

PHẦN I

CƠ SỞ DI TRUYỀN

MỞ ĐẦU

LƯỢC SỬ PHÁT TRIỂN CỦA DI TRUYỀN HỌC VÀ KỸ THUẬT DI TRUYỀN

1.1- LĨNH VỰC NGHIÊN CỨU CỦA DI TRUYỀN VÀ CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN

Thuật ngữ “di truyền” (genetics) xuất phát từ gốc latin là gentikos (nguồn gốc). Di truyền học là một bộ môn của sinh học, chuyên đi sâu nghiên cứu hai đặc tính cơ bản của sự sống là tính di truyền và tính biến dị.

Tính di truyền biểu hiện ở sự giống nhau của các tính trạng giữa thế hệ này và thế hệ khác. Đặc tính di truyền cho phép thế giới sinh vật bảo toàn nòi giống. Trải qua nhiều thế hệ nối tiếp nhau nhưng những đặc tính di truyền không bị mất đi, thế hệ con cháu luôn có những đặc điểm giống bố mẹ, ông bà.

Các sinh giới sống trong điều kiện môi trường luôn có những biến động như sự thay đổi thời tiết, nhiệt độ môi trường, lượng nước, lượng thức ăn và sự đấu tranh sinh tồn giữa các loài. Để thích nghi với điều kiện sống, các cơ thể sống cũng có những thay đổi, làm xuất hiện những tính trạng khác nhau giữa các thế hệ, đó là sự biến dị. Biến dị biểu hiện sự sai khác của thế hệ con cháu so với thế hệ bố mẹ đồng thời sự sai khác của một cá thể nào đó so với các cá thể khác cùng đàn.

Di truyền học thực sự trở thành một bộ môn khoa học độc lập kể từ những năm 1900 - 35 năm sau ngày Mendel công bố công trình “Các thí nghiệm lai ở thực vật”. Từ đó đến nay, cùng với sự phát triển mạnh mẽ của các ngành khoa học khác như vật lý, toán học, hóa học, di truyền học đã và đang khám phá rất nhiều quy luật về sự tồn tại và lưu truyền sự sống và trở thành một mũi nhọn trong nghiên cứu sinh học.

Những thành tựu rực rỡ của di truyền học đã đem lại những nhận thức mới về cấu tạo và sự vận hành bộ máy di truyền của cơ thể sống. Cùng với sự phát triển mạnh mẽ của di truyền học, một lĩnh vực nghiên cứu mới của di truyền học ra đời, đó là kỹ thuật di truyền hay còn gọi là công nghệ gen hoặc công nghệ di truyền (genetic engineering).

Có thể nói, kỹ thuật di truyền là một tập hợp của nhiều kỹ thuật như hóa học, sinh học phân tử, vi sinh vật học,... mà trong đó, vai trò hàng đầu thuộc về các tư duy và phương pháp của di truyền.

Công nghệ di truyền sử dụng các phương pháp sinh học phân tử để tách DNA từ một cơ thể sống và sau đó cắt, nối các gen trên DNA. Bằng cách như vậy, người ta có thể loại bỏ các gen không mong muốn và đưa vào các gen mới đặc hiệu theo chủ ý lựa chọn. Các thao tác cắt, nối trên DNA được thực hiện bên ngoài cơ thể sống trong các ống nghiệm (*in vitro*). Phân tử DNA mới được tạo dựng sau các thao tác cắt, nối có một số đặc điểm khác với phân tử DNA ban đầu được tách ra từ tế bào sống, được gọi là DNA tái tổ hợp và kỹ thuật này được gọi là kỹ thuật tái tổ hợp DNA. Sự tái tổ hợp DNA được đánh giá là thành công chỉ sau khi đưa được phân tử DNA tái tổ hợp vào trong tế bào sống và chúng biểu hiện các hoạt tính di truyền và ở thế hệ con cháu sẽ mang phân tử DNA tái tổ hợp.

Có thể nói: Kỹ thuật di truyền là sự thao tác bộ máy di truyền của một cơ thể sống bằng cách thêm vào hay loại bớt gen đặc hiệu.

1.2- GIAI ĐOẠN DI TRUYỀN SAU MENDEL

Phát minh của Mendel đã đặt nền móng cho di truyền học. Tuy nhiên, ở thời điểm mà Mendel công bố công trình nghiên cứu của mình, một phần do chưa hiểu rõ được cơ chế phân bào, các nhà khoa học chưa thể hiểu và đánh giá đúng mức tầm quan trọng của phát minh này.

Cuối thế kỷ XIX, 5 năm sau ngày công bố công trình của Mendel (1870), các giai đoạn của quá trình phân bào nguyên phân và sau đó, phân bào giảm nhiễm (1890) đã được mô tả một cách chi tiết. Dưới kính hiển vi, các nhà nghiên cứu đã quan sát thấy các nhiễm sắc thể và sự phân chia các nhiễm sắc thể trong quá trình phân bào.

Năm 1902-1903, W.S Sutton, Th. Boveri và một số nhà khoa học khác đã tiến hành các nghiên cứu độc lập, cũng đã phát hiện có sự tương quan đồng điệu giữa sự biểu hiện của nhiễm sắc thể trong phân bào với sự biểu hiện của các tính trạng theo Mendel. Thuật ngữ “gen” do nhà khoa học Đan Mạch W. Johansen nêu ra năm 1909. Học thuyết di truyền nhiễm sắc thể ra đời: Các gen được chứng minh là nằm trên nhiễm sắc thể, chiếm một vị trí xác định, xếp theo đường thẳng và chúng chịu sự phân li như nhiễm sắc thể.

Học thuyết di truyền nhiễm sắc thể đã đưa di truyền học lên một bước phát triển mới. Sự phát triển của di truyền nhiễm sắc thể gắn liền với nhóm nghiên cứu do Morgan lãnh đạo với các nhà di truyền học nổi tiếng như C. Bridges, A.H Sturtevant và G. Muller:

- Việc phát hiện ra sự khác nhau giữa các cá thể đực và cái ở 1 cặp nhiễm sắc thể gọi là nhiễm sắc thể giới tính, là một dữ kiện quan trọng để xây dựng nên học thuyết di truyền nhiễm sắc thể. Các gen nằm trên nhiễm sắc thể giới tính sẽ có sự di truyền khác hơn so với các gen nằm trên nhiễm sắc thể thường. Quy luật di truyền của các gen liên kết với nhiễm sắc thể giới tính đã được xác định.

- Hiện tượng trao đổi chéo giữa các đoạn nhiễm sắc thể tương đồng trong phân bào giảm nhiễm dẫn tới sự sắp xếp lại các gen, từ đó xuất hiện các giao tử dạng mới không giống của cha mẹ, gọi là dạng tái tổ hợp (recombinant). Dựa vào tần số tái tổ hợp ổn định giữa các gen, người ta xây dựng các bản đồ di truyền nhiễm sắc thể.

Học thuyết di truyền nhiễm sắc thể đã củng cố thêm cho học thuyết về gen của Mendel, nhưng nó cụ thể hơn, đồng thời, nó chỉ rõ giới hạn của quy luật phân li độc lập trong học thuyết của Mendel.

Sau chiến tranh thế giới lần thứ hai, di truyền học phân tử đã phát triển rất mạnh mẽ. Năm 1944, O. Avery, Mc. Leod và Mc. Carty đã chứng minh rằng: DNA chính là chất di truyền. Năm 1953, mô hình cấu trúc DNA của Wattson-Crick ra đời, đã tạo một bước ngoặt lớn cho sự phát triển của di truyền học và sinh học.

Năm 1961, M. Nirenberg và J. Matthei đã xác định được bộ mã di truyền đầu tiên và sau đó, toàn bộ các bộ mã di truyền cũng đã được tìm ra.

1.3- SỰ RA ĐỜI CỦA CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN

Kỹ thuật di truyền ra đời vào những năm đầu của thập niên 70 trong thế kỷ 20. Phân tử DNA tái tổ hợp đầu tiên được nhóm các nhà nghiên cứu Mỹ là Berg, Boyer và Cohen tạo ra năm 1972-1973 từ nguồn vật liệu di truyền ban đầu là DNA của virus SV40 gây ung thư ở khỉ được cắt, ghép với DNA của vi khuẩn *E. Coli*. Phân tử DNA mới được tạo ra trong ống nghiệm này đã không được đưa vào vi khuẩn *E. Coli* như đã dự định vì lý do an toàn cho người và

động vật, sợ rằng loài vi khuẩn mới mang gen của virus gây nên ung thư, nếu thoát ra ngoài sẽ gây dịch bệnh mà con người thì chưa có cách điều trị, tai hại là khó lường.

Năm 1973-1974, nhóm các nhà khoa học người Mỹ do Cohen đứng đầu với Helinski, Boyer đã sử dụng plasmid làm nguồn vật liệu cho các nghiên cứu của họ. Plasmid là những phân tử DNA mạch vòng, xoắn kép, ngoài nhân. Plasmid xuất hiện khá phổ biến ở vi khuẩn, mã hóa các gen biểu hiện tính kháng thuốc, kháng kháng sinh ở vi sinh vật - plasmid pSR100 được phân lập và làm sạch. Plasmid này mang gen kháng tetracycline được cắt tại một vị trí bằng enzyme cắt hạn chế EcoRI, vị trí cắt này không nằm trong vùng có chứa các gen cơ bản và nối một đoạn DNA của plasmid R_{6-5d} có chứa gen kháng kanamixin tạo thành một phân tử lai gọi là DNA tái tổ hợp. Như vậy, phân tử DNA tái tổ hợp có chứa hai gen biểu hiện tính kháng tetracycline và kanamixin. Phân tử DNA được tạo dựng trong ống nghiệm này được đưa trở lại vào tế bào *E. Coli*. Kết quả là vi khuẩn *E. Coli* mang plasmid có chứa hai gen kháng thuốc đã có khả năng kháng cả tetracycline và kanamixin, nghĩa là, loài vi khuẩn này có thể phát triển được trên môi trường chọn lọc có chứa cả tetracycline và kanamixin. Một thí nghiệm kiểm tra được bố trí đã khẳng định rằng, loài vi khuẩn mới này mang phân tử DNA tái tổ hợp.

Sau thành công rực rỡ của nghiên cứu trên, nhiều nhà khoa học đã tiến hành các thí nghiệm lắp ghép gen và đã thu được nhiều kết quả ứng dụng được trong thực tiễn.

Từ những năm 1990, sự kết hợp giữa sinh học, công nghệ di truyền và tin học đã cho phép rút ngắn thời gian nghiên cứu và đã thu được nhiều kết quả hoàn hảo hơn.

1.4- Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN

Công nghệ di truyền hiện đang đóng vai trò cơ sở cho những nghiên cứu và ứng dụng của công nghệ sinh học, là mũi nhọn của ngành công nghệ sinh học.

Về ý nghĩa khoa học, có thể nói rằng, sự ra đời của công nghệ di truyền và những thành tựu đạt được đã tạo nên một cuộc cách mạng về nhận thức của con người đối với thế giới sinh học. Ngày nay, con người hiểu rõ hơn về

các cơ chế di truyền và đang từng bước điều khiển chúng để tạo ra các chủng loại sinh vật có lợi cho con người.

Về ý nghĩa thực tiễn, công nghệ di truyền được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu và sản xuất liên quan đến nông nghiệp, công nghệ thực phẩm, y dược, bảo vệ môi trường, ... Không thể liệt kê hết tất cả những kết quả nghiên cứu dựa trên cơ sở của công nghệ di truyền đã được ứng dụng vì tốc độ phát triển nhanh chóng của lĩnh vực công nghệ này, xin giới thiệu một số ví dụ cụ thể như sau:

1.4.1- Trong y dược

Vận dụng kỹ thuật di truyền, các nhà khoa học đã có thể chẩn đoán các bệnh do rối loạn di truyền và tiến tới điều trị bằng cách thay gen bệnh bằng gen lành hay đưa gen lành vào cơ thể để bù đắp cho gen bệnh - đây là một hướng ứng dụng khó thực hiện nhất.

Trong những năm qua, lĩnh vực ứng dụng công nghệ di truyền mạnh nhất trong y tế là ngành sản xuất thuốc kháng sinh, vắc xin, kháng thể đơn dòng và các protein có hoạt tính sinh học. Hiện nay, các nghiên cứu nhằm tìm kiếm các chất kháng sinh mới tăng mạnh do hiện tượng vi sinh vật kháng lại tác dụng của kháng sinh ngày càng nhiều hơn.

Phạm vi ứng dụng của kháng thể đơn dòng trong ngành y tế ngày càng tăng như phân tích miễn dịch, định vị các khối u, phát hiện một số protein có liên quan đến sự hình thành khối u, xác định sự có mặt của các loại vi khuẩn khác nhau, ... giúp cho các bác sĩ xác định bệnh một cách nhanh chóng và chính xác.

Kháng thể đơn dòng là tập hợp các phân tử kháng thể đồng nhất về mặt cấu trúc và tính chất. Kháng thể đơn dòng được tạo ra bằng cách cho lai tế bào lympho trong hệ miễn dịch của động vật hoặc của người với tế bào ung thư. Một số tế bào lai có khả năng tạo ra kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên. Chọn các tế bào đó nhân lên và sản xuất kháng thể đơn dòng. Các tế bào lai có khả năng tăng sinh vĩnh viễn trong môi trường nuôi cấy - tính chất này nhận được từ tế bào ung thư.

Nhờ công nghệ sử dụng DNA tái tổ hợp mà người ta có thể sản xuất một số protein có hoạt tính sinh học dùng để chữa bệnh như insulin chữa bệnh

tiểu đường, interferon chữa bệnh ung thư, các hormon tăng trưởng cho con người. Bản chất của công nghệ này là làm thay đổi bộ máy di truyền của tế bào bằng cách đưa gen mã hóa cho một protein đặc hiệu và bắt nó hoạt động để tạo ra một lượng lớn loại protein mà con người cần.

1.4.2- Trong nông nghiệp

Vấn đề chọn giống có vai trò rất quan trọng trong sản xuất nông nghiệp, nhằm nâng cao sản lượng và chống các loại sâu, bệnh cũng như các điều kiện tự nhiên bất lợi đối với cây trồng và vật nuôi.

Kỹ thuật di truyền được sử dụng để xác định vị trí của các gen mã hóa cho các tính trạng mong muốn, giúp cho việc lai tạo, chọn giống cũng như tạo ra các sinh vật chuyển gen nhanh và hiệu quả cao. Hiện nay, nhiều động vật và thực vật chuyển gen đã ra đời, đáp ứng nhu cầu cho con người.

Cây chuyển gen là cây có mang những gen đặc hiệu mà trước đó nó không có, do con người đã đưa vào nó bằng kỹ thuật di truyền. Các gen được chuyển thường liên quan đến các tính trạng như chịu hạn, chịu mặn, chống được sâu bệnh, ...

1.4.3- Trong công nghệ thực phẩm

Công nghệ lên men là một lĩnh vực quan trọng trong sản xuất thực phẩm. Việc tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng lên men tốt, đem lại hiệu quả cao là rất cần thiết. Các nghiên cứu sử dụng công nghệ di truyền phục vụ cho công nghệ lên men chủ yếu đi vào hai hướng chính là:

- Phân tích di truyền các loại vi sinh vật sử dụng trong quá trình lên men, xác định các gen mã hóa cho các tính trạng mong muốn nhằm tạo ra năng suất và chất lượng sản phẩm lên men.

- Tạo ra các vi sinh vật chuyển gen phục vụ cho các qui trình lên men.

Ví dụ trong sản xuất rượu, ngày nay người ta đã dùng các chủng vi sinh vật có khả năng tạo rượu cao và cho hương vị tốt. Phần lớn các chủng đó được nghiên cứu, tuyển chọn, lai tạo bằng công nghệ di truyền.

Để sản xuất rượu vang, trước đây, người ta phải dùng hai loại vi sinh vật là *S. Cerevisiae* để tạo ra hàm lượng rượu trong dịch lên men và sau đó, sử

dụng *Leuconostos* trong lên men phụ ở quá trình tàng trữ, nhằm nâng cao chất lượng của rượu. Ngày nay, người ta tiến tới dùng một chủng vi sinh vật chuyển gen để thực hiện cả hai quá trình.

Công nghệ di truyền đóng vai trò quan trọng trong việc tuyển chọn và tạo ra các vi sinh vật có hoạt tính enzyme cao, sử dụng trong công nghệ thực phẩm. Đối với các sản phẩm lên men sữa như phomat và sữa chua, trước kia, người ta thường sử dụng những vi sinh vật tự nhiên có mặt trong sữa để lên men, do vậy, người ta khó lòng kiểm soát quá trình lên men và hiệu quả không cao. Ngày nay, với công nghệ di truyền, người ta đã tạo được các chủng mới với các tính chất xác định và đã điều khiển được quá trình lên men theo định hướng mong muốn.

Trong những năm gần đây, bằng cách sử dụng công nghệ di truyền, người ta đã tuyển chọn và tạo ra những chủng vi sinh vật có khả năng tổng hợp các enzyme chịu nhiệt, chịu axit, chịu kiềm tốt để sản xuất enzyme. Enzyme λ -amylase chịu nhiệt đã và đang được sử dụng nhiều để sản xuất nha, đường glucose từ tinh bột.

Ở thời gian đầu, những nghiên cứu của công nghệ di truyền chủ yếu hướng vào những vấn đề sinh học cơ bản thuần túy và cho đến những năm gần đây, ngành công nghệ này đã chuyển thành một ngành công nghiệp trị giá nhiều tỷ USD.

Bên cạnh những ứng dụng cực kỳ to lớn, có lợi cho con người, cũng cần nhìn nhận sự quan tâm, lo lắng chính đáng về các thực phẩm chuyển gen.

Tuy ngày nay, các nhà khoa học đã có thể tổng hợp được các gen nhân tạo hay ghép gen này hay gen kia vào bộ máy di truyền của một sinh vật nào đó, nhưng chắc chắn, còn rất nhiều vấn đề về những bí ẩn của sự sống, nhất là ở các sinh vật bậc cao vẫn chưa được khám phá. Người ta có thể chứng tỏ sự vô hại của các loại thực phẩm từ thực vật, động vật hay vi sinh vật chuyển gen qua các thí nghiệm, nhưng về lâu dài, người ta chưa thể khẳng định được sự vô hại đó, vì vậy, không ít người đã tỏ ra lo lắng khi sử dụng chúng thường xuyên với một số lượng lớn.

CHƯƠNG I

BẢN CHẤT CỦA VẬT CHẤT DI TRUYỀN

1.1- AXIT NUCLEIC - VẬT CHẤT DI TRUYỀN CỦA MỌI SINH VẬT

1.1.1- Thành phần cấu tạo hóa học của axit nucleic

Axit nucleic được F. Miescher phát hiện năm 1869. Có hai loại axit nucleic là axit deoxyribonucleic (DNA) và axit ribonucleic (RNA).

Axit deoxyribonucleic (DNA) là polyme có phân tử lượng lớn, có mặt trong tất cả tế bào sống. DNA tập trung chủ yếu ở các nhiễm sắc thể trong nhân tế bào, ngoài ra còn có một số lượng nhỏ nằm ở ty thể và lục lạp - là các DNA ngoài nhân. Số lượng DNA là không thay đổi trong nhân của các tế bào cùng loài. Axit ribonucleic có mặt cả trong nhân tế bào và trong nguyên sinh chất

1.1.1.1- Thành phần nguyên tố

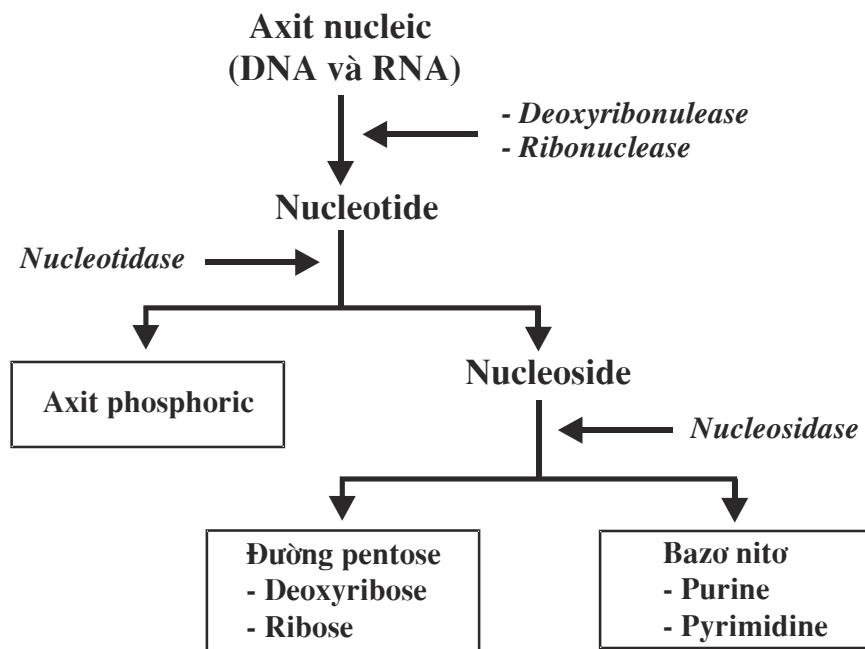
Trong cấu tạo của axit nucleic có 5 nguyên tố hóa học là carbon (C), hydro (H), oxy (O), nitơ (N) và phospho (P). Trong đó, thành phần nitơ thường chiếm khoảng từ 8-10% và phospho là 15-16%.

1.1.1.2- Thành phần cấu tạo hóa học

Phân tử axit nucleic được cấu tạo từ 3 thành phần chính là các bazơ nitơ, đường pentose và axit phosphoric.

Khi thủy phân hoàn toàn axit nucleic bằng enzyme hoặc bằng axit thì thu được ba thành phần chính là bazơ nitơ, đường pentose và axit phosphoric.

Nếu thủy phân từng bước bằng các enzyme thì đầu tiên, enzym ribonuclease cắt liên kết phosphoester, giải phóng các nucleotide - là đơn vị cấu tạo cơ bản của phân tử axit nucleic. Các nucleotide sẽ tiếp tục bị thủy phân dưới tác dụng của các enzyme nucleotidase và nucleosidase để giải phóng axit phosphoric, đường pentose và bazơ nitơ (Hình 1-1).



Hình 1-1: Sơ đồ thủy phân từng bước của axit nucleic

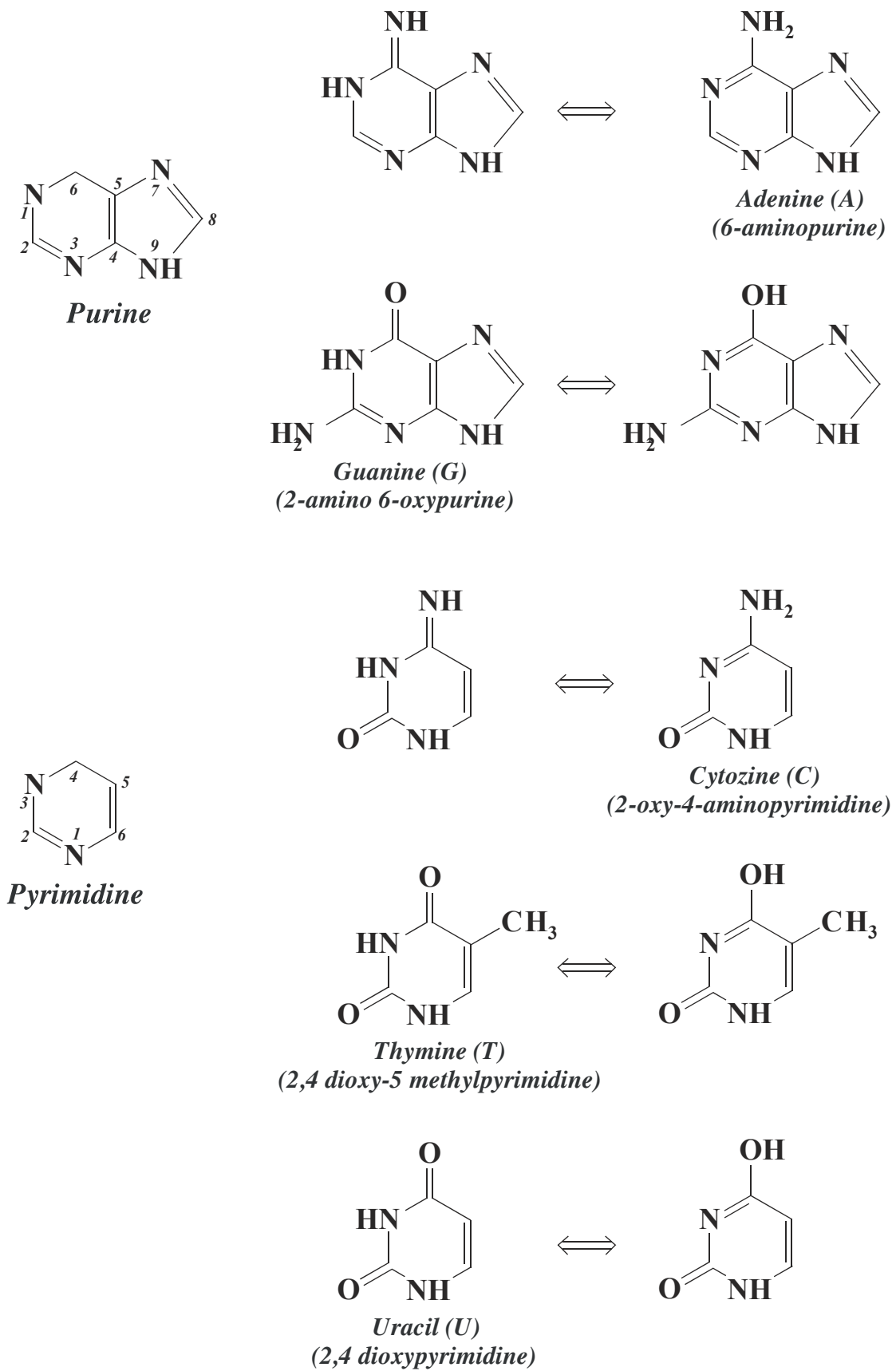
1,- Các bazơ nitơ:

Có 2 nhóm bazơ nitơ là purine và pyrimidine (Hình 1-2):

- Bazơ purine là hợp chất nitơ dị vòng. Vòng purine được nhà hoá học Đức E. Fischer gọi lần đầu tiên, trong đó, bao gồm một vòng pyrimidine và một vòng imidazol ghép lại. Các bazơ có nhân purine là adenine (A) và guanine (G). Mỗi bazơ đều có 2 dạng đồng phân. Một dẫn xuất quan trọng của bazơ adenine là hypoxanthine. Hypoxanthine được tạo thành khi nhóm $-NH_2$ của adenine được thay bằng nhóm $-OH$. Hypoxanthine có ý nghĩa quan trọng trong quá trình trao đổi chất của tế bào sống.

- Bazơ pyrimidine là một vòng 6 cạnh có chứa hai nguyên tử nitơ. Các bazơ có nhân pyrimidine là cytosine (C) và thymine (T).

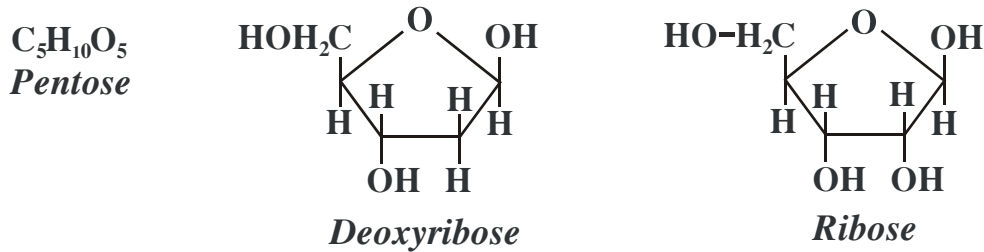
Trong điều kiện sinh lý, guanine và thymine thường tồn tại ở dạng ceton. Đôi khi, bazơ cytosine còn gặp dưới dạng 5-methyl cytosine, còn adenine và cytosine thường tồn tại dưới dạng amin.



Hình 1-2: Công thức cấu tạo của các bazơ nitơ

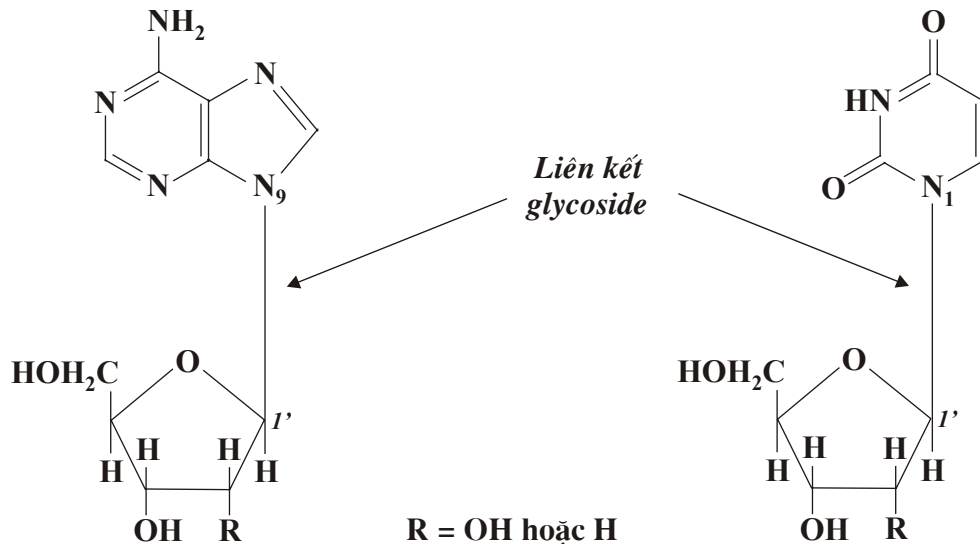
2,- Đường pentose:

Trong DNA có chứa gốc đường deoxyribose, trong RNA chứa gốc đường ribose nằm dưới dạng vòng, có công thức cấu tạo là:



1.1.1.3- Nucleoside và nucleotide

1,- Nucleoside:



Hình 1-3: Liên kết glycoside giữa bazơ nitơ và đường pentose

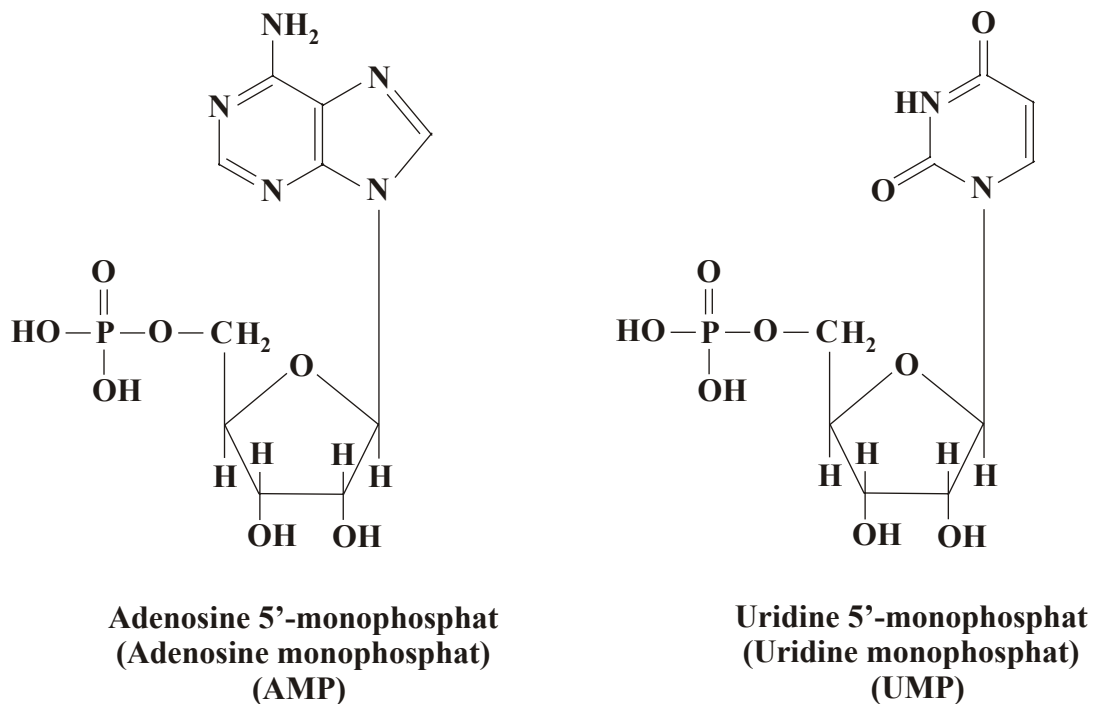
Khi một bazơ nitơ liên kết với phân tử đường pentose bằng liên kết β ,N-glycoside sẽ tạo thành một nucleoside. Liên kết β ,N-glycoside này hình thành giữa nguyên tử carbon thứ nhất (C_1) của đường pentose với nguyên tử thứ 9 (N_9) của bazơ purine hoặc với nguyên tử thứ nhất (N_1) của bazơ pyrimidine.

- Nucleoside của bazơ pyrimidine với đường ribose mang tên của bazơ và có đuôi là “-idine” (thymidine, uridine, cytidine).

- Nucleoside của bazơ purin với đường ribose mang tên của bazơ và có đuôi là “-osine” (adenosine, guanosine).

- Khi bazơ nitơ liên kết với đường deoxyribose thì có thêm tiếp đầu ngữ “deoxy-“ (deoxyadenosine, deoxyguanosine, deoxycytisine). Riêng bazơ thymine chỉ có mặt trong DNA nên gốc đường trong nucleoside luôn là deoxyribose, trong trường hợp này, nhiều khi người ta không cần gọi thêm tiếp đầu ngữ “deoxy-“, mà chỉ gọi một cách đơn giản là thymidine.

2,- Nucleotide:



Hình 1-4: Sơ đồ AMP và UMP

Nucleotide là ester phosphat của nucleoside. Axit phosphoric tạo liên kết ester với một nguyên tử carbon nào đó của đường (thường là ở C₅), tạo thành nucleotide (Hình 1-4).

Các nucleotide là đơn vị cấu tạo của axit nucleic, phân tử DNA được cấu tạo nên từ 4 loại nucleotide: dAMP, dGMP, dCMP và dTMP.

Nucleotide đóng vai trò sinh học quan trọng. Ngoài chức năng cấu tạo nên vật chất di truyền, chúng còn có mặt trong các coenzyme, xúc tác nhiều phản ứng hóa học trong tế bào như các coenzyme NAD, FAD, FMN và coenzyme A.

Bảng 1-1: Tên gọi và chữ viết tắt của một số nucleotide

Tên gọi	Ký hiệu
Adenozine 5'-monophosphat (axit adenyllic)	AMP
Guanosine 5'-monophosphat (axit guanylic)	GMP
Cytidine 5'-monophosphat (axit cytidylic)	CMP
Uridine 5'-monophosphat (axit thymidylic)	UMP
Deoxyadenosine 5'-monophosphat (axit deoxyadenylic)	dAMP
Deoxyguanosine 5'-monophosphat (axit deoxyadenylic)	dGMP
Deoxycytidine 5'-monophosphat (axit deoxycytidylic)	dCMP
Deoxythymidine 5'-monophosphat (axit deoxythymidylic)	dTMP

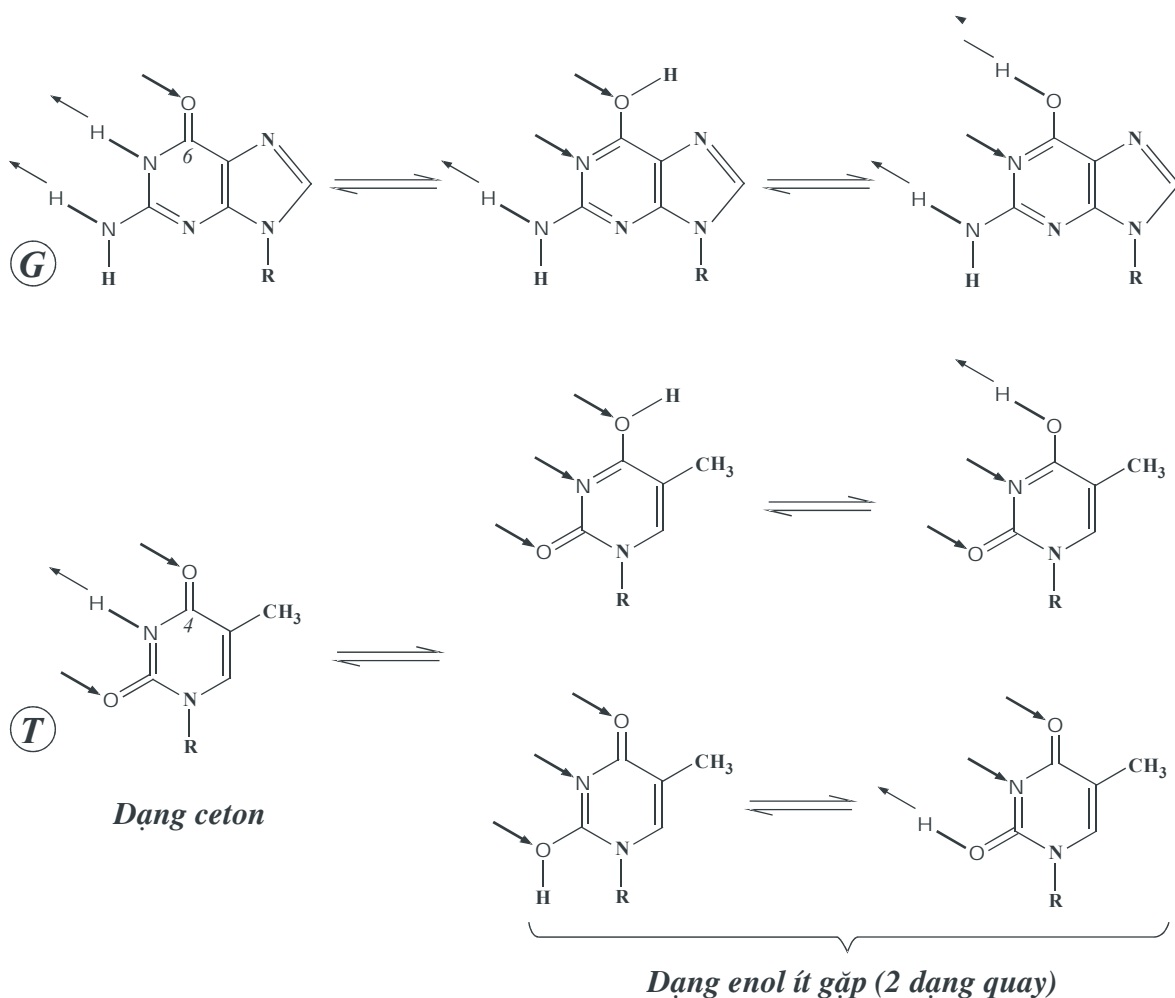
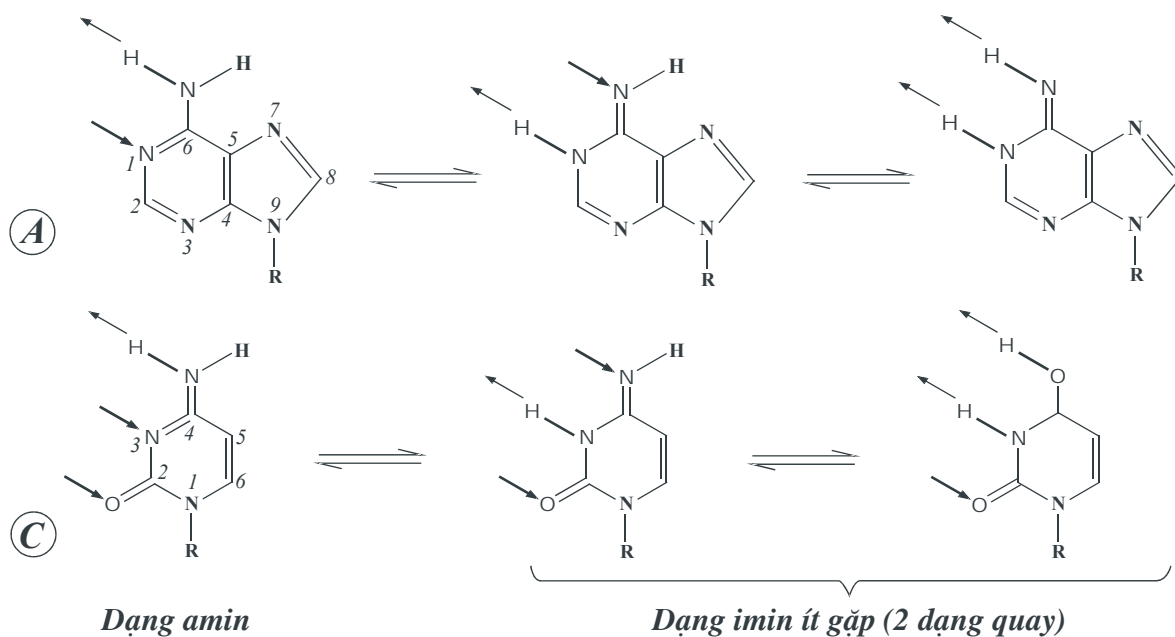
1.1.2- Cấu trúc phân tử DNA

1.1.2.1- Đặc điểm cấu tạo

Axit deoxyribonucleic (DNA) là phân tử mang thông tin di truyền của tế bào sống mà trong đó, gen là đơn vị di truyền cơ bản.

DNA được xây dựng từ 4 loại nucleotide: dAMP, dGMP, dCMP và dTMP. Gốc đường trong các nucleotide này là deoxyribose. DNA là một polynucleotide, các nucleotide nối với nhau bằng liên kết 3',5' phosphodiester. Hai liên kết ester được hình thành giữa gốc phosphat với carbon thứ 3 của nucleotide này và carbon thứ 5 của nucleotide nằm kề nó (Hình 1-5).

Phân tử DNA bao gồm hai sợi polynucleotide ngược chiều nhau, bazơ purine của sợi polynucleotide này nằm đối diện với bazơ pyrimidine của sợi polynucleotide kia theo quy luật bổ sung nghiêm ngặt: adenine đứng đối diện với thymine (A-T) và guanine đứng đối diện với cytosine (G-C). Hai sợi polynucleotide được giữ vững và ổn định nhờ các liên kết hydro giữa các bazơ nitơ của hai mạch (Hình 1-5).



Hình 1-5: Vị trí có thể hình thành liên kết hydro của các dạng bazơ nitơ

\rightleftharpoons *Hướng chuyển dịch điện tử trong liên kết hydro*

Quy luật liên kết bổ sung giữa hai loại bazơ nitơ do E. Chargaff phát hiện. Khi nghiên cứu thành phần các bazơ nitơ trong phân tử axit nucleic, ông thấy rằng: Số bazơ adenine luôn bằng thymine và số bazơ guanine luôn bằng cytosine. Quy tắc này được gọi là quy tắc Chargaff:

$$A = T \text{ và } G = C \text{ hay } \frac{A+G}{T+C} = 1$$

Về sau, các nhà nghiên cứu thấy rằng: số lượng các cặp bazơ A–T và G–C rất khác nhau ở mỗi loài nên quy tắc này được bổ sung nội dung sau:

Tỷ lệ (A+T)/(G+C) là tùy theo loài

Một đặc điểm rất quan trọng của các bazơ nitơ như đã nêu ở phần trên là chúng có các dạng đồng phân. Nếu xét về góc độ hoá học thuần túy, dựa vào khả năng cho và nhận điện tử của các nguyên tử trong các loại bazơ nitơ (Hình 1-5), thì khi thay đổi dạng đồng phân, bazơ adenine có thể tạo liên kết hydro với cả bazơ thymine (A–T) và cytosine (A–C), tương tự như vậy, bazơ guanine cũng có thể tạo liên kết với cytosine (G–C) và thymine (G–T).

Trong điều kiện sinh lý của tế bào, người ta thấy, bazơ adenine và cytosine thường nằm dưới dạng amino, nghĩa là, nguyên tử nitơ gắn với vòng purine và pyrimidine luôn có hai nguyên tử nitơ ($-NH_2$), rất ít khi gặp ở dạng imin ($-NH$). Tương tự như vậy, ở bazơ guanine và thymine, nguyên tử oxy gắn ở carbon thứ 6 của vòng purine và pyrimidine luôn nằm dưới dạng ceton ($C=O$) và rất ít khi gặp ở dạng enol ($C-OH$) (Hình 1-5). Như vậy, vị trí của nguyên tử hydro ở các nhóm thế trên là hết sức quan trọng. Nếu nguyên tử hydro không cố định vị trí thì sẽ dẫn đến sự bắt cặp nhầm giữa A–C và G–T, làm thay đổi trình tự sắp xếp và thành phần các bazơ nitơ trên các sợi polynucleotide. Nếu trường hợp này xảy ra thì bộ máy di truyền sẽ bị biến động, phân tử DNA của thể hệ này sẽ khác thể hệ trước. Tuy nhiên, tế bào cơ thể sống luôn có cách kiểm soát thích hợp để đảm bảo bộ máy di truyền ổn định từ thể hệ này qua thể hệ khác, về vấn đề này, chúng ta sẽ xem xét ở phần sau.

1.1.2.2- *Cấu trúc bậc II - Mô hình Watson và Crick*

Năm 1953, Watson và Crick đã khám phá ra mô hình cấu trúc phân tử DNA - đây là một phát minh quan trọng của thế kỷ XX, đánh dấu một bước ngoặt cho sự phát triển của di truyền học. Watson và Crick đã được trao giải thưởng Nobel năm 1962.

Theo Watson và Crick, mô hình cấu tạo không gian của DNA có những đặc điểm chính sau:

- Phân DNA gồm hai sợi polynucleotide sắp xếp theo hai hướng ngược chiều nhau (đối song song): sợi bên này có đầu 3'-OH thì sợi bên kia sẽ là 5'-P.

- Hai sợi cùng xoắn (xoắn đôi) xung quanh một trục chung.

- Các bazơ nitơ của hai sợi nằm quay vào trong. Bazơ của sợi này đứng đối diện với bazơ của sợi kia theo quy luật bổ sung A đối diện T và G đối diện C. A nối với T bằng hai liên kết hydro, G nối với C bằng 3 liên kết hydro.

- Nhóm phosphat và gốc đường trong chuỗi polynucleotide xoay ra ngoài, hình thành liên kết với nước, đảm bảo tính ổn định cho phân tử.

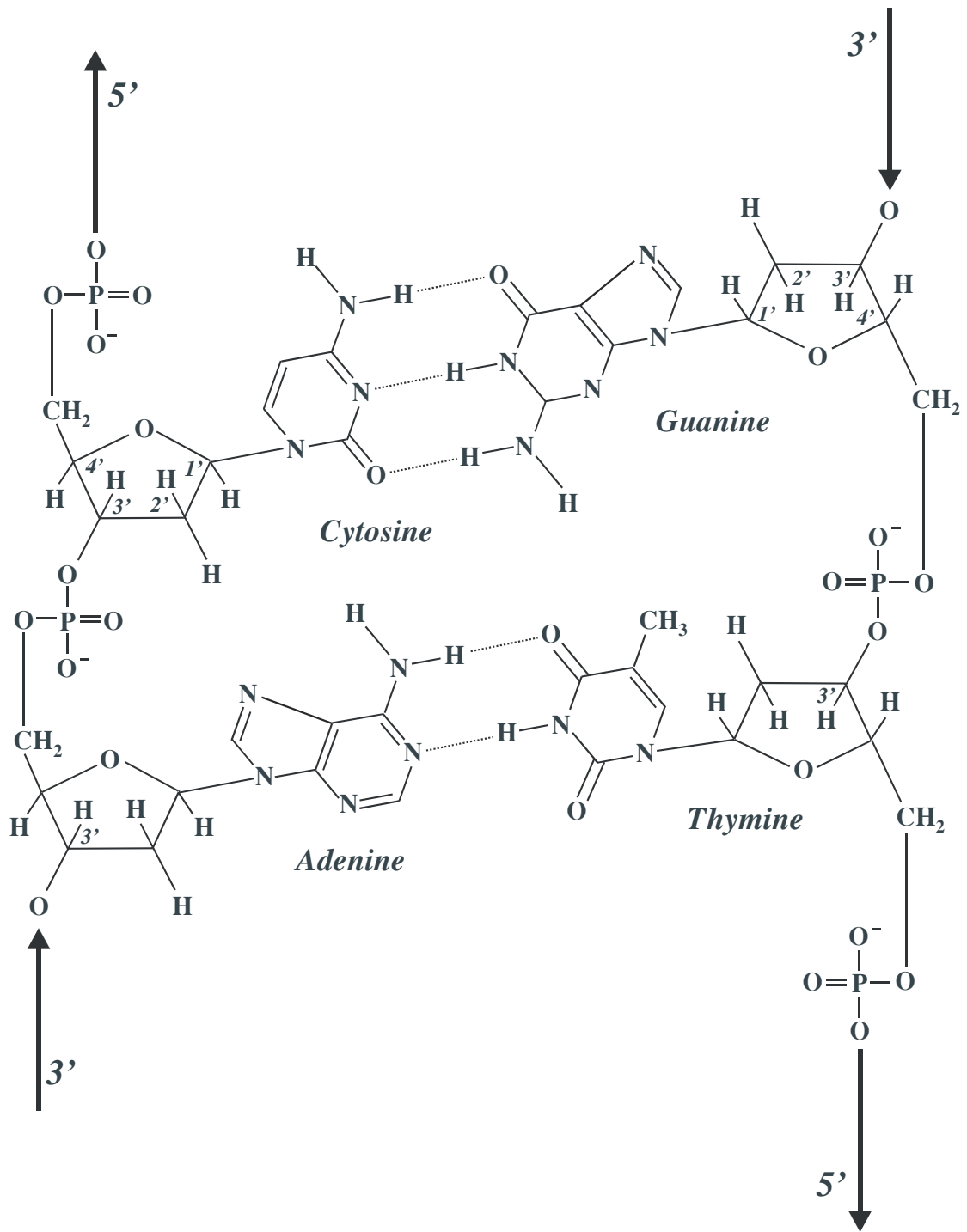
- Mỗi vòng xoắn ốc tương ứng với 10 cặp bazơ, chiều cao của mỗi vòng xoắn ốc là 34Å ($1\text{Å} = 10^{-10}\text{ m}$). Như vậy, chiều cao của mỗi nucleotide là 3,4Å, đường kính trong là 20Å (Hình 1-6).

1.1.2.3- *Các dạng cấu trúc của DNA*

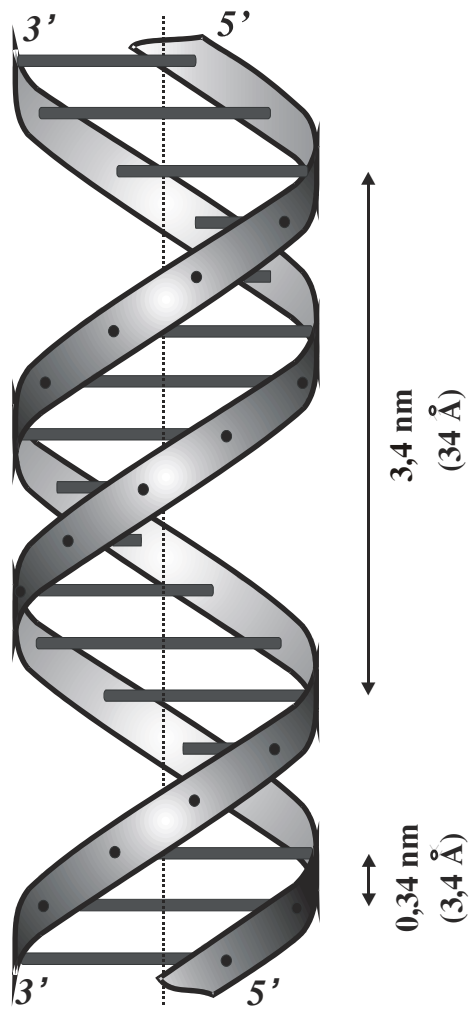
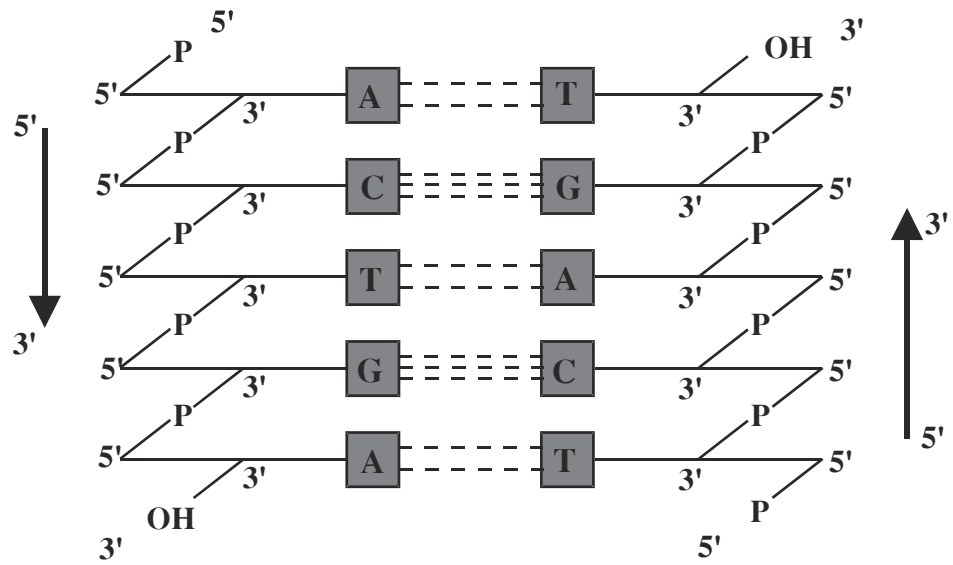
Phân tử DNA ở sinh vật eucaryote có dạng thẳng, còn phân tử lớn tế bào procaryote có dạng vòng. Tuy nhiên, dù vòng hay thẳng, các DNA đều có cấu tạo cuộn xoắn.

+ Dạng thẳng:

Phân tử gồm hai sợi xoắn kép, đối song song, mỗi sợi đều có đầu 3'-OH và 5'-Phosphat tự do.



Hình 1-6: Cấu tạo của 2 sợi polynucleotide và sự bắt cặp bổ sung của các bazơ nitơ



Hình 1-7: Mô hình cấu trúc phân tử DNA

Ngày nay, người ta đã phát hiện và mô tả được 6 loại cấu trúc xoắn đôi của DNA là A, B, C, D, E và Z. Sự khác nhau giữa các loại được thể hiện chủ yếu ở những đặc điểm sau:

- Chiều xoắn (xoắn phải hoặc xoắn trái),
- Số lượng đôi bazơ trong mỗi vòng xoắn,
- Khoảng cách giữa mỗi đôi bazơ,
- Khoảng cách lớn nhất giữa mỗi sợi.

Loại B là loại hay gặp nhất trong điều kiện sinh lý và là loại đúng theo mô hình của Watson và Crick, có chiều xoắn phải.

Loại Z được tìm thấy trong nhiễm sắc thể của ruồi dấm, có chiều xoắn trái và 12 đôi bazơ trong mỗi vòng xoắn.

Loại A được tìm thấy trong môi trường chứa nhiều ion natri hay canxi, có chiều xoắn phải và có 11 đôi bazơ trong mỗi vòng xoắn.

Loại C, D và E không có mặt trong cơ thể sống.

+ Dạng vòng:

Phân tử hình tròn, xoắn. Có thể gặp dạng xoắn đơn vòng như DNA và một số virus hay dạng xoắn đôi của DNA vi khuẩn.

1.1.3- Tính chất của DNA

Dung dịch DNA có tính keo do phân tử lớn và có tính axit do có chứa gốc axit phosphoric.

Dưới tác dụng của các tác nhân như nhiệt hay các chất hóa học (formamide, urê), hai sợi đơn của phân tử DNA bị tách rời do các liên kết hydro giữa các bazơ bổ sung bị phá vỡ - hiện tượng này gọi là sự biến tính của DNA. Giá trị trung bình của khoảng nhiệt độ trong quá trình biến tính gọi là nhiệt độ nóng chảy của DNA (T_m - melting Temperature). Sau khi hai mạch đơn của phân tử DNA tách rời ra, nếu ta giảm nhiệt độ từ từ, cộng với điều kiện thích hợp thì hai mạch sẽ bắt cặp trở lại - hiện tượng này gọi là sự hồi tính. Nếu ta giảm nhiệt độ một cách đột ngột thì sự bắt cặp trở lại sẽ không diễn ra.

Các nucleotide trong DNA hấp thụ tia cực tím với độ dài bước sóng tối đa là 260nm. Do vậy, khả năng hấp thụ tia cực tím của hai sợi đơn sẽ lớn hơn một sợi kép.

DNA bị thủy phân dưới tác dụng của các enzyme nuclease.

1.1.4- Các thí nghiệm chứng minh DNA là vật chất di truyền

1.1.4.1- Các chứng minh gián tiếp

Trước đây, người ta cho rằng, protein là vật chất di truyền, quan niệm này vẫn còn tồn tại cho đến những năm đầu của thế kỷ XX. Sau khi phát hiện ra axit nucleic (1869) và nhà hóa học Đức R. Feulgen tìm ra phương pháp nhuộm màu đặc hiệu với axit nucleic (1914), thì rất nhiều kết quả nghiên cứu về axit nucleic đã làm sáng tỏ rằng, DNA mới là vật chất di truyền chứ không phải là protein.

Những phát hiện sau đây gián tiếp cho thấy DNA là vật chất di truyền:

- DNA có mặt trong tất cả các tế bào sống, từ vi sinh vật, thực vật cho đến các động vật bậc cao.
- DNA là thành phần chủ yếu của các nhiễm sắc thể trong nhân tế bào.
- Hàm lượng DNA trong tất cả các tế bào dinh dưỡng (tế bào soma) của một loại sinh vật bất kỳ nào đều giống nhau, không phụ thuộc vào trạng thái hay chức năng của chúng. Ngược lại, hàm lượng RNA và protein lại thay đổi tùy theo trạng thái sinh lý.
- Khi gây đột biến bằng tia tử ngoại, người ta thấy hiệu quả gây đột biến cao nhất là ở bước sóng 260nm, là bước sóng mà DNA hấp thụ cao nhất.
- Số lượng DNA trong các tế bào sinh dục (trứng, tinh trùng, noãn, phấn hoa, ...) bằng một nửa số lượng DNA trong tế bào dinh dưỡng của cơ thể.

1.1.4.2- Thí nghiệm của Griffith và Oswald Avery

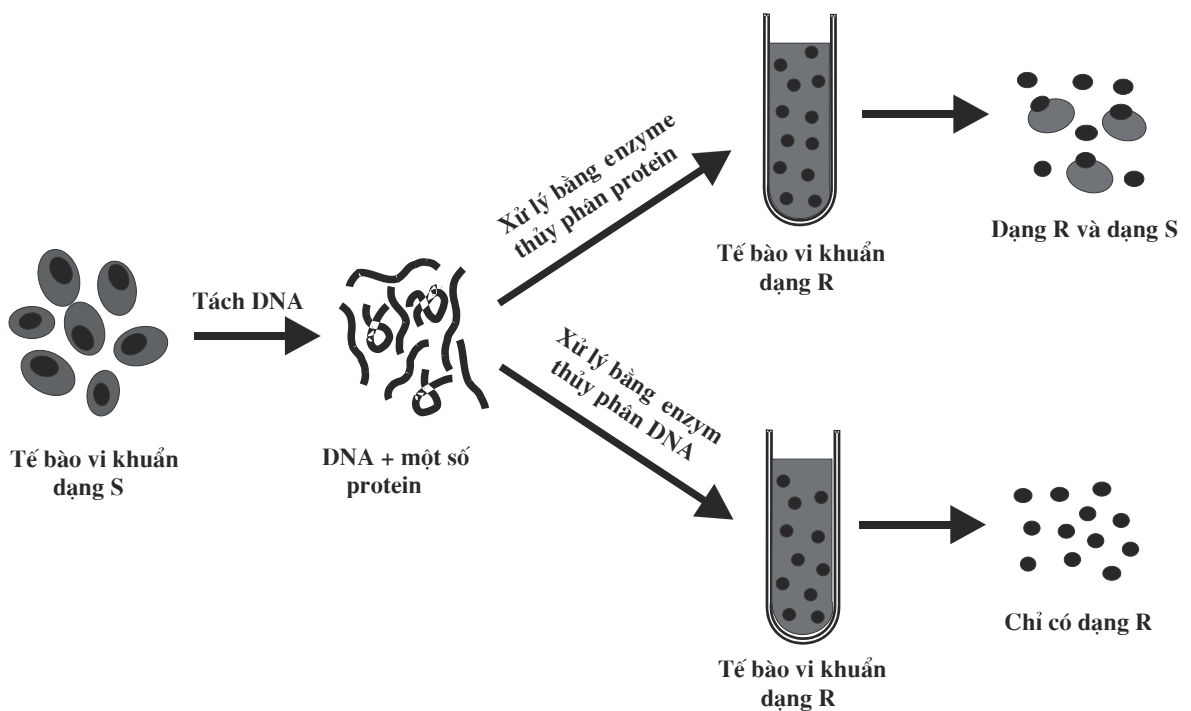
Năm 1928, Griffith đã phát hiện ra hiện tượng biến nạp (transformation) ở vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* gây bệnh sung phổi ở động vật có vú. Vi khuẩn này có hai dạng khác nhau:

- Dạng S (Smooth) có khuẩn lạc láng trên môi trường thạch. Tế bào của vi khuẩn dạng này có vỏ bao (capsule) nên hệ thống miễn dịch của cơ thể động vật không thể tấn công tiêu diệt được, vì vậy, khi xâm nhập vào cơ thể, chúng gây nên bệnh sung phổi.

- Dạng R (Rough) có khuẩn lạc nhẵn, tế bào của chúng không có vỏ bao, nên khi xâm nhập vào cơ thể động vật, chúng sẽ bị hệ thống miễn dịch của động vật tiêu diệt, không gây nên bệnh.

Griffith đã phát hiện ra rằng, nếu tiêm dịch vi khuẩn dạng S đã đun sôi đến chết vào chuột thì chuột không bị bệnh. Nhưng khi tiêm vào chuột hỗn hợp bao gồm một lượng nhỏ vi khuẩn sống dạng R với một lượng lớn tế bào vi khuẩn dạng S đã đun chết, thì chuột phát bệnh và chết. Lấy máu của chuột chết vì bệnh này đưa vào môi trường nuôi cấy, ông thấy sự có mặt của vi khuẩn dạng S. Như vậy, vi khuẩn dạng S không thể tự sống trở lại sau khi bị đun đến chết được, nhưng các tế bào chết này đã truyền tính gây bệnh cho tế bào sống dạng R. Hiện tượng này gọi là biến nạp.

Năm 1944, Oswald Avery, Colin Mc. Leod và Maclyn Mc. Carty đã xác định tác nhân gây biến nạp bằng thí nghiệm theo sơ đồ như Hình 1-8.



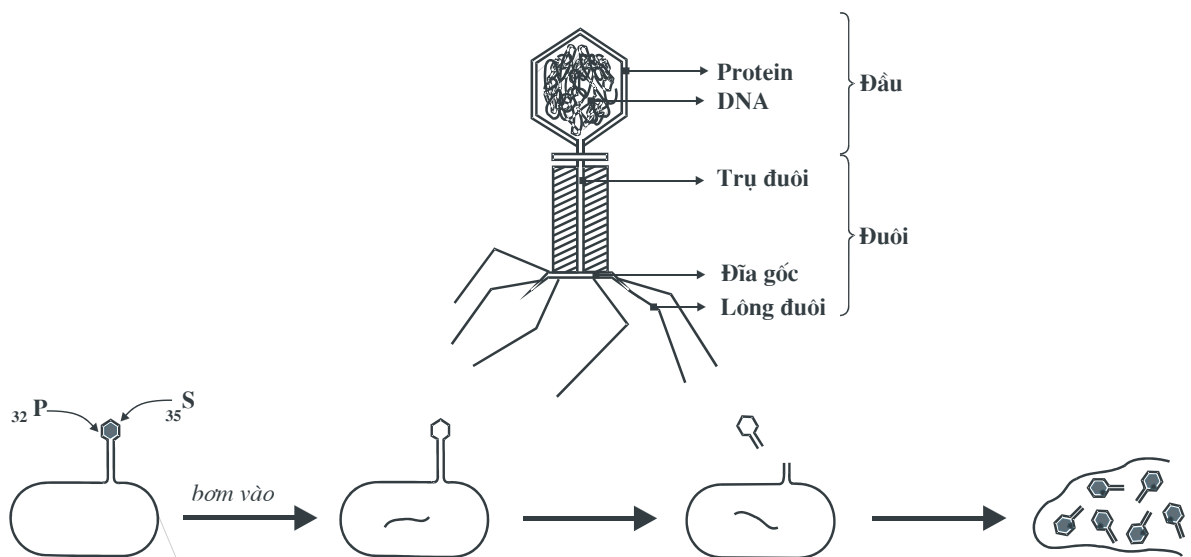
Hình 1-8: Sơ đồ thí nghiệm của Oswald Avery, Colin Mc. Leod và Maclyn Mc. Carty

DNA của tế bào vi khuẩn gây bệnh dạng S được tách và làm sạch. Mặc dù đã tách và làm sạch nhưng sản phẩm thu nhận được vẫn còn một ít protein. Giả thiết, nếu protein là tác nhân gây biến nạp thì sau khi xử lý loại bỏ protein bằng enzyme protease và phối trộn với tế bào sống dạng R, thì hiện tượng biến nạp sẽ không xảy ra. Ngược lại, nếu tác nhân biến nạp là DNA thì sau khi loại bỏ DNA bằng enzyme deoxyribonuclease và phối trộn với tế bào sống dạng R thì cũng sẽ không xuất hiện hiện tượng biến nạp.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, hiện tượng biến nạp chỉ tìm thấy khi có mặt DNA, còn ở trường hợp DNA bị enzyme phá hủy thì không xuất hiện hiện tượng biến nạp. Điều đó khẳng định rằng, chính DNA là tác nhân gây biến nạp, truyền tính gây bệnh từ tế bào dạng S sang tế bào dạng R của vi khuẩn.

1.1.4.3- *Thí nghiệm của A. Hershey và M. Chase*

Năm 1952, bằng thí nghiệm về sự xâm nhập của virus bacteriophage T₂ (gọi tắt là phage) vào vi khuẩn *E. Coli*, Alfred Hershey và Martha Chase đã chứng minh trực tiếp rằng, DNA chính là vật chất di truyền.



Hình 1-9: Sơ đồ về sự xâm nhập của virus phage T₂

Phage T₂ có cấu tạo gồm 2 thành phần chính, vỏ protein bên ngoài và DNA ở bên trong phần đầu, tỷ lệ giữa 2 thành phần này là tương đương. Khi xâm nhập vào vi khuẩn, người ta xác định rằng: đầu tiên, phần đuôi của phage bám vào màng tế bào của vi khuẩn, sau đó, một phần chất nào đó được bơm

vào tế bào vi khuẩn và sau một thời gian, rất nhiều tế bào virus mới được tạo thành bên trong tế bào của vi khuẩn và chui ra ngoài.

Thí nghiệm của A. Hershey và M. Chase được tiến hành với mục đích xác định xem, chất nào của phage được bơm vào tế bào vi khuẩn để tạo ra các thế hệ phage mới.

Dựa vào thành phần cấu tạo của DNA và protein, người ta thấy rằng: DNA chứa nhiều phospho nhưng không chứa lưu huỳnh, còn protein thì chứa lưu huỳnh. Vì vậy họ đã sử dụng 2 đồng vị phóng xạ là S^{35} và P^{32} để gắn vào protein và DNA của phage T_2 nhằm dễ dàng theo dõi. Tiến trình thí nghiệm gồm các bước sau:

- Tạo ra một thế hệ phage T_2 có protein chứa S^{35} và có DNA chứa P^{32} bằng cách nuôi vi khuẩn *E. Coli* trên môi trường có S^{35} và P^{32} . Thế hệ phage T_2 mới tạo thành sẽ mang đồng vị phóng xạ S^{35} và P^{32} .

- Tách virus đã mang đồng vị phóng xạ.

- Cho virus mang đồng vị phóng xạ xâm nhập vào tế bào vi khuẩn *E. Coli* không mang đồng vị phóng xạ. Bước này thực hiện bằng cách cho phage T_2 tiếp xúc với tế bào vi khuẩn trong khoảng thời gian đủ để virus bám vào màng tế bào của vi khuẩn và bơm vật chất di truyền của chúng vào trong tế bào, rồi dung dịch được lắc mạnh và li tâm để tách rời tế bào vi khuẩn ra khỏi phần còn lại của phage bên ngoài tế bào.

- Phân tích thành phần phóng xạ ở phần nằm ngoài tế bào vi khuẩn của phage và phần nằm bên trong tế bào vi khuẩn.

Kết quả cho thấy: Phần nằm ngoài tế bào vi khuẩn của phage có chứa nhiều S^{35} (80%) nhưng rất ít P^{32} . Điều đó cho thấy rằng, phần lớn protein của vỏ phage nằm ngoài tế bào vi khuẩn. Ngược lại, phần bên trong tế bào vi khuẩn có chứa nhiều P^{32} (70%), nhưng ít S^{35} , chứng tỏ rằng, DNA được bơm vào tế bào vi khuẩn để sinh sản ra một thế hệ phage mới.

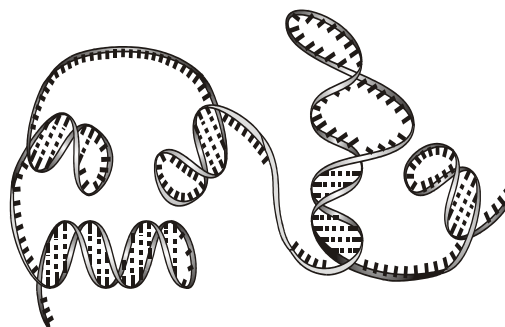
Từ các kết quả thí nghiệm đi đến kết luận: Vật chất di truyền của phage T_2 là DNA.

1.2- CÁC RNA

1.2.1- Cấu tạo hóa học và đặc điểm chung của RNA

Axit ribonucleic (RNA) cũng là một axit nucleic. Hai đặc điểm cơ bản về cấu tạo, phân biệt giữa axit ribonucleic và axit deoxyribonucleic là cấu tử đường và bazơ nitơ. Trong phân tử RNA có chứa đường ribose, còn trong DNA có chứa đường deoxyribose. Thành phần các bazơ pyrimidine trong RNA và DNA cũng khác nhau. DNA chứa cytosine và thymine, không bao giờ có uracil, ngược lại, RNA chứa cytosine và uracil, không khi nào có thymine. Ngoài ra, trong RNA có nhiều bazơ thứ yếu (các bazơ nitơ ít gặp) hơn trong DNA.

Đơn vị cơ bản xây dựng nên RNA cũng là các nucleotide. Các nucleotide liên kết với nhau cũng bằng liên kết 3'-5'-phosphodiester để tạo thành phân tử polynucleotide như DNA. Về cấu trúc phân tử, RNA có cấu trúc mạch đơn chứ không phải là mạch kép như DNA. Cấu trúc bậc I của RNA xác định trật tự sắp xếp các gốc nucleotide trong chuỗi polynucleotide.



Hình 1-10: Mô hình biểu diễn khả năng tạo thành cấu trúc xoắn đôi ở những đoạn RNA có các trình tự bazơ bổ sung

Cấu trúc bậc II của RNA cũng là xoắn nhưng khác với DNA, phân tử RNA là một chuỗi polynucleotide liên tục nên cấu tạo xoắn chỉ thực hiện trong phạm vi một phân tử. Khi đó, chuỗi polynucleotide tạo cấu trúc xoắn bằng cách tạo nên các liên kết hydro giữa adenine và uracil (A–U) và giữa guanine và cytosine (G–C). Trong cấu trúc bậc II của RNA, chỉ có khoảng 50% chuỗi polynucleotide của phân tử RNA được xoắn, còn các phần khác thì không. Hơn nữa, cấu hình của các đoạn xoắn cũng chưa hoàn thiện như ở DNA. Do không có sự tương ứng hoàn toàn trong trật tự của các bazơ bổ sung nên một số mắt xích nucleotide riêng lẻ có dạng vòm lồi.

RNA nằm trong bào tương, trong ribosome và cả trong nhân tế bào, nhưng tập trung chủ yếu trong bào tương.

1.2.2- Các loại RNA

1.2.2.1- *RNA thông tin* (mRNA)

RNA thông tin (messenger RNA) được tổng hợp trong nhân tế bào trên khuôn của DNA nên chúng chứa một lượng lớn thông tin cần thiết cho sự tổng hợp các protein đặc hiệu khác nhau. Độ lớn của mRNA phụ thuộc vào độ lớn của protein cần tổng hợp, như vậy, các phân tử mRNA của một tế bào có kích thước rất khác nhau và trình tự nucleotide của các RNA thông tin cũng rất khác nhau. Sau khi được tổng hợp ở nhân tế bào, mRNA sẽ chuyển từ nhân đến ribosome, mang những thông tin cần thiết cho quá trình tổng hợp protein.

Sơ đồ cấu trúc chung của các phân tử mRNA có thể chia làm ba đoạn: ở đầu 5' có đoạn dẫn đầu, tiếp sau là đoạn mã hóa protein và đoạn theo sau, đoạn dẫn đầu và đoạn theo sau không mang mã cho các axit amin.

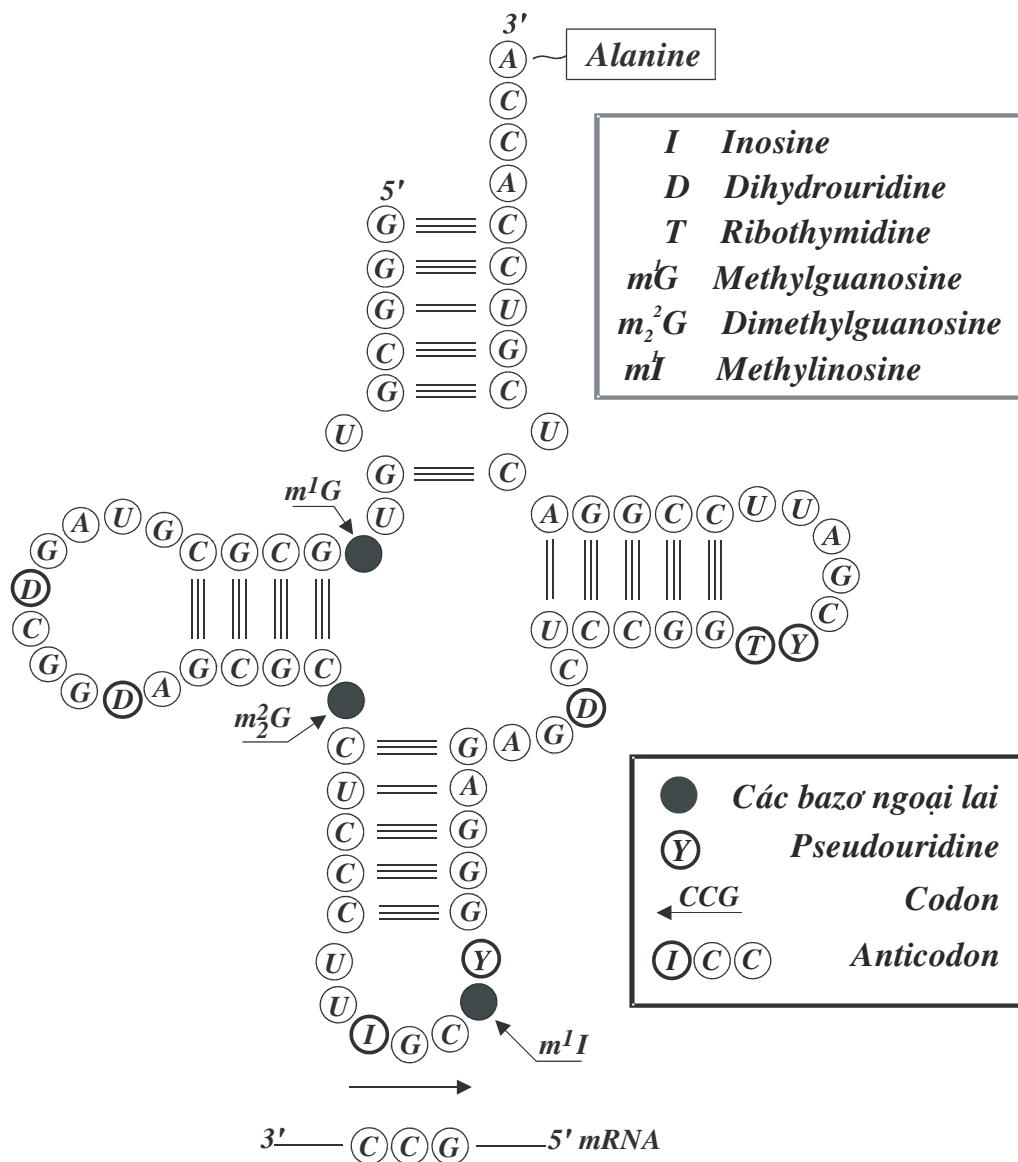


Hình 1-11: Sơ đồ cấu trúc chung của phân tử mRNA

1.2.2.2- *RNA vận chuyển* (tRNA)

tRNA (transfer RNA) làm nhiệm vụ vận chuyển các axit amin đã được hoạt hóa đến ribosome là nơi tổng hợp nên phân tử protein. tRNA chiếm khoảng từ 10% đến 20% tổng lượng RNA của tế bào, và có trọng lượng phân tử không lớn lắm, nó chỉ chứa khoảng từ 75 đến 90 nucleotide. Ngày nay, người ta đã xác định được thành phần và trật tự sắp xếp của hơn 100 tRNA.

Mỗi axit amin trong 20 axit amin, có thể kết hợp với một hoặc một số dạng tRNA. Điểm khác trong cấu tạo của tRNA là, ngoài bốn bazơ nitơ thông thường là A, G, C và U, nó còn chứa một lượng nhỏ các bazơ bổ sung phụ như 6-methylaminadenine, dimethylguanine, inosine, ...

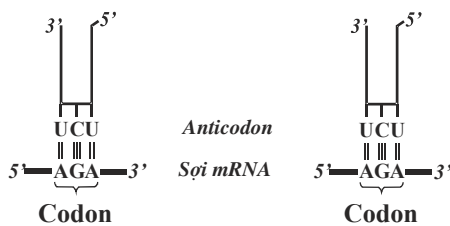
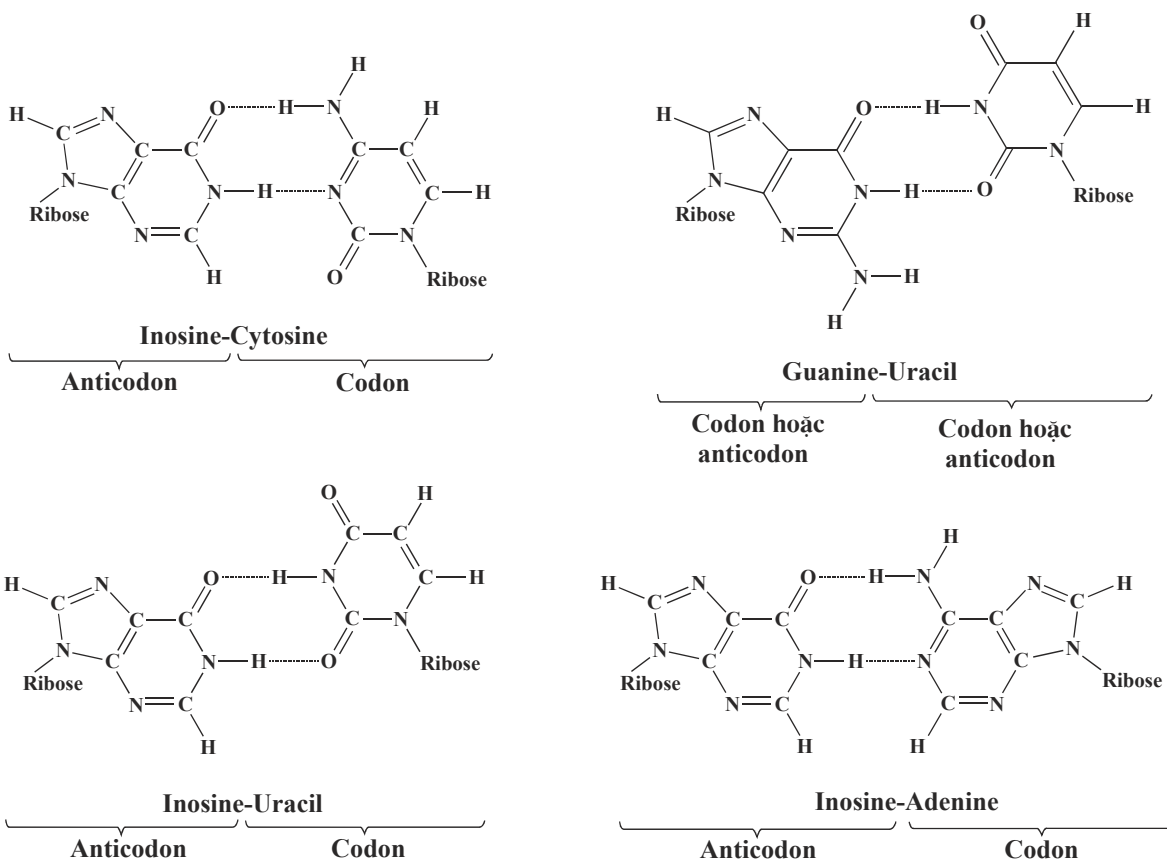


Hình 1-12: Mô hình cấu tạo RNA vận chuyển alanine của nấm men

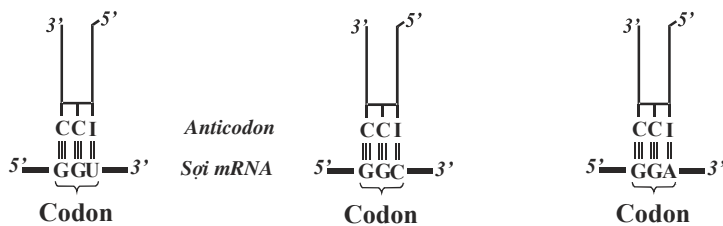
Có thể tóm tắt một số điểm chính về cấu tạo của phân tử tRNA như:

- Ở đầu 3' của phân tử luôn kết thúc bằng bộ ba CCA, còn ở đầu 5'-(nhóm monophosphat) thường kết thúc bằng gốc axit guanilic (G). Ở mỗi phân tử thường có bốn đoạn có chứa các liên kết hydro giữa các bazơ bổ sung và 4 vùng lồi, ở đó, giữa các nucleotide không có liên kết hydro vì các bazơ không có cặp bổ sung.

- Đầu 3' kết thúc bằng 3 nucleotide CCA–OH. Phân tử aminoaxit luôn luôn gắn ở đầu 3' ở bazơ A cuối.



Bazơ U của anticodon có thể liên kết với bazơ A hoặc G của codon



Bazơ I của anticodon có thể liên kết với bazơ U, C hoặc A của codon

Hình 1-13: Sự hình thành liên kết hydro giữa nucleotide thứ 3 trong codon với bazơ ngoại lai và bazơ không nằm theo quy luật (A–U, G–C) trong anticodon của phân tử tRNA

- Vùng lồi nằm gần kề đầu 3' (Hình 1-12) chứa 7 bazơ không sắp xếp theo quy luật bổ sung, nên giữa các bazơ không có các liên kết hydro. Hiện nay, người ta cho rằng, RNA vận chuyển gắn với bề mặt của ribosome nhờ vùng lồi này.

- Vùng lồi kế tiếp (tính từ đầu 3') với độ lớn rất thất thường, gọi là vùng lồi phụ (extra loop).

- Vùng lồi thứ ba (Hình 1-12) chứa 7 bazơ không có liên kết hydro (không bổ sung), trong đó có 3 bazơ chủ yếu kề nhau - anticodon là bộ ba đối mã, bộ ba này sẽ bổ sung cho bộ ba mã hóa (codon) trên RNA thông tin. Nhờ vậy, các axit amin được đưa đến đúng vị trí trong quá trình tổng hợp protein. tRNA vận chuyển alanine ở nấm men ở vị trí thứ ba của bộ đối mã (anticodon) là bazơ inosine (I) là dẫn xuất của purine, inosine có thể tạo liên kết bổ sung với cả ba loại bazơ là A, U và C (Hình 1-13).

- Vùng lồi tiếp theo (thứ tư) chứa 8 đến 12 bazơ không bổ sung, gọi là vùng lồi D (D-loop).

1.2.2.3- *RNA ribosome* (rRNA)

Ribosome được cấu tạo từ hai tiểu đơn vị, gồm một tiểu đơn vị lớn và một tiểu đơn vị nhỏ. Mỗi tiểu đơn vị được xây dựng từ ba thành phần chính là protein, lipid và rRNA.

Có ba loại phân tử rRNA thường gặp trong tế bào vi khuẩn, đó là:

- rRNA có độ dài 1542 nucleotide (16S) trong tiểu đơn vị nhỏ của ribosome,

- rRNA có độ dài 2904 nucleotide trong tiểu đơn vị lớn (23S),

- rRNA rất nhỏ, có độ dài 120 nucleotide (5S) cũng nằm trong tiểu đơn vị lớn.

- Trong tế bào sinh vật eucaryote, tiểu đơn vị nhỏ của ribosome chứa sợi rRNA 18S, còn tiểu đơn vị lớn chứa hai sợi rRNA là 28S và 5,8S.

Trong cả ba loại rRNA đều có số lượng các bazơ bổ sung không bằng nhau ($G \neq C$ và $A \neq U$).

1.2.2.4- *Nhiễm sắc thể*

Nhiễm sắc thể có thể quan sát rõ dưới kính hiển vi ở kỳ giữa của phân bào nguyên nhiễm. Nhiễm sắc thể có cấu trúc phức tạp, đặc biệt là nhiễm sắc thể của các vi sinh vật nhân chuẩn (eucaryote).

Trong một nhiễm sắc thể có một phân tử DNA sợi kép cuộn xoắn, liên kết với protein histon. Mỗi nhiễm sắc thể có hình dạng đặc trưng riêng, hình dạng đó có thể quan sát rõ trong thời kỳ phân bào.

Tế bào sinh vật đơn bội có một bộ nhiễm sắc thể (n NST), ví dụ như ở vi khuẩn có một nhiễm sắc thể. Sinh vật lưỡng bội như con người và động vật, tế bào có hai bộ nhiễm sắc thể ($2n$ NST). Sinh vật lưỡng bội thường sinh sản hữu tính nên trong cơ thể, ngoài tế bào dinh dưỡng (tế bào soma) còn có tế bào giới tính. tế bào dinh dưỡng luôn có $2n$ nhiễm sắc thể, còn tế bào giới tính chỉ có n nhiễm sắc thể. Ở các tế bào lưỡng bội ($2n$ NST), mỗi nhiễm sắc thể có một cặp giống nhau, gọi là nhiễm sắc thể tương đồng.

Số lượng nhiễm sắc thể trong tất cả các tế bào dinh dưỡng của một cơ thể sống đều giống nhau, cho dù chức năng hoạt động của các cơ quan trong cơ thể sống khác nhau.

Số lượng nhiễm sắc thể là đặc trưng cho từng loài, ví dụ:

- Người : $2n = 46$ nhiễm sắc thể,
- Ruồi dấm: $2n = 8$ nhiễm sắc thể,
- Vịt: $2n = 80$ nhiễm sắc thể,
- Ngựa: $2n = 64$ nhiễm sắc thể.

Số lượng nhiễm sắc thể không mang ý nghĩa cho sự tiến hóa. Nhiễm sắc thể nhìn rõ nhất dưới kính hiển vi vào kỳ giữa của nguyên phân, khi các mạch đã xoắn và co ngắn một cách cực đại.

Mỗi nhiễm sắc thể có một điểm thắt eo gọi là tâm động (centromere). Tâm động chia nhiễm sắc thể làm hai phần với chiều dài khác nhau. Dựa vào vị trí tâm động có thể phân biệt ba kiểu hình thái của nhiễm sắc thể:

- Nhiễm sắc thể cân tâm: Tâm động nằm ở giữa nhiễm sắc thể.

- Nhiễm sắc thể lệch tâm: Tâm động chia nhiễm sắc thể làm hai phần không đều nhau, một bên dài và một bên ngắn.

- Nhiễm sắc thể mút tâm: Tâm động nằm ở gần cuối của một đầu, chia nhiễm sắc thể làm hai phần rất không đều nhau, một bên rất dài và một bên rất ngắn.

Bằng phương pháp nhuộm màu và quan sát dưới kính hiển vi quang học ở giai đoạn không phân bào, người ta nhận thấy trên nhiễm sắc thể có vùng nhuộm màu đậm và có vùng nhuộm màu rất ít. Vùng bắt màu đậm gọi là chất dị nhiễm sắc (heterochromatine) và vùng ít bắt màu thuốc nhuộm gọi là chất nguyên nhiễm sắc (euchromatine).

Ngày nay, bằng những thiết bị nghiên cứu hiện đại, người ta đã chứng minh rằng, ở trạng thái cuộn xoắn cao của phân tử DNA và protein, nhiễm sắc thể sẽ bắt màu tốt với thuốc nhuộm, còn ở trạng thái giãn xoắn thì sự bắt màu kém hơn. Như vậy, chất dị nhiễm sắc là trạng thái cuộn xoắn, không phiên mã được của DNA, còn chất nguyên nhiễm sắc là trạng thái DNA đang hoạt động và giãn xoắn.

1.3- MÃ DI TRUYỀN

1.3.1- Khái niệm về mã di truyền

Chúng ta biết rằng, trình tự các bazơ nitơ trên DNA quyết định trình tự của axit amin trên protein tương ứng. Tất cả có 20 axit amin trong protein, nhưng chỉ có 4 loại bazơ nitơ trong DNA. Như vậy, nếu mỗi bazơ nitơ xác định một axit amin, thì chỉ có 4 axit amin được xác định. Nếu cứ hai bazơ nitơ xác định một axit amin, thì số lượng các axit amin được xác định chỉ là $4^2=16$, còn thiếu 4 axit amin chưa được xác định. Vậy, tối thiểu phải 3 bazơ nitơ xác định một axit amin. Như thế, số tổ hợp bộ ba có thể có từ 4 bazơ là $4^3=64$. Nếu mã di truyền là những bộ ba thì xảy ra trường hợp nhiều bộ ba xác định một axit amin.

Ngày nay, bằng kết quả thực nghiệm, người ta đã chứng minh rằng, bộ ba mã di truyền là đúng. Trong bộ mã di truyền, một bộ ba nucleotide được gọi là codon.

1.3.2- Đặc tính của mã di truyền

Mã di truyền có một số đặc tính sau:

1,- Mã di truyền không có dấu phẩy, nghĩa là thông tin di truyền được đọc theo từng cụm 3 nucleotide một cách liên tục, không ngắt quãng.

2,- Thông tin được đọc theo một chiều, bắt đầu từ một điểm xác định.

Bảng 1-2: Bảng mã di truyền

		<i>Vị trí thứ hai</i>				
		U	C	A	G	
<i>Vị trí thứ nhất - Đầu 5'</i>	U	UUU] Phe UUC] UUA] Leu UUG]	UCU] UCC] Ser UCA] UCG]	UAU] Tyr UAC] UAA* Stop UAG* Stop	UGU] Cys UGC] UGA* Stop UGG Trp	U C A G
	C	CUU] Leu CUC] CUA] CUG]	CCU] CCC] Pro CCA] CCG]	CAU] His CAC] CAA] Gln CAG]	CGU] CGC] Arg CGA] CGG]	U C A G
	A	AUU] Ile AUC] AUA] AUG* Met	ACU] ACC] Thr ACA] ACG]	AAU] Asn AAC] AAA] Lys AAG]	AGU] Ser AGC] AGA] Arg AGG]	U C A G
	G	GUU] Val GUC] GUA] GUG*]	GCU] GCC] Ala GCA] GCG]	GAU] Asp GAC] GAA] Glu GAG]	GGU] GGC] Gly GGA] GGG]	U C A G

3,- Mã di truyền mang tính phổ biến, nghĩa là tất cả mọi sinh vật đều dùng chung một loại thông tin.

Ví dụ: Một gen lấy từ tế bào động vật mã hóa cho một loại protein nào đó. Gen đó dù được dịch mã trong tế bào động vật hay dịch mã trong tế bào *E. Coli*, thì cũng chỉ tổng hợp nên một loại protein mà thôi.

4,- Mã di truyền mang tính thoái hóa (degenerate), nghĩa là, nhiều bộ ba cùng xác định một axit amin, trừ hai ngoại lệ là bộ ba AUG mã hóa cho methionine và UGG mã hóa cho tryptophan.

Ví dụ: Valine có 4 bộ ba mã hóa cho nó là GUU, GUC, GUA và GUG. Sự khác nhau chủ yếu của các bộ ba này là ở nucleotide thứ ba. Tuy vậy, không phải lúc nào cặp nucleotide đầu giống nhau cũng mã hóa cho một axit amin, ví dụ trường hợp của leucine có 6 bộ ba mã hóa, trong đó có hai bộ ba có hai nucleotide đầu khác với 4 bộ ba kia, đó là UUA, UUG và CUU, CUC, CUA, CUG.

5,- Mã di truyền có những bộ ba khởi đầu và kết thúc đặc hiệu. AUG là tín hiệu khởi đầu, nếu nó không có ở đầu 5' của RNA thông tin thì quá trình dịch mã không bắt đầu được. Các bộ ba kết thúc là UAG, UAA và UGA.

1.4- VẬT CHẤT DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ NHÓM SINH VẬT

1.4.1- Vật chất di truyền của virus

Virus được phát hiện vào cuối thế kỷ 19, có kích thước rất nhỏ, sống ký sinh trên các loài sinh vật khác nhau, không có cấu tạo tế bào hoàn thiện, nghĩa là không có màng tế bào, không có các bào quan. Virus không có thể tự tổng hợp protein khi chúng nằm bên ngoài tế bào chủ, nên sau khi đã hình thành, chúng không tăng về kích thước. Cấu tạo của virus đơn giản gồm một bộ máy di truyền của nó, gói trong vỏ protein, bên ngoài có thể có màng bao.

Bộ máy di truyền của virus chỉ có một loại axit nucleic: DNA (mạch kép hoặc mạch đơn) hoặc RNA. Cấu trúc của phân tử axit nucleic trong virus có thể ở dạng thẳng hoặc dạng vòng. Bộ gen nhỏ nhất có 4 gen, lớn nhất có chừng vài trăm gen.

Virus chỉ có thể tự tái bản bộ máy di truyền của mình và tổng hợp protein bao gói bộ máy di truyền trong tế bào chủ.

1.4.2- Vật chất di truyền của vi khuẩn

Vi khuẩn là loại vi sinh vật có cấu trúc tế bào nhưng đơn giản, tức là chúng có màng tế bào, nguyên sinh chất và các bào quan, tuy nhiên, chúng chưa có màng nhân. Bộ máy di truyền của vi khuẩn nằm trong nguyên sinh chất là phân tử DNA mạch kép vòng tròn, được gọi là nhiễm sắc thể. Ngoài nhiễm sắc thể, trong tế bào vi khuẩn còn có plasmid - là những phân tử DNA nhỏ, mạch vòng, xoắn kép, chúng có khả năng phân chia độc lập không phụ thuộc vào DNA nhiễm sắc thể.

Vi khuẩn thuộc nhóm tế bào đơn bội - có số nhiễm sắc thể là n , các tế bào lưỡng bội luôn có số lượng nhiễm sắc thể là $2n$. Bộ máy di truyền của vi khuẩn *E. Coli* được nghiên cứu kỹ nhất. *E. Coli* có một nhiễm sắc thể (chromosome), bộ gen có khoảng 2.000 đến 4.000 gen trên phân tử DNA vòng tròn, xoắn kép bao gồm khoảng 4,5 triệu nucleotide, cấu trúc không gian nằm dưới dạng siêu xoắn.

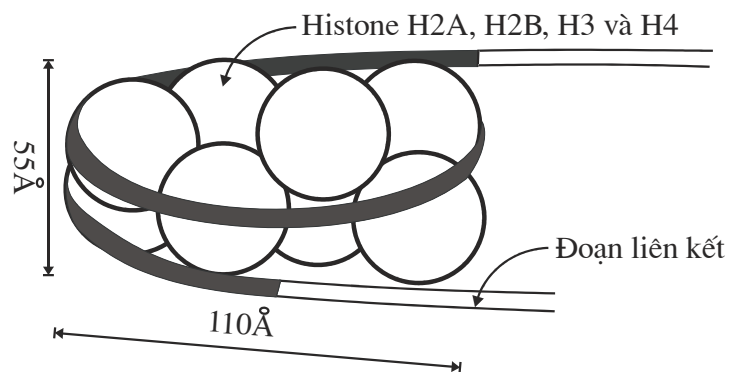
1.4.3- Vật chất di truyền của eucaryote

1.4.3.1- DNA trong nhân

Tế bào của các sinh vật có nhân điển hình (eucaryote) cấu tạo hoàn thiện, bao gồm màng tế bào, nguyên sinh chất, các bào quan và nhân tế bào. Khác với tế bào vi khuẩn, nhân tế bào có màng nhân bao bọc.

Bộ máy di truyền của tế bào là những phân tử DNA nằm trong cấu trúc nhiễm sắc thể. Mỗi nhiễm sắc thể chứa một phân tử DNA thẳng, mạch xoắn kép. Các nhiễm sắc thể phân bố trong nhân. Số lượng và hình dạng của nhiễm sắc thể là đặc trưng cho mỗi loài sinh vật.

Các tế bào dinh dưỡng của nhóm sinh vật eucaryote đều có số lượng nhiễm sắc thể là $2n$ (tế bào lưỡng bội). Tế bào giới tính chỉ có một bộ nhiễm sắc thể n (tế bào đơn bội).



Hình 1-14: Sơ đồ cấu tạo của nucleosome

Các nhiễm sắc thể của eucaryote có tổ chức phức tạp. Mỗi nhiễm sắc thể chứa một phân tử DNA dài mạch xoắn kép liên kết với protein histone và cuộn lại, tạo thành phức hợp nucleoprotein.

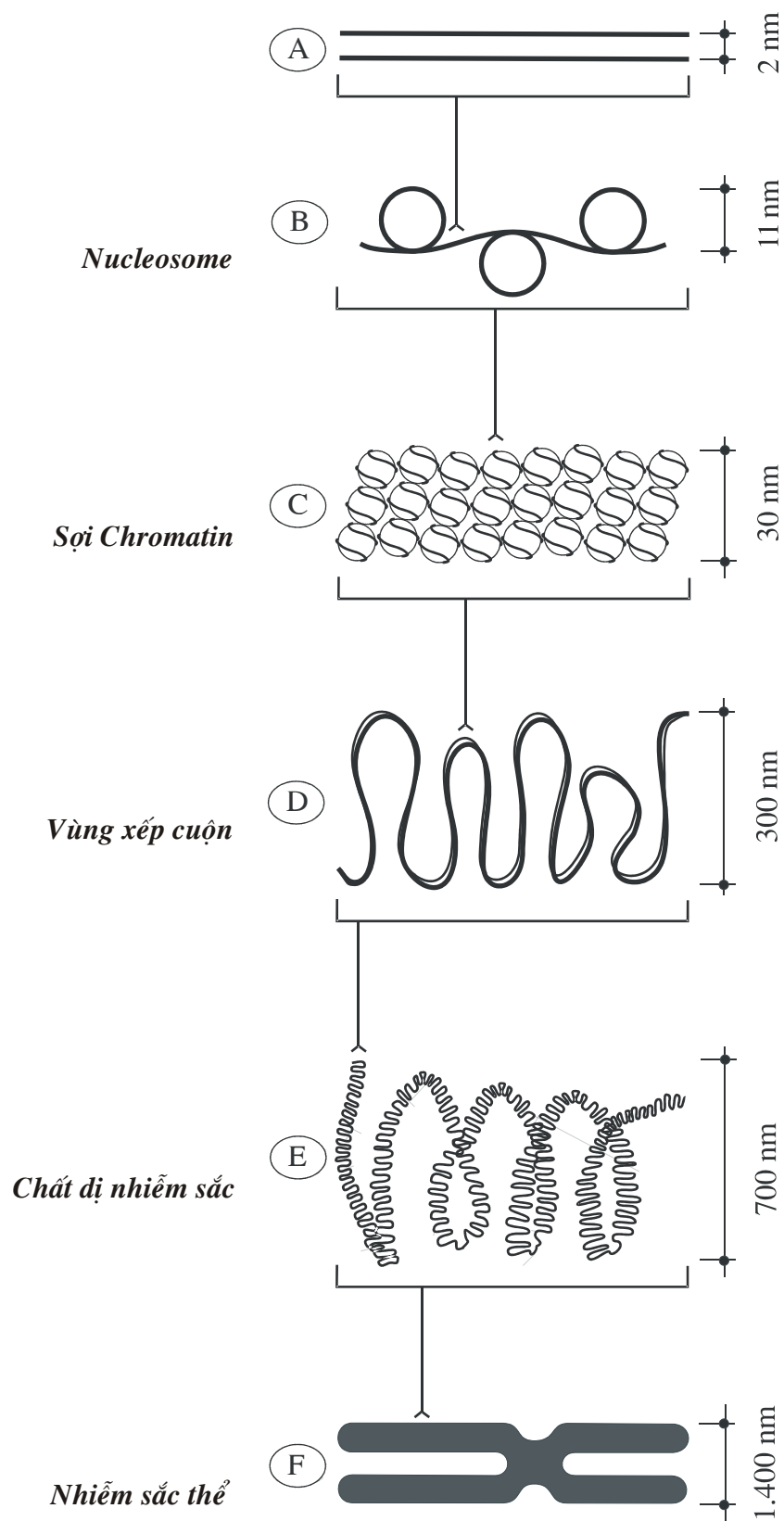
Histone là những protein có phân tử nhỏ chứa nhiều axit amin mang điện tích dương như lysine, arginine nên dễ liên kết với phân tử DNA mang điện tích âm.

Phân tử DNA trong nhiễm sắc thể được cuộn xoắn ở nhiều mức độ khác nhau. Nucleosome là đơn vị cấu trúc cơ bản, được tạo nên do một đoạn DNA khoảng 200 cặp nucleotide liên kết với 5 loại protein histone là H1, H2A, H2B, H3 và H4.

Cấu tạo của mỗi nucleosome gồm một đoạn DNA khoảng 145 cặp nucleotide quấn quanh một cái lõi gồm 8 protein histone là 2H2A, 2H2B, 2H3 và 2H4 và một đoạn DNA liên kết có độ dài khoảng 55 cặp nucleotide, đoạn này gắn với protein histone H1. Độ dài của đoạn DNA liên kết này thay đổi tùy theo chủng loại sinh vật.

Các nucleosome xếp sát vào nhau, tạo thành sợi chromatin. Sợi chromatin cuộn xoắn, uốn khúc nhiều lần, tạo thành vùng xếp cuộn dày đặc, gọi là chất dị nhiễm sắc. Chất dị nhiễm sắc là trạng thái cuộn xoắn cao của phức hợp nucleoprotein ở thời kỳ phân bào (Hình 1-15).

Các nhiễm sắc thể được nhân đôi lên trước thời kỳ phân bào và sau đó, chia đều về cho các tế bào con trong thời kỳ phân bào. Như vậy, các thông tin di truyền được truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác.



Hình 1-15: Cách sắp xếp của phức hợp nucleprotein, tạo thành nhiễm sắc thể ở giai đoạn phân chia tế bào

1.4.3.2- *DNA ngoài nhân*

Có một số bào quan trong tế bào chất như ti thể và lục lạp của tế bào eucaryote có chứa DNA. Các DNA ngoài nhân này cũng mang gen mã hóa cho protein và truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác, tuy nhiên, sự phân ly của các gen tế bào chất không tuân theo các định luật của Mendel vì cơ chế phân chia tế bào chất về các tế bào con không đều như các nhiễm sắc thể trong nhân. Lục lạp và ti thể là hai loại bào quan tham gia trực tiếp vào quá trình chuyển hóa năng lượng của tế bào.

Để phân biệt với DNA nhiễm sắc thể, DNA của lục lạp được ký hiệu là cpDNA (chloroplast DNA) và DNA của ti thể được ký hiệu là mtDNA (mitochondrial DNA).

Bộ gen của cpDNA mã hóa cho các protein trong thành phần của lục lạp. cpDNA có cấu trúc dạng vòng tròn, sợi xoắn đôi có kích thước nhỏ, khoảng từ 120 đến 200kb (kilobazo) tùy theo chủng loại thực vật.

DNA của ti thể (mtDNA) mã hóa cho nhiều protein của màng bên trong ti thể và một số protein tham gia vào chuỗi chuyển vận điện tử. mtDNA cũng có cấu trúc dạng vòng tròn nhưng nhỏ hơn cpDNA nhiều lần.

Mặc dù bộ máy di truyền ngoài nhân là các DNA của ti thể và lục lạp có thể tự nhân đôi một cách độc lập và có bộ máy tổng hợp protein riêng, nhưng hoạt động của chúng có sự phối hợp chặt chẽ với bộ máy di truyền trong nhân, hoạt động của các gen ngoài nhân góp phần bổ sung cho các hoạt động của các gen trong nhân.

Như vậy, trong các loại tế bào eucaryote có chứa lục lạp thì tồn tại ba loại DNA là DNA nhiễm sắc thể, cpDNA và mtDNA, còn các tế bào không có lục lạp thì chỉ có hai loại là mtDNA và DNA nhiễm sắc thể.

CHƯƠNG II

HOẠT ĐỘNG VÀ SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN

2.1- GEN LÀ ĐƠN VỊ CHỨC NĂNG CỦA BỘ MÁY DI TRUYỀN

2.1.1- Các quan niệm về gen

Thuật ngữ "gen" được Johansen nêu ra vào năm 1909 để chỉ nhân tố di truyền xác định một tính trạng nào đó. Vị trí và cấu trúc của gen đã được Morgan và các nhà khoa học xác định và ngày càng làm rõ thêm.

Giai đoạn trước năm 1953, khi cấu trúc của phân tử DNA chưa được khám phá thì cấu tạo của gen cũng chưa được xác định, tuy nhiên các nhà khoa học đã khẳng định rằng, gen là một đơn vị di truyền, mỗi một gen xác định một tính trạng, có một vị trí nhất định trên nhiễm sắc thể và gen có thể phân chia nhỏ về mặt tái tổ hợp và đột biến.

Năm 1941, Beadle và Tatum đã xác định rằng, gen kiểm tra hoạt tính của enzyme và nêu ra giả thuyết là: mỗi gen kiểm soát sự tổng hợp một enzyme. Giả thuyết này về sau được mở rộng và cụ thể hóa hơn là: mỗi gen kiểm soát sự tổng hợp một chuỗi polypeptide. Ví dụ, một phân tử enzyme được cấu tạo từ hai sợi polypeptide thì sẽ do hai gen xác định.

Sau khi Watson và Crick xác định được cấu trúc DNA thì cấu tạo của gen cũng ngày càng được làm rõ hơn.

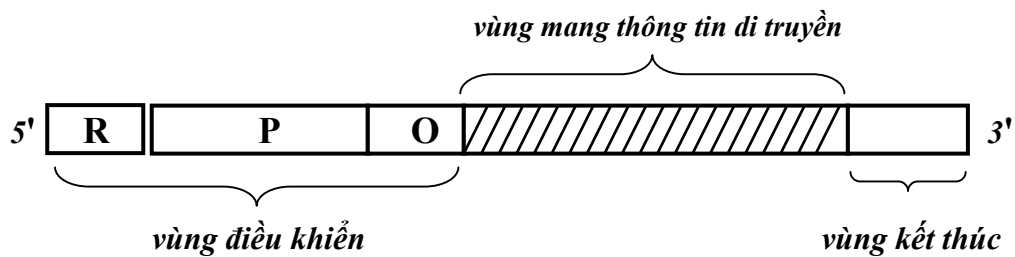
Hiện nay, cấu tạo và chức năng của một gen được xác định như sau:

- Gen là một đoạn DNA đảm bảo cho việc tạo ra một polypeptide hay một RNA. Mỗi gen có cấu tạo gồm ba vùng (region) có chức năng riêng biệt là: vùng trước, vùng sau và vùng mã hóa. Vùng trước làm nhiệm vụ điều hành, vùng trước và vùng sau không mã hóa cho các axit amin. Trong vùng mã hóa ở tế bào sinh vật eucaryote có những đoạn mang mã cho các axit amin gọi là exon xen kẽ với những đoạn không mang mã gọi là intron. Mỗi gen chiếm một vị trí (locus) nhất định trên nhiễm sắc thể và xác định một tính trạng nhất định. Gen có thể bị chia nhỏ bởi các đơn vị đột biến và tái tổ hợp.

2.1.2- Cấu trúc của gen

Mỗi một gen có cấu tạo tổng quát gồm ba vùng chính: vùng điều khiển (vùng trước), vùng mang thông tin di truyền (vùng mã hóa) và vùng kết thúc (vùng sau). Vùng điều khiển nằm ở đầu 3' và vùng kết thúc nằm ở đầu 5' của sợi DNA làm khuôn (coding strand hoặc sense) để phiên mã. Tuy nhiên, khi ghi sơ đồ của một gen bất kỳ nào đó vào ngân hàng gen, người ta đều lấy sợi DNA không làm khuôn (antisense) vì trình tự sắp xếp các bazơ trong sợi antisense giống như trình tự sắp xếp các bazơ trong sợi RNA sau khi phiên mã. Do đó, có thể nói vùng điều khiển nằm ở đầu 5' và vùng kết thúc nằm ở đầu 3' của gen. Vùng điều khiển và vùng kết thúc không mang mã cho các axit amin trong quá trình tổng hợp protein. Ngoài ra, trong một gen còn có thể có một số cấu trúc đặc thù khác, có vị trí không xác định như trình tự tăng cường (enhance), trình tự bất hoạt (silencer),...

Sơ đồ cấu trúc chung của một gen có thể biểu diễn như sau:



R: Trình tự điều hoà

P: Promoter

O: Operator

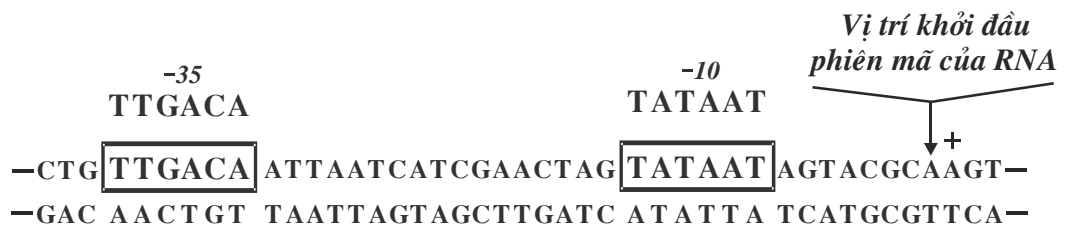
Vùng điều khiển không được phiên mã mà có chức năng giúp enzyme RNA-polymerase thực hiện sự phiên mã chính xác.

2.1.2.1- Cấu trúc của promoter

Promoter là trình tự nhận biết của enzyme RNA-polymerase và là nơi mà enzyme RNA-polymerase gắn vào để xác định vị trí bắt đầu phiên mã. Do vậy nên promoter có những cấu trúc đặc hiệu giúp enzyme nhận biết chính xác.

Khảo sát nhiều promoter khác nhau của các gen, người ta nhận thấy phần tâm của promoter có những trình tự chung giống nhau và gọi là các hộp, ví dụ ở *E. Coli* có hộp TATAAT. Hộp này thường nằm ở vị trí khoảng -10,

tức là nằm ở khoảng 10 nucleotide phía trước vị trí khởi đầu phiên mã hay trình tự TTGACA nằm ở vị trí -35, tức là khoảng 35 nucleotide trước vị trí khởi đầu phiên mã. Ở vi khuẩn có một loại promoter vì chỉ có một loại RNA-polymerase.



Hình 2-1: Vùng tâm promoter của operon Trp ở vi khuẩn

Ở tế bào eucaryote, vùng điều khiển thường lớn hơn ở tế bào procaryote. Eucaryote có ba loại enzyme RNA-polymerase nên chúng có ba loại promoter, mỗi loại ứng với một loại enzyme để chúng dễ dàng nhận biết và bám vào đó để thực hiện phiên mã. Promoter nhóm I là vị trí bám của enzyme RNA-polymerase I, promoter nhóm II và nhóm III là vị trí bám của enzyme RNA-polymerase nhóm 2 và nhóm III. Mỗi loại promoter có những trình tự chung giống nhau, các trình tự này định vị ở những vị trí xác định, do đó, các enzyme dễ dàng nhận biết và thực hiện phiên mã chính xác.

2.1.2.2- Cấu trúc vùng mang thông tin di truyền

Ở tế bào sinh vật procaryote, các gen được tổ chức theo dạng operon, nghĩa là, mỗi một gen mang mã để tổng hợp một số chuỗi polypeptide. Vùng mang mã để tổng hợp một polypeptide gọi là một cistron. Như vậy, gen ở tế bào procaryote thuộc loại polycistron. Các cistron sắp xếp theo từng nhóm, chung một vùng điều khiển tạo thành một operon. Các protein được mã hóa trong một operon thường có liên quan chặt chẽ với nhau trong một quá trình chuyển hóa sinh hóa nào đó trong tế bào. Kiểu tổ chức bộ máy di truyền như vậy giúp vi khuẩn thích nghi nhanh với những thay đổi của điều kiện ngoại cảnh môi trường. Toàn bộ vùng mang thông tin di truyền được mã hóa cho các polypeptide.

Vùng mang mã di truyền của sinh vật eucaryote có cấu trúc phức tạp hơn. Phần lớn các gen có chứa các đoạn không mang mã (intron) nằm xen kẽ với các đoạn mang mã (exon). Chỉ có một số ít các gen là không có intron như một số gen mã hóa cho protein histon. Ở nhiều gen, phần không mang mã (intron) có tổng độ dài lớn hơn tổng độ dài của các đoạn mang mã, như gen

mã hóa cho albumin, conalbumin, ... Số lượng intron có mặt trong các gen cũng không giống nhau, ví dụ như ở gen mã hóa cho α -globin chỉ có hai intron, trong khi đó, ở gen mã hóa cho collagen lại có đến 52 intron. Các đoạn intron sẽ được cắt bỏ trong quá trình phiên mã. Điểm giao tiếp giữa intron và exon có những dấu hiệu riêng biệt, đó là các cặp bazơ GU và AG (...GU.....AG...).

2.1.2.3- *Cấu trúc vùng kết thúc*

Vùng kết thúc nằm ở đầu 5' của sợi DNA làm khuôn (sense) - là đầu 3' của gen (sợi antisense), bao gồm những trình tự không mã hóa cho các axit amin. Vùng này thường có các tín hiệu dừng phiên mã, giúp enzyme RNA-polymerase dừng phiên mã đúng vị trí. Ngoài ra, trong vùng này còn có một số trình tự có chức năng chưa rõ ràng.

2.2- SỰ SAO MÃ DNA (Replication)

Một trong những tính chất căn bản của DNA là khả năng tự sao chép (replication) hay là tự nhân đôi (self duplication). Nghĩa là từ một phân tử DNA mẹ sao chép tạo ra hai phân tử DNA con giống y như phân tử DNA mẹ ban đầu.

Sự tái bản DNA là một trong những tính chất quan trọng, nhờ đó mà thông tin di truyền được truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác.

2.2.1- **Lý thuyết về sao mã DNA theo khuôn**

2.2.1.1- *Giả thuyết của Watson - Crick*

Sau khi xây dựng mô hình cấu trúc của phân tử DNA, Watson và Crick đã thấy rằng, nếu hai sợi DNA tách rời ra thì một sợi sẽ làm khuôn để tổng hợp một sợi mới vì do các bazơ nitơ luôn có xu hướng bắt cặp với nhau (A với T và G với C). Theo dự đoán của Watson và Crick, quá trình tổng hợp DNA có thể tóm tắt như sau:

- Đầu tiên liên kết hydro sẽ bị đứt ra để tạo hai mạch đơn làm khuôn.
- Các bazơ nitơ mới sẽ bắt cặp bổ sung với các bazơ nitơ trên sợi làm khuôn theo qui tắc A đối diện với T và G đối diện với C.

- Kết thúc quá trình sao mã, từ một sợi DNA xoắn kép mẹ sẽ tạo hai sợi xoắn kép con. Mỗi sợi xoắn kép con có một sợi mới tổng hợp và một sợi sẽ làm khuôn.

Ngay sau khi mô hình được nêu ra, nhiều thí nghiệm chứng minh đã được tiến hành để xác nhận dự đoán.

2.2.1.2- *Thí nghiệm chứng minh của Meselson - Stahl (1958)*

Thí nghiệm này nhằm mục đích chứng minh kiểu tổng hợp theo khuôn của DNA như dự đoán của Watson và Crick. Thí nghiệm được thực hiện trên *E. Coli*. Vi khuẩn được nuôi cấy qua nhiều thế hệ trên môi trường có chứa nitơ đồng vị nặng N^{15} và nitơ thường N^{14} .

Nguyên tắc của thí nghiệm là dựa trên khả năng phân biệt tỉ trọng của hai đồng vị N^{15} và N^{14} có mặt trong các loại DNA khi li tâm trên thang nồng độ $CsCl_2$. Quá trình thí nghiệm được tiến hành như sau:

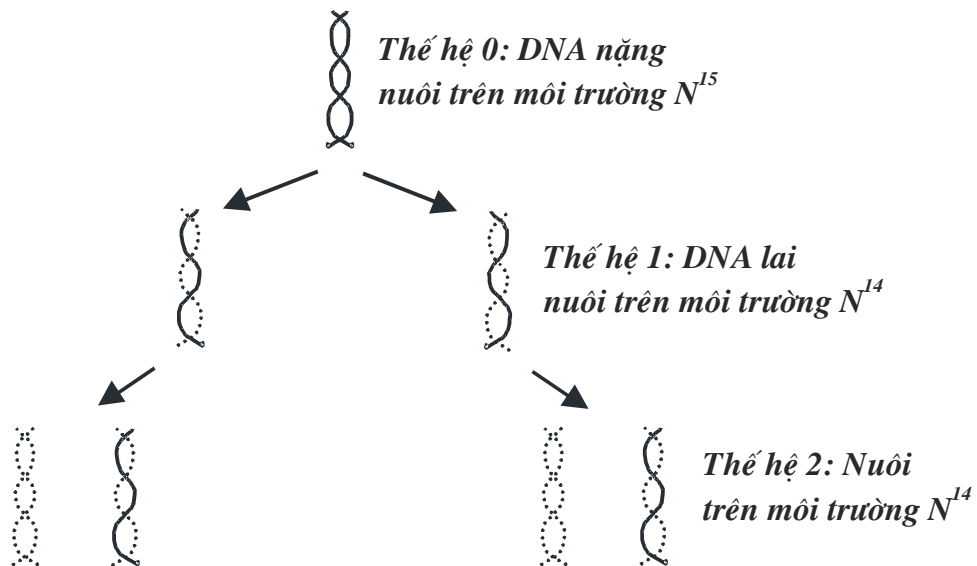
- Thế hệ đầu (gọi là thế hệ 0): vi khuẩn được nuôi trên môi trường chứa N^{15} như vậy ở thế hệ này, các nguyên tử nitơ trong DNA của vi khuẩn sẽ là N^{15} . Sau khi nuôi tiến hành tách DNA và đem li tâm trên thang nồng độ $CsCl_2$, nhận thấy:

+ Ở thế hệ 0: chỉ chứa 1 giải đơn có tỉ trọng cao. Như vậy tất cả DNA của thế hệ cha mẹ đều chứa 2 sợi với nitơ nặng.

- Thế hệ 1: Chuyển vi khuẩn ở thế hệ 0 sang nuôi trên môi trường chứa N^{14} . Thời gian và điều kiện nuôi tương tự như ở thế hệ 0. Sau khi tách DNA và đem li tâm như ở thế hệ 0, thì thấy:

+ Ở thế hệ 1 chỉ chứa 1 giải đơn có tỉ trọng trung bình. Như vậy mỗi phân tử con ở thế hệ 1 có 1 sợi chứa nitơ nặng của bố mẹ và 1 sợi bổ sung mới tổng hợp có cấu tạo từ nitơ nhẹ N^{14} , gọi là sợi DNA lai.

- Thế hệ 2: Tiếp tục chuyển vi khuẩn của thế hệ 1 sang thế hệ 2 và cũng nuôi trên môi trường chứa N^{14} . Quá trình thí nghiệm tiến hành tương tự như ở các thế hệ trên. Sau khi li tâm, quan sát thấy có một nửa số lượng phân tử DNA là phân tử lai giống thế hệ 1 và một nửa số lượng còn lại là phân tử DNA với cả hai sợi đều mang N^{14} (Hình 2-2).



Hình 2-2: Mô hình thí nghiệm của Meselson-Stahl

Thí nghiệm trên là một bằng chứng chứng minh giả thuyết của Watson và Crick là đúng. Quá trình tổng hợp DNA phải thực hiện theo khuôn, hai mạch ban đầu được tách ra, mỗi cái làm khuôn để tổng hợp mạch mới. Kết quả là, mỗi phân tử con đều mang một mạch cũ và một mạch mới. Kiểu sao mã như vậy gọi là “sao mã bán bảo tồn” (semi-conservative).

2.2.1.3- *Thí nghiệm chứng minh của Arthur và Kornberg*

Cũng trong năm này (1958), Arthur và Kornberg tại trường Đại học Washington đã tinh sạch một loại enzyme từ *E. Coli*, gọi là DNA-polymerase. Enzyme này xúc tác tổng hợp một sợi polynucleotide từ các nucleotide-3-phosphat.

Nguyên liệu dùng cho thí nghiệm gồm:

- Bốn loại nucleotide dạng triphosphat: dATP, dTTP, dGTP, dCTP.
- Enzyme DNA-polymerase chiết từ vi khuẩn *E. Coli*.
- Ion Mg^{+2} là cofactor của enzyme, tạo điều kiện thuận lợi cho hoạt động của enzyme.

Tiến trình thí nghiệm có thể mô tả như sau:

Thí nghiệm thứ nhất được tiến hành với đầy đủ các nguyên liệu như đã giới thiệu ở trên, trong các điều kiện thuận lợi cho sự tổng hợp sợi DNA mới, nhưng không có sợi làm khuôn.

Thí nghiệm thứ hai cũng được tiến hành tương tự như thí nghiệm 1 nhưng có một sợi DNA làm khuôn. Sợi làm khuôn được thu nhận bằng cách làm biến tính và tách mạch, sau đó đưa vào thí nghiệm.

Họ thấy rằng, ở thí nghiệm thứ nhất, enzyme DNA-polymerase không thể tổng hợp sợi DNA từ các nguyên liệu khi không có mặt của sợi khuôn, việc tổng hợp sợi DNA mới chỉ xảy ra ở thí nghiệm thứ hai, khi có mặt DNA khuôn. Điều đó khẳng định rằng giả thuyết của Watson và Crick là đúng. DNA được tổng hợp chỉ khi có một sợi làm khuôn.

2.2.2- Quá trình sao mã

2.2.2.1- Các enzyme và protein đặc hiệu tham gia sao mã

Đây là một quá trình phức tạp, để thực hiện sao mã cần thiết phải có mặt của các enzyme, các protein đặc hiệu và các điều kiện cần thiết sau đây:

1,- Liên kết hydro giữa 2 mạch bổ sung của sợi DNA mẹ phải bị phá vỡ và tách rời từng bước làm 2 mạch để làm khuôn.

2,- Phải có đoạn môi (primer), tức đoạn RNA mạch đơn gắn bắt cặp với mạch đơn DNA khuôn từ vị trí bắt đầu của mỗi đoạn sao chép.

3,- Có đủ 4 loại nucleotide ở dạng triphosphat (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) để bắt cặp bổ sung với các nucleotide mạch khuôn.

4,- Mạch mới được tổng hợp theo hướng $5'-P \rightarrow 3'-OH$.

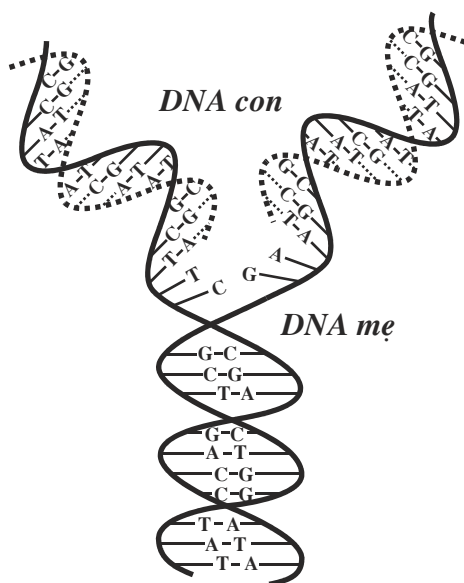
5,- Mỗi bước được điều khiển bởi enzyme đặc hiệu và được thực hiện một cách nhanh chóng, chính xác.

6,- Có mặt của ion Mg^{+2} làm cofactor của enzyme.

7,- Trong quá trình sao chép, ngoài các enzyme đặc hiệu còn có các protein đặc hiệu.

Các enzyme và protein đặc hiệu tham gia sao chép gồm có:

- Enzyme topoisomerase, làm nhiệm vụ tháo xoắn về hai phía trên sợi DNA kép.
- Enzyme helicase, sử dụng năng lượng ATP để làm đứt liên kết hydro giữa các bazơ nitơ của hai mạch khuôn.
- DNA-polymerase I, -II, -III làm nhiệm vụ tổng hợp sợi mới và sửa sai.
- RNA-polymerase, làm nhiệm vụ tổng hợp đoạn mồi.
- Enzyme primase, làm nhiệm vụ gắn mồi.
- Enzyme ligase, làm nhiệm vụ nối hai nucleotide đứng cạnh nhau bằng liên kết phosphodiester để tạo mạch polynucleotide.
- Enzyme ribonuclease (RNase) làm nhiệm vụ cắt bỏ mồi sau khi tổng hợp xong mạch mới.



Hình 2-3: Sao chép theo quy luật bổ sung

Các protein tham gia sao mã gồm có:

- Protein B, nhận biết điểm khởi đầu (origin) sao chép trên sợi DNA kép.
- Protein SSB (Single Strand Buiding), làm nhiệm vụ giữ hai mạch của sợi DNA không cho chập vào nhau, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình sao chép.

2.2.2.2- *Quá trình sao mã*

1,- *Nhận biết điểm khởi sự và tháo xoắn DNA:*

Quá trình sao mã được nghiên cứu khá kỹ ở tế bào vi khuẩn *E. Coli*. Sự sao mã bắt đầu khi protein B đặc hiệu nhận biết điểm khởi sự sao mã (replication origine) và gắn vào trình tự đặc hiệu đó. Tiếp theo, enzyme topoisomerase thực hiện tháo xoắn phân tử DNA từ điểm khởi sự.

Enzyme helicase sử dụng năng lượng ATP cắt đứt các liên kết hydro giữa các bazơ bắt cặp của hai mạch phân tử, tách hai mạch để tạo thành chạc ba hình chữ Y, gọi là chạc ba sao mã (replication fork). Có nhiều loại enzyme helicase: có loại gắn trên mạch, di chuyển và cắt liên kết hydro theo chiều từ đầu 3' đến đầu 5'; có loại gắn lên mạch, di chuyển và cắt liên kết hydro theo chiều 5' → 3'. Sau khi tách rời, hai mạch đơn sẽ được protein làm căng mạch SSB giữ không cho chập lại, làm cho trạng thái mở xoắn được bền vững. Mỗi phân tử protein SSB bám vào 8 nucleotide trên mạch đơn, mỗi chạc ba sao mã có khoảng 250 phân tử protein SSB hoạt động. Mạch khuôn được sử dụng đến đâu, các phân tử protein SSB sẽ được giải phóng đến đó.

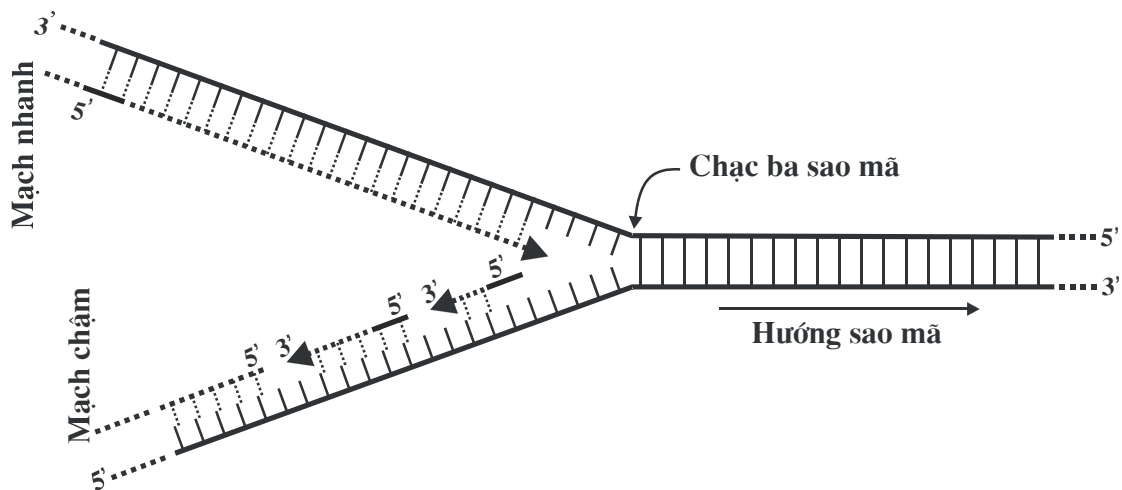
2,- *Tổng hợp môi:*

Enzyme DNA-polymerase chỉ có khả năng tổng hợp sợi DNA mới bằng cách nối dài đầu 3'-OH tự do của một đoạn môi đã bắt cặp sẵn trên khuôn theo chiều 3'-OH đến đầu 5'-P. Môi là một đoạn RNA nhỏ chừng 10 nucleotide, được tổng hợp từ khuôn của sợi DNA. Phức hợp enzyme primase-RNA-polymerase bám vào mạch đơn của chạc sao mã tổng hợp đoạn RNA môi tạo đầu 3'-OH tự do của đoạn môi. Enzyme DNA-polymerase III xúc tác tổng hợp mạch bổ sung từ đầu 3'-OH tự do của môi, kéo dài mạch. Sự tổng hợp các mạch đơn DNA mới, vì vậy, chỉ đi theo một chiều xác định từ đầu 5' đến đầu 3' (5'→3').

3,- *Sự tổng hợp mạch DNA mới xảy ra một cách liên tục trên mạch khuôn có chiều 3'→5' và gián đoạn trên mạch khuôn có chiều 5'→3':*

Trên mạch khuôn có chiều 3'→5', mạch mới được tổng hợp theo chiều 5'→3' một cách liên tục, cùng hướng tháo xoắn của phân tử DNA. Đoạn môi sẽ được tổng hợp từ điểm khởi sự sao mã. Khi xuất hiện đầu 3'-OH tự do của đoạn môi thì enzyme DNA-polymerase III gắn vào và tổng hợp ngay mạch bổ

sung theo chiều 5'→3' một cách liên tục cho đến điểm kết thúc sao mã. Mạch này được tổng hợp nhanh hơn nên người ta thường gọi là mạch nhanh (leading strand). Như vậy, để tổng hợp được sợi DNA mới bổ sung cho sợi làm khuôn này, enzyme DNA-polymerase chỉ cần có một đoạn mồi (Hình 2-4).



Hình 2-4: Sơ đồ biểu diễn cách sao chép gián đoạn và liên tục trên 2 sợi DNA khuôn

Trên mạch khuôn có chiều từ đầu 5'→3', việc tổng hợp mạch mới phức tạp hơn, do qui luật tổng hợp sợi DNA mới bổ sung luôn thực hiện theo chiều từ đầu 5'→3'. Mạch mới bổ sung cho mạch khuôn này được tổng hợp dưới dạng từng đoạn ngắn gọi là okazaki. Mỗi một okazaki có một đoạn mồi. Ở vi khuẩn, độ dài một okazaki khoảng 1.000 đến 2.000 nucleotide, còn ở tế bào eucaryote, số lượng nucleotide trong một okazaki ngắn hơn so với ở vi khuẩn. Hướng di chuyển để tổng hợp sợi mới của DNA-polymerase III ngược với hướng tháo xoắn của phân tử DNA mẹ.

Sợi con thứ hai này được tổng hợp một cách chậm hơn nên thường gọi là mạch chậm hay mạch sau (lagging strand). Các đoạn RNA mồi sau đó sẽ bị enzyme ribonuclease phân huỷ. Các lỗ trống xuất hiện sau khi các đoạn mồi mất đi sẽ được lấp đầy nhờ hoạt động của enzyme DNA-polymerase I. Cuối cùng, enzyme DNA-lygase nối các liên kết phosphodiester giữa các đoạn, tạo nên mạch DNA con hoàn chỉnh.

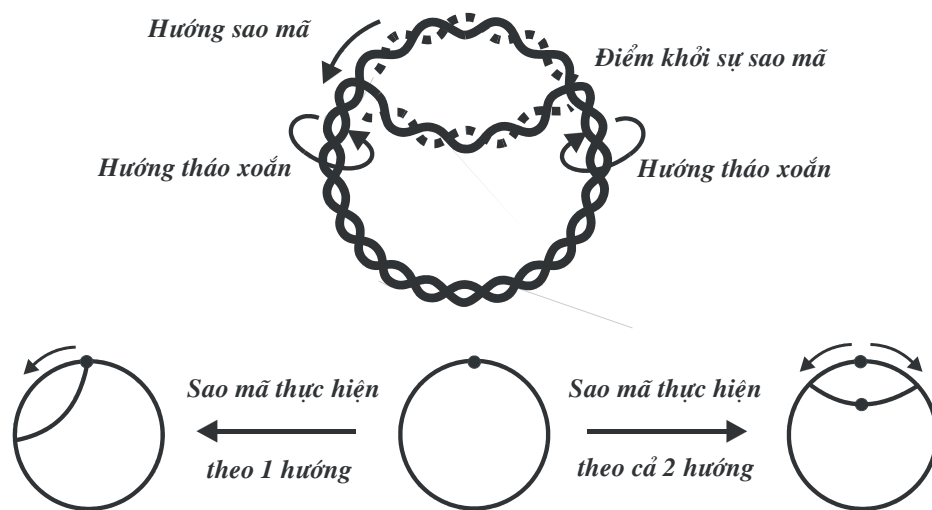
Ngoài chức năng tổng hợp sợi DNA mới theo chiều từ đầu 5'→3', enzyme DNA-polymerase III còn có khả năng sửa sai nhờ hoạt tính exonuclease. Trên đường di chuyển để tổng hợp, nếu nó gặp chỗ mà

nucleotide mới bắt cặp sai, nó sẽ lùi lại cắt bỏ nucleotide sai và lắp nucleotide đúng vào.

Kết quả, sau quá trình sao mã, hai phân tử DNA con được hình thành có cấu tạo giống y như phân tử DNA mẹ ban đầu, đảm bảo thông tin di truyền được truyền từ thế hệ này qua thế hệ khác một cách chính xác.

2.2.3- Sao mã DNA sợi kép dạng vòng của tế bào procaryote

2.2.3.1- Sao mã theo kiểu hình mắt



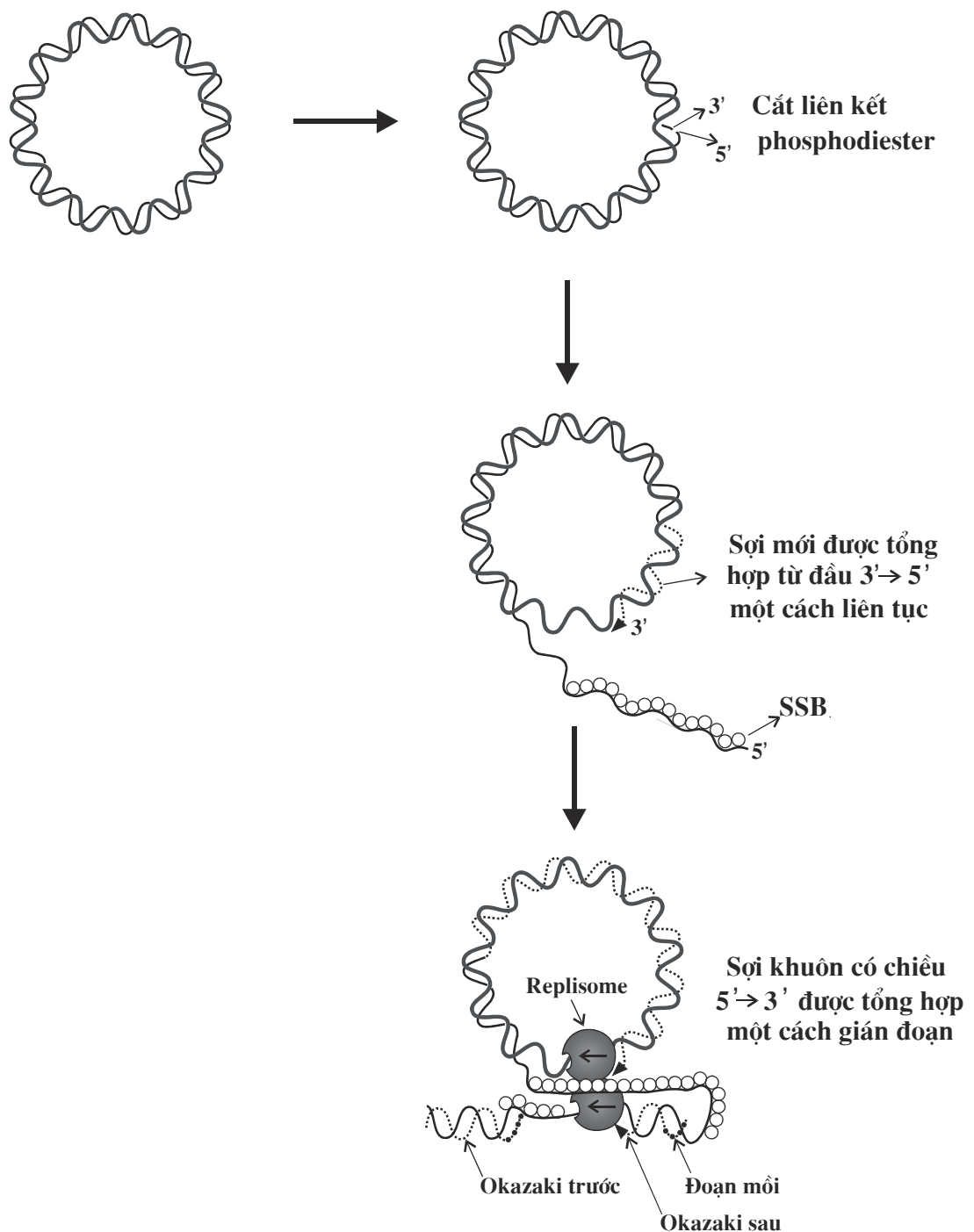
Hình 2-5: Sơ đồ tổng hợp DNA dạng vòng ở vi khuẩn

DNA của tế bào procaryote thường có dạng xoắn kép hình tròn. Quá trình tổng hợp cũng được thực hiện từ một điểm khởi đầu (replication origine) gọi là điểm xuất phát và triển khai ra cả hai phía chạc ba sao mã và lan dần về hai phía, cuối cùng tạo ra hai phân tử DNA lai. Có trường hợp sự tổng hợp chỉ xảy ra về một phía của điểm khởi đầu. Khi DNA dạng vòng tròn đang sao chép, quan sát thấy có dạng hình con mắt (eye replication).

Một đơn vị sao mã thống nhất (từ một điểm xuất phát) gọi là replicon.

Bộ gen của các sinh vật procaryote chỉ có một replicon. Tốc độ tổng hợp DNA của *E. Coli* có thể đạt 50.000 nucleotide/phút, chu kỳ sao mã kéo dài khoảng 20 phút (Hình 2-5).

2.2.3.2- Sao mã kiểu hình tròn xoay



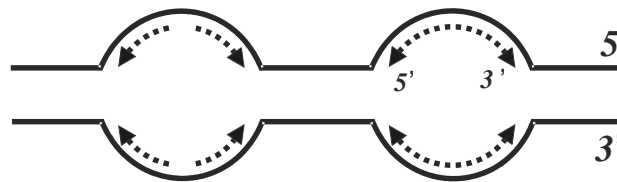
Hình 2-6: Sao mã theo kiểu hình tròn xoay

Ngoài kiểu sao mã có dạng hình con mắt như trên, ở một số vi khuẩn và virus còn có kiểu tổng hợp khác gọi là sao mã *hình tròn xoay*. Quá trình tổng hợp bắt đầu bằng sự cắt liên kết phosphodiester tại một điểm xác định trên một sợi DNA tròn kép tạo ra hai đầu mút, một đầu kết thúc bằng nhóm 3'-OH và đầu kia là đầu 5'-phosphat. Sự tổng hợp một mạch mới một cách

liên tục bằng cách kéo dài mạch từ đầu 3'-OH đồng thời dịch chuyển theo dạng xoay tròn, đầu 5'-P được xoay ra ngoài và một mạch mới khác được tổng hợp gián đoạn theo okazaki, sau khi kết thúc, hai phân tử DNA con được hình thành (Hình 2-6).

2.2.4- Sao mã ở tế bào eucaryote

Ở tế bào eucaryote có nhiều nhiễm sắc thể, đa dạng, mỗi nhiễm sắc thể là một phân tử DNA nằm liên kết với protein, nên quá trình sao mã phức tạp. Nhiều điểm sao mã xảy ra đồng thời, hay nói cách khác là trong cùng một thời điểm có nhiều đơn vị sao mã (replicon). Ví dụ như ở nấm men bánh mì *S. Cerevisiae* có 500 replicon.



Quá trình tổng hợp DNA ở tế bào eucaryote phức tạp hơn và tốc độ chậm hơn (3.000 nucleotide/phút).

Đặc điểm quan trọng trong quá trình sao mã ở tế bào eucaryote là có nhiều đơn vị sao mã xảy ra, đồng thời, trên một phân tử DNA và tế bào có cơ chế kiểm soát nghiêm ngặt quá trình này. Điểm nào đã sao qua một lần rồi thì không lặp lại trước khi toàn bộ phân tử DNA được tái tạo hoàn toàn.

Sau khi sao mã, các DNA con có cấu tạo giống y như DNA mẹ ban đầu được phân chia đều đặn về mỗi tế bào con trong quá trình phân bào.

2.2.5- Sửa sai DNA trong tế bào

2.2.4.1- Sửa sai trong sao mã

Sửa chữa những sai sót trên DNA nhằm khôi phục lại cấu trúc ban đầu là một đặc tính của mọi tế bào sống. Trong quá trình sao mã, các bazơ nitơ cũng có thể bắt cặp sai. Sự bắt cặp sai thường xảy ra là A bắt cặp sai với C (A...C) và G bắt cặp sai với T (G...T). Sở dĩ có sự bắt cặp sai như vậy là do trạng thái tồn tại của các bazơ có những thay đổi, dẫn đến sự nhận biết sai.

Nhờ cơ chế tổng hợp DNA luôn luôn khởi động từ đầu 5' → 3', nên việc sao mã được kiểm soát và sửa chữa một cách chính xác. Các enzyme DNA-polymerase I và III vừa làm chức năng polymer hóa vừa có hoạt tính exonuclease theo hướng 5' → 3' và 3' → 5'. Nếu trên đường di chuyển bắt gặp một nucleotide lắp sai, chúng sẽ lùi lại để cắt bỏ và lắp nucleotide đúng vào.

Khi hệ thống kiểm tra phát hiện có sai sót, các enzyme endonuclease sẽ cắt bỏ đoạn sai, sau đó, enzyme DNA-polymerase I sẽ tổng hợp lại cho đúng và enzyme DNA-ligase sẽ nối lại để phục hồi trạng thái bình thường. Khi tổng hợp nhân tạo phân tử DNA (*invitro*) người ta ước tính sai sót là 10^{-5} , nghĩa là, trong 10^5 nucleotide được tổng hợp thì có 1 nucleotide sai. Ví dụ DNA trong tế bào *E. Coli* có 3×10^6 nucleotide, như vậy cứ sau mỗi lần sao mã thì có 30 nucleotide sai, hay các nhiễm sắc thể ở người có 3×10^9 nucleotide, như vậy cứ sau mỗi lần sao mã thì có 30.000 nucleotide sai. Nếu với tần xuất sai này thì số lượng đột biến sẽ rất lớn. Qua thực tế nghiên cứu cho thấy tần xuất đột biến trong các quần thể sinh vật là nhỏ hơn rất nhiều.

Bằng cách đánh giá tần số đột biến xuất hiện trong các quần thể, người ta ước tính sự sai sót trong sao mã nằm trong khoảng 10^{-9} . Tuy nhiên, trong thực tế, tỉ lệ sai sót còn thấp hơn nhiều, vào khoảng 10^{-10} đến 10^{-11} , điều này chứng tỏ sự tồn tại một hệ thống kiểm tra và sửa sai rất hiệu quả của tế bào.

2.2.4.2- *Sửa sai sau khi sao mã*

Môi trường sống và cơ thể sống có mối quan hệ mật thiết với nhau. Các biến động của môi trường sống luôn tác động đến các sinh vật. Những thay đổi của môi trường bên ngoài có tác động trực tiếp đến bộ máy di truyền, làm biến đổi nó.

1,- *Các tác nhân có thể làm thương tổn DNA trong quá trình tồn tại:*

- Các tia vũ trụ và các tia phóng xạ có năng lượng cao có thể làm biến đổi các bazơ nitơ như gắn thêm các nhóm chức khác vào mạch vòng hay làm đứt vòng, làm đứt các liên kết hydro giữa hai mạch hay làm cắt mạch của DNA,...

- Các tia cực tím trong ánh sáng mặt trời thường gây nên sự dimer hóa các bazơ thymine, hình thành liên kết giữa hai bazơ thymine nằm kề nhau, làm chúng mất khả năng liên kết với bazơ adenine của mạch bổ sung.

- Tác động của các thành phần trong nội bào.

Sự tổn thương phân tử DNA có thể gây ra do quá trình trao đổi chất bất bình thường gây ra các chất độc hại và các gốc tự do bất lợi, hay do hoạt động của các enzyme không đồng bộ làm tổn động những sản phẩm trung gian bất lợi.

Ngoài ra, còn có nhiều tác nhân hóa học khác của môi trường bên ngoài cũng gây nên sự biến đổi có thể xảy ra trên DNA.

2,- Một số khả năng gây biến đổi trên phân tử DNA:

- Gãy mạch hay đứt mạch: Do sợi DNA rất mảnh, bản thân nó lại xoắn cuộn nhiều lần nên rất dễ bị gãy hay đứt mạch do tác động bên ngoài hay khi tháo xoắn.

- Mất các bazơ bổ sung, nghĩa là làm cho bazơ tương ứng không có cặp (như mất bazơ purine).

- Biến bazơ nitơ này thành bazơ khác, gây nên sự bắt cặp sai, như: Khi mất nhóm amin, cytosine sẽ biến nó thành uracil hoặc 5-metyl-cytosine-desamin bị nhận nhầm là thymine.

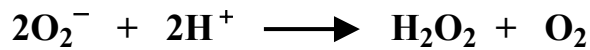
- Các bazơ nitơ có thể tồn tại dưới 2 dạng ceton và enol nên dẫn đến bắt cặp sai.

- Gắn thêm nhóm $-CH_3$, $-C_2H_5$: Khi gắn thêm nhóm ankyl sẽ làm thay đổi tính chất của các bazơ nitơ dẫn đến bắt cặp sai.

3,- Cơ chế phòng ngừa và sửa sai:

Để bảo vệ và thích nghi với những biến đổi, tế bào có cơ chế phòng ngừa và sửa sai. Các cơ chế phòng ngừa của tế bào như hệ thống enzyme khử độc, loại bỏ các độc tố, hệ thống điều hoà cân bằng cần thiết cho tế bào, hệ thống enzyme tham gia sửa sai. Ví dụ sau cho thấy hệ thống sửa sai và phòng ngừa của tế bào:

- Enzyme Superoxide Dismutase (SOD) làm nhiệm vụ giảm độc: Enzyme SOD được phát hiện năm 1968, có mã số EC.1.15.1.1, có mặt trong tất cả các tế bào có chuyển hóa oxy. Chúng xúc tác phản ứng phân huỷ gốc superoxyt O_2^- trong tế bào theo sơ đồ phản ứng sau:



H_2O_2 sẽ được enzyme catalase hoặc peroxydase chuyển hóa. Do đó, SOD cùng với catalase được xem là nhân tố quan trọng có thể giải độc, bảo vệ và chống lão hóa cho tế bào. Gốc O_2^- được sinh ra liên tục và cũng bị phân huỷ không ngừng bởi hoạt động của SOD, do đó, khi SOD có hoạt độ càng cao thì nồng độ O_2^- càng thấp.

- Hệ thống sửa sai trong tế bào rất đa dạng và có hiệu quả với sự tham gia của các enzyme, như photolyase, DNA-methyl-transferase, hệ thống enzyme mã hóa trong hệ thống gen SOS.

Ở vi khuẩn *E.Coli*, do tác động của tia tử ngoại làm xuất hiện các thymine dimer (T=T) trên DNA. Khi có ánh sáng, enzyme photolyase sẽ được hoạt hóa và cắt bỏ liên kết T=T, chuyển về trạng thái bình thường và ổn định.

Hệ thống enzyme nuclease có thể cắt bỏ chỗ sai hỏng bằng nhiều cách và tổng hợp lại cho đúng. Enzyme DNA-methyl-transferase có khả năng loại bỏ gốc methyl trong trường hợp các bazơ bị methyl hóa. Tóm lại, tế bào có cơ chế kiểm tra và sửa những sai sót nếu có. Ngoài ra, tế bào còn có hệ thống SOS (cấp cứu): Hệ thống này hoạt động khi tế bào bị tác động mạnh bởi các tác nhân gây đột biến, tạo nhiều sai hỏng trên DNA. Trong trường hợp cấp bách có nhiều sai hỏng cần cấp cứu, các gen SOS được mở ra. Nếu sửa sai không kịp, tế bào phải chấp nhận hoặc bị đột biến hoặc chết.

Trong tế bào còn có hệ thống điều hoà cân bằng axit-bazơ, tạo điều kiện thuận lợi cho hoạt động trao đổi chất làm giảm khả năng tạo các chất độc hại.

Ở sinh vật đa bào, việc khử độc và loại bỏ nhiều hóa chất gây độc được đảm bảo bởi gan và thận.

2.3- SỰ PHIÊN MÃ (Transcription)

Quá trình tổng hợp phân tử RNA từ khuôn DNA được gọi là quá trình phiên mã (transcription).

Những thông tin di truyền có trong phân tử DNA được sử dụng để tổng hợp protein. Tuy nhiên, phân tử DNA không phải là chất làm khuôn để tổng hợp protein, bởi vì, các phân tử DNA tập trung chủ yếu trong nhiễm sắc thể,

phân bố trong nhân tế bào, còn quá trình tổng hợp protein lại diễn ra trong tế bào chất. Như vậy, phải có một chất trung gian làm nhiệm vụ chuyển thông tin di truyền từ DNA trong nhân ra tế bào chất và làm khuôn cho quá trình tổng hợp protein.

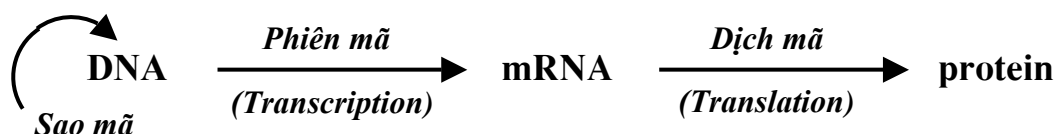
Năm 1957, sau khi khám phá ra cấu trúc phân tử DNA, Francis Crick đã nêu ý tưởng về một chất trung gian truyền thông tin di truyền cho quá trình tổng hợp protein, và dự đoán "người phiên dịch" trung gian đó là RNA. Dự đoán này đã được khẳng định bằng các nghiên cứu chứng minh RNA có cấu tạo hóa học tương tự như DNA và được tổng hợp trên khuôn của DNA.

Năm 1960, có 3 nhóm nghiên cứu độc lập ở Mỹ đã chiết tách được enzyme RNA-polymerase, enzyme này có khả năng tổng hợp phân tử RNA từ khuôn DNA.

Benjamin Hall và Sol Spiegelman (1961) đã tách và tinh sạch RNA và DNA từ thực khuẩn thể T₂. Lấy DNA của T₂ làm biến tính để tách thành 2 sợi đơn. Khi cho các sợi đơn DNA bắt cặp với sợi đơn RNA thì chúng tạo thành dạng phân tử lai DNA/RNA. Tuy nhiên, khi họ lấy DNA của các cơ thể khác trộn với RNA của T₂ thì chúng không bắt cặp, nghĩa là không tạo phân tử lai. Điều đó chứng tỏ rằng, RNA của T₂ đã được tổng hợp trên khuôn DNA của nó theo cơ chế bổ sung nên chúng có thể bắt cặp và tạo thành phân tử lai.

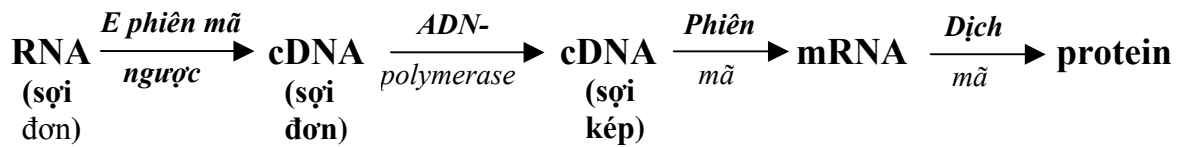
Những bằng chứng khác như RNA tập trung chủ yếu ở tế bào chất nhưng chúng cũng có mặt trong nhân tế bào. Ở những loại tế bào mà sự tổng hợp protein xảy ra mạnh mẽ thì hàm lượng RNA tập trung nhiều hơn so với những tế bào ít tổng hợp protein.

Như vậy, RNA chính là chất trung gian truyền thông tin di truyền để tổng hợp protein. Mối quan hệ giữa DNA, RNA và protein được thể hiện như sau:



Về sau, người ta còn phát hiện quá trình phiên mã ngược, nghĩa là, phân tử DNA được tổng hợp trên khuôn của phân tử RNA. Quá trình phiên mã ngược được enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase) xúc tác.

Enzyme này được phát hiện lần đầu tiên khi nghiên cứu sự sao chép bộ gen của virus gây ung thư (retrovirus). Đầu tiên, enzyme phiên mã ngược sẽ tổng hợp sợi DNA đơn (cDNA) trên khuôn của phân tử RNA, sau đó, enzyme DNA-polymerase sẽ tổng hợp mạch bổ sung để tạo thành sợi DNA kép (cDNA kép). Quá trình có thể biểu diễn qua sơ đồ sau:



2.3.1- Đặc điểm chung của quá trình phiên mã

Sự phiên mã được thực hiện theo một số nguyên tắc chung sau:

- Sản phẩm phiên mã là một sợi polyribonucleotide mạch đơn (RNA).
- Để thực hiện phiên mã, phân tử DNA phải dẫn xoắn cục bộ. Đối với mỗi gen, chỉ một trong hai sợi DNA được chọn làm khuôn để tổng hợp phân tử RNA. Enzyme RNA-polymerase sẽ quyết định việc chọn sợi làm khuôn và xúc tác quá trình tổng hợp phân tử RNA.
- Phân tử RNA mới được tổng hợp theo chiều từ đầu 5'-phosphat đến đầu 3'-OH.
- Sự phiên mã được thực hiện khi có mặt của các enzyme và 4 loại nucleotide là GTP, CTP, UTP và ATP.
- Phân tử RNA được tổng hợp theo cơ chế bổ sung tương tự như sự sao mã ở DNA nhưng đối diện với A trên sợi DNA sẽ là U trên RNA.
- Không có cơ chế sửa sai đi kèm với quá trình phiên mã, do vậy, những sai sót sẽ dẫn đến sự sai khác trong biểu hiện gen. Tuy nhiên, sự sai khác trong quá trình phiên mã không ảnh hưởng gì đến việc truyền đạt thông tin di truyền cho thế hệ sau.

2.3.2- Phiên mã tổng hợp mRNA ở procaryote

2.3.2.1- Enzyme RNA-polymerase ở procaryote

Ở các sinh vật procaryote chỉ có một loại enzyme RNA-polymerase, nó chịu trách nhiệm xúc tác quá trình tổng hợp cả ba loại RNA là mRNA, tRNA và rRNA. RNA-polymerase của vi khuẩn *E. Coli* được nghiên cứu kỹ nhất.

Enzyme này có cấu trúc bậc 4 rất phức tạp, bao gồm hai hợp phần chính là enzyme lõi và nhân tố σ . Nhân tố σ có thể tách ra khỏi enzyme lõi, có trọng lượng phân tử là 70.000dalton ($1\text{dalton}=1,66\times 10^{-24}\text{g}=1/12$ khối lượng nguyên tử carbon). Enzyme lõi được cấu tạo từ 5 chuỗi polypeptide: hai chuỗi α , một chuỗi β , một chuỗi β' và một chuỗi ω . Ngoài ra, ở enzyme lõi còn có nhân tố phiên mã là ρ và *nus A*. Các nhân tố phiên mã này dễ dàng tách ra khỏi enzyme lõi, nên trong quá trình tách và tinh sạch enzyme thường không tìm thấy.

Bảng 2-1: Các tiểu đơn vị RNA-polymerase của *E. Coli*

Tiểu đơn vị	Số lượng	Trọng lượng phân tử (dalton)	Chức năng
β' (beta)	1	160.000	- liên kết với DNA khuôn
β (beta)	1	150.000	- kéo dài mạch RNA
α (alpha)	2	42.000	- chưa rõ
ω (omega)	1	11.000	- chưa rõ
σ (sigma)	1	70.000	- nhận biết promoter
ρ (rho)	6	46.000	- kết thúc phiên mã
Nus A	1	70.000	- kéo dài và kết thúc

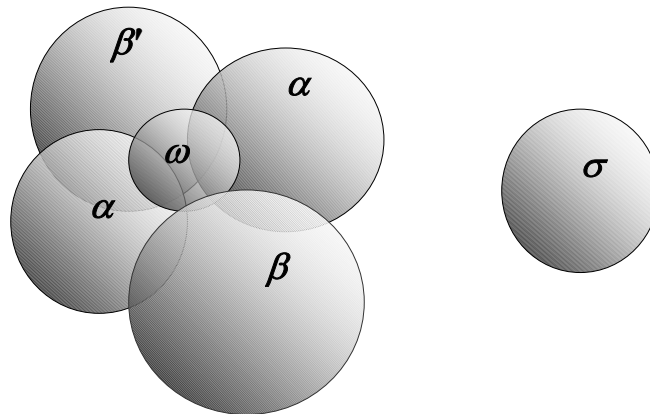
Tư liệu dựa theo S.C. Rastogi

Giữa các sợi polypeptide trong enzyme lõi không có liên kết đồng hóa trị bền vững mà chỉ hình thành các liên kết thứ cấp. Trọng lượng phân tử của các chuỗi polypeptide được biểu diễn ở Bảng 2-1.

Chức năng của chuỗi β' là liên kết với sợi DNA khuôn, còn chuỗi β có tác dụng xúc tác hình thành liên kết phosphodiester. Vai trò của hai chuỗi α hiện chưa biết rõ.

Nhân tố σ đóng vai trò quan trọng trong việc tổng hợp RNA, nó giúp cho enzyme lõi có thể khởi đầu quá trình phiên mã tại một điểm đặc thù.

Nhiều thí nghiệm (*in vitro*) cho thấy, khi thiếu nhân tố σ , enzyme lõi sẽ khởi đầu phiên mã một cách tùy tiện, không đúng vị trí quy định. Ở *E. Coli*, người ta đã tìm thấy 3 loại nhân tố σ , mỗi loại có trọng lượng phân tử riêng. RNA-polymerase phát hiện ra promoter, sau đó gắn lên phân tử DNA, mở xoắn cục bộ và thực hiện quá trình tổng hợp phân tử RNA. Sự có mặt của Mg^{+2} là cần thiết cho hoạt động xúc tác của enzyme RNA-polymerase.



Hình 2-7: Cấu trúc RNA-polymerase ở procaryote

2.3.2.2- Phiên mã tổng hợp mRNA ở procaryote

Đặc điểm của mRNA procaryote là mỗi phân tử mang dữ liệu thông tin cho sự tổng hợp nhiều sợi polypeptide đồng thời (polycistronic mRNA).

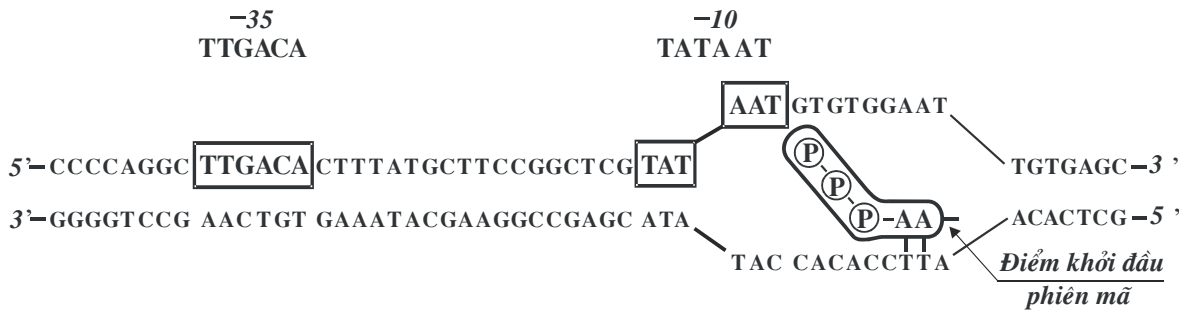
Phiên mã tổng hợp mRNA ở procaryote được nghiên cứu khá kỹ ở vi khuẩn *E. Coli*. Quá trình này có thể chia làm 3 giai đoạn: khởi động, kéo dài và kết thúc.

1,- Giai đoạn khởi động:

Tiểu đơn vị σ của enzyme RNA-polymerase nhận biết và gắn enzyme vào promoter để khởi động quá trình phiên mã. Promoter là đoạn phân tử

DNA có cấu trúc đặc biệt, giúp enzyme RNA- polymerase nhận biết vị trí bắt đầu của sự phiên mã.

Enzyme RNA-polymerase gắn vào trình tự -35 của ptomoter, trượt dọc theo phân tử DNA đến trình tự -10 thì mở xoắn, làm lộ sợi làm khuôn, đoạn mở xoắn có độ dài khoảng 12÷17 nucleotide, quá trình phiên mã bắt đầu tại vị trí xác định.

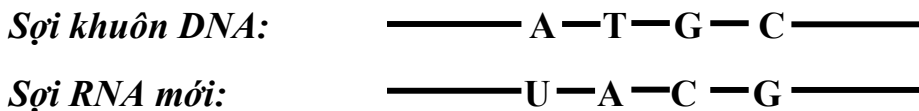


Hình 2-8: Khởi đầu phiên mã ở promoter UV5 operon lactose

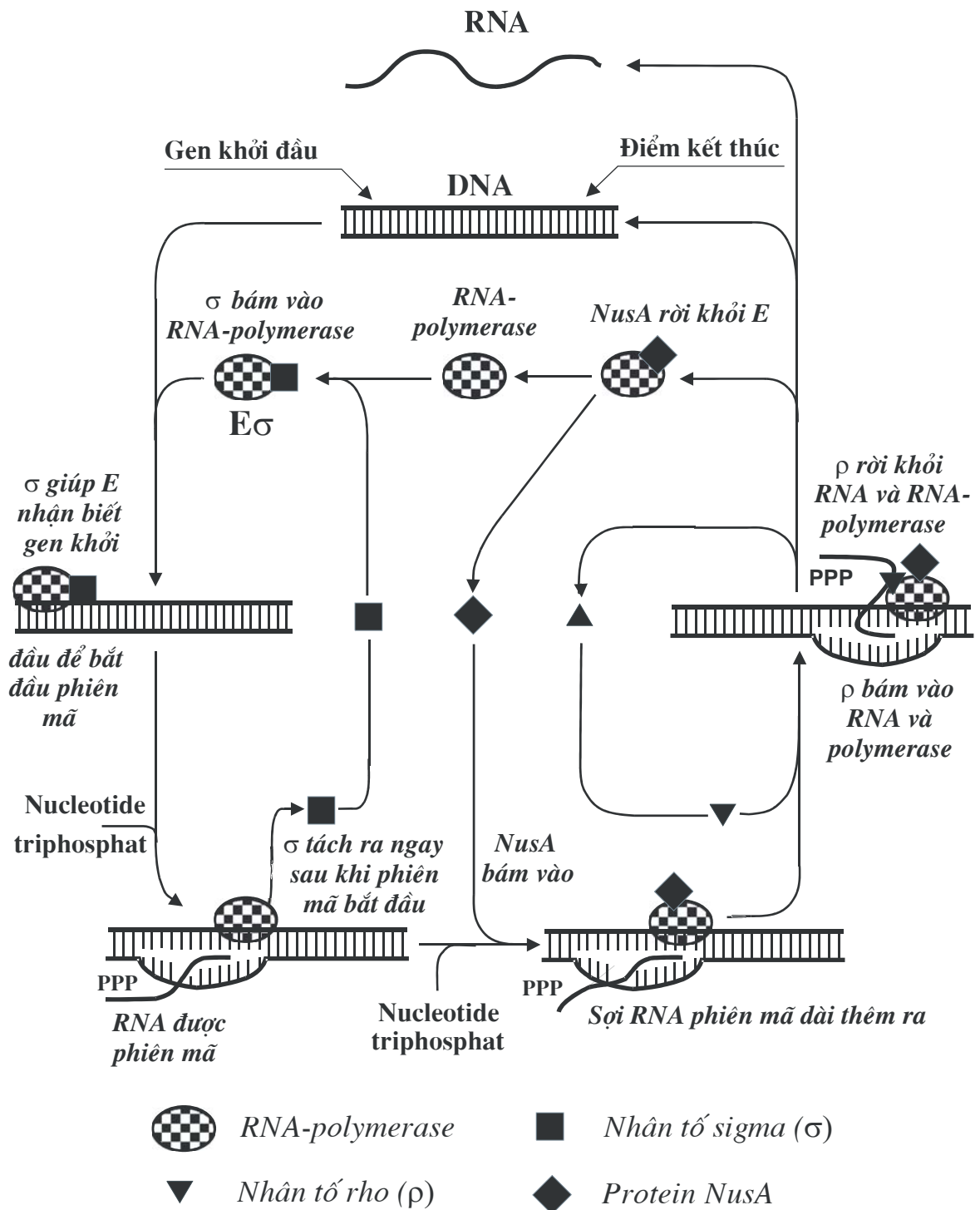
Sau khi tổng hợp được đoạn RNA ngắn khoảng 8÷10 nucleotide thì nhân tố σ tách khỏi enzyme lõi và sợi khuôn DNA, kết thúc giai đoạn mở đầu. Sau đó, nhân tố σ có thể kết hợp với một enzyme lõi khác để khởi đầu một sự phiên mã mới.

2,- Giai đoạn kéo dài:

Sau khi nhân tố σ tách khỏi phức hợp, một nhân tố kéo dài là protein Nus A gắn vào, enzyme DNA-polymerase tiếp tục chuyển dịch dọc theo gen, làm giãn xoắn sợi DNA và thực hiện quá trình polymer hóa, kéo dài sợi RNA mới. Sợi mRNA được tổng hợp theo nguyên tắc bổ sung: A đối diện với U, T đối diện với A, G đối diện với C và C đối diện với G, như sau:



Khi enzyme RNA-polymerase trượt dọc theo gen đến đâu thì sự tháo xoắn và tổng hợp mới được thực hiện đến đó, còn đoạn gen sau khi đã tháo xoắn, phân tử RNA-polymerase trượt qua rồi thì được xoắn trở lại cấu trúc ban đầu (Hình 2-9).



Hình 2-9: Sơ đồ biểu diễn quá trình tổng hợp RNA

3,- Giai đoạn kết thúc:

Trên sợi DNA khuôn có chứa đoạn mã kết thúc, có chức năng làm dừng quá trình phiên mã ở điểm qui định. Tại điểm kết thúc, enzyme RNA-polymerase dừng quá trình nối các nucleotide, giải phóng phân tử RNA mới tổng hợp ra khỏi phức hệ enzyme và DNA khuôn, đồng thời, enzyme cũng tách khỏi sợi DNA để có thể đến với một trình tự khởi động mới.

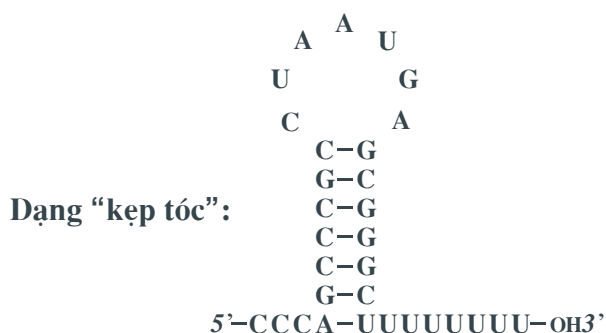
Có hai kiểu kết thúc phiên mã:

- Thứ nhất: Enzyme RNA-polymerase tiếp nhận tác nhân kết thúc ρ .
- Thứ hai: Kết thúc xảy ra không cần sự có mặt của tác nhân ρ .

Khi nghiên cứu về cách kết thúc phiên mã theo kiểu thứ hai ở vi khuẩn và phage, người ta nhận thấy có hai điểm đặc trưng về cách sắp xếp các bazơ nitơ ở đoạn cuối trên sợi làm khuôn như sau:

- Có 2 trình tự đối xứng bổ sung phía trước điểm kết thúc.
- Một đoạn poly A nằm ngay trước điểm kết thúc (Hình 2-10).

Nhờ cấu trúc đặc biệt như vậy nên sau khi hai trình tự đối xứng bổ sung được hình thành trên sợi RNA, chúng có thể bắt cặp với nhau, tạo thành cấu trúc có dạng "kẹp tóc", ngăn cản RNA-polymerase phiên mã tiếp tục, đồng thời, có tác dụng kéo sợi RNA mới được tổng hợp ra khỏi phức hệ enzyme và sợi khuôn. Quá trình tổng hợp sẽ dừng lại ở đoạn poly-U.



Hình 2-10: Sơ đồ biểu diễn cách hình thành cấu trúc dạng "kẹp tóc"

Tại các vị trí kết thúc cần sự có mặt của protein kết thúc phiên mã ρ , cấu trúc của đoạn DNA khuôn thường thấy thiếu đoạn poly-A trước điểm kết thúc và không phải lúc nào cũng có các trình tự đối xứng bổ sung để có thể hình thành dạng "kẹp tóc" nêu trên.

Hiện nay, chúng ta còn chưa biết rõ, bằng cách nào mà nhân tố ρ tác động lên quá trình kết thúc phiên mã. Có thể nó đã sử dụng năng lượng từ phân tử ATP để thực hiện sự tác động này.

Một đặc điểm nổi bật ở tế bào sinh vật procaryote là các phân tử DNA nằm trong tế bào chất, nên quá trình phiên mã và dịch mã được tiến hành đồng thời.

2.3.3- Phiên mã tổng hợp mRNA ở eucaryote

Sự phiên mã ở eucaryote xảy ra phức tạp hơn nhiều so với ở procaryote. Đặc điểm của mRNA eucaryote là mỗi phân tử mang dữ liệu thông tin cho sự tổng hợp một polypeptide. Quá trình phiên mã được thực hiện trong nhân tế bào, còn sự dịch mã xảy ra ở tế bào chất, hai quá trình này xảy ra ở hai vị trí khác nhau.

2.3.3.1- *Enzyme RNA-polymerase ở eucaryote*

Ở tế bào eucaryote có 3 loại enzyme RNA-polymerase, mỗi loại đảm nhận một chức năng riêng biệt, RNA-polymerase I chịu trách nhiệm tổng hợp rRNA; RNA-polymerase II chịu trách nhiệm tổng hợp mRNA và RNA-polymerase III chịu trách nhiệm tổng hợp các loại RNA có kích thước nhỏ như tRNA, RNA 5S ở ribosome và các phân tử RNA nhỏ khác.

Cấu trúc của các RNA-polymerase ở sinh vật eucaryote rất phức tạp, có trọng lượng phân tử lớn và cũng được hình thành từ nhiều tiểu đơn vị như enzyme RNA-polymerase ở sinh vật procaryote. Số lượng tiểu đơn vị cấu tạo thường ở khoảng 10.

Mỗi loại RNA-polymerase chịu trách nhiệm chính để tổng hợp một loại RNA, do vậy, các RNA-polymerase khác nhau sẽ có khả năng nhận biết promoter của mình để khởi đầu phiên mã đúng vị trí. Nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy, ở eucaryote, trình tự đoạn DNA promoter dài hơn so với ở tế bào procaryote, đặc biệt là đôi khi còn có sự hiện diện của nhóm trình tự khuếch đại (enhancer), có tác dụng làm tăng biểu hiện gen.

Ngoài 3 loại RNA-polymerase chủ yếu kể trên, trong tế bào sinh vật eucaryote còn có các RNA-polymerase của ty thể và của lục lạp thể. Các enzyme này chịu trách nhiệm phiên mã các gen nằm trên DNA ty thể và lục lạp thể.

2.3.3.2- *Quá trình phiên mã ở eucaryote*

DNA của tế bào eucaryote tập trung chủ yếu trong các nhiễm sắc thể trong nhân, có phân tử lượng lớn và chứa nhiều gen. Phần lớn các gen, ở phần mang mã để tổng hợp protein, có sự đan xen giữa các đoạn mang mã (exon) và các đoạn không mang mã (intron). Do vậy, quá trình phiên mã xảy ra phức tạp hơn và thường bao gồm hai quá trình chính:

- Quá trình phiên mã tạo nên phân tử mRNA đầu tiên, gọi là phân tử tiền mRNA.

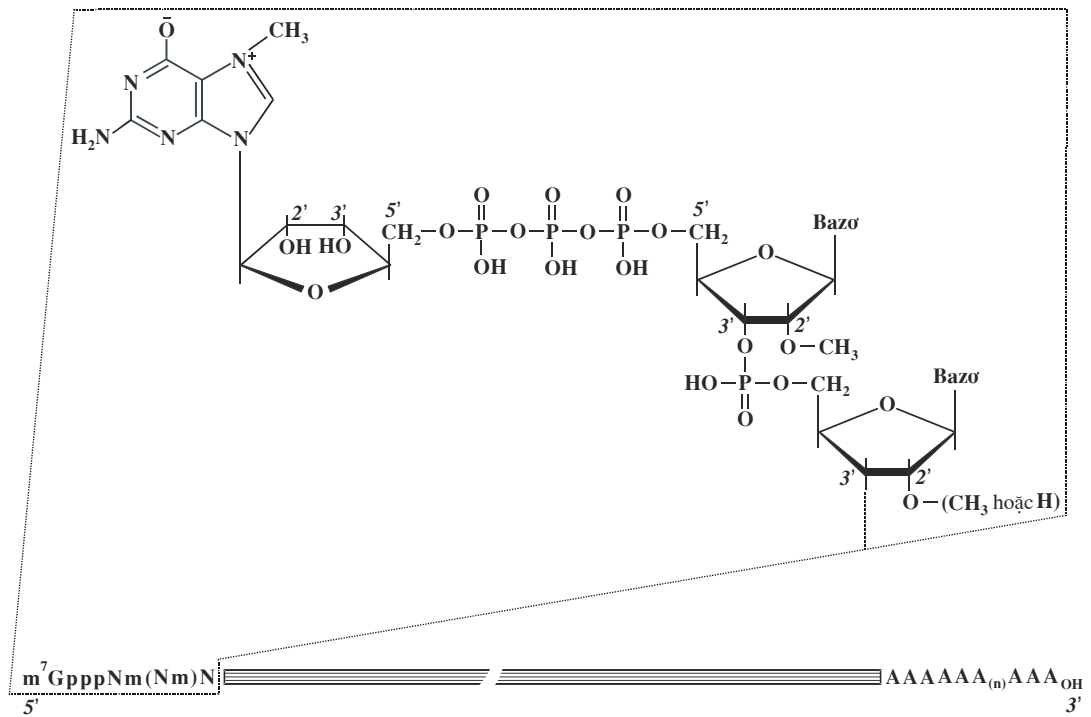
- Quá trình biến đổi phân tử tiền mRNA thành phân tử mRNA trưởng thành.

Quá trình phiên mã tạo nên phân tử tiền mRNA cũng được thực hiện theo các giai đoạn tương tự như quá trình phiên mã ở tế bào procaryote: Tức là, enzyme RNA-polymerase cùng với tác nhân khởi động phiên mã nhận biết promoter và khởi động phiên mã ở vị trí chính xác, tiếp theo đó là quá trình kéo dài mạch mRNA và kết thúc phiên mã tại vị trí xác định. Enzyme RNA-polymerase II sẽ chịu trách nhiệm phiên mã tổng hợp phân tử mRNA.

Phân tử tiền mRNA trải qua một số biến đổi mới trở thành phân tử mRNA trưởng thành. Quá trình biến đổi bao gồm: gắn mũ, hình thành đuôi poly-A và loại bỏ các intron, nối các exon.

1,- *Gắn mũ (capping):*

Phân tử mRNA được tổng hợp theo hướng từ đầu 5'-P đến đầu 3'-OH. Sau khi phân tử tiền mRNA hình thành được một đoạn thì ở đầu 5'-P được gắn thêm một nucleotide là 7-methylguanosine (Hình 2-11). Với chiều ngược lại tạo liên kết phosphodiester giữa hai cacbon thứ 5 của hai nucleotide. Tạo mạch liên kết 5'-5' thường được gọi là "mũ". Sau khi được gắn "mũ" thì ở đầu 5' của phân tử mRNA cũng sẽ có nhóm 3'-OH tự do ở gốc đường giống như ở đầu 3'. Tuy vậy, nhờ nhóm methyl (-CH₃) ở vị trí nitơ thứ 7 của bazơ guanosine có thể phân biệt được đầu 5'. Như vậy, sau khi gắn "mũ", đầu 5' không còn nhóm phosphat tự do nữa. "Mũ" giúp cho ribosome nhận biết và gắn vào đầu 5' của mRNA, khởi đầu dịch mã đúng vị trí qui định, đồng thời, "mũ" bảo vệ mRNA khỏi bị các enzyme nuclease phân huỷ.



Hình 2-11: Cấu tạo "mũ" chụp ở đầu 5' của mRNA

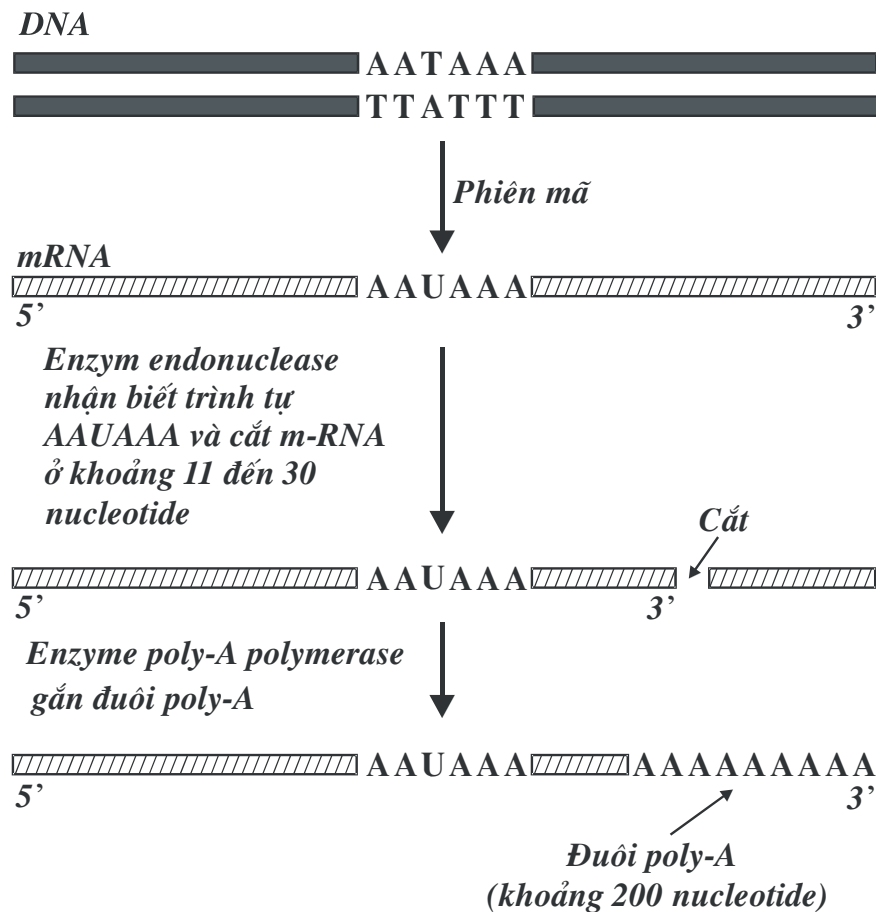
2.- Hình thành đuôi poly-A ở đầu 3'-OH:

Người ta phát hiện rằng, trong phần lớn các phân tử mRNA của nấm men và tế bào eucaryote, ở đầu 3' có chứa một trình tự dài khoảng 200 nucleotide với các bazơ adenine (A) gọi là đuôi poly-A. Đuôi poly-A là điểm đặc trưng của các phân tử mRNA ở eucaryote. Ở các loại RNA khác như rRNA, tRNA không có đuôi poly-A. Đuôi poly-A được gắn vào sau khi phân tử tiền mRNA đã được tổng hợp xong. Enzyme chịu trách nhiệm gắn đuôi poly-A vào tiền mRNA là poly-A-polymerase.

Quá trình hình thành đuôi poly-A được tiến hành theo mô tả ở Hình 2-12. Ở đầu 3'-OH của phân tử tiền mRNA có chứa một trình tự nhận biết là AAUAAA. Một enzyme endonuclease đặc hiệu nhận biết và cắt sợi tiền mRNA ở một vị trí khoảng từ 11 đến 30 nucleotide sau trình tự nhận biết về phía đầu 3'-OH, tiếp sau đó, enzyme poly-A-polymerase sẽ xúc tác gắn các nucleotide A vào đầu 3'-OH tạo thành đuôi poly-A. Độ dài đuôi poly-A của các mRNA thay đổi tùy theo loài và giai đoạn phát triển của tế bào.

Khi mRNA di chuyển từ nhân ra tế bào chất cũng như trong quá trình tồn tại, đuôi poly-A bị thoái hóa ngắn dần. Đuôi poly-A càng dài, thời gian tồn tại của mRNA trong tế bào càng lâu. Trong một số ít trường hợp, mRNA

không có đuôi poly-A như các mRNA phiên mã từ gen mã hóa histon không có đuôi poly-A.

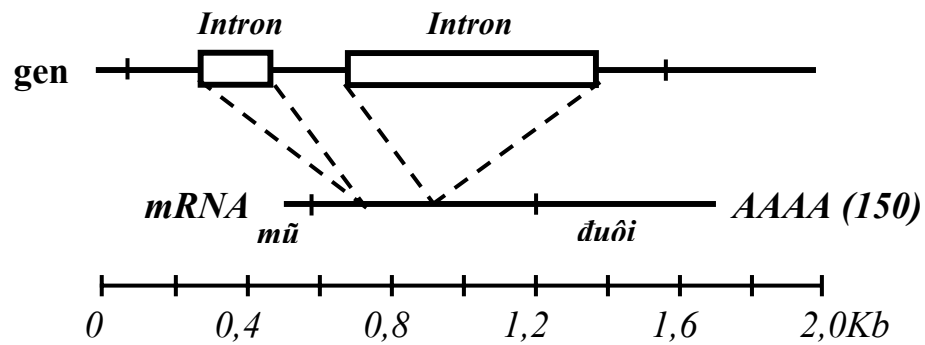


Hình 2-12: Sơ đồ về sự hình thành đuôi poly-A

3,- *Cắt bỏ intron và nối các exon (splicing):*

Các gen ở sinh vật eucaryote thường rất dài. Phần lớn có chứa các đoạn không mang mã cho protein (intron) xen lẫn với đoạn mang mã (exon). Nhiều gen có tổng độ dài của các intron lớn hơn tổng độ dài của các exon. Ví dụ như gen mã hóa cho β -globulin có 2 intron: Một intron nhỏ có độ dài 116 cặp bazơ và một intron lớn có độ dài là 646 cặp bazơ, thêm vào đó, ở đầu 5' có 52 cặp bazơ và ở đầu 3' có 110 cặp bazơ không mang mã cho protein. Tổng độ dài của các đoạn không mang mã lớn hơn tổng độ dài của các đoạn mang mã (Hình 2-13).

Tương tự như vậy, ở gen mã hóa cho ovalbumin cũng có tổng độ dài của các đoạn intron lớn hơn tổng độ dài của các đoạn exon cộng lại.



Hình 2-13: So sánh độ dài của mRNA của β -globulin của chuột với độ dài của gen mã hóa

Đối với các gen có chứa intron thì sau khi hình thành bản phiên mã đầu tiên phải trải qua giai đoạn cắt bỏ intron và nối các exon để tạo thành phân tử RNA trưởng thành. Quá trình này xảy ra theo hai bước chính: Các endonuclease thực hiện vết cắt ở ranh giới giữa intron và exon, tiếp theo đó là sự nối các exon lại và loại bỏ intron.

Trong quá trình loại bỏ intron và nối các exon có sự tham gia của các phân tử ghép nối (spliceosome) đó là phức hợp giữa RNA có phân tử lượng nhỏ giàu uracil có mặt trong nhân tế bào với một số protein chuyên biệt trong nhân.

Sau khi các intron được loại bỏ, các exon được nối lại, phân tử mRNA trưởng thành lúc này có mũ chup ở đầu 5', đuôi poly-A ở đầu 3' và các trình tự mang mã cho protein. mRNA trưởng thành sẽ đi qua lỗ màng nhân vào tế bào chất kết hợp với ribosome thực hiện quá trình tổng hợp protein.

Tuy nhiên, không phải tất cả các gen trong tế bào sinh vật eucaryote đều có chứa intron. Có một số gen không có intron, ví dụ như phần lớn các gen mã hóa cho các protein histon. Trong trường hợp này, quá trình phiên mã tạo mRNA sẽ không có giai đoạn splicing.

2.3.4- Phiên mã tổng hợp tRNA

Trong bộ gen của tế bào procaryote cũng như eucaryote có các gen mã hóa cho tRNA. Ở vi khuẩn, thông thường một gen có thể mã hóa cho một số tRNA khác nhau. Ví dụ ở *E. Coli*, một gen có thể mã hóa cho 7 loại tRNA khác nhau. Tuy vậy, đôi lúc người ta cũng tìm thấy có những gen chỉ mã hóa cho một tRNA.

Quá trình phiên mã tổng hợp tRNA ở vi khuẩn do enzyme RNA-polymerase xúc tác, còn ở nấm men và các sinh vật đa bào do enzyme RNA-polymerase III xúc tác. Sự phiên mã tổng hợp tRNA ở sinh vật nói chung thường diễn ra theo 2 giai đoạn:

- Phiên mã tổng hợp phân tử tiền tRNA chung,
- Cắt bỏ các intron tạo phân tử tRNA hoàn thiện.

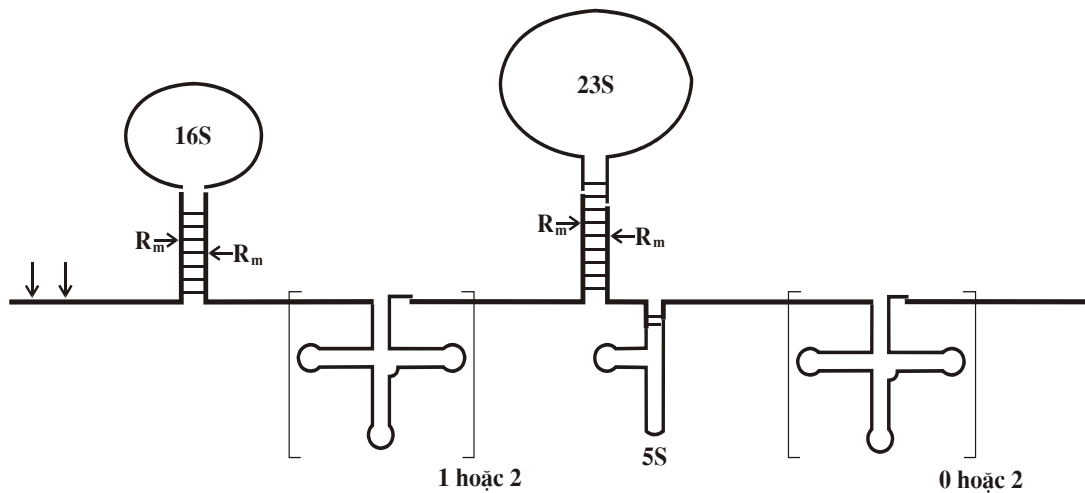
Trong trường hợp một gen mã hóa cho nhiều tRNA thì ở bản phiên mã đầu tiên có đoạn dẫn đầu ở đầu 5', đoạn cuối ở đầu 3' và các đoạn đệm nằm giữa các tRNA cần được loại bỏ để tạo các phân tử tRNA hoàn thiện. Phân tử tiền tRNA sẽ được một endonuclease là ribonuclease P (RNase P) cắt tại các vị trí xác định ở đầu 5', tạo đầu 5'-phosphat và một exonuclease khác là ribonuclease D cắt bỏ đoạn không mang mã ở đầu 3', tạo đầu 3'-OH. Tuy nhiên, ở đầu 3' của tRNA luôn có bộ ba CCA cuối cùng, là nơi axit amin gắn vào. Nếu ribonuclease D cắt sai vị trí ở đầu 3' thì enzyme đặc hiệu CCA-nucleotidyltransferase sẽ sửa sai để đầu 3' luôn có bộ ba CCA. Mỗi loại tRNA đặc hiệu cho một axit amin, do vậy, có ít nhất là 20 loại tRNA.

Ở tế bào eucaryote, số lượng gen mã hóa cho tRNA nhiều hơn ở tế bào vi khuẩn. Ở tế bào nấm men *S. Cerevisiae*, người ta đã xác định được 46 loại tRNA khác nhau, nhưng có đến khoảng 360 gen mã hóa cho các tRNA này. Như vậy, tính trung bình, mỗi tRNA có khoảng 8 gen mã hóa riêng biệt. Tuy nhiên, con số này không thể chia đều như vậy mà thông thường, những loại axit amin nào có mặt trong protein với số lượng lớn thì số lượng gen mã hóa cho tRNA vận chuyển axit amin đó sẽ nhiều hơn. Các gen mã hóa cho một loại tRNA thường phân bố trên các nhiễm sắc thể khác nhau. Do đó, các promoter của các gen đóng vai trò quan trọng trong sự kiểm soát quá trình phiên mã.

2.3.5- Phiên mã tổng hợp rRNA

Các phân tử rRNA cũng được tổng hợp từ các gen mã hóa cho chúng trên DNA. Trong tế bào procaryote có 3 loại rRNA tham gia vào quá trình tổng hợp protein là 16S, 23S và 5S; còn ở tế bào eucaryote, các rRNA có mặt trong ribosome là 18S, 28S và 5,8S.

Quá trình phiên mã tổng hợp rRNA cũng xảy ra theo hai bước như ở tRNA. Phân tử tiền rRNA được tổng hợp đầu tiên dựa trên khuôn DNA. Ở tế bào eucaryote, quá trình được xúc tác nhờ enzyme RNA-polymerase I. Phân tử tiền rRNA trải qua giai đoạn cắt loại intron để tạo các phân tử rRNA hoàn thiện.



R_m - Vị trí cắt của enzyme RNase III trên sợi tiền RNA

Hình 2-14: Nhiều rRNA có mặt trong cùng một phân tử tiền RNA ở *E. Coli*

Ở vi khuẩn *E. Coli*, một gen thường mã hóa cho một số phân tử rRNA. Ví dụ 3 loại rRNA là 16S, 23S và 5S được mã hóa trong một gen. Khi phiên mã sẽ tạo một phân tử tiền rRNA chung cho cả 3 loại rRNA trên, sau đó, các enzyme ribonuclease sẽ thực hiện quá trình cắt loại các intron để tạo 3 phân tử rRNA hoàn thiện. Cũng có trường hợp, trong một operon mã hóa cho rRNA có cả phân mã hóa cho cả tRNA (Hình 2-14).

2.4- DỊCH MÃ (Translation)

2.4.1- Đặc điểm chung của quá trình dịch mã

Dịch mã là quá trình tổng hợp chuỗi polypeptide dựa trên các thông tin mã hóa trên mRNA về trình tự sắp xếp các axit amin trên sợi polypeptide đó. Quá trình dịch mã phức tạp hơn nhiều so với quá trình sao mã và phiên mã. Dịch mã được thực hiện ở ribosome với sự tham gia của ba loại RNA. Mỗi ribosome gồm một đơn vị lớn và một đơn vị nhỏ. Ở tế bào vi khuẩn, tiểu đơn vị lớn chứa hai sợi rRNA là 23S và 5S, còn ở tiểu đơn vị nhỏ chứa một sợi rRNA 16S. Ở tế bào nấm men và sinh vật đa bào, tiểu đơn vị lớn chứa hai sợi

rRNA là 28S và 5,8S , còn tiểu đơn vị nhỏ chứa một sợi rRNA là 18S. Khi không tiến hành tổng hợp protein, mỗi đơn vị tồn tại tách rời trong tế bào chất. Trong thời gian dịch mã, hai tiểu đơn vị ribosome kết hợp với mRNA và tRNA thực hiện quá trình tổng hợp protein. Hướng dịch mã trên mRNA từ đầu 5' đến đầu 3'. Quá trình dịch mã được tiến hành khi hội tụ đủ các yếu tố như sự có mặt của mRNA, các ribosome, tRNA, các axit amin và các enzyme cần thiết, đảm bảo quá trình vận chuyển và hình thành liên kết peptit.

Dịch mã được thực hiện ở tế bào chất. Ở sinh vật procaryote, hai quá trình dịch mã và phiên mã xảy ra đồng thời. Sau khi sợi mRNA được phiên mã được một đoạn thì quá trình dịch mã khởi đầu. Ở sinh vật eucaryote, hai quá trình này xảy ra độc lập ở hai vị trí khác nhau.

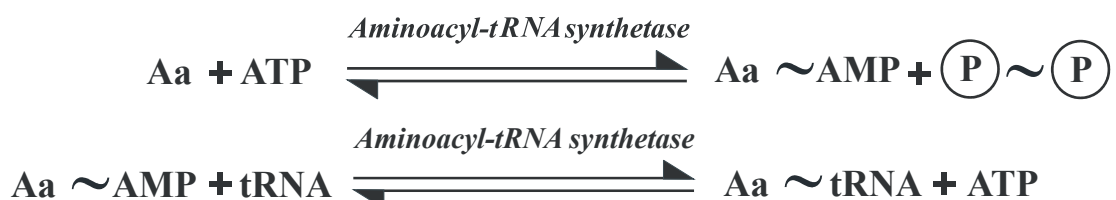
2.4.2- Sự hoạt hóa và vận chuyển axit amin

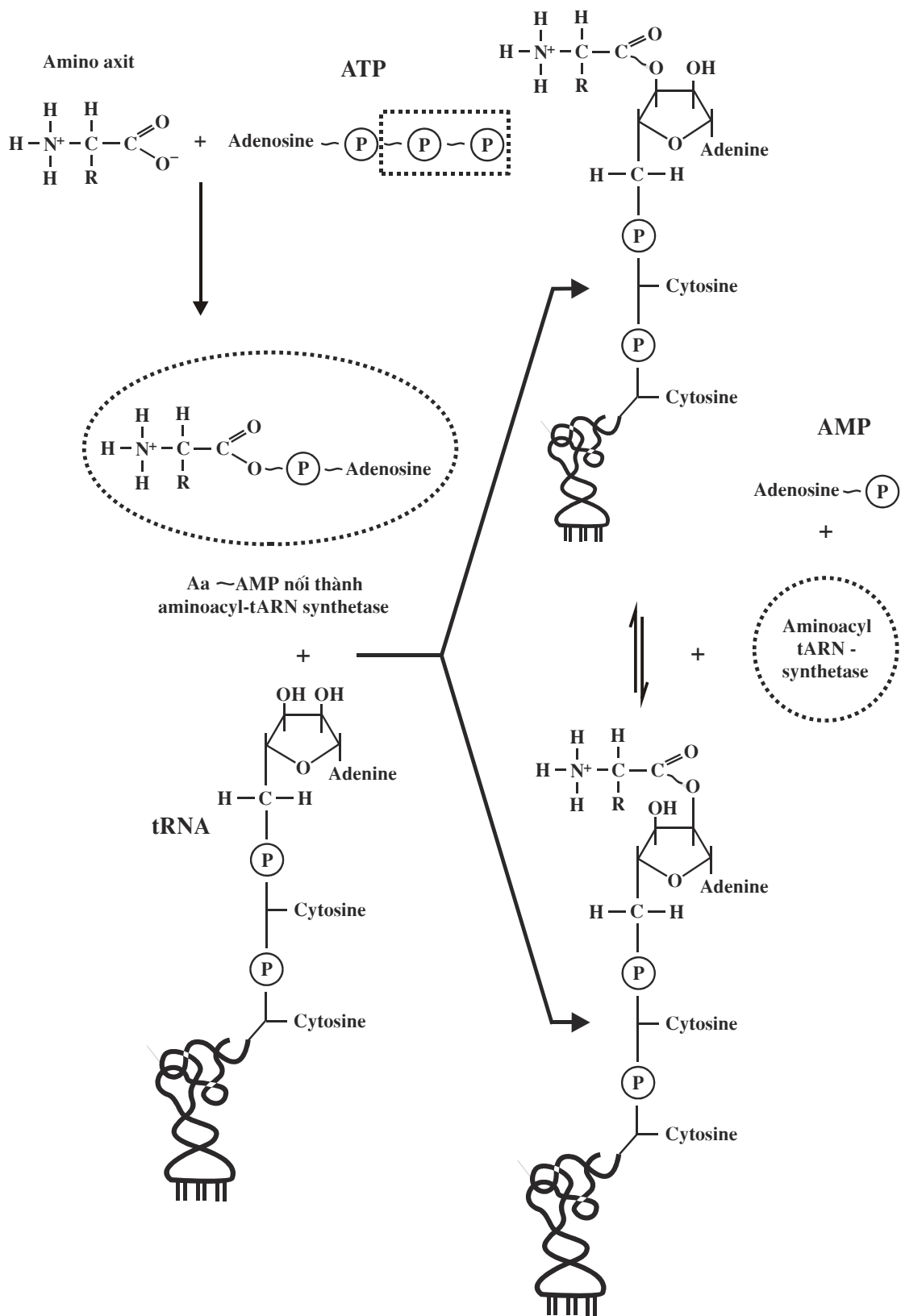
Các phân tử tRNA làm nhiệm vụ vận chuyển các axit amin cho quá trình tổng hợp protein. Mỗi axit amin có ít nhất một phân tử tRNA làm nhiệm vụ vận chuyển.

Các axit amin (Aa) được hoạt hóa nhờ enzyme aminoacyl-tRNA synthetase với năng lượng từ phân tử ATP. Enzyme này làm nhiệm vụ gắn axit amin vào đầu 3' của phân tử tRNA. Bộ ba cuối cùng ở đầu 3' của phân tử tRNA là –CCA. Nhóm cacboxyl của axit amin sẽ tạo liên kết đồng hóa trị với gốc đường ribose ở nucleotide cuối.

Sản phẩm trung gian: Aa~AMP sau khi xuất hiện lập tức gắn với phân tử enzyme cho đến khi gặp tRNA tương ứng thì axit amin sẽ được trao cho tRNA hình thành tổ hợp Aa~t-RNA, giải phóng AMP.

Quá trình chuyển hóa có thể biểu diễn như sau:





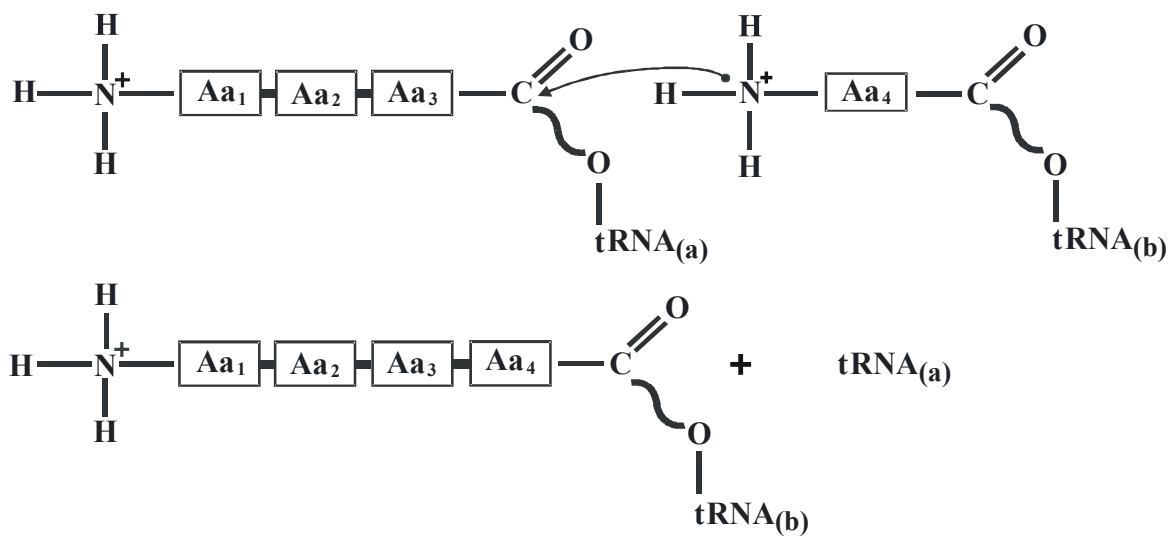
Hình 2-15: Sơ đồ biểu diễn quá trình gắn axit amin vào tRNA của enzyme aminoacyl-tRNA synthetase

Các axit amin luôn được gắn vào tRNA của nó một cách chính xác, điều đó cho thấy: trong phân tử enzyme phải có những vùng làm chức năng nhận biết các cơ chất của nó một cách chính xác. Trong mỗi tế bào phải có ít nhất 20 loại enzyme aminoacyl-tRNA synthetase tương ứng với 20 loại axit amin.

Quá trình gắn axit amin vào tRNA của enzyme aminoacyl-tRNA synthetase được biểu diễn ở Hình 2-15.

2.4.3- Hướng đọc mã và hướng kéo dài sợi polypeptide

Sự kéo dài sợi polypeptide có thể biểu diễn như sau:



Trong quá trình dịch mã, ribosome sẽ di chuyển dọc theo sợi mRNA từ đầu 5' đến đầu 3'. Các bộ ba mã hóa cho axit amin được đọc một cách liên tục từ bộ ba khởi đầu AUG nằm ở đầu 5' của phân tử mRNA cho đến khi gặp các bộ ba kết thúc ở đầu 3'-OH.

Sợi polypeptide được tổng hợp bắt đầu từ đầu chứa nhóm -NH₂ đến đầu chứa nhóm -COOH.

2.4.4- Các giai đoạn của quá trình dịch mã

Quá trình dịch mã gồm 3 giai đoạn: Khởi đầu, kéo dài và kết thúc.

1,- *Giai đoạn khởi đầu:*

Đầu tiên, một methionyl-tRNA synthetase (là một aminoacyl-tRNA synthetase) gắn phân tử methionyl vào đầu 3' của tRNA^{met} tạo phân tử Met-

tRNA^{met}. Trong tế bào tồn tại hai loại tRNA^{met}: Loại thứ nhất chịu trách nhiệm mang phân tử methionyl đến vị trí khởi đầu dịch mã, loại thứ hai mang methionyl đến các vị trí có chứa bộ ba AUG nằm ở giữa phân tử mRNA.

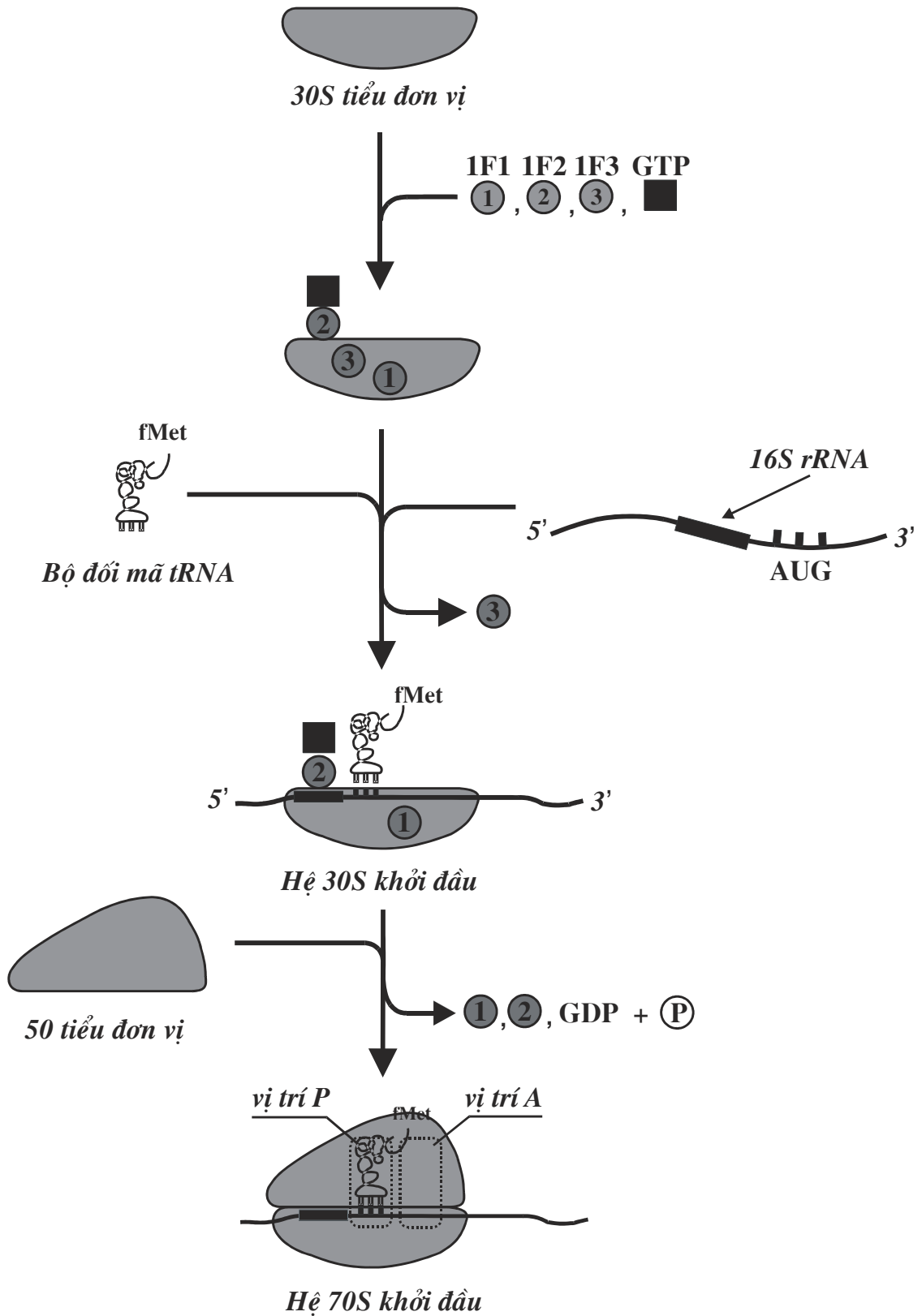
Với sự trợ giúp của các phân tử khởi động IF (initiation factor), tiểu đơn vị nhỏ của ribosome sẽ đến gắn vào một vị trí chuyên biệt của mRNA, vị trí này nằm ở đầu 5', không xa trước bộ ba khởi đầu AUG, đồng thời, phân tử Met-tRNA^{met} cũng định vị vào vị trí có chứa bộ ba khởi đầu, tạo nên phức hợp giữa tiểu đơn vị nhỏ của ribosome-mRNA-Met-tRNA^{met}. Ngay sau khi phức hợp này hình thành, tiểu đơn vị lớn của ribosome sẽ kết hợp vào tiểu đơn vị nhỏ, tạo nên hệ thống dịch mã: ribosome-mRNA-Met-tRNA^{met} (Hình 2-16).

Các nhân tố khởi động sau đó tách ra khỏi hệ để tiếp tục khởi động cho một quá trình dịch mã khác. Hiện nay, người ta đã biết được 3 loại nhân tố khởi động ở procaryote và 6 loại ở eucaryote. Năng lượng sử dụng để khởi động dịch mã được lấy từ các phân tử cao năng như GTP. Phân tử mRNA gắn vào tiểu đơn vị nhỏ của ribosome khi trong môi trường phải có nồng độ Mg⁺² nhất định.

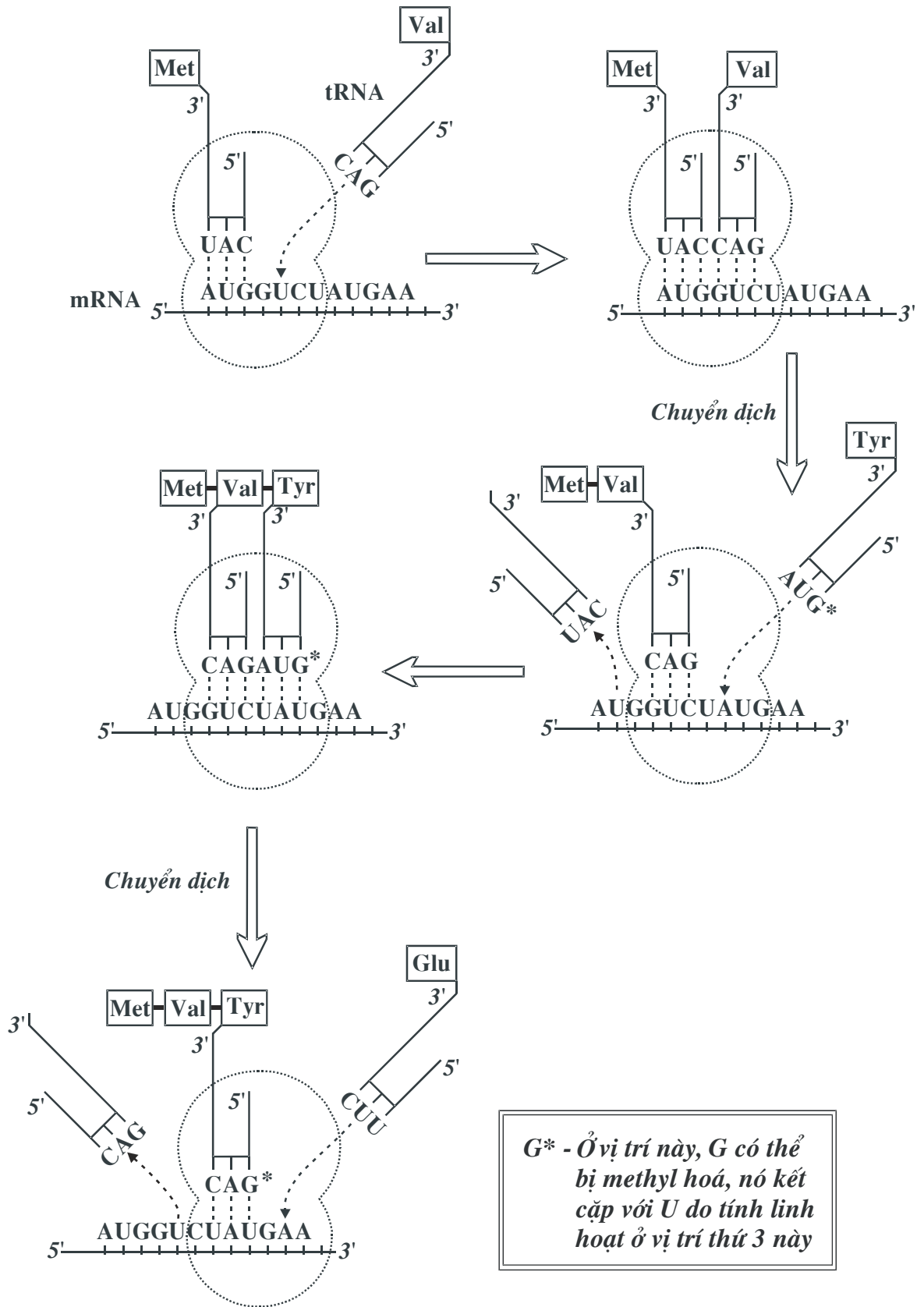
2,- Giai đoạn kéo dài:

Trên ribosome có hai vị trí chuyên biệt cho tRNA mang axit amin đến, đó là vị trí P (peptidyl) và A (aminoacyl). Phân tử tRNA mang methionine (Met-tRNA^{met}) đầu tiên đến sẽ bám vào vị trí P - đối diện với bộ ba AUG, tiếp sau đó, một tRNA thứ hai mang một axit amin có bộ ba mã hóa tiếp theo xếp vào vị trí A.

Bước tiếp theo là hình thành liên kết peptit giữa nhóm cacboxyl của axit amin gắn với tRNA trên vị trí P với nhóm amin của axit amin gắn với tRNA trên vị trí A, đồng thời, liên kết giữa axit amin với tRNA trên vị trí P mất đi, sợi polypeptide đang hình thành lúc này gắn với tRNA trên vị trí A. Cùng lúc đó, sợi mRNA dịch chuyển một bước, làm cho tRNA ở vị trí P đẩy ra ngoài, còn tRNA ở vị trí A chuyển sang vị trí P. Vị trí A sẽ tiếp nhận một tRNA mang axit amin thứ ba đến. Quá trình này lại lặp lại, liên kết peptit thứ hai được hình thành. Cứ như vậy, chuỗi polypeptide được kéo dài cho đến khi xuất hiện dấu hiệu kết thúc, nghĩa là có bộ ba kết thúc nằm đối diện vị trí A.



Hình 2-16: Sơ đồ biểu diễn giai đoạn khởi động dịch mã ở procaryote



Hình 2-17: Sơ đồ biểu diễn giai đoạn kéo dài chuỗi polypeptide đang tổng hợp

Các tRNA mang axit amin (Aa~tRNA) được xếp vào đúng vị trí A trên ribosome nhờ nhân tố kéo dài EF (elongation factor) với năng lượng từ phân tử ATP. Liên kết peptit được hình thành nhờ enzyme peptidyl transferase. Mỗi một bước dịch chuyển, mRNA sẽ tiến về phía trước ba nucleotide.

3,- Giai đoạn kết thúc:

Khi điểm A trên ribosome tiến đến đối diện với các bộ ba vô nghĩa (UAG, UAA, UGA) thì sẽ không có một tRNA nào mang axit amin đến nữa, nên sự kéo dài liên kết peptit sẽ dừng lại. Kết thúc giai đoạn dịch mã có sự trợ giúp của các nhân tố kết thúc RF (release factor). Nhân tố kết thúc nhận biết bộ ba kết thúc và làm đứt liên kết giữa các chuỗi polypeptide mới hình thành với phân tử tRNA cuối cùng, giải phóng sợi polypeptide. Sợi mRNA cũng tách khỏi ribosome, hai tiểu đơn vị của ribosome trở về trạng thái ban đầu, sẵn sàng cho một chu kỳ dịch mã mới.

Ở *E. Coli*, người ta đã tìm ra ba nhân tố kết thúc là RF1, RF2, RF3. RF1 nhận biết các bộ ba kết thúc là UAG và UAA; RF2 nhận biết các bộ ba UGA và UAA. Các RF này nhận biết các bộ ba kết thúc và đưa enzyme peptidyl transferase cắt liên kết giữa tRNA với chuỗi peptit. Cách hoạt động của riêng RF3 chưa được làm rõ.

2.4.5- Polyribosome

Hiện tượng nhiều ribosome cùng bám vào một mRNA và thực hiện dịch mã đồng thời gọi là polysome hay polyribosome. Sau khi ribosome đầu tiên kết hợp với mRNA ở đầu 5' thực hiện dịch mã được một đoạn ngắn, thì ở đoạn phía sau, nhiều ribosome khác cũng bám vào và cũng thực hiện dịch mã đồng thời. Mỗi ribosome đảm nhận dịch mã một đoạn trên mRNA. Người ta ước tính khoảng đảm nhiệm dịch mã của mỗi ribosome trên mRNA ở *E. Coli* là khoảng 80 nucleotide. Nhờ vậy, tốc độ tổng hợp protein tăng lên đáng kể.

2.5- ĐIỀU HOÀ BIỂU HIỆN GEN (Điều hoà sinh tổng hợp protein)

2.5.1- Mục đích của điều hoà biểu hiện gen

Mục đích của sự điều hoà biểu hiện gen là nhằm điều chỉnh hệ enzyme cho phù hợp với các nhân tố dinh dưỡng, tác nhân lý hóa và môi trường, tạo số lượng và số loại cần thiết để đảm bảo nhu cầu của tế bào là phát triển và sinh sản.

Trong bất kỳ tế bào nào, tất cả các gen đều không hoạt động đồng thời, bởi vì nhu cầu protein của tế bào thay đổi liên tục. Trong cơ thể sống, không phải loại protein nào cũng được tổng hợp với số lượng như nhau. Có loại được tổng hợp một cách liên tục trong suốt quá trình sống, ví dụ như hemoglobin của máu; có loại chỉ được tổng hợp trong một giai đoạn nhất định nào đó trong chu trình sống, ví dụ như hormone sinh trưởng, hormone sinh sản, ... Như vậy, một số gen sẽ hoạt động nhiều hơn, thường xuyên hơn, một số khác chỉ hoạt động ở những giai đoạn nhất định hoặc trong những điều kiện nhất định của chu trình sống. Để đáp ứng đầy đủ và đúng số lượng protein cho cơ thể sống, trong cơ thể sống phải có cơ chế điều hoà sinh tổng hợp protein, làm sao cho lượng protein tạo ra vừa đủ, không thừa và cũng không thiếu. Có như vậy, hoạt động trao đổi chất của cơ thể sống mới đảm bảo bình thường, ngược lại sẽ làm rối loạn trao đổi chất, phát sinh bệnh tật hoặc tử vong.

2.5.2- Các yếu tố điều hoà biểu hiện gen

Để thực hiện điều hoà biểu hiện gen, đầu tiên, phải có tín hiệu gây điều hoà, sau đó, thực hiện quá trình điều hoà.

Ở tế bào procaryote, tín hiệu gây điều hoà thường là những yếu tố dinh dưỡng hay những yếu tố vật lý của môi trường. Sự thay đổi các yếu tố dinh dưỡng hay yếu tố vật lý của môi trường có tác động làm thay đổi hoạt động của cơ thể sống, nhằm thích nghi với điều kiện mới để phát triển.

Ở tế bào eucaryote, tín hiệu điều hoà là những phân tử do tế bào chuyên biệt phát sinh. Ví dụ như các hormone được tổng hợp ở các bộ phận chuyên biệt như tuyến yên, tuyến giáp, ... đi vào trong máu, đem tín hiệu đến các mô thực hiện điều hoà biểu hiện gen.

Điều hoà biểu hiện gen có thể thực hiện bằng nhiều cách khác nhau như thay đổi cấu trúc của DNA, tác động trực tiếp đến các giai đoạn tổng hợp protein như phiên mã, dịch mã, ..., quá trình xảy ra rất phức tạp.

Phần lớn sinh vật procaryote đều ở dạng đơn bào, tế bào chưa có màng nhân, quá trình phiên mã và dịch mã xảy ra đồng thời trong tế bào chất, nên sự điều hoà biểu hiện gen được tiến hành chủ yếu ở giai đoạn phiên mã. Đối với các sinh vật đơn bào, sự điều hoà là nhanh và nhạy, vì các tín hiệu điều hoà tác động trực tiếp ngay tế bào. Ngược lại, sinh vật eucaryote là những cơ

thể đa bào: Mỗi tế bào là một thành phần của cơ thể sống, nên phải tuân thủ nghiêm ngặt theo một chương trình phát triển chung của cơ thể, mỗi bộ phận có một chức năng riêng biệt, sự điều hoà ở đây mang tính thống nhất cho toàn bộ cơ thể. Thêm vào đó, tế bào eucaryote có cấu tạo hoàn chỉnh, sự phiên mã xảy ra trong nhân tế bào, còn sự dịch mã thực hiện ở ngoài tế bào chất, do vậy, sự điều hoà biểu hiện gen phức tạp hơn nhiều và được tiến hành ở nhiều giai đoạn.

2.5.3- Mô hình điều hoà biểu hiện gen ở vi khuẩn

2.5.3.1- Cấu trúc operon

Bộ gen của vi khuẩn được tổ chức theo operon. Một operon có một vùng điều khiển và vùng mã hóa. Vùng điều khiển bao gồm gen điều hoà, promoter và điểm điều hành (operator). Vùng mã hóa bao gồm một số gen cấu trúc nằm kề nhau, mỗi gen cấu trúc mã hóa cho một polypeptide. Các protein được mã hóa trong một operon thường có quan hệ mật thiết với nhau trong một quá trình chuyển hóa sinh hóa nào đó trong tế bào.

Một operon có ít nhất một promoter, tuy nhiên, operon có thể có nhiều hơn một promoter và ái lực của các promoter này đối với RNA-polymerase là khác nhau. Operator là trình tự DNA, nơi mà protein ức chế (repressor protein) gắn vào.

Khái niệm về operon được F. Jacob và các cộng sự của ông nêu ra năm 1961 khi nghiên cứu sự kiểm soát di truyền hấp thụ đường lactose ở *E. Coli*. Với sự khám phá ra cơ chế điều hoà biểu hiện gen, ông đã nhận được giải thưởng Nobel 1965.

2.5.3.2- Operon cảm ứng - Operon lactose ở *E. Coli*

Vi khuẩn *E. Coli* có khả năng sử dụng đường lactose như nguồn cacbon chính để phát triển. Lactose là một disacarit, nên khi có mặt lactose trong môi trường, vi khuẩn sản sinh ra enzyme β -galactosidase để thủy phân lactose, tạo thành các phân tử monosacarit là glucose và galactose thuận lợi cho quá trình chuyển hóa. Ngoài β -galactosidase ra, tế bào vi khuẩn còn tổng hợp enzyme permease làm nhiệm vụ vận chuyển lactose qua màng tế bào. Khi nghiên cứu sự kiểm soát di truyền hấp thụ đường lactose, F. Jacob đã phát hiện cơ chế

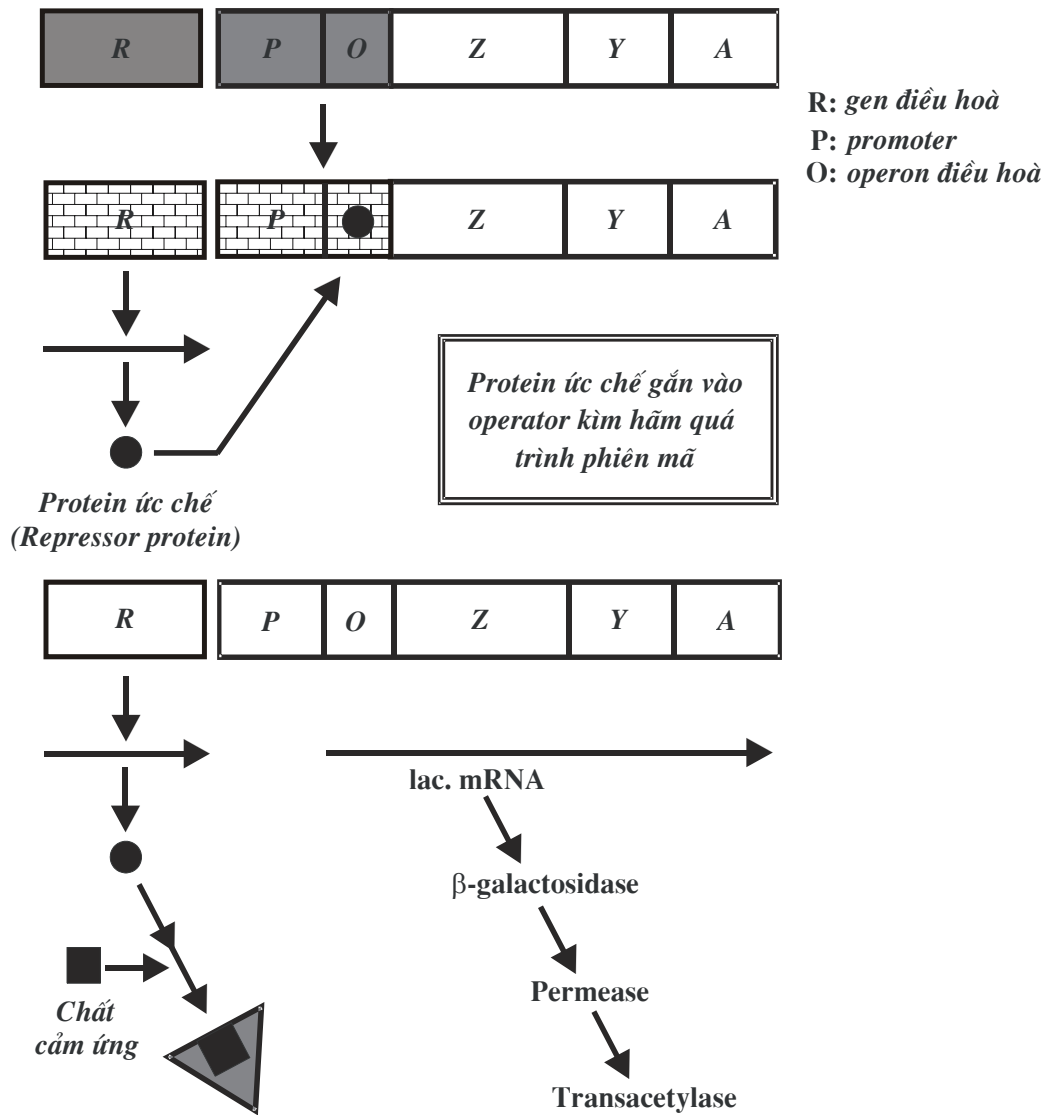
tổng hợp các enzyme hấp thụ đường lactose. Quá trình thí nghiệm có thể mô tả như sau:

- Khi nuôi vi khuẩn *E. Coli* trên môi trường không có lactose, thì ta thấy nồng độ enzyme β -galactosidase và permease do vi khuẩn sinh ra rất thấp: khi đưa đường lactose vào môi trường nuôi thì nồng độ hai enzyme này ở tế bào vi khuẩn tăng lên rất nhiều. Nhưng nếu nuôi vi khuẩn trên môi trường có đường glucose và lactose đồng thời thì nồng độ hai enzyme nêu trên trong tế bào thấp hơn so với trường hợp chỉ có đường lactose. Khi phân tích tổng nồng độ mRNA có mặt trong tế bào trước và sau khi đưa lactose vào trong môi trường nuôi, thấy rằng: Khi không có mặt lactose trong môi trường thì không xuất hiện mRNA mã hóa cho β -galactosidase và permease. Khi bổ sung lactose vào môi trường nuôi thì trong tế bào xuất hiện mRNA mã hóa cho hai enzyme nêu trên. Từ kết quả thí nghiệm trên, cùng với những kết quả thu được về đột biến gen, F. Jacob và J. Monod đã đưa ra mô hình điều khiển operon lactose như Hình 2-18.

Cấu trúc của operon lactose gồm: gen điều hoà (R), promoter (P), operator (O) và ba gen cấu trúc là lacZ mã hóa cho enzyme β -galactosidase, lacY mã hóa cho enzyme permease và lacA mã hóa cho enzyme transacetylase.

Khi không có mặt lactose trong môi trường, gen điều hoà thường xuyên tổng hợp protein ức chế. Protein ức chế có ái lực với điểm điều hành (operator) nên nó gắn vào điểm điều hành, ngăn cản không cho enzyme RNA-polymerase thực hiện phiên mã, mRNA không thể tổng hợp được, operon đóng.

Khi có mặt lactose trong môi trường, nhờ enzyme permease có sẵn ở màng tế bào chuyển một lượng rất ít vào trong tế bào. Khi đã vào trong tế bào, lactose chuyển thành allolactose (có chứa liên kết β -1,6). Allolactose là chất cảm ứng, nó liên kết với protein kìm hãm. Phức hợp này không có ái lực với operator, nên không gắn lên operator được, lúc này, operon mở. RNA-polymerase thực hiện phiên mã các gen cấu trúc.

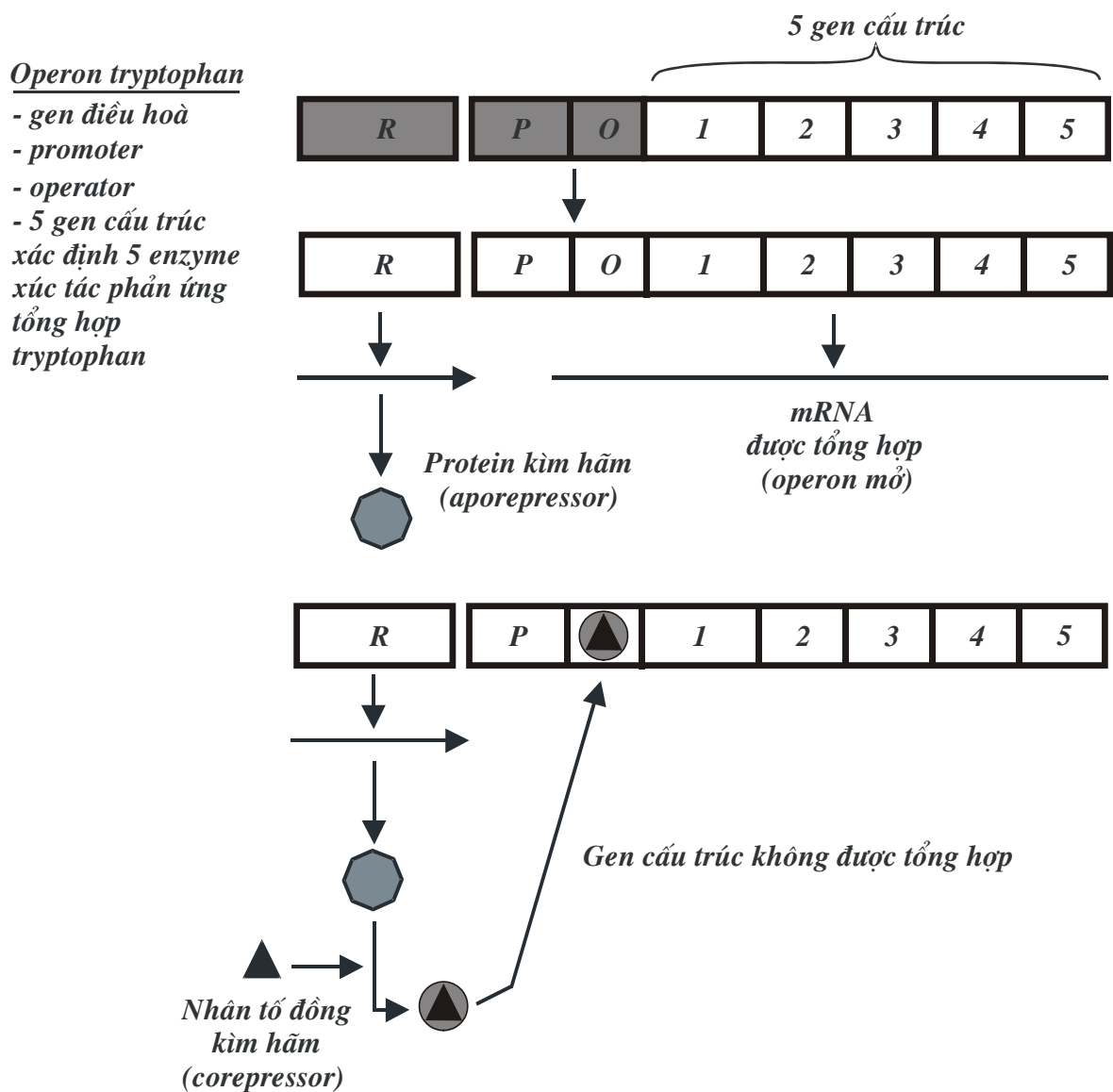


Hình 2-18: Mô hình hoạt động của operon lactose

Phần lớn sự tổng hợp các enzyme hoạt động trong các quá trình phân giải ở tế bào được sự kiểm soát theo cơ chế của operon cảm ứng.

2.5.3.2- Operon kìm hãm - Operon tryptophan ở *E. Coli*

Operon tryptophan cũng có cấu trúc tương tự như operon lactose, nghĩa là, bao gồm gen điều hoà (R), promoter (P), operator (O) và 5 gen cấu trúc. Mỗi gen cấu trúc mã hóa cho một enzyme, xúc tác phản ứng tổng hợp tryptophan. Trong tế bào, tryptophan được tổng hợp bằng một chuỗi 5 phản ứng, mỗi phản ứng được xúc tác bằng một enzyme mã hóa trong operon. Năm gen cấu trúc mã hóa cho 5 enzyme, lần lượt được ký hiệu là trpE, trpD, trpC, trpB và trpA. Gen trpE nằm ngay sau vùng điều hoà, được phiên mã đầu tiên.



Hình 2-19: Mô hình hoạt động của operon tryptophan

Hoạt động của operon tryptophan khác với operon lactose ở chỗ là protein kìm hãm, bản thân nó không có ái lực với operator nên khi đứng riêng một mình, nó không thể gắn vào điểm điều hành, nên operon mở. Ngược lại, khi protein kìm hãm kết hợp với chất đồng kìm hãm (corepressor), thì sẽ có ái lực với operator nên dễ dàng gắn vào đó, làm operon đóng. Hoạt động của operon có thể mô tả như Hình 2-19.

Như vậy, khi lượng tryptophan dư, operon đóng, còn khi thiếu tryptophan thì operon mở.

Nhìn chung, cách điều hoà biểu hiện gen ở sinh vật procaryote chủ yếu được thực hiện ở giai đoạn phiên mã.

2.5.4- Mô hình điều hoà biểu hiện gen ở eucaryote

Cấu tạo tế bào eucaryote là hoàn chỉnh, có màng nhân ngăn cách nhân tế bào với tế bào chất. Bộ máy di truyền tập trung chủ yếu trong nhân tế bào. Quá trình phiên mã được thực hiện trong nhân, còn dịch mã xảy ra trong tế bào chất. Hai quá trình này không xảy ra đồng thời như ở tế bào procaryote.

Bộ gen của sinh vật eucaryote có kích thước lớn, cấu trúc phức tạp, phần lớn các gen đều chứa các đoạn không mã hóa, xen kẽ với đoạn mã hóa. Trong nhiều trường hợp, phần không mang mã lớn hơn phần mang mã. Do đặc điểm cấu tạo như vậy nên việc điều hoà biểu hiện gen rất phức tạp. Các gen điều hoà thường có kích thước lớn hơn nhiều so với ở sinh vật procaryote. Các gen điều hoà thường nằm cách xa promoter. Điều hoà biểu hiện gen có thể được thực hiện ở nhiều giai đoạn như: điều hoà bằng cách thay đổi cấu trúc của nhiễm sắc chất, điều hoà trong giai đoạn phiên mã, trong giai đoạn dịch mã và sau dịch mã.

2.5.4.1- *Điều hoà hoạt động biểu hiện gen bằng cách thay đổi cấu trúc của nhiễm sắc chất*

Nhiễm sắc chất là cấu trúc liên kết giữa protein histon với DNA. Gen được phiên mã khi DNA phải giãn xoắn cục bộ, nếu nhiễm sắc chất xoắn chặt lại với các protein histon thì không xảy ra phiên mã. Kết quả của nhiều nghiên cứu cho thấy: ở sinh vật eucaryote, nhiều gen hoạt động biểu hiện mạnh, liên tục, thường được sắp xếp vào một nhiễm sắc thể, như vậy, sẽ thuận lợi cho việc sao chép và phiên mã. Ví dụ các gen mã hoá cho hemoglobin (4 gen) được sắp xếp gần nhau, biểu hiện của các gen này được điều chỉnh phù hợp với từng thời kỳ phát triển của cơ thể.

Sự thay đổi thành phần cấu tạo của các bazơ nitơ trong nhiễm sắc chất cũng làm thay đổi hoạt động biểu hiện gen. Ví dụ như sự methyl hoá một số bazơ nitơ ở vùng 5' của gen ở động vật sẽ kìm hãm hoạt động biểu hiện gen hay nhiễm sắc thể X không hoạt động ở người thuộc loại siêu methyl hoá.

2.5.4.2- *Điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở giai đoạn phiên mã*

Sự phiên mã được tăng cường hoặc kìm hãm do sự có mặt của một số nhân tố điều hoà sau:

1,- *Sự có mặt của trình tự cis trong phần điều hành của gen và các nhân tố trans (protein điều hoà):*

Đoạn DNA tham gia vào quá trình điều hoà biểu hiện gen, có cấu trúc gồm hai phần đối xứng nhau, được gọi là trình tự cis. Trình tự này nằm ở phần điều hành, là nơi tiếp nhận các protein điều hoà (nhân tố trans).

Đặc điểm cấu tạo chung của nhân tố trans là chúng bao gồm hai vùng cấu trúc: vùng chịu trách nhiệm gắn nhân tố trans vào trình tự cis và vùng tác động lên sự phiên mã. Các vùng cấu trúc chức năng này là độc lập với nhau. Ngoài hai vùng chính kể trên, nhiều nhân tố trans còn có một số vùng phụ khác. Nhân tố trans gắn vào trình tự cis của DNA nhờ các liên kết yếu và nó tác động lên sự phiên mã, làm khởi sự phiên mã và đạt tốc độ cao. Nhân tố trans có thể là một hormone hay một protein điều hoà.

2,- *Sự có mặt của trình tự khuếch đại hoặc trình tự dập tắt:*

Trình tự khuếch đại là đoạn DNA có tác dụng làm tăng sự phiên mã. Khi có mặt trình tự khuếch đại (enhancer) trong gen thì sẽ làm tăng sự biểu hiện gen. Vị trí của trình tự khuếch đại trong gen là không cố định, có thể nằm ở đầu 5', đầu 3' hay ngay trong intron của gen.

Ngoài trình tự khuếch đại, còn có trình tự dập tắt (silence), là đoạn DNA, mà khi có mặt trong gen thì sẽ có tác dụng ức chế phiên mã.

Như vậy, nếu trong gen có chứa trình tự khuếch đại thì sự phiên mã sẽ xảy ra mạnh mẽ, ngược lại, nếu có trình tự dập tắt thì sự phiên mã sẽ không thực hiện.

3,- *Chọn lựa promoter thích hợp:*

Đây là kiểu điều hoà dựa vào tương tác cis-trans thường gặp ở sinh vật eucaryote. Ví dụ điển hình là gen mã hoá cho α -amylase ở động vật bậc cao, gen này có hai promoter, mỗi promoter có hoạt tính phiên mã khác nhau và chịu trách nhiệm phiên mã cho một loại mRNA nhất định, đặc trưng cho các cơ quan khác nhau trong cơ thể (tuyến nước bọt và gan, tụy).

Sự lựa chọn promoter hoạt động tùy thuộc vào nhân tố trans hiện diện trong tế bào của các cơ quan có khả năng tổng hợp α -amylase. Nhân tố trans

đặc trưng sẽ tương tác với trình tự cis làm cho sự tổng hợp mRNA được thực hiện, kết quả là protein được tổng hợp.

2.5.4.3- *Điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở giai đoạn sau phiên mã*

Ở sinh vật eucaryote, sợi mRNA đầu tiên được tổng hợp (tiền mRNA) phải trải qua giai đoạn hoàn thiện như tạo mũ chup, cắt bỏ intron, nối exon, gắn đuôi poly-A để hình thành sợi mRNA trưởng thành. mRNA đi qua màng nhân, vào tế bào chất đến ribosome, thực hiện quá trình tổng hợp protein.

Điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở giai đoạn sau phiên mã chủ yếu tác động vào giai đoạn hoàn thiện mRNA. Các kiểu tác động có thể xảy ra như cắt các intron và nối exon khác nhau, gây đột biến trên mRNA. Ngoài ra, thời gian tồn tại của mRNA cũng có ảnh hưởng đáng kể đến số lượng protein tổng hợp. mRNA tồn tại càng lâu thì số lượng protein được tổng hợp càng nhiều.

2.5.4.4- *Điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở giai đoạn dịch mã và sau dịch mã*

Ở giai đoạn dịch mã, sự điều hoà biểu hiện gen thường thể hiện ở sự biến đổi các nhân tố khởi động của quá trình dịch mã.

Điều hoà ở giai đoạn sau dịch mã thường được thể hiện ở sự biến đổi hoạt tính của phân tử protein. Sau khi được tổng hợp, chuỗi polypeptide phải trải qua một giai đoạn hoàn thiện mới trở thành phân tử protein hoạt động. Trong giai đoạn sau dịch mã, chuỗi polypeptide có thể được gắn thêm các gốc không có bản chất protein như đường, phosphat hay một nhóm hữu cơ hoạt động hoặc có sự sắp xếp, tạo cấu hình không gian, cắt bỏ hoặc gắn thêm đoạn peptit để tạo phân tử protein hoạt tính.

2.5.5- **Sự biệt hóa tế bào**

1,- *Các tế bào biệt hoá chứa thông tin như nhau:*

Ở các sinh vật bậc cao, cơ thể trưởng thành bao gồm nhiều loại tế bào khác nhau (da, thịt, gan, thận,..). Sử dụng kỹ thuật lai DNA cho thấy, DNA từ những tế bào của các mô khác nhau của cùng một cá thể không bị biến đổi trong quá trình biệt hoá. Nói cách khác, số lượng DNA của tế bào biệt hoá, về căn bản, giống hệt từ ban đầu và chứa nguyên thông tin di truyền, đủ để phát triển thành cá thể nguyên vẹn.

2,- Các tế bào biệt hoá tổng hợp các nhóm protein khác nhau:

Ở các tế bào biệt hoá, ngoài việc tổng hợp các protein chung cần thiết cho các quá trình sinh lý, chúng còn tổng hợp một hoặc một số protein chủ yếu, ví dụ:

- Tế bào cơ tổng hợp nhiều myosine,
- Tế bào biểu bì tổng hợp nhiều keratine.

Như vậy, cùng chứa thông tin di truyền như nhau, nhưng mỗi loại tế bào biệt hoá chỉ sử dụng một phần thông tin để tổng hợp chủ yếu một số loại protein. Tóm lại, mặc dù tất cả các bước trong sự biểu hiện của gen về căn bản được điều hoà, nhưng đối với phần lớn các gen, việc khởi sự phiên mã là điểm kiểm soát quan trọng nhất.

CHƯƠNG III

BIẾN ĐỔI VẬT CHẤT DI TRUYỀN

3.1- KHÁI NIỆM VỀ BIẾN DỊ

Biến dị là những biểu hiện sai khác giữa các cá thể ở thế hệ trước với thế hệ sau hay giữa các cá thể trong cùng một thế hệ.

Giữa cơ thể sống và môi trường luôn có quan hệ mật thiết với nhau. Khi điều kiện môi trường sống thay đổi, các cơ thể sống cũng phải có những thay đổi để thích nghi với điều kiện mới, phát triển tốt hơn. Biến dị phản ánh mối tương quan giữa cơ thể và môi trường. Biến dị là nguồn nguyên liệu cho chọn lọc tự nhiên và chọn lọc nhân tạo.

Biến dị có thể được di truyền hoặc không di truyền cho thế hệ sau. Biến dị được di truyền cho các thế hệ kế tiếp gọi là biến dị di truyền. Biến dị di truyền thường thể hiện ở sự biến đổi trong bộ máy di truyền. Sự thay đổi có thể xảy ra trong phạm vi một gen, có thể trong một nhiễm sắc thể hoặc cả bộ gen.

Biến dị có thể không di truyền lại cho các thế hệ sau. Sự thay đổi của một cá thể hoặc một số cá thể, nhằm thích nghi tức thời với sự thay đổi bên ngoài, nhưng bộ gen của chúng không bị thay đổi, nên những biến đổi đó không tìm thấy ở thế hệ kế tiếp.

Những cá thể biến dị di truyền còn được gọi là những đột biến. Đột biến có thể là do con người gây ra có định hướng hoặc do các tác nhân tự nhiên.

Dựa vào tác nhân gây biến dị, người ta chia chúng làm hai loại là biến dị tự nhiên và biến dị nhân tạo.

3.2- ĐỘT BIẾN

3.2.1- Tác nhân gây đột biến

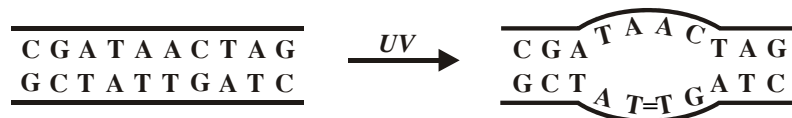
Bộ gen luôn hoạt động trong suốt chu trình sống, nó chịu sự tác động của hệ enzyme trong tế bào. Trong quá trình vận động như sao chép, phiên

mã, mặc dù có sự kiểm soát rất nghiêm ngặt, nhưng những sự thay đổi vẫn luôn xảy ra. Người ta thấy rằng, trong tự nhiên, các gen đều có thể bị đột biến, đó là các đột biến tự nhiên hay còn gọi là đột biến ngẫu nhiên. Các đột biến ngẫu nhiên thường xảy ra với một tần số nhất định và không xác định được tác nhân chính gây đột biến.

Để gây một đột biến nhân tạo, người ta thường sử dụng một trong các tác nhân sau:

- Dùng tia phóng xạ ion hoá như các tia α , β , γ hoặc tia X, các chùm tia neutron hoặc proton bắn vào bộ máy di truyền, gây ion hoá các thành phần cấu tạo của DNA, làm biến đổi DNA.

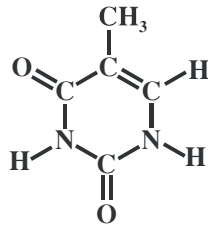
- Dùng tia phóng xạ không ion hoá như tia tử ngoại (UV) để tạo các dimer thymine. Khi chiếu tia tử ngoại, các bazơ thymine nằm kề nhau trên một mạch sẽ liên kết với nhau, làm mất liên kết hydro giữa các bazơ bổ sung giữa hai mạch.



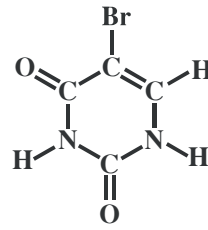
Hình 3-1: Mô hình biểu diễn sự hình thành dimer thymine

- Dùng các chất hoá học gây đột biến. Hiện nay người ta đã sử dụng nhiều loại chất hoá học khác nhau để làm thay đổi cấu trúc của DNA. Cơ chế tác dụng của mỗi tác nhân hoá học lên DNA là khác nhau: Có loại tác động vào giai đoạn sao chép, làm sai hỏng DNA trong giai đoạn sao chép như bromouracil hay 2-amino purine là các đồng đẳng của bazơ purine và uracil, cũng có loại tác động trực tiếp lên gen, làm biến đổi các bazơ nitơ. Ví dụ trường hợp tác động của bromouracil: Do đặc điểm cấu tạo của bromouracil mà nó có thể bắt cặp bổ sung với bazơ adenine thay vị trí của thymine, đồng thời cũng có thể bắt cặp bổ sung với bazơ guanine thay vị trí của cytosine (Hình 3-2), do vậy, sau vài lần sao chép từ cặp A–T ban đầu có thể chuyển thành cặp G–C.

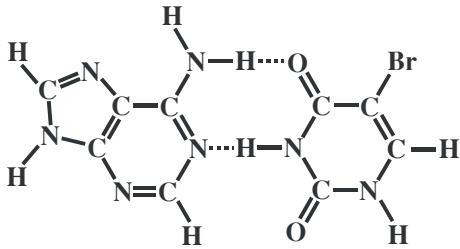
3.2.2- Đột biến gen



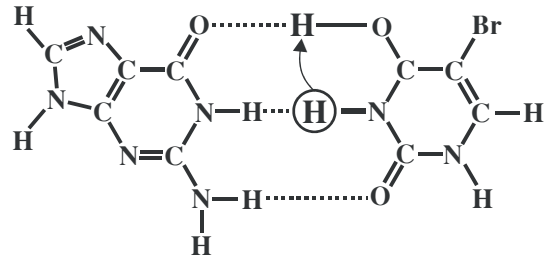
(a) *Thymine*



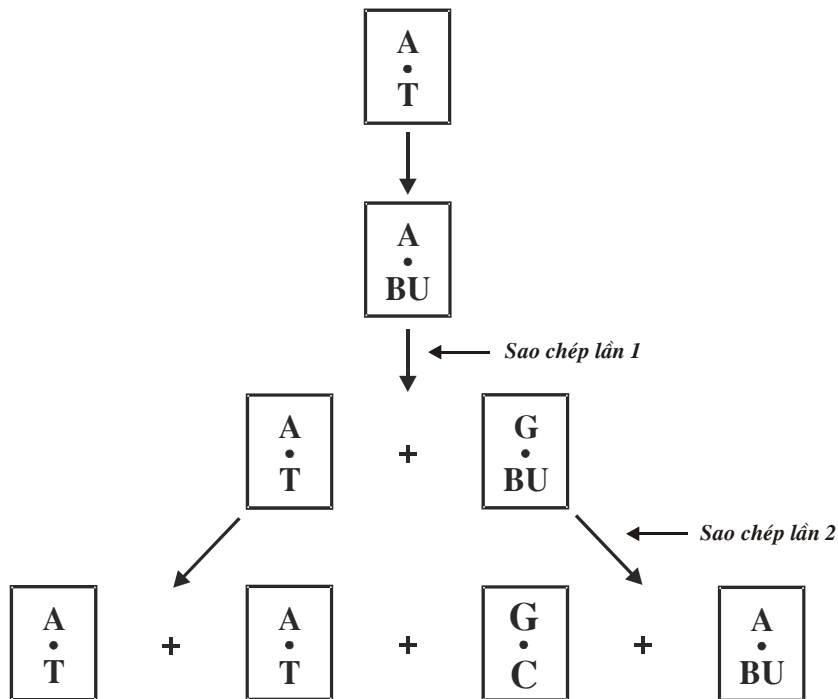
5-Bromouracil
(dạng ceton)



(b) *Adenine* *5-Bromouracil*
(dạng ceton)



(c) *Guanine* *5-Bromouracil*
(dạng enol)



Hình 3-2: 5-Bromouracil tác động vào giai đoạn sao chép làm chuyển đổi cặp bazơ A–T thành G–C

Đột biến gen là những thay đổi trong phạm vi một gen, thường thể hiện bằng sự biến đổi một vài nucleotide hay một codon, dẫn đến sự thay đổi bản chất hay trình tự sắp xếp của các axit amin trong một phân tử protein nào đó. Đột biến gen còn gọi là đột biến điểm.

Các dạng của đột biến gen có thể gặp là:

1,- *Đột biến im lặng hay còn gọi là đột biến đồng nghĩa:*

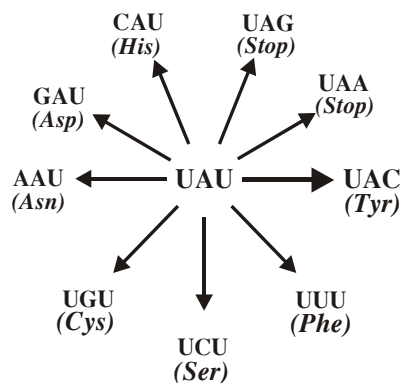
Là khi một nucleotide trong gen bị thay đổi nhưng không đưa lại hậu quả. Sự thay đổi này thường xảy ra ở bazơ thứ 3 trong codon, nên vẫn mã hoá cho axit amin đó.

Ví dụ: Codon UCU mã hoá cho serine, nếu bị thay đổi bazơ thứ 3 thành UCC, UCA hay UCG, vẫn mã hoá cho serine mà không có gì thay đổi.

2,- *Đột biến sai nghĩa:*

Khi đột biến, một codon này được thay thế bằng một codon khác, mã hoá cho một axit amin khác, sự thay đổi này dẫn đến sự tổng hợp một phân tử protein có thành phần axit amin sai khác, làm thay đổi bản chất của protein ban đầu.

Ví dụ: Codon AAG mã hoá cho lysine, khi đột biến bazơ A ở đầu codon thành G, hình thành codon mới GAG, mã hoá cho axit glutamic. Khi tổng hợp protein tại vị trí của lysine sẽ thay bằng axit glutamic.



Hình 3-3: Từ một bộ ba ban đầu, UAU mã hoá cho tyrosine có thể tạo thành 9 bộ ba khác nhau bằng cách thay đổi một bazơ nitơ

3,- Đột biến làm thay đổi khung đọc:

Là trường hợp mà đột biến xảy ra do mất đi hoặc chèn thêm các bazơ nitơ trên DNA làm lệch khung đọc của các bộ ba trong khi dịch mã. Hậu quả dẫn đến sự sai khác hoàn toàn về trật tự sắp xếp cũng như bản chất của các axit amin trong phân tử protein từ điểm xảy ra đột biến. Các đột biến sẽ càng trầm trọng nếu điểm đột biến càng nằm gần đầu 5' của mRNA.

Ví dụ: Từ một đoạn gen mã hoá cho 7 axit amin ban đầu là:

<u>AUG</u>	<u>GCC</u>	<u>UCU</u>	<u>AAC</u>	<u>CAU</u>	<u>GGC</u>	<u>AUA</u>
<i>Met</i>	<i>Ala</i>	<i>Ser</i>	<i>Asn</i>	<i>His</i>	<i>Gly</i>	<i>Ile</i>

Nếu mất G ở vị trí thứ tư thì khung đọc sẽ dịch chuyển và làm thay đổi thành phần và trật tự sắp xếp các axit amin, trở thành:

<u>AUG</u>	<u>CCU</u>	<u>CUA</u>	<u>ACC</u>	<u>AUG</u>	<u>GCA</u>	UA
<i>Met</i>	<i>Pro</i>	<i>Leu</i>	<i>Thr</i>	<i>Met</i>	<i>Ala</i>	

4,- Đột biến vô nghĩa:

Là trường hợp, khi một bộ ba mã hoá cho một axit amin, sau khi thay đổi, chuyển thành một trong ba bộ ba kết thúc là: UAA, UGA và UAG. Kiểu đột biến này sẽ làm mất đoạn trong sợi polypeptide, điểm đột biến càng nằm gần đầu 5' của mRNA thì độ dài đoạn bị mất càng lớn.

3.2.3- Đột biến nhiễm sắc thể

3.2.3.1- Đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể

Đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể là sự thay đổi xảy ra trong phạm vi một nhiễm sắc thể nào đó. Sự thay đổi cấu hình của nhiễm sắc thể thường gặp là mất đoạn, đảo đoạn hoặc lặp đoạn.

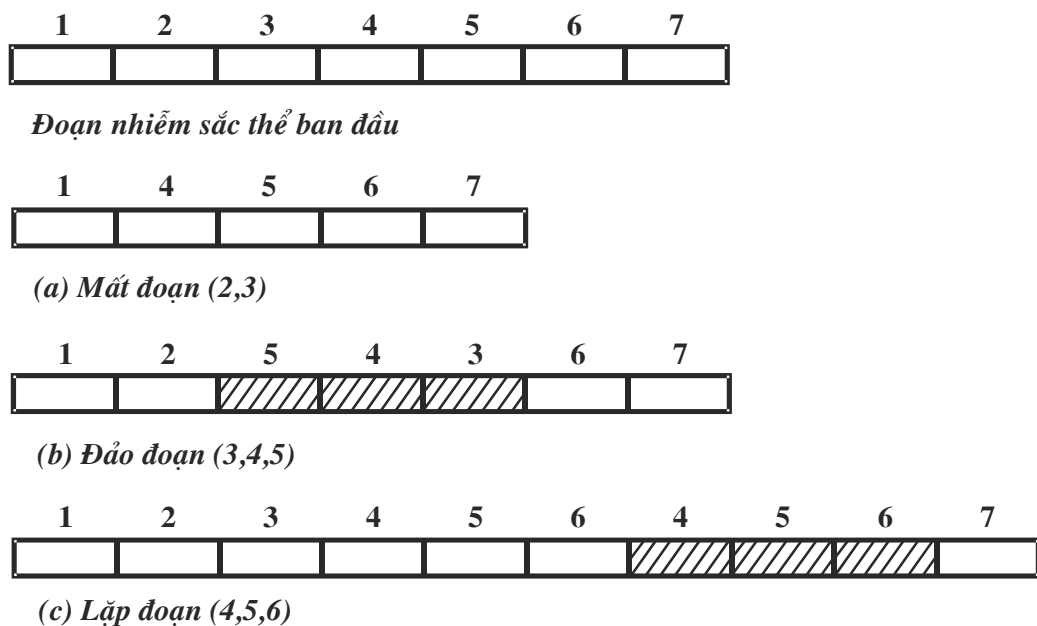
1,- Mất đoạn:

Là trường hợp nhiễm sắc thể bị thiếu một đoạn nào đó. Đoạn bị mất có thể nằm ở giữa nhiễm sắc thể, cũng có thể nằm ở đầu mút (mất đỉnh). Đoạn bị mất có thể nhỏ, mang một gen hay một phần gen. Ví dụ: ở người bị bệnh bạch huyết, nhiễm sắc thể 22 bị mất đoạn.

Sự mất một đoạn dài nhiễm sắc thể thường gây tử vong vì mất cân bằng di truyền bộ gen.

Nguyên nhân gây mất đoạn là do trong quá trình vận động, nhiễm sắc thể bị đứt ra, sau đó được nối lại nhưng không đầy đủ như ban đầu.

Ở các thể dị hợp tử có nhiễm sắc thể bị mất đoạn có thể quan sát được dưới kính hiển vi ở kỳ trước của giảm phân, khi các nhiễm sắc thể tương đồng bắt cặp nhau. Nếu có mất đoạn thì sẽ thấy ngay có những đoạn không tương đồng giữa hai nhiễm sắc thể.



Hình 3-4: Sơ đồ biểu diễn sự mất đoạn (a), sự đảo đoạn (b) và sự lặp đoạn (c)

2,- Đảo đoạn:

Là trường hợp đột biến xảy ra, khi một đoạn nhiễm sắc thể quay 180°. Lúc đầu, đoạn nhiễm sắc thể này bị đứt ra, sau đó quay 180°, rồi được nối lại. Ở sinh vật eucaryote, đoạn bị đảo có thể chứa tâm động hoặc không chứa tâm động. Nếu chỉ xảy ra sự đảo đoạn, thì các gen có thể chỉ bị quay ngược mà không mất đi. Trong trường hợp đảo đoạn xảy ra ở tế bào giới tính kèm với sự trao đổi chéo giữa hai nhiễm sắc thể tương đồng trong vùng đảo đoạn, thì thường một nửa sản phẩm của giảm phân sẽ mất sức sống (không thụ tinh được).

3,- *Lặp đoạn:*

Là trường hợp một đoạn nào đó của nhiễm sắc thể được tăng lên. Đoạn lặp có thể nằm cạnh nhau hoặc ở xa nhau trên cùng nhiễm sắc thể. Sự lặp đoạn thường không gây hậu quả nặng nề như mất đoạn, nhiều khi sự tăng đoạn lại có lợi cho sự tiến hoá và tạo vật liệu di truyền mới, làm cho cơ thể có số lượng gen dồi dào hơn.

3.2.3.2- ***Đột biến số lượng nhiễm sắc thể***

Hiện tượng thay đổi số lượng nhiễm sắc thể thường gặp trong tự nhiên và thường gặp hơn cả là sự tăng bội số lượng nhiễm sắc thể hay còn gọi là đa bội thể. Có nhiều kiểu đa bội thể như đa bội thể nguyên, đa bội thể lệch.

1,- *Đa bội thể nguyên:*

Là sự tăng nguyên bộ nhiễm sắc thể đơn bội lên một số lần nhất định. Nếu cá thể có số nhiễm sắc thể là $2n$ thì dạng đa bội thể nguyên sẽ là $3n$, $4n$, $5n$, ... Các cá thể đa bội thể lẻ như $3n$, $5n$, ... thường mất khả năng sinh sản hữu tính do các giao tử tạo nên bị mất cân bằng về di truyền. ở các cá thể đa bội chẵn như $4n$, $8n$, ... thì khả năng sinh sản hữu tính phụ thuộc vào sự phân chia giảm nhiễm của tế bào giới tính. Nếu sự phân ly các nhiễm sắc thể là cân bằng trong giai đoạn giảm nhiễm thì sẽ tạo nên các giao tử có khả năng thụ tinh, còn ngược lại, sẽ tạo nên các giao tử bất thụ.

Nhiều loại cây ăn quả và cây cảnh là các thể đa bội có quả to, hoa to.

Đa bội thể phát sinh do tăng bội toàn bộ nhiễm sắc thể cùng nguồn gọi là đa bội thể cùng nguồn. Trường hợp đa bội thể được hình thành do tạp giao giữa các loài với nhau, gọi là đa bội thể lai. Trong tế bào của đa bội thể lai có thể có cả hai bộ nhiễm sắc thể của hai loài khác nhau. Ví dụ điển hình của đa bội thể lai là thí nghiệm của Karpochenko, khi cho lai cây củ cải với bắp cải, nhận được thể đa bội lai.

2,- *Đa bội thể lệch:*

Đa bội thể lệch là trường hợp đột biến do sự thay đổi số lượng nhiễm sắc thể của một cặp hoặc một số cặp trong bộ nhiễm sắc thể. Ví dụ, bộ nhiễm sắc thể là $2n$ thì các cá thể đột biến đa bội thể lệch có thể sẽ có bộ nhiễm sắc

thể là $2n-1$, $2n+1$, $2n+2$, $2n-2$, ... Nghĩa là có thể mất đi hoặc thêm vào bộ nhiễm sắc thể một hoặc một số nhiễm sắc thể nào đó.

Đột biến theo kiểu này có thể tìm thấy ở cả thực vật và động vật.

Ở sinh vật lưỡng bội có số lượng nhiễm sắc thể là $2n$. Nếu thêm vào hoặc bớt đi một hoặc một số nhiễm sắc thể thì trong giai đoạn phân chia tế bào thường mất cân bằng.

Trong trường hợp tế bào giới tính có số nhiễm sắc thể là $2n-1$ thì trong giai đoạn phân chia giảm nhiễm sẽ tạo thành hai giao tử có số nhiễm sắc thể là n và $n-1$. Các đột biến đa bội thể lệch thường yếu, có thể tạo các kiểu hình khác nhau và trong nhiều trường hợp bị chết hoặc không sinh sản.

Một số dẫn chứng về đa bội thể lệch tìm thấy ở người là:

- *Hội chứng Down*: do Langdon Down phát hiện ở người có 3 nhiễm sắc thể thứ 21, nghĩa là, bộ nhiễm sắc thể $2n$ trở thành $2n+1$ và bằng 47 nhiễm sắc thể. Người bệnh có cặp mắt hơi giống mắt người Mông cổ, mắc chứng đần độn. Tỷ lệ mắc bệnh ở trẻ em do các bà mẹ có tuổi cao sinh con là nhiều hơn. Người ta ước tính có khoảng $1/60$ đứa bé bị mắc hội chứng Down do các bà mẹ có tuổi trên 45 sinh con và không bị ảnh hưởng bởi tuổi của người cha.

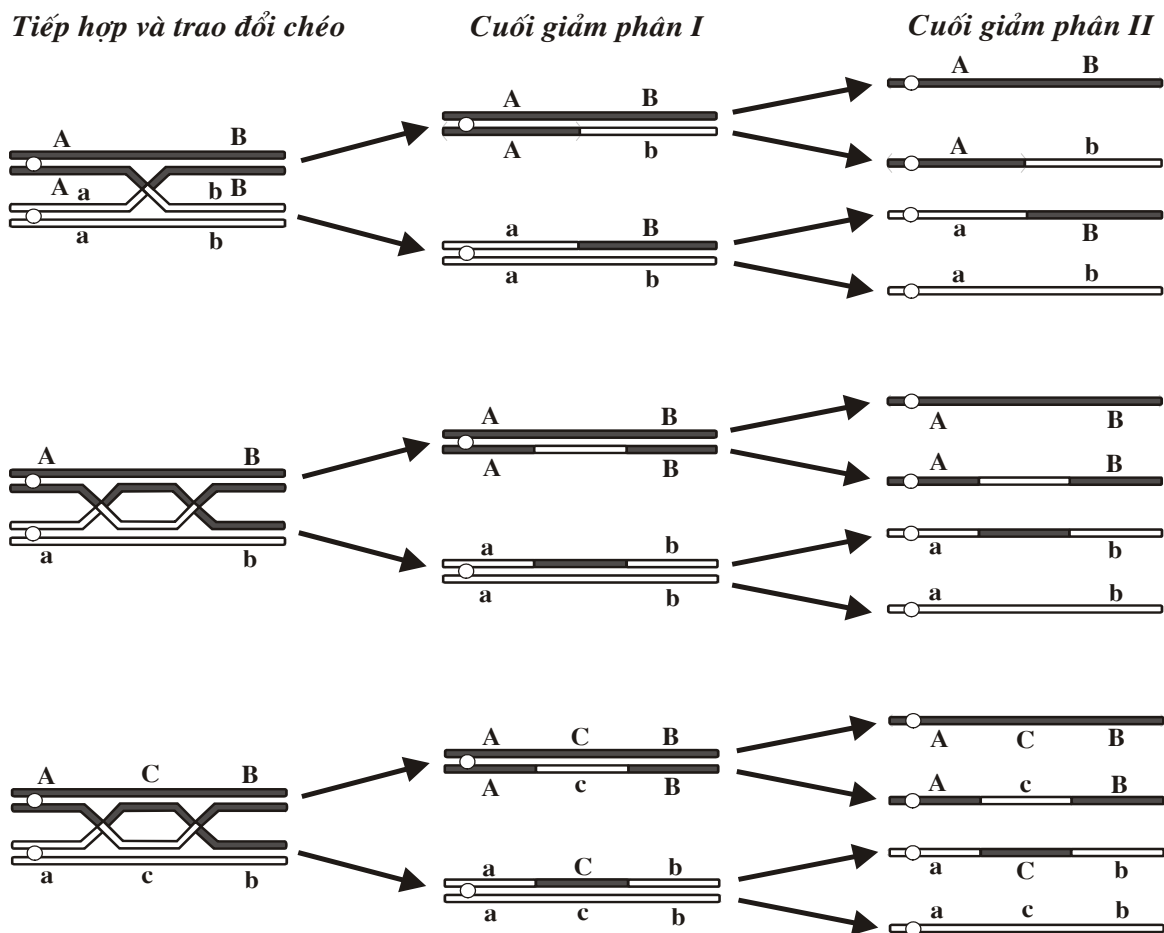
- *Hội chứng Turner*: do Henry Turner phát hiện ra. Là trường hợp nữ bị mất một nhiễm sắc thể giới tính. Bộ nhiễm sắc thể sẽ có $2n-1=45$ cặp nhiễm sắc thể XX trở thành XO. Những người bị hội chứng Turner thường kém thông minh, cơ quan sinh dục kém phát triển, có chiều cao thấp, không sinh sản.

- *Hội chứng Klinefelter*: do Henry Klinefelter phát hiện đầu tiên. Là trường hợp những người nam có 3 nhiễm sắc thể giới tính là XXY, như vậy, bộ nhiễm sắc thể sẽ là $2n+1=47$. Những người bị hội chứng này không có khả năng sinh sản, trí tuệ kém phát triển, có bộ ngực giống nữ.

- Những trường hợp khác có thể gặp ở người là: nữ có 3 nhiễm sắc thể giới tính (XXX) hay nam có 2 nhiễm sắc thể Y (XYY). ở hai trường hợp này, bộ gen có số lượng nhiễm sắc thể là $2n+1=47$. Những người có bộ gen như vậy thường phát triển không bình thường, không có khả năng sinh sản.

3.3- TÁI TỔ HỢP

Trong quá trình vận động, bộ máy di truyền có thể thay đổi. Các phân tử DNA có thể tái tổ hợp với nhau, kết quả là sự sắp xếp các gen ở phân tử DNA của thế hệ sau có thể khác với thế hệ trước. Điều kiện đầu tiên để tái tổ hợp xảy ra là trên DNA phải có điểm đứt. Cơ chế của tái tổ hợp nói chung cũng chưa được xác định rõ ràng. Kiểu tái tổ hợp được nghiên cứu nhiều là tái tổ hợp xảy ra giữa các nhiễm sắc thể tương đồng trong quá trình phân bào giảm nhiễm. Các nhiễm sắc thể tương đồng bắt cặp hay tiếp hợp với nhau và có sự trao đổi chéo, kết quả tạo thành các giao tử có nhiễm sắc thể tái tổ hợp (giao tử tái tổ hợp). Trao đổi chéo giữa hai nhiễm sắc thể tương đồng có thể xảy ra một lần hoặc nhiều lần.



Hình 3-5: Mô hình trao đổi chéo giữa các chromatit

Tái tổ hợp có thể xảy ra đều hoặc không đều. Tái tổ hợp đều là khi số lượng các gen trên hai nhiễm sắc thể tương đồng sau khi tái tổ hợp là như nhau, nghĩa là, sự hoán đổi các đoạn tương ứng giữa hai nhiễm sắc thể tương đồng và không làm mất thông tin di truyền.

Tái tổ hợp không đều là trường hợp sau khi tái tổ hợp, một nhiễm sắc thể bị mất đoạn, còn nhiễm sắc thể kia được thêm một đoạn. Tái tổ hợp không đều sẽ dẫn đến kết quả là một nhiễm sắc thể có số gen lặp lại, còn nhiễm sắc thể kia bị mất gen. Tái tổ hợp không đều đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình tiến hoá của sinh giới.

PHẦN II

NHỮNG NGUYÊN LÝ CƠ BẢN CỦA CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN

Công nghệ di truyền còn gọi là công nghệ DNA tái tổ hợp, đã và đang tiến hành một cuộc cách mạng sinh học. Nó ngày càng có nhiều ảnh hưởng đến y học lâm sàng, trong chăn nuôi, trồng trọt và nhiều lĩnh vực công nghệ khác. Khi sử dụng công nghệ di truyền chúng ta đã tạo ra protein của người với một lượng lớn cần thiết cho điều trị bệnh. Ví dụ như insuline, hormone sinh trưởng người, chất hoạt hóa plasminogen.

Cũng bằng cách này người ta đã tạo ra những vaccine phân tử để ngăn ngừa các bệnh nhiễm virus như bệnh viêm gan B, hay để chuẩn đoán như trong test phát hiện AIDS.

Về nguyên lý cơ bản để thực hiện công nghệ di truyền có nghĩa là phải thực hiện kỹ thuật DNA tái tổ hợp. Để tiến hành kỹ thuật này phải trải qua nhiều bước phức tạp và tinh vi sau đây:

- Bước 1: Tách chiết DNA từ nguồn khác nhau,
- Bước 2: Chuẩn bị phương tiện vận chuyển gen,
- Bước 3: Chuẩn bị các enzyme cắt và gắn DNA, để thiết kế vector DNA tái tổ hợp,
- Bước 4: Biến nạp DNA tái tổ hợp vào vật chủ,
- Bước 5: Theo dõi biểu hiện hoạt động của gen tái tổ hợp,
- Bước 6: Phân tích các sản phẩm của gen tái tổ hợp.

Trải qua hơn 30 năm phát triển, khái niệm về kỹ thuật di truyền được hiểu theo nghĩa rộng hơn, bao trùm hơn, nó bao gồm những thao tác không chỉ với từng gen riêng lẻ mà cả những phần lớn hơn của bộ gen và nhiều phương pháp khác khuyếch đại gen (không qua tạo dòng *invivo*) như phương pháp PCR. Dưới đây chúng tôi sẽ trình bày công việc thực hiện của mỗi bước, tiến hành theo từng chương mà đầu tiên là về enzyme.

CHƯƠNG IV

CÁC ENZYME SỬ DỤNG TRONG CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN

Sinh học phân tử đã phát hiện và hiểu rõ cơ chế tác động của hàng loạt enzyme, nhờ đó đã sử dụng chúng như những công cụ hữu hiệu trong việc cắt nối và ghép các gen.

Các enzyme sử dụng trong công nghệ di truyền có thể chia làm bốn nhóm lớn sau đây:

- Các enzyme giới hạn
- Các nuclease
- Các enzyme kết nối
- Các enzyme tổng hợp

4.1- CÁC ENZYME GIỚI HẠN (RE-Restriction Enzyme)

4.1.1- Hiện tượng giới hạn và hệ thống hạn chế - cải biên

4.1.1.1- *Hiện tượng giới hạn*

Khi nghiên cứu về sự xâm nhiễm của thực khuẩn thể (phage) vào tế bào vi khuẩn, người ta nhận thấy rằng trong một số trường hợp, thực khuẩn thể không thể phát triển được trong tế bào vi khuẩn vì bộ máy di truyền của chúng bị phá hủy. Nói cách khác, các vi khuẩn này kháng thực khuẩn thể. Thí nghiệm có thể mô tả như sau:

Cho phage xâm nhiễm hai chủng vi khuẩn A và vi khuẩn B, các vi khuẩn này được nuôi cấy trong hai môi trường thích hợp. Sau khi thu hồi và phân tích DNA của phage, người ta nhận thấy:

- Ở chủng A: Xuất hiện nhiều DNA của phage còn nguyên vẹn nhưng tế bào của vi khuẩn bị phá vỡ (do sự nhân lên của phage trong tế bào vi khuẩn).
- Ở chủng B: Tế bào vi khuẩn không bị phá vỡ nhưng DNA phage bị cắt thành những đoạn có kích thước xác định. Trong trường hợp này, DNA của

phage bị một hệ thống bảo vệ của vi khuẩn tiêu diệt khi vừa mới xâm nhập vào vi khuẩn.

Hiện tượng xảy ra ở vi khuẩn B gọi là hiện tượng giới hạn.

4.1.1.2- *Enzyme giới hạn và hệ thống hạn chế - cải biên (Restriction modification system)*

Vào năm 1962, lần đầu tiên Werner Arber đã chứng minh rằng: Có những enzyme đặc biệt, hoạt động trong tế bào vi khuẩn, chúng có khả năng phân biệt DNA của mình và DNA lạ của phage. Các enzyme này hạn chế khả năng sinh sản của phage trong tế bào vi khuẩn bằng cách phân hủy chúng một cách đặc hiệu.

Vào năm 1970, Hamilton Smith phát hiện ở vi khuẩn *Haemophilus influenzae* Rd enzyme giới hạn và đặt tên cho nó HindIII.

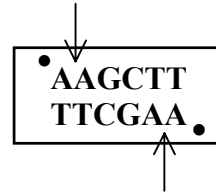
Với những thí nghiệm tiếp theo, Arber và cộng sự tại trường Đại học Geneva đã phát hiện ra nhiều chủng vi khuẩn có khả năng phân huỷ được DNA từ loài khác xâm nhập vào chúng nhờ kết hợp của hai quá trình enzyme.

Hai quá trình enzyme được thống nhất trong một hệ thống gọi là hệ thống hạn chế - cải biến, nhằm phân hủy DNA lạ và bảo vệ DNA của mình.

- Sự hạn chế được thực hiện nhờ sự hoạt động của các enzyme cắt hạn chế (RE - Restriction Enzyme). Đó chính là các endodesoxyribonuclease đặc biệt có thể nhận biết một trình tự nucleotide đặc hiệu trong chuỗi DNA sợi đôi và cắt cả hai sợi DNA đó.

- Sự cải biến là sự thay đổi DNA của bản thân tế bào theo con đường đặc biệt của mỗi loài, khiến DNA đó khác với DNA của loài khác và không phải là cơ chất của enzyme cắt hạn chế. Nhờ đó mà DNA của tế bào chủ được bảo vệ. Sự cải biến được thực hiện nhờ các enzyme methylase (metyl hoá) có trong tế bào vi khuẩn. Enzyme này sẽ metyl hoá cytosine ở vị trí (C₅) và adenine (trên N của C₆) thuộc vùng giới hạn (chuỗi đích).

Ví dụ: Ở Enzyme Hind III, sau khi được metyl hoá (dấu chấm) ở adenine, chuỗi đích này không được nhận biết bởi enzyme Hind III nữa, do đó, DNA không bị cắt:



Vậy enzyme hạn chế và enzyme cải biên có cùng một đối tượng nhận biết là chuỗi nucleotide đặc hiệu trong DNA ngoại lai và DNA của tế bào chủ, nhằm hạn chế sự sinh sản của DNA ngoại lai và bảo vệ DNA của mình. Tuy nhiên, cũng có một số loại enzyme có cả hai chức năng hạn chế và cải biên.

Ví dụ: Enzyme EcoRI với chuỗi đích là:

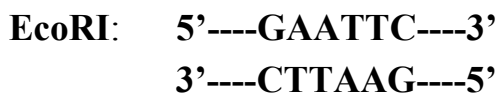


4.1.2- Cách gọi tên của enzyme giới hạn

Tên gọi của enzyme giới hạn thường có 3 hoặc 4 chữ xuất phát từ tên của vi sinh vật mà từ đó, enzyme được xác định và chiết tách.

- Chữ cái đầu (viết hoa) là chữ đầu của tên giống của vi khuẩn từ đó enzyme được trích li.
- Chữ thứ 2 và thứ 3 (viết thường) là chữ đầu tên loài của vi sinh vật.
- Đôi khi có chữ thứ 4 chỉ chủng sinh vật.
- Chữ số la mã chỉ thứ tự RE được phát hiện (có thể có nhiều RE được phát hiện từ một chủng).

Ví dụ như EcoRI - được xác định đầu tiên ở *E. Coli* và EcoRV - là enzyme thứ 5 cũng đã được xác định ở *E. Coli*.



E: Giống *Escherichia*

co: Loài *coli*

R: Chủng Ry 13

I: Enzyme được tách lần đầu tiên

Hpa I: 5'---GTTAAC---3'
3'---CAATTG---5'

H: Giống *Haemophilus*
pa: Loài *parainfluenzae*
I: Enzyme được tách lần đầu tiên

Hind III: 5'---AAGCTT---3'
3'---TTCGAA---5'

H: Giống *Haemophilus*
in: Loài *influenzae*
d: Chủng Rd
III: Enzyme thứ ba được tách ra

BamHI: 5□---GGATCC---3□
3'---CCTAGG---5'

B: Giống *Bacillus*
am: Loài *amyloliquefaciens*
H: Chủng H
I: Enzyme thứ nhất được tách ra

4.1.3- Các loại enzyme giới hạn

4.1.3.1- Loại I

Những enzyme giới hạn loại I có trình tự nhận biết đặc hiệu. Vị trí cắt của các enzyme loại này nằm ngoài trình tự nhận biết một khoảng cách không nhất định, dao động từ 1.000 đến 5.000 nucleotide. Do không có tính đặc hiệu trong cắt đoạn nên sản phẩm của nó không đồng nhất và không phát hiện được bằng điện di trên gel.

Phân tử lượng của chúng vào khoảng 300.000D, các bán đơn vị không giống nhau. Cần Mg^{+2} làm cofactor và ATP để cung cấp năng lượng cho enzyme này chuyển động dọc theo phân tử DNA từ điểm nhận biết đến điểm cắt. Ví dụ như EcoK do Meselson và Yuan tách được, cắt ở điểm cách trình tự nhận biết 1.000 nucleotide hoặc xa hơn nữa.

4.1.3.2- Loại II

Bao gồm những enzyme có trình tự nhận biết chuỗi nucleotide đặc hiệu. Khi nhận biết được trình tự đó, chúng cắt ngay tại vị trí nhận biết.

Phân tử lượng thấp hơn loại I và ở khoảng từ 20.000 đến 100.000D. Chỉ cần Mg^{+2} làm cofactor và không cần năng lượng ATP. Do có tính đặc hiệu về cắt đoạn DNA nên sản phẩm thủy phân là tập hợp những đoạn DNA đặc hiệu và cho phép phát hiện bằng điện di trên gel agarose.

Ngày nay có trên 1.000 RE loại II đã được tách ra từ các tế bào procaryote khác nhau và có hơn 70 loại đang được thương mại hóa trên thị trường.

4.1.3.3- *Loại III*

Bao gồm những enzyme sau khi nhận biết một trình tự DNA đặc hiệu thì cắt ở vị trí cách đó 20 nucleotide và tạo ra một số đầu cắt khác nhau. Tuy rằng vị trí điểm cắt rất gần trình tự nhận biết của chúng nhưng khó đoán trước được các điểm cắt đó. Vì vậy mà RE loại III cũng như RE loại I không được sử dụng rộng rãi trong công nghệ di truyền.

Trong 3 loại RE nói trên chỉ có RE loại II được ứng dụng nhiều hơn.

4.1.4- Các loại RE trong nhóm II

4.1.4.1- *Tính đặc hiệu vị trí*

1,- *Trình tự nhận biết của RE:*

Có thể nói các RE này là những công cụ thực thụ để cắt các DNA. Sự cắt này xảy ra ở một vùng đặc biệt được nhận biết bởi enzyme. Mỗi một enzyme nhận biết một đoạn nucleotide khác nhau rất đặc hiệu đối với nó và được gọi là trình tự nhận biết (chuỗi đích) hay đoạn đọc ngược xuôi.

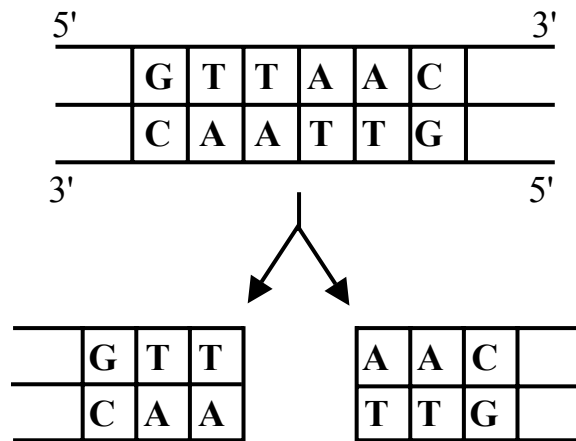
Đặc trưng quan trọng nhất của các trình tự nhận biết là chúng có cấu trúc đối xứng nghịch đảo (palindromic), nghĩa là hai mạch của trình tự hoàn toàn giống nhau khi chúng được đọc theo chiều 5' đến 3' ở mỗi sợi đơn. Các trình tự nhận biết của enzyme giới hạn được cấu tạo từ 4 đến 6 đôi bazơ. Ví dụ như đoạn DNA được đóng khung sau:



2,- Các kiểu cắt của RE:

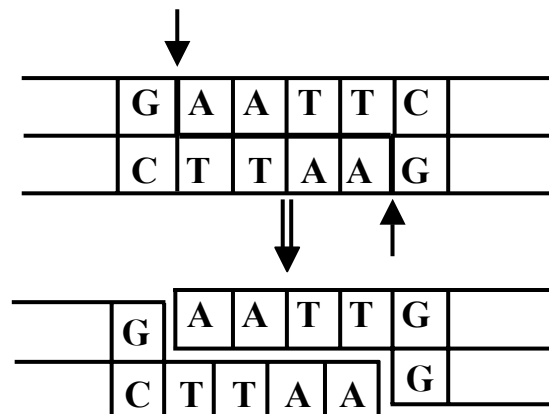
Cắt đầu bằng: Một số RE tạo vết cắt trên phân tử DNA ngay chính giữa palindrom, tạo ra hai đoạn DNA đầu bằng. Sau khi cắt, hai đầu không có khả năng tự kết hợp trở lại.

Ví dụ: **HpaI**



Cắt đầu dính (đầu lệch): Cắt bên này và bên kia của tâm đối xứng để tạo ra hai đầu lệch nhau một vài bazơ. Trong trường hợp này, các đầu dính bổ sung có thể bị bắt cặp trở lại. Như vậy, khi các DNA khác nguồn nhưng cùng có chứa trình tự nhận biết đặc hiệu của một RE, sau khi bị cắt sẽ có các đầu dính bổ sung giống nhau nên các đoạn DNA khác nguồn có thể nối lại để tạo ra những phân tử lai. Đây là cơ sở của phương pháp tạo dòng gen, một phương pháp thúc đẩy sự phát triển của công nghệ di truyền.

Ví dụ: **EcoRI**



3,- Số lượng đoạn cắt:

Một RE có khả năng thao tác trên toàn bộ chiều dài của một phân tử DNA. Số lượng đoạn cắt phụ thuộc vào số chuỗi đích của một RE có trên

phân tử DNA mà nó thao tác. Sử dụng RE khác nhau, sẽ bị cắt khác nhau và tạo ra lượng đoạn cắt khác nhau.

Ví dụ: EcoRI



Nếu chuỗi này có 5 lần trong một phân tử DNA thì enzyme EcoRI sẽ cắt tại 5 điểm trên phân tử DNA đó:

- Ta sẽ được 5 đoạn nếu DNA dạng vòng
- Ta sẽ được 6 đoạn nếu DNA dạng thẳng

4,- *Kích thước đoạn cắt:*

Vì vùng giới hạn được phân bố một cách ngẫu nhiên dọc theo một phân tử DNA mà được tạo thành bằng cách tổ hợp 4 loại bazơ nitơ (A,T,C,G) nên kích thước mỗi đoạn cắt phụ thuộc số cặp bazơ của mỗi chuỗi đích.

Nếu vùng nhận biết (chuỗi đích) của enzyme là 6 cặp bazơ sẽ sinh ra các đoạn có kích thước trung bình $4^6 = 4.096$ bazơ $\approx 4,1$ kb.

Nếu vùng nhận biết của enzyme là 4 cặp bazơ sẽ sinh ra các mảnh có kích thước là $4^4 = 256$ bazơ $\approx 0,26$ kb.

Tuy nhiên một số RE nhận biết các vùng rất hiếm gặp trong DNA. Ví dụ như NotI có chuỗi đích (GC\GGCCGC), khi cắt cho các mảnh có kích thước khoảng 1.000kb. PvuI có chuỗi đích (CGAT\CG) cho mảnh khoảng 300kb.

Bảng 4-1: Một số enzyme hạn chế (HC), enzyme cải biên (CB) và chuỗi đích của nó

Tên vi sinh vật	Enzyme	Chuỗi đích	HG/CB
<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	(BamHI)	G\GATCC	HC
<i>Bacillus amyloliquefaciens K</i>	BamKI	G\GATCC	HC
<i>Bacillus brevisS</i>	BbrsI	GCTGC	CB
<i>Haemophilus aegyptium</i>	(Hae III)	GG\CC	HC
<i>Baccillus subtilis</i>	Bsu1114	GGCC	HC
<i>Brevibacterium albidum</i>	Ball	TGG\CCA	HC
<i>Brevibacterium luteum</i>	BluI	C\TCGAG	HC
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	DpaI	GATC	CB
<i>Escherichia coli Ry13</i>	EcoRI	G\AATTC	HC/CB
<i>Escherichia coli Ry13</i>	EcoRV	GAT\ATC	HC
<i>Haemophilus influenzae Rb</i>	Hinb III	A\AGCTT	HC
<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	Hind I	CAC	CB
<i>Haemophilus influenzae Rd</i> -đột biến	(Hind III)	A\AGCTT	HC/CB
<i>Haemophilus influenzae Rf</i>	Hinf II	AAGCTT	HC
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa I	GTT\AAC	HC
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa II	C\CGG	HC
<i>Thermus aquaticus YTI</i>	Taq I	T\CGA	HC
<i>Xanthomonas amaranthicola</i>	Xam I	GTCGAC	HC
<i>Xanthomonas badrii</i>	Xba I	T\CTAGA	HC
<i>Xanthomonas malvaccarum</i>	Xma I	C\CCGGG	HC
<i>Xanthomonas paravericola</i>	Xpa I	C\TCGAG	HC
<i>Stetomyces achromogenes</i>	Sac II	CCGCGG	HC
<i>Stetomyces albus G</i>	Sal I	G\TCGAC	HC
<i>Nocardia otitids caviarum</i>	Not I	GC\GGCCGC	HC
<i>Providencia stuartii 164</i>	Pst I	CTGCA\G	HC
<i>Proteus vulgaris</i>	Pvu I	CGATCG	HC

Ghi chú: Những enzyme có cùng chuỗi đích, enzyme nào tìm thấy trước được để trong ngoặc (-)

4.1.4.3- **Điều kiện hoạt động của RE**

Đa số enzyme bán trên thị trường có độ hoạt động từ 1 đến 100 đơn vị trên μl . Một đơn vị được tính bằng khối lượng enzyme đủ để cắt hoàn toàn 1 μg DNA λ trong 1 giờ với thể tích phản ứng 50 μl , nhiệt độ phản ứng 37°C.

Tuy nhiên trong thực tế, muốn cắt hoàn toàn lượng DNA cần phải tăng nồng độ của enzyme từ 5 đến 10 lần so với cách tính đơn vị chỉ định. Điều kiện để phản ứng cắt tối ưu là:

- Có Mg^{+2} làm xúc tác
- Nhiệt độ 37°C
- pH từ 7,2 đến 7,8
- Thời gian phản ứng từ 1 đến 2 giờ.

Các RE bị ức chế trong các điều kiện: nồng độ EDTA cao quá hoặc sự có mặt của phenol (khi tách DNA chưa loại hết).

4.1.5- **Ứng dụng của RE trong công nghệ di truyền**

4.1.5.1- **Phân lập gen**

Các RE cung cấp một phương pháp mới có hiệu lực cho việc phân lập gen. Về nguyên tắc một bộ gen DNA phức tạp có thể bị cắt thành nhiều phân đoạn, mà từ đó người ta có thể phân lập một phân đoạn mang gen đặc hiệu bằng cách điện di trên gel. Những băng điện di DNA đặc hiệu được thử nghiệm cho gen định nghiên cứu bằng cách lai hóa với những bản sao phóng xạ của gen tinh chế từ tế bào bằng những biện pháp thích hợp. Gen toàn bộ hoặc một phần của nó có thể thu được những phân đoạn nhỏ hơn bằng cách cắt đoạn liên tiếp với những RE khác. Từ đó ta có thể phân lập được gen mong muốn.

Ví dụ, muốn phân lập vùng điều hòa lac, đầu tiên cắt DNA chứa gen lac bằng Hind III và tạo nhiều phân đoạn trong đó có một đoạn chứa lac dài 660bp. Đoạn này được tách bằng cách điện di trên gel. Phân đoạn thu được cắt tiếp bằng enzyme Hae III thành đoạn chứa 174bp vẫn còn chứa hệ thống

điều hòa và gen lac. Nếu tiếp tục cắt bằng những RE thích hợp ta sẽ phân lập được vùng điều hòa gen lac.

Ngoài ra, các RE còn được sử dụng để tạo các vector chuyển gen.

4.2- CÁC LOẠI NUCLEASE

4.2.1- Phân loại

Các nuclease có khả năng phân cắt phân tử DNA hoặc RNA. Có ba kiểu phân loại các nuclease sau:

1,- Dựa vào bản chất của cơ chất mà nó tác dụng, người ta chia nuclease làm hai loại:

- Deoxyribonuclease (DNase), cơ chất của nó là DNA
- Ribonuclease (RNase), cơ chất của nó là RNA

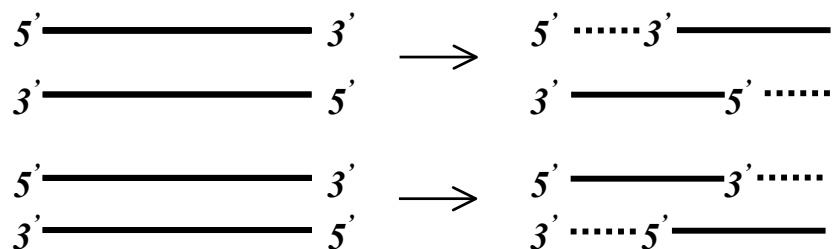
2,- Dựa theo kiểu liên kết mà enzyme thủy phân, người ta cũng chia ra làm hai loại:

- Nuclease "a": Thủy phân đặc hiệu liên kết phosphodiester giữa cacbon (C_{3'}) và nhóm phosphate.

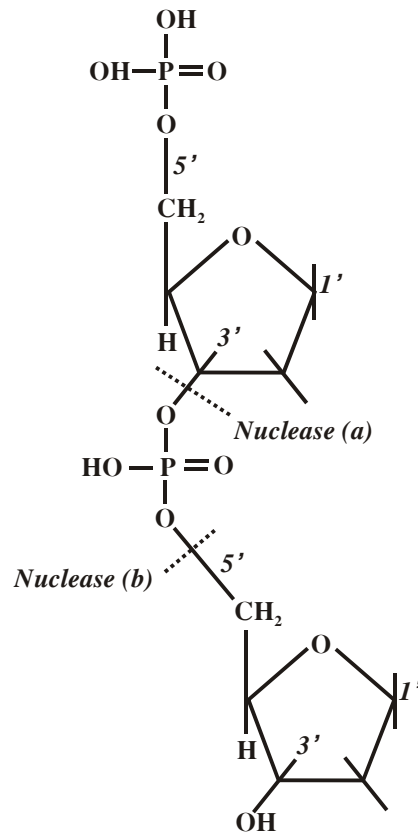
- Nuclease "b": Thủy phân đặc hiệu liên kết phosphoester giữa cacbon (C_{5'}) và nhóm phosphate (Hình 4-1).

3,- Dựa theo hoạt tính enzyme, người ta cũng chia ra làm hai loại exonuclease và endonuclease:

- *Exonuclease*: Cắt các liên kết phosphoester từ hai đầu của chuỗi polynucleotide và từ đó cắt dần từng nucleotide, chúng đòi hỏi là phải có nhóm OH (3') hoặc OH (5') tự do ở hai đầu chuỗi.



- *Endonuclease*: Thường thuỷ phân liên kết phosphoester ở vị trí bất kỳ bên trong chuỗi và tạo ra các oligonucleotide.



UUHình 4-1: Phân loại nuclease theo liên kết bị cắt

4.2.2- Một số nuclease thường dùng và ứng dụng của nó

4.2.2.1- *DNase I*

Là một endonuclease có khả năng phân cắt phân tử DNA sợi đơn hoặc sợi đôi sau các bazơ pyrimidine để tạo hỗn hợp oligonucleotide có nhóm phosphat ở đầu 5'. Khả năng phân cắt sợi đơn hoặc sợi đôi trong phân tử DNA phụ thuộc vào sự có mặt của Mn^{+2} và Mg^{+2} .

- Khi có mặt của Mn^{+2} , enzyme này tấn công vào sợi đôi tạo vết cắt đầu bằng hay đầu dính.

- Khi có mặt của Mg^{+2} , nó tấn công vào một sợi trên phân tử DNA một cách độc lập.

Các DNase được sử dụng để loại DNA ra khỏi dịch chiết RNA nhằm làm tinh sạch RNA. Ngoài ra, người ta còn dùng để tạo vết đứt ngay trên phân

từ DNA trong kỹ thuật đánh dấu hay phát hiện những gen đang hoạt động trên nhiễm sắc chất, vì ở nồng độ thấp chúng chỉ cắt ở những vị trí siêu nhạy cảm như những gen mở, vùng vừa phiên mã.

4.2.2.2- *Nuclease S1*

Là enzyme được tách từ nấm sợi *Asp. oryzae*, có khả năng phân huỷ DNA sợi đơn, DNA sợi đôi. Không có khả năng phân cắt phân tử lai DNA-RNA.

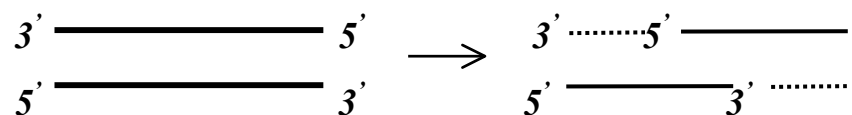
Các enzyme nuclease S1 được sử dụng nhằm các mục đích sau:

- Phân tích cấu trúc của các phân tử lai DNA- RNA,
- Loại bỏ các mạch đơn của đầu so le để tạo đầu bằng,
- Loại bỏ những cấu trúc kẹp tóc trong khi tạo cDNA.

4.2.2.3- *Desoxyribonuclease III* (Exonuclease III)

Enzyme này được tách từ vi khuẩn *E. Coli*.

Nó xúc tác phản ứng phân cắt các trình tự nucleotide từ đầu 3'-OH tự do của một theo hướng 3' → 5'. Kết quả là tạo vùng mạch đơn dài trên DNA sợi đôi, ngoài ra còn có hoạt tính 3'-phosphate.



Enzyme này được ứng dụng để tạo các cấu trúc mạch đơn ở một số vùng trên phân tử DNA để sản xuất mẫu dò đặc trưng cho từng mạch hoặc phối hợp với nuclease S1 tạo đột biến mất đoạn tại những vùng đặc biệt.

4.2.2.4- *Enzyme ribonuclease* (RNase A và RNase H)

RNase hiện diện ở mọi nơi, enzyme thương mại được trích ly từ tụy bò.

Đặc trưng cắt liên kết phosphodiester ngay sau một bazơ pyrimidine như uracil và cytosine của RNA mạch đơn. RNase A bền nhiệt không mất hoạt tính ở 90°C trong một giờ.

Được ứng dụng để loại bỏ RNA còn sót lại trong dịch chiết DNA hoặc loại bỏ các vùng không bắt cặp của RNA trên phân tử lai DNA- RNA.

RNase H là enzyme xúc tác loại bỏ RNA. Sau khi phiên mã ngược để tiếp tục tổng hợp mạch thứ hai của cDNA hình thành mạch DNA sợi đôi.

4.2.2.5- *Enzyme phosphodiesterase*

Là một loại nuclease có trong nọc rắn, cơ chất tác dụng là DNA và RNA, tấn công từ đầu 3' của chuỗi polynucleotide.

4.3- ENZYME KẾT NỐI

4.3.1- **Ligase**

Để kết nối hoặc hàn hai mảnh DNA hoặc RNA người ta phải sử dụng enzyme ligase trong sự có mặt của ATP. Khi đó tạo ra một liên kết ester giữa một mảnh chứa 5' –phosphat và một mảnh chứa 3'–OH. Chúng thường được sử dụng kết hợp với enzyme khác như kinase và alkaline phosphatase. Thông thường, khớp hai mảnh đầu dính dễ hơn hai mảnh có đầu phẳng.

4.3.1.1- *Ecoli DNA ligase*

Enzyme này được trích ly từ *E. Coli*, chỉ có thể xúc tác nối hai mảnh DNA có đầu so le. Ứng dụng tạo DNA tái tổ hợp trong kỹ thuật tách dòng.

4.3.1.2- *T₄ DNA ligase*

Enzyme này được trích từ phage T₄. Có khả năng xúc tác nối hai trình tự DNA đầu so le và đặc biệt là hai trình tự đầu bằng. Khả năng gắn mạnh hơn 10 lần so với ligase tách từ *E. Coli*. Được ưa chuộng trong kỹ thuật tách dòng.

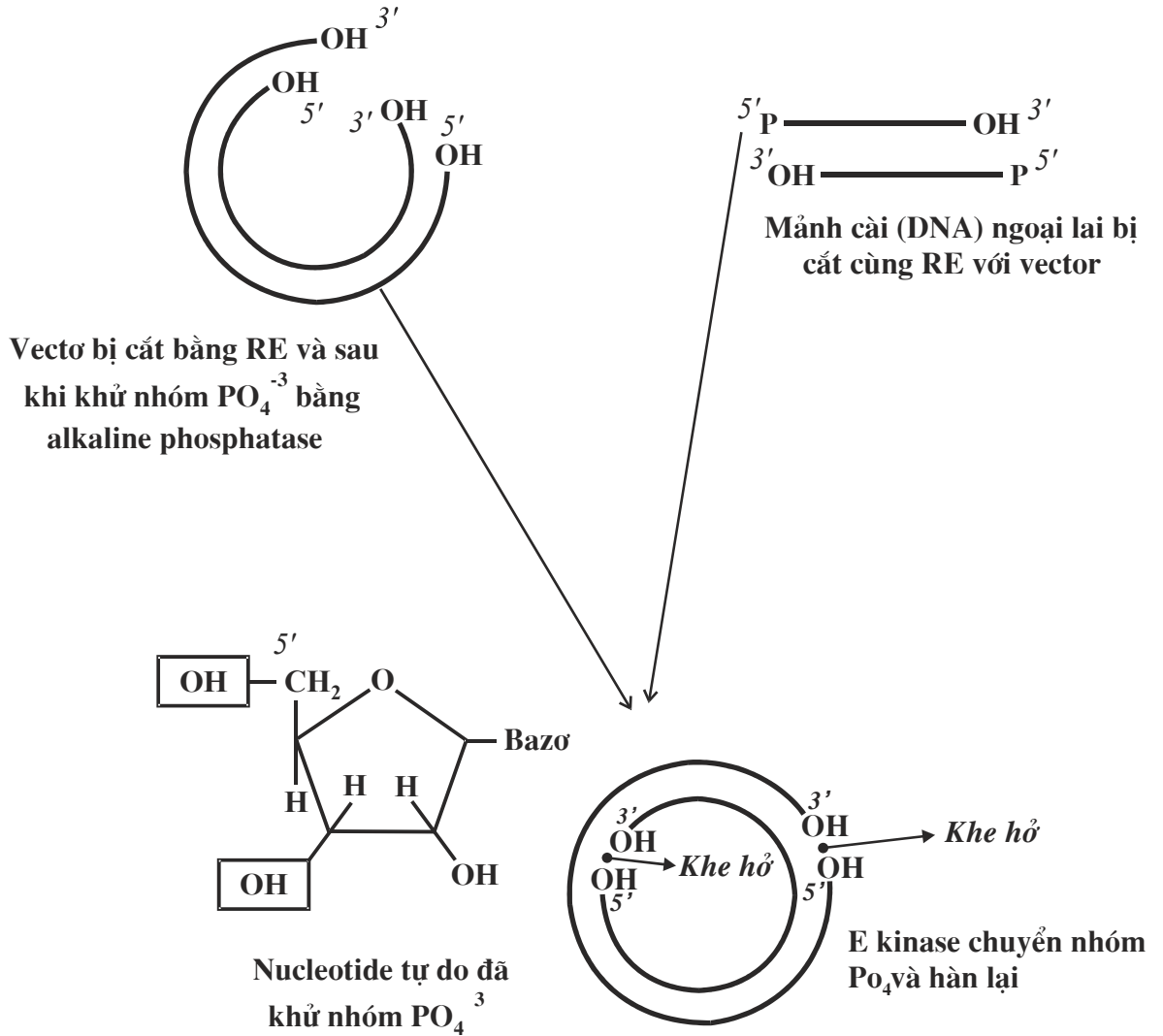
4.3.1.3- *T₄ RNA ligase*

Enzyme này được trích từ phage T₄, xâm nhiễm *E. Coli*. Có khả năng xúc tác nối hai trình tự RNA bằng liên kết phosphodiester. Cơ chất của nó thường là những phân tử nhỏ nên được dùng đánh dấu phóng xạ đầu 3' của các phân tử RNA dùng làm mẫu dò phân tử.

4.3.2- Các enzyme dephosphoryl hoá (khử nhóm PO_4^{-3})

1,- Alkaline phosphatase:

Được trích ly từ *E. Coli* hay từ ruột bê. Đặc tính của enzyme này là hoạt động ở pH kiềm và có khả năng xúc tác khử nhóm phosphate 5' của một chuỗi DNA hoặc RNA và các nucleotide tự do.



UUHình 4-2: Phản ứng nối DNA ngoại lai với vector đã khử nhóm PO_4^{-3}

Alkaline phosphatase được ứng dụng để:

- Loại bỏ nhóm phosphate 5' trên trình tự DNA hoặc RNA trước khi đánh dấu phóng xạ 5' của chúng bằng P^{32} làm mẫu dò phân tử lai.
- Loại bỏ nhóm phosphate 5' trên một vector vừa mới bị cắt bởi enzyme RE. Nhằm tránh vector này đóng kín trở lại, khiến cho việc cài mảnh DNA

ngoại lai vào bị cản trở. Trong trường hợp này, sợi kép được cài vào có mang hai nhóm phosphat ở 5' sẽ tạo ra hai trong bốn liên kết este để hình thành một DNA tái tổ hợp kép vòng kín có chứa hai khe hở.

Sự chắp nối vector đã bị khử PO_4^{-3} ở 5' với DNA ngoại lai tạo ra DNA tái tổ hợp sợi kép có hai chỗ trống (OH) do OH 3' của đoạn ngoại lai không tạo liên kết ester với OH 5' của vector đã khử nhóm PO_4^{-3} (Hình 4-2).

4.3.3- Các enzyme phosphoryl hoá

- *Enzyme kinase* (T_4 polynucleotide kinase): được chiết từ trực khuẩn T_4 xâm nhiễm *E. Coli*. Có khả năng chuyển nhóm phosphate từ phân tử ATP lên đầu 5' của DNA hay RNA đã bị khử phosphate bởi enzyme alkaline phosphatase.

Enzyme kinase được ứng dụng để đánh dấu phóng xạ ở đầu 5' của DNA làm mẫu dò phân tử trong kỹ thuật lai hoặc để chuyển nhóm PO_4^{-3} tới các trình DNA không có nhóm PO_4^{-3} trong phương pháp tạo dòng.

4.4- CÁC ENZYME TỔNG HỢP

Enzyme sao chép một axit nucleic: Quá trình sao chép chuỗi axit nucleic tức là tổng hợp một chuỗi DNA hoặc RNA được tiến hành theo nguyên tắc bổ sung và đối song song. Việc thêm một nucleotide mới được tiến hành theo hướng $5' \rightarrow 3'$.

4.4.1- Enzyme sao chép DNA \rightarrow DNA

Là các enzyme DNA-polymerase I, enzyme T_4 DNA-polymerase, Taq polymerase tổng hợp chuỗi DNA từ một khuôn DNA hay còn gọi "enzyme phụ thuộc DNA".

4.4.1.1- *Enzyme DNA - polymerase I*

Enzyme DNA-polymerase có nguồn gốc được tách từ vi khuẩn *E. Coli*, chúng có ba hoạt tính:

- Hoạt tính tổng hợp DNA theo hướng $5' \rightarrow 3'$ và sửa chữa trong sao chép,
- Hoạt tính exonuclease theo hướng $3' \rightarrow 5'$,

- Hoạt tính exonuclease theo hướng $5' \rightarrow 3'$.

Ngày nay enzyme DNA-polymerase được dùng chủ yếu để xác định trình tự DNA bằng phương pháp dideoxynucleotide của Sanger, ngoài ra, còn dùng để tổng hợp mẫu dò có độ phóng xạ cao, hoặc xây dựng các vector từ DNA mạch đơn.

Trong thực tế người ta hay sử dụng đoạn Klenow là sản phẩm thủy phân của enzyme DNA-polymerase I, có hoạt tính exonuclease theo hướng $3' \rightarrow 5'$ và hoạt tính tổng hợp.

4.4.1.2- **Enzyme *T₄* DNA - polymerase**

Có nguồn gốc từ phage T_4 xâm nhiễm *E. Coli* có hoạt tính exonuclease theo hướng $3' \rightarrow 5'$. Enzyme này mạnh nên được sử dụng nhiều để tổng hợp mẫu dò có độ phóng xạ cao.

4.4.1.3- **Enzyme *Taq* - polymerase**

Trích li từ vi khuẩn *Thermococcus aquaticus*, là enzyme chịu nhiệt cao, có tác dụng khuếch đại tổng hợp DNA. Enzyme này chủ yếu sử dụng để nhân dòng gen trong phản ứng PCR.

4.4.2- **Enzyme phiên mã ngược (Reverse transferase)**

Là enzyme có khả năng sao chép bộ gen RNA của retrovirus khi ký sinh trong tế bào chủ tạo ra cDNA, theo chiều $5' \rightarrow 3'$ cần có mặt của môi. Đây là giai đoạn cần thiết để tạo ra ngân hàng cDNA.

Hiện nay trên thị trường enzyme phiên mã ngược có nguồn gốc từ AMV (Avian Myeloblastosis Virus). Enzyme phiên mã ngược là một DNA-polymerase $5' \rightarrow 3'$, có các đặc tính sau:

- Là enzyme phụ thuộc RNA,
- Tổng hợp DNA theo hướng $5' \rightarrow 3'$,
- Có hoạt tính RNase.

Chúng được ứng dụng để thiết lập ngân hàng cDNA hoặc tiến hành phản ứng PCR trên mRNA, ngoài ra, chúng còn được sử dụng để xác định trình tự DNA bằng phương pháp sử dụng các didesoxynucleotide của Sanger.

4.4.3- Các enzyme tổng hợp RNA (RNA-polymerase)

Có ba loại RNA polymerase được sử dụng nhiều nhất hiện nay là SP6 RNA-polymerase có nguồn gốc từ phage xâm nhiễm *Salmonella typhimurium*. T₃, T₇ RNA-polymerase được trích ly từ phage T₃ và T₇ xâm nhiễm *E. Coli*.

Các enzyme này hoạt động trên sợi khuôn DNA xúc tác sự tổng hợp RNA theo hướng 5' → 3'. Quá trình tổng hợp không cần mồi nhưng khuôn DNA phải mang promoter đặc trưng của phage. Các enzyme này được ứng dụng để:

- Để tổng hợp các mẫu dò RNA đánh dấu phóng xạ trong phòng thí nghiệm.
- Nghiên cứu bản phiên mã RNA của một DNA đã được dòng hóa nhờ phương pháp PCR.
- Xác định trình tự DNA được gắn trong một vector có mang các promoter đặc trưng của phage SP6, T₃, T₇.

Ngoài ra người ta còn dùng enzyme này tổng hợp lượng lớn RNA từ DNA được nối ngay sau promoter thích hợp.

4.4.4- Enzyme terminal - transferase

Enzyme này được trích ly từ tuyến ức bê. Có các đặc tính:

- Terminal-transferase xúc tác gắn cùng một loại nucleotide vào đầu 3'-OH tự do của phân tử DNA để tạo đuôi polynucleotide.

Chúng được ứng dụng để:

- Thêm đuôi polynucleotide để tạo đầu sole cho phân tử DNA dùng trong kỹ thuật tạo dòng.
- Đánh dấu đầu 3' (OH) của phân tử DNA để xác định trình tự axit nucleic theo Manxam và Gilbert.

CHƯƠNG V

VECTOR CHUYỂN GEN

5.1- KHÁI NIỆM VỀ VECTOR

5.1.1- Sự chuyển gen

Việc nghiên cứu một gen xác định ở sinh vật eucaryote gặp phải nhiều khó khăn, vì gen đó chỉ là trình tự nhỏ nằm lọt trong toàn bộ gen có kích thước lớn. Để thu nhận lượng gen tinh sạch với hàm lượng lớn người ta phải chuyển và tạo dòng gen đó.

Để chuyển gen từ tế bào A (tế bào cho) sang tế bào B (tế bào nhận) chỉ có thể thực hiện bằng cách dính các gen cần chuyển vào một yếu tố trung gian được gọi là đoạn dẫn.

Những đoạn dẫn này có khả năng hướng dẫn, vận chuyển các đoạn gen cần nghiên cứu vào tế bào nhận. Đoạn dẫn này chính là các vector chuyển gen.

5.1.2- Vector

Vector là phân tử DNA nhỏ (ngắn) dạng thẳng hoặc dạng vòng, trong đó, người ta sẽ cài một mảnh DNA (gen quý) cần nghiên cứu. Những mảnh DNA đã được cài gọi là đoạn cài (insert) hoặc DNA ngoại lai hoặc DNA lạ.

Các phân tử DNA nhỏ này thường là những thực khuẩn thể hoặc các plasmid mà trong bộ gen của chúng có tín hiệu cần thiết cho chúng tái bản, nhưng chúng lại không biết tái bản (sinh sôi nảy nở) một mình. Chúng cần đưa vào trong các tế bào chủ (ví dụ như tế bào vi khuẩn chẳng hạn).

5.2- NHỮNG YÊU CẦU TỐI THIỂU CỦA MỘT VECTOR CHUYỂN GEN

Vector phải có một vùng nhận biết đối với một enzyme giới hạn loại II. Vùng này sẽ là vùng cài lắp một DNA (gen cần nghiên cứu) đã được xử lý bởi cùng enzyme giới hạn. Thật vậy, mỗi một RE tạo ra một đầu so le riêng, có khả năng gắn với một đoạn DNA mang đầu so le tương ứng. Hơn nữa, các vùng nhận biết này thường được đặt vào giữa các gen chỉ thị để tiện theo dõi

sự biểu hiện hoạt động của gen tái tổ hợp. Thông thường, đó là những gen kháng kháng sinh, hoặc gen mã hóa tổng hợp enzyme có khả năng chuyển hoá cơ chất tạo màu để phát hiện trên mặt thạch.

Vector phải tồn tại trong tế bào chủ qua nhiều thế hệ và ít gây xáo trộn trong tế bào chủ.

Vector có kích thước càng nhỏ càng tốt để thu nhận lượng DNA tối đa và dễ biến nạp vào tế bào chủ.

Vector phải có khả năng tự sao chép tích cực trong tế bào chủ, không phụ thuộc vào sự sao chép bộ gen của tế bào chủ.

Đảm bảo sự di truyền bền vững của một DNA tái tổ hợp.

Chúng không có khả năng sống sót ngoài tế bào chủ và không chuyển vào tế bào chủ khác bằng con đường tiếp hợp.

Có trình tự điều hoà tạo điều kiện thuận lợi cho việc phiên mã của gen được đưa vào.

Khả năng biến nạp lớn nghĩa là có khả năng thâm nhập tốt vào tế bào chủ của vector mang gen tái tổ hợp.

Để theo dõi sự biểu hiện của gen tái tổ hợp, yêu cầu này là cần thiết cho việc phát hiện dòng cần tìm.

Tính chế dễ dàng với khối lượng lớn bản sao của gen gắn vào vector.

Ngày nay các vector chuyển gen ngày càng hoàn thiện và tiện lợi cho việc sử dụng. Không có vector nào toàn năng cho sự chuyển gen mà cần có sự lựa chọn tùy đối tượng và tùy kích thước đoạn gen cần tạo dòng. Chúng được cấu tạo với nhiều tính chất chuyên biệt để mang được các trình tự nucleotide như mong muốn.

5.3- MỘT SỐ ỨNG DỤNG CỦA VECTOR CHUYỂN GEN

- Một ứng dụng đầu tiên là để tiến hành một quá trình được gọi là sự tách dòng nhằm khuếch đại lượng lớn bản sao DNA xác định.
- Nghiên cứu sự biểu hiện của một đoạn DNA chưa biết.

- Đưa gen mà con người cần nghiên cứu vào tế bào chủ.
- Sản xuất protein từ gen được tạo dòng.
- Sản xuất RNA với khối lượng lớn từ DNA tạo dòng.

5.4- CÁC VẬT CHỦ THU NHẬN CÁC VECTOR CHUYỂN GEN

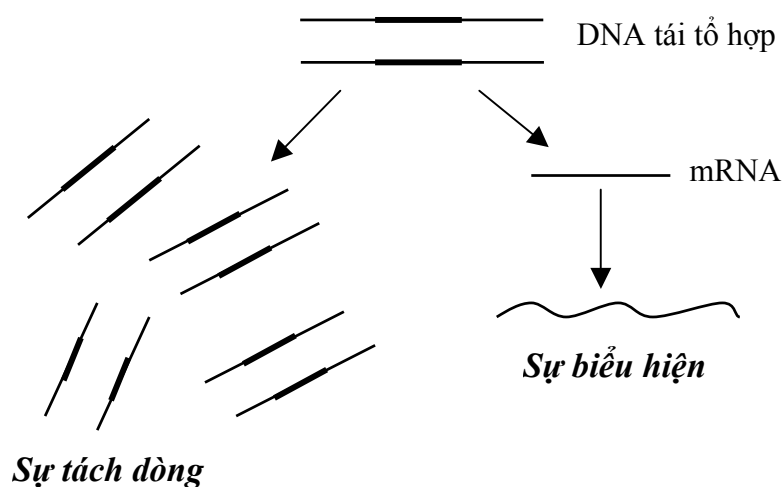
Mọi thao tác với DNA và việc tạo dựng các phân tử DNA tái tổ hợp được thực hiện trong ống nghiệm. Nhưng việc tạo dòng một gen mong muốn phải được thực hiện trong tế bào sống. Do vậy, việc biến nạp, tiếp nhận và thể hiện gen trong tế bào sống là cực kỳ quan trọng trong quá trình nghiên cứu.

Tế bào nhận gen tái tổ hợp phải là một cơ thể phù hợp với gen đó và phải có những biện pháp chọn lọc các tế bào chủ đã tiếp nhận gen.

Ngày nay, người ta đã biết có bốn loại vật chủ thu nhận các vector chuyển gen là:

- Vật chủ là vi khuẩn *E. Coli* và các vi khuẩn khác,
- Vật chủ là nấm men và nấm mốc,
- Vật chủ là tế bào thực vật bậc cao,
- Vật chủ là tế bào động vật có vú.

5.5- CÁC LOẠI VECTOR CHUYỂN GEN



UUHình 5-1: Những ứng dụng DNA tái tổ hợp

Dựa vào nguồn gốc người ta phân ra:

- Các vector là những plasmid,
- Các vector là phage,
- Các vector lai nhân tạo như: cosmid, bluescript.

Dựa vào chức năng người ta phân ra:

- Vector tách dòng (có kèm theo sự biểu hiện hoặc không biểu hiện của protein - Hình 5-1),
- Vector biểu hiện (vector tổng hợp).

5.5.1- VECTOR CHUYỂN GEN LÀ PLASMID

Các plasmid là những mẫu DNA nhỏ, ngắn, dạng vòng (khép kín), sợi đôi nằm ngoài nhiễm sắc thể, được tìm thấy đầu tiên trong tế bào một số vi khuẩn. Chúng sao chép được là nhờ một số enzyme có mặt trong tế bào vi khuẩn và không phụ thuộc vào sự sao chép nhiễm sắc thể vi khuẩn. Tùy các kiểu của plasmid mà số bản sao plasmid bởi vi khuẩn sẽ khác nhau. Một số plasmid chỉ có một bản sao duy nhất vì chúng tự tái bản chỉ một lần trong mỗi lần phân bào. Một số khác có số bản sao lớn vì chúng tái bản được nhiều lần trong mỗi chu kỳ phân bào. Những plasmid có từ 10 đến 100 bản sao trong tế bào chủ được xem như plasmid có bản sao cao. Plasmid khác có từ 1 đến 4 bản sao trong tế bào chủ, được xếp vào nhóm có bản sao thấp. Trong sinh vật eucaryote, plasmid chỉ có trong tế bào nấm men.

Mỗi plasmid đều có một chuỗi mã di truyền (sequence) mang chức năng tự tái bản DNA. Nếu không có vị trí khởi đầu phiên mã (ori) này, DNA không thể tự tái lập trong tế bào chủ. Với tính chất tự tái bản, plasmid là một vector chuyển gen để nhân dòng DNA cần thiết.

Do kích thước nhỏ nên plasmid chỉ chứa rất ít gen chọn lọc, thường đặc tính chọn lọc là kháng kháng sinh. Từ khi được phát hiện đến nay, các plasmid không ngừng được cải tiến và ngày càng được có thêm nhiều đặc tính quý cho việc tạo dòng.

Trong phòng thí nghiệm, người ta sử dụng các plasmid nhân tạo mà được tạo ra từ các plasmid tự nhiên và cài thêm một số chuỗi DNA.

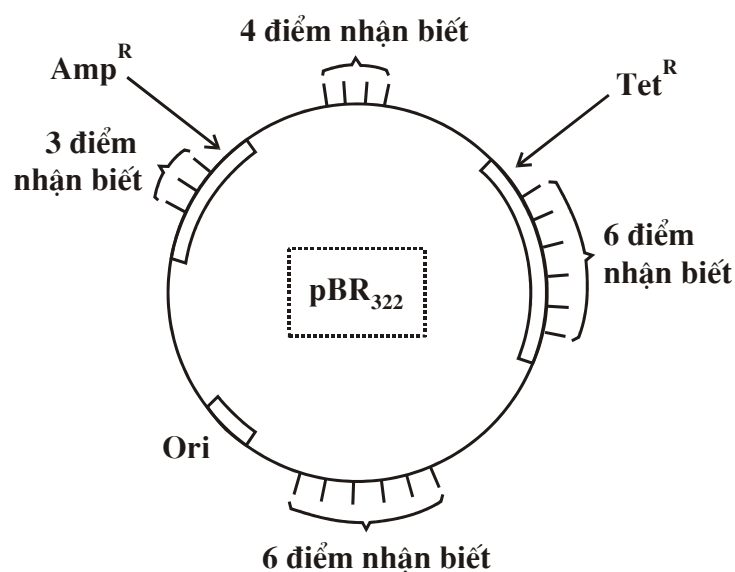
5.5.1.1- Các plasmid thế hệ thứ nhất

Thế hệ đầu tiên đó là các plasmid tìm thấy trong tự nhiên pSC₁₀₁ (Stalay-Cohen), ColE1 đã góp phần đầu tiên vào lịch sử tạo dòng. Tuy vậy các plasmid này có rất ít những đặc tính cần thiết. Sau này, các nhà nghiên cứu đã tìm ra các plasmid nhân tạo thế hệ hai, ba bằng cách tập trung nhiều đặc tính quý của nhiều plasmid tự nhiên vào một cấu trúc duy nhất.

5.5.1.2- Plasmid thế hệ thứ hai

pBR₃₂₂ - là plasmid được sử dụng rất phổ biến vào những năm 1980 để nhân dòng trong tế bào *E. Coli*. Nó được tìm ra vào năm 1977 bởi Bolivar Rodrigues.

Các plasmid thế hệ thứ 2 được cấu tạo phức tạp hơn bắt nguồn từ plasmid nhỏ và được cấu tạo thêm nhiều đoạn gen quý (Hình 5-2).



Hình 5-2: Cấu tạo plasmid pBR₃₂₂

pBR₃₂₂ có kích thước 4.363bp và hai gen kháng thuốc, một chống chịu được ampicilline (amp^R) và một chống chịu được tetracycline (tet^R)

Có nhiều điểm nhận biết bởi enzyme cắt hạn chế và trong số đó có nhiều điểm nhận biết nằm trong gen kháng kháng sinh.

Ví dụ, gen kháng ampicilline có ba trình tự nhận biết bởi ba enzyme cắt hạn chế là PstI, PvuI, ScaI. Còn gen kháng tetracycline có sáu điểm nhận biết là: EcoRV, BamHI, SphI, SmaI, XmaIII, NnuI.

Việc cài DNA lạ được tiến hành một trong hai gen kháng thuốc. Nếu chỉ còn một gen kháng với kháng sinh là do một trong hai gen đã không nhận đoạn cài. Điều này cho phép để chọn lựa các plasmid tái tổ hợp.

Một ứng dụng nữa của pBR₃₂₂ là chúng có số bản sao lớn. Thực nghiệm cho thấy cứ 15 plasmid tái tổ hợp được biến nạp trong *E. Coli*, số lượng này có thể tăng lên từ 1.000 đến 3.000 bản sao trong điều kiện nuôi cấy tốt.

5.5.1.3- Các plasmid thế hệ ba

Đây là các plasmid mạnh và đa năng, tiện sử dụng cho nhiều loại RE khác nhau với hàng chục trình tự nhận biết của chúng được nối tiếp nhau thành một đoạn dài gọi là polylinker. Kích thước nhỏ, sao chép nhanh trong tế bào vi khuẩn, tạo số lượng bản sao lớn.

Các plasmid thế hệ 3 được chia làm 3 nhóm lớn:

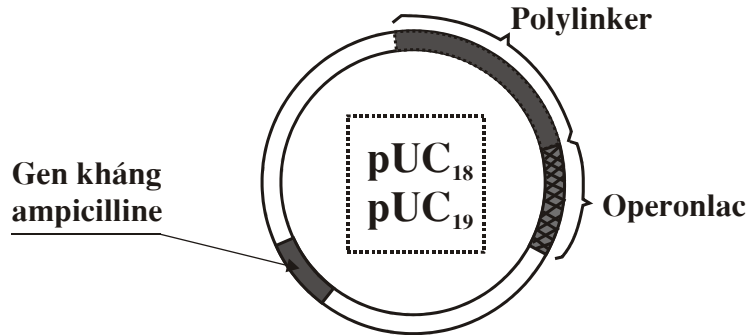
- Dãy pUC như: pUC₁₈, pUC₁₉ (Hình 5-3)
- Dãy Gemini: Plasmid pGEM₃, Plasmid pCR 2.1
- Nhóm các plasmid Bluescript

1,- Dãy pUC:

pUC là plasmid của University California, có kích thước 2,6kb và có một số đặc trưng sau:

- Có một mảnh operon lacZ, các vi khuẩn chủ yếu sử dụng với pUC dùng để tổng hợp enzyme β -galactosidase.
- Có vùng polylinker với 13 vùng giới hạn của 13 enzyme cắt hạn chế.
- Ở pUC₁₈, vùng hạn chế (EcoRI, SacI, KpnI, XmaI, BamHI, XbaI, Sall, HindI, AccI, BspmI, PstI, SphI, Hind III).

- Ở pUC₁₉, vùng polylinker có trình tự ngược lại (Hind IIIEcoRI).
- Có một gen bền với ampicilline, gen này mã hoá cho protein (enzyme) vốn được tiết ra trong khoảng ngoại biên màng sinh chất của vi khuẩn.

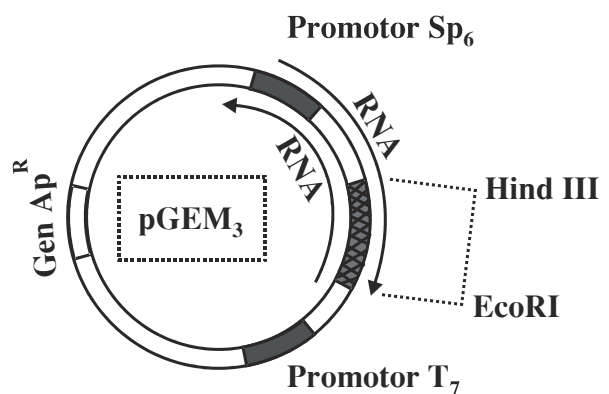


Hình 5-3: Cấu tạo plasmid pUC

Sự hiện diện của lacZ tạo thuận lợi cho vector tái tổ hợp bằng cách quan sát các vi khuẩn trên thạch để chọn vi khuẩn có khả năng tiếp nhận một plasmid. Sự có mặt của gen kháng ampicilline cho phép pUC được tiến hành nuôi cấy trên môi trường có ampicilline (Hình 5-3).

Ưu điểm: Kích thước nhỏ, dễ biến nạp vào tế bào vi khuẩn. Vùng polylinker cho phép gắn xen bất kỳ trình tự DNA lạ nào, hoặc có thể cho phép tạo dòng đoạn DNA có hai đầu dính khác nhau mà không cần chất gắn.

2,- Plasmid pGEM₃ : (Hình 5-4)



Hình 5-4: Cấu tạo plasmid pGEM₃ (Gemini)

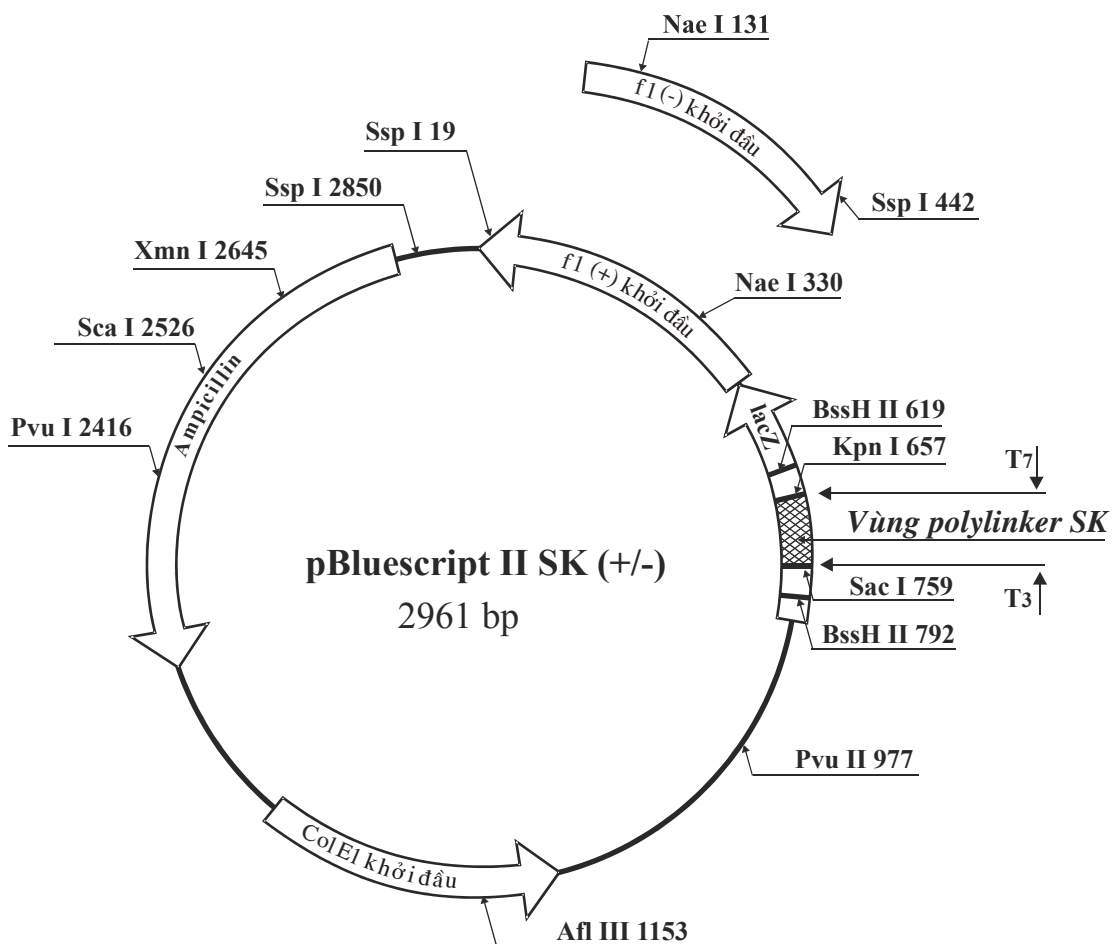
Kích thước khoảng 3kb, mang gen kháng ampicilline (Amp^R) và vùng polylineker gồm 13 trình tự nhận biết bởi 13 enzyme cắt hạn chế tương tự như vùng polylineker của pUC₁₉.

Hai promotor đặc trưng cho RNA-polymerase Sp₆ và T₇ ở hai bên vùng polylinker. Vì vậy có ưu điểm là cho phép phiên mã đoạn DNA gắn trong vector thành nhiều RNA, mà các RNA này thường được dùng làm mẫu dò, hoặc dùng trong nghiên cứu cấu trúc chức năng của RNA.

3,- Nhóm các plasmid bluescript:

Bluescrip là vector lai nhân tạo phage sợi và plasmid vì vậy nó được kết hợp tất cả những ưu điểm của các phage và ưu điểm của các plasmid, có thể xem đó là nhóm có tiềm năng nhất hiện nay.

Cấu tạo: Bluescript có cấu tạo dạng vòng khép kín, kích thước vào khoảng 2.961bp (Hình 5-5), bao gồm:



Hình 5-5: Cấu tạo pBluescript SK (+/-)

- Một mảnh lacZ ở đầu 5' của gen này có cài sẵn polylinker gồm 21 vùng giới hạn: KpnI, ApaI, DraII, XhoI, AccI, HindII, SalI, ClaI, HindIII, EcoRV,

EcoRI, PstI, SmaI, BamHI, SpeI, XbaI, NotI, XmaI, SacII, BstXI, SacI hoặc ngược lại. Ở vùng polylinker người ta còn tìm thấy một vùng nhận biết tương đối hiếm (NotI) mà không có ở dãy pUC. Với 2 promoter T₃ và T₇ để thu được đoạn cài RNA cùng chiều hoặc ngược chiều qua việc sử dụng RNA-polymerase của phage T₃ nhận biết promoter T₃ hoặc ngược lại.

- Một mảnh DNA của phage tùy mục đích sử dụng có thể là phage M₁₃ hoặc phage f₁. Vùng này sẽ sử dụng khi người ta muốn DNA tái bản dưới dạng sợi đơn hoặc sợi đôi, ngoài ra ở vùng này còn chứa điểm khởi đầu cho sự tái bản (ori). Song sự tái bản chỉ có thể xảy ra bởi sự đồng gây nhiễm với một virus trợ giúp (virus helper). Virus này sẽ bổ khuyết những chức năng thiếu bằng cách mang đến những gen mã hóa các enzyme cần thiết cho sự tái bản. Phụ thuộc vào sự cài đặt của mảnh DNA này so với chiều của gen lacZ, người ta sẽ có vector bluescript + hoặc -. Cặp này cho phép nhận được sợi cùng chiều hoặc ngược chiều.

Một gen chống chịu được ampicilline, gen này cho phép chọn lựa tất cả những vi khuẩn đã sát nhập một bluescript.

Trong vector bluescript còn có điểm khởi đầu sao chép colEI ori, chuỗi này cho phép nhân bản của phagemid (bluescript) ở trong *E. Coli* như plasmid. Giống gốc *E. Coli* được sử dụng thường là XL1Blu, trong bộ máy di truyền của chúng có chứa gen mã hóa tổng hợp tetracycline. Điều này cho phép dễ dàng chọn lựa những vector đã sát nhập vào vi khuẩn.

Ứng dụng: Tùy theo điều kiện thao tác người ta có thể sử dụng bluescript để nhân bản một đoạn DNA sợi đơn hoặc sợi kép hoặc sao chép RNA *invitro* để sản xuất đầu dò lai hóa hoặc tạo ngân hàng cDNA.

5.5.2- CÁC VECTOR CHUYỂN GEN LÀ PHAGE

Phage (thực khuẩn thể) là virus xâm nhiễm vi khuẩn làm phân giải vi khuẩn. Việc sử dụng phage làm vector chuyển gen có nhiều ưu điểm hơn so với vector là plasmid:

- Dễ xâm nhập vào vi khuẩn,
- Khả năng nhân lên nhanh trong tế bào chủ,

- Khả năng tiếp nhận đoạn DNA lạ lớn hơn plasmid.

Tuy nhiên, việc sử dụng phage có nhiều bất lợi như:

- Thao tác ghép DNA lạ phức tạp,
- DNA tái tổ hợp không tạo thành khuẩn lạc như DNA tái tổ hợp là plasmid, mà thành đĩa phân giải xuất hiện trên mặt thạch phủ đầy vi khuẩn

Phần lớn các nhóm phage sử dụng làm vector đều bắt nguồn từ phage λ thuộc thể hệ thứ nhất.

5.5.2.1- *Phage λ* (thể hệ đầu)

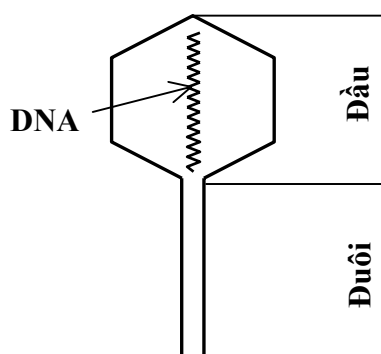
Cấu tạo (Hình 5-6) gồm hai phần: Phần đầu chứa DNA và được đóng gói trong vỏ protein. Phần đuôi cho phép virus có thể tự cố định trên các tế bào chủ là vi khuẩn:

- DNA của phage: Sợi đôi, mạch thẳng, dài 48,5kb gồm hàng chục gen. Đầu tận cùng của DNA là sợi đơn gồm 12 nucleotide và chúng được gọi là những đầu dính.

- Cũng như tất cả virus, DNA này được bao bọc trong vỏ protein.

Phage sinh sôi nảy nở theo hai cách:

- Chu kỳ tan: phage được sinh sôi nảy nở trong vi khuẩn. Các phage mới được tạo ra sẽ đi ra khỏi vi khuẩn bằng cách làm tan vi khuẩn này.



Hình 5-6: Cấu tạo của phage λ

- Sinh tan: Là một kiểu sinh sản khác của virus, phage không làm tiêu tan vi khuẩn, thay vì tự sinh sản trong tế bào chất, phage sát nhập DNA của mình với DNA của vi khuẩn.

5.5.2.2- *Các biến hình của phage λ* (phage thể hệ sau)

Các phage thuộc thể hệ thứ hai rất đa dạng, mỗi một loại thích ứng với một mục đích sử dụng.

1,- *Giảm một số vùng hạn chế giống nhau:*

Phage λ tự nhiên (chưa biến hình) gọi là phage hoang dại có chứa nhiều vùng hạn chế giống nhau như:

- 5 vùng EcoRI

- Nhiều vùng Hind III

Không thể cắt vector này bằng EcoRI hoặc HindIII để cài vào đây một mảnh DNA lạ. Người ta đã biến hình loại phage λ này chỉ còn chứa một vùng nhận biết của EcoRI tạo ra vector cài và hai vùng EcoRI tạo ra vector thay thế. *Ví dụ:*

- λ NM607 là vector cài chứa đoạn cài DNA dài 9kb ở vị trí cắt bởi EcoRI trong gen CI.

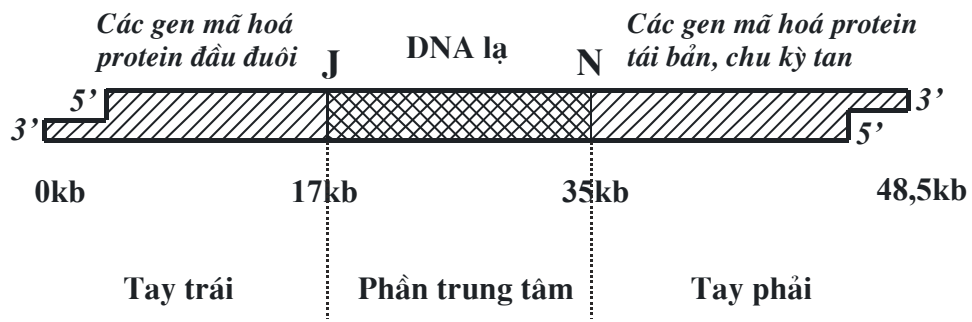
- λ charon 16: DNA được cài vào vị trí EcoRI làm ức chế gen lacZ.

- λ EMBL4 là một vector thay thế, đoạn DNA thay thế dài 23kb.

2,- *Làm khuyết những phần không cần thiết:* (Hình 5-7)

Phage λ chỉ có thể nhận được DNA lạ trong một chừng mực rất hạn chế. Khả năng của nó sẽ bị giảm rất nhiều khi độ dài genon (bộ gen) lớn hơn 105% (51 ÷ 52kb) hoặc nhỏ hơn 78% (38 ÷ 38,5kb) so với độ dài ban đầu.

Người ta tìm cách tăng chiều dài của đoạn được cài bằng cách giảm đi nhiều hoặc ít chiều dài những phần không cần thiết của genon của phage λ. Trong số các vector bỏ 1/3 phần trung tâm giữa gen J và N. Trong khi đó giữ lại đầu 5' (tay trái) vốn mã hoá cho protein đầu, đuôi. Cũng như đầu 3' (tay phải) vốn mã hoá cho protein thiết yếu cho sự tái bản và chu kỳ tan.

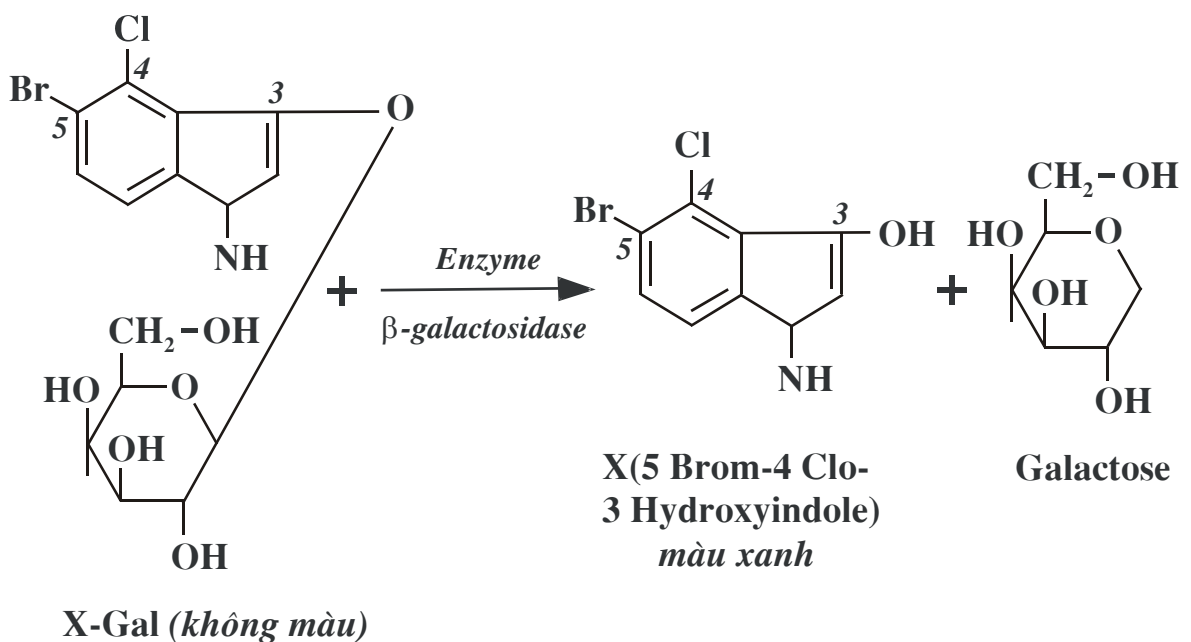


Hình 5-7: Phage λ biến hình

Phần trung tâm giữa gen J và N không cần thiết cho sự sinh sản của phage có thể được thay bằng DNA lạ. Các đầu mảnh 5' và 3' đều là đầu dính.

3,- *Cài một mảnh của operon lacZ:*

Mục đích là chọn ra phage tái tổ hợp mà đem lại khả năng phân biệt bằng mắt các phage λ đã được sát nhập một đoạn cài vào trong bộ gen của chúng.



Hình 5-8: Cơ chế phản ứng thủy phân X-Gal bởi enzyme β-galactosidase

Bắt đầu từ phage λ người ta đã cấu tạo nên (biến hình) phage λgt₁₁ đó là một vector biểu hiện. Phage này có cài vào gen lacZ một DNA cần tạo

dòng. Các phage $\text{gt}\lambda_{11}$ tạo ra được các vùng tan trắng nếu chúng đã được cài DNA lạ vào gen lacZ (gen chịu trách nhiệm tổng hợp β -galactosidase).

Các phage $\text{gt}\lambda_{11}$ tạo ra vùng tan xanh nếu như chúng không tiếp nhận đoạn cài DNA lạ.

Để phát hiện các phage λ tái tổ hợp, người ta cho vào môi trường chứa phage λ tái tổ hợp (môi trường nuôi cấy) một đường X-Gal (5brome-4chloro-indolyl- β -galactopyroside). Giống như đường lactose, nó bị thủy phân bởi enzyme β -galactosidase. Người ta có thể dễ dàng phát hiện khi có mặt của enzyme β -galactosidase (Hình 5-8).

5.5.2.3- Các vector chuyển gen M_{13}

Đặc tính cấu tạo: Là phage thể sợi, xâm nhiễm đặc trưng *E. Coli*. DNA của phage mạch đơn, có kích thước 6,4kb, trong đó có khoảng 10 gen.

Ứng dụng: Do ưu điểm của loại vector này là tạo được một lượng lớn phân tử DNA chỉ mang trình tự của một mạch, nên chúng thường được dùng xác định trình tự nucleotide trong phương pháp Sanger.

5.5.2.4- Các biến hình của phage M_{13}

- Vector M_{13} mp2 là dạng đơn giản nhất, có một hoặc hai trình tự nhận biết bởi EcoRI nhận đoạn cài có đầu dính được cắt bởi enzyme EcoRI.

- Vector M_{13} mp7 được tạo thành bằng cách đưa thêm vị trí cắt hạn chế vào gen lacZ của vector M_{13} mp2. Vector này có 4 điểm nhận biết bởi bốn enzyme cắt hạn chế: EcoRI, BamHI, Sall và PstI.

5.5.3- CÁC VECTOR CHUYỂN GEN KHÁC

5.5.3.1- Các cosmid

1,- Đặc tính cấu tạo: (Hình 5-9)

Các cosmid là những vector lai nhân tạo từ một plasmid với các trình tự cos của phage λ (được sử dụng từ năm 1978). Các trình tự cos này điều khiển sự đóng gói DNA tái tổ hợp vào đầu của phage. Khi bao gói các vùng cos đều bị cắt, chỉ còn một phần DNA của cosmid được giới hạn bởi các đầu dính với

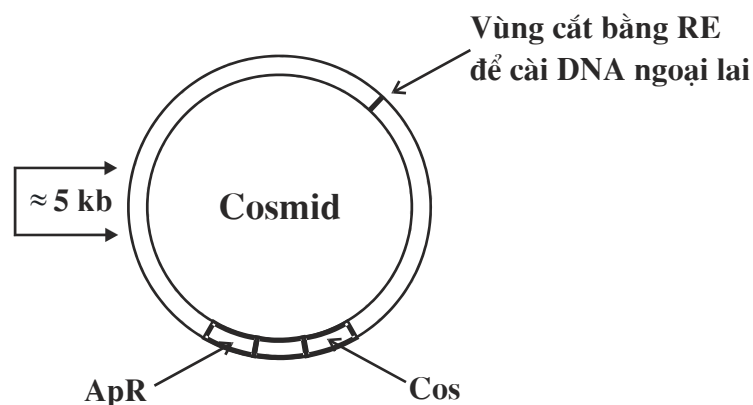
đoạn cài DNA lạ được bao gói. Trong phản ứng bao gói *in vitro*, các protein cần thiết cho sự tạo thành đầu và đuôi phải được thêm vào để cho các phage có thể tự hợp thành.

Cosmid là những plasmid có các vùng giới hạn mà tại đây, người ta có thể cài lắp DNA lạ và một gen chống chịu ampicilline. Kích thước cosmid \approx 5kb do đó, nó có thể nhận được đoạn cài 35÷45kb và có thể tới 47kb (như chúng ta đã thấy ở Mục 5.5.2.2, đầu của phage λ có thể bao gói được 52kb).

Vào thời điểm gây nhiễm *E. Coli*, DNA tái tổ hợp được phóng vào vi khuẩn. Trong vi khuẩn các đầu dính sẽ bắt cặp tạo ra cosmid tái tổ hợp khép kín dạng vòng và tái bản như một plasmid.

2,- Ưu điểm và ứng dụng của cosmid:

Cũng như phage, cosmid cho khả năng xâm nhiễm tế bào vi khuẩn lớn, nhận đoạn cài có kích thước lớn.



Hình 5-9: Cấu tạo cosmid

Trong tế bào chủ, nó tự nhân bản như plasmid. Cho nên người ta nhận được những khuẩn lạc, chứ không phải đĩa phân giải trên mặt thạch, thuận lợi cho việc quan sát.

Với những tiện lợi trên, người ta dùng cosmid để tách dòng từ những gen lớn để tạo ngân hàng genôm (bộ gen). Những vi khuẩn mang vector này có khả năng chống chịu với môi trường có ampiciline.

Tuy vậy việc ứng dụng cosmid để tách dòng cũng rất khó khăn và vất vả.

5.5.3.2- *Các nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men YAC* (Yeart - Artificial - Chromosomes)

Do nhu cầu tạo dòng với những trình tự DNA ngày càng lớn, các nhà nghiên cứu tìm tòi phát triển những vector ngày càng mới. Ngày nay người ta đã tạo ra YAC cho phép tạo dòng với những đoạn DNA dài 150÷1.000kb, trung bình là 350kb. Bằng nghiên cứu cho thấy ở nấm men (*Saccharomyces Cerevisiae*), nhiễm sắc thể muốn nhân đôi và phân ly tốt cần ba trình tự:

- 2 TEL (telomere): Trình tự đầu cuối của NST
- CEN (centromere - tâm động): Trình tự trung tâm của NST, đảm bảo sự chia đôi và đi về 2 cực của tế bào
- ARS (autonomously replicating sequence): Trình tự sao chép tự chủ tương tự như ori ở plasmid

Dựa vào đó người ta đã cấu tạo NST nhân tạo có đủ ba trình tự nói trên với cấu tạo gồm 2 cánh tay, giữa 2 cánh tay người ta có thể cài đặt một đoạn DNA cần tạo dòng với kích thước khoảng 150 đến 1.000kb. Trên mỗi cánh tay gồm các gen đánh dấu di truyền để chọn lọc các tế bào nấm men có chứa YAC và các chuỗi tận cùng có chức năng telomere đoạn cuối của NST. Một trong hai cánh tay mang một mảnh DNA hoạt động như một tâm động và một nguồn tái bản ori. Việc cài DNA lạ vào gen mã hóa chất ức chế tRNA vận chuyển tyrosine sẽ làm biến đổi màu sắc khuẩn lạc tế bào gốc có mang gen hô phách (khuẩn lạc từ trắng sang đỏ) khi có mặt của DNA lạ. Đây là dấu hiệu về sự hiện diện của YAC tái tổ hợp trong tế bào nấm men.

Các nhiễm sắc thể này được đưa vào tế bào chủ (nấm men), nó được nhân lên như NST khác ở trong tế bào nấm men và ta có được những gen mong muốn.

5.5.3.3- *Các nhiễm sắc thể nhân tạo của động vật có vú*

1,- *Cấu tạo*: Tương tự như YAC và bao gồm:

- Trình tự TEL
- Trình tự CEN
- Trình tự ARS

Nhưng khác với YAC là trình tự TEL và CEN có nguồn gốc từ người. Điều này cho phép MAC (Mammalian Artificial Chromosomes) vào tế bào động vật có vú và giữ được ổn định trong tế bào.

2,- Mục đích sử dụng:

Chủ yếu sử dụng nghiên cứu cho các tế bào bậc cao mà chúng ta không sử dụng được với tế bào nấm men. Khi đưa NST vào tế bào chủ, nó cũng tồn tại được và nhân lên trong tế bào chủ.

5.5.4- Các vector là virus của eucaryote

Là những vector từ virus và tế bào tiếp nhận vector này là tế bào eucaryote. Nó có cấu tạo giống như phage λ . Tuy nhiên các loại vector này có tính đặc hiệu cao và người ta xây dựng dựa trên những hiểu biết cụ thể.

CHƯƠNG VI

CÔNG NGHỆ DNA TÁI TỔ HỢP VÀ SỰ TÁCH DÒNG

6.1- CÔNG NGHỆ DNA TÁI TỔ HỢP

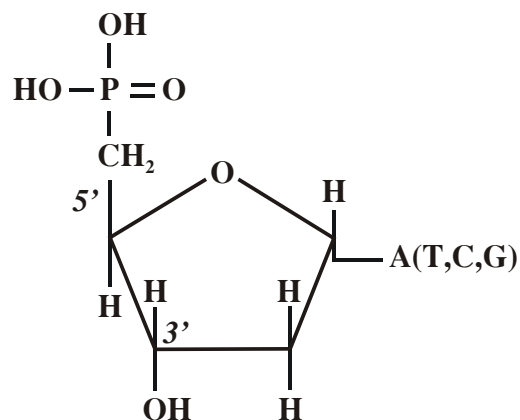
6.1.1- DNA tái tổ hợp

6.1.1.1- *Khái niệm*

1,- *DNA*:

DNA là chữ viết tắt của axit 2'-deoxyribonucleic, được nhà sinh học người Thụy Điển Miescher tìm ra vào năm 1869 trong nhân tế bào bạch cầu (tế bào máu). Đầu tiên ông gọi nó là nuclein có nghĩa là hạch nhân. Sau đó, ông đã phát hiện ra nó có bản chất axit và gọi nó là axit nucleic. Sau hơn 80 năm cùng với sự tranh cãi của nhiều nhà khoa học, đến năm 1952, người ta mới công nhận DNA là vật chất di truyền.

DNA gồm 3 thành phần chính: bazơ nitơ dạng purine và pyrimidine (A,T,C,G), đường pentose (đường 5 carbon) và axit phosphoric (H_3PO_4). Ba thành phần này có tỷ lệ 1:1:1 và chúng liên kết với nhau tạo thành một nucleotide:



Hình 6-1: Cấu tạo một nucleotide

Cấu trúc của DNA được Watson-Crick khám phá ra. Đó là chuỗi xoắn kép cong nhẹ nhàng, có cấu trúc không gian 3 chiều, gồm hai sợi song song,

đối xứng và bổ sung cho nhau theo một qui luật nghiêm ngặt: A bắt cặp với T và C bắt cặp với G nhờ các liên kết hydro. Cấu trúc xoắn kép của Watson-Crick là chiếc chìa khóa để mở ra những kỹ thuật của sự sống.

2,- DNA tái tổ hợp:

Với cấu trúc đặc biệt của phân tử DNA và sự bắt cặp nghiêm ngặt của các bazơ nitơ, nhiều nhà nghiên cứu đã nảy ra ý tưởng: nếu tạo ra được những đuôi ở một trong hai sợi của phân tử DNA khác nhau thì chúng có thể nối lại với nhau nhờ bắt cặp bổ sung.

Vào những năm 70, bằng những phương pháp khác nhau, người ta đã tạo được những phân tử DNA tái tổ hợp đầu tiên.

Năm 1972, nhóm nghiên cứu của trường đại học Stranford (Paul-Berg) đã đưa ra phương pháp đuôi để nối các phân tử DNA khác nhau. Để tạo đầu dính, người ta sử dụng enzyme terminal transferase. Dưới tác dụng của enzyme này, người ta đã tạo được những đuôi poly nucleotide khoảng 50 đến 100 gốc adenine (polyA) ở đầu OH (3') của mạch đơn DNA SV 40 (Simian virus 40) và đuôi polyT ở DNA plasmid đã được mở bởi enzyme. Sau khi trộn lẫn hai loại DNA này, các đuôi bổ sung adenine và thymine bắt cặp lại với nhau và với sự có mặt của enzyme ligase, hai DNA này được nối lại và tạo ra plasmid tái tổ hợp vòng. Vì sự an toàn cho cộng đồng nên sản phẩm tái tổ hợp này không được biến nạp trong tế bào chủ. Tuy chưa hoàn tất, nhưng thực nghiệm của Berg đã cho ta hai vấn đề mấu chốt về DNA tái tổ hợp. Ông cho rằng, có thể dùng enzyme để cắt DNA một cách định trước và các đoạn DNA ở các loài khác nhau có thể nối lại với nhau.

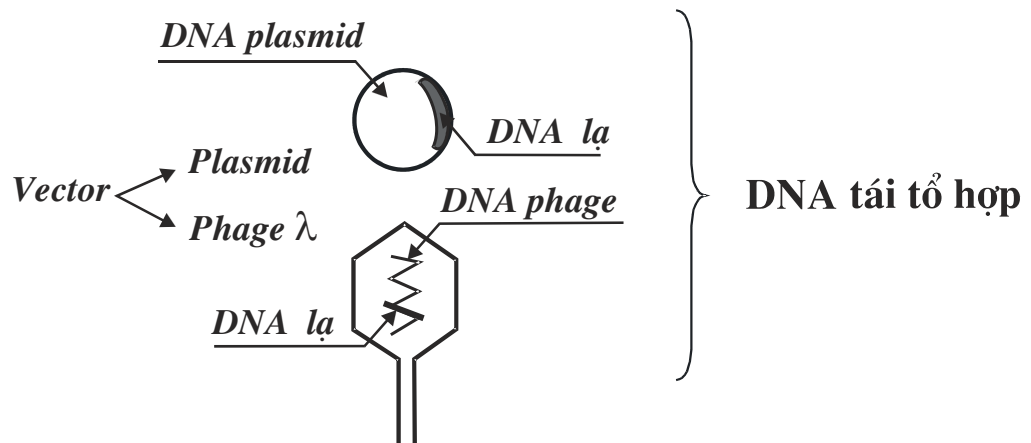
Năm 1973, Staley Cohen và Annie Chang đã tạo ra những phân tử DNA tái tổ hợp từ các loài khác nhau, có nhiều ưu điểm và đã được biến nạp trong tế bào chủ. Và từ đây, công nghệ DNA tái tổ hợp ra đời. Sau đó, nhiều nhà khoa học đã lao vào các thí nghiệm lắp ghép gen và nhanh chóng thu được những kết quả có ứng dụng trong thực tiễn.

Kỹ thuật tái tổ hợp DNA do Rerg, Chang, Boyer và Cohen đề ra đã giúp các nhà sinh học có thể làm thay đổi tính di truyền của cơ thể sống theo chiều hướng định trước và vượt qua được hàng rào ngăn cản loài. Mỗi tổ hợp DNA mới đều tạo nên những đặc điểm sinh học mới kể cả về mặt di truyền lẫn sinh hóa.

Vậy người ta gọi DNA tái tổ hợp là một DNA lai, tìm được *invitro* (trong ống nghiệm) bằng cách tổ hợp 2 DNA thuộc 2 loài khác nhau.

Ví dụ: Hai vector là plasmid, phage λ được cài mảnh DNA lạ để tạo ra DNA tái tổ hợp (Hình 6-2).

Các DNA lạ này được gọi là đoạn cài hay DNA ngoại lai. Nó chính là một mảnh (đoạn) DNA hay là gen mà người nghiên cứu quan tâm và ghép nó vào DNA của plasmid hay DNA của virus.



Hình 6-2: Mô hình biểu diễn sự tạo ra DNA tái tổ hợp

6.1.1.2- Mục đích tạo DNA tái tổ hợp

DNA tái tổ hợp được chế tác với mục đích là để thực hiện một quá trình gọi là sự tách dòng. Tách dòng là sự tách lập và thu nhận nhiều bản sao đồng nhất của một gen hay của một mảnh đoạn DNA. Tách dòng có thể được đi kèm hoặc không được đi kèm với sự biểu hiện protein. Những áp dụng này của DNA tái tổ hợp dùng để thiết lập các ngân hàng bộ gen, cDNA hoặc tổng hợp protein, enzyme, hormone, ...

6.1.1.3- Những yêu cầu của DNA tái tổ hợp

- DNA tái tổ hợp phải đạt được những yêu cầu cần thiết của một vector chuyển gen (xem Chương 4).

- DNA tái tổ hợp phải có hoạt tính khi đưa vào tế bào chủ.

- DNA tái tổ hợp phải có những dấu hiệu dễ phát hiện trong quần thể vi khuẩn. Và dễ quan sát sự hoạt động và biểu hiện của gen tái tổ hợp.

6.1.2- Các công đoạn chính tạo DNA tái tổ hợp

6.1.2.1- Chọn nguyên liệu

DNA được chọn làm phương tiện vận chuyển gen (vector) thường là DNA plasmid và DNA phage. Chúng được thu nhận chủ yếu từ tế bào vi sinh vật, được tách và làm sạch theo phương pháp chiết tách DNA plasmid, DNA virus (Chương 7).

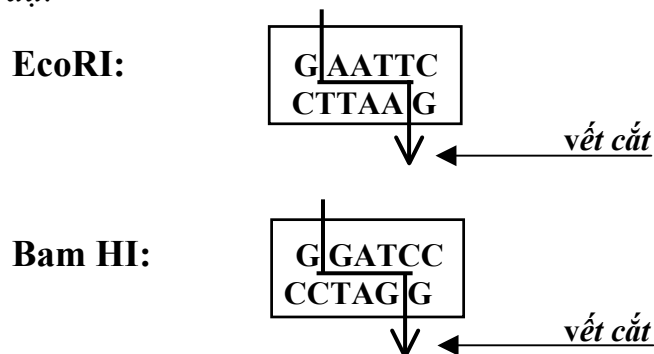
DNA chứa gen cần nghiên cứu (DNA lạ) cũng được thu nhận từ tế bào sinh vật được chiết tách và làm sạch và kiểm tra theo phương pháp chiết tách DNA. Ngoài ra, người ta còn sử dụng DNA tổng hợp bằng phương pháp hóa học hoặc tổng hợp từ mRNA nhờ enzyme sao chép ngược theo cơ chế nuclease S₁ hoặc kỹ thuật Gubler-Hoffman.

Các enzyme để cắt, nối các đoạn DNA lại với nhau như enzyme restriction, enzyme ligase cùng với sự hợp tác của một số enzyme khác như kinase và alkaline phosphatase, ...

6.1.2.2 Công đoạn cắt với sự tham gia của enzyme RE kiểu II

RE (Restriction Endonuclease) kiểu II: là những enzyme cắt hạn chế ở những vị trí xác định và được dùng trong công nghệ DNA tái tổ hợp bởi vì chúng có một số ưu điểm: Hầu như chỉ có một kiểu hoạt tính cắt, enzyme khác đảm nhiệm việc cải biên. Mỗi một enzyme cắt ở vị trí phù hợp định trước ngay ở bên trong hay cạnh trình tự nhận biết. Chúng chỉ cần ion Mg⁺² và không cần năng lượng ATP.

Ví dụ:



- Các enzyme này gập chuỗi đích của nó trên phân tử DNA và cắt DNA thành hai mảnh dạng đầu bằng hay đầu dính. Hiệu quả cắt của enzyme giới hạn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau như hàm lượng của enzyme, nhiệt độ, ion kim loại, môi trường đệm, pH và độ tinh khiết của DNA.

6.1.2.3- *Công đoạn nối với sự có mặt của DNA ligase*

Bước tiếp theo của kỹ thuật di truyền là nối các đoạn DNA vào vector chuyển gen để tạo plasmid có mang DNA lạ. Phản ứng nối được thực hiện nhờ enzyme DNA ligase.

DNA ligase là một enzyme xúc tác các phản ứng nối hai mảnh DNA bằng cách tạo cầu nối phosphodiester giữa đầu 5'(P) và đầu 3'(OH) của hai nucleotide đứng cạnh nhau (Hình 6-2). Trong sinh học phân tử, người ta coi DNA ligase như một chất keo phân tử để kết dính các mẫu DNA lại với nhau.

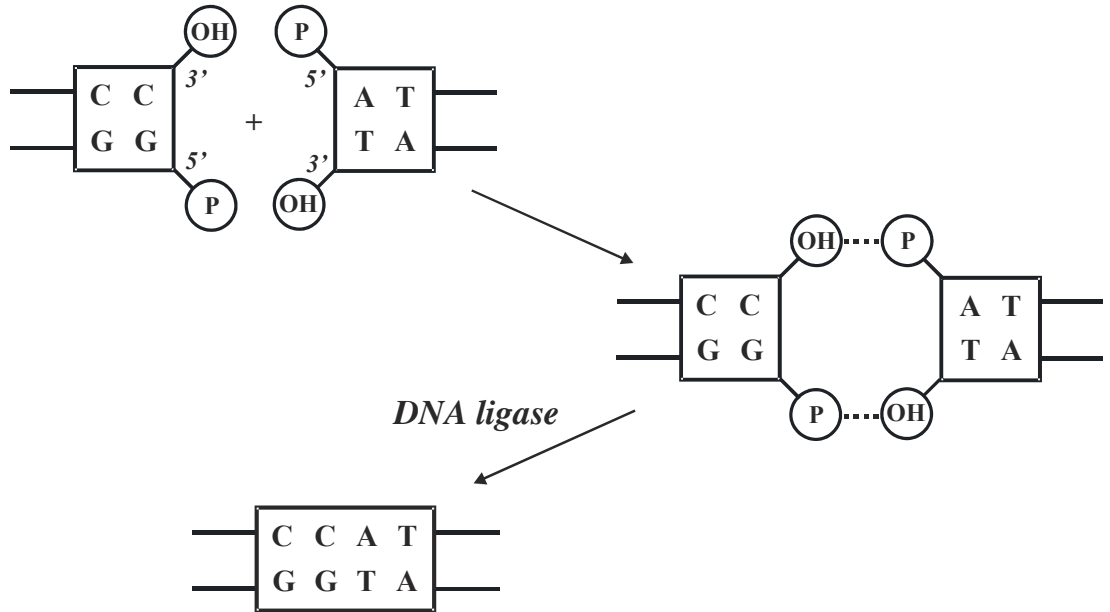
1,- *Nối đầu bằng:*

Nối đầu bằng được xảy ra khi hai đoạn DNA đầu bằng đứng cạnh nhau. Dưới tác dụng của enzyme ligase, liên kết phosphodiester giữa đầu 5'(P) và đầu 3'(OH) được hình thành và hai nucleotide được nối lại với nhau (Hình 6-3a). Khả năng nối hai đoạn DNA đầu bằng rất thấp. Để tăng hiệu suất phản ứng, thường người ta phải tăng nồng độ của các đoạn DNA.

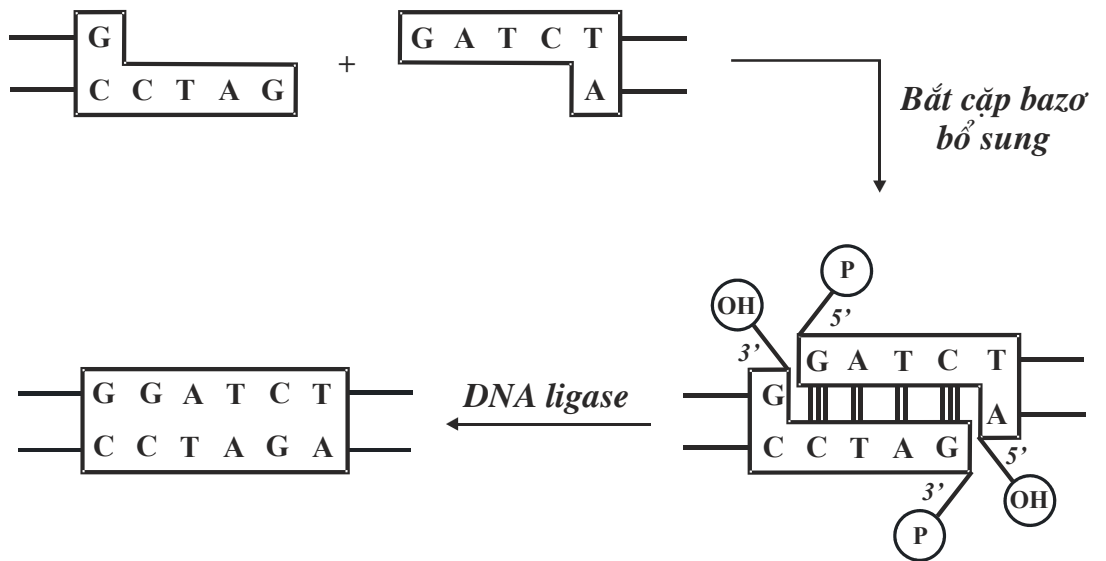
2,- *Nối đầu lệch:*

Đầu tiên, hai mảnh DNA đầu lệch do có những bazơ bổ sung nên chúng tiến gần lại nhau để tạo liên kết hydro giữa các bazơ nitơ bổ sung. Sau đó, hai nucleotide của hai đầu nối tạo liên kết este giữa OH(3') và P(5') dưới tác dụng của enzyme DNA ligase. Phản ứng nối được thực hiện theo sơ đồ được biểu diễn trên Hình 6-3b.

a,- Nối đầu bằng:



b,- Nối đầu lệch:



Hình 6-3: DNA và các phản ứng nối

6.1.3- Các phương pháp tạo DNA tái tổ hợp

6.1.3.1- Phương pháp đơn giản dùng đầu lệt

1,- Chọn và xử lí DNA plasmid:

Plasmid được tách từ tế bào *E. Coli* hoặc tế bào nấm men theo phương pháp chiết tách DNA plasmid. Sau đó, dùng enzyme RE II (như EcoRI) cắt để tạo ra plasmid hở có hai đầu lệt nhau.

2,- Chọn và xử lí đoạn cài:

DNA đoạn cài được thu nhận và lựa chọn, tinh chế theo mục đích của từng nghiên cứu. Cắt DNA bằng enzyme RE loại II cùng loại với enzyme cắt plasmid (EcoRI) để tạo ra các vết cắt giống nhau.

3,- Tạo plasmid tái tổ hợp:

Ghép đoạn cài vào plasmid bằng cách ủ các DNA đoạn cài với plasmid với sự có mặt của enzyme DNA ligase, ta thu được DNA tái tổ hợp. Phản ứng nối xảy ra theo sơ đồ được biểu diễn trên Hình 6-4.

6.1.3.2- Phương pháp sử dụng đoạn nối (linker)

1,- Chọn và xử lí vector plasmid: (tương tự như trên)

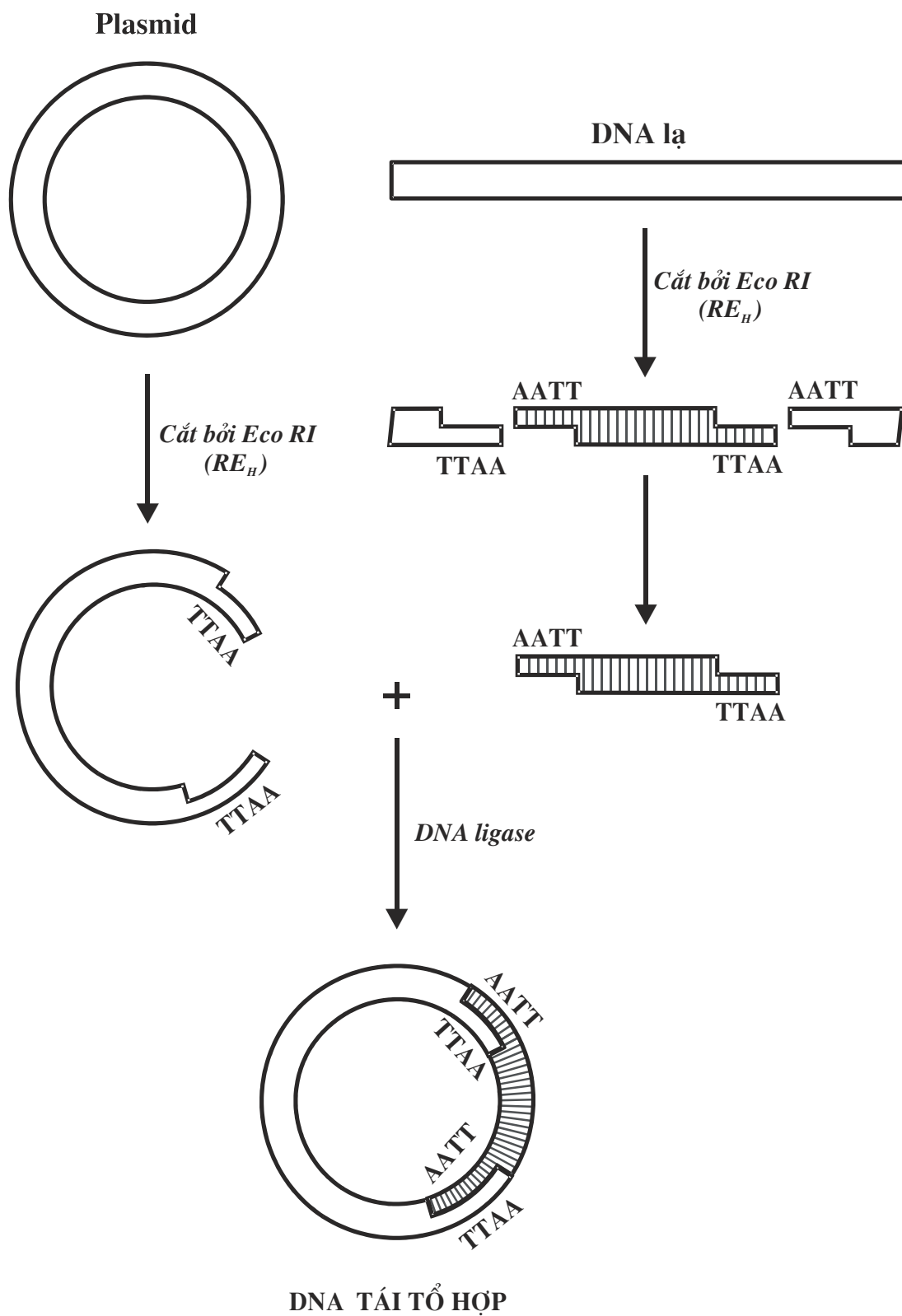
2,- Chọn và xử lí đoạn cài:

Linker là những đoạn DNA dài 10 đến 15 nucleotide, được tổng hợp bằng phương pháp hóa học, sao cho ở giữa mỗi linker phải có trình tự nhận biết bởi một enzyme cắt hạn chế loại II. Ví dụ như EcoRI có chuỗi đích là G/AATTC.

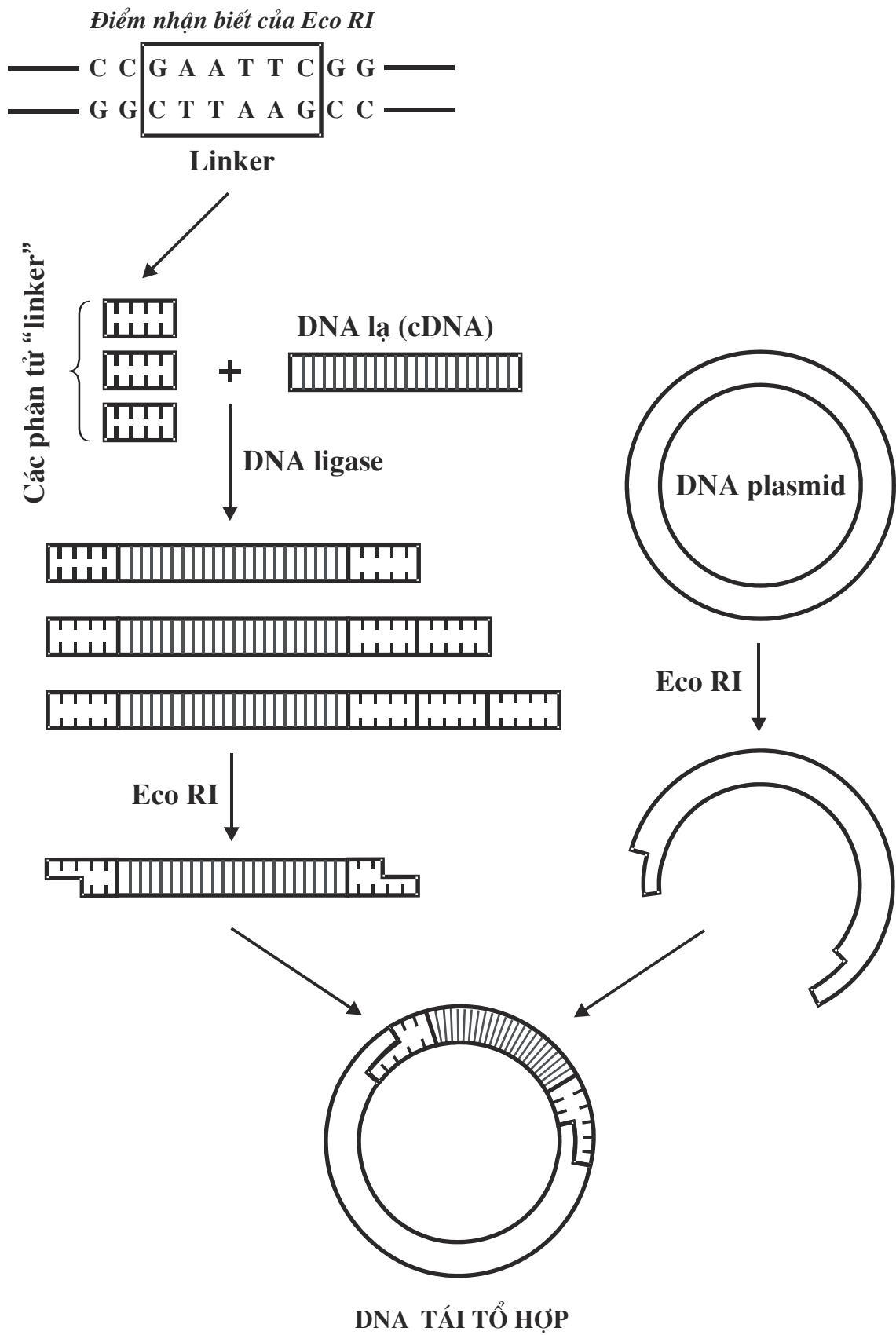
cDNA đầu bằng được tổng hợp từ mRNA nhờ enzyme sao chép ngược theo cơ chế nuclease S₁. Metyl hóa các vùng hạn chế có trong đoạn cDNA sợi đôi được nhận biết bởi enzyme EcoRI.

Ủ linker có chứa chuỗi đích G/AATTC với cDNA và enzyme DNA ligase để tạo phân tử lai.

Cắt phân tử DNA lai bởi enzyme EcoRI, ta được phân tử lai có hai đầu lệt.



Hình 6-4: Phương pháp dùng đầu lách



Hình 6-5: Dùng các đoạn nối linker tạo DNA tái tổ hợp

3,- *Tạo vector tái tổ hợp:*

Để tạo vector tái tổ hợp, người ta ghép phân tử DNA lai đầu lệch vào plasmid mà cũng được cắt bởi cùng một enzyme EcoRI. Nhờ tác dụng của enzyme DNA ligase mà vector tái tổ hợp được tạo thành (Hình 6-5).

6.1.3.3- *Phương pháp sử dụng enzyme terminal transferase (ETT)*

Nguyên tắc: Dựa vào đặc tính của enzyme terminal transferase có khả năng gắn cùng một loại nucleotide vào đầu 3'(OH) của phân tử DNA.

Cách tạo DNA tái tổ hợp bằng phương pháp này được tiến hành theo 4 bước sau (Hình 6-6):

1,- *Bước 1:*

Chọn và phân lập DNA lạ đầu bằng và plasmid, giả sử ta phân lập plasmid có chứa chuỗi đích được nhận biết bởi enzyme BamHI (G/GATCC).

Cắt plasmid bằng enzyme BamHI để tạo plasmid hở có hai đầu dính.

Cắt DNA lạ bằng enzyme exonuclease theo hướng 5' → 3' để tạo DNA có hai đầu lệch nhau.

2,- *Bước 2:*

Ủ DNA lạ với cùng một loại nucleotide dCTP với sự có mặt của enzyme terminal transferase để tạo đuôi polyC ở đầu 3'(OH) của DNA lạ.

Ủ plasmid với cùng một loại nucleotide dGTP với sự có mặt của enzyme terminal transferase để tạo đuôi polyG ở đầu 3'(OH) của plasmid hở.

3,- *Bước 3:*

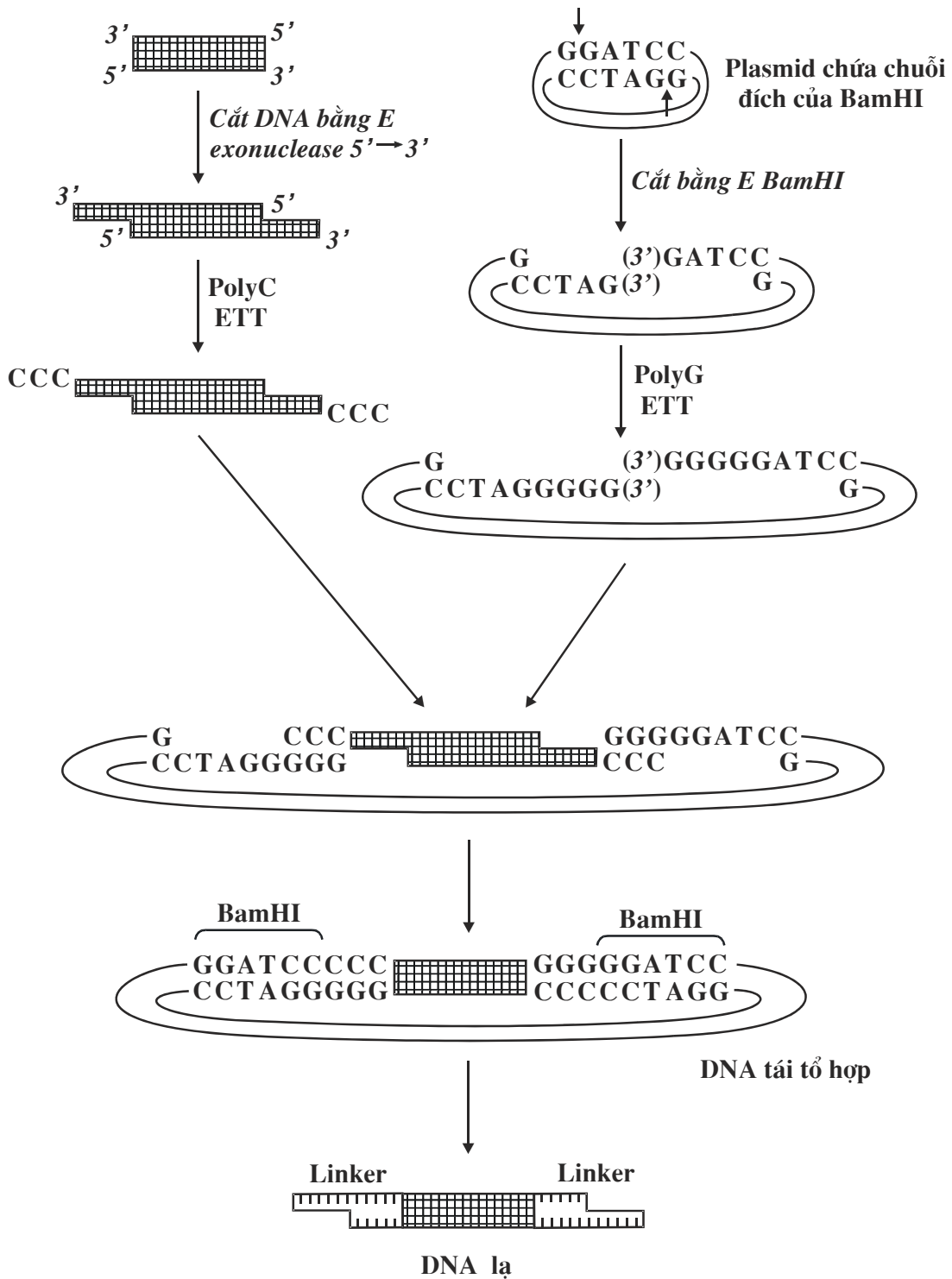
Đưa DNA lạ vào plasmid với sự có mặt của enzyme DNA ligase, các đầu mút của homopolymer có trình tự bổ sung (---GGGG 3'/3'CCCC---) sẽ bắt cặp với nhau.

4,- *Bước 4:*

Bổ sung enzyme DNA-polymerase I để gắn các nucleotide tương ứng vào chỗ trống theo nguyên tắc bổ sung. Enzyme ligase nối liên kết

phosphodiester và cuối cùng tạo được plasmid tái tổ hợp có hai chuỗi đích được nhận biết bởi enzyme BamHI.

Ưu điểm của phương pháp là ghép DNA lạ đầu bằng vào plasmid để tạo DNA tái tổ hợp và chế tác được DNA đầu lệt từ DNA đầu bằng.



Hình 6-6: Cách tạo DNA tái tổ hợp dùng enzyme terminal transferase

6.2- MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP ĐƯA DNA TÁI TỔ HỢP VÀO TẾ BÀO CHỦ

6.2.1- Hóa biến nạp

Hiện tượng biến nạp là chìa khóa giúp ta hiểu biết cơ sở phân tử của gen, cũng là công cụ để thực hiện các thao tác tạo tính di truyền của vật sống. Theo Mandel và Higa cho thấy rằng, *E. Coli* trở nên rất dễ bị biến nạp bởi DNA ngoại lai khi các tế bào vi khuẩn được xử lý trong môi trường có CaCl_2 và trước đó được sốc nhiệt ở 42°C .

Hóa biến nạp là phương pháp sử dụng chất hóa học, tạo điều kiện để đưa vector tái tổ hợp vào tế bào chủ. Quá trình được thực hiện theo hai bước sau: Xử lý tế bào chủ trong dung dịch CaCl_2 ở nhiệt độ thấp nhằm để thay đổi màng tế bào và ủ vector tái tổ hợp với tế bào chủ đã xử lý.

Hiệu suất của phương pháp hóa biến nạp này vào khoảng 10^5 đến 10^6 tế bào biến nạp trên 1mg DNA tái tổ hợp. Qua các kết quả thực nghiệm, người ta thấy rằng, các tế bào phát triển ở pha sớm đến pha giữa dễ được biến nạp hơn. Những nghiên cứu sau này cho thấy việc xử lý tế bào bằng các ion kim loại hóa trị hai như Mg^{+2} , Mn^{+2} và Ba^{+2} cũng cho khả năng biến nạp lớn. Ngoài ra, hiệu suất biến nạp còn phụ thuộc vào kích thước của plasmid, plasmid càng nhỏ thì hiệu suất biến nạp càng cao.

6.2.2- Điện biến nạp

Nguyên tắc: Sử dụng dòng điện cao thế cục bộ theo xung để tạo lỗ nhỏ trên màng sinh học của tế bào, tạo điều kiện cho tế bào hấp thụ DNA tái tổ hợp được dễ dàng.

Hiệu suất: Từ 10^9 đến 10^{10} tế bào biến nạp cho 1mg DNA tái tổ hợp, tuy nhiên, lượng tế bào biến nạp bị chết nhiều có khi lên tới 70%. Hiệu suất của phương pháp này phụ thuộc vào các yếu tố sau:

- Độ mạnh của điện trường tác động khác nhau đối với các loại tế bào khác nhau,

- Độ dài của hàng số thời gian (thời gian ngắt xung - ms). Theo nhiều nghiên cứu, hầu hết đối với các loại tế bào sinh vật, hiệu quả biến nạp cao khi hàng số thời gian đạt được khoảng 6ms,

- Nồng độ tế bào chủ,

- Nồng độ DNA tái tổ hợp,

- Giai đoạn phát triển của tế bào (tế bào quá già hoặc quá non đều không thích hợp),

- Môi trường dung dịch đệm,

- Cấu trúc màng tế bào.

6.2.3- **Biến nạp tế bào trần** (protoplast)

Là phương pháp chuyển DNA tái tổ hợp vào tế bào chủ đã được xử lý bằng polyetylen glycol (PEG). Để tạo tế bào trần, người ta ủ tế bào với PEG nồng độ 30% đến 40%. Đây là phương pháp chuyển gen có hiệu quả cao đối với tế bào thực vật. Bằng phương pháp này, người ta đã nhận được các cây mang gen biến nạp ổn định và di truyền qua nhiều thế hệ (Potrykus và cộng sự - 1995).

Ưu điểm: Tần số biến nạp đồng thời gen chỉ thị và gen cần biến nạp cao. Có thể chuyển gen vào tế bào protoplast của bất kỳ loại cây nào. Đặc biệt là loại cây có giá trị kinh tế cao như lúa, ngô, đại mạch.

Nhược điểm: Việc tái sinh cây protoplast còn rất khó khăn ở một số loài cây.

6.2.4- **Phương pháp bắn gen**

Nguyên tắc: Người ta sử dụng hạt kim loại nặng được bao bọc DNA và bắn trực tiếp vào tế bào.

Ưu điểm: Phương pháp này có thể biến nạp cho tất cả các loại tế bào thực vật. Thao tác dễ dàng, bắn một lần được nhiều tế bào.

Nhược điểm: Hiệu suất biến nạp thấp, thường xuyên nhận được cây biến nạp khảm (cây có tế bào biến nạp và tế bào không biến nạp).

Một số thành tựu đã đạt được bằng phương pháp bắn gen: Năm 1988, Mc. Cabe và cộng sự đã nhận được cây đậu tương biến nạp đầu tiên bằng phương pháp bắn gen. Năm 1990, Promm, Gordon, Kamm và cộng sự đã nhận được cây ngô biến nạp ở nhiều phòng thí nghiệm. Những năm gần đây có hàng loạt công bố về biến nạp thành công ở lúa. Năm 1996, Zthang và cộng sự đã biến nạp ở đu đủ, mía và bông. Điều đó đã khẳng định tính ưu việt của phương pháp này.

6.2.5- Phương pháp vi tiêm

Phương pháp vi tiêm là phương pháp sử dụng vi kim và kính hiển vi để đưa DNA tái tổ hợp vào mỗi tế bào nhất định.

Đây là quá trình lai ghép cho tế bào bậc cao hoặc tế bào hợp tử. Tùy thuộc từng trường hợp cụ thể, người ta có thể chọn phương pháp sao cho việc đưa DNA tái tổ hợp vào tế bào có hiệu quả cao.

Ưu điểm: Có thể tối ưu lượng DNA tái tổ hợp đưa vào tế bào và quyết định đưa DNA vào loại tế bào nào. Đưa chính xác và thậm chí vào tận nhân của tế bào và có thể quan sát được. Các tế bào có cấu trúc nhỏ như hạt phấn, tế bào tiền phôi cũng có thể tiến hành một cách chính xác. Có thể biến nạp cho mọi giống cây.

Nhược điểm: Một phát tiêm chỉ được một tế bào và thao tác cần phải khéo léo và tỉ mỉ.

6.2.6- Tải nạp

Tải nạp là hiện tượng chuyển vật liệu di truyền qua vector là virus từ vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận, trong đó có quá trình chuyển gen và tái tổ hợp gen ở vi khuẩn nhờ thực khuẩn thể (Bacteriophage).

Thực nghiệm đã chứng minh được tải nạp ở *E. Coli* qua phage λ , phage P₁ và ở *Bacillus subtilis* qua phage SP₁₀. So với các phương pháp trên, tải nạp cho hiệu suất cao hơn.

Như vậy, đến nay đã có nhiều phương pháp hóa học, hóa lý, cơ học và sinh học để đưa DNA tái tổ hợp vào tế bào chủ. Tùy các đối tượng và yêu cầu cụ thể, phương pháp này hay phương pháp khác có hiệu quả và được sử dụng nhiều hơn.

6.3- KỸ THUẬT TÁCH DÒNG (tạo dòng)

Kỹ thuật tách dòng bao gồm việc phải cài một mảnh (chuỗi) DNA lạ vào một vector (plasmide hoặc phage λ) bằng phương pháp hóa sinh. Sau đó, đưa phân tử lai này vào tế bào chủ đã chọn lựa bằng phương pháp biến nạp hoặc tải nạp. Trường hợp muốn tạo dòng tổng hợp enzyme thì mảnh DNA định cài phải mã hóa cho gen cấu trúc của một enzyme nào đó.

6.3.1- Mục đích của sự tách dòng

- Thiết lập ngân hàng bộ gen,
- Thiết lập ngân hàng cDNA,
- Sản xuất protein, enzyme,
- Sản xuất vaccine,
- Sản xuất kháng sinh.

6.3.2- Các bước cơ bản của phương pháp tách dòng

Quá trình thực hiện có thể thay đổi phụ thuộc vào nhân tố tham gia và mục đích của quá trình tách dòng. Tuy nhiên để tạo dòng, cần phải thực hiện các bước sau:

6.3.2.1- *Tách lập các DNA lạ cần tạo dòng*

Chọn và cắt DNA lạ của tế bào cho bằng một enzyme cắt hạn chế (RE). Phân lập đoạn DNA (gen quý) phù hợp với vector và mục đích cần tạo dòng.

Trong trường hợp đặc biệt, để tạo dòng một gen chưa biết, người nghiên cứu có thể tổng hợp hóa học đoạn DNA cần tạo dòng khi dự đoán cấu trúc protein do gen chỉ huy tổng hợp hoặc tổng hợp cDNA từ mRNA.

Tạo đầu dính khi cần thiết.

6.3.2.2- *Chọn và xử lý vector*

Chọn vector cần phải chú ý những yêu cầu sau: độ lớn của gen lạ (đoạn cài), loại tế bào chủ tiếp nhận vector và phương pháp ứng dụng.

Xử lí vector: cắt vector bằng enzyme cắt hạn chế cùng loại với enzyme đã cắt DNA nói trên (để tạo những vết cắt giống nhau, thuận tiện cho việc nối ghép sau này). Khử nhóm phosphat bằng enzyme alkaline phosphatase để tránh hai đầu vector đóng kín trở lại.

6.3.2.3- **Tạo DNA tái tổ hợp** (Vector tái tổ hợp)

Việc tạo DNA tái tổ hợp bằng cách ghép DNA lạ vào vector đã được cắt cùng một enzyme cắt hạn chế loại II, khi đó, chúng sẽ ghép đôi những đầu dính lại với nhau nhờ bắt cặp bổ sung.

Một phản ứng ghép nối xảy ra với sự có mặt của enzyme DNA ligase của *E. Coli* hoặc phage T₄ để hoàn chỉnh phân tử lai.

6.3.2.4- **Chuyển DNA tái tổ hợp vào tế bào chủ bằng phương pháp biến nạp hoặc tải nạp**

Công đoạn này nhằm mục đích sử dụng bộ máy của tế bào chủ để sao chép vector tái tổ hợp thành một số lượng lớn bản sao. Việc chuyển DNA tái tổ hợp vào tế bào vi khuẩn tức là làm cho vi khuẩn trở thành khả biến, nghĩa là có khả năng thấm vector tái tổ hợp. Sự thấm này có thể xảy ra một cách tự nhiên hoặc được cảm ứng. Tuy nhiên, nó sẽ phụ thuộc vào loại plasmid sử dụng làm vector và phụ thuộc vào sự định vị của vùng cài lắp chứa bên trong vector mà người nghiên cứu sẽ chọn phương pháp biến nạp hoặc tải nạp.

Biến nạp là hiện tượng chuyển vật chất di truyền trực tiếp từ tế bào thể cho D (Doner) sang tế bào thể nhận R (Reception), không cần sự tiếp xúc giữa hai tế bào hoặc nhân tố trung gian là phage hoặc virus. Biến nạp được thực hiện với vector chuyển gen là plasmid. Có nhiều phương pháp biến nạp như hóa biến nạp, điện biến nạp, biến nạp tế bào trần, phương pháp bắn gen và phương pháp vi tiêm.

Tải nạp là hiện tượng chuyển vật chất di truyền trực tiếp từ tế bào thể cho D (Doner) sang tế bào thể nhận R (Reception) qua nhân tố trung gian là virus. Tải nạp được thực hiện với vector chuyển gen có nguồn gốc là virus như phage, cosmid, ...

6.3.2.5- *Phát hiện dòng cần tìm*

Công việc tiếp theo là kiểm tra sự hiện diện của gen mong muốn. Việc chọn lựa những chủng như ý muốn là không đơn giản, vì cách tiến hành thí nghiệm trong một hỗn hợp không đồng nhất nên các dòng vi khuẩn có thể mọc lên theo ba khả năng:

- Tế bào vi khuẩn không nhận plasmid tái tổ hợp,
- Tế bào nhận plasmid nhưng không có gen lạ,
- Tế bào vi khuẩn nhận được plasmid tái tổ hợp.

Tùy thuộc vào mục đích nghiên cứu mà người ta có các phương pháp khác nhau để xác định dòng cần tìm. Nếu mục đích là nghiên cứu đoạn gen chưa biết, người ta thường dùng đầu dò. Nếu đoạn DNA đã biết (cDNA), công việc sẽ đơn giản và nhanh chóng.

6.3.2.6- *Kiểm tra và thu nhận sản phẩm của gen tái tổ hợp*

Tùy từng trường hợp cụ thể mà người nghiên cứu đưa ra những phương pháp kiểm tra thu hồi sản phẩm của gen tái tổ hợp. Nếu là mục đích thiết lập ngân hàng cDNA, ta phải tiến hành các bước sau: Đầu tiên người ta phải tách plasmid tái tổ hợp ra khỏi dịch nuôi cấy, sau đó, cắt plasmid tái tổ hợp bằng enzyme RE loại II và thu được hai băng DNA, một có độ dài bằng khung vector, còn băng khác có độ dài tương ứng đúng bằng cDNA. Cách kiểm tra lại cDNA đã được cắt bằng cách điện di trên gel agarosa 0,8% và kiểm tra lại độ dài của những băng cDNA thu được. Những đoạn có kích thước khác nhau sẽ di chuyển những khoảng cách khác nhau trên gel.

Nếu sản phẩm của gen tái tổ hợp là protein, enzyme, hormone, vaccine, kháng sinh,... người ta có thể thu nhận sản phẩm bằng phương pháp chiết tách lắng lọc ly tâm kết tủa phân đoạn hoặc trao đổi ion.

6.3.3- *Một số phương pháp xác định dòng cần tìm*

6.3.3.1- *Phương pháp lai axit nucleic*

1,- *Khái niệm đầu dò:*

Các đầu dò là những mảnh DNA được đánh dấu, có khả năng nhận biết một chuỗi DNA hoặc RNA đồng đẳng qua lai hóa.

2,- *Đặc điểm của đầu dò:*

Là một đoạn axit nucleic (DNA hoặc RNA) sợi đơn. Đầu dò phải bổ sung các bazơ nitơ, đối song song với đoạn axit nucleic cần nhận biết. Đầu dò phải so mồi được, đó là các đầu đánh dấu phóng xạ.

3,- *Các loại đầu dò:*

cDNA làm đầu dò cực tốt, ngoài ra, mRNA và oligonucleotide cũng có thể làm đầu dò. Nếu chuỗi DNA chưa biết trình tự, người ta phải tinh sạch một lượng nhỏ protein tương ứng với DNA đã nghiên cứu và từ đó tổng hợp đầu dò. Còn nếu một phần DNA phải so mồi đã biết thì công việc rất dễ dàng để tổng hợp một đầu dò.

4,- *Nguyên tắc của phương pháp lai axit nucleic:*

Dựa vào khả năng biến tính khi nhiệt độ tăng và hồi tính khi hạ nhiệt độ từ từ của DNA. Khi tăng nhiệt độ của DNA lên quá nhiệt độ sinh lý (thường ở khoảng 80 đến 95°C), hai sợi đơn DNA sẽ tách rời nhau do liên kết hydro bị đứt. Khi hạ nhiệt độ từ từ của khối DNA đã biến tính cùng với các điều kiện thích hợp khác, các mạch đơn bắt cặp trở lại. Sự bắt cặp chỉ có thể xảy ra khi hai trình tự DNA hoàn toàn bổ sung cho nhau. Tính đặc hiệu cực lớn của phản ứng lai này cho phép bất kỳ trình tự mạch đơn nào cũng tìm gặp mạch bổ sung với nó, mặc dù chúng nằm trong hàng triệu các trình tự DNA và RNA khác nhau. Có thể dùng đồng vị phóng xạ đánh dấu để phát hiện đoạn lai.

5,- *Cách tiến hành:*

Chuẩn bị mẫu (đầu) dò đã được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ hoặc hóa chất. Biến tính dòng cần tìm ở dưới dạng một sợi, sau đó hạ nhiệt độ từ từ, các sợi đơn tương đồng bắt cặp với nhau. Sự bắt cặp xảy ra giữa DNA và DNA, RNA và DNA, RNA và RNA.

6.3.3.2- *Phương pháp sử dụng kháng thể*

1,- *Nguyên tắc:*

Dựa vào phản ứng đặc trưng của một số protein và kháng thể mà chúng ta có thể nhận biết được qua phản ứng đặc trưng đó như phản ứng tạo màu, phản ứng kết tủa.

2,- *Cách tiến hành:*

Chọn kháng thể đặc trưng cho protein (thuốc thử cho protein). Tách protein được biểu hiện trong quá trình tạo dòng. Ủ protein với kháng thể đặc trưng. Sau đó tiến hành nhận biết thông qua các dấu hiệu của phản ứng đặc trưng giữa protein và kháng thể.

3,- *Ứng dụng:*

Chủ yếu sử dụng trong y học với hai yêu cầu sau: DNA cần nghiên cứu được gắn vào vector phải biểu hiện protein khi tạo dòng và đồng thời, vector tạo dòng phải là vector biểu hiện (ví dụ như vector λ gt11). Protein biểu hiện cần phải có kháng thể đặc trưng.

6.3.3.3- *Phương pháp phát hiện do mất hoạt tính vì xen đoạn*

Nguyên tắc: Dựa vào sự mất khả năng kháng thuốc của vi khuẩn mang vector tái tổ hợp khi chúng được nuôi cấy trong môi trường kháng sinh.

Phạm vi sử dụng: Phương pháp này dùng cho vector có từ hai gen kháng thuốc trở lên, ví dụ như vector pBR₃₂₂. Trong plasmid pBR₃₂₂ có hai gen kháng thuốc Amp^R và TetR. Trên các gen này có những điểm nhận biết của các RE nơi cài đặt DNA lạ. Khi gắn DNA lạ vào một trong hai gen nói trên thì gen nhận đoạn cài mất khả năng kháng thuốc. Quan sát những khuẩn lạc bị mất gen kháng thuốc, chứng tỏ những khuẩn lạc đó có chứa gen cần tạo dòng.

Ưu điểm của phương pháp là ít tốn kém so với phương pháp lai.

6.3.3.4- *Phương pháp phát hiện do thay đổi kiểu hình*

1,- *Nguyên tắc:*

Dựa vào sự thay đổi màu sắc của khuẩn lạc, chứng tỏ rằng, khuẩn lạc đó có chứa gen lạ.

2,- *Cách tiến hành:*

Chuẩn bị hai mẫu thử nghiệm mà plasmid tạo dòng có chứa gen lacZ (ví dụ như dãy pUC), một mẫu để so sánh còn mẫu kia để cài DNA lạ vào gen lacZ. Sau đó, nuôi cấy cả hai mẫu trong môi trường có chất cảm ứng X-Gal (5

brom-4chloro-3indolyl D-galactopynoside). Chất cảm ứng này bị phân hủy bởi enzyme β -galactosidase tạo ra galactose và X (dẫn xuất indol), ngoài môi trường, dẫn xuất này bị oxy hóa cho màu xanh đậm.

Qua quan sát, ta thấy plasmid không chứa gen lạ cho khuẩn lạc màu xanh do gen lacZ tổng hợp enzyme β -galactosidase. Còn plasmid thứ 2 cho khuẩn lạc màu trắng, điều đó chứng tỏ nó chứa DNA lạ được cài trong gen lacZ và chọn những khuẩn lạc màu trắng.

6.4- NGÂN HÀNG GEN (Genomic library)

Ngân hàng bộ gen của một sinh vật là tập hợp các trình tự DNA cấu thành bộ gen được gắn vào vector, nó chỉ biểu diễn tổng số của gen. Ngân hàng này được tạo ra từ một bộ sưu tập DNA tái tổ hợp cả các chuỗi mã hóa lẫn các chuỗi không mã hóa. Khác với ngân hàng cDNA, ngân hàng bộ gen có thể được thiết lập bất kỳ loại tế bào nào của sinh vật nghiên cứu.

Các bước thiết lập ngân hàng gen:

- Tách và làm sạch DNA của sinh vật,
- Cắt DNA thành những đoạn có kích thước xác định bằng enzyme RE loại II - thông thường, người ta sử dụng EcoRI,
- Vector được chọn để tạo dòng gen thường là cosmid hoặc phage λ cũng được xử lý bởi EcoRI,
- Tạo vector tái tổ hợp và đóng gói trong vỏ phage,
- Đưa vector tái tổ hợp vào tế bào chủ và tạo dòng,
- Xác định đặc tính và biểu hiện của dòng vi khuẩn vừa lập,
- Tiến hành sàng lọc, nghĩa là phải tách những vector nào có đoạn DNA ưa chuộng, từ đó xây dựng ngân hàng bộ gen.

Đặc điểm và ứng dụng:

- Ngân hàng gen chứa các đoạn DNA lớn hơn 100 lần so với cDNA.
- Giải mã thông tin di truyền chứa trong bộ gen, đặc biệt là cấu trúc intron và exon của một gen xác định.

- Tạo dòng những trình tự DNA không mã hóa nằm cạnh các gen mã hóa và đóng vai trò quyết định trong sự điều hòa biểu hiện của gen.

6.5- NGÂN HÀNG cDNA

6.5.1- Thiết kế ngân hàng cDNA

Ngân hàng cDNA là tập hợp các bản sao cDNA từ tất cả các mRNA của một tế bào. Như vậy, ngân hàng được thiết lập từ một loại tế bào xác định (tế bào biệt hóa), vì thế, cDNA mang tính tế bào rất cao.

Quá trình chuẩn bị ngân hàng cDNA bao gồm các bước sau đây:

- Chiết tách RNA tổng số, ta phải chọn những tế bào có chứa nhiều mRNA cần thiết và sau đó, làm sạch mRNA,

- Chọn lựa các mRNA chứa nhiều A (polyA) bằng cách tách trên cột xenlulose oligo dT,

- Tổng hợp cDNA sợi kép đầu bằng từ mRNA dưới tác dụng của enzyme sao chép ngược nhờ kỹ thuật nuclease S₁ hoặc kỹ thuật Gubler-Hoffman,

- Metyl hóa các vùng hạn chế (có trong đoạn cDNA sợi đôi) được nhận biết bởi enzyme EcoRI để bảo vệ vùng này không bị cắt khi thao tác với EcoRI,

- Tạo đầu dính bằng cách sử dụng đoạn nối linker có chứa trình tự nhận biết bởi EcoRI, sau đó, cắt bằng enzyme EcoRI. Trong trường hợp này, chỉ có đoạn nối bị cắt còn cDNA vẫn còn nguyên vẹn (do được metyl hóa). Đưa cDNA vào vector tạo DNA tái tổ hợp,

- Ghép cDNA đầu dính vào vector thích hợp đã được mở EcoRI và đã khử nhóm phosphat,

- Hàn kín mạch nhờ enzyme phosphoryl hóa và enzyme ligase để tạo vector tái tổ hợp,

- Đưa vector tái tổ hợp vào tế bào chủ và nuôi cấy trong các điều kiện thích hợp để tạo dòng,

- Xác định dòng cần tìm và thành lập ngân hàng cDNA.

Mục đích của việc thiết lập ngân hàng cDNA là nhằm nghiên cứu sự biểu hiện của một gen xác định cùng với những vấn đề liên quan đến sự điều hòa biểu hiện gen cũng như mối tương tác giữa các gen trong một quá trình sống.

Chú ý: Khi phân tích kết quả thu được ngân hàng cDNA, cần chú ý tác dụng sinh lí từng thời điểm thí nghiệm.

6.5.2- Sàng lọc ngân hàng cDNA

Một phương pháp phổ biến nhằm sàng lọc ngân hàng cDNA được bắt đầu từ việc tạo canh trường nuôi cấy chứa đựng nhiều khuẩn lạc từ ngân hàng cDNA. DNA plasmid từ mỗi mẻ cấy vi khuẩn gắn với mảnh nhỏ nitro-xenlulose (màng lai) sẽ bị biến tính và lai với mRNA tổng số. Mỗi mRNA khác nhau sẽ được lai trên nitroxelulose với thứ tự cDNA bổ sung của nó. Các mRNA bám vào màng lọc được tách ra và dùng để tổng hợp protein mà nó mã hóa bằng hệ thống dịch mã *invitro*. Protein hình thành được đem phân tích xem có phải là sản phẩm của mRNA cần tìm hay không, và từ đó, xác định vi sinh vật nuôi cấy chứa gen mong muốn. Sàng lọc tất cả các mẻ nuôi cấy theo cách trên để xác định dòng đơn thể hiện gen tìm kiếm.

CHƯƠNG VII

MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU TRONG CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN

7.1- CÁC PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT AXIT NUCLEIC

Mọi nghiên cứu và ứng dụng của công nghệ gen đều được bắt đầu từ việc thu nhận một lượng axit nucleic tinh sạch. Mỗi quan tâm đầu tiên của kỹ thuật tách chiết axit nucleic là thu nhận được các phân tử này ở trạng thái nguyên vẹn, không bị phân hủy bởi tác nhân cơ học, tác nhân hóa học và enzyme như RNase, DNase.

7.1.1- Phương pháp tách chiết DNA vi khuẩn

DNA có kích thước lớn, mọi việc chiết tách cần phải tránh mọi tác nhân cơ học, hoá học tới phân tử DNA này.

Việc tách DNA từ tế bào vi khuẩn được chia làm bốn bước cơ bản:

7.1.1.1- Nuôi cấy và thu sinh khối

Tùy từng loại vi khuẩn mà người nghiên cứu chuẩn bị môi trường và điều kiện nuôi cấy khác nhau như nhiệt độ, độ pH, và điều kiện dinh dưỡng thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn.

Tách tế bào ra khỏi dịch nuôi cấy bằng cách ly tâm và làm sạch tế bào. Thông thường khoảng 1.000ml dịch nuôi cấy li tâm và thu lấy khoảng 10ml cặn vi khuẩn.

7.1.1.2- Phá vỡ màng tế bào và giải phóng các thành phần bên trong

Axit nucleic được giải phóng ra khỏi màng tế bào bằng phương pháp hóa học và sinh học để thu dịch chiết tế bào.

Enzyme lysozyme là một enzyme có trong lòng trắng trứng hoặc phage T₄, có khả năng phá vỡ thành phần trùng hợp của thành tế bào. EDTA (TrilonB) tạo phức với Mg⁺² dạng hòa tan và làm vỡ thành tế bào. Đồng thời EDTA ngăn không cho enzyme trong tế bào phân hủy DNA. Người ta còn có

thể phá vỡ màng tế bào và giải phóng DNA ra khỏi liên kết histon bằng chất tẩy rửa SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) hoặc enzyme protease.

Các chất phá vỡ màng này làm li giải màng, tách rời các phần tử lipid và gây ra sự gãy màng tế bào.

7.1.1.3- *Làm sạch DNA từ dịch chiết tế bào*

Loại bỏ các thành phần không mong muốn như protein, lipid và các thành phần khác bằng kết tủa phân đoạn. Mẫu được lắc mạnh trong hệ dung môi phenol-chloroform để biến tính, kết tủa protein và giải phóng axit nucleic vào dung dịch lỏng. Protein bị biến tính sẽ tách ra khỏi pha nước có chứa DNA sẽ được tách ra nhờ ly tâm. Dịch nổi gồm axit nucleic và nước được hút ra và tiếp tục phân hủy RNA bằng enzyme RNase. Sau đó, tách DNA và nước để thực hiện bước phân tích tiếp theo.

7.1.1.4- *Thu hồi DNA dạng đặc*

Mục đích của bước này là thu DNA dạng cô đặc, nhằm bảo vệ chúng khỏi sự phân hủy của enzyme. Có 2 phương pháp kết tủa:

Kết tủa DNA trong etanol với sự có mặt Na^+ nồng độ cao, nhiệt độ thấp, tỷ lệ giữa etanol và mẫu phân tích là 3:1.

Kết tủa trong izopropanol, tỷ lệ giữa rượu và mẫu là 1:1. Với phương pháp này không cần sự có mặt của muối và loại được DNA có phân tử lượng thấp. Ly tâm cao tốc và thu nhận DNA dạng cô đặc.

Trong cả hai phương pháp, DNA thu được sẽ rửa trong etanol-70% để loại izopropanol và muối để thu được DNA tinh khiết.

7.1.2- *Phương pháp tách DNA plasmid*

Việc tách DNA plasmid ra khỏi DNA nhiễm sắc thể là rất khó khăn. Tuy nhiên người ta có thể dựa vào sự khác nhau lý hóa giữa hai loại DNA như: kích thước, hình thái, cấu trúc của chúng.

Về nguyên tắc được tiến hành theo 3 bước sau:

7.1.2.1- **Bước 1**

Sau khi thu hồi và làm sạch các tế bào có chứa plasmid, người ta xử lý trong hỗn hợp SDS, EDTA hoặc NaOH làm DNA sợi đôi biến tính thành DNA sợi đơn nằm cạnh nhau.

7.1.2.2- **Bước 2**

Xử lý hỗn hợp trên trong môi trường đệm ($\text{NaCH}_3\text{COO} + \text{CH}_3\text{COOH}$) để kết tủa protein và SDS dạng tập hợp.

7.1.2.3- **Bước 3**

Đưa về môi trường trung tính, DNA sợi đơn được hồi tính trở lại. Còn DNA (NST) do dài nên hồi tính chậm và kết tủa cùng SDS. Tách DNA plasmid bằng cách kết tủa trong etanol hoặc izopropanol, sau đó ly tâm tách được plasmid tinh sạch.

7.1.3- **Tách DNA của tế bào khác**

Ngoài vi khuẩn, DNA của virus, của tế bào thực vật, động vật cũng có thể tiến hành tách để phục vụ cho công nghệ di truyền. Các giai đoạn làm sạch tương tự như trên. Chỉ có giai đoạn nuôi cấy và phá vỡ màng tế bào thì khác, tuy nhiên, tùy từng loại tế bào mà có những cách xử lý sao cho thích hợp.

7.1.4- **Phương pháp tách RNA tổng số và mRNA**

7.1.4.1. **Tách RNA tổng số**

RNA được tiến hành chiết tách gồm các bước cơ bản tương tự như DNA (bao gồm phá vỡ màng tế bào, loại protein, tủa RNA) nhưng ở đây ta dùng enzyme desoxyribonuclease (DNase) để phân huỷ DNA. Do RNA kém bền và dễ bị phân huỷ bởi enzyme ribonuclease (RNase) có nhiều ở khắp nơi, hoạt tính cao lại bền với nhiệt (trên 90°C), vì vậy, điều kiện thao tác để chiết tách phải được tiến hành trong môi trường vô cùng nghiêm ngặt. Phương pháp chung để tách RNA tổng số được tiến hành như sau:

Tế bào được nghiền với chất tẩy rửa SDS, sarcocyl nồng độ cao, nitor lỏng để biến tính protein. Đồng thời mẫu cũng được nghiền với chất khử (2-

mercaptoethanol) để ức chế RNase. Nước sử dụng cũng được xử lý với DEPC (Diethylpyrocarbonat) cũng để loại bỏ RNase.

Các protein, DNA được loại bỏ qua xử lý mẫu với hỗn hợp dung môi Trizol (phenol pH=4, guanidinium thiocyanate, glycerol, sodium acetate), khi ly tâm, ta tách được RNA trong pha nước. DNA ở pH=4 bị hấp phụ vào pha dưới cùng với phenol, protein biến tính nằm giữa hai pha cũng bị loại cùng với DNA cùng với pha phenol. RNA trong pha nước được hút ra sau đó rửa bằng izopropanol để -20°C, ly tâm và rửa lại bằng ethanol 79%, thu hồi RNA tinh khiết, bảo quản lạnh để làm các thí nghiệm tiếp theo. Chất lượng của RNA tổng số được đánh giá sơ bộ qua điện di trên gel agarose.

7.1.4.2. *Tách từng loại RNA khác nhau*

Dựa vào kích thước trọng lượng phân tử, người ta có thể tiến hành sắc kí, điện di hoặc ly tâm để tách từng loại RNA. Phương pháp tách mRNA:

Do kích thước bé lại chiếm lượng nhỏ (1÷5%) RNA tổng số, có cấu trúc đa dạng nên không thể tách bằng phương pháp trên.

Nhờ đặc điểm mRNA có đuôi polyA, do đó, người ta tách mRNA ra khỏi mẫu bằng phương pháp sắc ký ái lực oligodt-xenlulose.

Ngày nay trên thị trường có loại viên bi từ, trên bề mặt có gắn oligodt. Sau khi mRNA bám trên bề mặt các viên bi từ, thông qua liên kết bổ sung với oligodt, các viên bi này thu nhận và đem ly tâm ta thu được mRNA tinh khiết.

Lưu ý rằng, để tách mRNA, người ta đi từ tế bào biệt hoá, lượng mRNA nhiều và đây cũng là con đường nghiên cứu cấu trúc gen mã hoá. Ngày nay người ta đã tổng hợp được ngân hàng mRNA.

7.1.5- **Tách và thu nhận gen**

Ngày nay, người ta có thể thu nhận gen để thực hiện kỹ thuật di truyền bằng ba phương pháp:

7.1.5.1- *Tách các đoạn DNA từ bộ gen*

Đây là phương pháp sử dụng rộng rãi ngay từ buổi đầu tiên của sự phát triển kỹ thuật DNA tái tổ hợp. Toàn bộ phân tử DNA của một sinh vật được cắt nhỏ thành những đoạn có kích thước 1,5÷2kb bằng restriction enzyme

(RE). Điện di hoặc sắc kí để tách đoạn DNA tinh khiết, sau đó gắn vào vector chuyển gen, tạo plasmid DNA tái tổ hợp.

Nhược điểm là tốn nhiều công sức và thời gian nhưng ngày nay người ta vẫn sử dụng để tạo ngân hàng DNA bộ gen (genomic DNA libraries).

7.1.5.2- **Sự tổng hợp gen bằng phương pháp hoá học**

Năm 1969, gen nhân tạo đầu tiên được tổng hợp do nhóm nghiên cứu Khorama, đó là gen mã hoá tổng hợp tRNA vận chuyển amino axit (alamin) ở nấm men gồm 77 cặp nucleotide. Gen đầu tiên không được biểu hiện vì không có các trình tự điều hoà.

Về sau, chính nhóm này đã tổng hợp được gen có hoạt tính: đó là gen mã hóa cho chất ức chế tRNA vận chuyển tyrosine ở *E. Coli*, có chiều dài khoảng 200 cặp nucleotide.

Vào năm 1977, K. Itakura và Boyer đã tổng hợp được gen mã hóa sinh tổng hợp hormone somatostatin của động vật có vú được biểu hiện ở *E. Coli*. và từ đó, nòi *E. Coli* mang gen tổng hợp hóa học được tạo ra. Sau này, người ta tổng hợp hóa học gen mã hóa hormone tăng trưởng của người dài 584pb.

Phương pháp tổng hợp hóa học gen cũng được sử dụng để tạo ra nòi vi khuẩn tổng hợp insulin, một loại hormone chữa bệnh tiểu đường cho người. Gen insuline được tổng hợp từ hơn 40 đoạn oligonucleotide khác nhau, sau đó, được nối lại nhờ enzyme lygase để tạo ra hai chuỗi polynucleotide dài 271 và 286bp mã hóa, tổng polypeptide A có 21 aminoaxit, polypeptide B có 30 aminoaxit.

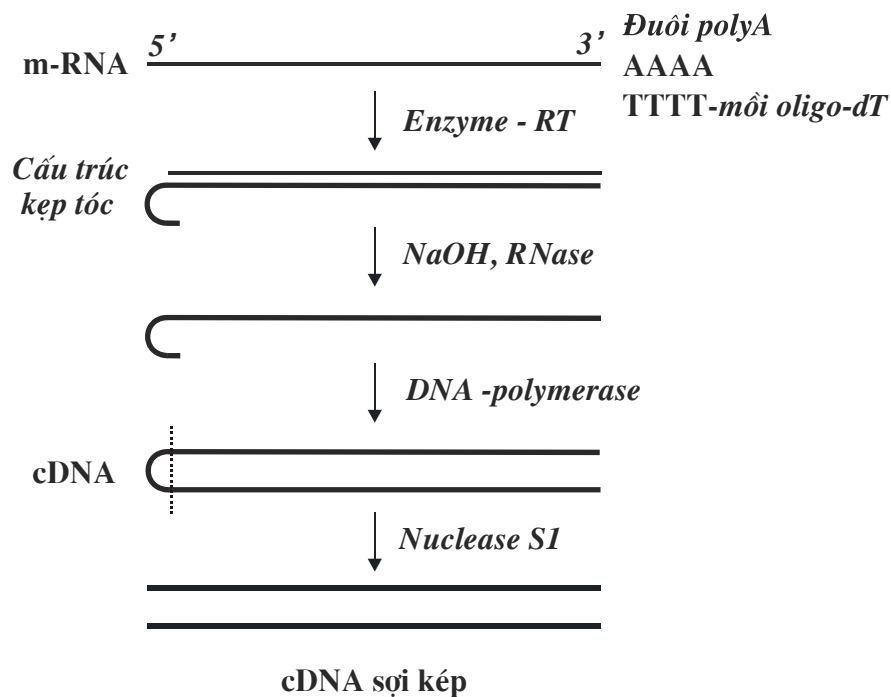
Qua các kết quả thu được, các nhà khoa học đã khẳng định rằng: muốn tổng hợp được gen bằng phương pháp hoá học cần phải biết trình tự của axit amin ở protein mà gen đó chịu trách nhiệm tổng hợp.

7.1.5.3- **Sinh tổng hợp gen từ mRNA**

Tổng hợp cDNA từ mRNA nhờ kỹ thuật của Gubler và Hoffman với sự có mặt của enzyme phiên mã ngược (Rever transcriptase - Hình 7-1). Sau đó, cDNA (complementary) gắn vào plasmid và biến nạp vào vi khuẩn để tạo dòng cDNA. Phương pháp này được trình bày ở Chương 6 (thiết lập thư viện cDNA).

Ưu điểm là: Gen thu nhận bằng phương pháp này đã loại bỏ được những trình tự không mã hoá. Bằng con đường này, người ta đã tạo dòng gen mã hoá tổng hợp globine của người, động vật và chim, protein thủy tinh thể mắt bò, ovalbumine (protein lòng trắng trứng) và fibroin tơ tằm.

Vào năm 1992 các nhà khoa học Mỹ đã tạo được dòng cDNA của 2.375 gen của bộ não người. Phương pháp tổng hợp gen từ mRNA ngày càng được phát triển, nó kết hợp với các phương pháp khác của sinh học phân tử và được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực.



Hình 7-1: Sơ đồ tổng hợp gen từ mRNA

7.2- PHƯƠNG PHÁP NHÂN BẢN (PCR - Polymerase Chain Reaction)

Phương pháp tạo dòng *in vivo* mà chúng ta đã đề cập trong Chương 6 tuy đã giải quyết về vấn đề số lượng, nhưng đòi hỏi thao tác quá phức tạp và thời gian quá dài. Trong sự ra đời của các phương pháp khuếch đại (tái bản nhanh) *in vitro* có chọn lọc, chúng ta phải kể đến phương pháp PCR.

Phương pháp PCR - phản ứng dây chuyền nhờ hoạt động của enzyme DNA-polymerase - do K. Mulis cùng cộng sự phát minh năm 1985, đã đưa lại một cuộc cách mạng trong di truyền học phân tử. Đây là phương pháp hoàn toàn mới trong việc nghiên cứu, phân tích gen và hệ gen. Khó khăn lớn nhất trước đây trong việc phân tích gen là ở chỗ chúng là những mục tiêu đơn lẻ và

rất nhỏ trong một hệ gen phức tạp khổng lồ. Kỹ thuật PCR ra đời đã thay đổi tất cả, giúp chúng ta có thể tạo ra một số lượng lớn các bản sao của một đoạn DNA mong muốn.

Do những ưu điểm tuyệt đối trong nghiên cứu sinh học phân tử, kỹ thuật PCR được nhanh chóng áp dụng rộng rãi để chẩn đoán các bệnh về virus, vi khuẩn, các bệnh ký sinh trùng và cho kết quả rất chính xác. Mặt khác, sự phân tích thành phần và trật tự nucleotide trên phân tử DNA trong hệ gen còn có ý nghĩa to lớn trong phân loại các loài sinh vật. Chính nhờ tính thực tiễn to lớn của kỹ thuật này mà tác giả của PCR, Kary Mulis, được tặng giải thưởng Nobel vào năm 1993.

Thực chất đây là phương pháp tạo dòng *invitro*, không cần đến sự hiện diện của tế bào và dựa trên nguyên tắc được trình bày sau đây:

7.2.1- Nguyên tắc của phương pháp PCR

Nguyên tắc của phương pháp là tạo lượng lớn các đoạn DNA đặc thù từ DNA khuôn dựa trên cơ sở hoạt động của DNA-polymerase để tổng hợp sợi mới bổ sung.

Các yếu tố cơ bản để thực hiện phản ứng PCR bao gồm:

- Sợi khuôn DNA chỉ cần biết trình tự nucleotide của đoạn nhỏ nằm cạnh đoạn cần nhân để thiết kế hai mồi oligonucleotide.

- Hai đoạn mồi ngắn để xác định các điểm bắt đầu tổng hợp DNA. Là tín hiệu chỉ hướng đi ($5' \rightarrow 3'$) của enzyme DNA-polymerase. Mỗi dài khoảng 20 nucleotide và các nucleotide ở hai đầu của mồi không tự kết hợp với nhau theo nguyên tắc bổ sung.

- Có đầy đủ các loại nucleotide dATP, dTTP, dGTP, dCTP.

- Môi trường đệm cung cấp ion Mg và nước tinh khiết không có enzyme RNase và DNase.

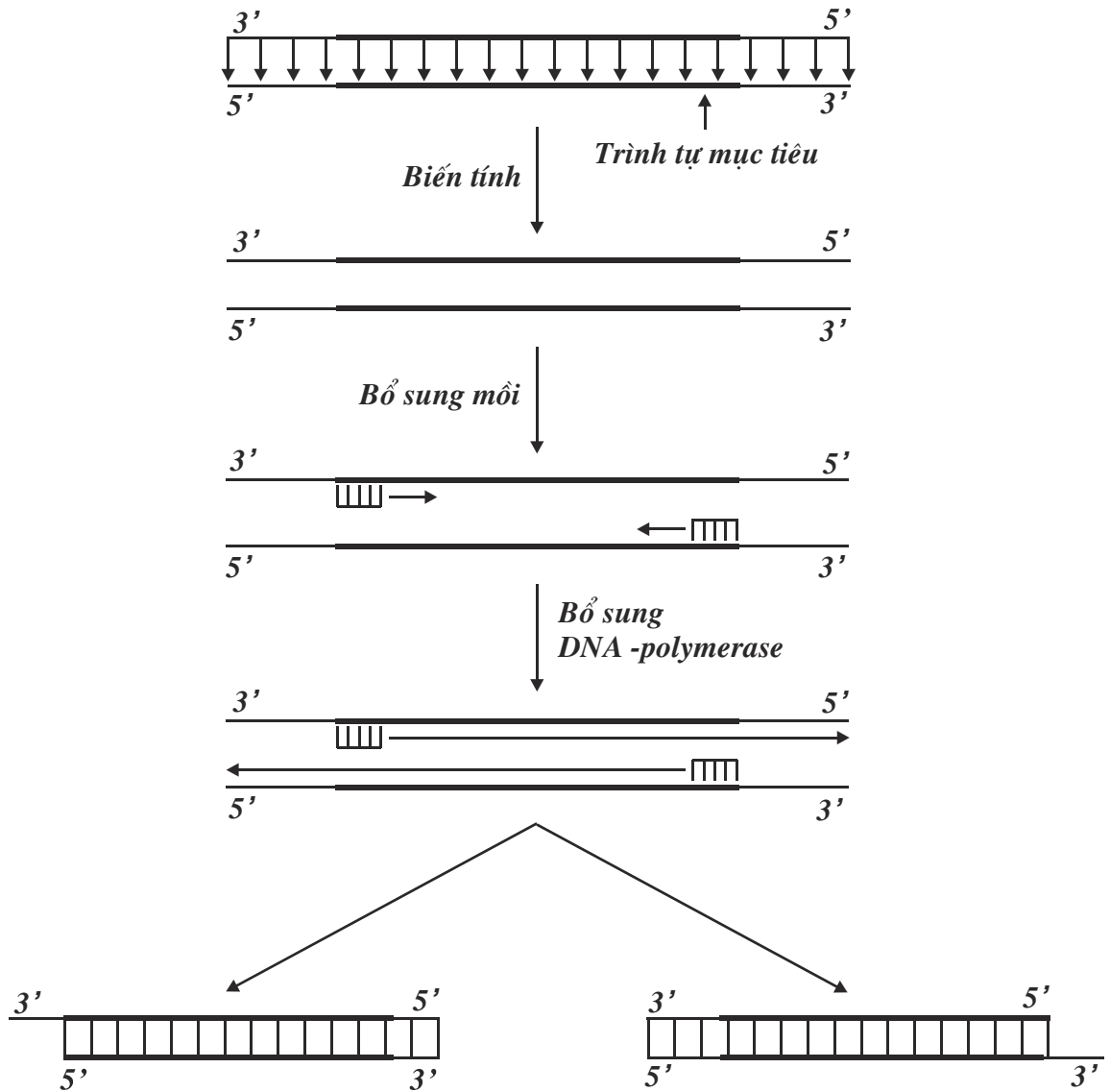
- Enzyme chịu nhiệt *Thermus aquaticus* (Taq)

Dung tích tổng số cho một phản ứng PCR khoảng từ 20 μ l đến 50 μ l.

Đặc điểm của phản ứng PCR là chọn lọc, nhạy và nhanh.

7.2.2- Các bước tiến hành thí nghiệm

Phản ứng PCR là một chuỗi gồm nhiều chu kỳ và mỗi chu kỳ gồm 3 bước (Hình 7- 2 và Hình 7-3):



Hình 7-2: Các bước thực hiện phản ứng PCR một chu kỳ

7.2.2.1- **Bước 1** - Thực hiện quá trình biến tính DNA bằng nhiệt

Đưa DNA vào dung dịch phản ứng (gồm các thành phần cần thiết cho sự sao chép), tăng nhiệt độ của dung dịch lên tới 90÷98°C, thời gian lưu tương ứng khoảng từ 30s÷1 phút. Tại nhiệt độ này, các phân tử DNA mạch kép bị tách ra (do liên kết hydrô bị đứt), tạo nên các sợi đơn dùng để làm khuôn tổng hợp sợi mới.

7.2.2.2- **Bước 2** - Thực hiện phản ứng lai

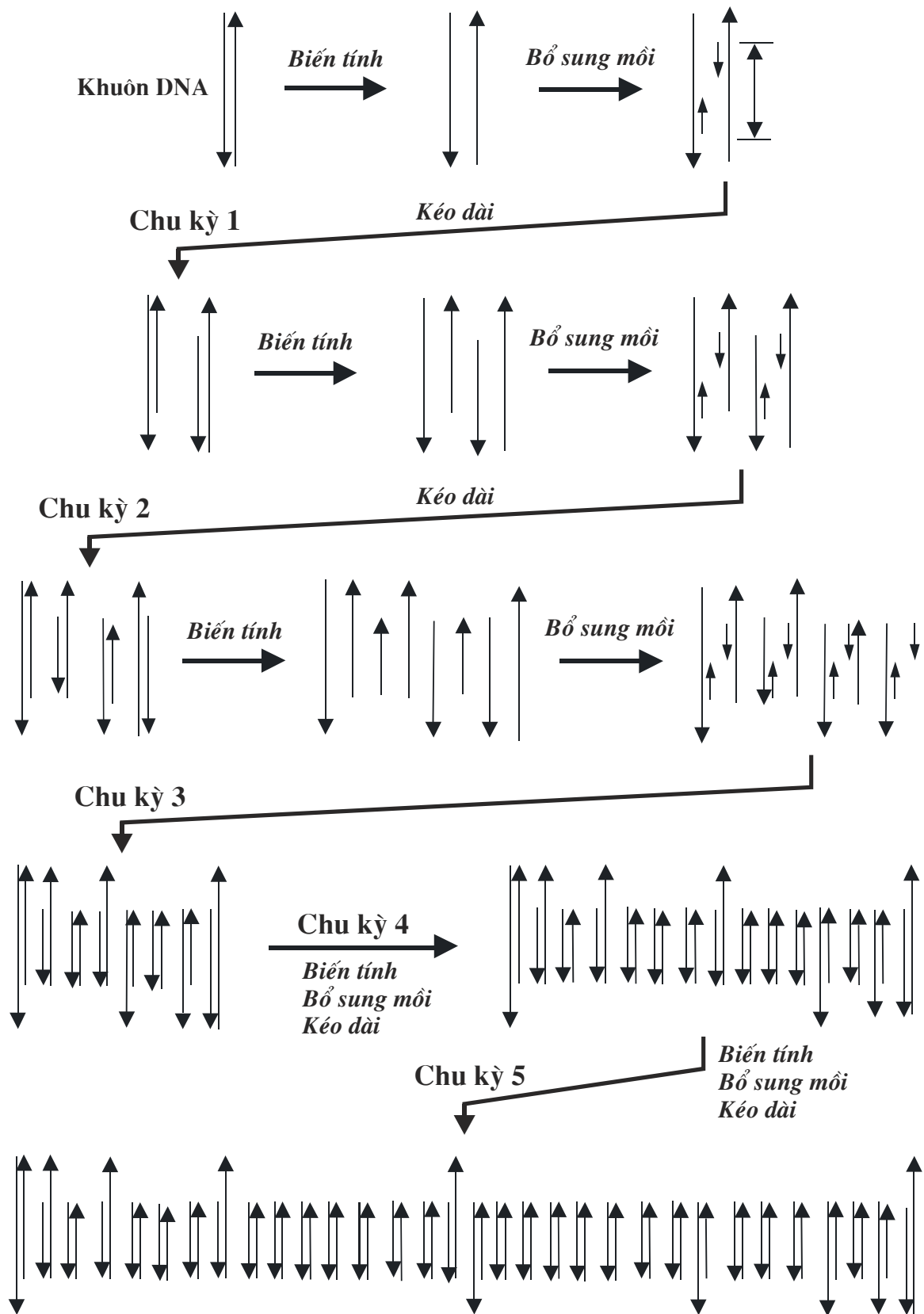
Sau bước 1, ngay lập tức nhiệt độ được hạ xuống từ từ và nhỏ hơn nhiệt độ T_m của mồi, vào khoảng $37\div 68^\circ\text{C}$ và thời gian lưu $30\text{s}\div 1$ phút. Bổ sung mồi để mồi bắt cặp với sợi khuôn. Mồi được tổng hợp hóa học, có mồi ngược và xuôi. Người ta còn có thể dựa vào trình tự nucleotide ở đầu 3' của khuôn để tổng hợp mồi. Sau đó bổ sung DNA-polymerase để kéo dài mồi.

7.2.2.3- **Bước 3** - Tổng hợp mạch mới hay còn gọi là kéo dài (extension)

Nâng nhiệt phản ứng lên 72°C trong vài chục giây đến 1 phút để DNA-polymerase tổng hợp sợi mới. Trong thực tế, thời gian và nhiệt độ phản ứng phụ thuộc vào sợi DNA cần khuếch đại.

Kết thúc một chu kỳ từ một DNA kép mẹ tổng hợp 2 sợi DNA kép con. Cứ như vậy, phản ứng xảy ra trong 25 đến 40 chu kỳ. Sau chu kỳ cuối, nhiệt độ được duy trì ở 72°C trong khoảng từ 5 đến 10 phút sao cho tất cả các sợi đơn xoắn lại và tạo nên sản phẩm của PCR. Sau đó hạ xuống 4°C để bảo quản sản phẩm.

Sản phẩm của PCR được kiểm tra bằng cách chạy điện di trên gel agarose nồng độ từ $0,8\%\div 2\%$ để phát hiện sự đa hình của các đoạn DNA đặc thù, hoặc các đoạn DNA bị thay đổi do các tác nhân nào đó (đột biến, tái tổ hợp).



Hình 7-3: Sơ đồ phản ứng PCR nhiều chu kỳ

7.2.3- Các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng PCR

7.2.3.1- *DNA mẫu làm khuôn*

Phản ứng PCR tối ưu xảy ra khi mẫu DNA không được dài quá, thường khuếch đại tốt nhất đối với đoạn DNA dài khoảng 1÷1,5kb.

Mẫu DNA tinh sạch sẽ cho kết quả tốt, tuy nhiên, kỹ thuật chuẩn đoán bằng phương pháp này vẫn đạt kết quả tốt trong trường hợp mẫu DNA không cần có độ tinh sạch cao, như vết máu khô, những mẫu vật khảo cổ (tóc, móng tay người đã chết). Phương pháp này cho phép xác định DNA với một lượng thấp, khoảng nhỏ hơn 100 ng ($1\text{g} = 10^9\text{ng}$).

7.3.3.2- *Enzyme DNA-polymerase*

Chất lượng của phương pháp phụ thuộc vào khả năng chịu nhiệt của enzyme polymerase (do phản ứng luôn phải thực hiện ở nhiệt độ khác nhau). Đầu tiên người ta sử dụng các đoạn Klenow của DNA-polymerase I từ *E. Coli* ở 37°C (cắt nhỏ mảnh DNA-polymerase I thành đoạn Klenow mất hoạt tính exonuclease) do đó đã nhận được đoạn cần nhân không tinh sạch vì đây không phải là enzyme chịu nhiệt. Phương pháp PCR chuyển sang một bước ngoặt mới cùng với sự phát hiện enzyme Taq-polymerase có nguồn gốc vi khuẩn (*Thermus aquaticus*) tách từ suối nước nóng nên chịu được nhiệt độ cao. Với enzyme này cho phép nhận được các sản phẩm DNA tinh sạch. Điều này cho phép tự động hóa tất cả các bước của chu trình nhân bản DNA. Từ đó máy chu trình nhiệt PCR ra đời và có khả năng điều khiển về cả nhiệt độ lẫn thời gian. Ngày nay có rất nhiều hãng trên thế giới sản xuất máy chu trình nhiệt PCR như: Perkin Elmer, MJ, Eppendorf, ...

Nhược điểm của enzyme này là không tổng hợp được trình tự DNA dài quá 3kb, hơn nữa, enzyme này không có khả năng sửa sai trong quá trình sao chép. Hiện nay có nhiều enzyme polymerase chịu nhiệt mới được đưa ra thị trường với nhiều chức năng chuyên biệt và hoàn thiện hơn, như là Tth-polymerase tách từ vi khuẩn *Thermus thermophilus*, Elogase (bao gồm nhiều enzyme kết hợp trong đó có sự tham gia của Taq-polymerase).

7.2.3.3- *Môi và nhiệt độ nóng chảy của môi*

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

- Trình tự của mỗi được chọn không có sự bất cặp giữa mỗi xuôi và mỗi ngược, và cũng không tạo những cấu trúc kẹp tóc.

- Mỗi phải chọn đặc trưng cho DNA cần khuếch đại và không trùng với các trình tự lặp lại trên gen.

- Trình tự nằm giữa mỗi xuôi và mỗi ngược không quá lớn (1kb).

- Độ dài mỗi cần chọn khoảng 18 đến 30 nucleotide, nếu mỗi nhỏ hơn 10 nucleotide, mỗi bám không đặc hiệu. Còn mỗi dài hơn 30 nucleotide sẽ ảnh hưởng đến cơ chế tổng ở Bước 3.

- Tm mỗi xuôi và mỗi ngược không cách nhau quá xa, thông thường trong khoảng từ 4÷5°C, và nhiệt độ nóng chảy của mỗi khoảng 72°C.

7.2.3.4- *Ảnh hưởng của các nucleotit*

Cần phải có bốn loại nucleotide dạng triphosphat như: dATP, dTTP, dGTP, dCTP. Nồng độ mỗi loại nucleotide phải ở dạng cân bằng, ứng với khoảng 20÷200μM cho mỗi loại nucleotide. Nếu mất trạng thái cân bằng thì sẽ gây ra lỗi khi sao chép, nếu nồng độ các nucleotide cao hay thấp hơn sẽ dẫn đến hiện tượng sao chép giả.

7.2.3.5- *Môi trường phản ứng*

Ion Mg^{+2} là thành phần không thể thiếu được của phản ứng PCR, nồng độ Mg^{+2} tối ưu để thực hiện PCR từ 150÷200μM. Nồng độ chuẩn cho từng khoản tương ứng, phải được xác định trong điều kiện thí nghiệm nhất định.

Nước sử dụng cho phản ứng PCR phải là nước tinh khiết, không chứa bất kỳ ion lạ nào. Không được chứa các enzyme cắt hạn chế và các enzyme phân hủy axit nucleic.

Môi trường dung dịch đệm phải ổn định.

7.2.3.6- *Thời gian và số lượng chu kỳ*

Qua nghiên cứu cho thấy: tổng thời gian cho mỗi bước của một chu kỳ và của chu kỳ đầu với các chu kỳ tiếp theo là khác nhau. Ngoài ra, thời gian cho mỗi phản ứng còn phụ thuộc vào độ dài của đoạn DNA cần nhân dòng.

Số lượng chu kỳ cho một phản ứng PCR thông thường trong khoảng từ 30 đến 40 chu kỳ. Bởi vì phản ứng diễn biến theo hai giai đoạn: Ở giai đoạn đầu, số lượng bản sao tăng theo cấp số nhân, và đến một giới hạn nào đó thì số bản sao giảm, hiệu quả khuếch đại giảm do các nguyên nhân:

- Nồng độ nucleotide giảm,
- Xuất hiện sản phẩm phụ,
- Do các bản sao không bắt cặp với mỗi mà chúng lại bắt cặp với nhau.

Ngoài ra, số chu kỳ phụ thuộc vào số bản mẫu ban đầu, nếu số bản mẫu là 10^5 thì thực hiện 25÷30 chu kỳ, còn số mẫu $10^2÷10^3$ thì thực hiện 35÷40 chu kỳ.

7.2.3.7- **Thiết bị và dụng cụ**

Thiết bị cần đáp ứng yêu cầu thay đổi được nhiệt độ nhanh và chính xác. Tránh tối đa sự bốc hơi nước trong quá trình phản ứng. Tuy nhiên, ứng với mỗi phản ứng cụ thể có các thiết bị và dụng cụ khuếch đại riêng.

7.2.4- **Ứng dụng của phương pháp PCR**

7.2.4.1- **Ưu và nhược điểm của phương pháp PCR**

Ưu điểm: Thời gian thực hiện nhanh, chỉ cần 3 giờ là có thể khuếch đại được một trình tự đáng quan tâm. Thực hiện đơn giản và ít tốn kém (nó được thực hiện trong ống nghiệm plastic nhỏ gồm thành phần tối thiểu được thực hiện đồng thời). Yêu cầu về độ tinh sạch của mẫu không cao (vết máu khô, mẫu vật khảo cổ, những vết tích để lại của người đã chết).

Nhược điểm: Cần phải có DNA môi đặc trưng cho DNA cần khuếch đại. Để có đoạn môi này ít nhất phải biết trước trình tự nucleotide cần khuếch đại. Kích thước DNA cần khuếch đại không vượt quá 3kb. Khả năng ngoại nhiễm lớn (do thao tác nhiều lần). Sai sót còn do sử dụng E-Taq-polymerase khoảng 10^4 (sai sót cho một lần sao chép).

7.2.4.2- **Phạm vi sử dụng**

Sản xuất mẫu dò đánh dấu phóng xạ (dầu dò) với khối lượng lớn, phù hợp với phương pháp lai giữa DNA và DNA, RNA và DNA.

Khuếch đại số lượng RNA, do lượng mRNA nhỏ dưới mức cho phép nên người ta dùng phương pháp RT-PCR để tăng nồng độ mRNA đến một giới hạn phát hiện bằng cách phiên mã ngược: mRNA → cDNA. Từ cDNA, ta đánh giá được mRNA.

Khuếch đại DNA và RNA ngay tại hệ mô: Gọi là kỹ thuật insitu, kỹ thuật này có nguyên tắc như trên, được tiến hành ngay trên lát cắt mô, tế bào cố định trên lame trong thiết bị PCR có bộ phận tạo nhiệt cho lame.

Trong nuôi cấy mô tế bào, kỹ thuật PCR được dùng để nghiên cứu những thay đổi ở mức độ DNA của các dòng mô nuôi cấy và các cây tái sinh từ mô sẹo, để nghiên cứu sự có mặt của các gen ngoại lai trong các cây biến nạp.

Định lượng DNA: Khi nồng độ DNA thấp, dùng phương pháp PCR nhân lên đến mức xác định. Người ta xác định được số lượng bản mẫu ban đầu qua tính toán dựa vào sản phẩm cuối cùng và số chu kỳ nhân. Điều quan trọng là số chu kỳ nhân không được vượt quá giai đoạn đầu của phản ứng, khi mà số lượng bản sao còn tỷ lệ thuận với số lượng bản mẫu ban đầu.

Ứng dụng: Trong pháp y, chuẩn đoán những bệnh di truyền, nghiên cứu mẫu khảo cổ, bảo tồn và duy trì những gen quý.

7.2.5- Nguyên lý cơ bản của phản ứng RT-PCR (PCR ngược)

Phản ứng RT-PCR thực chất là phản ứng nhân một đoạn giới hạn của khuôn RNA, theo nguyên lý của phản ứng PCR gồm có hai giai đoạn: Giai đoạn thứ nhất là sao chép RNA khuôn thành DNA sợi đôi nhờ hoạt động của enzyme sao chép ngược. Giai đoạn này được thực hiện ở 50÷55°C và thời gian là 30 phút. Giai đoạn 2 là dùng chính DNA vừa sao chép làm khuôn cho phản ứng PCR, quá trình được thực hiện theo ba bước như đã trình bày ở trên.

Sau khi phản ứng kết thúc, sản phẩm của phản ứng PCR ngược được giảm xuống 4°C để bảo quản cho tới khi sử dụng. Để đánh giá và phát hiện sản phẩm PCR ngược người ta cũng điện di trên gel agarose 0,8÷1%. Và DNA chuẩn là DNA λ được cắt bởi enzyme HindIII có độ dài 23,1kb; 9,4kb; 6,5kb; 4,3kb, ...

7.2.6- Phương pháp điện di DNA

7.2.6.1- Nguyên tắc điện di

Điện di là kỹ thuật được sử dụng trong thí nghiệm để phân để phân tích các đại phân tử tích điện. Trong phòng thí nghiệm sinh học phân tử người ta thường sử dụng phương pháp điện di để tách ly, phát hiện phân tử DNA nguyên vẹn, DNA bị cắt hạn chế và DNA của sản phẩm PCR.

Axit nucleic nói chung là một phân tử tích điện âm, vì vậy, chúng có thể dịch chuyển qua băng gel từ cực âm (cathode) sang cực dương (anode) dưới tác dụng của điện trường. Trên cùng một bản gel, có cùng một dòng điện những phân tử DNA khác nhau về trọng lượng nên khác nhau về điện tích và chạy được những quãng đường khác nhau sau một thời gian như nhau. Sau khi phân tách bằng điện di, để phát hiện phân tử DNA, người ta dùng phương pháp làm hiện hình. Đối với gel agarose, người ta nhuộm bằng ethidium bromid. Chất này sẽ gắn xen các bazơ của phân tử DNA và phát quang dưới tia tử ngoại. Như vậy dễ dàng cho phép phát hiện vị trí các đoạn DNA trên gel và có thể phân biệt được phân tử DNA trên cùng một băng gel. Đối với gel polyacrylamid, các phân tử thường được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ và vị trí của chúng sẽ được phát hiện bằng kỹ thuật phóng xạ tự ghi. Trong điện di, người ta sử dụng thang DNA chuẩn, thường là DNA λ . Khi điện di cho chạy cùng với mẫu nghiên cứu, qua đó có thể so sánh với DNA mẫu với DNA chuẩn để biết trọng lượng phân tử, hoặc trích li được DNA khác nhau.

7.2.6.2- Cách tiến hành

Hệ thống điện di bao gồm nguồn điện, buồng điện di, khuôn đổ gel và hệ thống soi chụp ảnh. Các bước được tiến hành như sau:

- Cân khoảng 1g agarose cho vào 100ml đệm TBE (Tris-borate-EDTA) hoặc TAE (Tris-acetate-EDTA) ở nhiệt độ phòng, khuấy đều và để yên 1 phút, cho vào lò viba (làm nóng chảy gel và không tạo bọt).

- Làm nguội gel xuống 50÷55°C, thêm 1 μ l ethidium bromid, đổ gel vào khuôn gel và lấp lược.

- Khi gel nguội, đặt khuôn gel vào buồng điện di, tháo lược và đổ đệm chạy vào khay gel sao cho đệm cao hơn mặt gel khoảng 2÷5 mm.

- Nạp DNA mẫu và DNA chuẩn vào các giếng, đậy nắp và cắm điện cực.
- Điện di trong khoảng 30 phút với điện thế 100÷120V.
- Chụp hình ảnh gel dưới ánh sáng UV để xem kết quả.

Lưu ý: Tùy thuộc vào kích thước của DNA mẫu mà người ta chọn loại gel (agarose, polyacrlamid), nồng độ gel, loại đệm (TBE hoặc TAE). Đệm TAE cho độ phân giải cao các phân đoạn lớn hơn 4 kb, trong khi đệm TBE có phân giải cao từ 0,1 đến 3kb. Ngoài ra, độ phân giải các phân đoạn DNA còn phụ thuộc vào phương pháp điện di, tối ưu điện thế, tối ưu lượng DNA nạp và đệm nạp.

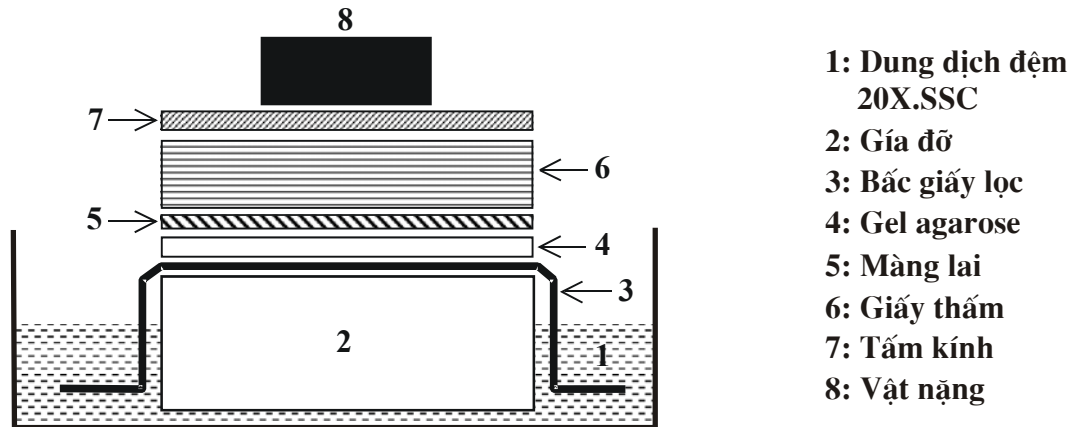
Thuốc nhuộm ethidium bromid (EtBr) là một thuốc nhuộm huỳnh quang mà có thể nhận biết cả hai loại DNA sợi đơn và sợi kép. Mặc dù vậy, ái lực liên kết với DNA sợi đơn tương đối thấp hơn so với DNA sợi kép. DNA nhuộm EtBr được nhận biết bằng tia cực tím. Tại bước sóng 254nm, ánh sáng UV được hấp thụ bởi DNA và chuyển sang thuốc nhuộm. Tại bước sóng 302nm và 366nm, ánh sáng UV được hấp thụ bởi chính thuốc nhuộm. Trong cả hai trường hợp, năng lượng được phát xạ ứng với tia tại bước sóng 590nm trong vùng vàng đỏ của quang phổ thấy được. EtBr là chất gây đột biến mạnh, cần phải mang găng tay khi thao tác với dung dịch thuốc nhuộm này và các gel nhuộm. Để tạo độ phân giải cao rõ nét, các vạch và nền nhạt nên nhuộm gel với EtBr ngay sau khi điện di.

7.3- CÁC PHƯƠNG PHÁP LAI PHÂN TỬ

7.3.1- Phương pháp Southern blot

Phương pháp Southern blot được E. Southern phát minh vào năm 1975, cho phép nghiên cứu DNA của bộ gen, kiểm tra kết quả chuyển gen hoặc kiểm tra sự có mặt của một gen nào đó trong bộ gen của tế bào. Để thực hiện được quá trình lai, đầu tiên, người ta phải tách DNA bộ gen của tế bào. Sử dụng enzyme cắt giới hạn để cắt phân tử DNA thành những đoạn nhỏ, điện di trên gel agarose để tách những đoạn có kích thước khác nhau. Gây biến tính DNA trên gel bằng dung dịch NaOH-0,5M, sau đó, chuyển DNA từ gel sang màng lai (nitrocellulose). Trong quá trình chuyển, vị trí của DNA phải được giữ nguyên.

DNA cố định trên màng được lai với mẫu dò có đánh dấu phóng xạ, ở nhiệt độ 65°C và thời gian lai khoảng 3÷8 giờ. Sau quá trình lai người ta rửa màng lai để loại bỏ những mẫu dò không bắt cặp chuyên biệt với DNA cố định trên màng lai.



Hình 7-4: Kỹ thuật chuyển DNA từ gel agarose lên màng lai

Cuối cùng, người ta dùng kỹ thuật phóng xạ tự ghi để định vị các phân tử lai. Trong kỹ thuật này, người ta đặt một phim nhạy cảm với tia xạ áp sát vào màng lai. Các phân tử lai có đánh dấu phóng xạ sẽ tác động lên phim và kết quả được thể hiện qua các chấm đen trên phim (Hình 7-4).

Các ứng dụng quan trọng của Southern blot:

- Lập bản đồ giới hạn của một gen.
- Phát hiện các đa dạng trình tự của cùng một gen ở các chủng hay các cá thể khác nhau qua sự so sánh bản đồ giới hạn của chúng.
- Phát hiện các đột biến mất đoạn, đột biến điểm hay tái tổ hợp trên một gen vì chúng làm thay đổi bản đồ giới hạn.

7.3.2- Phương pháp Northern blot

Phương pháp lai Northern blot là phương pháp lai RNA của tế bào với mẫu dò DNA. Phương pháp này được sử dụng để xác định kích thước và hàm lượng của một mRNA đặc trưng trong một hỗn hợp RNA. Về nguyên tắc giống như lai Southern blot, được tiến hành như sau:

RNA (đã được làm biến tính) sẽ được phân tích theo kích thước nhờ điện di trên gel agarose có chứa chất làm biến tính. Các chất làm biến tính có tác dụng ngăn cản sự hình thành cấu trúc bậc hai của RNA sau khi đã biến tính. Và do đó, không cản trở sự di chuyển cũng như sự tách của các RNA trên gel. Sau đó, RNA được chuyển lên màng lai. Những RNA cố định trên màng lai được đem lai với mẫu dò DNA có đánh dấu phóng xạ để tạo phân tử lai RNA-DNA. Các phân tử lai được phát hiện nhờ kỹ thuật phóng xạ tự ghi.

7.3.3- Lai tại chỗ

Lai tại chỗ là phương pháp lai phân tử, trong đó, trình tự axit nucleic cần tìm nằm ngay trong tế bào hay trong mô. Lai tại chỗ cho phép nghiên cứu axit nucleic mà không cần qua giai đoạn tách chiết chúng ra khỏi mô, tế bào. Các ứng dụng của kiểu lai này rất đa dạng đi từ kỹ thuật định vị gen trên nhiễm sắc thể, phát hiện dòng vi khuẩn tái tổ hợp trong phương pháp tạo dòng đến việc nghiên cứu một mRNA chuyên biệt trong tế bào và mô. Phương pháp này ít tốn kém hơn là lai Southern blot, mẫu dò được đánh dấu bằng huỳnh quang thay cho mẫu dò đánh dấu phóng xạ. Tùy từng loại tế bào và mô có thể thực hiện các phương pháp lai tại chỗ khác nhau.

7.3.3.1- *Lai trên khuẩn lạc*

Phương pháp này được sử dụng để phát hiện dòng vi khuẩn có mang vector tái tổ hợp cần tìm trong một ngân hàng gen. Ngân hàng gen được trải trên mặt thạch của hộp petri. Sau khi các khuẩn lạc đạt kích thước nhất định, người ta thu lấy dấu ấn của chúng bằng cách áp một màng lai trên mặt thạch. Mỗi khuẩn lạc sẽ để lại vài tế bào vi khuẩn trên màng lai. Sau đó xử lý màng lai bằng NaOH để làm vỡ tế bào vi khuẩn và làm biến tính DNA. Kết quả phóng xạ tự ghi của dấu ấn cho phép xác định dòng vi khuẩn cần tìm trên hộp petri ban đầu. Dòng này sẽ được thu nhận và phân tích.

7.3.3.2- *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 DNA cần tìm trên nhiễm sắc thể nhờ một mẫu dò chuyên biệt. Chọn tế bào kì giữa của quá trình phân bào khi các nhiễm sắc thể có kích thước lớn nhất (các nhiễm sắc thể này thường có nguồn gốc từ bạch cầu). Bằng các kỹ thuật xử lý cố định tế bào trên lam kính, định vị hình dạng và vị trí của nhiễm sắc thể. Sử dụng enzyme RNase và enzyme protease K để loại

bỏ RNA và protein. Nhiễm sắc thể cố định trên lam được đem lai với mẫu dò DNA hoặc RNA có đánh dấu phóng xạ. Sử dụng kỹ thuật phóng xạ tự ghi để phát hiện phân tử lai (phân tử lai trên lam được phủ một huyền dịch nhạy cảm với tia xạ). Sau một thời gian, cho tia xạ tác động lên huyền dịch, lam được đem quan sát dưới kính hiển vi. Tại các điểm có các phân tử lai xuất hiện các chấm đen trên lớp huyền dịch.

7.3.3.3- *Lai trên tế bào và mô*

Lai trên tế bào và mô thường được sử dụng để phát hiện các mRNA. Các loại mRNA hoạt động ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình phát triển tế bào và cơ thể. Lai trên tế bào và mô nhằm nghiên cứu giai đoạn hoạt động của mRNA, từ đó, tìm hiểu hoạt động của một gen, mối liên quan giữa phiên mã và giải mã, định vị các gen cần nghiên cứu trên nhiễm sắc thể.

Mô hoặc tế bào được xử lý bằng phương pháp mô, tế bào học như: cố định, khử nước, tẩm paraffin, cắt thành những lát mỏng ($7\div 10\mu\text{m}$) trải trên lam. Xử lý với enzyme protease để loại bỏ protein, sau đó xử lý với enzyme DNase để loại bỏ DNA. Lai với mẫu dò có đánh dấu phóng xạ hoặc huỳnh quang. Sau đó phủ một lớp huyền dịch nhạy với phóng xạ hoặc huỳnh quang để một thời gian thích hợp cho phản ứng xảy ra, quan sát kết quả lai dưới kính hiển vi. Trong tế bào những vị trí có phân tử lai được phát hiện bằng các chấm đen.

Phạm vi sử dụng của phương pháp:

- Đối tượng nghiên cứu có tổ chức phức tạp bao gồm nhiều tập hợp các tế bào khác nhau như bộ não.
- Các phương pháp miễn dịch tế bào cho phép phát hiện một protein chuyên biệt thông qua kháng thể đặc trưng của nó. Khi phối hợp những phương pháp miễn dịch tế bào và lai tại chỗ, người ta sẽ phát hiện đồng thời mRNA và protein của nó, từ đó, xác định được mối tương quan giữa hoạt động phiên mã và dịch mã của một gen.
- Bằng cách lai nhiều lát cắt liên tục (có cấu trúc gần như đồng nhất) với nhiều mẫu dò khác nhau, người ta có thể xác định vị trí, sự phân bố và tương tác giữa các mRNA cùng tham gia vào một quá trình sống.

7.4- PHƯƠNG PHÁP GIẢI TRÌNH TỰ CỦA AXIT NUCLEIC

Khi nghiên cứu về gen, việc xác định được vị trí của gen trên nhiễm sắc thể chưa cho phép kết luận về bản chất của nó như gen đó tương ứng với gen gì, chức năng điều hòa hay mã hóa cho protein nào. Nhờ việc giải trình tự gen mà người ta đã giải quyết được những khó khăn trên. Có hai phương pháp giải trình gen đó là phương pháp hóa học của Maxam-Gilbert và phương pháp enzyme của Sanger và cộng sự.

7.4.1- Phương pháp hóa học của Maxam-Gilbert

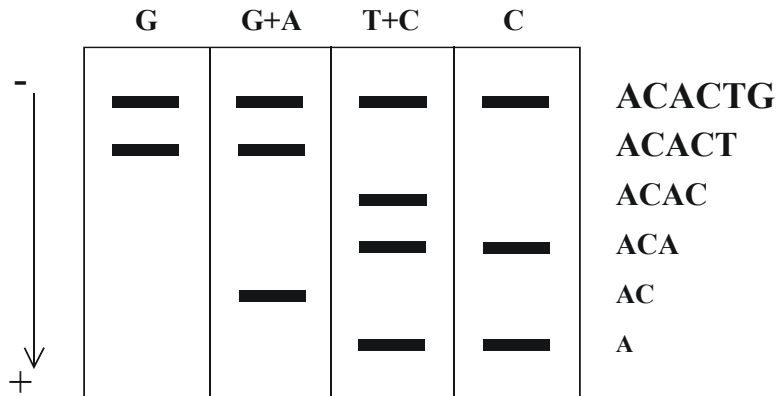
Vào năm 1977, Maxam và Gilbert lần đầu tiên phát minh ra phương pháp giải trình tự gen bằng phương pháp hóa học. Nguyên tắc của phương pháp là dựa trên phản ứng hóa học thủy giải đặc hiệu, các DNA không tự xoắn lại với nhau, tạo thành tập hợp nhiều phân đoạn có kích thước khác nhau.

Trước hết, phân tử DNA được đánh dấu đồng vị phóng xạ P^{32} ở đầu 5' của mạch đơn, tạo những đoạn đánh dấu có thể phát hiện bằng hình phóng xạ. Xử lý hóa học đặc hiệu phân hủy đặc trưng một loại nucleotide của mạch DNA đã đánh dấu phóng xạ, tạo các đoạn oligonucleotide có chiều dài hơn kém nhau 1 nucleotide được phát hiện bằng điện di. Kết quả các phản ứng hóa học xử lý mạch DNA được phát hiện bằng điện di trên gel polyacrylamid có thể xác định được trình tự mạch đơn.

Mạch đơn đã đánh dấu phóng xạ có thể xử lý theo 4 nhóm phản ứng:

- Nhóm phản ứng thứ nhất xử lý mạch đơn DNA bằng dimethyl sulphat làm đứt mạch tại G.
- Nhóm phản ứng thứ hai xử lý mạch đơn DNA bằng axit (pH=2) gây đứt mạch đơn tại A hoặc G.
- Nhóm phản ứng thứ ba xử lý mạch đơn DNA bằng hydrazin gây đứt mạch đơn tại T và C.
- Nhóm phản ứng thứ 4 xử lý mạch đơn DNA bằng hydrazin với nồng độ muối cao làm đứt mạch đơn tại C.

Kết quả: Các phản ứng tạo thành các đoạn DNA cắt ngẫu nhiên, có kích thước khác nhau. Điện di trên gel polyacriamid (Hình 7-5), đọc kết quả điện di bằng máy phóng xạ tự ghi ta thu được trình tự nucleotide của mạch đơn DNA.



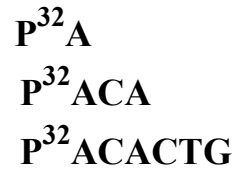
Hình 7-5: Sơ đồ giải trình gel theo phương pháp hoá học

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

Sau khi xử lý bằng phương pháp hóa học và cắt mạch đơn nói trên ta thu được các phân đoạn sau:

- Kết quả nhóm 1 cắt tại G: $P^{32}ACACT$
 $P^{32}ACACTG$
- Kết quả phản ứng nhóm 2 cắt tại A hoặc G: $P^{32}AC$
 $P^{32}ACACTG$
 $P^{32}ACACT$
 $P^{32}ACACTG$
- Kết quả phản ứng nhóm 3 cắt tại C hoặc T: $P^{32}A$
 $P^{32}ACA$
 $P^{32}ACACTG$
 $P^{32}ACAC$
 $P^{32}ACACTG$

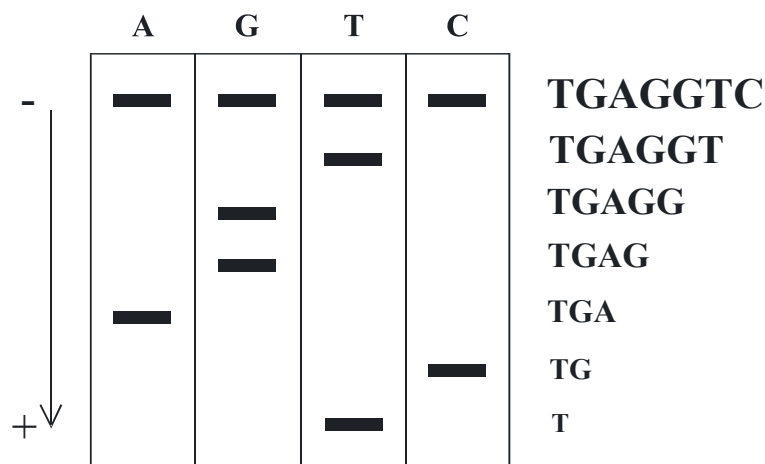
- Kết quả phản ứng nhóm 4 cắt tại C:



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

7.4.2- Phương pháp enzyme sử dụng các dideoxynucleotide

Phương pháp này được F. Sanger và cộng sự phát minh vào năm 1977. Nguyên tắc của phương pháp dideoxy là dựa vào sự tổng hợp mạch bổ sung cho trình tự cần xác định nhờ hoạt động của enzyme DNA-polymerase. Với việc sử dụng thêm các dideoxynucleotide (ddNTP) với các deoxynucleotide (dNTP) thông thường, kết quả tổng hợp cũng là sự hình thành một tập hợp nhiều đoạn DNA có kích thước khác nhau. Trong phản ứng sử dụng đoạn DNA mỗi mạch đơn khoảng 20 nucleotide, bốn loại dNTP (trong đó có một loại đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ) và bổ xung thêm 1% ddATP (hoặc ddCTP, ddGTP, ddTTP) cho mỗi loại phản ứng. Các ddNTP mất hai nguyên tử oxy ở C3 và C2 khi mạch đơn DNA đang tổng hợp được gắn 1 ddNTP phản ứng ngừng tổng hợp. Mỗi loại phản ứng được thực hiện riêng rẽ, có DNA khuôn, DNA môi, đầy đủ các loại dNTP, enzyme Taq DNA-polymerase, dung dịch đệm và có thêm khoảng 1% một loại ddNTP. Kết quả phản ứng tổng hợp nên các đoạn oligonucleotide dài ngắn khác nhau một nucleotide và được nhận biết nhờ phương pháp điện di (Hình 7-6). Tổng hợp kết quả phản ứng ở 4 ống, thu được trình tự các nucleotide của mạch đơn, có thể biết được trình tự sắp xếp các nucleotide trong gen.



Hình 7-6: Sơ đồ giải trình gen theo phương pháp Sanger

Ví dụ: Giải trình đoạn gen:	5' - AGTCCAG-3'
- Mạch cần tổng hợp là	3' - TCAGGTC-5'
- Kết quả phản ứng theo loại A:	TCAdd TCAGGTC
- Kết quả phản ứng loại G:	TCAGdd TCAGGdd TCAGGTC
- Kết quả phản ứng loại C:	TCdd TCAGGTCdd TCAGGTC
- Kết quả phản ứng loại T:	Tdd TCAGGTdd TCAGGTC

7.4.3- Phương pháp xác định trình tự nucleotide bằng máy tự động

Trong kỹ thuật này, người ta không đánh dấu bằng các đồng vị phóng xạ mà bằng hóa chất (các fluochrome). Mỗi loại ddNTP được đánh dấu bằng một fluochrome có màu khác nhau. Như vậy, tất cả các oligonucleotide cùng chấm dứt tại một loại ddNTP sẽ có cùng một màu. Sau khi điện di trên gel polyacriamid, kết quả sẽ được xử lý qua một hệ thống vi tính.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1- Đái Duy Ban (19980, *Công nghệ ADN trong điều trị gen các bệnh hiếm nghèo*, Nxb Y học, Hà Nội.
- 2- Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang (1999), *Di truyền phân tử - Những nguyên tắc cơ bản trong chọn giống cây trồng*, Nxb Nông nghiệp, Hà nội.
- 3- Nguyễn Hữu Chấn chủ biên (1999), *Những vấn đề hoá sinh học hiện đại*, Nxb KH&KT, Hà Nội.
- 4- Phạm Thị Trân Châu, Trần Thị Áng (1997), *Hoá sinh học*, Nxb Giáo Dục, Hà Nội.
- 5- Nguyễn Lân Dũng chủ biên, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty (1997), *Vi sinh vật học*, Nxb Giáo dục, Hà Nội.
- 6- Hồ Huỳnh Thuỳ Dương (1998), *Sinh học phân tử*, Nxb Giáo dục, Hà nội.
- 7- Nguyễn Như Hiền (2002), *Di truyền và công nghệ tế bào soma*, Nxb KH&KT, Hà Nội.
- 8- Đỗ Đình Hoà chủ biên (1996), *Giáo trình hoá sinh*, Đại học Y Dược, TP HCM.
- 9- Phạm Thanh Hồ (2000), *Di truyền học*, Nxb Giáo dục, Hà Nội.
- 10- Nguyễn Đình Huyền (1998), *Sinh học phân tử ADN*, Nxb KH&KT, Hà Nội.
- 11- Võ Thị Thương Lan (2002), *Sinh học phân tử*, Nxb Đại học Quốc gia, Hà Nội.
- 12- Nguyễn Thị Lang (2002), *Phương pháp cơ bản trong nghiên cứu công nghệ sinh học*, Nxb Nông nghiệp-Chi nhánh TP Hồ Chí Minh.
- 13- Lê Đình Lương, Phan Cự Nhân (1993), *Di truyền học*, Nxb KH&KT, Hà Nội.
- 14- Phan Cự Nhân (1992), *Một số vấn đề về di truyền học (hiện đại)*, Nxb Giáo dục và Đào tạo, Hà Nội.
- 15- Phan Cự Nhân (1998), *Sinh học đại cương*, Nxb Đại học Quốc gia, Hà nội.

- 16- Khuất Hữu Thanh (2003), *Cơ sở di truyền học phân tử và kỹ thuật gen*, Nxb KH&KT, Hà Nội.
- 17- Nguyễn Đức Thành (2000), *Nuôi cấy mô tế bào thực vật - Nghiên cứu và ứng dụng*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
- 18- Lê Ngọc Tú (1997), *Hoá sinh công nghiệp*, Nxb KH&KT, Hà Nội.
- 19- Lê Ngọc Tú, Đỗ Ngọc Liên, Đặng Thị Thu (2002), *Tế bào và các quá trình sinh học*, Nxb KH&KT, Hà nội.
- 20- Nguyễn Văn Uyên chủ biên, Nguyễn Tiến Thắng (2000), *Những kiến thức cơ bản về công nghệ sinh học*, Nxb Giáo dục, Hà Nội.
- 21- C.Vili và Dethio (1979), *Các nguyên lý và các quá trình sinh học*, Nxb KH&KT, Hà Nội.
- 22- Emil L. Smith (1983), *Principles of Biochemistry*, Mc. Graw-Hill Book Company (7th Edition), New Dehi.
- 23- Emil L. Smith, Robert L. Hill (1983), *Principles of biochemistry -General aspects*, McGraw-Hill Book Company, New Dehi.
- 24- Hartl Daniel L., Freifelder David, Snyder Leon A. (1988), *Basic genetics*, Johnes and Bartlett Publishers Inc., USA.
- 25- Rastogi S. C. (1996), *Biochemistry*, Tata McGraw-Hill Publishing Co.Ltd, New Dehi.
- 26- René Scriban coordonnateur (1982), *Biotechnologie*, Technique et documentation lavoisier, Paris.
- 27- The national medical series for indepenent study (1996), *Genetics*, William & Wilkins, USA.
- 28- Watson James D., Hopkins Nancy H., Roberts Jeffrey W., Steiz Joan Argetsinger, Weiner Alan M. (1987), *Molecular biology of the gene*, The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., USA.
- 29- William M. Fogarty (1983), *Microbial enzymes and biotechnology*, Applied Science Publishes Ltd, London & New York.

MỤC LỤC

Phần I- Cơ sở di truyền	1
Mở đầu- Lược sử phát triển của di truyền học và kỹ thuật di truyền	2
1.1- Lĩnh vực nghiên cứu của di truyền học và công nghệ di truyền	-
1.2- Giai đoạn di truyền sau Mendel	3
1.3- Sự ra đời của công nghệ di truyền	4
1.4- Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của công nghệ di truyền	5
1.4.1- Trong y dược	6
1.4.2- Trong nông nghiệp	7
1.4.3- Trong công nghệ thực phẩm	-
Chương I - Bản chất của vật chất di truyền	9
1.1- Axit nucleic - Vật chất di truyền của mọi sinh vật	-
1.1.1- Thành phần cấu tạo hoá học của axit nucleic	-
1.1.2- Cấu trúc phân tử DNA	14
1.1.3- Tính chất của DNA	20
1.1.4- Các thí nghiệm chứng minh DNA là vật chất di truyền	21
1.2- Các RNA	25
1.2.1- Cấu tạo hóa học và đặc điểm chung của RNA	-
1.2.2- Các loại RNA	26
1.3- Mã di truyền	31
1.3.1- Khái niệm về mã di truyền	-
1.3.2- Đặc tính của mã di truyền	32
1.4- Vật chất di truyền của một số nhóm sinh vật	33
1.4.1- Vật chất di truyền của virus	-
1.4.2- Vật chất di truyền của vi khuẩn	-
1.4.3- Vật chất di truyền của eucaryote	34
Chương II - Hoạt động và sự biểu hiện của gen	38
2.1- Gen là đơn vị chức năng của bộ máy di truyền	38
2.1.1- Các quan niệm về gen	-
2.1.2- Cấu trúc của gen	39
2.2- Sự sao mã	41
2.2.1- Lý thuyết về sao mã DNA theo khuôn	-
2.2.2- Quá trình sao mã	44
2.2.3- Sao mã DNA sợi kép dạng vòng của tế bào procaryote	48
2.2.4- Sao chép mã ở tế bào eucaryote	50
2.2.5- Sửa sai DNA trong tế bào	-
2.3- Sự phiên mã	53
2.3.1- Đặc điểm chung của quá trình phiên mã	55
2.3.2- Phiên mã tổng hợp mRNA ở procaryote	56
2.3.3- Phiên mã tổng hợp mRNA ở eucaryote	61
2.3.4- Phiên mã tổng hợp tRNA	65

2.3.5- Phiên mã tổng hợp rRNA	66
2.4- Dịch mã	67
2.4.1- Đặc điểm chung của quá trình dịch mã	-
2.4.2- Sự hoạt hoá và vận chuyển axit amin	68
2.4.3- Hướng đọc mã và hướng kéo dài sợi polypeptide	70
2.4.4- Các giai đoạn của quá trình dịch mã	-
2.4.5- Polyribosome	74
2.5- Điều hoà biểu hiện gen (Điều hoà sinh tổng hợp protein)	-
2.5.1- Mục đích của điều hoà biểu hiện gen	-
2.5.2- Các yếu tố điều hoà biểu hiện gen	75
2.5.3- Mô hình điều hoà biểu hiện gen ở vi khuẩn	76
2.5.4- Mô hình điều hoà biểu hiện gen ở eucaryote	80
2.5.5- Sự biệt hóa tế bào	82
Chương III - Biến đổi vật chất di truyền	84
3.1- Khái niệm về biến dị	-
3.2- Đột biến	-
3.2.1- Tác nhân gây đột biến	-
3.2.2- Đột biến gen	86
3.2.3- Đột biến nhiễm sắc thể	88
3.3- Tái tổ hợp	92
Phần II- Những nguyên lý cơ bản của công nghệ di truyền	94
Chương IV- Các enzyme sử dụng trong công nghệ di truyền	96
4.1- Các enzyme giới hạn	-
4.1.1- Hiện tượng giới hạn và hệ thống hạn chế - cải biên	-
4.1.2- Cách gọi tên của enzyme giới hạn	98
4.1.3- Các loại enzyme giới hạn	99
4.1.4 - Các loại RE trong nhóm II	100
4.1.5- Ứng dụng của RE trong công nghệ di truyền	104
4.2- Các loại nuclease	105
4.2.1- Phân loại	-
4.2.2- Một số nuclease thường dùng và ứng dụng của nó	106
4.3- Enzyme kết nối	108
4.3.1- Ligase	-
4.3.2- Các enzyme dephosphoryl hoá	109
4.3.3- Các enzyme phosphoryl hoá	110
4.4- Các enzyme tổng hợp	-
4.4.1- Enzyme sao chép DNA	-
4.4.2- Enzyme phiên mã ngược	111
4.4.3- Các enzyme tổng hợp RNA (RNA-polymerase)	112
4.4.4- Enzyme terminal-transferase	-
Chương V - Vector chuyển gen	113
5.1- Khái niệm về vector	-
5.1.1- Sự chuyển gen	-

5.1.2- Vector	-
5.2- Những yêu cầu tối thiểu của một vector chuyển gen	-
5.3- Một số ứng dụng của vector chuyển gen	114
5.4- Các vật chủ thu nhận các vector chuyển gen	115
5.5- Các loại vector chuyển gen	-
5.5.1- Vector chuyển gen là plasmid	116
5.5.2- Các vector chuyển gen là phage	121
5.5.3- Các vector chuyển gen khác	125
5.5.4- Các vector là virus của eukaryote	128
Chương VI - Công nghệ DNA tái tổ hợp và sự tách dòng	129
6.1- Công nghệ DNA tái tổ hợp	-
6.1.1- DNA tái tổ hợp	-
6.1.2- Các công đoạn chính tạo DNA tái tổ hợp	132
6.1.3- Các phương pháp tạo DNA tái tổ hợp	135
6.2- Một số phương pháp đưa DNA tái tổ hợp vào tế bào chủ	140
6.2.1- Hóa biến nạp	-
6.2.2- Điện biến nạp	-
6.2.3- Biến nạp tế bào trần	141
6.2.4- Phương pháp bắn gen	-
6.2.5- Phương pháp vi tiêm	142
6.2.6- Tải nạp	-
6.3- Kỹ thuật tách dòng (tạo dòng)	-
6.3.1- Mục đích của sự tách dòng	143
6.3.2- Các bước cơ bản của phương pháp tách dòng	-
6.3.3- Một số phương pháp xác định dòng cần tìm	145
6.4- Ngân hàng gen	148
6.5- Ngân hàng cDNA	149
6.5.1- Thiết kế ngân hàng cDNA	-
6.5.2- Sàng lọc ngân hàng cDNA	150
Chương VII - Một số phương pháp nghiên cứu trong công nghệ di truyền	151
7.1- Các phương pháp tách chiết axit nucleic	-
7.1.1- Phương pháp tách chiết DNA vi khuẩn	-
7.1.2- Phương pháp tách DNA plasmid	152
7.1.3- Tách DNA của tế bào khác	153
7.1.4- Phương pháp tách ARN tổng số và mRNA	-
7.1.5- Tách và thu nhận gen	154
7.2- Phương pháp nhân bản (PCR)	156
7.2.1- Nguyên tắc của phương pháp PCR	157
7.2.2- Các bước tiến hành thí nghiệm	158
7.2.3- Các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng PCR	161
7.2.4- Ứng dụng của phương pháp PCR	163
7.2.5- Nguyên lý cơ bản của phản ứng RT-PCR (PCR ngược)	164
7.2.6- Phương pháp điện di DNA	165

7.3- Các phương pháp lai phân tử	166
7.3.1- Phương pháp Southern blot	-
7.3.2- Phương pháp Northern blot	167
7.3.3- Lai tại chỗ	168
7.4- Phương pháp giải trình tự của axit nucleic	170
7.4.1- Phương pháp hóa học của Maxam-Gilbert	-
7.4.2- Phương pháp enzyme sử dụng các dideoxynucleotide	172
7.4.3- Phương pháp xác định trình tự nucleotide bằng máy tự động	173
Tài liệu tham khảo	174
Mục lục	176