luôn luôn là hệ mở, hệ sẵn sàng hoạt động. Ngược lại ở cơ thể bậc cao thì hệ gen trình bày ở đây lại luôn luôn ở tình trạng đóng, nghĩa là bị ức chế, không hoạt động. Có thể, ta mới dễ dàng hiểu được tình trạng biệt hoá tế bào ở mức độ hoạt động gen. Tất nhiên trong mô hình này còn nhiều điểm đòi hỏi phải có thực nghiệm xác nhận, và còn phải làm sáng tỏ nhiều hơn nữa.

Hiện nay người ta coi những thay đổi tế vi trong phân tử histon - như hiện tượng methyl hoá hay khử methyl axetyl hoá và hiện tượng photphorin hoá hay khử photphat trên protein không phải histon cũng như sự hình thành đơn vị ADP - ribozơ từ NAD - như được bao gồm trong điều hoà hoạt động gen và các quá trình khác như cơ chế sửa chữa ADN, sự hình thành polyamin, sự giải phóng các enzym ở lysosom... cũng đều đóng vai trò trong điều hoà hoạt động gen của tế bào - mà thể hiện cụ thể trong quá trình phân chia tế bào.

#### **IV. ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG BIỂU HIỆN GEN THÔNG QUA MÀNG TẾ BÀO TRONG SỰ PHÂN CHIA TẾ BÀO**

##### **1. Thành phần hoá học của màng bào tương**

Màng bào tương của các tế bào động vật gồm chủ yếu là protein, lipid và một lượng nhỏ chất đường. Ở tế bào hồng cầu, các thành phần hoá học của màng được phân tích như sau: lipid chiếm 35%, protein 55%, và glucit 10%. Ở tế bào gan lipid chiếm khoảng 40%, protein 60%, còn glucit thì dưới 1%. Bề mặt bên ngoài của màng bào tương thường chứa glucit, tích điện âm bởi vì được liên kết với những nhóm cacboxi, photphat hay acid sialic.

**1.1. Lipit.** Thành phần chủ yếu của màng bào tương là photpholipit 55% trong đó lexitin chiếm khoảng 20%. Cholesterol chứa nhiều ở màng này hơn các màng khác và đóng vai trò quan trọng trong tình trạng lý, hoá của màng bào.

**1.2. Glucit.** Các hexozơ, hexozamin, fucozơ và acid sialic thì liên kết chủ yếu với protein. Acid sialic thì nhạy cảm với enzym nơraminidaza và gắn với protein bởi gốc N-axetylgalactozamin ở bề mặt bên ngoài của màng. Một lượng nhỏ acid sialic cũng tồn tại trong dạng gangliasid (tức là

glycolipit) trong màng bào tương.

**1.3. Protein.** Protein bào gồm glycoprotein và các enzym màng bào tương. *Hiện nay người ta biết tới 30 enzym khu trú ở màng này.* Những enzym thường xuyên gặp là năm nucleotidaza, các loại ATPaza, acid photphataza, ARN-aza, v.v... Có một số protein có thành phần acid amin và tính chất giống actin của cơ và của microtubul.

## 2. Tổ chức phân tử của màng bào tương

Mô hình đầu tiên của cấu trúc màng được đề nghị bởi Darwson và Danielli bao gồm hai lớp lipit với sự buộc vào các phân tử protein ở hai phía ngoài.

Sau đó mô hình đã được thay đổi. Protein không cho buộc vào hai lớp lipit mà còn ngấp trong đó. Hiện nay protein liên kết màng được phân thành hai loại: *protein bên ngoài* và *protein xen vào trong*. Protein bên ngoài thì liên kết yếu với màng, ngược lại protein xen vào trong thì lại liên kết chặt chẽ với màng. Loại liên kết chặt vào màng này chiếm khoảng 70-80% toàn bộ protein màng và bao gồm các enzym, protein kháng nguyên, protein vận chuyển, các protein nhận hocmon, thuốc. Một trong những đặc trưng của enzym màng thông thường đòi hỏi lipit để hoạt động.

Hiện nay người ta quan niệm tổ chức phân tử của màng hình thành nên một cấu trúc lỏng, mà cấu trúc này phụ thuộc vào tỷ lệ giữa photpholipit và cholesterol. Người ta thấy rằng cholesterol ảnh hưởng mạnh mẽ đến sự sắp đặt của các phân tử photpholipit. Nếu thêm cholesterol vào photpholipit thì gây ra một tình trạng mới của màng, sẽ trở nên rất đậm đặc khi ở nhiệt độ cao và ngược lại, lại rất lỏng khi ở nhiệt độ thấp. Như vậy, bình thường cholesterol có mặt trong màng gây nên một tình trạng trung bình của tính lỏng màng phù hợp với các hoạt động sinh lý của tế bào.

## 3. Vai trò của màng bào tương

Màng bào tương của tế bào có những chức phận chính sau đây:

Ngăn cách giữa các tế bào với nhau, giữa tế bào với môi trường bên ngoài.

### 3.1. Nhập nội và xuất ngoại các chất

Nhập nội tức là lấy các chất từ môi trường bên ngoài vào tế bào. Trong

trường hợp này, người ta phân biệt hai hiện tượng: thực bào và ẩm bào.

Xuất ngoại có nghĩa là bài tiết các chất được sản xuất từ tế bào ra ngoài môi trường.

### **3.2. Sự thấm các chất**

Trong trường hợp thấm các chất của màng, người ta cũng phân biệt ra sự thấm thụ động và thấm chủ động.

### **3.3. Sự nhận diện tế bào và các chất dính kết**

Vấn đề này rất phức tạp, người ta gán cho vai trò của glycocalix nằm ở bề mặt bên ngoài của tế bào đóng vai trò quyết định. Về cơ chế nhận diện thì chưa rõ ràng, song có nhiều giả thuyết.

a. *Giả thuyết của Ehrlich Tylerweiss* với gợi ý bề mặt tế bào mang những thành phần giống kháng nguyên và kháng thể và chúng nhận diện nhau theo kiểu kết hợp kháng nguyên kháng thể đó.

b. *Giả thuyết những yếu tố dính kết đặc biệt* mà những yếu tố đó có thành phần hoá học là glycoprotein. Chất này được tổng hợp trong tế bào và bài tiết ra môi trường ở dạng hoà tan và làm nhiệm vụ dính kết.

c. *Giả thuyết enzym cơ chất* do Roseman nêu ra. Theo giả thuyết này, sự nhận diện các tế bào và sự dính kết giữa chúng thì được trung gian bởi sự tác dụng tương hỗ giữa cơ chất cacbohydrat và enzym glycosyl transferaza trên bề mặt các tế bào.

d. *Giả thuyết tác dụng tương hỗ* giữa các phân tử proton trong các phân tử oligomer của Naijor qua liên kết hydro giống như kết hợp giữa các chuỗi  $\alpha$  và  $\beta$  trong hemoglobin.

e. *Giả thuyết lưới mã hoá màng* của Changeu - Oosowa. Hình ảnh chủ yếu của mô hình này là thông tin đặc hiệu được mã hoá trong sự phân phối địa hình của những codon màng. Ngoài ra còn một số giả thuyết khác nữa.

### **3.4. Sự di chuyển tế bào**

Các tế bào muốn di chuyển được cần phải dẫn truyền những lực sinh ra trong nó với môi trường qua bề mặt tế bào. Do đó màng tế bào đóng vai trò quan trọng trong di chuyển tế bào.



### 3.5. Sự sinh sản và lớn lên của tế bào

Hiện nay, người ta đề cập nhiều đến vai trò của màng bề mặt tế bào trong sinh sản và lớn lên của tế bào. Một hiện tượng biết rất rõ trong môi trường tế bào là hiện tượng ức chế tiếp xúc. Các tế bào trong nuôi cấy sinh sôi nảy nở đến mức chúng chạm nhau trên lớp bề mặt của môi trường nuôi cấy thì ngừng, do đó sự tiếp xúc gây ra hiện tượng ức chế sinh sản tế bào. Ngoài ra người ta còn thấy những hiện tượng khác thông qua các chất ở bề mặt tế bào để kích thích hoặc ức chế sự phân chia tế bào - mà cơ chế của những hiện tượng đó là sẽ được giới thiệu ở phần dưới đây.

## 4. Điều hoà của hoạt động màng trong sự phân chia tế bào

Hiện nay, ngoài vai trò chính của gen trong hoạt động phân chia tế bào, người ta còn nói nhiều đến vai trò của màng. Vậy thông qua một số cơ chế còn bàn cãi sau đây, người ta gán cho màng vai trò này.

### 4.1. Mối liên quan giữa màng với hệ thống $Ca^{2+}$ - cAMP - cGMP

Enzym adenin cyclaza nằm ở màng bào tương và enzym guanilat cyclaza cũng nằm ở đây, chúng tham gia tạo ra cAMP và cGMP. Những enzym này được hoạt hoá bởi các hocmon và bị ức chế bởi ion  $Ca^{2+}$ . Một enzym khác photphodiesteraza nằm ở trong bào tương lại thuỷ phân các cAMP và cGMP và được hoạt hoá bởi ion  $Ca^{2+}$ .

Lượng cAMP và cGMP được hình thành nhiều ít qua hoạt động của các enzym màng và nội bào nói trên đóng vai trò quan trọng trong phân chia tế bào như chúng đã biết.

### 4.2. Mối quan hệ giữa các chất nhận của màng với hệ thống microfilament và microtubule

Trên bề mặt tế bào có chứa các chất nhận có bản chất glycoprotein của nhiều loại - như chất nhận thuốc, chất nhận nội tiết tố, chất nhận các chất kích thích sự phân bào v.v... Trong và dưới đó của màng tế bào có chứa các microfilament và microtubule - là tập hợp của các thành phần protein giống actin của cơ, v.v... Hệ thống này lại được liên quan đến bộ máy phân bào của tế bào. Do đó khi một biến đổi dẫn ra môi trường bên ngoài có thể ảnh hưởng đến cấu trúc dưới màng qua phân tử nhận glycoprotein. Từ sự thay đổi này dẫn đến ảnh hưởng tổng hợp ADN và phân chia tế bào.

### **4.3. Tình trạng hoá lỏng của màng**

Đó cũng là một yếu tố hoá học, tạo điều kiện cho các chất kích thích phân bào kể cả các tia xạ tăng cường hoạt động bởi sự đi qua màng dễ dàng.

Vận chuyển thức ăn từ môi trường phục vụ cho quá trình phân chia tế bào. Khi có yếu tố phân bào tác dụng lên chất nhận bề mặt tế bào thì sẽ làm hoạt hoá các proton vận chuyển của màng và quá trình tăng cường vận chuyển qua màng được xảy ra. Điều này dễ hiểu, vì quá trình phân chia tế bào đòi hỏi phải có sự cung cấp nguyên liệu và năng lượng đầy đủ. Sự cung cấp này nhờ nguồn thu thức ăn duy nhất ở môi trường bên ngoài. Màng đóng vai trò chủ yếu ở đây là tăng cường vận chuyển các thức ăn đó vào bên trong để tế bào sử dụng.

## **5. Quan hệ gen - màng trong sự phân chia tế bào**

Căn cứ vào những vấn đề đã trình bày ở trên, tác giả trong quyển sách tế bào và phát triển đã đề xuất một mô hình chung về mối quan hệ gen - màng trong phân chia tế bào - mà nó bao gồm những hiểu biết và những kiến thức mới trong lĩnh vực này.

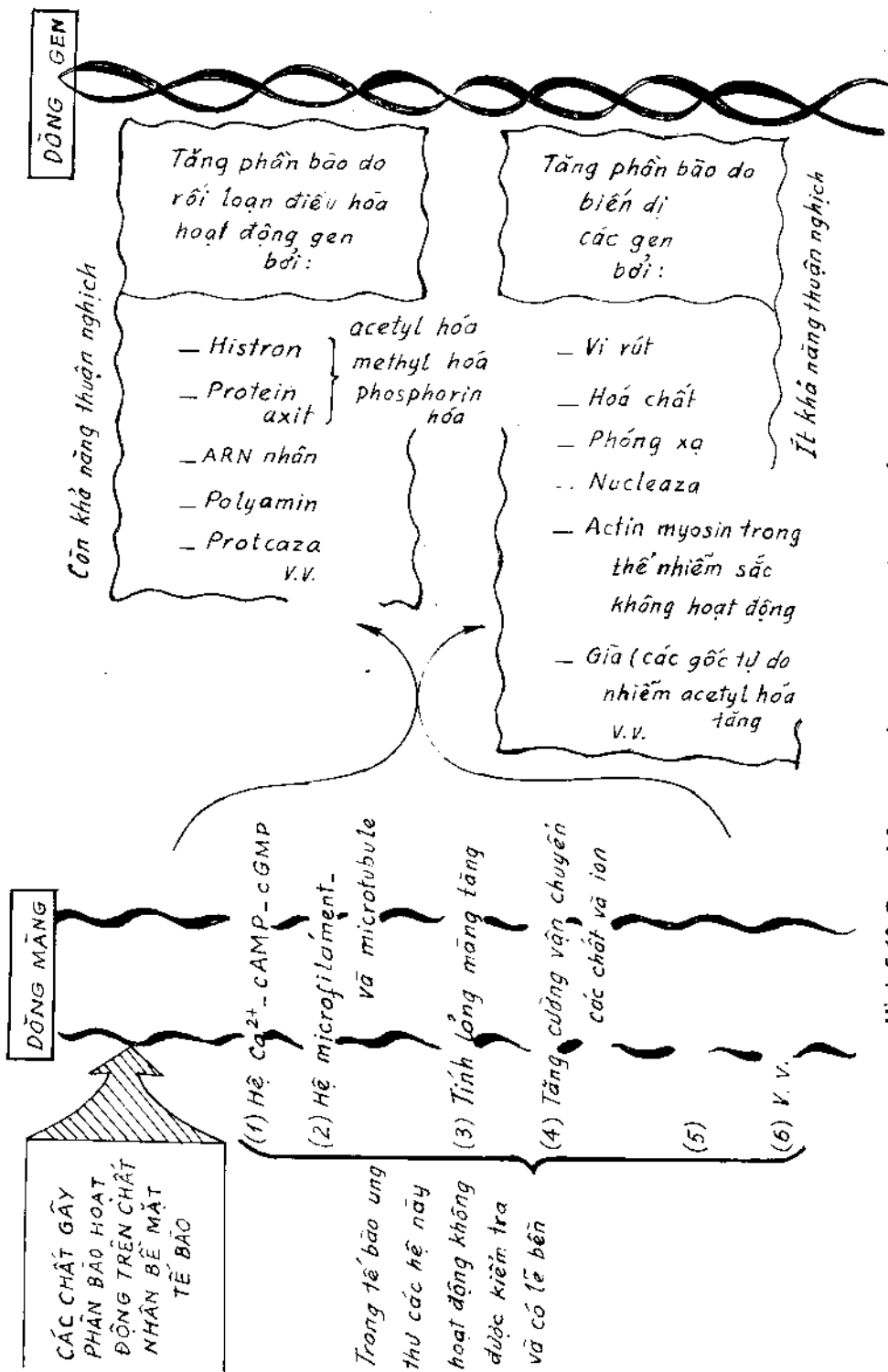
Mô hình trình bày hai dòng trong cơ chế phân bào (hình 5.10).

### **5.1. Dòng màng**

Những kích thích gây phân bào từ môi trường bên ngoài đi vào, tác dụng tương hỗ với thành phần thích ứng ở bề mặt tế bào gây ra một loạt thay đổi ở màng có liên quan tới các hệ thống:  $Ca^{2+}$  - cAMP - cGMP microfilament - microtubule, sự tăng cường vận chuyển các chất và ion qua màng, tính lỏng màng, v.v... Tất cả những thay đổi này đều được chuyển vào nhân mà cụ thể là trên thể nhiễm sắc hoặc bằng con đường trực tiếp, hoặc bằng con đường gián tiếp.

### **5.2. Dòng gen**

Khi có những tín hiệu ở bên ngoài vào thì, nhiều gen có sự cảm ứng và tăng cường hoạt động. Vai trò của một loạt các hiện tượng metyl hoá axetyl hoá các histon, photphorin hoá các protein nhân, các polyamin, các ARN nhân và một loạt các gen (nhạy cảm, hợp nhất, tiếp nhận, sản xuất v.v...) hoạt động kéo theo.



Hình 5.10. Quan hệ gen - màng trong sự phân chia tế bào

Hai dòng này phối hợp tạo điều kiện cơ sở vật chất cho tế bào phân chia.

Vấn đề ung thư, chủ yếu là sự tăng sản tế bào. Vì vậy lý thuyết hai dòng trong sinh sản tế bào bình thường cũng là cơ sở để tìm hiểu sự biến hình tế bào bình thường thành tế bào ung thư.

Ở tế bào bình thường, hai dòng này hoạt động có sự kiểm tra và được điều hoà. Nhưng ở tế bào ung thư chúng hoạt động không được kiểm tra. Cứ thế quá trình tăng sản ngày càng đi xa mãi, và càng tăng sản thì thế hệ sau ngày càng xa lạ với thế hệ nguồn gốc bởi những biến dị xảy ra trong nhiều lần phân chia nhanh tụ tập lại vì không kịp được sửa chữa. Mặt khác tính lỏng của màng cũng ngày càng thay đổi, kết hợp với những tác nhân virus, hoá chất, phóng xạ đi vào làm cho bộ gen tế bào có những biến đổi sâu sắc. Kết quả từ ung thư lúc đầu còn lành tính và có khả năng thuận nghịch, đi tới ác tính và không thuận nghịch nữa. Lại cộng thêm trong tế bào ung thư tăng sản xuất các enzym proteaza và enzym lyzosom. Loại này phân tán vào trong cả nhân và bề mặt tế bào, càng làm thay đổi sâu sắc cả cấu trúc phân tử thể nhiễm sắc cũng như bề mặt tế bào và dẫn đến di căn, thâm lậu và xâm lấn vào các tế bào khác. Mô hình này ngoài sự tóm tắt những biểu hiện nay về điều hoà hoạt động phân chia tế bào bình thường và ung thư thì còn nêu ra phương hướng để hướng dẫn sự tìm kiếm tiếp tục trong tương lai.

**PHẦN B**  
**CÁC PHƯƠNG PHÁP**  
**XÁC ĐỊNH GEN VÀ**  
**CÔNG NGHỆ BIỂU HIỆN GEN**

## CHƯƠNG VI

# CÁC ENZYM CẮT, BIẾN ĐỔI VÀ NỐI ADN

Trong công nghệ gen, sau khi tách được ADN thì cần phải kết cấu lại phân tử ADN, phân tử này gọi là phân tử ADN tái tổ hợp (recombinant DNA molecule). Để tạo ra phân tử này thì phải có vectơ (vật trung gian chuyển gen) cũng như ADN được chọn dòng cần phải được cắt ở những điểm đặc biệt và được nối lại với nhau theo kiểu phải được kiểm tra, kiểm soát.

*Cắt và nối* là hai thí dụ của kỹ thuật thao tác tinh vi trên phân tử ADN và được phát triển mạnh trên 30 năm nay. Nhờ sự cắt và nối mà các phân tử ADN có thể được ngắt lại, dài ra, được sao ra thành ARN hoặc tái bản lại phân tử ADN mới và có thể bị biến đổi do thêm vào hoặc tách ra những nhóm hoá học đặc hiệu.

Tất cả những thao tác tinh vi đó được thực hành *trong các ống nghiệm* không những cung cấp cơ sở cho sự chọn dòng gen mà còn cho những hiểu biết trong nghiên cứu cơ bản về hoá sinh ADN, cấu trúc gen và *sự kiểm tra của biểu hiện của gen*.

*Hầu hết tất cả các thao tác kỹ thuật cắt nối ADN đều tiến hành sử dụng các enzym.* Trong tế bào, các enzym này tham gia vào các quá trình chủ yếu như sao chép (replication) phiên mã (transcription) các ADN, làm gãy ADN, cởi xoắn hoặc đưa ADN ngoại lai vào (như sự xâm nhập của ADN virus) sửa chữa ADN bị biến dị và tái tổ hợp lại giữa các ADN khác nhau. Sau khi chiết xuất làm sạch từ các dịch chiết tế bào. Nhiều enzym tin rằng, có thể dẫn ra những phản ứng tự nhiên của chúng hoặc những phản ứng có liên quan chặt chẽ với chúng dưới những điều kiện nhân tạo.

*Cắt và nối gen* được thực hiện bởi những enzym được gọi là các enzym hạn chế hay còn gọi là enzym giới hạn có tên là *endonucleaza hạn chế* (restrictase) dùng cho *sự cắt* và các *ligaza* dùng cho *sự nối*.

## I. CÁC ENZYM HẠN CHẾ

Một số enzym hạn chế hay còn gọi là enzym giới hạn cắt phía trong phân tử ADN thành những đoạn đặc hiệu của mình. Gọi là enzym hạn chế bởi vì người ta phát hiện đầu tiên chúng có mặt trong những vi khuẩn làm hạn chế sự lớn lên của virus gây bệnh (thực khuẩn thể). Những enzym này bảo vệ ADN của vật chủ trước ADN của cơ thể ngoại lai. Song những enzym này đều có mặt trong các tế bào, mà những tế bào này kéo theo những enzym có khả năng metyl hoá ADN của vật chủ. Điều đó làm biến đổi ADN chủ thành cơ chất không thích hợp nữa cho sự tiêu hoá bằng enzym hạn chế. Đối với từng vị trí ADN xác định riêng, metylase và enzym hạn chế luôn luôn xảy ra ở vi khuẩn như là cặp song đôi.

Tên gọi enzym hạn chế này bắt nguồn từ tên vi khuẩn được dùng để tách enzym này. Chẳng hạn EcoRI là enzym hạn chế tách từ *E.coli*, còn BamHI bắt nguồn từ *Bacillus amyloliquefaciens* (bảng 6.1 và 6.2). Cách viết tên và gọi tên như sau: chữ đầu tiên là tên chi của vi khuẩn hay gọi là giống (E), hai chữ của từ sau chỉ tên loài của vi khuẩn (co), còn có thể bổ sung thêm chúng xác định (R) và chữ số La Mã (I) (II) là chỉ enzym được tách ra lần đầu tiên hay lần thứ hai ở vi khuẩn đó (EcoRI, EcoRII).

Ví dụ: *E. coli* RI, *E. coli* RII

<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	R	I hoặc II
Tên chi hay giống (genus) của vi khuẩn. Tên này <b>phải viết hoa</b> và có thể viết tắt <b>E</b> .	Tên loài (species) của vi khuẩn. Tên loài <b>viết thường</b> và <b>không được viết tắt coli</b>	ví dụ: chủng mẫu là ATCC 11775	Là chữ số La Mã chỉ lần đầu hay lần hai enzym được tìm thấy ở <i>E.coli</i>

Mỗi enzym hạn chế nhận biết và cắt một đoạn có chiều dài 4-7 đôi base của chuỗi đuôi ADN. Sự cắt ADN như vậy có thể tạo đầu tù hay đầu bẹt (HpaI) hoặc đầu dính (BamHI) phụ thuộc vào cơ chế cắt của enzym (hình 6.1). Đầu dính đặc biệt được sử dụng trong cấu trúc phân tử ADN lai hay khảm.





Nếu như trong phạm vi phân tử ADN lai hay nucleotid được sắp đặt một cách ngẫu nhiên, người ta có thể tính được số enzym cắt toàn bộ phân tử ADN. Đối với mỗi vị trí trong phân tử ADN có bốn khả năng (A, C, G hoặc T) bởi vậy enzym hạn chế nhận biết đoạn có chiều dài bốn đôi base sẽ cắt trung bình ADN ở mỗi 256 đôi base ( $4^4$ ) trong khi đó enzym khác, nó nhận biết đoạn sáu đôi base thì mỗi lần sẽ cắt 4096 đôi base ( $4^6$ ). Đoạn ADN đã cho sẽ sắp đặt sẵn vị trí cắt đối với những enzym khác nhau, mà cái đó cho phép cấu trúc bản đồ hạn chế.

**Bảng 6.2. Một số enzym giới hạn**

Enzym	Vi khuẩn có enzym	Các đoạn cắt	Số điểm cắt ADN virut		
			phage	Ad2	SV40
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G <u>G A T C C</u> C C T A G <u>G</u>	5	3	1
<i>Bgl</i> III	<i>Bacillus globigi</i>	A <u>G A T C T</u> T C T A G <u>A</u>	5	12	0
<i>Eco</i> RI	<i>E.coli RY 13</i>	G <u>A A T T C</u> C T T A G <u>A</u>	5	5	1
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus egyptius</i>	G G C C C C G G	50	50	18
<i>Hha</i> I	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	G C G C C G C G	50	50	2
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae R<sub>d</sub></i>	A <u>A G C T T</u> T T C G A <u>A</u>	6	11	6
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	C T G C A <u>G</u> G <u>A C G T C</u>	18	25	3
<i>Sma</i> I	<i>Serratia</i>	C C C G G G G G G C C C	3	12	0

### Các methylaza

Chúng ta cần biết trong *intro* người ta sử dụng các vị trí methylaza đặc hiệu để cải biến các chỗ nhận biết với mục đích bảo vệ ADN khỏi bị restrictaza (RE) tác động. Vị trí methylaza chuyển nhóm methyl từ S-adenosin-L - metionin tới cytozin hoặc adenin nhất định của mỗi sợi thuộc vị

trí nhận biết. Trong điều kiện phòng thí nghiệm có thể cải biến một sợi ADN và như thế cũng đủ tạo cho vị trí nhận biết tránh được tác động của restrictaza.

## II. NHỮNG ENZYM KHÁC LIÊN QUAN ĐẾN CÁC THAO TÁC TRÊN ADN

Ta có thể kể ra các enzym đó thuộc vào những loại sau đây:

- *Nucleaza* đó là những *enzym cắt*, làm ngăn hoặc thoái hoá các phân tử acid nucleic.

- *Ligaza* là những *enzym nối* các phân tử acid nucleic lại với nhau.

- *Polymeraza* là những *enzym sao chép* các phân tử acid nucleic.

- *Các enzym biến đổi* (modifying enzym) - là những *enzym tách hay cộng thêm* các nhóm hoá học.

- *Topoisomeraza* là những *enzym làm xoắn tròn ốc* cao độ hay cởi xoắn từ các ADN đóng vòng khép kín.

Trước khi đi vào chi tiết mỗi loại enzym này, có hai điểm chúng ta cần lưu ý:

- Hầu hết các enzym đều phân phối tới một loại riêng rẽ, song một vài enzym biểu hiện những hoạt động đa dạng mà những hoạt động đó trải ra hai hay nhiều loại. Chẳng hạn, nhiều polymeraza phối hợp cả khả năng tạo ra phân tử ADN mới rồi hoạt động thoái hoá ADN được liên kết.

- Trong các enzym cắt, nối ADN có nhiều enzym tương tự hoạt động trên ARN đã được biết. Các ribonucleaza được dùng để tách ARN trong chế phẩm ADN là một ví dụ. Mặc dù các enzym liên quan đến ARN có sử dụng trong chọn dòng gen nhưng chúng ta không nói ở đây.

### 1. Các nucleaza

Nucleaza làm thoái hoá phân tử ADN bằng cách làm gãy các liên kết phosphodiester - mà liên kết này gắn một nucleotid vào cái sau của chuỗi ADN. Do đó có hai loại nucleaza.

- Exonucleaza - là những enzym tách nucleotid ở đầu tận của phân tử ADN.

- Endonucleaza - là những enzym có khả năng làm gãy những liên kết phosphodiester bên trong phân tử ADN.

Sự phân biệt chính giữa các exonucleaza là nằm trong số các chuỗi đó bị thoái hoá khi phân tử xoắn kép bị tấn công enzym được gọi là Bal 31 (được tách chiết từ vi khuẩn *Alteromonas sepefiana* là một ví dụ về exonucleaza nó tách nucleotid từ hai chuỗi của phân tử xoắn kép.

Exonucleaza III của *E.coli* làm thoái hoá chỉ một chuỗi của phân tử xoắn kép, giải phóng ra ADN chuỗi đơn.

Chính tiêu chuẩn đó cũng được dùng để phân loại các endonucleaza. S<sub>1</sub> endonucleaza (từ fungus *acfeigillus oyzae*) sẽ chỉ làm gãy những chuỗi đơn trong khi đó deoxyribonucleaza I (ADNse) nó được chuẩn bị từ tuy bò cắt cả các phân tử chuỗi đơn và chuỗi kép. ADNse I thì không đặc hiệu, trong đó nó tấn công ADN ở chuỗi phosphodiester bất kỳ bên trong. Kết quả cuối cùng sau sự thủy phân này ta có hỗn hợp các mononucleotid và những oligonucleotid ngắn. Mặt khác một nhóm chuyên biệt của enzym loại này được gọi là endonucleaza hạn chế chỉ làm gãy ADN chuỗi kép ở số lượng giới hạn của các vị trí nhận diện đặc hiệu.

## 2. Các polymeraza

Polymeraza ADN là những enzym mà chúng tổng hợp một chuỗi mới bổ sung vào khuôn ADN hay ARN. Hầu hết các polymeraza chỉ có vùng xoắn kép - mà vùng đó hoạt động như là primer cho việc mở đầu sự trùng hợp.

Ba loại polymeraza ADN được dùng thông dụng trong công nghệ gen. Đầu tiên là polymeraza ADN I, enzym này được tách ra từ *E.coli*. Nó buộc vào vùng chuỗi đơn ngắn (hoặc chỗ nút) trong phân tử ADN chuỗi kép và rồi tổng hợp chuỗi mới một cách hoàn toàn làm thoái hoá chuỗi hữu hiệu. Vì vậy polymeraza ADN I là một thí dụ về enzym hoạt động hai hướng: tổng hợp ADN và thoái hoá ADN.

Thật ra hoạt động polymeraza và nucleaza của polymeraza ADN I thì được kiểm tra bởi những phần khác nhau của phân tử enzym và có thể được tách ra nếu enzym bị gãy theo con đường đặc biệt. Phần của enzym duy trì chức phần polymeraza thì được gọi là đoạn Klenow. Đoạn Klenow thiếu hoạt động nucleaza, nó có thể tổng hợp chuỗi ADN bổ sung chỉ trên khuôn

chuỗi đơn. Sự áp dụng phần lớn của enzym này là trong phân tích thứ tự ADN.

Loại thứ ba của polymeraza là enzym phiên mã ngược-reverse transcriptaza, một enzym gồm trong sao chép của một vài loại virus - và là enzym quan trọng trong công nghệ di truyền.

Reverse transcriptase duy trì nhất là dùng cái khuôn ARN. Khả năng của enzym tổng hợp sợi ADN bổ sung vào khuôn ARN là trung tâm của vấn đề chọn đồng phân tử ADN bổ sung.

### 3. Các enzym làm biến đổi ADN

Có nhiều enzym làm biến đổi ADN bằng cách thêm hay tách các nhóm hoá học đặc biệt. Đó là:

- Phosphataza kiềm (từ *E.coli* hay ruột bê) làm tách ra những nhóm phosphat có mặt ở đầu tận 5' của phân tử ADN.

- Kinaza polynucleotid - từ *E.coli* bị nhiễm phage T4 - có tác dụng ngược lại enzym phosphataza kiềm tức là xúc tác gắn nhóm phosphat vào đầu 5' tận tự do.

Transferaza terminal kết thúc được tách ra từ mô tuyến ức của bê - xúc tác sự thêm một hay nhiều deoxynucleotid vào đầu tận 3' của phân tử ADN.

### 4. Các topoisomeraza

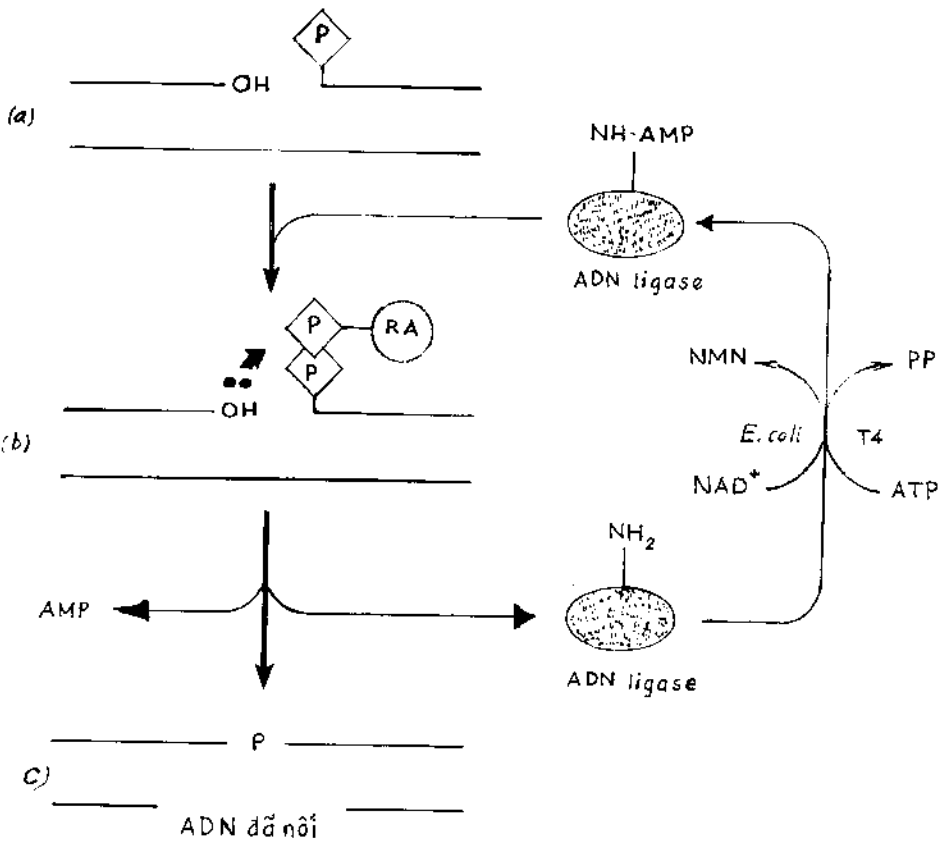
Topoisomeraza là những enzym có khả năng thay đổi cấu tạo hình của ADN đóng vòng (như phân tử ADN của plasmid) bằng cách đưa vào hoặc tách ra những vòng xoáy tròn ốc cao cấp.

### 5. Các ligaza

ADN ligaza là một enzym nổi quan trọng trong tế bào vì chức năng của nó là sửa chữa các mối liên kết photphodiester bị đứt gãy một cách ngẫu nhiên hoặc do hậu quả của việc sao chép hoặc tái tổ hợp ADN. Trong kỹ thuật di truyền, nó được sử dụng để hàn gắn những chỗ gián đoạn chuỗi đường - photphat, những gián đoạn này thường diễn ra khi ADN tái tổ hợp được hình thành bằng cách nối các phân tử ADN từ những nguồn khác nhau. Vì vậy, nó được coi là chất keo phân tử được sử dụng để kết dính các mẫu ADN với nhau. Chức năng này là hết sức quan trọng đối với sự thành công của nhiều thí nghiệm, và vì vậy ADN ligaza là enzym nổi chủ chốt trong kỹ

thuật di truyền.

Enzym được sử dụng nhiều nhất trong các thí nghiệm là ADN ligaza của T4, nó được tách chiết từ các tế bào *E.coli* bị nhiễm phage T4. Mặc dù enzym này hiệu quả nhất khi hàn gắn các khe hở trong các đoạn được giữ với nhau bằng các đầu dính, nó cũng có thể nối các phân tử ADN đầu bằng với nhau trong những điều kiện thích hợp. Enzym này hoạt động tốt nhất ở 37°C, nhưng nó được sử dụng ở nhiệt độ thấp hơn nhiều (4-15°C) để ngăn ngừa sự biến tính nhiệt của những đoạn kết cặp ngắn, các đoạn này giữ các đầu dính của các phân tử ADN với nhau. Cách hoạt động của ADN ligaza được minh họa trên hình 6.2.



Hình 6.2. Kiểu tác động của ADN ligaza

Enzym này nối các nucleotit thông qua các đầu 3'-OH và 5'-PO<sub>3</sub>- liên kế do có một điểm cắt (a). ADN ligaza được adenyli hoá bởi  $NAD^+$  (*E.coli*) hoặc ATP (phage T<sub>4</sub>). Sau đó enzym này adenyli hóa photphat đầu 5' tại điểm cắt (RA là ribose-adenin), nó tạo điều kiện hình thành mối liên kết photphodiester (b,c)

Khả năng cắt, sửa đổi và nối các phân tử ADN đã đưa vào tay các kỹ sư di truyền công cụ sắc bén trong việc tạo ra các phân tử ADN tái tổ hợp. Công nghệ sử dụng ở đây là công nghệ thí nghiệm trong ống nghiệm, không đòi hỏi các hệ thống sống. Tuy nhiên, một khi đoạn ADN tái tổ hợp đã được tạo ra in vitro, nó thường cần phải được nhân lên sao cho đủ số lượng để có thể sử dụng trong các phép thao tác và phân tích tiếp theo. Việc nhân bản thường đòi hỏi phải có một hệ thống sinh học, và vì vậy, chúng ta cần xem xét các hệ thống sống khác nhau có thể sử dụng để nhân bản các phân tử ADN tái tổ hợp.

Trong tế bào, ligaza ADN là sửa chữa những đoạn gãy của chuỗi đơn trong quá trình phân tử cần xoắn kép lại khi tái bản, ligaza nối hai đoạn riêng lẻ của ADN xoắn. Vai trò của các enzym đó trong tái tổ hợp ADN thì cũng sẽ được mô tả dưới đây.

## **6. Sự nối kết các phân tử ADN lại với nhau**

Giai đoạn cuối cùng trong cấu trúc phân tử ADN tái tổ hợp là nối kết phân tử vecto và ADN được chọn dòng, enzym xúc tác quá trình này gọi là ligaza ADN.

### **6.1. Kiểu hoạt động của ligaza ADN**

Tất cả các tế bào sống đều sản xuất các enzym ligaza ADN nhưng enzym được sử dụng trong công nghệ gen thì thường được tách chiết và làm sạch từ vi khuẩn *E.coli* mà vi khuẩn này được nhiễm với phage T4. Trong tế bào, enzym này mang chức phận khá quan trọng là sửa chữa bất kỳ sự không liên tục nào ở trong một chuỗi của phân tử chuỗi kép. Mặc dù sự không liên tục có thể xảy ra bởi sự gãy phân tử ADN tế bào chúng cũng là kết quả tự nhiên của các quá trình như tái bản và tái tổ hợp ADN. Do đó ligaza đóng một vai trò thực sự trong tế bào.

Trong ống nghiệm các enzym ligaza ADN được tách và làm sạch sửa chữa chuỗi đơn không liên tục nhưng cũng liên kết hai phân tử ADN hoặc hai đầu tận của chúng.

### **6.2. Những đầu dính làm tăng lên hiệu quả của sự nối buộc**

Những đoạn đầu tù thì được nối với nhau. Mặc dù phản ứng này có thể xảy ra trong ống nghiệm, nhưng không hiệu quả lắm. Bởi vì ligaza không có khả năng cầm giữ phân tử để nối kết mà phải chờ sự kết hợp mang đến

những đầu tận đồng thời. Có thể sự nối buộc đầu tù được tiến hành ở nồng độ ADN cao để làm tăng sự may mắn những đầu tận của các phân tử đi đến với nhau đồng thời.

Ngược lại sự nối buộc của những đầu tận bổ sung thì có hiệu quả hơn nhiều. Bởi vì những đầu dính có thể nối đôi base với một cái khác bởi liên kết hydro hình thành cấu trúc bền cho enzym tiến hành công việc.

### **6.3. Đặt những đầu dính vào những phân tử có đầu tù**

Như trên đã nói, những đầu dính thích hợp thì rất tốt cho các phân tử ADN gắn buộc với nhau trong thí nghiệm cloning gen. Thường những đầu dính đó có thể được cung cấp bởi sự tiêu hoá cả vector và ADN được xoay dòng với cùng một enzym cắt hạn chế, hoặc với những enzym khác mà chúng gây ra cùng đầu dính. Song, điều đó không phải luôn luôn có thể thực hiện được. Tình hình chung là ở đáy phân tử vector có những đầu dính, còn đoạn ADN được tạo dòng thì có đầu tù. Trong tình huống đó thì một trong ba phương pháp sau đây có thể được dùng để đặt những đầu dính chính xác vào những đoạn ADN.

#### *a. Các linkơ*

Linkơ ( linker) là những mảnh ngắn của ADN chuỗi đôi, tuy có đầu tù nhưng chứa vị trí cắt hạn chế. Ligaza ADN sẽ xúc tác sự nối buộc những đầu tận của các phân tử ADN có đầu tù lớn. Sự nối buộc đầu tù, có thể được tiến hành một cách rất hiệu quả, do các oligonucleotid (tức các linkơ) được đưa vào hỗn hợp nối buộc ở một nồng độ cao.

Hơn nữa các linkơ buộc vào mỗi đầu tận của phân tử ADN sẽ tạo ra cấu trúc chuỗi. Sự tiêu hoá bằng BamHI sẽ làm gãy chuỗi ở dãy nhận diện tạo ra một lượng lớn các linkơ bị gãy và đoạn ADN nguyên uỷ bây giờ mang những đầu dính BamHI. Đoạn cải tiến này thì bây giờ sẵn sàng để nối buộc vào vector tạo dòng và được cắt hạn chế bởi BamHI.

#### *b. Các adaptơ*

Một phương pháp thứ hai để buộc đầu dính vào phân tử từ đầu tù là qua việc sử dụng adaptơ (adapter). Adaptơ - giống như linkơ là những oligonucleotid ngắn. Song không giống linkơ, adapter thì được tổng hợp sao cho một đầu dính vào đầu kia tù.

Lý tưởng của quá trình đó là liên kết đầu tù của adaptơ vào đầu tù của

đoạn ADN tạo ra một phân tử với những đầu dính. Điều này có thể đơn giản nếu dùng linker nhưng phức tạp nếu dùng adaptor.

### c. Sản xuất đầu dính gắn với đuôi homopolymer

Kỹ thuật gắn đuôi homopolymer là một cách để sản xuất ra những đầu dính trên những phân tử ADN đầu tù. Homopolymer là một polymer đơn giản trong đó tất cả các tiểu đơn vị thì như nhau. Ví dụ một chuỗi ADN được tiến hành gắn đuôi là toàn polydeoxyguanosin (poly dG). Khi gắn đuôi người ta dùng enzym transferaza deoxynucleotid tận để đưa một loạt nucleolid vào đầu tận 3'-OH của phân tử ADN chuỗi kép.

Dĩ nhiên để có khả năng gắn buộc lại với nhau hai phân tử có đuôi phải có các homopolymer ở dạng bổ sung. Thường đuôi poly (dG) của ADN được chọn dòng buộc vào đuôi poly dC của vector.

**Bảng 6.3. Tóm tắt các enzym thông dụng dùng trong công nghệ gen: cắt, nối và biến đổi ADN**

Stt	Loại enzym	Enzym cụ thể	Vai trò, cơ chế tác dụng	Ứng dụng trong công nghệ gen
1	<p>Các enzym giới hạn (restriction enzym-RE) (giới hạn được hiểu ngầm là giới hạn của sự xâm nhiễm, tức là ADN phage bị một hệ thống bảo vệ của vi khuẩn tiêu diệt khi vừa mới xâm nhập, hệ thống bảo vệ này là RE)</p> <p><u>Chú ý:</u> Methylaza là enzym gắn nhóm methyl vào A hay C ở vị trí cắt của RE điều đó có nghĩa là khi A hay C được methyl hoá thì RE không còn nhận biết được vị trí cắt, vì vậy ADN vi khuẩn không bị chính RE của chúng cắt là nhờ cơ chế này.</p>	<p>- RE là endonucleaza có khả năng thủy phân ADN mạch đôi một cách lặp lại ở những vị trí xác định.</p> <p>- Có ba loại RE<sub>1</sub>, RE<sub>2</sub> và RE<sub>3</sub> nhưng chỉ có RE<sub>2</sub> nhận biết được một trình tự và cắt ngay tại đó nên được sử dụng trong sinh học phân tử.</p> <p>- Loại RE<sub>2</sub> đã biết tới hơn 100 loại ở vi sinh vật.</p>	<p>- Mỗi RE nhận biết được một trình tự nucleotit đặc trưng (thường 4-6) và trình tự này có cấu trúc palindromic có nghĩa là hai mạch của trình tự hoàn toàn giống nhau theo chiều 5'--&gt;3', do đó vị trí cắt là giống nhau trên hai mạch.</p> <p>- Có kiểu cắt đầu bằng (blunt ends) và kiểu cắt đầu so le hay dính (cohesive ends)</p>	<p>- Dùng cắt nhỏ bộ gen khổng lồ của sinh vật.</p> <p>- Dùng trong phương pháp tạo dòng để thu được dòng gen mong muốn có số lượng lớn.</p> <p>- Dùng trong lập bản đồ giới hạn để so sánh bộ gen giữa các loài thông qua kỹ thuật RFLP (restriction fragment length polymorphism = <i>tính đa hình kích thước của trình tự giới hạn</i>)</p> <p><u>Chú ý:</u> lập bản đồ các điểm giới hạn hiểu với nghĩa là phần lớn các đoạn ADN đều có các điểm nhận biết đối với nhiều enzym giới hạn khác nhau và thường rất hữu ích nếu ta biết vị trí tương đối của một số điểm này. Kỹ thuật để làm việc này gọi là <i>lập bản đồ giới hạn</i>.</p>



2	Các polymeraza (ADN và ARN polymeraza) a) ADN polymeraza xúc tác tổng hợp ADN theo chiều 5'-3')	ADN polymeraza I (ADN pol I)	ADN pol I có vai trò sửa sai khi sao chép ở vi khuẩn cụ thể <u>tổng hợp</u> ADN theo chiều 5'-3' và <u>thủy phân</u> ADN theo chiều 5'-3' và 3'-5'.  - Thực tế người ta chỉ sử dụng một sản phẩm đoạn Klenow của pol I giữ được hoạt tính polymeraza và exonucleaza 5'-3' không mong muốn.	- Xác định trình tự ADN theo phương pháp dideoxy nucleotit .  - Tổng hợp mẫu dò có độ phóng xạ cao.  - Xây dựng các vectơ từ ADN mạch đơn.
		T <sub>a</sub> ADN polymeraza	- Có hoạt tính giống hệt đoạn Klenow, nhưng có exonucleaza 5'-3' mạnh hơn	Vì có exonucleaza 5'-3' mạnh hơn nên được sử dụng nhiều hơn khi cần tổng hợp mẫu dò có độ phóng xạ cao.
		Taq polymeraza	Có hoạt tính sinh tổng hợp ADN	Vì chịu nhiệt tốt nên dùng trong chạy phản ứng PCR.
		Enzym phiên mã ngược (reverse transcriptase) có nguồn gốc từ retro virus như Avian myeloblastosis virus = AMV và Moloney murine leukemia virus = MMLV.	Tổng hợp mạch ADN bổ sung cADN vào khuôn ARN theo chiều 3'-5' khi có mặt của mỗi.	- Thiết lập ngân hàng cADN.  - Tiến hành phản ứng PCR trên mRNA.  - Xác định trình tự của axit nucleic bằng phương pháp sử dụng các dideoxynucleotit.

	b) Các ARN polymeraza	Ba loại ARN polymeraza hay được sử dụng: - SP <sub>6</sub> ARN polymeraza (có nguồn gốc từ phage xâm nhiễm <i>S.typhimurium</i> ) - T <sub>3</sub> ARN polymeraza. - T <sub>7</sub> ARN polymeraza (hai loại sau có nguồn gốc từ phage xâm nhiễm <i>E.coli</i> )	Tổng hợp một lượng lớn ARN từ ADN sau khi gắn với promotơ thích hợp.	- Tổng hợp mẫu dò ARN đánh dấu phóng xạ hay hoá học. - Xác định trình tự của một ADN được dòng hoá trong một vectơ có mang promotơ đặc trưng cho phage SP <sub>6</sub> , T <sub>3</sub> , T <sub>7</sub> . - Nghiên cứu bản phiên mã của ARN của một ADN đã được dòng hoá.
3	Các ligaza (nối hai đoạn ADN bằng ADN ligaza hay hai đoạn ARN bằng ARN ligaza)	- <i>E.coli</i> ADN ligaza	Nối hai đầu so le	- Hàn gắn những chỗ gián đoạn và những đầu mẩu các ADN tái tổ hợp lại với nhau.
		- T <sub>4</sub> ADN ligaza (có nguồn gốc từ phage T4 lây nhiễm cho <i>E.coli</i> )	Nối hai đầu bằng với nhau.	- Hàn gắn những chỗ gián đoạn trong chuỗi pentoza photphat. - Nối những đầu ADN tái tổ hợp lại với nhau.
		- T <sub>4</sub> ARN ligaza	Nối hai trình tự ARN bằng liên kết photphodiester	- Đánh dấu phóng xạ ở đầu 3' của ARN nếu dùng làm mẫu dò phân tử.
		T <sub>4</sub> polynuclotit kinase (có nguồn gốc từ phage T4 xâm nhiễm <i>E.coli</i> )	Xúc tác sự chuyển nhóm γ-phosphat của ATP cho đầu 5' của ADN hay ARN	- Đánh dấu phóng xạ đầu 5' của ADN trong các kỹ thuật xác định trình tự ADN hay làm mẫu dò phân tử trong các kỹ thuật lai. - Photphoryl hoá các trình tự ADN không có nhóm (P) đầu 5' để chuẩn bị cho phản ứng nối trong tạo dòng.

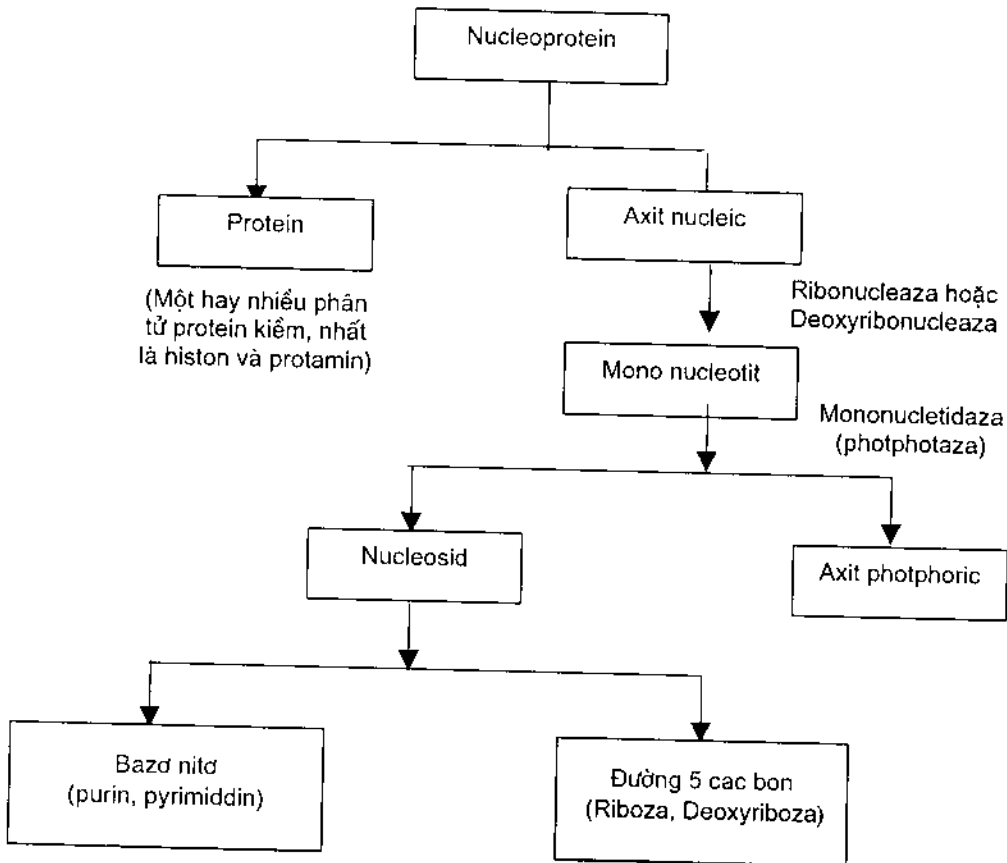
4	Các nuclease (ADNse thủy phân ADN; ARNse thủy phân ARN)	ADNse I (từ tụy bò)	- Thủy phân liên kết nằm ngay sau một pyrimidin trên chuỗi mạch đôi hay đơn.	- Loại các ADN tạp nhiễm trong phân đoạn ARN hay protein. - Tạo chỗ đứt (nick) trên ADN trong kỹ thuật đánh dấu mẫu dò. - Phát hiện các gen hoạt động trên nhiễm sắc thể.
		Nucleaza S <sub>1</sub> (từ <i>Aspergillus oryzae</i> )	- Thủy phân ADN mạch đơn, mạch đôi, phân tử lai ADN, ARN	- Phân tích cấu trúc các phân tử lai ADN, ARN loại bỏ các phân mạch đơn của một đầu so le trên ADN. - Loại bỏ các cấu trúc bậc hai (nút vòng) trên ARN để tạo đầu bằng.
		- Exonucleaza III (từ <i>E. coli</i> )	- Thủy phân tuần tự các nucleotit từ đầu 3'→5'. - Enzym còn có hoạt tính 3'-phosphotaza, ARNse H.	- Tạo cấu trúc mạch đơn ở một số vùng trên phân tử ADN dùng làm cơ chất cho đoạn Klenow của ADN polymeraza I để sản xuất mẫu dò đặc trưng cho từng mạch. - Tạo ra những đột biến mất đoạn tại những vùng đặc biệt trên ADN khi phối hợp với nucleaza S <sub>1</sub> .
		ARNaza A (từ tụy bò 90°C 1giờ không mất hoạt tính)	- Cắt một cách đặc trưng liên kết photphodiester nằm ngay sau một pyrimidine của một ARN mạch đơn.	- Dùng để loại bỏ ARN trong các chế phẩm ADN hay protein. - Loại bỏ các vùng không bắt cặp trên ARN trong phân tử lai ARN và ADN.
		ARNaza H	- Loại bỏ ARN trong phân tử lai ARN và ADN.	- Dùng để loại bỏ ARN sau phản ứng phiên mã ngược để tiếp tục tổng hợp mạch thứ hai của cADN hình thành một ADN mạch đôi.
		ARNaza III và IV ARNaza T <sub>1</sub> ARNaza U <sub>2</sub> ARNaza T <sub>2</sub>	- Cắt ARN mạch đôi - Cắt ngay sau G - Cắt đặc trưng cho A - Đặc trưng cho A, G, C, U...	

5	Các enzym sửa đổi các đầu của phân tử ADN	Phosphatasa kiềm (từ vi khuẩn và từ ruột bò)	- Có tác dụng loại bỏ nhóm photphat từ các đầu 5' của ADN để lại nhóm 5'-OH	- Dùng loại bỏ nhóm photphat ở đầu 5' và cũng dùng nó trước khi bổ sung (P) có hoạt tính phóng xạ vào đầu 5' khi dùng polynucleotit kinaza.
		Polynucleotit kinase	- Có tác dụng bổ sung (P) vào đầu 5' của ADN	- Dùng để đánh dấu <sup>32</sup> P phóng xạ
		Terminal deoxyribonucleotid transferase	- Liên tục bổ sung các nucleotit vào bất cứ đầu 3' nào đang tồn tại.	- Dùng để thêm đuôi polynucleotit, để tạo đầu so le trong tạo dòng. - Dùng để bổ sung các đuôi homopolymer vào phân tử ADN trước khi thiết kế các phân tử tái tổ hợp. - Đánh dấu đầu 3'-OH trong phương pháp Maxam, Gilbert.
6		Topoisomeraza	Thay đổi tạo hình của ADN đóng vòng bằng cách đưa vào hoặc tách ra, những vòng xoáy tròn ốc cao cấp.	- Cởi xoắn sợi kép ADN để chúng sao chép.

## CHƯƠNG VII

# PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT AXIT NUCLEIC

Thành phần axit nucleic thường ở dưới dạng nucleoprotein. Tách axit nucleic ra khỏi nucleoprotein theo sơ đồ chỉ dẫn ra ở đây. Toàn bộ sơ đồ chỉ ra thành phần hoá học tạo axit nucleic (hình 7.1).



Hình 7.1. Sơ đồ cấu tạo acid nucleic

Chúng ta biết rằng, bộ gen người chứa khoảng  $3 \times 10^9$  đôi base, nếu chiều dài trung bình mỗi gen là  $3 \times 10^3$  đôi base (3kb) thì toàn bộ genom có khoảng  $10^6$  gen. Song thật ra bộ gen người chỉ khoảng 30.000 gen và một số gen mã hoá còn chưa xác định rõ chức phận.

Hai sợi ADN xoắn nhau và có nút đậm đặc lại nhờ các phân tử protein, chủ yếu là *protein kiềm đó là histon*. Sự đậm đặc này có thể đóng vai trò điều hoà và chắc chắn có ý nghĩa thực tiễn. Khi ADN trong nhân tế bào là hình sợi thì kéo dài chiếm khoảng 1 m. Protein của nhiễm sắc thể làm đậm đặc phân tử ADN lại và như vậy ADN được bao gói trong nhân có thể tích vài  $\mu\text{m}^3$ .

*Trong công nghệ gen, người ta cần chuẩn bị ít nhất ba loại ADN khác nhau:*

- *Loại thứ nhất là ADN của toàn bộ tế bào*, thường đòi hỏi như là nguồn nguyên liệu, từ đó thu được các gen để làm tách dòng. Toàn bộ ADN tế bào có thể là ADN từ sự nuôi cấy vi khuẩn, thực vật, động vật hoặc từ cơ thể khác mà chúng đang được nghiên cứu.

- *Loại thứ hai là ADN của plasmid*. Sự tách ADN plasmid từ nuôi cấy vi khuẩn kéo theo những giai đoạn cơ bản giống những giai đoạn tách ADN toàn bộ tế bào.

- *Loại thứ ba là loại ADN của thực khuẩn thể (phage)* cũng cần nếu như phương tiện vận chuyển gen cần nó. ADN của thực khuẩn thể thì được chuẩn bị từ các tiểu phần của thực khuẩn thể hơn là từ các tế bào bị nhiễm nó vì để khỏi bị bắn bởi ADN vi khuẩn. Song cần có kỹ thuật để tách vỏ của thực khuẩn thể. Trừ một sự ngoại lệ là dạng nhân đôi xoắn kép của  $M_{13}$  thì chỉ được chuẩn bị ở *E.coli*, mặc dầu nó là plasmid của vi khuẩn.

## I. SỰ CHUẨN BỊ ADN CỦA TOÀN BỘ TẾ BÀO

Thủ tục chuẩn bị ADN của toàn bộ tế bào từ các vi khuẩn nuôi cấy có thể chia làm bốn giai đoạn:

- Nuôi cấy vi khuẩn cho lớn lên và thu hoạch.
- Phá vỡ tế bào để giải phóng nội dung bên trong.
- Làm sạch ADN từ dịch chiết tế bào.
- Làm đậm đặc các mẫu ADN.

## 1. Nuôi cấy và thu hoạch vi khuẩn

Hầu hết các vi khuẩn lớn lên và phân chia không có một chút khó khăn gì trong môi trường lỏng đầy đủ các chất dinh dưỡng.

Song để chuẩn bị cho việc chiết xuất tế bào, các vi khuẩn cần phải thu ở một lượng thể tích nhỏ. Do đó khi thu hoạch nuôi cấy thì phải tiến hành ly tâm ở nồng độ thấp. vi khuẩn từ 1000 ml nuôi cấy ở đậm độ tế bào tối đa thì có thể thu vào một thể tích chỉ 10 ml hoặc ít hơn.

## 2. Chuẩn bị sự chiết ADN từ tế bào vi khuẩn

Tế bào vi khuẩn được bao bọc trong một màng bào tương và một thành cứng. Tất cả các hàng rào này sẽ bị phá vỡ để giải phóng các thành phần của tế bào vi khuẩn. Phương pháp phá vỡ tế bào này được chia làm hai loại phương pháp: phương pháp vật lý và phương pháp hoá học.

*Phương pháp vật lý* chủ yếu làm gãy bằng những lực cơ học.

*Phương pháp hoá học* thì thường dùng những chất hoá học như EDTA, lysozym hay phối hợp cả hai.

Lysozym là một enzym có mặt trong lòng trắng trứng và trong nước bọt. Nó thuỷ phân những thành phần trùng hợp của thành tế bào, còn EDTA lấy ion Mg, mà ion này tham gia vào sự duy trì cấu trúc của toàn bộ thành tế bào, đồng thời EDTA cũng ức chế các enzym tế bào để khỏi làm thoái hoá ADN. Cũng có khi cần thêm cả sodium dodecyl (SDS), chất này phá màng tế bào làm ly giải màng, tách rời các phân tử lipid và do đó gây ra gãy màng tế bào.

## 3. Làm sạch ADN từ dịch chiết tế bào vi khuẩn

Trong dịch chiết tế bào vi khuẩn có ADN, protein và ARN. Vấn đề đặt ra là phải tách được các thành phần nhiễm bẩn ra khỏi ADN để có ADN dạng tinh khiết; do đó phải khử protein của dịch chiết bằng cách thêm phenol hay hỗn hợp phenol và chloroform theo tỷ lệ 1:1. Những dung môi hữu cơ đó làm kết tủa protein và giải phóng ra ADN và ARN vào dung dịch lỏng.

Khi ly tâm có ba lớp, trong đó lớp lỏng axit nucleic ở trên cùng có thể hút ra bằng ống hút. Để tách hết protein cần phải làm vài lần như trên nhưng thường dẫn đến ADN bị gãy, do đó thường xử lý dịch chiết tế bào với

protease như pronase hay proteinase K trước khi chiết xuất bằng phenol.

Những enzym đánh gãy polypeptid thành những đơn vị nhỏ và những tiểu đơn vị đó dễ dàng tách ra khỏi phenol nhưng hầu như còn lẫn với ADN trong lớp nước. Còn phân tử ARN, đặc biệt mARN cũng được tách ra bởi xử lý phenol nhưng hầu như cũng còn lẫn với ADN trong lớp nước.

Chỉ có một cách có hiệu quả để tách ARN là xử lý thêm với enzym ribonuclease, enzym này thủy phân nhanh chóng các phân tử ARN để thành các tiểu đơn vị ribonucleotid.

#### **4. Làm đậm đặc các mẫu ADN**

Phương pháp thông dụng để làm đậm đặc ADN là tủa bằng ethanol trong sự có mặt của ion  $\text{Na}^+$  và ở nhiệt độ  $-20^\circ\text{C}$  hay thấp hơn. Ethanol tuyệt đối sẽ làm lắng tủa một cách có hiệu quả các axit nucleic trùng hợp và khi ly tâm cao tốc thì ADN lắng xuống đáy và đo lường sự hấp thụ của nó ở bước sóng 260 nm, điều đó phù hợp với  $50\mu\text{g}$  của ADN xoắn kép trong 1ml.

#### **5. Sự chuẩn bị ADN của toàn bộ tế bào từ những cơ thể khác**

Ngoài vi khuẩn, ADN toàn bộ tế bào của thực vật, động vật cũng có thể tiến hành tách chiết để phục vụ cho dự kiến tiến hành công nghệ gen. Các giai đoạn cơ bản trong sự làm sạch ADN cũng giống như trên chỉ có giai đoạn nuôi cấy và phá màng thì có thể khác, tùy theo từng loại tế bào mà xử lý thích hợp.

## **II. SỰ CHUẨN BỊ ADN CỦA PLASMID**

Sự tách chiết và làm sạch plasmid từ sự nuôi cấy vi khuẩn giống như sự chuẩn bị ADN toàn bộ tế bào. Sự nuôi cấy tế bào chứa plasmid sẽ được lớn lên trong môi trường lỏng, rồi thu hoạch và dịch chiết tế bào được chuẩn bị. Dịch chiết sẽ được khử protein, ARN được tách ra và ADN được làm đậm đặc lại bởi kết tủa bằng ethanol.

Song có một sự khác biệt cơ bản giữa làm sạch ADN plasmid và ADN toàn bộ tế bào, đó là trong chế phẩm plasmid, ADN cần phải tách khỏi một lượng lớn ADN nhiễm sắc thể của vi khuẩn.

Tách riêng hai loại ADN này rất khó khăn nhưng điều đó đặc biệt quan trọng, nếu như plasmid được dùng như phương tiện để tiến hành thuần



hoá gen. Sự có mặt một lượng nhỏ nhất của sự nhiễm bản ADN vi khuẩn trong phòng thí nghiệm thuần hoá gen có thể dẫn tới những kết quả không thích hợp.

Thật may mắn, người ta đã tìm ra một vài phương pháp có thể tách ADN vi khuẩn khi làm sạch plasmid. Đó là những phương pháp dựa trên sự khác nhau về tính chất lý hoá giữa hai loại ADN. Đó là kích thước plasmid lớn nhất cũng chỉ chiếm tới 8% kích thước của nhiễm sắc thể vi khuẩn *E.coli*. Do đó kỹ thuật tách *phân tử ADN nhỏ* khỏi *phân tử ADN lớn* có thể có hữu hiệu trong sự làm sạch plasmid này.

Ngoài kích thước, ADN plasmid và ADN vi khuẩn khác nhau về cấu hình. ADN plasmid có *hình thể vòng*, còn ADN của nhiễm sắc thể vi khuẩn cũng vòng nhưng trong quá trình chuẩn bị dịch chiết tế bào thì loại này luôn luôn bị gãy để cho những *đoạn thẳng*. Phương pháp tách các *phân tử vòng* khỏi các *phân tử thẳng* được sử dụng để làm sạch ADN plasmid.

## 1. Kỹ thuật tách dựa vào kích thước ADN

Xử lý bằng EDTA và lysozym được dẫn ra trong sự có mặt của đường (sucrose). Sau đó ly giải tế bào sẽ được gây ra bởi thêm vào những *chất phá màng không mang ion* như triton X-100, còn *chất phá màng mang ion* như SDS sẽ gây ra làm gãy nhiễm sắc thể. Phương pháp này bảo toàn ADN của vi khuẩn, rất ít bị gãy. Như vậy khi ly tâm sẽ được chất dịch sáng trong đó chứa hầu như toàn bộ ADN.

## 2. Kỹ thuật tách dựa trên cơ sở hình thái cấu trúc ADN

ADN plasmid có hai hình thái vòng:

- Một là hai chuỗi nguyên vẹn nhưng cuộn vòng tròn ốc cao độ.
- Hai là vòng mở- trong đó một hoặc hai chuỗi bị nứt ra.

### 2.1 Sự biến tính kiềm

Có một dãy pH hẹp, ở đó ADN không xoắn tròn ốc thì bị biến tính, còn plasmid xoắn tròn ốc thì không. Nếu thêm NaOH vào dịch chiết tế bào để pH đạt tới 12-12,5 thì liên kết hydro trong phân tử ADN không xoắn tròn ốc sẽ bị gãy, làm cho sợi xoắn kép cởi ra và hai chuỗi polynucleotid tách nhau.

Nếu như bây giờ thêm acid vào, những chuỗi ADN vi khuẩn bị biến

tính sẽ tụ lại thành một khối lộn xộn. Ly tâm sẽ vốn thành một mảng không hoà tan, tách khỏi ADN plasmid trong dịch nổi.

Cũng trong phương pháp này, dưới một số tình huống, đặc biệt là ly giải tế bào bằng SDS và làm trung hoà bởi acetat natri thì hầu hết protein và ARN cũng sẽ không hoà tan và được tách ra ở giai đoạn ly tâm. Sự chiết xuất phenol và xử lý enzym ribonuclease có thể cũng không cần thiết như phương pháp biến tính kiềm được sử dụng.

## 2.2 Ly tâm trong gradient nồng độ ethidium bromide cesium chlorid

Gradient nồng độ được tạo ra bởi ly tâm dung dịch chlorid cesium (CsCl) ở tốc độ rất cao. Bởi vì sự tiến triển gradient ở lực ly tâm cao sẽ kéo các ion cesium và chlorid xuống đáy ống. Các đại phân tử sinh học có mặt trong dung dịch CsCl khi được ly tâm sẽ hình thành các giải ở những điểm khác nhau trong gradient.

ADN đậm độ nổi vào khoảng  $1,7\text{g/cm}^3$  và như vậy nó sẽ di chuyển đến vùng có độ đậm này của CsCl. Protein có đậm độ nổi thấp hơn nên nó ở đỉnh ống ly tâm, còn ADN thì vốn lại ở đáy ống ly tâm.

Khi ly tâm gradient nồng độ trong sự có mặt của ethidium bromide (EtBr) có thể được dùng để tách ADN xoắn tròn ốc ra khỏi phân tử ADN không xoắn tròn ốc.

EtBr liên kết với phân tử ADN giữa đôi base dính kết, gây ra cởi xoắn một phần của sợi xoắn kép, còn phân tử xoắn tròn ốc cao độ không có đầu tự do nên ít liên kết với EtBr. Như vậy sự ly tâm gradient nồng độ EtBr+CsCl là phương pháp rất có hiệu lực để thu hồi ADN plasmid tinh sạch.

## 3. Sự phóng đại plasmid

Plasmid được nhân lên nhiều lần trong vi khuẩn chỉ khi vi khuẩn đó ngừng sản xuất protein. Vì vậy trong quá trình nuôi cấy phải thêm chloramphenicol, chất ức chế tổng hợp protein thì trong vòng 12 giờ từ 20 plasmid trong một vi khuẩn sẽ tăng tới 4000 plasmid.

## III. SỰ CHUẨN BỊ ADN CỦA THỰC KHUẨN THỂ

Đối với thực khuẩn thể (phage) thì bắt đầu nguyên liệu không phải là tách chiết từ tế bào, bởi vì các tiểu phần thực khuẩn thể có thể thu được một

lượng lớn từ môi trường ngoài tế bào của nuôi cấy vi khuẩn bị nhiễm. Khi ly tâm môi trường nuôi cấy, vi khuẩn lắng xuống đáy, còn các tiểu phần của thực khuẩn thể nổi lên trên. ADN của thực khuẩn thể được tách bằng khử protein khỏi vỏ của nó.

Toàn bộ quá trình tách chiết này đơn giản hơn phương pháp tách ADN của toàn bộ tế bào và của plasmid. Song sự tách chiết và làm sạch với một lượng có ý nghĩa của ADN thực khuẩn thể là đối tượng của công việc phải làm.

Cái khó khăn chính, đặc biệt với thực khuẩn thể lamda ( $\lambda$ ) là làm tăng sự nuôi cấy nhiễm khuẩn. Sự chuẩn độ tối đa của thực khuẩn thể lamda vào khoảng  $10^{10}$ /ml, thì chỉ mới có được 500 ng ADN. Vậy thể tích nuôi cấy phải lớn ở hàng 1000 đến 2000 ml thì mới đủ số lượng ADN thu được.

### **1. Sơ tập thực khuẩn thể từ sự nuôi cấy bị nhiễm khuẩn**

Để làm giảm dịch treo từ 1000-2000 ml xuống đến 5 ml hay dưới nữa để tiến hành chiết xuất ADN cần phải ly tâm. Song các tiểu phần thực khuẩn thể thì quá nhỏ nên để chống vón lại khi ly tâm phải làm tủa với polyethylen glycol (PEG). Đây là thành phần trùng hợp chuỗi dài, trong sự có mặt của muối, thì nó hấp thụ nước do đó gây ra sự tập hợp các đại phân tử như các tiểu phần của thực khuẩn thể để kết tủa. Tủa này thu được bằng ly tâm rồi hoà tan trở lại trong một thể tích nhỏ.

### **2. Làm sạch ADN từ các tiểu phần của thực khuẩn thể lamda**

Khi protein của tủa PEG, rồi hoà tan trở lại thì cần thiết bởi vì tủa này cũng chứa một lượng nhất định mảnh vụn, có lẽ bao gồm cả ADN tế bào được cởi chuỗi. Những tạp bẩn đó được tách ra bởi gradient nồng độ CsCl. Dải băng tiểu phần ADN của thực khuẩn thể ở trong gradient CsCl là từ  $1,45-1,50\text{g/cm}^3$ . Thu dải băng đó và tách CsCl bằng thẩm tích, chúng ta được chế phẩm thực khuẩn thể tinh sạch. Từ chế phẩm này, ADN có thể được tách chiết bởi xử lý phenol hoặc enzyme protease để thuỷ phân lớp protein áo khoác bên ngoài của thực khuẩn thể.

### **3. Làm sạch ADN của $M_{13}$**

Dạng tái bản chuỗi đôi của  $M_{13}$ , mà nó giống như số bản sao plasmid, rất dễ làm sạch giống như phương pháp chuẩn bị plasmid. Dịch

chiết tế bào được chuẩn bị bị nhiễm với  $M_{13}$  và dạng tái bản được tách ra khỏi ADN vi khuẩn bởi ly tâm gradient nồng độ EtBr - CsCl.

Song dạng chuỗi đơn của bộ gen  $M_{13}$  được chứa trong tiểu phần thực khuẩn thể. Các tế bào nhiễm khuẩn luôn luôn bài tiết các tiểu phần  $M_{13}$  vào trong môi trường. Lượng  $10^{12}/\text{ml}$  hoặc trên nữa vẫn có thể thu được một cách dễ dàng khi nuôi cấy. Do có nồng độ cao như vậy nên một lượng có ý nghĩa của ADN  $M_{13}$  chuỗi đơn có thể được chuẩn bị từ sự nuôi cấy với dung tích 5 ml hoặc ít hơn. Hơn nữa các tế bào bị nhiễm không ly giải nên không có sự nhiễm bẩn những mảnh vụn trong dịch treo của thực khuẩn thể. Giai đoạn ly tâm gradient nồng độ CsCl rất ít cần cho  $M_{13}$  nhưng lại cần cho thực khuẩn thể lamda.

## IV. CÁC PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT AXIT NUCLEIC CỤ THỂ

Mọi nghiên cứu và ứng dụng sinh học phân tử đều bắt đầu bằng việc thu nhận một lượng axit nucleic đủ lớn và tinh sạch để tiến hành các thí nghiệm kế tiếp. Mối quan tâm hàng đầu của các kỹ thuật tách chiết axit nucleic là thu nhận được các phân tử này ở trạng thái nguyên vẹn tối đa không bị phân huỷ bởi các tác nhân cơ học (phân tử bị gãy do nghiền, lắc mạnh) hay hoá học (phân tử bị thuỷ giải bởi các enzym nội bào giải phóng ra môi trường khi tế bào bị phá vỡ). Các axit nucleic cần được tách chiết trong điều kiện nhiệt độ thấp để ức chế hoạt động của các enzym nội bào (desoxyribonucleaza – ADNza và ribonucleaza- ARNza).

### 1. Phương pháp tách chiết ADN

ADN là phân tử có kích thước lớn, do đó trong thao tác cần tránh mọi tác nhân cơ học hay hoá học quá mạnh có thể làm đứt gãy phân tử này.

Có nhiều phương pháp tách chiết ADN tế bào. Nói chung, các phương pháp tách chiết cơ bản đó đều được tiến hành theo ba bước:

#### 1.1. Bước 1

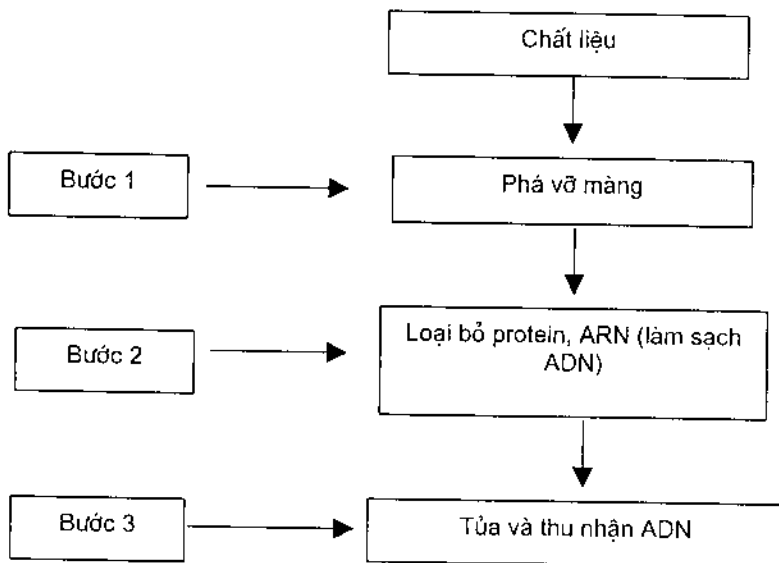
*Phá màng tế bào và màng nhân* (tế bào eukaryote). Thông thường tế bào, mô được nghiền trong một hỗn hợp chất tẩy (như SDS, sarcosyl) và proteaza K. Khi đó màng tế bào, màng nhân sẽ bị vỡ và giải phóng ADN ra ngoài môi trường và phân huỷ các protein liên kết với ADN.

## 1.2. Bước 2

Loại bỏ các thành phần không mong muốn trong mẫu, chủ yếu là protein bằng cách lắc mẫu mạnh trong dung dịch phenol và cloroform, dung dịch này có tác dụng làm biến tính protein đồng thời không hoà tan axit nucleic, sau khi ly tâm sẽ tủa thành lớp nằm giữa pha nước và pha phenol, cloroform. Thu nhận axit nucleic.

## 1.3. Bước 3

Tủa axit nucleic, nhằm thu nhận axit nucleic dưới dạng cô đặc, bảo vệ axit nucleic tránh bị phân huỷ của enzym; mặt khác có thể hoà tan chúng lại trong dung dịch theo nồng độ mong muốn. Có thể tủa axit nucleic trong ethanol (2,5 dung tích ethanol/ 1dung tích mẫu), môi trường có nồng độ muối cao, nhiệt độ thấp. Tuy nhiên cũng có thể tủa trong isopropanol (1 thể tích isopropanol/ 1 thể tích mẫu), không cần muối. Sau khi thu nhận axit nucleic, cần tủa cần phải rửa trong ethanol 70% để loại bỏ muối hoặc isopropanol dính vào. Dưới đây là sơ đồ tiến hành theo ba bước (hình 7.2).



Hình 7.2. Sơ đồ tiến hành tách chiết ADN

## ***Phương pháp cụ thể tách chiết ADN theo Blin và Stafford***

### ***Bước 1***

*Phá vỡ màng:* sử dụng PBS, kết hợp ly tâm 6000 vòng/ phút để phá vỡ màng và rửa tế bào, sau đó sử dụng EDTA làm ức chế ADNza; SDS là chất tẩy rửa mạnh phá vỡ liên kết nucleoprotein và sacaroza (phân giải histon và lipid), đồng thời tách riêng chúng ra. Để loại bỏ tạp chất bẩn này phải dùng enzym thuỷ phân proteaza K, quá trình này cần được theo dõi qua nồng độ trong của dung dịch, thời gian xử lý tối thiểu là 30 phút.

### ***Bước 2***

*Loại bỏ tạp chất:* quá trình này sử dụng hai lần phenol bão hoà với một lượng tương ứng và một lần chloroform. Các chất này làm biến tính mạnh protein và khi ở dạng biến tính thì protein không hoà tan trong nước, còn ADN hoà tan trong nước. Sau khi ly tâm 8000 vòng/ phút thì hỗn hợp được chia làm ba phần: *dung dịch trong chứa ADN ở phía trên*, dịch trắng ở giữa là protein, dưới cùng là phenol. Quá trình lấy dịch trong để được ADN phải hết sức cẩn thận mới đạt yêu cầu.

### ***Bước 3***

*Tủa ADN:* sử dụng cồn tuyệt đối với thể tích 2,5/ 1 thể tích mẫu của dung dịch chiết kết hợp ly tâm 14000 vòng/ phút, sau khi đã để lạnh qua đêm hoặc để lạnh ở -20°C trong 3 giờ. Tiếp tục rửa cồn 70% ly tâm 14000 vòng/ phút, tiến hành hai lần để loại bỏ muối, ta thu được ADN tế bào.

## **2. Phương pháp tách chiết ARN**

Các phân tử ARN không bền, dễ bị phân huỷ bởi các enzym là các ribonucleaza (ARNza-ARNse). Hơn nữa, các ARNza lại có mặt ở khắp nơi (có rất nhiều các tác nhân thường dùng để loại bỏ enzym (việc xử lý nhiệt độ 90°C trong 1 giờ không làm mất hoạt tính ARNza). Vì những lý do đó, việc tách chiết ARN đòi hỏi nhiều biện pháp thận trọng để tránh mọi tạp chất bởi các ARNza từ môi trường: thao tác trong điều kiện vô trùng, mọi dụng cụ, hoá chất đều được khử trùng bằng nhiệt hay hoá chất, tránh mọi tiếp xúc với dụng cụ bằng tay trần ...

### ***2.1 Phương pháp tách chiết ARN tổng số***

*Phương pháp này gồm các bước như đối với ADN.* Tế bào, mô được nghiền trong một dung dịch gồm chất tẩy (như SDS, sarcosyl), một tác nhân

gây biến tính protein mạnh (guanidinium thiocyanate), một chất khử (2-mecaptoethanol). Hai loại chất sau có tác dụng ức chế các hoạt động của các ARNza nội bào và tách các protein liên kết khỏi phân tử ARN.

Các protein được loại bỏ khỏi mẫu qua xử lý phenol: chloroform và ly tâm. ARN hoà tan trong pha nước được rửa bằng ethanol thu nhận qua ly tâm. ARN có thể được bảo quản trên một năm dưới dạng rửa trong dung dịch ethanol hoặc đông lạnh ở  $-70^{\circ}\text{C}$  trong nước có chứa ARNsin (một chất ức chế ARNza).

## 2.2. Tách chiết tARN, mARN, rARN

Khoảng 80% tổng số ARN tế bào là ARN ribosom (rARN), khoảng 15% là ARN vận chuyển (tARN). Các ARN này có kích thước và trình tự xác định và có thể dễ dàng tách riêng bằng kỹ thuật điện di, ly tâm v.v... ARN thông tin (mARN) chiếm khoảng 1-5% tổng số ARN có kích thước và trình tự đa dạng. Tuy nhiên chúng có đặc điểm chung là cấu trúc đuôi poli A (có thể lên tới 100A). Dựa vào cấu trúc này và đặc tính liên kết bổ sung A-T của nucleotit có thể tách ARN thông tin ra khỏi mẫu bằng sắc ký ái lực trên cột oligo (dT)-cellulose. Hiện nay đã xuất hiện những bộ mẫu thử (còn có tên là kit) sử dụng các viên bi từ có mang oligo (dT) trên bề mặt. Sau khi các ARN thông tin bám lên bề mặt các viên bi này được ly tâm tách ARN thông tin. Phương pháp này cho phép tách cả những ARN thông tin có khối lượng rất nhỏ.

## 3. Tinh sạch axit nucleic

Các axit nucleic có thể được tinh sạch nhờ một số kỹ thuật như siêu ly tâm, sắc ký hay điện di.

### 3.1. Siêu ly tâm

Siêu ly tâm trên một gradien liên tục cesium chloride (CsCl). Trong quá trình ly tâm, dung dịch CsCl đậm đặc trong ống ly tâm sẽ tự động hình thành một gradien tỷ trọng tăng dần từ miệng ống xuống đáy ống. Các axit nucleic di chuyển trong ống dưới tác dụng của lực ly tâm, đến vị trí tỷ trọng bằng tỷ trọng ống. Lớp này sẽ được thu nhận lại sau ly tâm. Độ phân giải của một gradien tỷ trọng này có thể đạt tới 1% đơn vị tỷ trọng cho phép phân tách hai phân tử giống hệt nhau, trong đó một phân tử được đánh dấu bằng đồng vị nặng. Kỹ thuật này được dùng để tinh sạch plasmid và phage.

Siêu ly tâm trên đệm CsCl (gradien không liên tục). Hỗn hợp nhiều axit nucleic có tỷ trọng biết trước khác nhau được đặt trên một lớp dung dịch CsCl. Trong quá trình ly tâm chỉ những phân tử có tỷ trọng cao hơn tỷ trọng lớp đệm mới di chuyển xuyên qua lớp đệm. Thông thường, ống ly tâm bao gồm nhiều lớp đệm có tỷ trọng tăng dần từ miệng đến đáy ống, axit nucleic cần tinh sạch sẽ nằm ở mặt phân cách giữa hai lớp đệm. Kỹ thuật này được dùng để tinh sạch một lượng phage.

Siêu ly tâm trên gradien sacaroza. Dùng để phân tách thô một hỗn hợp có kích thước chênh lệch nhau nhiều kilô bazơ (kb); ứng dụng trong chọn lọc các đoạn ADN có kích thước xác định trong việc lập ngân hàng gen.

### 3.2. Sắc ký

Với phương pháp sắc ký có các loại sắc ký sau đây:

a. *Sắc ký ái lực* trên poly U- sepharoz hay trên oligo (dT)- cellulosa dùng để tinh sạch ARN thông tin.

b. *Sắc ký lọc gel* dùng trong phân tách các axit nucleic và các nucleotit tự do sau quá trình tạo mẫu dò (probe) đánh dấu.

c. *Sắc ký trao đổi ion* trên vi cột để thu hồi những lượng rất nhỏ ADN.

d. *Sắc ký lỏng hiệu suất cao* (high performance liquid chromatography), đây là một kỹ thuật mới có độ phân giải rất cao được dùng trong tinh sạch các oligonucleotid tổng hợp (độ phân giải mono nucleotit), plasmid, phân tách các đoạn ADN.

### 3.3. Điện di

Phương pháp này giới thiệu chi tiết ở mục 4.2.

## 4. Phân tích định tính và định lượng axit nucleic

### 4.1. Phương pháp định lượng bằng quang phổ kế

Phương pháp này không thật chính xác nhưng cho phép ước lượng tương đối nồng độ axit nucleic có trong mẫu. Nguyên tắc dựa vào sự hấp phụ mạnh ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 260 nm của các bazơ pyrimidin. Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260 nm (OD 260 nm) của các mẫu cho phép xác định nồng độ axit nucleic có trong mẫu. Một đơn vị OD 260 nm tương ứng



với một nồng độ là 50 $\mu$ g/ ml cho một dung dịch ADN sợi đôi; 40  $\mu$ g/ ml cho một dung dịch ARN hay ADN sợi đơn.

Tuy nhiên, cách tính này chỉ đúng với các dung dịch axit nucleic sạch. Để kiểm tra độ sạch của dung dịch, ta có thể đo thêm giá trị OD ở 280nm; 280 nm là bước sóng mà ở đó các protein hấp thụ ánh sáng cao nhất nhưng các protein cũng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260 nm như các axit nucleic và do đó làm sai lệch giá trị thật của nồng độ axit nucleic. *Dung dịch axit nucleic được xem như là sạch không tạp nhiễm protein, khi tỷ số OD 260nm/ 280nm nằm trong khoảng 1,8 đối với ADN tinh khiết và 2,0 đối với ARN tinh khiết.*

#### **4.2. Phương pháp điện di**

*Phương pháp này được sử dụng rộng rãi trong phân tích định tính và trong việc thu nhận mẫu axit nucleic. Đó là phương pháp chủ yếu làm cho các đoạn axit nucleic hiển thị trực tiếp.*

##### *a. Nguyên tắc của phương pháp*

Dựa vào đặc tính cấu tạo của các axit nucleic. Các axit nucleic là các đại phân tử sinh học tích điện âm đồng đều trên khắp bề mặt nên khi chịu tác động của điện trường chúng sẽ di chuyển về cực dương. Tính linh động của phân tử phụ thuộc vào hai chỉ tiêu là khối lượng phân tử tức là số lượng nucleotit hay cặp nucleotit (ADN mạch dài) và nồng độ các chất cấu thành gel.

Hai loại gel được sử dụng trong nghiên cứu axit nucleic là gel polyacrylamide và gel agarosa (agarose). Việc chọn loại gel cũng như nồng độ các chất tạo thành gel phụ thuộc kích thước trung bình của các đoạn axit nucleic.

##### *b. Gel agarose*

*Đây là loại gel thông dụng nhất, thao tác đơn giản, thường dùng để phân tách các đoạn có kích thước tương đối lớn trong khoảng 0,5-20 kb (kilô bazơ). Gel được đổ trên một giá thể nằm ngang và điện di thực hiện theo phương nằm ngang.*

Các axit nucleic trong gel agarosa sẽ được hiện hình dưới tia tử ngoại (UV) nhờ một hoá chất là ethidium bromide. Chất này có khả năng gắn xen vào giữa các bazơ của axit nucleic và phát quang dưới tác dụng của tia tử

ngoại ( $\lambda \approx 300 \text{ nm}$ ), axit nucleic sẽ hiện hình dưới dạng những vạch đỏ da cam. Tiếp theo, so sánh kích thước của axit nucleic với kích thước đã biết của marker chuẩn (gồm nhiều trình tự ADN có kích thước đã biết).

### c. Gel polyacrylamide

Dùng để tách các đoạn có kích thước  $< 1000 \text{ bp}$  (cặp bazơ) (bảng 7.1), tuy nhiên thao tác với gel polyacrylamide phức tạp hơn gel agarosa. Do đó gel này chỉ thao tác với mục đích đặc hiệu như:

- Tinh sạch các oligonucleotid tổng hợp
- Xác định trình tự đoạn ADN nhỏ
- Tách các đoạn ADN nhỏ có chiều dài  $< 500 \text{ bp}$

Gel được đổ giữa hai tấm thủy tinh và phương điện di thực hiện theo chiều thẳng đứng.

**Bảng 7.1. Đặc tính phân tách của các gel agarose và polyacrylamide**

Loại gel	Phạm vi phân tách (cặp bazơ)
0,3 % agarosa	50000 đến 1000
0,7 % agarosa	20000 đến 300
1,4 % agarosa	6000 đến 300
4 % acrylamid	1000 đến 100
10 % acrylamid	500 đến 25
20 % acrylamid	50 đến 1

### d. Điện di trường xung điện

Phương pháp điện di trường xung điện (pulse field gel eletrophoresis) sử dụng để phân tách các phân tử ADN rất lớn  $> 50 \text{ kb}$ , không thể phân tách được bằng gel agarosa dù ở nồng độ tối thiểu là 0,4% (dưới 0,4% gel quá mềm không thể thao tác được).

Nguyên tắc của loại điện di này dựa vào sự thay đổi hướng điện trường trong quá trình điện di. Mỗi lần hướng điện trường thay đổi thì phân tử ADN phải tự định hướng lại. Thời gian cần cho sự định hướng tùy thuộc vào kích thước của phân tử, phân tử càng dài thì thời gian tự định hướng càng lớn khiến cho nó di chuyển chậm hơn một phân tử kích thước nhỏ.

*e. Tinh sạch axit nucleic bằng điện di trên gel agarosa*

Sau khi điện di, các vạch tương ứng với ADN cần tinh sạch được phát hiện và thu nhận lại theo một trong các phương pháp sau:

- Phần agarosa chứa các vạch đó được cắt ra và ADN được thu nhận sau khi đã khuếch tán từ gel agarosa vào một dung dịch đệm thích hợp.

- Một "giếng nhỏ" được khoét trong agarosa ngay trước vạch ADN. "Giếng" này được bơm đầy dung dịch đệm và điện trường được tái lập. ADN di chuyển vào "giếng" chứa đầy dung dịch đệm và được thu nhận lại.

- Điện di được thực hiện trong một gel agarosa đặc biệt như (như nusieve hay seaplaque) có điểm nóng chảy thấp (65°C). Khi agarose đã hoàn toàn tan chảy, ADN được thu nhận lại sau nhiều công đoạn tách chiết và tủa.