

## CHƯƠNG VIII

# PHƯƠNG PHÁP LAI PHÂN TỬ VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH DẤU PHÂN TỬ

### I. PHƯƠNG PHÁP LAI AXIT NUCLEIC

Phương pháp lai axit nucleic còn gọi là phương pháp lai phân tử. Cơ sở của hiện tượng lai phân tử là sự tách rời hai mạch đôi của chuỗi xoắn kép ADN khi nhiệt độ môi trường vượt quá nhiệt nóng chảy ( $T_m$ ) của phân tử và sự tái bắt cặp giữa các trình tự tương đồng sau đó. Các trình tự bổ sung có thể là ADN hay ARN để tạo thành các phân tử mới là ADN – ADN, ARN – ARN và ADN – ARN. Đây là sự lai phân tử đặc hiệu tuyệt đối.

Các yếu tố ảnh hưởng đến sự lai phân tử gồm có: nồng độ ADN trong môi trường, nhiệt độ và thời gian phản ứng, kích thước các trình tự lai, lực ion của môi trường.

Hiện có ba kiểu lai phân tử ADN.

#### 1. Lai trong pha lỏng

Các trình tự cần lai nằm trong pha lỏng. Sự lai phân tử xảy ra khi các trình tự này gặp nhau do chuyển động nhiệt và khi nhiệt độ môi trường thấp hơn  $T_m$  ít nhất vài độ. Phương pháp này được sử dụng để tính tỷ lệ phần trăm (%) các trình tự giống nhau ở các loài gần nhau, để phân tích các trình tự lặp lại và ứng dụng trong việc so sánh kích thước các bộ gen không chứa trình tự lặp lại.

Ba phương pháp thường được sử dụng để phân tích định lượng các phân tử lai là:

- phương pháp dùng quang phổ kế;
- phương pháp sử dụng nucleaza  $S_1$  và
- phương pháp sắc ký trên hydroxylapatit.

ADN mạch đôi hấp thu ánh sáng yếu hơn mạch đơn, do đó trong phân tử lai, sự giảm OD 260 nm tương ứng với sự tăng số lượng các phân tử lai. Nucleaza S<sub>1</sub> có khả năng thủy phân các nucleotit mạch đơn, vì vậy dung dịch phản ứng lai cho tác dụng với enzym này thì chỉ còn các phân tử lai là không bị thủy phân, trên cơ sở đó tủa và định lượng được các phân tử lai. Trong phương pháp sắc ký trên hydroxylapatit, photphat canxi gắn các axit nucleic mạch đôi trên cơ sở đó tách được các phân tử lai để định lượng.

## 2. Lai trên pha rắn

Lai trên pha rắn có cùng nguyên tắc với lai trên pha lỏng. Điểm khác biệt ở đây là một trong hai trình tự bổ sung được cố định trên một giá thể rắn (màng lai). Việc sử dụng giá thể rắn tạo điều kiện dễ dàng trong thao tác và việc tách trình tự không lai ra khỏi phân tử lai, mặt khác còn ngăn sự tái bắt cặp giữa hai mạch của cùng một phân tử. Trình tự có đánh dấu dùng để gen cần tìm được gọi là mẫu dò (probe). Vận tốc lai trên pha rắn thấp hơn mười lần vận tốc lai trong pha lỏng. Ba kỹ thuật lai trên pha rắn thông dụng sử dụng lai axit nucleic là: Southern Blot, Northern Blot, và Dot hay Slot Blot.

### 2.1 Southern Blot

Các trình tự ADN thu được sau khi thủy giải ADN bộ gen bằng các enzym giới hạn (RE), được phân tách qua điện di trên gel agarosa. Sau đó, ADN được biến tính và được chuyển lên màng lai. Màng lai được đem lai với mẫu dò đánh dấu và kết quả thu nhận dưới dạng phóng xạ tự ghi hay ngay trên màng lai thông qua kỹ thuật miễn dịch học. Southern Blot được sử dụng trong kỹ thuật RFLP để lập bản đồ giới hạn của một gen hay để phát hiện các đột biến làm thay đổi bản đồ giới hạn của gen.

### 2.2 Northern Blot

Các bước tiến hành cũng giống như trong kỹ thuật Southern blot. Ở đây trình tự cần xác định là ARN. Kỹ thuật này được sử dụng để phát hiện các ARN đặc trưng cho loại mô hay cho thời điểm phát triển của cá thể cho phép định lượng và xác định kích thước của chúng. ARN được biến tính rồi tách ra trên gel agarosa, sau đó chuyển lên màng lai và lai với mẫu dò có đánh dấu phóng xạ.

### **2.3 Dot hay Slot Blot**

Là kỹ thuật định lượng trong đó axit nucleic được thấm trực tiếp lên màng lai tạo một điểm (dot) hay một khe (slot). Quá trình lai và phát hiện phân tử lai giống như trên.

### **3. Lai tại chỗ**

Lai tại chỗ là một kiểu lai phân tử trong đó trình tự axit nucleic cần tìm (trình tự đích) nằm ngay trong tế bào hay mô. Lai tại chỗ cho phép nghiên cứu axit nucleic mà không cần tách chiết chúng ra khỏi mô, tế bào. Có ba phương pháp lai tại chỗ:

#### **3.1. Lai trên khuẩn lạc**

Phương pháp này được sử dụng để phát hiện dòng vi khuẩn có mang vectơ tái tổ hợp cần tìm trong một ngân hàng gen bằng cách áp một màng lai trên mặt thạch và khuẩn lạc sẽ để lại một vài tế bào vi khuẩn trên màng lai. Màng lai được xử lý NaOH để làm vỡ vi khuẩn và làm biến tính ADN. Sau đó các bước phát hiện giống như trên.

#### **3.2. Lai trên nhiễm sắc thể**

Phương pháp này cung cấp thông tin chính xác về vị trí và sự phân bố của một trình tự ADN cần tìm trên nhiễm sắc thể nhờ một mẫu dò chuyên biệt. Các nhiễm sắc thể này thường ở giai đoạn trung kỳ, từ tế bào bạch cầu, được xử lý như kiểu tế bào bọc trên lam kính. Loại bỏ ARN (bằng RNase\*) và protein (bằng protease K), rồi đem lai với mẫu dò phóng xạ và đem phủ nhũ tương và soi dưới kính hiển vi.

#### **3.3. Lai trên tế bào và mô**

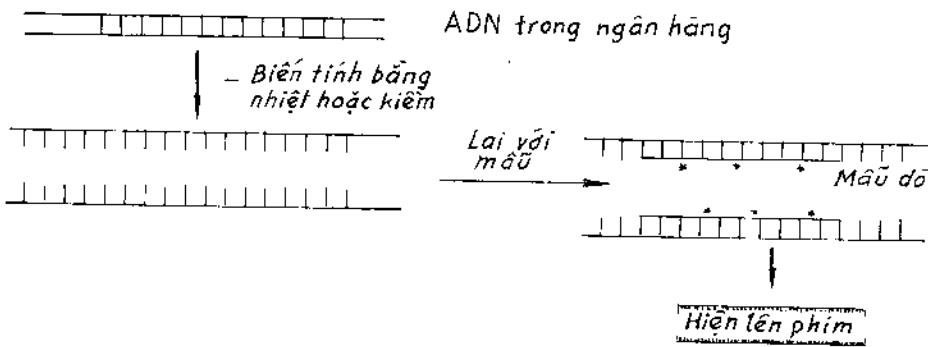
Phương pháp này sử dụng để nghiên cứu sản phẩm mRNA phiên mã và sản phẩm protein dịch mã của một gen xác định trong mô hay tế bào. Thao tác xử lý như trong phương pháp lai trên nhiễm sắc thể.

## **II. PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH DẤU AXIT NUCLEIC**

Phương pháp đánh dấu axit nucleic gọi là phương pháp đánh dấu phân tử. Mẫu dò (probe) dùng trong phương pháp lai phân tử là những trình tự tương đồng với gen cần tìm được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ hay bằng phương pháp hóa học (hình 8.1). Mẫu dò có tính chuyên biệt nghĩa là chỉ lai

với một gen nhất định và có tính nhạy hơn nên dễ phát hiện để định tính và định lượng. Mỗi loại tác nhân đánh dấu có những ưu và nhược điểm riêng.

*Đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ* có ưu điểm là có độ nhạy cao cho tín hiệu mạnh với thời gian phơi sáng ngắn nhưng nhược điểm là có hại cho sức khoẻ con người và các mẫu dò cũng không thể dùng được trong một thời gian dài do chu kỳ bán rã của các đồng vị phóng xạ.



**Hình 8.1.** Phát hiện gen đích bằng mẫu dò ADN (DNA probe) (lai ADN)

*Đánh dấu bằng phương pháp hoá học* có thể khắc phục được các nhược điểm của việc đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ. Tuy vậy độ nhạy vẫn kém hơn so với phương pháp trước.

Với phương pháp đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, người ta thường dùng  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$  phát ra tia beta ( $\beta$ ) năng lượng cao, còn đánh dấu bằng phương pháp hoá học người ta dùng hệ avidin hay streptavidine. Chất biotin và hệ phát quang sinh học (peroxidase) do gắn với ADN. Hệ đầu, biotin gắn vào ADN từ những nucleotit được tổng hợp; sau quá trình lai, biotin hiện diện trong phân tử lai và dùng ligand avidin gắn nhóm huỳnh quang phản ứng với biotin đó sẽ phát hiện phân tử lai. Còn hệ hai thì peroxidase có khả năng phát sáng.

Các phương pháp đánh dấu chính là:

### 1. Phương pháp nick – translation

Nguyên tắc của phương pháp này là DNase I sẽ cắt phân tử ADN ở

nhiều vị trí tạo ra những "lỗ thủng" phân bố một cách ngẫu nhiên trên cả hai mạch. Từ những "lỗ thủng" này, ADN polymeraza I một mặt "gặm" dần mạch bị cắt theo chiều 5' – 3' (nhờ hoạt tính exonucleaza), mặt khác lại tổng hợp bù đoạn bị thiếu (nhờ hoạt tính polymeraza). *Do trong phản ứng có sự hiện diện của một loại nucleotit đánh dấu.* Kết quả cuối cùng là ADN sẽ được đánh dấu trên khắp chiều dài phân tử.

## 2. Phương pháp thiết lập môi ngẫu nhiên (random priming)

Mẫu dò được biến tính bằng nhiệt độ rồi làm lạnh đột ngột. Thêm vào phản ứng hỗn hợp oligonucleotide tổng hợp, thường là các hexanucleotid-gồm sáu nucleotit. Một vài hexanucleotid trong số đó sẽ bắt cặp được với hai mạch đơn của mẫu dò. Khi chúng trở thành môi (primer) cho ADN polymeraza được tổng hợp mạch bổ sung. Vì một trong bốn *loại nucleotit thêm vào phản ứng được đánh dấu* nên mạch mới tổng hợp cũng sẽ được đánh dấu.

## 3. Phương pháp đánh dấu các oligonucleotid

Các oligonucleotid được tổng hợp dưới dạng mạch đơn, *được đánh dấu ở đầu 5'* nhờ enzym T<sub>4</sub> kinaza với sự hiện diện của một nucleotit đánh dấu. Sau phản ứng các nucleotit tự do cũng được loại bỏ bằng sắc ký lọc gel, sắc ký lỏng cao áp v.v...

## 4. Phương pháp tạo mẫu dò ARN

Trình tự ADN dùng để sản xuất mẫu dò ARN phải được đưa vào một vectơ có mang các promotơ dạng SP<sub>6</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>7</sub>. Vectơ này được cắt ra thành dạng mạch thẳng. Sau đó, ARN polymeraza thích ứng được thêm vào phản ứng cùng với các nucleotit đánh dấu. ARN polymeraza sẽ phiên mã trình tự ADN bắt đầu từ promotơ, tạo ra một lượng lớn ARN đánh dấu. Sau phản ứng vectơ có mang trình tự ADN gốc bị DNase I phân huỷ, các enzym được loại bỏ qua tách chiết bằng phenol, sau đó ARN được tinh sạch trên sắc ký lọc gel.

Ưu điểm là các phân tử lai ADN – ARN hiệu quả lai cao và bền vững hơn phân tử lai ADN – ADN. Nhờ hoạt tính riêng của mẫu dò và hiệu quả lai cao, có thể sử dụng <sup>32</sup>S làm nhân tố đánh dấu, mặc dù tia xạ có năng lượng yếu vẫn cho phép thu được tín hiệu tinh và rõ, sử dụng được mẫu dò trong thời gian dài.

## CHƯƠNG IX

# CÁC LOẠI VẬT CHỦ THU NHẬN VÀ CÁC LOẠI VECTƠ CHỌN DÒNG

### I. CÁC LOẠI VẬT CHỦ THU NHẬN

Hiện nay chúng ta biết có bốn loại vật chủ thu nhận và các loại vectơ chọn dòng\* trình bày tóm tắt trong bảng 9.1 và 9.2.

#### 1. Vật chủ là *E.coli* và các vi khuẩn khác

- Các vectơ tạo dòng biểu hiện trong vật chủ *E.coli* gồm các vectơ plasmid *E.coli* và các vectơ phage.

- Các vectơ chọn dòng được đưa trên plasmid *E.coli* gồm có pBR322, pBR325, pAT153, pUC8.

- Các vectơ chọn dòng được dựa trên phage gồm có vectơ  $M_{13}$  mp2,  $M_{13}$  mp7, vectơ bacteriophage lamda.

- Cosmid.

- Ngoài vật chủ là *E.coli*, các vi khuẩn khác cũng được dùng làm vật chủ cho các thí nghiệm tách dòng gen, đó là *Bacillus*, *Subtilis*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*. Tất nhiên có những hạn chế nhất định đối với các vật chủ này.

#### 2. Vật chủ là nấm men và nấm mốc

- Hệ gen của *S.cerevisae* có khoảng  $1,35 \times 10^7$  bazơ nitơ, nhiều hơn *E.coli* khoảng 3,5 lần. Các nấm *A.nidulans*, *N.crassa* cũng được dùng trong thí nghiệm tách dòng gen.

- Vectơ 2  $\mu$ m plasmid episom của nấm men được dùng trong vật chủ nấm men Aiep, Yips, Yrps.

---

\* Thuật ngữ này còn có tên gọi là tách dòng, nhân dòng - BTV

**Bảng 9.1. Các loại tế bào chủ dùng trong công nghệ gen**

Các nhóm chính	Kiểu loại sinh vật	Kiểu loại tế bào	Thí dụ
Vi khuẩn	Nhân sơ	Gram âm Gram dương	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Streptomyces spp</i>
Nấm	Nhân chuẩn	Vi sinh vật có khuẩn ty	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus nidulans</i>
Thực vật	Nhân chuẩn	Tế bào trần Tế bào nguyên Cả cơ thể	Các loại khác nhau Các loại khác nhau Các loại khác nhau
Động vật	Nhân chuẩn	Tế bào sâu bọ Tế bào động vật Tế bào trứng Cả cơ thể	<i>Drosophila melanogaster</i> Các loại khác nhau Các loại khác nhau Các loại khác nhau

**Bảng 9.2. Các loại vectơ dùng cho các tế bào động vật và thực vật**

Loại tế bào	Loại vectơ	Loại hệ gen	Thí dụ
Thực vật	Plasmid	ADN	Plasmid Ti của <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
	Virut	ADN ADN	Virut khảm cải hoa, virut Gemini (Geminivirut) Virut khảm thuốc lá
Động vật	Plasmid	ADN	Các loại vectơ plasmid khác nhau. Nhiều loại là vectơ lai có chứa một phần hệ gen của SV40
	Virut	ADN	Virut Baculo Virut Papilloma Virut Simian 40 (Simianvirus 40-SV40) Virut Vaccinia
	Virut	ARN	Virut Retro
	Gen nhảy	ADN	Các phần tử P trong <i>Drosophila melanogaster</i>

### 3. Vật chủ là thực vật bậc cao

Các vectơ tạo dòng được biểu hiện trong nó gồm:

- Ti plasmid của *Agrobacterium tumefaciens*.
- *Cauliflower mosaic virus* (virus khảm cải hoa).

- Gemini virus (virus khảm thuốc lá).
- Simple bacterial plasmid: PBR322.

#### 4. Vật chủ là các tế bào động vật có vú

Các vectơ chọn dòng biểu hiện trong chúng gồm:

- Các vectơ dựa trên virus Simian 40 (Simianvirus 40-SV<sub>40</sub>).
- Các vectơ dựa trên các virus (virus) Baculo (Baculovirus), Papilloma (Papillomavirus), Vaccinia (Vacciniavirus).
- Các vectơ được dựa trên BPV.
- Các vectơ virus Retro (Retrovirus).

## II. CÁC LOẠI VECTƠ CHỌN DÒNG

Những kỹ thuật cơ bản trong tạo dòng gen đã được mô tả ở các chương trên bao gồm các công đoạn:

- Chiết và làm sạch phân tử ADN.
- Cắt và nối ADN thành phân tử ADN tái tổ hợp.
- Đưa phân tử ADN tái tổ hợp đó vào trong tế bào sống qua việc gắn với vectơ gọi là *vectơ chọn dòng* hay còn có tên gọi là *kỹ thuật biến nạp ADN*.

Bây giờ ta phải nghiên cứu xem vectơ chọn dòng nào thì đưa vào tế bào sống nào. Đó là *vấn đề các tế bào chủ thu nhận các vectơ chọn dòng*. Mở đầu ở trên đã giới thiệu, hiện nay có bốn loại vật chủ thu nhận các vectơ như *E.coli*, nấm men nấm mốc, thực vật bậc cao và các tế bào động vật có vú. Dưới đây chúng ta lần lượt tìm hiểu sâu hơn các loại vectơ đưa vào đối với từng loại vật chủ đó.

### 1. Các vectơ đối với *E.coli*

Các vectơ chọn dòng đơn giản nhất, được sử dụng rộng rãi nhất trong *tạo dòng gen* là dựa trên các plasmid vi khuẩn. Một lượng lớn các vectơ plasmid khác nhau có thể sử dụng cho *E.coli*. Chúng liên hợp dễ dàng giữa sự làm sạch với các tính chất mong muốn như: hiệu quả biến nạp cao, các markơ (marker) chọn lọc thuận tiện cho biến nạp và tái tổ hợp, có khả năng



chọn dòng những mẫu ADN lớn tới 5kb.

### *1.1. Các vectơ chọn dòng được dựa trên plasmid của E.coli*

#### *a. Vectơ pBR322*

Các vectơ thông dụng được sử dụng với *E.coli* trước tiên phải kể đến là pBR322 (chữ p là chữ viết tắt của cụm từ plasmid; BR là tên viết tắt của hai nhà khoa học ở phòng thí nghiệm đầu tiên tìm ra vectơ này là: F. Bolivar và R. Rodrigues; 322 là danh số của plasmid này để phân biệt với các plasmid khác trong khi nghiên cứu cũng do phòng thí nghiệm này tìm ra như pBR325, pBR327 v.v...).

Plasmid có kích thước nhỏ hơn 10 kb nên dễ loại trừ vấn đề ADN bị gãy khi làm sạch: pBR322 có 4361 bp (bazơ pair = đôi hay cặp base). Kích thước đó nói lên rằng, không chỉ vectơ có thể làm sạch một cách dễ dàng mà còn có thể cả phân tử ADN được cấu trúc với nó. Thậm chí thêm vào 6 kb ADN, phân tử pBR322 tái tổ hợp vẫn còn là kích thước có thể điều khiển được.

Plasmid này có hai bộ gen kháng kháng sinh là gen kháng ampicilin hoặc gen kháng tetracyclin được dùng làm markơ chọn lựa đối với tế bào chứa plasmid này. Mỗi gen markơ gồm những vị trí cắt gen hạn chế duy nhất, mà chúng được dùng trong các thí nghiệm chọn dòng.

Việc gài ADN mới vào pBR322 mà chúng ta đã được cắt với Pst I, PvuII hoặc ScaI sẽ làm ức chế gen amp<sup>r</sup> và khi dùng gài một trong tám enzym cắt hạn chế (đã ghi trong bản đồ gen là BamHI và Hind III) làm ức chế kháng tetracyclin. Sự thay các vị trí cắt hạn chế - mà chỗ đó có thể dùng để ức chế gài - pBR322 có thể được dùng để chọn dòng các đoạn ADN có đầu dính.

Một sự tiến bộ thứ ba của pBR322 là cơ số bản sao (copy) cao. Có khoảng 15 phân tử có mặt trong *E.coli* bị biến nạp nhưng số lượng này có thể tăng từ 1000 tới 3000 phân tử bởi sự phóng đại plasmid với sự có mặt của chất ức chế tổng hợp như chloramphenicol. Do đó sự nuôi cấy *E.coli* đã cung cấp một sự sản sinh lớn phân tử pBR322 tái tổ hợp.

#### *b. Vectơ pBR325 chứa ba markơ chọn lựa*

pBR325 là plasmid pBR222 có thêm đoạn ADN. Đoạn này mang gen acetylcholintransferaza của chloramphenicol (CAT) một enzym ức chế hoạt

động của chloramphenicol và như vậy kháng kháng sinh này. Gen CAT chỉ chứa vị trí enzym cắt hạn chế *E.coRI* trên plasmid. Như vậy vị trí này có thể được dùng để chọn dòng những tái tổ hợp được phát hiện bởi ức chế gài của kháng chloramphenicol, pBR325 có tiến bộ hơn pBR322 là thêm một vị trí chọn dòng và thêm một markơ chọn lựa.

#### c. Vectơ pATI 53 - plasmid có số bản sao cao

Vectơ pATI 53 là một dẫn xuất khác của pBR322 nhưng trong trường hợp này sự thay đổi không bao gồm sự cộng thêm markơ chọn dòng mới hay những vị trí chọn dòng bên ngoài. Ngược lại, vectơ pATI 53 đã được cấu trúc bởi sự tách ra một đoạn 700 đôi base của pBR322, trong đó có cả gen  $amp^R$  và  $tet^R$  nhưng làm thay đổi sự tái bản và tiếp tục tạo ra plasmid. pATI 53 khác với pBR322 ở hai phương diện.

- pARI 53 có số lượng bản sao cao hơn pBR322, thường có mật khoảng 30-45 phân tử trên một *E.coli*. Với số lượng copy này thì dễ dàng được phát hiện khi nghiên cứu hiệu quả của gen được chọn dòng trong tế bào chủ.

- pARI 53 là một plasmid không liên tục, không trực tiếp vận chuyển được tới tế bào *E.coli* khác do sự phát đi 700 đôi base đã làm phá huỷ khả năng liên tục của pBR322. Điều này quan trọng đối với sự kiểm chế sinh học để tránh đi khả năng làm tẩu thoát "phân tử pATK - 53 tái tổ hợp từ trong các ống nghiệm".

#### d. Vectơ pUC8 - sự chọn dòng gen *lacZ*

Vectơ pUC8 đã được dẫn ra từ pBR322, mặc dù trong trường hợp này sự tái bản và gen  $amp^R$  vẫn còn nguyên vẹn. Một đoạn nucleotid của gen này đã bị thay đổi. Tất cả những vị trí chọn dòng bây giờ đã được tụ tập lại trong một đoạn ngắn của gen *lacZ'*. Sự chọn dòng bằng gen *lacZ'* không thuận tiện hơn khi dùng markơ kháng kháng sinh song giá trị của nó ở chỗ là tập trung lại được các vị trí cắt hạn chế và cho phép một đoạn ADN có hai đầu dính khác nhau được chọn dòng mà không còn chất gán.

### 1.2. Các vectơ chọn dòng được dựa trên bacteriophage M13

Hầu hết những thí nghiệm đối với vectơ chọn dòng là phải được tái bản trong tế bào vật chủ. Với các vectơ plasmid, sự đòi hỏi này dễ dàng thoả mãn. Những đoạn thứ tự ADN ngắn có khả năng hoạt động như những plasmid có nguồn gốc của sự nhân lên và hầu hết các enzym cần thiết để nhân lên được cung cấp bởi tế bào chủ. PBR322 do cắt ngắn cũng tạo ra

được cấu trúc cuối cùng có sự nhân lên.

Với bacteriophage như M13, tình hình nhân lên có phức tạp hơn. Các phân tử ADN phage nói chung mang một vài gen mà những gen đó chủ yếu là nhân lên, bao gồm cả gen mã hoá đối với số thành phần của protein áo của phage và những enzym nhân ADN đặc hiệu của phage. Sự thay đổi hoặc sự mất một số gen đó sẽ làm hư hại hoặc làm phá huỷ khả năng nhân lên của cả phân tử. Do đó rất hạn hữu để cải tiến các phân tử ADN của phage. Bộ gen của M13 bình thường là 6,4 kb chiều dài, trong đó có mười gen chiếm hầu hết. Mỗi gen ấy có chức năng chủ yếu đối với sự nhân lên của phage. Chỉ có một đoạn giữa 507 nucleotid, trong đó ADN lạ có thể gắn vào mà không làm gãy gen khác và vùng này có vị trí nhân lên mà nó cần được nguyên vẹn.

#### a. Vectơ M13 mp2

Giai đoạn đầu tiên trong cấu trúc vectơ M13 là đưa gen *lacZ'* vào đoạn giữa đó và hình thành nên M13mp1, mà nó tạo nên đám màu xanh trên agar X-gal.

M13mp1 không có lấy một vị trí cắt hạn chế trong gen *lacZ'*. Song nó chứa sáu nucleotid GGATTC ở gần đầu của gen. Một sự thay đổi nucleotid đơn giản có thể làm cho đoạn này được dẫn ra khi dùng biến dị và lúc này ta có vectơ M13 mp2.

M13 mp2 có sự thay đổi gen *lacZ'* rất nhỏ (tức là codon thứ năm bây giờ làm đặc hiệu cho asparagin thay thế acid aspartic nhưng enzym beta-galactosidaza được sản xuất bởi các tế bào bị nhiễm với M13 mp2 thì giữ nguyên chức phận). M13 mp2 là vectơ M13 đơn giản nhất. Những đoạn ADN với những đầu dính *EcoRI* có thể gài được vào vị trí chọn dòng và các tái tổ hợp được phân biệt bằng một đám sáng trên agar X-gal.

#### b. Vectơ M13 mp7

Giai đoạn tiếp theo trong phát triển vectơ M13 là đưa thêm vào những vị trí cắt hạn chế vào gen *lacZ'*. Điều này đã đạt được nhờ sinh tổng hợp trong ống nghiệm những oligonucleotid ngắn được gọi là polylinker (polylinker). Polylinker gồm hàng loạt những đầu dính là *EcoRI*. Polylinker mới này gài vào M13 mp2 ở vị trí cắt *EcoRI* để hình thành nên M13 mp7. Đây là một vectơ phức tạp hơn với bốn vị trí có thể chọn dòng (*EcoRI*, *BamHI*, *SalI* và *PstI*). Polylinker không làm gãy gen *lacZ'*, khi M13 mp7 bị cắt hoá bởi *EcoRI*, *BamHI* hoặc *SalI* thì một phần polylinker bị chặt.

Khi nối kết, trong sự có mặt của ADN mới thì một trong ba biến cố có thể xảy ra:

- ADN được gắn vào.
- Polylinkơ được gắn trở lại.
- Vectơ tự nối kết mà không có sự gắn cài.

Nếu sự cài ADN mới thì gen *lacZ'* bị gãy do đó *plaque sáng* trên agar X-gal. Nếu polylinkơ được gắn trở lại thì gen *lacZ'* không bị gãy do đó có *plaque màu xanh*. Cũng như vậy (*plaque màu xanh*) nếu trường hợp vectơ tự nối kết lại.

Sự tiến bộ của vectơ M13 mp7 là những vị trí chọn dòng cân xứng vì ADN được cài vào hoặc BamHI, Sall hoặc PstI đều có thể bị cắt từ phân tử tái tổ hợp khi dùng *EcoRI*.

### c. Những vectơ M13 phức tạp hơn

Đó là vectơ M13 có polylinkơ phức tạp hơn gài vào gen *lacZ'*, chẳng hạn M13 mp8 - nó là một phần của plasmid pVC8. Giống như vectơ plasmid, ưu điểm của vectơ M13 mp8 là khả năng của nó nhận những đoạn ADN với hai đầu dính khác nhau.

Vai trò của vectơ M13 mp9 cũng cùng một polylinkơ nhưng theo hướng ngược lại.

Những đôi vectơ M13 khác như: M13 mp10/11.M13 mp18/19 tương tự như M13 mp8/9, song có polylinkơ khác nhau do đó có những vị trí cắt hạn chế khác nhau.

## 1.3. Các vectơ chọn dòng được dựa trên phage lamda

Hai vấn đề giải quyết trước khi các vectơ chọn dòng được dựa trên lamda phát triển.

Phân tử ADN lamda ( $\lambda$ ) chứa 52 kb có thể tăng lên khoảng 5% tức là khoảng 3kb ADN mới thêm vào nữa. Nếu kích thước của phân tử lớn hơn 52kb, thì nó không bao gói vào cấu trúc đầu lamda được và các tiểu phần phage gây nhiễm không tiến hành được. Điều đó làm hạn chế kích thước của đoạn ADN cài vào vectơ lamda.

Bộ gen lamda thì quá lớn, điều đó phải có nhiều đoạn thứ tự nhận diện đối với các enzym cắt hạn chế. Song enzym cắt hạn chế không thể được

dùng để làm gãy phân tử lamda bình thường trong cái kiểu - mà kiểu đó sẽ cho phép gài ADN mới vào đó được. Hình như phân tử này có thể được cắt thành nhiều mẫu nhỏ mà những mẫu này có thể tạo thành bộ gen lamda mới thay đổi do kết cấu nối trở lại.

Do những khó khăn đó nên làm chúng ta ngạc nhiên rằng: có nhiều kiểu vectơ chọn dòng lamda được phát triển. Việc sử dụng đầu tiên của chúng là những mẫu ADN lớn từ 5 kb đến 40 kb, còn những mẫu quá lớn thì lại được dùng bởi plasmid hay vectơ M13.

Dưới đây là những vectơ gài vào và thay thế dựa vào phage lamda.

*a. Vectơ gài vào ít nhất phải có một vị trí cắt hạn chế*

Gồm có:

- Lamda NM607 đó là vectơ gài, nó mang tới 9 kb ADN mới được gài vào vị trí *EcoRI* trong gen *CI*.

- Lamda charon 16, ADN mới được gài vào vị trí *EcoRI* làm ức chế gen *lacZ'*.

*b. Vectơ thay thế phải có hai vị trí cắt hạn chế*

Gồm có:

- Lamda (U'ΕλB'): đoạn ADN mới có thể thay vào là 15 kb.

- Lamda EMBL4: đoạn ADN mới thay vào là 23 kb.

#### **1.4. Các vectơ chọn dòng dựa trên cosmid**

*Cosmid là vectơ lai* tạo giữa phân tử ADN phage và plasmid vi khuẩn.

Cosmid về cơ bản là một plasmid mang vị trí *cos*. Vị trí *cos* cần cho chức phận bao gói của phage. Cosmid thiếu các gen lamda nên không sản xuất plaque.

Thí nghiệm chọn dòng với cosmid thì được giãn ra như sau: cosmid mở ra một vị trí cắt hạn chế và những đoạn ADN mới được gài vào. Những đoạn này thì được sản xuất bằng enzym cắt hạn chế và được dẫn vào cosmid. Sự nối kết được giãn ra. Sau đó ADN cosmid tái tổ hợp được bao gói và làm nhiễm *E.coli* mặc dù vòng plaque không được hình thành.

Cosmid được dùng để thuần hoá những đoạn ADN lớn có khi tới 40 kb. Khả năng này đã làm dấy lên vấn đề thư viện genom hay còn gọi là thư viện bộ gen. Thư viện bộ gen là một bộ của các dòng tái tổ hợp - mà dòng đó

chứa tất cả các ADN có mặt trong một cơ thể riêng lẻ, chẳng hạn thư viện bộ gen *E.coli* chứa tất cả những gen *E.coli*. Các cơ thể có thư viện bộ gen được giới thiệu ở bảng 9.3.

**Bảng 9.3. Số lượng các dòng gen có mặt trong thư viện bộ gen của các cá thể.**

Các cá thể khác nhau	Kích thước bộ gen (đôi base)	Số đoạn dài 17kb (1)	Số đoạn dài 35 kb (2)
<i>Escherichia coli</i>	$4 \times 10^6$	700	340
<i>Bacillus megaterium</i>	$3 \times 10^7$	5.300	2.600
<i>Aspergillus nidulans</i>	$4 \times 10^7$	7.000	3.400
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$7 \times 10^7$	12.500	6.000
<i>Drosophila melanogaster</i>	$8 \times 10^7$	1.410	6.850
Cà chua	$7 \times 10^8$	125.000	60.000
Người	$3 \times 10^9$	535.000	258.000
Ếch	$2,3 \times 10^{10}$	4.280.000	1.997.000

(1) đoạn 17kb có thể dùng vectơ lamda EMB L4 nhân dòng.

(2) đoạn 35kb có thể dùng vectơ cosmid nhân dòng.

Những thư viện này có thể giữ lại nhiều năm, có thể gửi cho nhau từ nhóm nghiên cứu này tới nhóm nghiên cứu khác. Điều đó giúp cho sự phát triển nghiên cứu nhanh chóng trong lĩnh vực sinh học phân tử.

Ngoài vectơ đối với *E.coli* còn có các vectơ đối với các vi khuẩn khác, đó là *Streptomyces*, *Bacillus* và *Pseudomonas*. Các vectơ này phần lớn là plasmid còn một số thì từ phage như vectơ chọn dòng của *Streptomyces* thì dựa trên  $\phi$  C31 - một loại bacteriophage.

## 2. Các vectơ chọn dòng đối với các vật chủ khác

Những thí nghiệm chọn dòng vi khuẩn *E.coli* chủ yếu là để nghiên cứu cấu trúc, chức năng và biểu hiện của gen trong các nghiên cứu cơ bản của sinh học phân tử. Còn trong công nghệ sinh học không chỉ nghiên cứu gen mà còn dùng sự nhân, tách dòng để kiểm tra hoặc tổng hợp những sản phẩm chuyển hoá quan trọng như hormon insulin hay thay đổi tính chất của cơ thể, chẳng hạn đưa khả năng kháng sâu bọ vào các cây trồng. Do đó chúng ta cần phải xem xét các vectơ chọn dòng đối với các cơ thể khác.

## 2.1. Vectơ đối với nấm men và các nấm khác

- Nấm men *S.cerevisiae* là một trong những cơ thể quan trọng nhất trong công nghệ sinh học.

- Vectơ có cấu trúc vòng 2  $\mu\text{m}$ , kích thước 6kb tồn tại trong tế bào nấm men và có số lượng bản sao từ 70 đến 200.

Dùng gen *leu.2* như là markơ chọn lọc.

Vectơ được dẫn ra từ vòng 2 $\mu\text{m}$  được gọi là *plasmid episom nấm men* hay  $\gamma\text{Eps}$ , điển hình của loại này là pJDB 219.

pJDB 219 cũng gồm các đoạn liên tiếp như pBR322 do đó có thể nhân lên và được chọn lọc cả trong nấm men và trong *E.coli* có sự gài pJDB vào một nhiễm sắc thể của các vectơ khác của nấm men.

Plasmid integrative yeast: (YIp) là plasmid vi khuẩn mang gen nấm men. Plasmid replicative yeast (YRp) là plasmid mang đoạn gen thứ tự ADN của nhiễm sắc thể chứa đoạn sao chép. Các vectơ này kết hợp với ADN nhiễm sắc thể theo kiểu tái tổ hợp giữa markơ plasmid với gen vật chủ thích hợp.

## 2.2. Các vectơ chọn dòng đối với thực vật bậc cao

Có ba hệ thống vectơ:

- Vectơ plasmid Ti của vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.
- Vectơ virus *Cauliflower mosaic* (Ca MV).
- Vectơ vận chuyển gen trực tiếp khi dùng plasmid vi khuẩn đơn giản.

### a. Vectơ chọn dòng là vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

*A.tumefaciens* (A-T) là vi khuẩn thường gây ra bệnh nổi u ở chồi (crown gall disease) trong nhiều loài thực vật hai lá mầm, bệnh này xảy ra khi có tổn thương, cho phép vi khuẩn tấn công thực vật.

Sự sinh ra bệnh này liên quan với sự có mặt của plasmid Ti (tumour inducing) trong tế bào vi khuẩn. Đó là plasmid dưới 200kb, mang nhiều gen gây nhiễm. Sau khi gây nhiễm một phần, phân tử hợp nhất vào ADN nhiễm sắc thể thực vật. Phần này được gọi là T-ADN giữa 15 và 30kb và được di truyền trong các thế hệ sau của thực vật.

Trong tự nhiên *A.tumefaciens* (A-T) gây nhiễm gần 100 loài thực vật nhưng tất cả đều là loài hai lá mầm. Sự gây nhiễm loài một lá mầm (như lúa

mạch, lúa mì, lúa gạo...) thì còn chưa được chứng minh một cách rõ ràng.

Gen mới được đưa vào qua plasmid pBR, sau đó plasmid pBR đó hợp nhất vào plasmid T<sub>1</sub> rồi mới đưa vào cây hai lá mầm.

*b. Vector chọn dòng là virus Cauliflower mosaic*

Hầu hết thực vật là đối tượng của những virus, phần lớn virus đó là loại ARN, cho nên khó biến nạp. Chỉ có virus ADN được biết gây nhiễm ở thực vật bậc cao, đó là Geminivirus và Caulimoviruses (CaMV). Geminivirus còn ít biết.

Bộ gen CaMV khoảng 8kb có ít nhất sáu gen và một vùng hợp nhất. Bộ gen này có hai hạn chế:

- Chỉ thêm được khoảng từ 200 đến 300 nucleotid nữa mà thôi.

- Vật chủ nhận đưa được bộ gen này vào rất hạn chế, chủ yếu là cải súp lơ và củ cải trắng. Hiện nay người ta đang mở rộng nghiên cứu xem ở loài ngũ cốc và cỏ đồng cỏ đưa được bộ gen này vào không?

*c. Vector vận chuyển gen trực tiếp cung cấp hệ thống chọn dòng tốt nhất đối với thực vật nông nghiệp.*

Dòng pBR332 gắn gen mới dựa vào protoplast qua bản gen hoặc qua xung điện gọi là *chuyển gen trực tiếp*. Có lẽ đó là con đường chọn dòng đối với công nghệ gen của những cây trồng nông nghiệp, vì Ti plasmid và CaMV là hai hệ tự nhiên nhưng chúng có nhiều khó khăn và hạn chế khi sử dụng.

### **2.3. Vector chọn dòng đối với các tế bào động vật có vú**

*a. Vector dựa trên SV40*

SV40 có khả năng gây nhiễm một số loài động vật có vú kéo theo vòng tan (lytic) và sinh tan (lysogenic).

Giống như lamda và CaMV, sự bắt buộc bao gói làm hạn chế lượng ADN mới gài vào bộ gen. Bộ gen SV40 nhỏ khoảng 5,2kb và chỉ dung hợp được vài trăm nucleotid ở ngoài vào.

Chỉ mới thành công được khi làm mất một đoạn gen bình thường bằng SVGT-5 người ta đưa được gen globin beta của thỏ vào tế bào khỉ.

*b. Vector virus khác của động vật có vú*

Khuyết điểm của vector SV40 là phân tử ADN tái tổ hợp trong đó duy



trì ở tế bào bị biến nạp chỉ một thời gian ngắn. Sự biến nạp thường xuyên không được tạo ra.

Bovine papilloma virus (BPV) là vectơ khác của động vật có vú cung cấp sự biến nạp thường xuyên hơn. BPV chủ yếu gây ra mụn cóc trên bò nhưng cũng gây nhiễm trên các loài khác. Trong các tế bào chuột, BPV có nhiều bản sao với gần 100 phân tử/1 tế bào. Chúng không gây chết tế bào chủ, các phân tử BPV chuyển sang tế bào con cháu khi tế bào vi khuẩn đã được cấu trúc. Nó chỉ ra có tiềm năng lớn để đưa những mẫu lớn ADN vào tế bào động vật có vú.

## CHƯƠNG X

# CÁC LOẠI VECTƠ TRONG TẠO DÒNG

### I. NHỮNG VẤN ĐỀ CHUNG

Chúng ta biết rằng, tạo dòng là nhằm thu nhận một lượng lớn bản sao ADN từ một trình tự ADN xác định. Phương pháp tạo dòng này gồm năm bước trình bày trong bảng 10.1.

*Bảng 10.1. Phương pháp tạo dòng*

Các bước	Nội dung thực hiện
Bước 1	Chọn và xử lý vectơ
Bước 2	Xử lý ADN cần cho tạo dòng
Bước 3	Tạo vectơ tái tổ hợp từ hai thành phần trên
Bước 4	Chuyển vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ là vi khuẩn
Bước 5	Chọn lọc dòng vi khuẩn có chứa vectơ tái tổ hợp cần tìm hay còn gọi là phát hiện dòng cần tìm trong thư viện gen

Trong chương này trình bày chi tiết bước 1 của vấn đề chọn và xử lý vectơ.

Vectơ là một ADN, thường có dạng vòng được dùng để chuyển một đoạn ADN lạ vào tế bào vật chủ như vi khuẩn, nấm men, tế bào động thực vật v.v... vectơ được dùng chủ yếu trong phương pháp chuyển gen hay vectơ được dùng trong phương pháp tạo dòng vì xác định một gen trong sinh vật nhân chuẩn (eukaryote) là rất khó, người ta thường ví chẳng khác nào như đáy bể mò kim, nhưng kim ở đây lại nằm trong biển kim nên phải tách chiết, tinh sạch và nhân dòng.

- Bốn đặc tính phải có của một vectơ được trình bày tóm tắt trong bảng 10.2.

**Bảng 10.2. Các đặc tính của vectơ**

Đặc tính	Nội dung đặc tính
Đặc tính 1	Vectơ phải có khả năng và xâm nhập được vào tế bào chủ
Đặc tính 2	Vectơ phải tự sao chép tích cực bên trong tế bào chủ
Đặc tính 3	Vectơ phải cho phép chọn lọc dễ dàng các dòng vi khuẩn có mang vectơ tái tổ hợp.
Đặc tính 4	Vectơ phải có khả năng đặc biệt tiếp nhận tốt gen lạ

Thông thường có năm loại vectơ được trình bày tóm tắt trong bảng 10.3.

**Bảng 10.3. Các loại vectơ**

Loại vectơ	Đặc tính
1. Vectơ plasmid	- Thông thường gắn 8-9kb ADN lạ, tế bào chủ là vi khuẩn
2. Vectơ phage	- Có thể gắn 15-20 kb ADN lạ, xâm nhiễm tế bào vi khuẩn cao.
3. Vectơ cosmid (phối hợp giữa plasmid và phage lamda)	- Có thể gắn tới 35-50 kb ADN lạ, phát triển ở vi khuẩn.
4. Vectơ virut của sinh vật nhân chuẩn SV40 đối với động vật, CaMV đối với thực vật. Adenovirus Retrovirus Herpesvirus Vacciniavirus	- Có thể xâm nhiễm vào tế bào động vật, thực vật
5. Vectơ thể nhiễm sắc nấm men nhân tạo	- Có thể xâm nhập vào tế bào nấm men. - Đưa gen lạ có kích thước lớn 150-1000 kb

Tuỳ theo ADN tạo dòng, người ta phân biệt được hai loại thư viện gen dưới đây (bảng 10.4).

**Bảng 10.4. Phân biệt hai loại thư viện gen**

	Loại thư viện gen	Đặc tính
Loại 1	Thư viện bộ gen	- ADN được tạo dòng là toàn bộ trình tự ADN của bộ gen. - Cho phép nghiên cứu toàn bộ các trình tự mã hoá và không mã hoá chứa trong bộ gen.
Loại 2	Thư viện cADN	- ADN được tạo dòng là tập hợp tất cả cADN xuất phát từ các mARN của một loạt tế bào chuyên biệt. - Chỉ cho phép biểu hiện của gen ở mức độ phiên mã trong tế bào sinh vật

## II. CÁC LOẠI VECTO

### 1. Vectơ plasmid

Những đặc điểm cơ bản của vectơ plasmid

**1.1 Plasmid là phân tử ADN vòng có trong vi khuẩn.** Plasmid mang một hay nhiều gen và thường những gen đó có ích cho vật chủ: chẳng hạn plasmid mang gen kháng kháng sinh làm cho vi khuẩn chống được một số kháng sinh, đồng thời có lợi cho công nghệ gen vì chúng cung cấp một phương tiện thuận lợi để lựa chọn các tế bào có mang gen lạ.

**1.2 Tất cả các plasmid có ít nhất một đoạn ADN có nguồn gốc nhân lên,** do đó chúng có khả năng nhân lên mà hoàn toàn không lệ thuộc vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn.

**1.3 Một vài loại plasmid cũng có khả năng nhân lên** bởi tự gài vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn, plasmid đó gọi là episom.

**1.4 Kích thước của các plasmid** khoảng từ 10 kb cho tới 250 kb.

**1.5 Số lượng bản sao (copy)** từ 1 đến 50

**1.6 Có năm loại plasmid chính**

a. *Plasmid F* - có khả năng khởi động chuyển plasmid sang một cơ thể khác.

b. *Plasmid R* kháng lại kháng sinh.

c. *Plasmid col* - mã hoá colicin một phân tử protein giết vi khuẩn khác.

d. *Plasmid thoái hoá* - cho phép vi khuẩn làm thoái hoá những phân tử chuyển hoá không bình thường như toluen, acid salicylic.

e. *Plasmid độc* - gây bệnh lý cho vật chủ như plasmid Ti sinh ra bệnh ung thư rễ trên cây hai lá mầm.

**1.7 Trong nấm men *S. cerevisiae* cũng có plasmid vòng 2 $\mu$ m;** nó kết hợp với pBR322 của *E.coli* tạo ra vectơ episom gài vào ADN chromosom của nấm men và nhân lên nhiều lần

Tóm lại *plasmid vi khuẩn* là phân tử ADN hai chuỗi vòng nhỏ, có chức phận tự nhiên là kháng kháng sinh. Plasmid có nhiều đặc tính mà những đặc tính đó được sử dụng đặc biệt vào cấu trúc vectơ chọn dòng. Chúng có thể có một bản duy nhất hay nhiều bản sao trong phạm vi một vi khuẩn và tái bản không lệ thuộc vào ADN của vi khuẩn. Thứ tự ADN toàn

bộ của nhiều plasmid đã được biết. Nhờ đó người ta có thể gài đoạn ADN ngoại lai vào những vị trí chính xác bởi những enzym cắt hạn chế. Plasmid nhỏ hơn nhiễm sắc thể vật chủ ( vi khuẩn ), bởi vậy người ta có thể tách nó dễ dàng ra khỏi ADN vi khuẩn để thao tác gắn ADN ngoại lai.

Từ khi phát hiện được plasmid có các đặc điểm và tính chất nêu ở trên, cho đến nay các plasmid không ngừng được cải tiến, ngày càng mang thêm nhiều đặc tính quý cho việc tạo dòng. Hiện nay đã sinh ra ba thế hệ của plasmid (xem bảng 10.5).

**Bảng 10.5. Các đặc tính của các thế hệ plasmid**

Các thế hệ của plasmid	Ví dụ	Các đặc tính quý
Plasmid thế hệ 1	Đó là các plasmid tự nhiên như: pSC101, Col E <sub>1</sub> ...	Góp phần tạo dòng các gen eukaryote
Plasmid thế hệ 2	pBR322	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kích thước 4363 bp</li> <li>- Có hai gen kháng kháng sinh :               <ul style="list-style-type: none"> <li>+ Ap<sup>R</sup>- kháng ampicilin</li> <li>+ Tc<sup>R</sup>- kháng tetracyclin</li> </ul> </li> <li>- Có 20 vị trí nhận biết enzym giới hạn RE.</li> <li>- Có 11 vị trí đưa gen ADN lạ xen vào trong số đó có những vị trí nằm trong các gen kháng kháng sinh nên khi có gen ADN lạ xen vào sẽ làm mất tính kháng kháng sinh tương ứng</li> </ul>
Plasmid thế hệ 3		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Đây là plasmid mạnh nhất với hai đặc tính:               <ul style="list-style-type: none"> <li>+ Kích thước nhỏ nên sao chép nhanh, tạo ra số bản sao lớn.</li> <li>+ Có mang polylinkơ, đó là một đoạn polynucleotit tổng hợp tương ứng với một chuỗi các vị trí nhận biết duy nhất của các enzym giới hạn (RE).</li> </ul> </li> <li>- Hiện có ba nhóm:               <ul style="list-style-type: none"> <li>+ Nhóm pUC, 2600bp, mang gen Ap<sup>R</sup> và một phần gen <i>lacZ</i> để dễ phát hiện mẫu xen vào giữa gen <i>lacZ</i> là polylinkơ có thể cho phép gắn xen vào bất cứ gen lạ nào.</li> <li>+ Nhóm pSP và Gemini, 3000bp mang gen Ap<sup>R</sup> và polylinkơ, có một promoter đặc trưng cho ARN polymeraza ở hai bên polylinkơ thuận lợi cho phiên mã ra nhiều ARN để làm mẫu dò nghiên cứu.</li> <li>+ Nhóm pBluescript kết hợp được tất cả các ưu điểm nói trên.</li> </ul> </li> </ul>

## 2. Vector thực khuẩn thể

### Những đặc điểm và tính chất của thực khuẩn thể

*Thực khuẩn thể (phage)* là virus gây nhiễm vi khuẩn, nó có một số tính chất sau:

**2.1. Cấu trúc của chúng rất đơn giản** phân chủ yếu là ADN (đôi khi là ARN) mang nhiều gen, trong đó có gen nhân thực khuẩn thể được bao bọc bởi lớp áo bảo vệ hoặc capsid là những phân tử protein.

### 2.2. Quá trình gây nhiễm gồm ba giai đoạn:

a. *Giai đoạn 1.* Những tiểu phần thực khuẩn thể buộc vào phía bên ngoài của vi khuẩn và tiêm nhiễm sắc thể vào bên trong tế bào.

b. *Giai đoạn 2.* ADN của thực khuẩn thể được tái sinh.

c. *Giai đoạn 3.* Những gen khác của thực khuẩn thể trực tiếp tổng hợp các thành phần protein của nó. Những tiểu phần mới được tập hợp lại và được giải phóng khỏi vi khuẩn.

**2.3. Chỉ có thực khuẩn thể lamda và thực khuẩn thể M13 là được tìm thấy vai trò thực như những vector chọn dòng,** mặc dù có nhiều loại thực khuẩn thể khác nhau.

### 2.4. Tổ chức gen trong phân tử ADN lamda

Lamda là loại thực khuẩn thể điển hình có đầu và đuôi. ADN chứa trong cấu trúc đầu polyhedral và đuôi thì dùng để buộc thực khuẩn thể vào bề mặt vi khuẩn để tiêm ADN vào tế bào.

Phân tử ADN lamda về kích thước gồm 49kb và đã được nghiên cứu bằng kỹ thuật làm bản đồ gen và phân tích thứ tự ADN.

Nó là chuỗi kép ADN, có dạng thẳng và vòng.

### 2.5. Tổ chức gen trong phân tử ADN M13.

Đó là thực khuẩn thể hình sợi, hoàn toàn khác gen lamda. Về chiều dài nó gồm 6407 nucleotit và là ADN chuỗi đơn dạng vòng với vỏ chỉ có ba protein chứ không phải 15 protein như lamda. Mặc khác chu kỳ gây nhiễm đơn giản hơn và bộ gen không gài vào ADN vật chủ.

Khi gây nhiễm, ADN của M13 vào trong tế bào *E.coli* qua lông rụng. Chuỗi đơn này làm khuôn để tổng hợp chuỗi bổ sung và như vậy có ADN chuỗi kép. Phân tử này không được gài vào bộ gen vi khuẩn nhưng được

dùng để tái bản cho tới hơn 100 bản sao ADN trong tế bào. Khi vi khuẩn phân chia, mỗi bản sao ADN con cháu của bộ gen thực khuẩn thể tiếp tục tái bản và duy trì một lượng lớn trong mỗi tế bào. Những tiểu phần thực khuẩn thể mới tiếp tục tập hợp và giải phóng, vào khoảng 1000 thực khuẩn thể mới được sản xuất cho mỗi thế hệ của tế bào bị nhiễm.

## 2.6. M13 là phương tiện tách dòng hấp dẫn

Vì:

a. *Dạng tái bản* ADN chuỗi kép của bộ gen M13 rất giống plasmid và có thể được xử trí như vậy trong các mục đích thí nghiệm.

b. *Những dạng này* dễ dàng được tạo ra từ nuôi cấy tế bào *E.coli* và có thể đưa vào bởi sự gây nhiễm.

c. *Những gen* được tách dòng với vectơ dựa trên M13 có thể thu được ở dạng ADN chuỗi đơn.

d. *Những chuỗi đơn* này có thể dễ dàng để phân tích thứ tự và dễ dàng gây biến dị *in vitro*.

Tóm lại thực khuẩn thể chứa ADN thẳng, trong đó người ta có thể đưa ADN ngoại lai vào nhiều vị trí hạn chế. *Plasmid chỉ có thể tiếp nhận đoạn ADN có chiều dài 6-10kb*; trong khi đó thực khuẩn thể có thể nhận đoạn ADN có chiều dài tới 10-20kb. Mặt khác sử dụng phage làm vectơ có ưu điểm hơn so với vectơ plasmid và phage có một hệ thống xâm nhập tế bào vi khuẩn chủ, có khả năng tăng hiệu quả xâm nhiễm nhanh hơn nhiều so với chuyển plasmid vào vi khuẩn.

Nhưng nếu đoạn ADN ngoại lai dài hơn thì có thể chọn dòng cosmid, mà nó là sự phối hợp những đặc tính tốt nhất của plasmid và thực khuẩn thể lamda. Cosmid là plasmid có đoạn cos cần thiết cho việc bao gói ADN lamda vào thực khuẩn thể. Vectơ này phát triển ở dạng plasmid trong vi khuẩn. Nhiều cosmid có thể mang đoạn ADN gài vào với chiều dài từ 35-50kb. Dưới đây là bảng những vectơ phổ biến để chọn dòng (bảng 10.6).

**Bảng 10.6. Các vectơ phổ biến để chọn dòng**

Vectơ	Độ lớn của ADN ngoại lai có thể gài được
Plasmid pBR322	0,01-10 kb
Charon 4A	10-20 kb
Cosmid	35-50 kb

Hiện nay phage cũng được cải tiến nhiều để hoàn thiện các tính chất của vectơ (bảng 10.7).

**Bảng 10.7. Những đặc điểm các phage**

Các thể hệ vectơ phage	Ví dụ	Các đặc điểm
Phage thể hệ 1	Phage tự nhiên lamda	48502 bp
Phage thể hệ 2	Phage EMBL 3 và 4	Có polylinker tiếp nhận 15-20 kb ADN là thích hợp. Thích hợp cho vectơ thiết lập thư viện bộ gen.
Phage thể hệ 3	Lamda GEM 11 và 12	- Có vùng polyliker. - Có promotơ đặc trưng cho ARN polymerase để tổng hợp một lượng lớn ARN, để dò ADN trong thư viện gen
Phage thể hệ 4	Lamda 11 và 18-23	Đây là vectơ biểu hiện có mang một gen <i>lacZ</i> để phát hiện vectơ tái tổ hợp trong thư viện gen

### 3. Các nhiễm sắc thể nhân tạo của động vật có vú

Các nhiễm sắc thể nhân tạo của động vật có vú còn có tên là MAC (mammifere artificial chromosomes). Những vectơ này có nguồn gốc từ người TEL, CEN... Đưa MAC vào tế bào động vật có vú và giữ ổn định trong tế bào.

### 4. Các nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men

Nấm men (YAC = yeast artificial chromosomes), cho phép tạo dòng những đoạn ADN có kích thước từ 150-1000 kb (kích thước trung bình là 350 kb).

- Nhiễm sắc thể nhân tạo bây giờ được kết cấu có ba trình tự sau thì nhân đôi và phân ly rất tốt.

+ TEL [ Telomeric sequense- Trình tự đầu cuối của nhiễm sắc thể (NST)].

+ CEN (Centromeric sequense- Trình tự trung tâm của nhiễm sắc thể)

+ ARS (Autonomous replicating sequense- Trình tự sao chép tự chủ).



- YAC này đưa vào tế bào nấm men bằng phương pháp biến nạp và ở đó chúng sẽ nhân lên như nhiễm sắc thể tự nhiên.

- YAC liên tục được cải tiến chẳng hạn gắn thêm ORI (điểm khởi đầu sao chép) gen kháng ampicilin, polylinkơ và promotơ đặc trưng cho T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, ARN polymeraza..

## **5. Các vectơ là virut của sinh vật nhân chuẩn**

Các virut (virus) là những phương tiện chọn dòng đối với các cơ thể khác vì rằng: hầu hết các cơ thể sống đều bị nhiễm bởi virus. Điều này đặc biệt quan trọng khi nhớ lại rằng, các vectơ plasmid chỉ đưa được vào vi khuẩn và nấm men nhưng vectơ virus thì có tiềm năng đưa được vào cả động vật và thực vật.

Những virus động vật như SV40, virus thực vật như virus khảm xúp lơ CaMV là những virus được chú ý nhất hiện nay. Các virus khác sử dụng trong vectơ chọn dòng còn đang được nghiên cứu đó là Adenovirut, Retrovirut, Herpesvirus và Vacciniavirus.

## CHƯƠNG XI

# SỰ TẠO DÒNG GEN VÀ PHÁT HIỆN DÒNG CẦN TÌM

## I. CÁC BƯỚC CỦA PHƯƠNG PHÁP TẠO DÒNG GEN

### 1. Các vấn đề cơ bản

Các vấn đề cơ bản trong việc tạo dòng gen gồm bốn công đoạn:

1. Tạo ra các đoạn ADN
2. Gắn vào một vectơ
3. Nhân trong một tế bào vật chủ
4. Chọn lọc các đoạn trình tự quan tâm

Mục đích của việc tạo dòng là nhằm thu được một lượng lớn bản sao của một trình tự ADN xác định. Tùy thuộc vào thư viện gen cần thiết lập, do đó các nhân tố tham gia vào quá trình tạo dòng (vectơ, tế bào chủ, chuyển vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ...) có thể thay đổi nhưng tiến trình tạo dòng bao giờ cũng gồm các bước sau:

#### *1.1. Chọn và xử lý vectơ*

- Trước hết vectơ được cắt ở một vị trí xác định bằng một enzym giới hạn.
- Xử lý ở hai đầu mỗi cắt để chúng không thể nối lại được.
- Vectơ chỉ ở dạng vòng khi hai đầu chỗ mỗi cắt được nối với một gen lạ.

#### *1.2. Xử lý ADN cần cho tạo dòng (insert)*

- Chọn các đoạn ADN có kích thước gần nhau và tương ứng với loại vectơ đã chọn.
- Xử lý hai đầu của các ADN này cho phù hợp với hai đầu chỗ mỗi cắt

của vectơ (bằng cùng một enzym giới hạn cắt).

### ***1.3. Tạo vectơ tái tổ hợp***

- Vectơ và ADN cần tạo dòng được trộn chung theo một tỷ lệ nhất định với sự hiện diện của ligase.

- Vectơ tái tổ hợp sẽ được hình thành dưới tác dụng của ligase làm nối vectơ với ADN.

- Vectơ tái tổ hợp này được tinh sạch qua tách chiết và tủa.

### ***1.4. Chuyển vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ***

Chuyển vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ nhằm sử dụng bộ máy của tế bào chủ thích hợp, để sao chép vectơ tái tổ hợp thành một số lượng lớn bản sao.

### ***1.5. Phát hiện dòng cần tìm trong thư viện gen***

Để phát hiện dòng cần tìm người ta sử dụng một mẫu dò. Mẫu dò đó có thể là kháng thể đặc trưng cho protein được mã hoá bởi gen cần tìm hoặc mẫu dò đó là trình tự ADN bổ sung cho gen cần tìm.

## **2. Các thư viện gen**

### ***2.1. Thư viện bộ gen***

- Để thiết lập thư viện bộ gen (genomic library), trước hết người ta tách chiết ADN bộ gen của sinh vật đó.

- Cắt ADN thành những đoạn có kích thước xác định bằng các enzym giới hạn.

- Gắn các đoạn đó vào vào vectơ, tạo vectơ tái tổ hợp (bảng 11.1)

- Các vectơ tái tổ hợp sau đó được đưa vào tế bào chủ. Các tế bào chủ sẽ được nuôi cấy trên môi trường đặc và hình thành nên những dòng (clone).

- Việc thiết lập thư viện bộ gen theo các bước cơ bản của kỹ thuật tạo dòng nói trên.

- Vectơ tạo dòng thư viện bộ gen có thể sử dụng

+ Phage: đoạn ADN khoảng 10-20 kb.

+ YAC: đoạn ADN > 150 kb.

+ Cosmid: đoạn ADN khoảng 35-45 kb.

- *Thư viện bộ gen* chỉ cần khi giải mã di truyền của một cấu trúc intron- exon của một gen xác định và tạo dòng các trình tự ADN điều hoà biểu hiện gen.

**Bảng 11.1.** Kích thước thư viện hệ gen của các sinh vật khác nhau

Sinh vật	Kích thước hệ gen	Đoạn xen 20 kb	Đoạn xen 45 kb
<i>Escherichia coli</i> (vi khuẩn)	$4,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$
<i>Sacchromyces cerevisiae</i> (nấm men)	$1,4 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$	$9,3 \times 10^2$
<i>Arabidopsis thaliana</i> (thực vật bậc cao đơn giản)	$7,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$4,7 \times 10^3$
<i>Drosophila melanogaster</i> (ruồi quả)	$1,7 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
<i>Stronglyocentrotus purpuratus</i> (nhím biển)	$8,6 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$5,7 \times 10^4$
<i>Homo sapiens</i> (người)	$3,0 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$
<i>Triticum aestivum</i> (lúa mì lục bội)	$1,7 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$

## 2.2. Thư viện cADN

- Thư viện cADN là tập hợp các bản sao cADN từ tất cả các mRNA của một tế bào nhờ qua enzym phiên mã ngược đồng.

- Việc thiết lập thư viện cADN cũng tuân theo nguyên tắc của kỹ thuật tạo dòng nói trên.

- Vectơ tạo dòng thư viện cADN thường được sử dụng loại plasmid pUC, Gemini, Bluescript.

- Các loại vectơ này kết hợp với cADN (<9 kb) tạo thành vectơ tái tổ hợp và đưa vào vi khuẩn bằng phương pháp biến nạp như đã nói ở chương biến nạp.

## II. SỰ PHÁT HIỆN DÒNG CẦN TÌM

Người ta có thể phát hiện dòng tái tổ hợp cần tìm trong thư viện bộ gen hay thư viện cADN bằng hai phương pháp thông dụng sau đây:

### 1. Phương pháp sử dụng các oligonucleotit tổng hợp

Protein cần nghiên cứu được tách chiết tinh sạch, vài trình tự ngắn (15-

200 axit amin) của protein được xác định.

Tương ứng với trình tự axit amin, trình tự oligonucleotit phù hợp nhất được tổng hợp với đánh dấu ở đầu 5' bằng đồng vị phóng xạ hay bằng hoá chất nhờ polynucleotit kinaza.

Mẫu dò oligonucleotit sau đó được đem lai với thư viện gen qua phương pháp lai tại chỗ và phát hiện bằng kỹ thuật phóng xạ tự ghi hay kỹ thuật miễn dịch tế bào.

## 2. Phương pháp sử dụng kháng thể

- Sử dụng phương pháp này khi có một kháng thể đặc trưng cho protein mã hoá bởi gen cần tạo dòng và vectơ sử dụng là vectơ cho phép dịch mã đoạn ADN tạo dòng thường gặp đó là vectơ lamda gtl.

- Nguyên tắc của phương pháp theo Huỳnh Hoàng Dương đã mô tả như sau:

+ Khi các đĩa phân giải do các phage tái tổ hợp tạo ra trên mặt lớp vi khuẩn đạt kích thước nhất định (1-2 mm), người ta đặt lên trên một màng nitrocellulose tẩm IPTG, chất cảm ứng của operon lac. IPTG sẽ cảm ứng sự tổng hợp protein "lai" (được mã hoá bởi tổ hợp gen *lacZ*-ADN cần tạo dòng).

+ Protein "lai" hấp phụ lên bề mặt màng và màng được đem ủ với kháng thể đặc trưng. Phức hợp kháng thể – protein sẽ được phát hiện nhờ một protein đánh dấu bằng  $^{125}\text{I}$  có khả năng gắn với kháng thể. Kết quả thu nhận dưới dạng một bản phóng xạ tự ghi. Các đĩa phân giải tương ứng với tín hiệu nhận được sẽ được thu nhận lại.

## CHƯƠNG XII

# PHƯƠNG PHÁP PCR DÙNG TRONG TẠO DÒNG IN VITRO

Các phương pháp tạo dòng *in vivo*\* đã được đề cập ở các phần trước tuy giải quyết được vấn đề về số lượng vật chất di truyền nhưng đòi hỏi thao tác phức tạp và thời gian dài. Sự ra đời của phương pháp PCR đã đảo lộn nguyên tắc của việc tạo dòng cổ điển, mở ra những triển vọng ứng dụng to lớn. Phương pháp PCR thực chất là một phương pháp tạo dòng *in vitro*\*, không cần sự hiện diện của tế bào, nhằm mục đích thu nhận một số lượng lớn bản sao của một trình tự xác định. Qua 32 chu kỳ số phân tử ADN mạch kép sinh ra đã là 1.073.741.82 (bảng 12.1)

Phương pháp PCR (polymerase chain reation) thực chất gồm bốn bước sau:

*Bước 1.* Nghiên cứu và tổng hợp các cặp đoạn mồi (primer) đặc hiệu cho gen muốn tạo dòng.

*Bước 2.* Tách chiết ADN từ các mẫu đối tượng nghiên cứu đem đo quang phổ cũng như chạy điện di trên gel agarose.

*Bước 3.* Nghiên cứu các điều kiện tối ưu để tiến hành PCR, cấu gen muốn tạo dòng và phóng đại nó.

*Bước 4.* Tiến hành điện di sản phẩm PCR trên gel agarose và so sánh với đối chứng để phát hiện.

## I. PHẢN ỨNG CHUỖI POLYMERAZA

### 1. Nguyên tắc chung

Trước khi đi vào các bước tiến hành PCR chúng ta cần nhắc lại tổng hợp ADN trong tế bào.

---

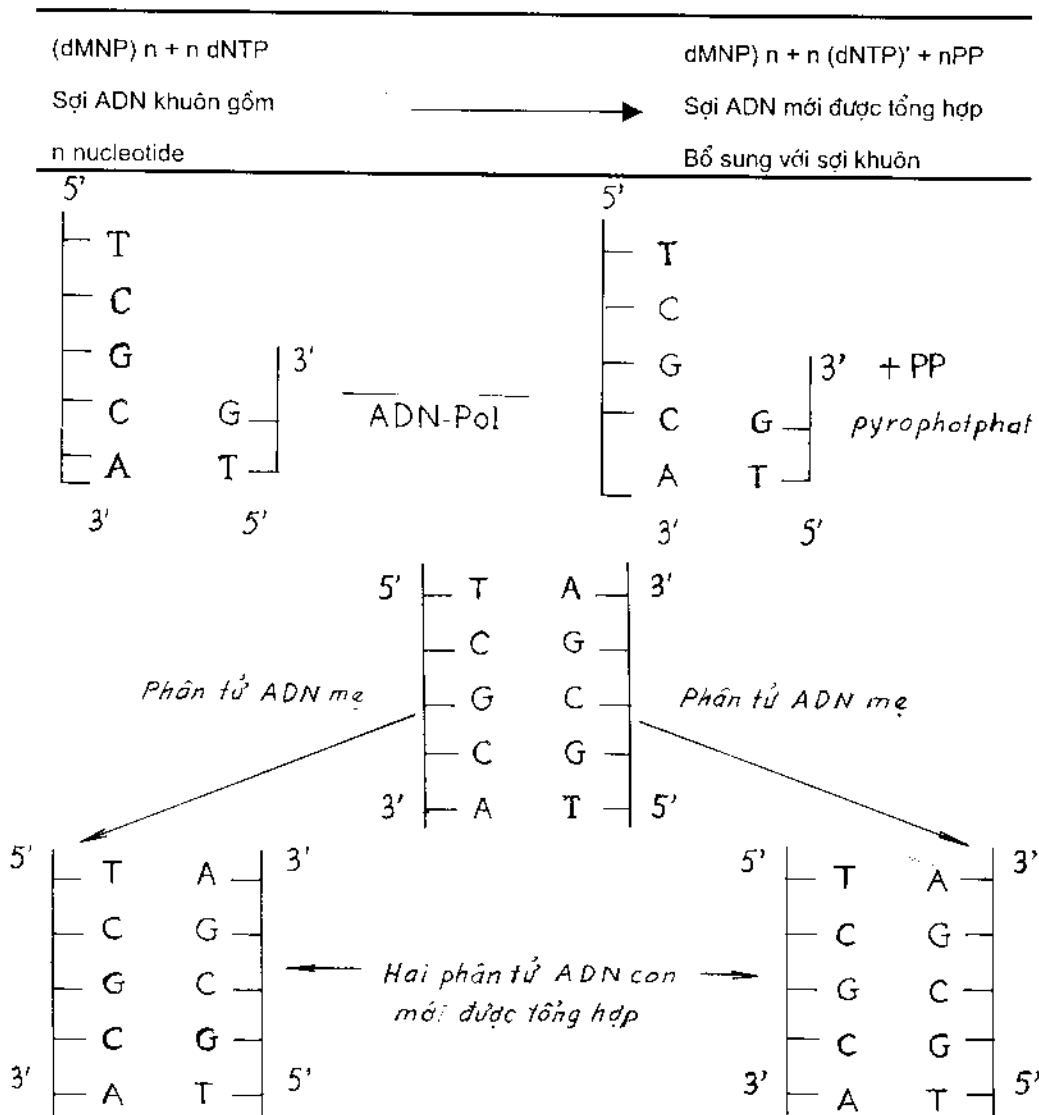
\* In vitro: trong ống nghiệm; in vivo: trong cơ thể sống – BTV.

**Bảng 12.1. Số phân tử ADN sinh ra tương ứng với các chu kỳ**

<b>Số chu kỳ</b>	<b>Số phân tử ADN - Mạch kép sinh ra</b>
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	5.024
13	2.048
14	4.096
15	8.192
16	19.384
17	32.768
18	65.536
19	31.072
20	262.144
21	524.288
22	1.048.567
23	2.097.152
24	4.194.304
25	8.388.608
26	16.777.246
27	33.544.432
28	67.108.864
29	134.217.728
30	268.435.456
31	536.870.912
32	1.073.741.82

Trong tế bào (in vivo) phân tử ADN được tổng hợp nhờ ADN polymeraza (DNA - Pol). Mỗi sợi ADN đều được dùng làm sợi khuôn (template), ADN polymeraza xúc tác sự gắn các deoxyribonucleosid - triphosphat (dNTP) đó là dATP, dCTP, dTTP tạo nên sợi thứ hai bổ sung với sợi khuôn.

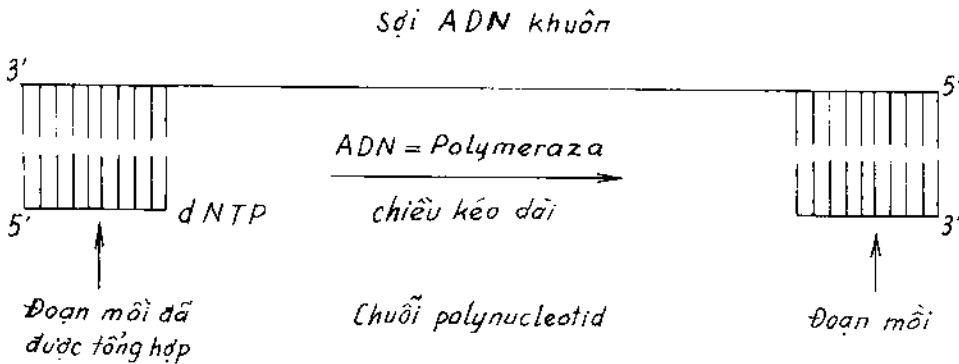
Sơ đồ tổng quát sự tổng hợp ADN trong tế bào dưới đây (hình 12.1)



Hình 12.1. Sự gắn dẫn từng nucleosid monophosphat (dMNP) vào sợi bổ sung đang được tổng hợp



Quá trình tổng hợp ADN trong tế bào diễn ra rất phức tạp với sự tham gia của rất nhiều yếu tố. Ở đây chỉ nêu một điểm rất quan trọng đó là: oligonucleotid gọi là đoạn môi bổ sung với những đoạn tương ứng ở sợi ADN khuôn, sau đó là sự kéo dài ADN bổ sung nhờ ADN - polymeraza (hình 12.2).



Hình 12.2. Chuỗi polynucleotid tổng hợp

Như vậy tạo sự tạo thành nhiều đoạn ADN bổ sung với sợi ADN khuôn, sau đó là sự loại trừ những đoạn môi ADN. Sự lắp đầy và nối các đoạn ADN bổ sung thành sợi ADN hoàn chỉnh bổ sung với sợi ADN khuôn.

## 2. Phản ứng PCR

Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) là một kỹ thuật tổng hợp nhiều lần in vitro (nhân lên hay khuếch đại) một đoạn ADN nằm giữa hai vùng có chuỗi nucleotid đã biết.

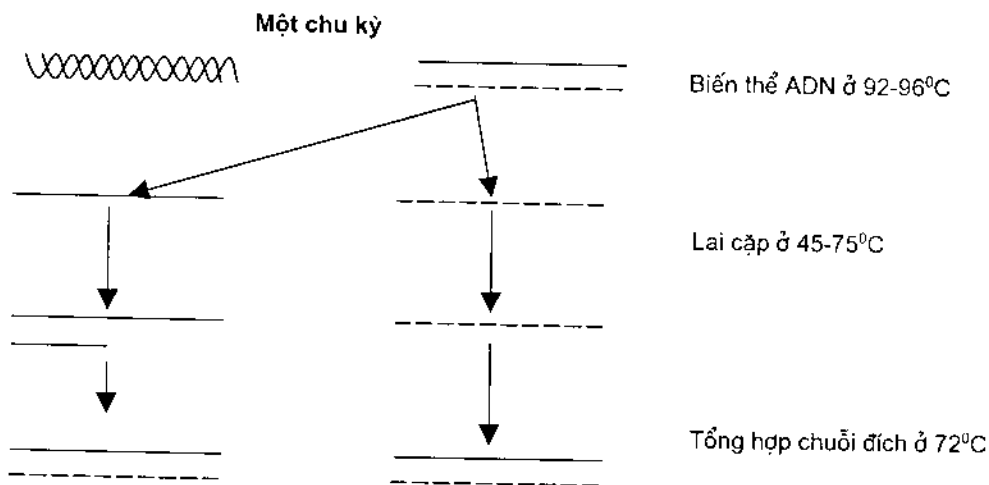
Trong phản ứng PCR, nhiệt độ là yếu tố cực kỳ quan trọng và kèm theo nó là những yếu tố thời gian. PCR diễn ra qua ba bước cho mỗi chu kỳ.

a. Bước 1. Làm biến thể ADN khuôn ở 92°C - 96°C khiến cho hai sợi ADN tách rời nhau và duỗi ra, bộc lộ chuỗi đích (target sequence) tức là đoạn ADN đặc hiệu định nhân lên (của một sinh vật định nghiên cứu). Sự biến thể ADN diễn ra dưới sự có mặt của dư thừa (về mặt phân tử) của hai đoạn môi và bốn loại dNTP diễn ra trong vòng 30 giây - 1 phút.

b. Bước 2. Lai cặp những đoạn môi với chuỗi đích ở nhiệt độ 45°C-

75°C. Các đoạn mới gắn với chuỗi đích theo quy luật bổ sung đôi bazơ trong 30 giây - 1 phút.

c. Bước 3. Tổng hợp chuỗi đích ở 72°C. Các đoạn mới được kéo dài nhờ ADN polymeraza, bản sao của chuỗi được tổng hợp. Sau đó chuỗi đích và bản sao của nó lại được dùng làm khuôn cho chu kỳ sau. Như vậy, chu kỳ biến thể, lai cặp, tổng hợp đoạn ADN được lặp lại nhiều lần (35 - 40 lần), sau mỗi chu kỳ sản phẩm định nghiên cứu (đoạn ADN đích) tăng gấp hai lần. Sau n chu kỳ sẽ có  $2^n$  đoạn ADN "đích" được nhân lên. Thời gian kéo dài từ 30 giây - nhiều phút, theo tính toán sau 30 giây chu kỳ sự khuếch đại sẽ là  $10^6$  so với số lượng mẫu ban đầu (hình 12.3).



**Hình 12.3.** Sơ đồ các bước phản ứng chuỗi polymeraza (PCR)

Trong các chu kỳ kể trên, sự thay đổi về nhiệt độ diễn ra trong thời gian ngắn, vì vậy khó mà thực hiện được bằng cách thủ công. Vì vậy sự khuếch đại đoạn ADN được thực hiện trong một máy vi tính hoá với những chương trình vận hành do người nghiên cứu xác định: máy luân nhiệt (thermal cycler).

## **2.1. Phản ứng PCR gồm những thành phần**

### **a. Chuỗi đích**

ADN của gen muốn tạo dòng hay của virus (ví dụ virus viêm gan B), của tế bào sinh vật (ký sinh trùng sốt rét, vi khuẩn...). Trong nghiệm phẩm được đưa vào hỗn hợp PCR dưới dạng sợi đơn hay sợi đôi hoặc có thể phân

cắt thành những đoạn ngắn hơn nhờ enzyme giới hạn (restriction endonuclease), chuỗi đích (đoạn ADN cần khuếch đại) được khuếch đại dưới dạng thẳng có hiệu quả hơn là dạng vòng kín. Do đó thường làm đứt thẳng ADN plasmid (vòng) trước khi chúng được dùng làm khuôn trong PCR.

#### b. Những đoạn oligonucleotid mới

Chúng có ít nhất 16 nucleotid và thường có 20 - 30 nucleotid. Chúng phải có thứ tự nucleotid bổ sung tuyệt đối với những đoạn tương ứng của ADN khuôn, không có cấu trúc bậc hai phức tạp, không bổ sung lẫn nhau, có thể tổng hợp được trên *in vitro*. Đoạn mới lại cặp với ADN khuôn ở nhiệt độ thấp (37 - 55°C), ở nhiệt độ này ADN polymeraza bắt đầu hoạt động kéo dài đoạn mới với tốc độ chậm (tăng nhanh ở 72°C). Nồng độ đoạn mới thường dùng là 1µM đã cho ít nhất 30 chu kỳ khuếch đại.

#### c. Taq ADN - polymeraza

Trước đây, người ta dùng *E.coli* ADN - polymeraza, nhưng nó có nhiều nhược điểm nên ngày nay người ta dùng Taq ADN - polymeraza chịu nhiệt, chiết xuất từ một vi khuẩn ưa nhiệt *Thermus aquaticus*. Enzym này vẫn tồn tại ở nhiệt độ 95°C kéo dài, không bị bất hoạt bởi giai đoạn gây biến thể bằng nhiệt và không cần thay thế ở mỗi chu kỳ khuếch đại.

#### d. Những dung dịch đệm được dùng trong PCR

Dung dịch đệm chuẩn cho PCR chứa 50mM KCl, 10 mM tris- HCl (pH = 8,3 ở nhiệt độ phòng) và 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, khi ủ ở nhiệt độ 72°C. pH của dung dịch đệm giảm còn khoảng 7,2 vì nồng độ Mg<sup>+2</sup> rất thấp nên nghiệm phẩm ADN khuôn không được chứa nhiều tác nhân chelat hoá (EDTA) hoặc nhiều nhóm có điện tích âm (photphat...) ADN đích dùng làm khuôn nên được pha trong 10mM tris- HCl (pH = 7,6), 0,1mM EDTA (pH = 8,0). Cũng có thể thay đổi nồng độ các thành phần (thí dụ: 10mM tris - HCl, 50mM KCl và nồng độ MgCl<sub>2</sub> thay đổi 0,05 - 5mM với mức tăng mỗi lần 0,5mM thực hiện PCR với mỗi dung dịch và rút kinh nghiệm.

#### e. Deoxyribonucleosid triphosphat (dNTP)

dNTP được sử dụng với những nồng độ bão hoà (200µM đối với mỗi dNTP). Một dung dịch dự trữ của các dNTP (5mM), nên điều chỉnh tới pH = 7,0 bởi NaOH 1N để đảm bảo pH của phản ứng cuối cùng không giảm thấp hơn 7,1 (bảng 12.2).

**Bảng 12.2.** Các yếu tố tham gia phản ứng PCR

Các yếu tố		Đối tượng	Mục đích
1	Đoạn ADN đích	Được tách ra từ virus ( <i>HIV Dengue, Hepatitis B, EBV...</i> ) vi khuẩn, ký sinh trùng	Một sợi ADN để làm khuôn tổng hợp sợi ADN mới bổ sung
2	Primer	Có khoảng 20-30 mononucleotid được tổng hợp từ máy Synthesizer	Được bổ sung vào hai đầu của đoạn ADN khuôn khổ để làm mỗi kéo dài tổng hợp.
3	Taq ADN polymeraza	Enzym ADN polymeraza <i>Thermus aquaticus</i> là enzym chịu nhiệt có thể tới 95°C mà không bất hoạt từ vi khuẩn ưa nhiệt. Enzym này chịu được nhiệt nên không cần thay thế enzym cho mỗi bước của chu kỳ khuếch đại.	Xúc tác cho việc gắn bổ sung các mononucleotid vào sợi ADN khuôn
4	Dung dịch đệm	tris HCl, pH = 8,3; KCl, MgCl <sub>2</sub>	Để phản ứng tiến hành thuận lợi trong môi trường giữ pH cố định và Mg <sup>2+</sup> kích hoạt enzym
5	Deoxyribonucleosid triphosphat (dNTP)	Có bốn loại bazơ dNTP	Là những cơ chất cần cho phản ứng enzym ADN polymeraza để tổng hợp sợi ADN bổ sung.

## 2.2. Cách tiến hành chạy PCR

**Bảng 12.3.** Nội dung của bốn bước tiến hành chạy PCR

Các bước	Nội dung các bước			
1	Đặt chương trình thời gian cho máy luân nhiệt			
	Thời gian	Biến thể 95°C	Lai tạo primer 50°C	Kéo dài 72°C
	Chu kỳ đầu	5 phút	2 phút	3 phút
	Chu kỳ tiếp theo	1 phút	2 phút	3 phút
	Chu kỳ cuối	5 phút	2 phút	10 phút
2	Chuẩn bị mẫu dung dịch chứa đủ các thành phần phản ứng trong một ống nghiệm: H <sub>2</sub> O, dung dịch đệm, MgCl <sub>2</sub> , dNTP, cặp primer, Taq ADN pol, ADN đích từ virus, vi khuẩn hay gen muốn nhân dòng.			

3	Chạy máy luân nhiệt Cho các ống nghiệm vào máy luân nhiệt Bật máy hoạt động cho đến khi kết thúc cho chữ END (Như vậy có khoảng 25 chu kỳ khuếch đại thì mới dễ phát hiện bằng điện di)
4	Chạy điện di trên agel agarose Pha mẫu thử ống nghiệm với thuốc chỉ thị màu, chuyển vào giếng thạch gel. agarose và cho chạy điện di trong khoảng 60 phút, 90v, 11A. Quan sát bằng đèn tử ngoại, sản phẩm ADN khuếch đại có màu hồng.

## II. CÁC CHỈ TIÊU ẢNH HƯỞNG ĐẾN PHẢN ỨNG PCR

### 1. ADN mẫu

Lượng ADN mẫu chỉ cần một lượng nhỏ (100ng).

### 2. Enzyme

ADN polymerase chịu nhiệt.

### 3. Môi và nhiệt độ lai

Môi là chỉ tiêu quan trọng nhất để đạt được một sự khuếch đại đặc trưng và có hiệu quả cao. Việc chọn môi phải tuân thủ một số nguyên tắc sau:

**3.1. Trình tự của môi** không có sự bất cặp bổ sung giữa môi "xuôi" và môi "ngược" và không có cấu trúc "kẹp tóc" do sự bất cặp bổ sung giữa các phần khác nhau của một môi.

**3.2. Tm của môi xuôi và môi ngược** không cách biệt quá xa. Thành phần nucleotide của các môi cân bằng tránh các cặp GC lặp đi lặp lại nhiều lần.

**3.3. Các môi chọn phải đặc trưng** cho trình tự ADN cần khuếch đại, không trùng với các trình tự lặp lại trên gen.

**3.4. Trình tự nằm giữa hai môi "xuôi" và "ngược"** không quá lớn, phản ứng PCR sẽ tối ưu trên những trình độ nhỏ hơn 1kb.

### 4. Các thành phần khác

Các thành phần của phản ứng PCR: Bốn loại nucleotide thường được sử dụng ở nồng độ 20- 200  $\mu\text{M}$ / mỗi nucleotide. Nồng độ cao hơn hay sự mất cân bằng trong thành phần các nucleotide sẽ làm tăng lỗi sao chép của polymerase. Nồng độ ion  $\text{Mg}^{++}$  cũng là một nhân tố ảnh hưởng mạnh đến

quá trình PCR.

### 5. Số lượng chu kỳ của phản ứng PCR

Không vượt quá 40 chu kỳ cho một phản ứng PCR vì sẽ làm giảm hiệu quả khuếch đại. Số chu kỳ cho một phản ứng tùy thuộc số lượng bản mẫu ban đầu.

### 6. Thiết bị và dụng cụ cho phản ứng PCR

Cần đáp ứng được yêu cầu là thay đổi nhiệt độ thật nhanh và chính xác, ống nghiệm dùng cho các phản ứng của cùng một nghiên cứu phải thuộc cùng một kiểu vì đặc tính truyền nhiệt, độ tiếp xúc giữa ống và bộ phận tạo nhiệt của thiết bị có ảnh hưởng lớn đến quá trình khuếch đại.

## III. CÁC ỨNG DỤNG CHỦ YẾU CỦA PHƯƠNG PHÁP PCR

**Bảng 12.4. Các ứng dụng của PCR**

	Các lĩnh vực ứng dụng PCR	Ý nghĩa của ứng dụng
1	Trong lĩnh vực nghiên cứu khoa học	<ul style="list-style-type: none"><li>- Xác định trình tự nucleotide của các đoạn ADN được nhân lên.</li><li>- Tách dòng những đoạn ADN đặc hiệu khi cần.</li><li>- Giúp phát hiện đột biến.</li><li>- Phân tích liên tiếp gen từ những tế bào riêng lẻ.</li><li>- Giúp nghiên cứu quá trình tiến hoá ở mức độ phân tử.</li><li>- Giúp phục hồi những gen đã tồn tại cách đây hàng chục triệu năm.</li></ul>
2	Trong lĩnh vực khoa học hình sự	<ul style="list-style-type: none"><li>- Giúp chẩn đoán nhanh và chính xác từ vết máu khô, nước bọt, sợi tóc của thủ phạm còn lưu lại ở hiện trường.</li><li>- Xác định quan hệ huyết thống cha con, ông cháu...</li></ul>
3	Trong ngành nông nghiệp: chọn giống cây trồng và vật nuôi	<ul style="list-style-type: none"><li>- Chọn cặp cha mẹ tốt làm giống rất nhanh chóng</li></ul>
4	Trong ngành y học hiện đại	<ul style="list-style-type: none"><li>- Chẩn đoán sớm và nhanh chóng các bệnh nhiễm trùng di truyền và ung thư.</li></ul>
5	Trong lĩnh vực tư vấn di truyền	<ul style="list-style-type: none"><li>- Chẩn đoán nhanh và chính xác các bệnh di truyền.</li><li>- Chẩn đoán trước sinh được giới tính 8 tuần tuổi và các dị tật bẩm sinh.</li></ul>
6	Trong lĩnh vực bảo vệ môi trường	<ul style="list-style-type: none"><li>- Xác định mức độ ô nhiễm sinh học nhanh chóng.</li></ul>

- Việc sản xuất mẫu dò dùng trong các phương pháp lai phân tử.
- Khuếch đại số lượng các ARN thông qua kỹ thuật RT-PCR (phiên mã ngược tạo cADN từ ARN- khuếch đại cADN).
- Định lượng so sánh một sản phẩm thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau.

Ngoài ra phương pháp này cũng có những hạn chế cần phải thận trọng khi sử dụng: mức độ ngoại nhiễm, sự kém trung thực trong quá trình tổng hợp bởi Taq polymerase.

Ứng dụng của kỹ thuật PCR có rất nhiều ở các lĩnh vực khác nhau nhưng được tóm tắt trong một số lĩnh vực chính ở bảng 12.4.

## CHƯƠNG XIII

# KỸ THUẬT BIẾN NẠP VÀ KỸ THUẬT LÂY NHIỄM

Sự cắt và nối ADN cho phép các nhà sinh học tạo ra được những phân tử ADN tái tổ hợp mới. Giai đoạn tiếp theo là đưa ADN tái tổ hợp vào các tổ hợp vật chủ. Để đưa được ADN tái tổ hợp vào tế bào, người ta dùng kỹ thuật biến nạp ADN (transformation) và kỹ thuật lây nhiễm (transfection). Đối với *E.coli* thì *biến nạp có nghĩa là đưa ADN plasmid* vào trong tế bào, còn *lây nhiễm và đưa ADN phage* vào trong tế bào. Thuật ngữ biến nạp (sự biến nạp, kỹ thuật biến nạp) hiện nay được hiểu theo nghĩa rộng là đưa bất kỳ ADN nào vào bất cứ tế bào nào. Các tế bào này lớn lên và phân chia tạo ra dòng thuần.

Nói một cách chặt chẽ thuật ngữ "tạo dòng" (cloning) chỉ biểu hiện ở các giai đoạn sau của thủ tục chứ không phải chỉ cấu trúc của chính phân tử ADN tái tổ hợp. Sự chọn dòng phục vụ hai mục đích chính:

Trước hết nó cho phép một lượng lớn các phân tử ADN tái tổ hợp có thể được sản xuất ra từ một lượng nhất định của nguyên liệu ban đầu. Khởi sự chỉ vài nanogam (ng) của ADN tái tổ hợp thu được, nhưng mỗi vi khuẩn nhận plasmid thì sẽ phân chia nhiều lần để tạo ra một dòng mà mỗi tế bào của dòng này sẽ chứa nhiều bản sao phân tử ADN. Vài miligam (mg) của ADN tái tổ hợp có thể được tách ra từ một dòng vi khuẩn đơn giản - biểu hiện sự tăng lên hàng nghìn lần so với số lượng ban đầu.

Nếu như dòng đó không chỉ dùng nguồn ADN mà còn dùng để đưa vào trong nuôi cấy lỏng thì những tế bào này sẽ lớn lên và cung cấp hàng miligam ADN tức là hàng triệu lần tăng lên trong sinh sản. Về phương diện này, sự chọn dòng có thể cung cấp một lượng lớn ADN cần thiết để các nhà sinh học phân tử nghiên cứu cấu trúc, chức phận và biểu hiện của gen.

Chức phận quan trọng thứ hai của sự chọn dòng có thể là sự làm thuần khiết phân tử ADN mong muốn.



## I- KỸ THUẬT BIẾN NẠP - ĐƯA CÁC ADN CỦA PLASMIT VÀO TẾ BÀO VI KHUẨN

Hầu hết các vi khuẩn đều có khả năng nhân phân tử ADN từ môi trường tế bào mà chúng lớn lên. Thường phân tử ADN được lấy bằng kiểu này thì bị thoái hoá, song hạn hữu cũng có phân tử ADN tồn tại và nhân lên trong vật chủ.

Ở đây ta nói đến phân tử ADN plasmid và sự nhân lên được nhận diện bởi vật chủ.

Sự đi vào và duy trì của plasmid thường được phát hiện bởi nhìn thấy sự biểu hiện của các gen của plasmid. Chẳng hạn các tế bào *E.coli* thường nhạy cảm với hiệu quả ức chế lớn lên của các kháng sinh ampicilin, tetracyclin. Song các tế bào chứa plasmid pBR322, một vector cloning phổ biến, thì kháng lại những kháng sinh đó. Bởi vì BR322 có hai bộ gen - một gen mã hoá enzym beta phát triển lactamaza - mà nó biến đổi ampicilin thành dạng không độc trong vi khuẩn và gen khác mã hoá enzym khử độc của tetracyclin. Sự đi vào của BR322, có thể được phát hiện trong vi khuẩn *E.coli* bị biến nạp các kháng sinh đó (amp<sup>r</sup> tet<sup>r</sup>).

Những năm gần đây, thuật ngữ biến nạp được mở rộng, đó là quá trình vi khuẩn thu được thêm thông tin di truyền. Thí nghiệm đã chỉ ra một vài loại như: *Bacillus* và *Streptococcus* có thể bị biến nạp một cách dễ dàng do chúng có những cơ chế để liên kết ADN và để ADN đi vào.

Hầu hết những vi khuẩn, kể cả *E.coli* chỉ lấy một lượng giới hạn của ADN dưới hoàn cảnh bình thường. Mục đích để làm biến nạp những đoạn ADN một cách có hiệu quả, vi khuẩn có thể trải qua một số xử lý lý học và hoá học, mà sự xử lý này làm tăng khả năng thu nhận ADN. Những tế bào đã trải qua sự xử lý thì gọi là *những tế bào có năng lực*.

### 1. Chuẩn bị những tế bào *E.coli* có năng lực

Những khám phá trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp thấy rằng sự biến nạp ADN được xảy ra tăng lên khi quan sát tế bào *E.coli* bị ẩm ướt trong dung dịch muối mạnh hơn là các tế bào không ẩm ướt. Dung dịch muối có nồng độ 50mM chlorid calcium hay chlorid rubidium đều có hiệu quả tốt.

Một cách chính xác, tại sao có kiểu xử lý này thì chưa hiểu, có lẽ cách gây cho ADN làm tủa được phía ngoài của tế bào. Sự di chuyển ADN vào các tế bào phải được kích thích thêm bởi tăng nhiệt độ lên 40°C (sốc nhiệt ngắn: 2 phút ở 42°C). Lại một lần nữa ta vẫn không rõ tại sao shock nhiệt thì lại có hiệu quả này.

## 2. Sự chọn lựa đối với các tế bào biến nạp

Sự biến nạp các tế bào là thủ tục không mấy thành công, mặc dù 1ng của pBR322 có thể sinh ra 1.000 đến 10.000 tế bào được biến nạp. Điều đó biểu hiện sự đi vào chỉ cần 0,01% của tất cả các phân tử. Tuy có tới 10.000 vector biến nạp nhưng chỉ có một tỷ lệ rất nhỏ các tế bào có khả năng. Để phân biệt những tế bào có khả năng này người ta cần chọn lựa. Trong trường hợp pBR322, các tế bào *E.coli* mang plasmid sẽ có khả năng hình thành những dòng trên môi trường agar - mà chúng chứa ampicillin hay tetracyclin. Hầu hết các vector chọn dòng plasmid dẫn ra ít nhất một gen mà gen đó kháng lại kháng sinh trong vật chủ. Sự chọn lựa đối với các vector biến nạp này sẽ rất đơn giản bởi đạt trên môi trường có chứa kháng sinh.

## II. SỰ CHỌN LỰA ĐỐI VỚI CÁC VẬT TÁI TỔ HỢP

Vật tái tổ hợp là tế bào biến nạp chứa chất plasmid có phân tử ADN tái tổ hợp. Trong thí nghiệm chọn dòng gen cần thiết phải chọn lựa các tế bào tái tổ hợp đó từ những tế bào được biến nạp.

### 1. Sự ức chế gài một marker chọn lọc gen kháng kháng sinh

Hầu hết các vector chọn dòng được cho rằng, gài đoạn ADN vào plasmid là làm phá huỷ sự nguyên vẹn một trong những gen có mặt ở plasmid đó.

pBR322 có một hai vị trí hoạt động của enzym hạn chế, mà những vị trí đó có thể được dùng để mở vector trước khi gài vào đoạn ADN mới. Chẳng hạn BamHI cắt pBR322 ở ngay điểm mà trong đó có gen mã hoá sự kháng lại tetracyclin. Phân tử pBR322 tái tổ hợp mang một mẫu ADN bên ngoài trong vị trí BamHI, do đó không có khả năng kháng tetracyclin nữa. Như vậy tế bào chứa pBR322 tái tổ hợp này chỉ còn kháng ampicillin nhưng lại nhạy cảm tetracyclin. Đó là sự sàng lọc vật tái tổ hợp pBR322 bằng sự ức

chế gen kháng tetracyclin bởi sự gài thêm đoạn ADN vào vị trí của gen đó.

## 2. Sự ức chế gài không phải là marker chọn lọc gen kháng kháng sinh

Trong trường hợp này, người ta gài một gen *lacZ* - tức là gen mã hoá enzym beta galactosidaza trong pUC8. Enzym này đánh gãy lactose thành glucose và galactose. Có một chất cũng tương tự lactose đó là X - gal (5brome - 4 chloro - 3 indoly1 - D - galactopyranosid) và cũng bị đánh gãy bởi beta galactosidaza để tạo một sản phẩm mang màu xanh đậm. Vậy nếu tái tổ hợp với gen *lacZ* bị gãy thì không có khả năng sinh ra enzym và do đó không có màu trên agar khi thêm X - gal và cả chất cảm ứng hoạt động của enzym như isopopylthiogalactosid (IPTG).

## III. KỸ THUẬT LÂY NHIỄM - ĐƯA CÁC ADN CỦA PHAGE VÀO TẾ BÀO VI KHUẨN

Có hai phương pháp khác nhau, nhờ chúng mà phân tử ADN tái tổ hợp được đưa vào cấu trúc với vector phage để lây nhiễm (transfection) cho tế bào vi khuẩn và bao bì đóng gói trong ống nghiệm.

### 1. Kỹ thuật lây nhiễm

Quá trình này thì tương đương với sự biến nạp, nó chỉ khác nhau là một đằng là dùng ADN của phage, còn đằng kia là dùng ADN của plasmid; ADN được làm sạch, tạo ra phân tử phage tái tổ hợp, rồi được trộn với các tế bào *E.coli* có năng lực và sự đi vào của ADN được cảm ứng bởi shock nhiệt.

### 2. Bao bì đóng gói trong ống nghiệm

Kỹ thuật lây nhiễm với các phân tử ADN lamda không phải là luôn luôn có hiệu quả như là gây nhiễm các tế bào nuôi cấy với các tiểu phần phage lamda. Do đó phân tử lamda tái tổ hợp có thể được bao gói thành các cấu trúc đuôi và đầu lamda trong ống nghiệm.

Điều này có thể có khó khăn, song sự thật cũng dễ dàng đạt tới sự bao gói đòi hỏi một số protein khác nhau được mã hoá bởi bộ gen lamda nhưng chúng có thể được chuẩn bị một lượng lớn các tế bào bị nhiễm với những dòng phage lamda bị khiếm khuyết (defective). Những dòng này mang đến một sự biến dị trong một của các thành phần protein áo ngoài. Các tế bào bị nhiễm sẽ tiếp tục tổng hợp và tích tụ tất cả những thành phần khác thậm chí

mặc dầu cả các tiểu phân phage chín chưa được tập hợp.

Một hỗn hợp khăn gói *in vitro* được chuẩn bị bởi dung dịch của hai sự nuôi cấy tế bào: một bị nhiễm với dòng lamda khuyết bởi một protein và dòng khác khuyết lỗi một protein thứ hai. Hỗn hợp sẽ chứa tất cả những thành phần cần thiết và sẽ có ADN của lamda bao gói một cách hữu hiệu hay là những phân tử tái tổ hợp thành những tiểu phân phage chín. Các phân tử được bao gói theo con đường này có thể được đưa vào *E.coli* một cách đơn giản bằng cách cộng thêm những phage được tập hợp đó vào trong nuôi cấy vi khuẩn và cho phép quá trình nhiễm khuẩn lamda bình thường chiếm chỗ.

### 3. Sự nhiễm phage được nhìn thấy như là plaque trên môi trường agar

Giai đoạn cuối của chu kỳ nhiễm khuẩn phage là sự ly giải tế bào. Nếu các tế bào bị nhiễm phân tán trên môi trường agar rắn, ngay lập tức sau đó sự ly giải tế bào có thể được nhìn thấy như plaque trong nuôi cấy vi khuẩn. *Mỗi plaque là một vùng sáng được tạo ra như là phage làm dung giải các tế bào còn gọi là vết tan và gây nhiều ly giải vi khuẩn bên cạnh.*

Cả lamda và M13 hình thành plaque. Với lamda chúng là những plaque thật được tạo ra bởi ly giải tế bào. Song, những plaque M13 thì hơi khác vì M13 không ly giải tế bào chủ. Ngược lại M13 gây ra giảm tốc độ lớn của các tế bào bị nhiễm đủ để gây ra một vùng làm sáng ra trong đám vi khuẩn. Mặc dù không phải là plaque thật nhưng vùng đó cũng được nhìn thấy giống như những plaque của phage bình thường.

Kết quả cuối cùng của thí nghiệm chọn dòng gen là khi dùng phage lamda hoặc vector M13, một đĩa agar được phủ những plaque. Mỗi plaque được dẫn ra từ một tế bào đơn vị gây nhiễm chứa những tiểu phân phage giống hệt nhau. Chúng có thể chứa những phân tử vector tự nối buộc lại hay là những vật tái tổ hợp.

### 4. Sự chọn lựa các phage tái tổ hợp

Hầu hết các phage ly giải tế bào mà chúng gây nhiễm nên không một dạng chọn lựa nào trên sự kháng sinh mà được thích hợp mặc dù đó là dạng chọn lựa phổ biến của vector plasmid. Do đó có một số cách khác để phân biệt plaque tái tổ hợp như sau:

#### 4.1. Sự ức chế gài của gen *lacZ* được mang đến bởi vector phage

Tất cả các vector M13 cũng như một vài vector lamda mang bản sao

của gen *LacZ*. Gài ADN mới vào gen này làm ức chế sự tổng hợp emzym beta galactosidaza - giống như với vector plasmid pUC8. Những vật tái tổ hợp thì được phân biệt trên agar X- gal. Các plaque gồm các phage bình thường thì xanh, các phage tái tổ hợp thì sáng.

#### 4.2 Sự ức chế gài của gen *cI lamda*

Một vài loại vector tạo dòng lamda có những vị trí cắt hạn chế duy nhất của gen *cI*. Ức chế gài gen này gây ra thay đổi hình thái plaque. Plaque bình thường biểu hiện đục ngẫu trong khi đó tái tổ hợp với gen *cI* bị gãy thì sáng. Sự khác nhau thì hoàn toàn có thể phân biệt bằng mắt thường.

#### 4.3. Sự chọn lựa dùng tính trạng *Spi*

Phage lamda không gây nhiễm cho *E.coli* được khi ở dạng kết hợp với phage liên quan gọi là P2. Lúc này lamda gọi là  $Spi^+$  nhạy cảm với sự ức chế prophage P2 (sensitive to P2 prophage inhibition). Một vài vector chọn dòng phage lamda mà bị gài ADN mới thì sẽ làm thay đổi tính trạng  $Spi^+$  thành  $Spi^-$ , như vậy các vật tái tổ hợp có thể làm nhiễm các tế bào mà các tế bào đó mang prophage P2. Các tế bào như vậy được dùng như vật chủ cho các thí nghiệm tạo dòng các vector đó. Chỉ những tái tổ hợp là  $Spi^-$  thì mới hình thành có plaque.

#### 4.4. Sự lựa chọn trên cơ sở kích thước bộ gen lamda

Hệ thống bao gói lamda, mà nó tập hợp các tiểu phân phage chín có thể gài các phân tử ADN vào giữa 37 và 52 kb vào cấu trúc đầu. Bất cứ vật nào dưới 37 kb sẽ không bao gói được. Nhiều vector lamda có cấu trúc mất đi một đoạn lớn phân tử ADN lamda và như vậy có chiều dài kém hơn 37 kb. Chúng chỉ bao gói thành phage chín được khi có thể ADN từ bên ngoài vào mang đến kích thước toàn bộ gen tới 37 kb hay hơn nữa. Chỉ những vector đó, các phage tái tổ hợp mới có khả năng sinh sản.

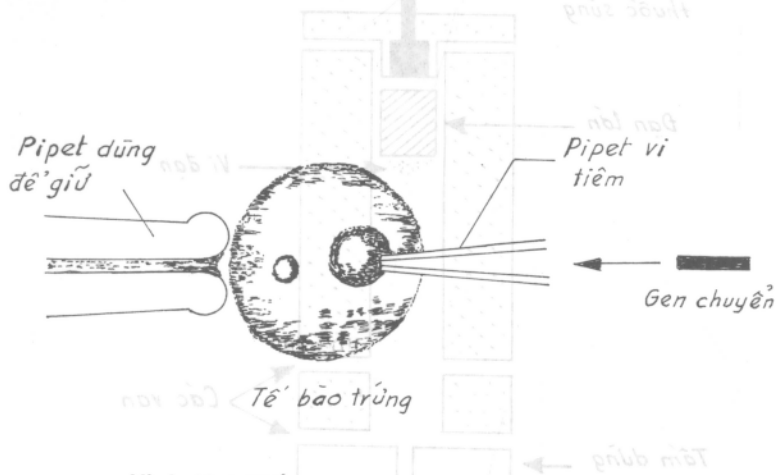
## IV. KỸ THUẬT BIẾN NẠP VÀO CÁC TẾ BÀO KHÔNG PHẢI VI KHUẨN

Các con đường đưa ADN vào các tế bào nấm mốc, động vật và thực vật thì cũng cần thiết nếu như các cơ thể đó được dùng như vật chủ để chọn dòng gen. Nói chung làm ướt bằng muối chỉ có hiệu quả với vài loại vi

khuẩn mà không hiệu quả với cơ thể bậc cao. Song xử trí trước với lithium chlorid hay lithium acetat thì vẫn làm tăng sự đi vào nấm men của ADN và vấn đề này hiện nay được dùng một cách điều hoà trong sự biến nạp của *Saccharomyces cerevisiae*.

Hàng rào chủ yếu cho sự đi vào của ADN là thành tế bào. Các tế bào động vật được nuôi cấy - thiếu thành tế bào, thì chúng lấy ADN hoàn toàn đặc biệt nếu ADN được lắng cặn lại trên bề mặt tế bào với phosphat calcium.

Một số emzym làm thoái hoá thành tế bào nấm mốc hay tế bào thực vật và do đó có thể thu được tế bào trần (protoplast) nguyên vẹn. Protoplast sẵn sàng nhận ADN đi vào khi tiến hành vi tiêm (hình 13.1)



Hình 13.1. Tiến hành vi tiêm cho tế bào trần.

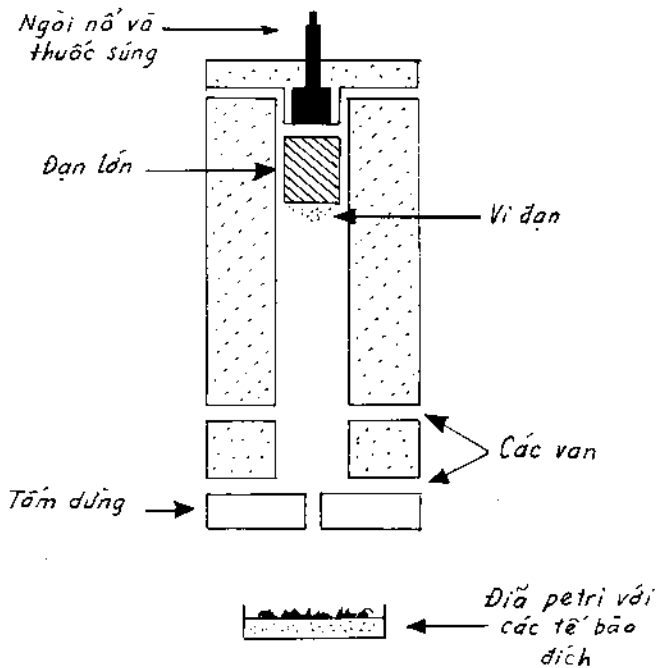
Tế bào được giữ trên pipet thủy tinh bằng cách hút nhẹ (bên trái hình). Kim vi tiêm được chế tạo bằng cách kéo dài ống thủy tinh mao dẫn đang nóng chảy cho đến khi có đầu nhọn hoắt. Dùng máy vi thao tác chọc kim vào bên trong tế bào (bên phải hình) cho đến khi đầu kim xuyên vào nhân.

Một sự biến nạp khác được kích thích bởi kỹ thuật đặc biệt như là kích thích xung điện (electroporation). Sau biến nạp các protoplast có thể phục hồi lại thành tế bào, phân chia sinh sản các cơ thể bị biến nạp đó.

Còn có một phương pháp khác nữa của kỹ thuật biến nạp là vi tiêm (microinjection) dùng bơm tiêm tế vi tiêm phân tử ADN trực tiếp vào nhân tế bào. Quá trình này không cần dùng vectơ tạo dòng mà trực tiếp ADN hợp nhất vào nhiễm sắc thể. Quá trình này xảy ra khi tiến hành trên ếch, chuột vào ruồi quả.

Những năm gần đây người ta có phương pháp biến nạp đối với tế bào

thực vật bằng súng bắn gen vào tế bào. ADN được dùng để bao bọc các hạt vonfram cực nhỏ gọi là siêu vi đạn. Khi nhắm bắn vào tế bào, các siêu vi đạn sẽ đưa ADN vào trong tế bào (hình 13.2).



**Hình 13.2. Súng bắn gen**

ADN được bọc vỏ để trở thành các viên đạn siêu nhỏ, chúng được gia tốc nhờ viên đạn lớn khi ngòi súng phát nổ. Đến tấm dẹt thì viên đạn lớn bị giữ lại trong khoang, còn siêu vi đạn tiếp tục lao tới mô đích trên đĩa Petri. Cũng có súng bắn gen dùng khí nén thay cho thuốc nổ.

## CHƯƠNG XIV

# CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ CỦA AXIT NUCLEIC

Hai phương pháp xác định trình tự chính của axit nucleic là *phương pháp hoá học của Maxam và Gilbert (1977)* và *phương pháp enzym học của Sanger và cộng sự (1977)*. Dù rất khác nhau về nguyên tắc, hai phương pháp này có một số điểm chung: hình thành một tập hợp nhiều oligonucleotid có chiều dài khác nhau, mỗi oligonucleotid có xác suất hiện bằng nhau trong phản ứng. Các trình tự này sau đó được phân tách dựa vào kích thước bằng phương pháp điện di trên gel polyacrymid có khả năng phân tách hai trình tự chỉ cách nhau một nucleotid. Kết quả được đọc trên bản phóng xạ tự ghi hoặc nhờ một máy dò tự động.

### I. PHƯƠNG PHÁP MAXAM VÀ GILBERT

Phương pháp này dựa vào sự thuỷ giải đặc trưng phân tử ADN cần xác định trình tự bằng phương pháp hóa học.

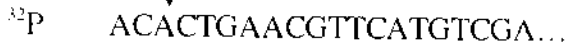
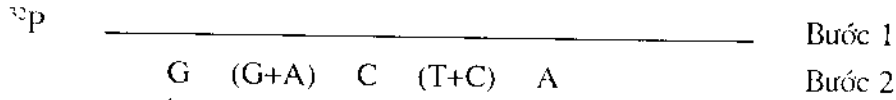
**Bảng 14.1.** Tóm tắt phương pháp Maxam - Gilbert xác định trình tự acid nucleic

Bước 1	ADN sợi đơn cần xác định được đánh dấu phóng xạ $^{32}\text{P}$ ở một đầu 5'.
Bước 2	Tiến hành 5 phản ứng cắt: Cắt ở G, cắt ở G+A, cắt ở C, cắt ở T+A, cắt ở A. Ở đây là phản ứng G- biến đổi các G bởi dimethyl sulfat (me).
Bước 3	Loại các G đã bị biến đổi, và thuỷ phân liên kết đường phosphat bằng piperidin
Bước 4	Phân tách các đoạn trên điện di

Trước hết các phân tử ADN được đánh dấu bằng  $^{32}\text{P}$  ở một đầu. Sau đó chúng được chia thành năm phân đoạn: G, A, C, G+A, T+C; mỗi phân đoạn



chịu một xử lý hoá học chuyên biệt (như dimethylsulfate) có khả năng tương tác với các bazơ đặc hiệu và tạo điểm đứt có chọn lọc đối với các bazơ đặc hiệu bị phá bằng tác động hoá chất, ta có thể xác lập được chính xác trình tự các bazơ dọc theo chuỗi ADN ban đầu (hình 14.1).



me ↗

<sup>32</sup>P \_\_\_\_\_

me ↗

<sup>32</sup>P \_\_\_\_\_

me ↗

<sup>32</sup>P \_\_\_\_\_

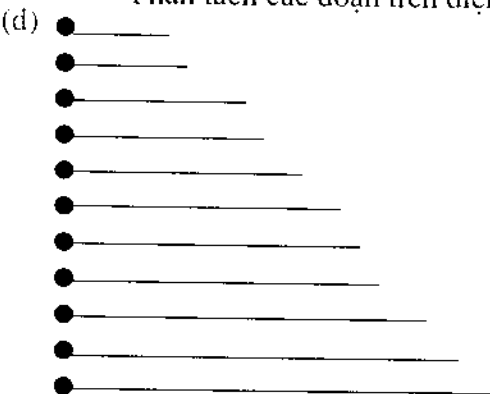
me ↗



Bước 3

↓  
 Phân tách các đoạn trên điện di

Bước 4



Hàng loạt các đoạn xếp được tạo ra có độ dài khác nhau một nucleotit và được đánh dấu ở đầu 5'

Hình 14.1. Xác định trình tự ADN bằng phương pháp Maxam - Gilbert

## II. PHƯƠNG PHÁP SANGER

Phương pháp này dựa vào sự tổng hợp nhờ enzym ADN polymeraza mạch bổ sung cho trình tự ADN mạch đơn cần xác định. Ngoài bốn loại nucleotid thông thường còn sử dụng thêm bốn loại dideoxynucleotid không còn khả năng hình thành các cầu nối phosphodiester và do đó sẽ làm ngừng quá trình tổng hợp. ADN polymeraza sử dụng có thể là đoạn Klenow của ADN polymeraza I, Taq polymeraza hay Sequenase.

Sự tổng hợp mạch mới bắt đầu từ một mồi bắt cặp với một trình tự chuyên biệt trên phage M13, với sự hiện diện của bốn loại nucleotid trong đó có một loại được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ  $^{35}\text{S}$ . Phản ứng tổng hợp được tiến hành trong bốn phân đoạn dideoxynucleotid với hàm lượng rất nhỏ. Do hàm lượng thấp nên thỉnh thoảng mới có một dideoxynucleotid được sử dụng vào phản ứng tổng hợp một oligonucleotid, lập tức sự tổng hợp oligonucleotid đó dừng lại. Tính xác suất thì trong mỗi phân đoạn oligonucleotid sẽ có mặt tất cả các cỡ oligonucleotid ứng với tất cả các nucleotid cùng loại trên trình tự ADN. Các phản ứng tổng hợp sẽ được đem phân tách trên gel polyacrylamid và kết quả được đọc trên bản phóng xạ tự ghi.

### \* Các phương pháp cải biên từ phương pháp của Sanger

- Xác định trình tự bằng máy tự động: Không đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ mà bằng hoá chất - các fluochrom. Mỗi loại dideoxynucleotid được đánh dấu bằng một fluochrom có màu khác nhau. Sau khi điện di trên gel polyacrylamide, kết quả sẽ được đọc qua hệ thống máy vi tính.

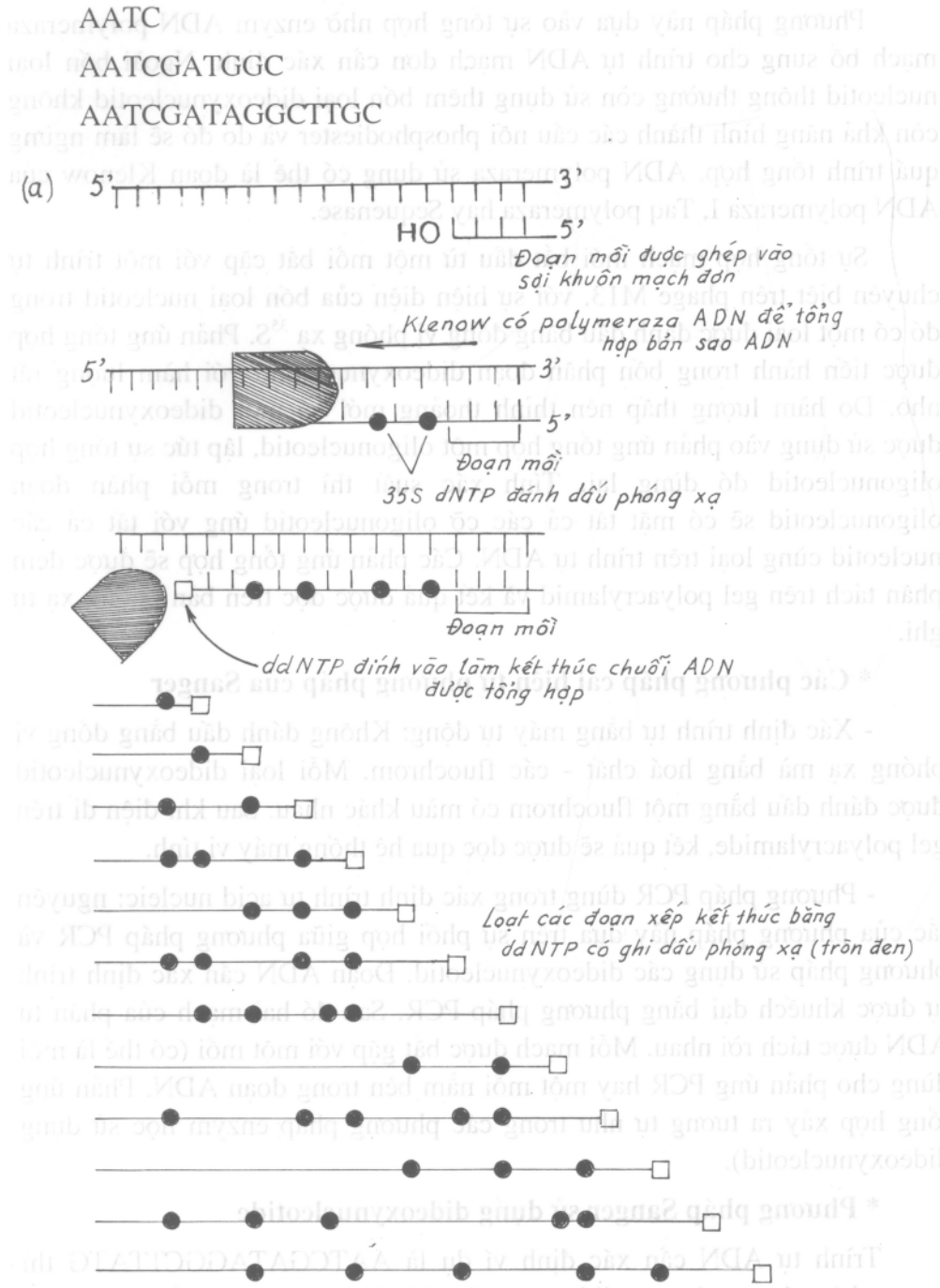
- Phương pháp PCR dùng trong xác định trình tự acid nucleic: nguyên tắc của phương pháp này dựa trên sự phối hợp giữa phương pháp PCR và phương pháp sử dụng các dideoxynucleotid. Đoạn ADN cần xác định trình tự được khuếch đại bằng phương pháp PCR. Sau đó hai mạch của phân tử ADN được tách rời nhau. Mỗi mạch được bắt cặp với một mồi (có thể là mồi dùng cho phản ứng PCR hay một mồi nằm bên trong đoạn ADN. Phản ứng tổng hợp xảy ra tương tự như trong các phương pháp enzym học sử dụng dideoxynucleotid).

### \* Phương pháp Sanger sử dụng dideoxynucleotide

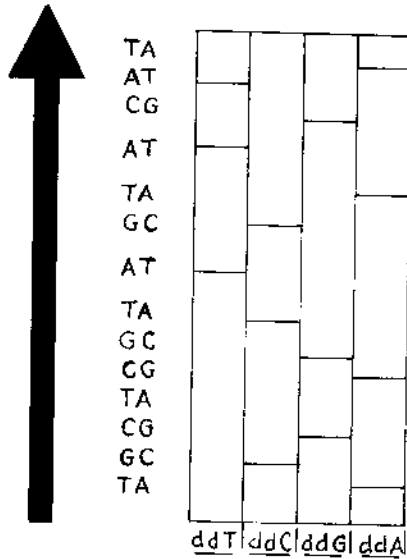
Trình tự ADN cần xác định ví dụ là AATCGATAGGCTTATG thì trong phân đoạn có mặt dideoxynucleotid ddC sẽ có sự tổng hợp các

oligonucleotid sau (hình 14.2 và 14.3).

II. PHƯƠNG PHÁP SANGER



Hình 14.2. Xác định trình tự ADN bằng phương pháp Sanger



Hình 14.3. Phương pháp Sanger sử dụng các dideoxynucleotid

Sau đó, bốn phản ứng tổng hợp sẽ được đem phân tách trên gel polyacrylamid và kết quả được đọc trên bản phóng xạ tự ghi.

Ở đây trình tự cần xác định được tạo dòng trong phage M13. Ví dụ cho thấy sự hình thành 5 vạch trên bản điện di trong phản ứng có thêm ddATP; mỗi vạch tương ứng với một đoạn ADN đã kết nạp một ddATP thay vì dATP và do đó không tiếp tục kéo dài thêm. Bản điện di được đọc theo chiều mũi tên. Trình tự đọc bên trái chính là trình tự bổ sung cho trình tự được trên bản điện di.

## CHƯƠNG XV

# CÔNG NGHỆ BIỂU HIỆN GEN

## I. NHỮNG VẤN ĐỀ CHUNG CỦA CÔNG NGHỆ

### I. Các hệ biểu hiện gen

Sự biểu hiện gen là một vấn đề phức tạp. Hiện tại người ta đang sử dụng các hệ sau đây để biểu hiện gen:

- Hệ vi khuẩn: *E.coli* và *B.subtilis*.
- Hệ nấm men: *S.cerevisiae* và *P.pastisis*.
- Hệ tế bào động vật.

Các đặc điểm của các hệ biểu hiện trên được trình bày trong bảng 15.1.

**Bảng 15.1. Các đặc điểm của hệ biểu hiện**

Hệ biểu hiện gen	Phân tử protein biểu hiện	Các đặc tính khác
Ở vi khuẩn <i>E.coli</i>	Đó là các protein không quá nhỏ >80 acid amin, hoặc không quá lớn <500 acid amin.	- Không quá kỵ nước. - Không quá chứa nhiều gốc lysteine và disulfua. - Phải gắn với một đoạn peptid khác để được bền vững và dễ nhận biết khi tách chiết.
Ở vi khuẩn <i>B.subtilis</i>	Protein có nguồn gốc từ prokaryote	Protein này tiết ra môi trường.
Ở nấm men	Protein có ở prokaryote	- Sinh trưởng nhanh. - An toàn cao nên được sử dụng trong công nghiệp dược liệu, thực phẩm.
Ở tế bào động vật	Có khả năng biểu hiện được hết các protein	Thời gian dài và nhân dòng nuôi phức tạp

## 2. Phân lập gen

- Để biểu hiện được một gen thì trước hết phải tách dòng để xác định được trình tự nucleotide.

- Có hai cách phân lập gen từ ngân hàng gen và từ phương pháp PCR (bảng 15.2 và 15.3).

**Bảng 15.2. Phân lập từ ngân hàng gen**

Gen ở prokaryote	Gen ở eukaryote
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Không có intron</li> <li>- Cắt ADN bằng enzym hạn chế tạo ra những đoạn 3-5Kb đưa vào vectơ chọn dòng.</li> <li>- Sau đó các dòng plasmid mang đoạn ADN mong muốn được nhận biết, tách chiết và xác định đặc điểm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Thông qua ngân hàng cADN - do đó phải tách ARNm bằng cột oligo (dT).</li> <li>- Rối dùng men sao chép ngược (reverse transcriptas-RT) và mỗi oligo (T) để tổng hợp nên phân tử lai cADN-mARN.</li> <li>- Bỏ mARN bằng thuỷ phân kiềm.</li> <li>- Tổng hợp chuỗi kép cADN dưới tác dụng của ADN polymeraza.</li> <li>- Đưa vào vectơ để tạo ngân hàng cADN.</li> <li>- Phân lập gen mong muốn bằng phương pháp:               <ul style="list-style-type: none"> <li>+ Lai ADN.</li> <li>+ Phân tích miễn dịch.</li> <li>+ Phân lập dựa vào hoạt tính protein.</li> </ul> </li> </ul>

**Bảng 15.3. Phân lập bằng phương pháp PCR**

Bắt đầu từ ADN hệ gen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bắt đầu từ ngân hàng cADN (qua phiên mã ngược ARNm).</li> <li>- Nhân gen qua ba bước: Biến tính, hồi tính, tổng hợp tạo số gen hàng triệu bản.</li> <li>- Được các đoạn gen rồi đưa vào vectơ tách dòng.</li> <li>- Sau đó đưa vào vectơ biểu hiện để biểu hiện gen</li> </ul>
-----------------------	---

## 3. Plasmid được chọn lựa để biểu hiện trong vi khuẩn nấm men

Plasmid được chọn là plasmid có số lượng lớn và có khả năng ổn định tốt trong tế bào.

- Có chứa promotơ mạnh.
- Có vùng khởi đầu dịch mã cũng phải là vùng khởi đầu tốt.
- Chú ý những protein có glycosyl hoá, phosphoryl hoá, hay gắn với lipit thì chúng phải biến đổi sâu sắc sau quá trình dịch mã. Các protein này

thường có nguồn gốc từ eukaryote nên phải biểu hiện trong nấm men hoặc tế bào động vật.

#### 4. Vùng khởi đầu phiên mã (promotor)

Có những đặc điểm:

- Phải mạnh để có khả năng tạo protein ngoại lai lớn hơn từ 10-30% protein tổng số của tế bào.
- Chỉ hoạt động phiên mã gen khi không có cảm ứng ở mức độ nhỏ tối đa.
- Được cảm ứng theo cách đơn giản, nhưng hiệu quả lớn (như nhiệt độ, chất thường sử dụng).

#### 5. Vùng kết thúc phiên mã (terminator)

- Giảm tốc độ phiên mã.
- Dừng không đặc hiệu.

## II. CÔNG NGHỆ BIỂU HIỆN GEN TRONG *E.COLI*

Chúng ta biết rằng để biểu hiện gen cần phải tiến hành bởi những tín hiệu - mà vật chủ thừa nhận. Những tín hiệu đó có thể gồm ba điểm quan trọng nhất.

- Promotor:

Là điểm ở đó sự phiên mã của gen được bắt đầu. Trong *E.coli* promotor thì được nhận diện bởi yếu tố sigma, một thành phần của enzym polymeraza ARN phiên mã.

- Terminator:

Là điểm kết thúc sự phiên mã của gen, tín hiệu kết thúc thường là đoạn ngắn ADN mà đoạn đó có base kết đôi với chính nó để hình thành cấu trúc vòng cuống lá.

- Vị trí liên kết ribosom:

Một đoạn nucleotid ngắn được thừa nhận bởi ribosom như cái điểm ở đó nó có thể buộc vào phân tử mARN. Codon mở đầu của khung đọc thì luôn luôn ở vị trí này.

Lý do tại sao những gen của cơ thể bậc cao lại không làm việc được trong tế bào vi khuẩn vì những tín hiệu nói trên thì khác nhau trong cơ thể khác nhau. Ví dụ các gen *E.coli* thì được đặt trước bởi hai đoạn tách nhau. TTGACA và TATAAT, chúng phối hợp để cung cấp tín hiệu mở đầu cho sự sao chép. Trong tế bào động vật promotor cũng gồm hai đoạn tách nhau, nhưng cái đó không giống cái mà polymeraza ARN của *E.coli* có khả năng để nhận diện những đoạn promotor động vật.

Những tín hiệu tận cùng và những vị trí liên kết ribosom thì cũng khác nhau trong vi khuẩn và động vật. Những gen động vật được chọn dòng thì không biểu hiện trong *E.coli* hoàn toàn một cách đơn giản bởi vì các enzym trong vi khuẩn thì không nhận diện những đoạn điều hoà của các gen động vật.

## 1. Các vectơ

Muốn các gen ngoại lai của động vật, thực vật được biểu hiện trong *E.coli* thì những gen đó phải được gài vào trong một vectơ dưới sự kiểm soát của các tín hiệu của *E.coli*. Vectơ đó gọi là vectơ biểu hiện.

- Một vectơ biểu hiện đơn giản nhất là cung cấp chỉ một promotor.
- Promotor mạnh là promotor có tốc độ cao của phiên mã và trên cơ sở đó sản phẩm dịch mã cũng tạo ra nhiều. Còn promotor yếu thì tạo ra rất ít sản phẩm dịch mã trong tế bào.
- Có những yếu tố điều hoà promotor mà trong *E.coli* là chất cảm ứng và chất ức chế do những gen tương ứng sinh ra.

Nhiều promotor được dùng trong các vectơ biểu hiện ở *E.coli* như promotor lac; promotor trp, promotor tac với những chất gây cảm ứng như IPTG. P-indolylacetic acid; IPTG tương ứng.

## 2. Vectơ cassette cung cấp tất cả những tín hiệu biểu hiện

Trong những năm vừa qua, nhiều vectơ biểu hiện đã được phát triển. Những cái đó cung cấp tất cả những tín hiệu cần cho sự biểu hiện của gen (promotor, terminator, vị trí liên kết ribosom) trong một dạng gọi là băng cassette. Sở dĩ gọi như vậy vì gen mới chỉ việc gài vào.

Vị trí cắt hạn chế duy nhất trong giữa một cụm những tín hiệu biểu hiện.



### **3. Các vấn đề cần chú ý trong việc sản xuất các protein tái tổ hợp ở *E.coli***

Khi sản xuất một lượng lớn protein tái tổ hợp, có một số vấn đề cần lưu ý ở các giai đoạn.

#### **3.1. Ở mức phiên mã**

Gen ngoại lai có thể chứa những đoạn như là những dấu hiệu kết thúc trong *E.coli*. Những đoạn đó sẽ là vô hại trong tế bào động vật hoặc thực vật, nhưng trong vi khuẩn thì là một sự kết thúc sớm và mất biểu hiện gen.

#### **3.2. Ở giữa phiên mã và dịch mã**

Nếu như gen ngoại lai chứa các intron thì chúng cần phải được tách ra trước khi gen đó được chọn dòng và nhân lên trong *E.coli*. Vi khuẩn thì không đủ khả năng để chặt các intron, vì đó là cả một vấn đề trừ khi cADN được tạo ra từ mRNA.

#### **3.3. Ở mức dịch mã**

Việc sử dụng codon có thể cũng là vấn đề. Mặc dù hầu hết các cơ thể đều dùng chung một mã di truyền mà ở đây có khuynh hướng là những codon riêng lẻ. Nhưng với glicin được mã hoá bởi hàng loạt codon như GGA, GGG, GGU và GGC và ở tại một cơ thể nào đó chỉ dùng có GGA và GGC - mà những mã này đã bị khử đi cùng phân tử tARN đó.

#### **3.4. Ở hậu dịch mã**

Có thể sản phẩm bị thoái hoá nhanh vì trần trụi dễ bị enzym thuỷ phân hoặc quá trình chế biến không chính xác bởi trong vi khuẩn thiếu hiện tượng glycosyl hoá.

#### **3.5. Ở mức độ tế bào**

Sự biểu hiện của gen được chọn dòng và nhân lên nhanh có thể có hại đối với tế bào chủ vì sự tiêu hao năng lượng quá nhiều.

Bởi vậy phân tử protein tái tổ hợp có được sản xuất ra một lượng có ý nghĩa hay không trong *E.coli* thì phụ thuộc vào rất nhiều gen riêng lẻ được liên quan đó. Với một vài gen hệ thống đã làm việc tốt, còn một số khác, vấn đề rất khó khắc phục.

### III. CÔNG NGHỆ BIỂU HIỆN GEN TRONG NẤM MEN

Sản phẩm của biểu hiện gen tái tổ hợp trong *E.coli* thì nằm trong nội bào, muốn thu sản phẩm đó phải phá vỡ tế bào. Song đối với nấm men thì sản phẩm đó được tiết ra môi trường.

**1. Ở nấm men có các loại promotơ** sau đây được dùng để biểu hiện các gen là:

- Promotơ glycolytic (khởi động các gen mã hoá, các enzym glycolytic).

- Promotơ galactose (khởi động các gen mã hoá các chất tham gia quá trình trao đổi galactose).

- Promotơ phosphat - khởi động gen phosphatase acid.

- Promotơ CUP1 v.v...

**2. Một số terminatơ của nấm men như:**

TRP1, GAP, FNP, gen D v.v... đã được sử dụng để biểu hiện gen lạ.

**3. Ngoài ra ở nấm men còn một loạt các yếu tố khác** ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen biến nạp đó là điểm khởi đầu phiên mã (IR) tín hiệu bổ sung đuôi poly A, cấu trúc làm bền vững ARN, yếu tố khởi đầu quá trình dịch mã, yếu tố kéo dài quá trình dịch mã, đóng gói chuỗi polypeptid, quá trình hậu dịch, độ bền của protein nội bào, quá trình glycosyl hoá và vận chuyển protein đó ra ngoài bào....

PHẦN C

**ỨNG DỤNG CỦA  
CÔNG NGHỆ GEN**

## CHƯƠNG XVI

# KHÁI QUÁT VỀ ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ GEN

## I. KHÁI QUÁT VỀ ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ GEN

Công nghệ gen cho phép các nhà sinh học lấy gen từ tế bào này và ghép vào một tế bào khác. Khi được ghép vào một tế bào mới, gen có thể biến đổi chức năng của tế bào đó, để có lợi cho con người, vật nuôi và cây trồng.

1. Hiện nay công nghệ gen đã mang nhiều hy vọng làm gia tăng sản lượng nông nghiệp, khiến mùa màng bội thu bằng cách chuyển gen cho cây trồng và vật nuôi tạo ra giống mới cho năng suất cao, tạo lương thực, thực phẩm có phẩm chất tốt, tạo giống mới chống chịu với khí hậu khắc nghiệt, khô hạn, lạnh hay chua mặn và tạo ra giống kháng được nhiều và chống được nhiều bệnh tật do vi sinh vật có hại gây ra.

2. Công nghệ gen cũng đang được nghiên cứu để phát triển khoa học máy tính: bằng cách sử dụng trình tự ADN để thay thế cho con bộ bán dẫn, nhằm vượt qua những hạn chế của máy tính điện tử hiện nay.

3. Công nghệ gen cũng đang giúp cho vấn đề nghiên cứu nguồn gốc sự sống và đa dạng sinh học, giúp cho tìm hiểu cơ chế sống trong đó có điều hoà hoạt động, biệt hoá, tăng sinh tế bào dẫn đến ung thư v.v... ngày càng sáng rõ hơn.

4. Công nghệ gen giúp phát triển công nghiệp sản xuất các acid amin, các vitamin, các kháng sinh, các sắc tố, các thuốc trừ sâu, các protein đơn bào và các enzym.

5. Công nghệ gen trong giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường như chuyển gen phân huỷ cellulose vào các vi khuẩn chịu nhiệt hay tạo tập đoàn vi khuẩn phân huỷ chất thải công nghiệp *biphenyl polychlorid*.

6. Đặc biệt công nghệ gen được ứng dụng rõ nhất và sớm nhất là trong điều trị gen và chẩn đoán gen các bệnh trong y học.

Dưới đây chúng tôi tập trung nói về một số thành tựu đạt được của hai vấn đề này trong những năm gần đây.

## II. ĐIỀU TRỊ GEN

### 1. Mở đầu

Những thành tựu của Temin, Baltimore 1975 với sự phát hiện ra enzym phiên mã ngược dòng (reverse transcriptase) người ta thấy có thể dùng nó để tổng hợp gen nhân tạo nhất là đi từ mRNA lên ADN.

Rồi 1979 thành tựu của Aber, Nathan và Smith về enzym thủy phân hạn chế acid nucleic (restrictase), người ta có thể dùng nó cắt gen và gài gen mới vào để tạo ra giống mới có năng suất cao – và cũng từ đó người ta luôn luôn nghĩ tới liệu có thể sửa chữa gen, thay thế gen bệnh bằng gen lành và tạo ra một ngành phẫu thuật phân tử – trong điều trị của y học.

Điều trị gen trên người chính thức phải kể từ tháng 3/1991, bác sĩ Stephen Rosenberg ở Viện ung thư quốc gia Bethesda, Mỹ đã thử nghiệm trên một phụ nữ bị ung thư da cách trị liệu bằng gen đầu tiên.

Ông trích lấy từ máu bệnh nhân loại lymphocyt T rồi đưa vào đó yếu tố tiêu huỷ khối u (tumour necrosis factor TNF) và hoàn trở lại người bệnh. Những tế bào T biến đổi này đã sản xuất ra NTF. Kết quả khối u đã thoái hoá nhưng vẫn chưa đủ để lành bệnh.

Thao tác này đánh dấu bước khởi đầu của một giai đoạn y học mang nhiều hy vọng, đó là giai đoạn điều trị gen cho các bệnh.

### 2. Các biện pháp gen trong chữa bệnh cho người

Tuy điều trị gen mới ra đời, nhưng đến nay đã hình thành một số hướng về liệu pháp gen trong chữa bệnh cho người như sau:

- 2.1. Liệu pháp antisense, antigene.
- 2.2. Đưa một gen mới vào bù đắp cho gen hỏng hóc.
- 2.3. Đưa một gen mới vào sản xuất ra chất cần thiết để tiêu huỷ tế bào bệnh.
- 2.4. Cấy gen vào các vi khuẩn, nấm men... để sản xuất các dược phẩm mới quý, hiếm sử dụng trong điều trị các bệnh (bốn loại liệu pháp trên xem

cuốn Công nghệ gen và công nghệ sinh học ứng dụng trong y dược học hiện đại do GS.TS Đái Duy Ban và PTS. Lữ Thị Cẩm Vân chủ trì. Nhà xuất bản y học, 1994).

**Bảng 16.1. Các bệnh có khả năng điều trị gen bằng kỹ thuật antisense, antigene**

Phân loại bệnh	Trên các bệnh cụ thể
Các bệnh do virus	1. Adeno virus
	2. Herpes simplex virus 1 (HSV 1)
	3. Herpes simplex virus 2 (HSV 2)
	4. Herpes Zoster
	5. Cytomegalovirus (CMV)
	6. Epstein – Barr virus (EBV)
	7. Human papilloma virus (HPV)
	8. Human T cell lymphotropic virus – 1 (HTLV-1)
	9. Human – immunodeficiency virus (HIV)
	10. Influenza A
	11. Influenza B
	12. Farain fluense
	13. Hepatitis A
	14. Hepatitis B
Các bệnh ung thư	15. Lymphoma
	16. Leukemia
	17. Melanoma
	18. Osteosarcoma
	19. Carcinomas colon
	20. Prostate carcinoma
	21. Kidney carcinoma
	22. Bladder carcinoma
	23. Breast carcinoma
Các bệnh khác	24. Psoriasis
	25. Allergy
	26. Inflammation
	27. Drug resistance

2.5. Tái tổ hợp gen trong tạo vaccin thế hệ mới, vaccin phân tử – vaccin ADN (xem cuốn Công nghệ gen sản xuất vaccin thế hệ mới của GS.TS Đái Duy Ban năm 1994).

2.6. Sử dụng công nghệ gen trong cấy ghép các cơ quan để thay thế những cơ quan bệnh.

2.7. Thay phẫu thuật bằng liệu pháp gen.

Các liệu pháp trên sẽ được trình bày chi tiết hơn dưới đây.

### **2.1. Liệu pháp antisense, antigene**

Điều trị antisense là điều trị ngược hướng còn điều trị antigene là điều trị chống lại gen bằng cách một chuỗi oligonucleotid trói buộc cả chuỗi kép ADN. Thực chất của các điều trị này là lai tạo bổ sung vào phân tử ADN hay ARN làm cho các gen đó không hoạt động được nữa.

Phương pháp điều trị gen này rất hứa hẹn vì đặc hiệu và rất có ứng dụng trong điều trị các bệnh do virus, trong ung thư và trong các bệnh di truyền.

### **2.2. Liệu pháp đưa một gen mới vào bù đắp cho gen hỏng**

Thế giới trong những năm qua đã có một số kết quả trong điều trị gen một số bệnh kiểu này. Dưới đây có thể kể ra một số thí dụ điển hình.

- Ken Culver ở Bethesda (Mỹ) đã báo cáo chiến lược điều trị gen của bệnh thiếu enzym adenosin deaminase (ADA). Thiếu enzym này thì chất độc tích tụ lại giết tế bào lymphocyte T và B. Trẻ chết ngay năm đầu do suy giảm miễn dịch phối hợp nặng. Tác giả đã nghiên cứu bệnh bằng cách tách tế bào lymphocyte T của bệnh nhân đưa ra ngoài rồi gây nhiễm bằng retrovirus có mang gen ADA, sau đó truyền lại tế bào T đó vào máu bệnh nhân. Kết quả hai trường hợp đã được xử lý kiểu này thấy hiệu giá kháng thể được cải thiện rõ và các bệnh nhân đã phát triển hạch lympho.

- Charles Coutelic ở Luân Đôn (Anh) đã điều trị gen đối với bệnh xơ nang (cystic fibrosis) gây rối loạn vận chuyển ion clo ( $Cl^-$ ) ở phổi. Nguyên nhân do thiếu yếu tố điều hoà dẫn  $Cl^-$  qua màng xơ nang. Tác giả đã dùng adenovirus làm vector dẫn gen sinh yếu tố điều hoà đó để đưa vào cơ thể cải thiện tình trạng nói trên.

- Marianne Grassman ở Michigan (Mỹ) đã mô tả sự điều trị gen đối với bệnh tăng cholesterol di truyền.

**Bảng 16.2. So sánh các chức phận đã được biết của các cytokin với các hiệu quả của chúng khi được biểu hiện bởi virus được tái tổ hợp**

STT	Các cytokin	Các chức phận chủ yếu đã được biết	Hiệu quả miễn dịch khi được biểu hiện ra trong virus đậu tái tổ hợp
1	IL-1 $\gamma$	Làm hoạt hoá các tế bào T	Làm tăng sự trả lời kháng thể trí nhớ
2	IL-1 $\beta$	Làm hoạt hoá các tế bào T	
3	IL-2	Yếu tố lớn của T làm hoạt hoá các tế bào B, các monocyt và các tế bào giết tự nhiên	Làm yếu sự lớn của virus làm kích thích các tế bào giết tự nhiên sản xuất ra IFN $\gamma$
4	IL-3	Yếu tố sinh trưởng và biệt hoá tế bào máu	Tạo máu trong các hoạt động vật bị chiếu xạ
5	IL-4	Làm điều hoà trả lời kháng thể, đặc biệt IgE	Làm tăng tính chất bệnh lý của virus
6	IL-5	Làm điều hoà sản xuất IgA	Làm kích thích sự trả lời IgA đặc hiệu kháng nguyên
7	IL-6	Được bao gồm trong sự chín của tế bào B tới những tế bào bài tiết kháng thể đặc biệt IgG1	Làm kích thích sự trả lời IgG1 đặc hiệu kháng nguyên phục hồi bổ sung của các tế bào giúp đỡ T
8	IL-7	Chất hoạt hoá sớm tế bào B	
9	IL-10	Làm điều hoà miễn dịch trung gian tế bào	
10	TN- $\alpha$	Hoạt động chống virus invitro, hoạt động tế bào T độc	Hạn chế sự lớn lên của virus tái tổ hợp, cho phép chuột thiếu tế bào T chống nhiễm khuẩn
11	TNF- $\gamma$	Làm điều hoà phức hợp các phân tử hoà hợp tổ chức (MHC) trên các tế bào trình diện kháng nguyên	Hạn chế sự lớn lên của virus tái tổ hợp cho phép chuột khuyết tế bào T vẫn chống được nhiễm khuẩn
12	TGF- $\beta$	Ức chế các chức phận của tế bào T và B in vitro làm hoạt hoá trí nhớ của T	

Người ta thấy thiếu gen mã hoá receptor của LDL ( Low densitylipoprotein) vận chuyển cholesterol vào gan để chuyển hoá, nên cholesterol ứ lại trong máu gây vữa xơ động mạch – nhất là động mạch vành tim dễ bị tắc mạch – gây nên bệnh nhồi máu cơ tim. Đó là bệnh nguy hiểm. Tác giả đã sử dụng retrovirus mang gen receptor của LDL đưa vào tế bào gan người – và thấy rằng 25% cholesterol đã giảm được trong máu bệnh nhân.



### **2.3. Đưa một gen mới vào sản xuất ra các chất cần thiết để tiêu huỷ tế bào bị bệnh**

Đó là trường hợp liệu pháp gen bằng các cytokin tái tổ hợp thường được áp dụng trong điều trị ung thư.

Các gen cytokin như gen IL2 ( interleukin -2) IL-4, TNF ( tumour necrosis factor) v.v... đưa vào virus đậu, rồi gây nhiễm cho lymphocyt T tách ra từ máu các bệnh nhân ung thư.

Sau đó lại đưa các tế bào T đã được chuyển gen nói trên vào trong cơ thể người bệnh. Các tế bào đó tiết ra các cytokin diệt tế bào ung thư. Đây còn gọi là vaccin tế bào sống.

### **2.4. Chuyển gen vào các vi khuẩn, nấm men... để sản xuất các dược phẩm quý hiếm điều trị bệnh**

Ngày nay nhờ phát triển công nghệ gen, người ta đã làm cho các vi sinh vật – chủ yếu *E.coli* và nấm men *Saccharomyces cerevisiae* – tạo ra những hormon, protein, kháng sinh...

Vì các chức năng tạo ra những sản phẩm này không quen thuộc với chúng nên trước đó các vi sinh vật phải được cấy gen mang thông tin cần thiết để sản sinh ra những chất mong muốn bằng phương pháp tái tổ hợp gen.

Sau đó chúng được nuôi cấy và sinh sôi nảy nở nhanh hơn trong những bình lên men: 5 lít, 10 lít hoặc thậm chí 100 lít, 500 lít và rồi người ta tách chiết được các sản phẩm đó từ vi sinh vật hoặc từ môi trường cấy chủng để làm thuốc men.

Hiện nay có hàng chục công ty Genentech ra đời và cạnh tranh nhau để sản xuất và thương mại hoá các sản phẩm nói trên. Họ thu về một lợi nhuận kếp xù kể hàng tỷ đôla cho mỗi hãng trong vài năm lại đây.

Ví dụ đối với hormon somatotostatin – kể từ tháng 11/1977 tại phòng thí nghiệm Genetech ở Francisco, giống vi khuẩn được mang gen sản xuất hormon đó bằng công nghệ gen đầu tiên ra đời. Chúng sản sinh ra somatostatin để chữa bệnh tuyến yên chỉ cần 100g vi khuẩn biến đổi gen đã tạo ra 5mg hormon một cách nhanh chóng mà trước đây đã phải dùng đến 100 tấn não cừu để chiết xuất hormon đó.

Đối với insulin, sau đó một năm cũng hãng Genentech đã sản xuất

thành công bằng con đường tái tổ hợp gen vào vi khuẩn *E.coli* mà trước đây cũng phải tách chiết từ hàng trăm, ngàn tấn tụy bò, lợn mới được vài gam đến chục gam. Đây là thị trường to lớn vì có tới 5 triệu người bị bệnh tiểu đường trên thế giới phải dùng đến insulin hàng ngày cho đến suốt đời.

Đối với một loạt những chất khác như:

Somatotropin, interferon, protein đông máu yếu tố XIII, protein CD4, albumin huyết thanh v.v... cũng đều được các công ty cạnh tranh sản xuất theo con đường tái tổ hợp gen. Bảng 16.3 dưới đây nêu ví dụ điển hình bằng các vi sinh vật các hãng trong sản xuất albumin huyết thanh bằng công nghệ nói trên.

**Bảng 16.3. Các sinh vật được dùng để sản xuất albumin huyết thanh người bằng con đường tái tổ hợp gen**

Các sinh vật	Các công ty ( các hãng ) tiến hành sản xuất
1. <i>E. coli</i>	Genetech, South San Francisco, CA, USA Upjohn, Kalamazoo, MI, USA Genetica, Rhone Poulenc, Paris, France
2. <i>Bacillus subtilis</i>	Genex, Gaithersberg, MD, USA
3. <i>Sacharomyces cerevisise</i>	Gentech, South San Francisco, CA, USA, Delta, Nottingham, UK Rhone Poulenc, Paris, France Green Cross corp, Osaka, Japan, Tonen, Tokyo, Japan SkADNigen/vepex Biotechnika, Stockholm, Sweden
4. Schizosaccharo	Delta, Nottingham, UK
5. <i>Pichia Pastoris</i>	Philipps, Mahwah, NJ, USA Green Cross corp, Osaka, Japan
6. <i>Hanseula Ro polymorpha Kluyveromyces Lactis Aspergillus niger</i>	Delta, Nottingham, UK Rhone, Poulenc, Paris, France Gist, Brocades, Delft, The Netherlands
7. <i>Aspergillus nidulans</i>	Delta, Nottingham, UK
8. Nottingham	Delta, UK
9. <i>Nerospora crassa</i>	Tonen, Tokyo, Japan
10. <i>Solanum tuberosum</i> (Potato)	Mogen international NV, Leiden The Netherlands
11. <i>Sus scrota</i> (pig)	DNX, Princeton, NJ, USA

## 2.5. Tái tổ hợp gen trong tạo vaccin thế hệ mới vaccin phân tử và vaccin ADN

Hiện nay phòng và chống một số bệnh do virus, do vi khuẩn và cả bệnh ung thư thành công nhờ vào việc sản xuất vaccin tái tổ hợp gen.

- Một số kháng nguyên virus dễ được sản xuất từ nấm men như kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg) trong phòng và chống bệnh viêm gan B nguy hiểm cho người; Kháng nguyên Glycoprotein của virus HSV-1, kháng nguyên hemagglutinin (HA) của virus cúm, kháng nguyên T của virus polioma, kháng nguyên gag của virus HTLV-III v.v...

- Một số vaccin phân tử khác cũng được sản xuất trong E.Coli, hoặc trong virus đậu tái tổ hợp như vaccin sốt rét, vaccin dại, vaccin HIV...

- Gần đây một hướng vaccin mới được ra đời đó là vaccin ADN. Nhờ kỹ thuật sinh học phân tử phát triển, kết hợp với việc hiểu tường tận hơn về bệnh tật và hệ miễn dịch – mà các nhà nghiên cứu đã đưa ra thử nghiệm loại vaccin này. Các thử nghiệm lâm sàng đầu tiên ở người mới bắt đầu từ năm 1955, về nguyên tắc, vaccin này ra đời có thể hầu hết chống lại bất kỳ một bệnh nào.

Chúng ta biết rằng, hiện nay nhiều loại vaccin chỉ có tác dụng kích thích hệ miễn dịch dịch thể, nghĩa là chống bệnh dựa trên hàng rào kháng thể lưu hành trong máu và bạch huyết. Các kháng thể này trôi nổi trong dòng máu cho tới khi gặp một protein lạ vừa vận thì chúng kết hợp và làm mất tác dụng gây bệnh của kháng nguyên. Nhưng trong quá trình đó, có lúc phải theo đuổi rượt bắt protein lạ ngoại xâm, nên các đại thực bào tham gia các tế bào này báo cho hệ miễn dịch lymphocyt B và T phối hợp tạo ra kháng thể nhanh hơn thông qua trí nhớ nhận biết protein lạ trước đây. Chính vaccin đưa cho hệ miễn dịch trí nhớ như vậy. Thế nhưng khi vào được trong tế bào chủ, tác nhân gây bệnh thoát được khỏi sự chú ý của kháng thể. Trong trường hợp này phải huy động đến hệ miễn dịch tế bào và hệ này tiêu diệt toàn bộ cả tế bào nhiễm bệnh để ngăn chặn bệnh lan rộng. Song có một số tác nhân gây bệnh tinh quái hơn, luôn luôn thay đổi hình dạng bề mặt làm khó khăn trong việc nhận dạng để tấn công. Kể đó, dù đã được làm yếu, vaccin phải thật sự “sống” mới ngăn chặn lây bệnh đúng nghĩa, nhưng như thế thì hiểm họa sẽ gia tăng. Vaccin ADN không đem lại hiểm họa như vậy. Lí do là chúng tác động bằng cách làm cho các tế bào tạo ra những protein lạ mà không có tác nhân gây bệnh bên cạnh.

- Tiến sĩ Marget Liu ( Mỹ) đã tạo ra được vaccin ADN đầu tiên - đó là bản sao phân tử của gen bên trong gọi là nucleoprotein. Tác giả đưa gen này vào plasmid và đưa vào vi khuẩn. Dùng vi khuẩn sinh sôi nảy nở một lượng lớn các plasmid mang gen virus cúm này trong một thời gian ngắn. Sau khi thu hoạch được các plasmid đó nhóm tác giả đưa chúng vào cơ thể chuột và họ vô cùng phấn khởi vì đã khám phá ra được chuột có đáp ứng miễn dịch mạnh đối với bệnh cúm.

Kết quả này vượt xa hy vọng mong đợi của nhóm nghiên cứu. Máy con chuột của họ đã thật sự miễn dịch đối với cả hai loại cúm: một loại có từ năm 1934 và loại kia có năm 1968. Các virus cúm thường xuyên đổi lớp áo khoác ngoài làm cho hệ miễn dịch khó nhận diện. Nhưng phân tử nucleoprotein từ vaccin ADN, nhờ chức năng giới phân xét đã tồn tại tương đương hơn 60 năm qua và đủ sức nhận ra và tấn công virus cúm.

Hiện nay nhiều nhóm nghiên cứu khác bắt chước vaccin ADN chống cúm - đã bắt đầu chế tạo vaccin ADN khác – như vaccin ADN chống lao, vaccin ADN chống viêm gan B, vaccin ADN chống ung thư.

- Đầu tháng 8/1996 tạp chí Nature medicine ( Anh) đăng tường trình hai nhóm nghiên cứu chế tạo ra vaccin ADN lấy từ vi khuẩn lao. Khi họ tiêm vaccin này cho chuột nhắt, con chuột đã tạo được miễn dịch đối với lao. Bác sĩ Douglas B.Lowrie, nhà nghiên cứu và phát triển loại vaccin mới này tại Viện Y học quốc gia Anh nói rằng những kết quả vừa khám phá sẽ giúp các nhà khoa học sản xuất một vaccin cho người chống lao hữu hiệu hơn BCG. Vaccin BCG – dùng tiêm cho người trên cơ sở vi khuẩn sống làm yếu độc lực. Người ta hy vọng có thể sẽ tạo nên sức kháng bệnh, nhưng thật ra đến nay hiệu quả của nó không chắc chắn. Trước đây nhiều viên chức y tế cộng đồng tin rằng, giữa thập niên 80 lao không còn là mối đe dọa tới sức khỏe con người. Thế nhưng thập niên vừa qua sự trở lại của lao là đáng sợ, bởi nhiều trường hợp lao có liên quan đến đà gia tăng của bệnh AIDS trên toàn cầu.

Mặc dù mối liên quan giữa vi khuẩn *Tuberculosis mycobacterium* và lao là một trong những vấn đề được khám phá sớm nhất, nhưng đến nay chúng ta biết tương đối ít về bệnh này. Một số loại lao kháng thuốc khiến các bác sĩ vất vả khi điều trị lao cho nhiều bệnh nhân. Theo WHO, 70% bệnh nhân lao kháng thuốc sẽ chết trong vòng bốn tháng và tổ chức này báo động chính phủ các nước cần có chương trình chống lao rộng lớn, nếu không, 30 triệu người nữa sẽ chết trong 10 năm tới và 90 triệu sẽ bị nhiễm

lao. Tại Mỹ có hơn 15 triệu người mắc lao ngầm.

Loại vaccin BCG hiện nay cũng có khi không tạo được miễn dịch chống lao. Vì vậy khi thấy vaccin ADN chống lao hữu hiệu ra đời tiến sĩ Lee Reichman – Giám đốc Trung tâm lao quốc gia thuộc trường y New Jersey tại Newark phát biểu: “ Tôi rất vui khi thấy loại vaccin mới ra đời” và Elisercarz, giáo sư miễn dịch học, Trường đại học California nhấn mạnh: vaccin từ gen dễ sản xuất hơn các vaccin chứa vi khuẩn còn sống – và rất hi vọng vaccin chống lao loại này sẽ rẻ hơn, dễ bảo quản, dễ vận chuyển và cho mức bảo vệ chắc chắn hơn – sẽ ngăn chặn được bệnh lao lây lan rộng.

- Đối với vaccin ADN chống bệnh viêm gan B, cũng đã được một số tác giả thảo ra. Heather David và cộng sự ở trường đại học Ottawa đang tiến hành sản xuất vaccin loại này. Không giống như bệnh cúm, bệnh viêm gan B từ lâu đã có thể ngừa bằng dòng vaccin kích thích các kháng thể. Nhưng việc chúng ngừa thì dài dòng, phức tạp, người nhận cần phải được tiêm ba lần trong sáu tháng. Ở nhiều nơi, viêm gan virus B lan tràn thành dịch rộng lớn, việc tiêm chủng phiền phức như trên tỏ ra không có ích. Tiến sĩ David hy vọng vaccin ADN chống viêm gan B này sẽ đem đến cho cơ thể sự miễn dịch tốt và lâu dài, đồng thời cũng hi vọng cả chữa trị cho người đã mắc bệnh nữa.

- Đối với vaccin ADN chống ung thư đã ra đời cách đây 5 đến 6 năm khi các nhà khoa học nhận ra rằng có thể thuyết phục hệ thống miễn dịch của cơ thể phá huỷ các tế bào ung thư. Nếu điều này xảy ra, hệ thống miễn dịch có thể chỉ tấn công tế bào ung thư như những phân tử ngoại lai. Các tế bào ung thư có lớp protein duy nhất ở trên bề mặt của chúng và chính những protein này được sử dụng để khơi dậy sức đề kháng của hệ thống miễn dịch.

Nhóm nghiên cứu ở Southampton và Cambridge sản xuất vaccin này bằng cách lấy chuỗi ADN là mật mã của một loạt protein trên tế bào ung thư và tái tổ hợp gen vào plasmid tạo ra vector chuyển gen. Khi tiêm vector vào cơ bắp bệnh nhân, thì bộ phận chế tạo protein của tế bào cơ sẽ bắt đầu sản xuất ra loại protein ung thư.

Sự xuất hiện đột ngột của hàng triệu phân tử protein ung thư sẽ kích thích hệ thống miễn dịch sản xuất hàng tỷ kháng thể chống lại chúng. Các nhà khoa học rất hy vọng trên cơ sở này các kháng thể cũng sẽ tấn công các protein bám trên bề mặt của tế bào ung thư và vì vậy diệt ung thư ở bệnh nhân.

## 2.6. Sử dụng công nghệ gen trong cấy ghép các cơ quan

Hàng năm trên thế giới có hàng vạn bệnh nhân chờ được ghép các cơ quan nội tạng như tim, phổi, thận, giác mạc v.v... Tuy các nước tiên tiến đều có ngân hàng các cơ quan đó – do những người tự nguyện hiến tặng. Song số cung bao giờ cũng thấp hơn số cầu gấp hàng chục lần. Do đó bọn mafia dựa vào con số đó buôn bán trẻ em để lấy phủ tạng, hoặc đánh cắp những phủ tạng của các bệnh nhân mới chết đem bán kiếm những khoản tiền lớn.

Để góp phần giải quyết nạn khan hiếm các phủ tạng ghép đó – các nhà khoa học đã nghiên cứu việc ghép các nội tạng thú vật vào cho người và đã bước đầu có hy vọng.

Cách đây 90 năm về trước một nhà phẫu thuật người Pháp đã ghép thận lợn cho bệnh nhân, nhưng bị thải loại và bệnh nhân không sống được. Năm 1910 người ta đã thay thận khỉ cho một bệnh nhân khác nhưng người này cũng chỉ sống được có 30 giờ. Những năm gần đây, người ta vẫn thực hiện các ca ghép nội tạng thú vật cho người, nhưng khó kéo dài cuộc sống.

Về mặt lý thuyết có thể bù đắp sự thiếu cơ quan người bằng cấy ghép cơ quan loài vật. Song khó khăn là ở chỗ cơ thể người bệnh không chấp nhận bộ phận được ghép ngay cả khi dùng nội tạng của người để ghép cho nhau. Hệ thống miễn dịch của người nhận rất nhạy cảm với vật lạ và bằng mọi cách tấn công để thải loại cơ quan được ghép. Vì vậy các bác sĩ mỗi khi ghép các cơ quan của người – ngay cả người cận huyết – anh em cũng phải dùng thuốc ức chế miễn dịch. Dùng nội tạng thú vật để ghép cho người còn nguy hiểm hơn. Để khắc phục tình trạng khó khăn này người ta đã đánh lừa hệ miễn dịch. Các nhà nghiên cứu đã nghĩ đến việc tạo ra giống vật được cấy gen người đó là lợn và chuột.

David White – giáo sư miễn dịch học và Hohn Wallword chuyên gia ghép tim ở bệnh viện Boston (Mỹ) đã thành lập tại Boston một trung tâm mang tên “Imutran” nhằm mục đích cấy gen người vào phôi lợn để cho ra đời loại lợn có nội tạng chấp thuận protein người, và những con lợn này sẽ được nuôi và hoàn thiện việc lai tạo chúng để nội tạng chúng có thể ghép được cho người.

Một thành công đầu tiên là ghép tim. Một ca ghép tiến hành đầu tiên trên thế giới thành công là do giáo sư Chris BaARNrd thực hiện ghép tim lợn sang người. Cho đến nay sau một năm theo dõi, quả tim lợn nằm trong ngực người vẫn làm việc tốt, không có sự đào thải. Hiện nay các bác học Mỹ có

trong tay 500 con lợn giống để gửi đến các trung tâm có nhu cầu ghép.

Như vậy việc ghép gen vào phủ tạng các động vật để ghép cơ quan cho người là thắng lợi trong tầm tay, nhưng lúc ấy những người yêu nhau liệu có dám chấp nhận sống với nhau bằng quả tim lợn trong người không?

### **2.7. Thay phẫu thuật bằng liệu pháp gen**

Như trên chúng ta đã biết, liệu pháp gen ngày càng vững vàng bước vào nền y học hiện đại – trong điều trị các bệnh lỗi di truyền, các bệnh tim mạch, ung thư v.v... Tuy nhiên gần đây các nhà khoa học Mỹ còn hy vọng rằng, ngay cả trong những trường hợp bi kịch nhất, nhờ áp dụng liệu pháp gen, họ vẫn có thể bảo vệ được người bệnh đối với nguy cơ tàn phế. Tại những nơi mạch máu bị co thắt, họ đưa vào cơ thể một loại gen có thể thực hiện được chức năng tạo ra hợp chất thúc đẩy sự sinh sôi những mạng mạch máu phụ. Bằng cách đó các nhà khoa học Mỹ đã tạo ra được các tác phẩm “typass” kinh điển từng thực hiện trong kỹ thuật phẫu thuật tim mạch hiện đại, song không cần phải phẫu thuật phức tạp.

Giáo sư Jeffrey Isner – Trường đại học tổng hợp Tufts mới đây đã xử trí liệu pháp gen nói trên cho một nữ bệnh nhân trên 70 tuổi được tăng lưu lượng máu trên 80% ở những nơi cần thiết. Tác giả đã khẳng định trên tạp chí “Lancet” rằng, liệu pháp gen này có thể trở thành phương pháp điều trị thay thế hữu hiệu một số bệnh tim mạch trầm trọng một khi mọi tân được tỏ ra bất lực.

Ngày nay dùng liệu pháp gen, các bác sĩ đang đưa ra những bọc một lớp polimer chứa đầy đội quân gen vào các mạch máu như kiểu trước đây đưa những “khinh khí cầu đầy gas” để mở rộng mạng mạch máu. Sau khi lớp polimer chứa gen bám vào thành mạch, thì ADN sẽ được thâm nhập vào bên trong, sản xuất ra các nhân tố làm gia tăng mạch máu. Và kết quả chỉ vài tuần đã xuất hiện cả mạng mạch máu mới. Nhờ liệu pháp này bệnh nhân đầy lùi được những cảm giác đau đớn trong chân cũng như những vết thương cơ bắp. Các nhà khoa học đang hoàn thiện phương pháp này, điều đó mở ra một kỷ nguyên y học mới.

## **III. CHẨN ĐOÁN GEN**

Chẩn đoán gen hay còn gọi là thăm dò axit nucleic là dùng một đoạn

ADN hay ARN có khả năng nhận biết một đoạn nucleotide bổ sung và hình thành với nó một phân tử sợi kép bền trong quá trình lai tạo. Sự hình thành sợi kép nó có thể chứng minh được bằng những chất đánh dấu như những đồng vị phóng xạ, các enzym và chất sinh màu, các phân tử huỳnh quang hay là quang phát sáng (xem phần công nghệ gen).

Những tiến bộ trong kỹ thuật chẩn đoán gen hay còn gọi là công nghệ ADN cung cấp một lợi khí mới trong phát hiện một loạt các bệnh di truyền phân tử và các bệnh nhiễm vi sinh vật. Sự chẩn đoán gen được tăng lên bởi phản ứng chuỗi polymerase (PCR) và phản ứng chuỗi polymerase kết đôi với phản ứng sao chép ngược (RT – PCR), dẫn tới trực tiếp phát triển những kỹ thuật lai tạo phân tử trong di truyền học, y học và thú y học, **đặc biệt trong chẩn đoán nhanh và chính xác các bệnh virus** mà trong đó tác nhân gây bệnh không thể tách nhận được bằng các phương pháp thông thường và cổ điển.

Trong chẩn đoán gen có ba loại chính:

1. Chẩn đoán gen các bệnh di truyền
2. Chẩn đoán gen các bệnh nhiễm trùng
3. Chẩn đoán gen trong pháp y

## 1. Chẩn đoán gen các bệnh di truyền

Trên thế giới, các bệnh di truyền ở người là những bệnh rất quan trọng. ở nước Anh, 30% trẻ em được nhận bảo hộ nhi đồng là có bệnh di truyền. Bệnh viêm xơ nang xảy ra ở Caucasians với mức 1/2000 trẻ mới sinh. Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne có nhiều ở thế giới thứ ba gây bất lực, cũng như kiệt sức trước khi chết. ở Sardinia và Cyprus, khoảng 1% trẻ em sinh ra là có gen beta – thalassaemia. Bệnh thiếu enzym glucose – 6 phosphate dehydrogenase trên thế giới có tỷ lệ mắc 1/10<sup>8</sup> người dân.

### 1.1. Các chẩn đoán đặc hiệu gen

Đó là những đoạn ADN có chiều dài khoảng 1-6 kb tương ứng với vùng gen quan tâm nằm trong bộ gen. Chẩn đoán gen đặc hiệu này được chuẩn bị bằng một vài nguồn. Trước hết mRNA có thể được làm sạch từ tế bào, rồi dùng enzym reverse transcriptase để tạo ra cADN. cADN được thuần hoá vào trong vector vi khuẩn như đã nói ở trên. Phương pháp này có thể được áp dụng nếu như mRNA tương ứng với gen quan tâm phong



phủ trong một loại tế bào nào đấy ví dụ gen globin trong các tế bào erthropoietic. Song phổ biến là mRNA có tỷ lệ thấp – khoảng 0,01% của toàn bộ mRNA tế bào nên một phương pháp khác được sàng lọc là lập ra thư viện của những đoạn ADN thuần hoá - mà những đoạn đó bắt nguồn hoặc từ ADN của toàn bộ tế bào ( thư viện của cả bộ gen) hoặc là phiên mã ngược của tất cả mRNA của tế bào ( thư viện cADN). Rồi thì áp dụng một trong những kỹ thuật sau đây để tách riêng những đoạn gen đặc hiệu đang quan tâm. Phương pháp đó là sàng lọc trong thư viện bằng những đoạn oligonucleotide được tổng hợp hoá học. Như vậy một hỗn hợp của các oligonucleotide ( mỗi chúng có ít nhất 11 mononucleotide) được tổng hợp ra có thành phần tương ứng với đoạn ADN mã hoá protein đặc hiệu. Một hỗn hợp oligonucleotide như thế là cần thiết bởi vì có sự thoái hoá mã di truyền.

Phương pháp này lần đầu tiên đã được dùng để tách gen mã hoá cho protein bổ thể và vừa qua là đối với yếu tố đông máu VIII ở người. Cấu trúc đầu tiên của protein này thì không rõ, nhưng những đoạn ADN thì được sàng lọc, rồi biểu hiện trong vi khuẩn, các kháng thể chống lại sản phẩm gen có thể được dùng để tách những đoạn gen cần muốn.

Một cách nữa là một đoạn gen mã hoá cho một protein nào đó đã được tách trong một loài khác, mà nó có khả năng đồng nhất thì được dùng để sàng lọc thư viện của người. Thí dụ gen phenylalanine hydroxylase, khuyết nó gây ra phenylketonuria ( PKU), thì đã được tách ra bởi sàng lọc ở thư viện gen người bởi dòng cADN của chuột sống.

Bước ngoặt trong chẩn đoán phân tử là sự ra đời của phản ứng chuỗi polymerase (PCR). Phản ứng này có khả năng thu được hàng triệu copy những đoạn ADN đặc hiệu qua sự phóng đại bằng enzym của nó.

Kỹ thuật PCR thực chất đã thực hiện một bước ngoặt trong chẩn đoán lâm sàng, vì rằng nó không đòi hỏi chất đồng vị phóng xạ, còn về số lượng ADN thì đủ để quan sát trực tiếp và đánh giá trong giai đoạn phân tách bằng điện di. Để phục vụ cho chẩn đoán người ta tiến hành trung bình 35 chu kỳ PCR. Các tác giả đã sử dụng PCR để phóng đại *in vitro* gen insulin người. Lúc đầu người ta sử dụng enzym mới của mỗi lần sau biến tính. Thường xuyên trong phản ứng tạo ra những sản phẩm không đặc hiệu, bởi vì nhiệt độ tổng hợp giới hạn chỉ đến 37°C và dẫn ra các liên kết không đặc hiệu của các primer. Sự dẫn ra enzym polymerase bền nhiệt ở vi khuẩn *Thermus aquaticus* ( polymerase Taq) như các phần trên đã nói làm đơn giản phần

ứng phóng đại, giảm giá thành và góp phần đẩy nhanh sự ứng dụng phản ứng này vào trong sinh học và y học.

Hiện nay trên thị trường có nhiều loại enzym polymerase ưa nhiệt, không làm thay đổi hoạt tính của mình trong dãy nhiệt độ cao.

Sự chỉ ra có hay không có một đoạn đặc biệt ADN là quan trọng nhất của phản ứng PCR trong chẩn đoán y học. Sự nhạy cảm rất lạ thường của phương pháp trong các hoàn cảnh hơi tối ưu một chút là có thể đi đến phóng đại những đoạn không đặc hiệu. Để thu được sản phẩm chính xác cũng cần thiết phải xác định số lượng cơ chất đặc hiệu và thực nghiệm những điều kiện phản ứng được xác định.

Cũng cần nhớ rằng khi so sánh với enzym Klenow, những khả năng biểu hiện lỗi sao chép của polymerase Taq cao hơn, cho nên không có thể sử dụng quá ít lượng ADN vào mục đích chẩn đoán mặc dù sự phóng đại ADN của một tế bào duy nhất có thể làm được.

Một ví dụ tuyệt vời của sự chẩn đoán gen tiến bộ đó là chẩn đoán bệnh bạch huyết. Sự chẩn đoán trực tiếp ADN nhờ PCR đã phát hiện đó là bệnh di truyền. Khi sử dụng PCR, Williams và cộng sự 1988 đã dẫn ra sự chẩn đoán đầy đủ bệnh này trong vòng một ngày. Sự có mặt của một số phản ứng có thể phát hiện những biến dị điểm của bệnh.

Việc phân lập ra những biến dị còn chưa biết dẫn đến tình trạng bệnh lý có thể rất đơn giản qua sự phân biệt mARN thay thế cho ADN. Sự loạn dưỡng cơ Duchenne qua sự phân tích mARN của tế bào lymphocyte máu ngoại vi.

Chẩn đoán phân tử với sự sử dụng PCR cũng có thể lợi dụng để phát hiện sự chuyển dịch đặc hiệu đối với ung thư trong mARN hay ADN của bộ gen. Người ta sử dụng thường xuyên PCR trong chẩn đoán bệnh ung thư lymphocyte. Dấu hiệu di truyền tế bào của bệnh này là có nhiễm sắc thể Philadelphia, ngược lại ở mức độ phân tử dẫn đến hợp chất gen BCR trên nhiễm sắc thể 22 với gen ABL trên nhiễm sắc thể 9 và tạo ra dạng khám mARN và protein. ý nghĩa của những nghiên cứu này tăng lên sau phát hiện mARN của gen BCR – ABL ở các bệnh nhân mà trước đây không chỉ ra sự có mặt của nhiễm sắc thể Philadelphia.

Phương pháp phân tử học được sử dụng ngày càng nhiều để phát hiện mARN đặc hiệu đối với các ung thư cũng như đánh giá sự biểu hiện của chúng. ý nghĩa to lớn của PCR là để đánh giá sự điều trị bệnh nhân như

người ta đã chỉ ra gần đây trong các nghiên cứu biến dị gen p53 trong ung thư phế quản, ung thư đường dẫn nước tiểu và ung thư dạ con. Người ta cũng mô tả một loạt những biến dị điểm gây ra bởi thay đổi gen này trong ung thư phổi và cổ tử cung.

## ***1.2. Phân tích trực tiếp những biến dị gen dùng chẩn đoán đặc hiệu gen***

Trước đây hiểu một cách đầy đủ tường tận bệnh lý phân tử của người thì chỉ có bệnh Hemoglobin. Những thay đổi ở mức độ sao chép đã gây ra biến dị trong những đoạn promotor hoặc mất tất cả hoặc chỉ một phần của gen globin như đã được mô tả.

Những lỗi đó có thể phát hiện trực tiếp khi dùng những chẩn đoán đặc hiệu gen, nhờ phương pháp thấm Southern.

Trong kỹ thuật này, ADN của người được cắt ra thành những đoạn đặc hiệu bởi những enym tiêu hoá hạn chế. Những đoạn này được chuyển vào màng lọc theo kích thước. Sau đó tách bởi điện di gel, rồi được đánh dấu phóng xạ. Đoạn ADN chẩn đoán đặc hiệu có thể được phát hiện bởi phương pháp tự phóng xạ mô.

Sự biến dị của một nhóm gen globin làm ảnh hưởng tới vị trí nhận diện của enym hạn chế sau đó những đoạn khác nhau về kích thước sẽ được sản xuất ra. Chẩn đoán đặc hiệu gen sẽ được quan sát bằng phương pháp thấm Southern với sự lai tạo với đoạn ADN. Đoạn được nhận diện sẽ được lọc và vì sự thay đổi kích thước nên làm thay đổi sự chuyển dịch khi chạy điện di. Chẩn đoán này cần ít nhất 2 mg ADN để chẩn đoán trẻ trước khi sinh hay phát hiện người mang bệnh di truyền. ADN đủ cho thấm Southern có thể thu được từ mẫu máu sạch, hoặc từ dịch ối 16-18 tuần của thai hay từ vi nhung mao của màng ối lúc 8-10 tuần. Mỗi mẫu xử lý bằng phương pháp thấm phải mất tối thiểu sáu ngày.

Thông thường những biến dị riêng lẻ gây ra bệnh không làm thay đổi vị trí liên kết enym hạn chế mà chỉ có thể phân lập được bởi phân tích thứ tự ADN. Nếu như đoạn biến dị được biết, thì lỗi này có thể được chẩn đoán bằng cách dùng oligonucleotide ngắn tổng hợp. Sự chẩn đoán oligonucleotide có cấu trúc tương ứng để sửa chữa những đoạn biến dị ADN của người mang sẽ được lai tạo với cả ADN chẩn đoán và ADN từ cá thể bình thường. Kỹ thuật này hoàn toàn được dùng trong chẩn đoán bệnh thiếu máu hình liềm ( được gây ra bởi sự thay đổi đơn giản GAG thành GTG) và

bệnh lỗi di truyền alpha – antitrypsin ( đó là điều kiện mở đường dẫn tới bệnh khí thũng và bệnh gan). ở đây cũng cần nhắc đến khái niệm đa hình về độ dài của đoạn hạn chế RFLP:

Vì nhiều những biến dị khác nhau ở locus globin gây nên bệnh thalassamia điều đó làm cho việc chẩn đoán trở nên khó khăn về phân tích biến dị để đi đến phương pháp lai tạo oligonucleotide. Vấn đề này nghiên cứu cả sự liên kết với gia đình làm chẩn đoán ADN như là những dấu hiệu di truyền. Người ta tiến hành phân tích và phát hiện có những thay đổi trong kích thước các đoạn trên giấy thấm Southern và chúng đều được gọi là đa hình về độ dài đoạn hạn chế ( RFLP).

Trong chẩn đoán thiếu máu hình liềm bởi sự có mặt HpaI vị trí đa hình gần 5kb cách xa gen bị ảnh hưởng. Phương pháp này bây giờ được dùng để chẩn đoán bệnh Hemophylia A và B, OTC, Lesch – Nyhan syndrome và PKU.

Chẩn đoán đặc hiệu gen chẳng những giúp chẩn đoán những lỗi gen mà còn phân tích chi tiết chức phận và cấu trúc các gen. Vị trí gây biến dị trực tiếp có thể được dùng để cải tiến hoạt động của sản phẩm. Chẳng hạn kỹ thuật này được dùng để phân tích chức phận các phần khác nhau của receptor acetylcholine. Những thay đổi được tiến hành ở những gen làm mã hoá tiểu đơn vị receptor mà chúng làm thay đổi đoạn axit amin và như vậy làm thay đổi cấu trúc bậc ba của các phần chủ yếu của protein như là các vị trí liên kết với toxin và agonist.

### ***1.3. Phân tích gián tiếp khi dùng phép chẩn đoán ADN***

Phương pháp ADN tái tổ hợp có thể cũng được dùng khi lỗi hoá sinh là cơ sở rối loạn một nguồn duy nhất chưa rõ. Trường hợp này lại khai thác sự liên kết bệnh với RFLP, nhưng ở đây RFLP được đặc trưng bởi những đoạn ADN được thuần dòng. RFLP có thể được khu trú khoảng vài ngàn đôi base cách locus khiếm khuyết. Nguyên tắc khi dùng RFLP để phân tích liên kết thì không phức tạp. ở meiosis, các nhiễm sắc thể đồng nhất liên kết lại, sự gãy nhiễm sắc thể xảy ra ( vào khoảng 2 lần/1 nhiễm sắc thể) cho phép trao đổi nguyên liệu di truyền, sự trao đổi này được gọi là trao đổi chéo.

Nếu hai gen hay RFLP đồng thời trên một nhiễm sắc thể thì điều đó không phải là trao đổi chéo giữa chúng. Như vậy nếu hai đoạn ADN được di truyền trong gia đình thì chúng cũng được liên kết. Nếu hai dấu hiệu cùng

được di truyền tới 99% một lần, chúng ta có thể nói liên kết được ở khoảng cách di truyền 1 centi Morgan (1cM). Bộ gen của người có gần 3000 cM chiều dài.

PFLP là những chỉ thị tốt để làm bản đồ của những bệnh người.

- Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne ( DMD – Duchenne muscular dystrophy) là bệnh được liên kết đặc trưng bởi sự yếu cơ dần rồi dẫn đến liệt và chết ở tuổi 20 – 30 của cuộc đời. DMD là bệnh đầu tiên được tìm thấy ở khu trú ở vùng nhiễm sắc thể có liên kết với RFLP. Trong mấy năm qua ít nhất 10 RFLP đặc trưng hai phía của locus bệnh đã được phát hiện và giúp chẩn đoán khi trẻ mới sinh.

- Bệnh múa giật Huntington (huntington's chorea) là bệnh thoái hoá hiếm gặp của hệ thống thần kinh trung ương, mà ở đó các triệu chứng trở nên biểu hiện chỉ ở tuổi trung niên. Khi nghiên cứu tính di truyền của RFLP trong nhiều gia đình ở Venezuelan người ta đã thấy sự liên kết giữa RFLP (được gọi là G8) và bệnh múa giật Huntington ở gần 10 cM. Người ta vừa mới phát hiện bệnh này ở cánh tay ngắn của nhiễm sắc thể 4. Điều đó làm dễ dàng cho việc tìm thấy RFLP mới trong bệnh Huntington bởi sự tách ra những thử nghiệm trực tiếp ở nhiễm sắc thể 4.

- Chẩn đoán DX 13 làm phát hiện RFLP được liên quan chặt chẽ tới bệnh Haemophilia A. Bệnh này chịu sự biến dị và làm thay đổi sự biểu hiện của gen yếu tố VIII. Trong các trường hợp này, DX 13 cung cấp một chỉ thị rất có ích cho chẩn đoán bệnh khi trẻ mới sinh.

#### **1.4. Một số phát hiện khác của chẩn đoán gen**

##### *a. Phát hiện những rối loạn đa nguồn*

Một vài rối loạn như bệnh tim là kết quả của sự tác động tương hỗ giữa các yếu tố môi trường (như ăn kiêng, tập luyện và hút thuốc) với các thành phần của gen – mà những điều đó hoàn toàn còn chưa hiểu. Song những gen nào đó, kiểm tra chuyển hoá cholesterol là tiêu chuẩn tốt để nghiên cứu. Có sự liên kết giữa các gen apolipoprotein và receptor LDL. Sự mất cân bằng liên kết giữa RFLP ở locus ApoA<sub>1</sub> và hyperlipidami đã được chứng minh và là nguyên nhân của những bệnh mạch vành.

##### *b. Phát hiện những rối loạn không di truyền*

Việc áp dụng các phương pháp sinh học phân tử đã làm lợi cho y học

hơn là di truyền. Khả năng chẩn đoán các gen vi sinh vật cho phép nghiên cứu bệnh của người. Những thí dụ hiện nay bao gồm việc sử dụng các chẩn đoán cho Papillomavirus người để sàng lọc bệnh nhiễm trùng đốt sống cổ và phát hiện virus ADN Herpes simplex trong thủy thái dương của vài loại động kinh. Chẩn đoán ADN cũng rất có giá trị trong phân tích bệnh lý của ung thư.

### 1.5. Một số bệnh di truyền đã được chẩn đoán gen

Bảng dưới đây có thể kể ra một số bệnh di truyền ở người đã được chẩn đoán gen theo Dorkin và công sự.

Các chẩn đoán	Các bệnh lâm sàng
Chẩn đoán đặc hiệu gen	
Enzymes	
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	Bệnh Favism
Ornithine transcarbamyase	Khuyết OTC
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase syndrome	Hội chứng Lesch-Nyhan
Phenylalanyne hydroxylase	Bệnh phenylxeto niệu
3-hydroxy 3-methylglutaryl-CoA-reductase	
Hormones	
Insulin	Đái đường tụy
Growth hormone	Bệnh lùn
Gonadotrophin	
Prolactin	
Receptor bề mặt tế bào	
Acetylcholine receptor	
Low-density lipoprotein receptor	Vai trò trong bệnh tim mạch
<i>Protein của hệ thống miễn dịch và máu</i>	
Globins	Bệnh lý hemoglobin
Clotting factors VIII, IX	Bệnh ưa chảy máu A, B
Antithromin III	Nguy cơ nhồi máu tăng

Histocompatibility antigens	
Complement componens	
Immunoglobins	Các bệnh suy giảm miễn dịch khác
T-cell receptor	
Các gen khác	
Collagen	Rối loạn collagen
$\alpha_1$ Antitrypsin	Khí thũng, bệnh gan
Oncogenes	Ung thư
Chẩn đoán phát hiện RFLP được liên kết với những gen lỗi	
DX13	Bệnh ưa chảy máu A
G8	Bệnh múa giật Huntington
RC8, K1.28.754	Bệnh loạn dưỡng cơ Duchene

Trong những năm qua, sinh học phân tử đang đóng một vai trò quan trọng trong lĩnh vực y học dự phòng thông qua sự chẩn đoán gen các bệnh của trẻ còn trong bụng mẹ hay vừa mới đẻ ra. Nhờ sinh học phân tử, nhiều bệnh hiện nay được hiểu ở mức độ ADN. Sinh học phân tử đang đóng một vai trò quan trọng trong chẩn đoán và điều trị các bệnh ở lâm sàng.

## 2. Chẩn đoán gen các bệnh nhiễm trùng

- Mục tiêu của các chẩn đoán ADN trong các bệnh nhiễm trùng là phát hiện và tách ra tác nhân bệnh lý đặc trưng trực tiếp tới hình ảnh lâm sàng làm thông tin cho sự điều trị bệnh được nhanh chóng.

- Hiện nay người ta sử dụng rộng rãi chẩn đoán ADN hay chẩn đoán gen để phát hiện một loạt các bệnh nhiễm trùng như bảng dưới đây đã chỉ ra một số bệnh.

Một số chẩn đoán gen các bệnh nhiễm trùng

1. Lĩnh vực y học
2. Bệnh nhiễm Mycoplasma
3. Phát hiện các gen nội độc tố vi khuẩn
4. Phát hiện virus chàm như Herpes simplex
5. Phát hiện virus HIV

6. Phát hiện CMV
7. Phát hiện virus papilloma người
8. Phát hiện virus viêm gan B ở tổ chức gan người
9. Phát hiện các gen vi khuẩn kháng sinh
10. Phát hiện các tác nhân gây bệnh cho thực vật
11. Phát hiện các ký sinh trùng sốt rét như *Plasmodium falciparum* v.v...

Trong lãnh vực thú y và thực phẩm một số kit hiện hành đã được thương mại hoá cho phép chẩn đoán một số vi sinh vật bằng PCR như bảng dưới đây.

Bảng một số chẩn đoán gen đối với vi sinh vật thú y và thực phẩm

#### **Lĩnh vực thú y**

1. Phát hiện *Mycoplasma gallisepticum*
2. Phát hiện *Mycobacterium paratuberculosis*
3. Phát hiện BCV (Leucose bovin)
4. Phát hiện virus của bệnh Aujeszky

#### **Lĩnh vực thực phẩm**

1. *Listeria monocytogenes*
2. *Escherichia coli*
3. *Salmonella spp*
4. *Staphylococcus aureus*
5. *Campylobacter spp*
6. *Yersinia enterocolitica*

### **3. Chẩn đoán gen trong pháp y**

Chẩn đoán pháp y là một lĩnh vực đặc biệt của y học và thường gồm:

1. Nhận dạng một cá thể
2. Xác định một mối quan hệ huyết thống

Sử dụng công nghệ gen- đặc biệt là xem xét trình tự ADN có thể **nhận dạng cá thể** và **xác định huyết thống** được một cách đúng đắn hơn là những phương pháp xem xét kiểu hình (nhóm máu, kiểu huyết thanh, các enzym,



hệ hô hấp...) trước đây để luận chứng trong hình pháp học và tội phạm học.

#### IV. MỘT SỐ LƯU Ý CUỐI CÙNG

Vì khuôn khổ cuốn sách có hạn chỉ nêu lên các nguyên lý chung của công nghệ gen, còn những vấn đề riêng biệt của công nghệ gen chuyên ngành như:

1. Công nghệ gen trong vi khuẩn
2. Công nghệ gen trong thực khuẩn thể
3. Công nghệ gen trong nấm men
4. Công nghệ gen trong thực vật
5. Công nghệ gen trong động vật
6. Công nghệ gen trong ty thể
7. Công nghệ gen trong lục lạp
8. Công nghệ gen trong tế bào gốc (nhân bản)
9. Ứng dụng công nghệ gen trong các ngành nông, lâm, thủy sản
10. Ứng dụng công nghệ gen trong ngành y dược học hiện đại
11. Ứng dụng công nghệ gen trong sản xuất vaccin phân tử
12. Ứng dụng công nghệ gen trong nghiên cứu nguồn gốc sự sống như điều hoà biệt hoá tế bào và vấn đề ung thư.

Chúng tôi xin được trình bày ở những tập sau nếu có cơ hội tốt.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Aucubel F.M et al.** Short protocols in molecular biology : Third edition, Niley, 1995
2. **Blackburn M.G ADN Gait M.J.** Nucleic acids in chemistry and biology. Second edition Oxford University Press, 1996.
3. **Brown T.A.** Genomy. Wydawnictwo Nauka PWN. Warszawa, 2001
4. **Đái Duy Ban và Lữ Thị Cẩm Vân.** Công nghệ gen và Công nghệ Sinh học ứng dụng trong y dược học hiện đại. Nhà xuất bản Y học, 1994
5. **Đái Duy Ban và Lữ Thị Cẩm Vân.** Công nghệ gen và Công nghệ Sinh học ứng dụng trong nông nghiệp hiện đại. Nhà xuất bản Nông nghiệp, 1994
6. **Đái Duy Ban.** Kỹ thuật gen và các vấn đề nghiên cứu y học hiện đại. Tổng hội Y học Việt Nam, 1985.
7. **Đái Duy Ban, Trương Nam Hải, Đinh Duy Kháng, Lữ Thị Cẩm Vân, Nguyễn Đình Phúc.** Sinh học phân tử của ung thư vòm họng. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, 2003.
8. **Đái Duy Ban, Trương Nam Hải, Đinh Duy Kháng.** Sinh học phân tử của các bệnh gan và ung thư gan. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, 2004.
9. **Đái Duy Ban, Lữ Thị Cẩm Vân.** Công nghệ gen trong sản xuất thế hệ mới ứng dụng trong y học và nông nghiệp hiện đại. Trung tâm thông tin tư liệu Trung tâm KHTN&CNQG, 1994.
10. **Đái Duy Ban, Trần Thị Minh Tâm, Đái Thị Ngân Hà, Đái Thị Hằng Nga.** Công nghệ ADN trong điều trị gen các bệnh hiếm nghèo. Nhà xuất bản Y học, 1998
11. **Griffin HG. Griffin A.M.** PCR technology current Innonation CRC, Press 1994

12. **Harris ELV ADN Angal S.** Protein purification methods. A practical approach ILR. Press 1989
13. **Hoàng Thị Bích Ngọc.** Acid nucleic. Trong cuốn sách Hoá sinh y học. Nhà xuất bản Y học
14. **Hồ Huỳnh Thuỳ Dương.** Sinh học phân tử. Nhà xuất bản Giáo dục, 1997
15. **Lê Đình Lương.** Nguyên lý kỹ thuật di truyền, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 2001
16. **Newton C.R, Graham A.** PCR-Bios scientific publishers, 1994
17. **Nguyễn Đình Huyền.** Những điều cơ bản của kỹ thuật di truyền. Nhà xuất bản Nông nghiệp, 1999
18. **Rolfs A. Schuller I. Finckh U, Weber-Rolfs I.** PCR: Clinical Diagnostics ADN Research, Sringer lab, 1992
19. **Sambrook, Fritsch, Maniatis.** Molecular cloning, a laboratory manual 1, 2, 3. Second edition. CSH 1989
20. **Schumann W.** Genetic Engineering Techniques. Institute of Genetics. Germany
21. **Watson, Hopkins, Roberts, Steitz, Weiner.** Molecular biology of the gene. 4<sup>th</sup> edition. The Benjamin cummings Publishing company, Inc 1987
22. **Winter P.C, Hickey G.I, Fletcher H.I.** Genetics, Bios Scientific Publisers, limited, 1998.

GS. TSKH. ĐÁI DUY BAN

## CÔNG NGHỆ GEN

<i>Chịu trách nhiệm xuất bản:</i>	PGS, TS TÔ ĐĂNG HẢI
<i>Biên tập:</i>	Nguyễn Kim Long
<i>Kiểm tra kỹ thuật:</i>	Trần Khánh Thịnh
<i>Vẽ bìa:</i>	Hương Lan

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

70 Trần Hưng Đạo, Hà Nội

---

In 600 cuốn, khổ 16x24 cm, tại Nhà in Khoa học và công nghệ.

Giấy phép xuất bản số: 136-2006/CXB/142-06/KHKT do Cục xuất bản cấp ngày 13 tháng 4 năm 2006.

In xong và nộp lưu chiểu tháng 6 năm 2006

công nghệ gien



**Giá : 30.000 đ**