

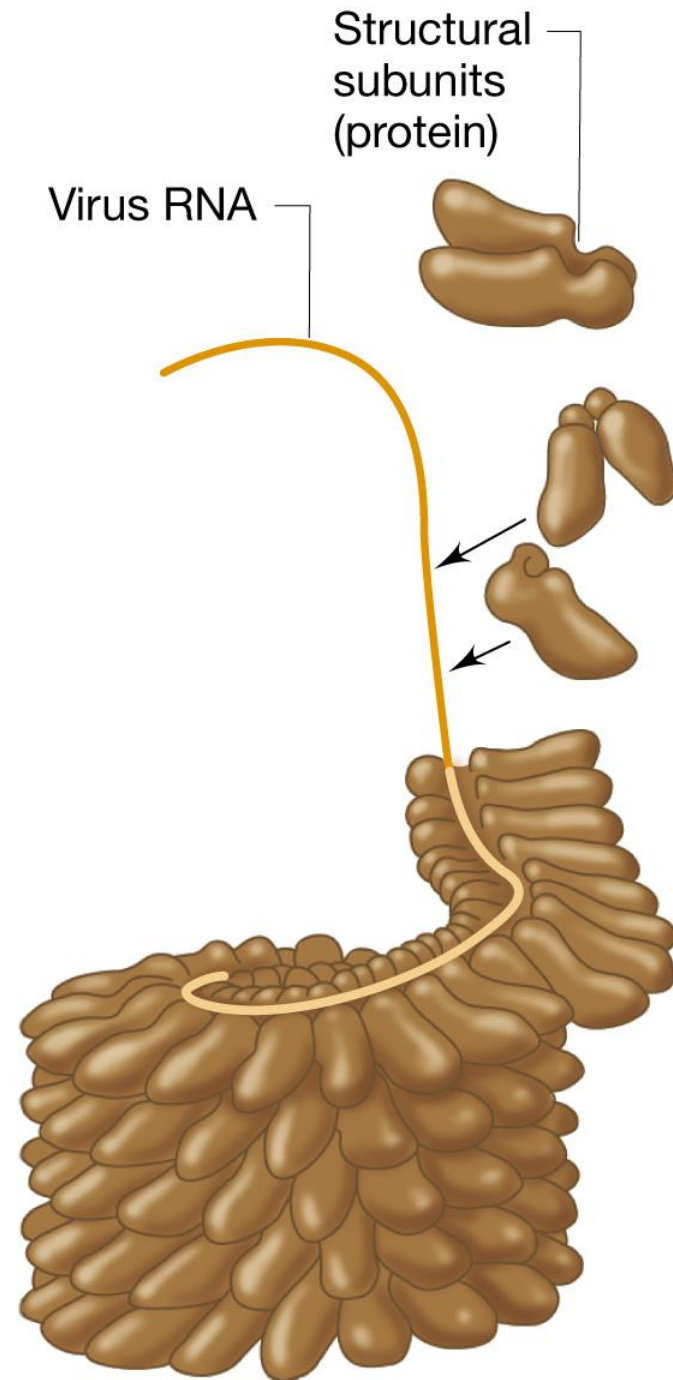
# Đặc điểm sinh học của virút

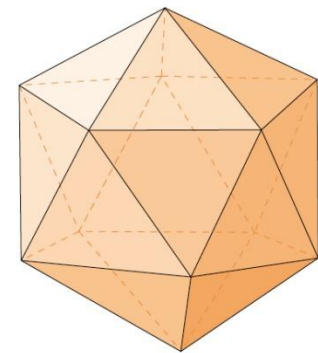
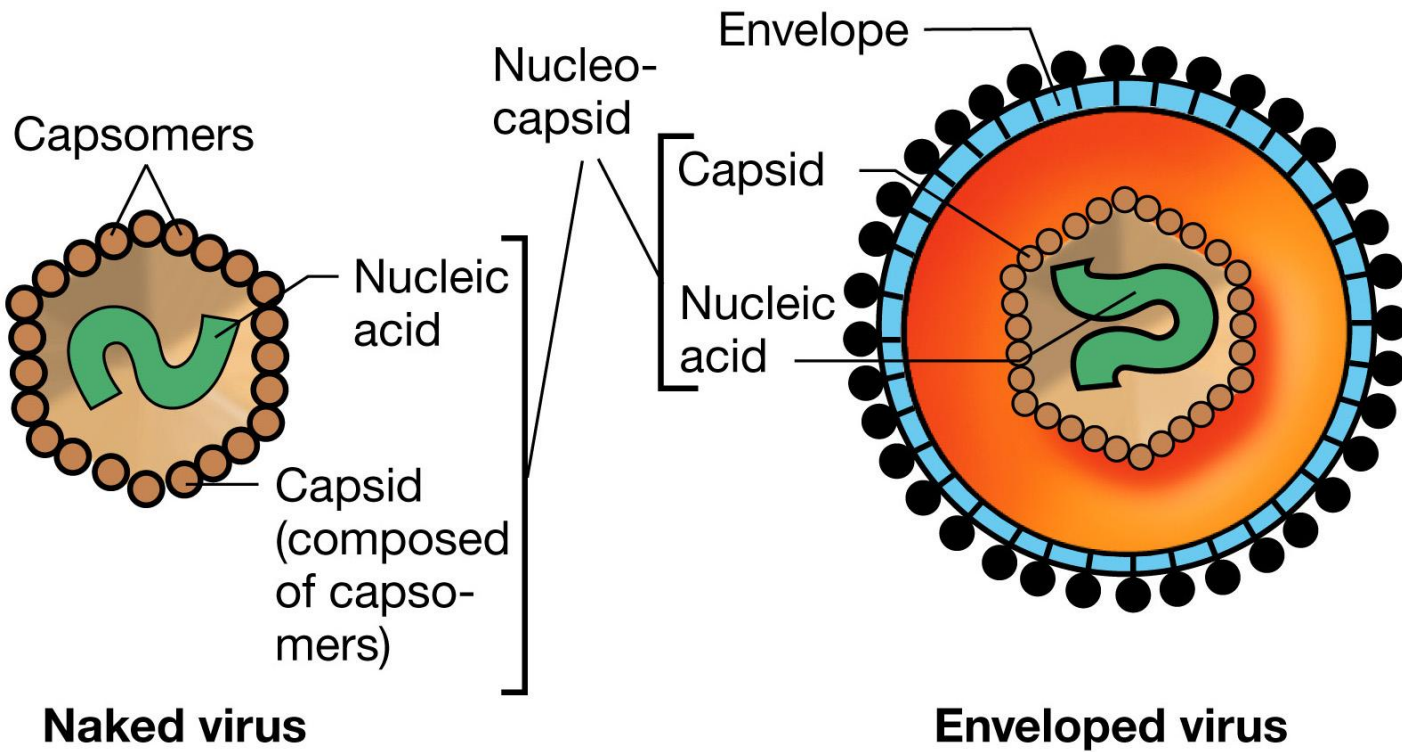
## **Đặc điểm của virút**

- **Virút: yếu tố di truyền không tế bào, gồm nucleic acid được bao bọc bởi một vỏ protein**
- **Kích thước nhỏ ( $0,02 - 0,03 \mu\text{m}$ ), chỉ nhân bản được trong tế bào chủ**
- **Ở ngoài tế bào chủ được gọi là virion**
- **Tế bào vi khuẩn, động vật, thực vật đều có thể bị nhiễm bởi các virút chuyên biệt**

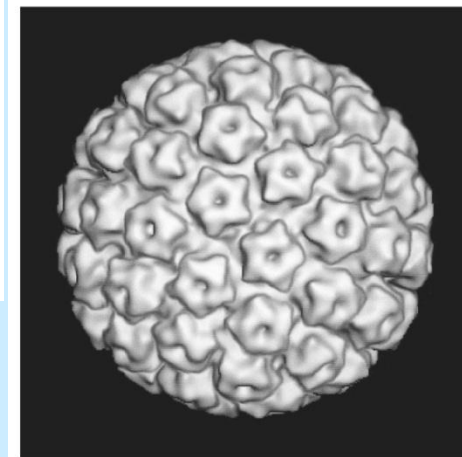
# Virion

- Bộ gen nhỏ (190kb), DNA mạch kép, DNA mạch đơn, RNA mạch kép hoặc RNA mạch đơn
- Một số virút có bộ gen được phân đoạn thành vài phân tử
- Vỏ protein (capsid): cấu tạo bởi các tiểu phần (capsomere) tạo hình chuỗi xoắn hoặc vỏ 20 mặt
- Nucleocapsid: phức hợp capsid và bộ gen
- Một số virút có cấu trúc đuôi hoặc đầu đĩnh giúp xâm nhiễm tế bào chủ
- Virút động vật còn có màng bao có nguồn gốc từ tế bào chủ





(a)

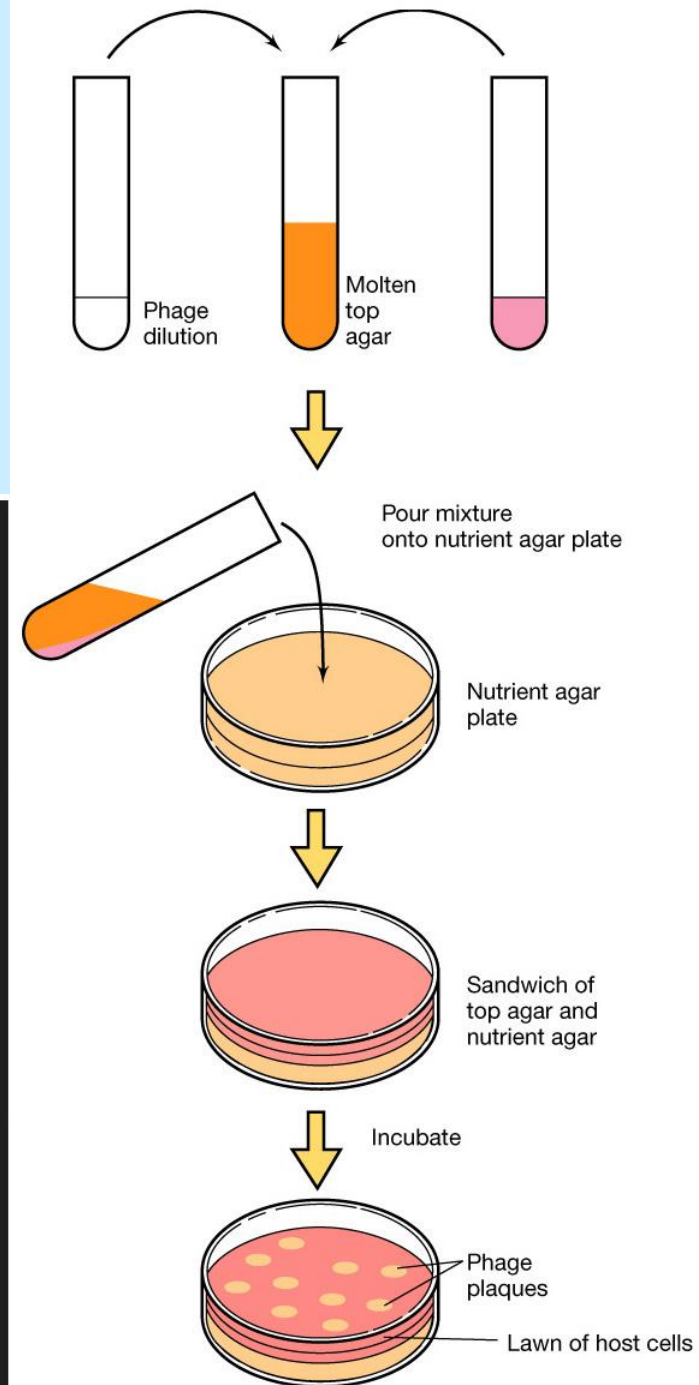


(c)

Tim Baker and Norm Olson

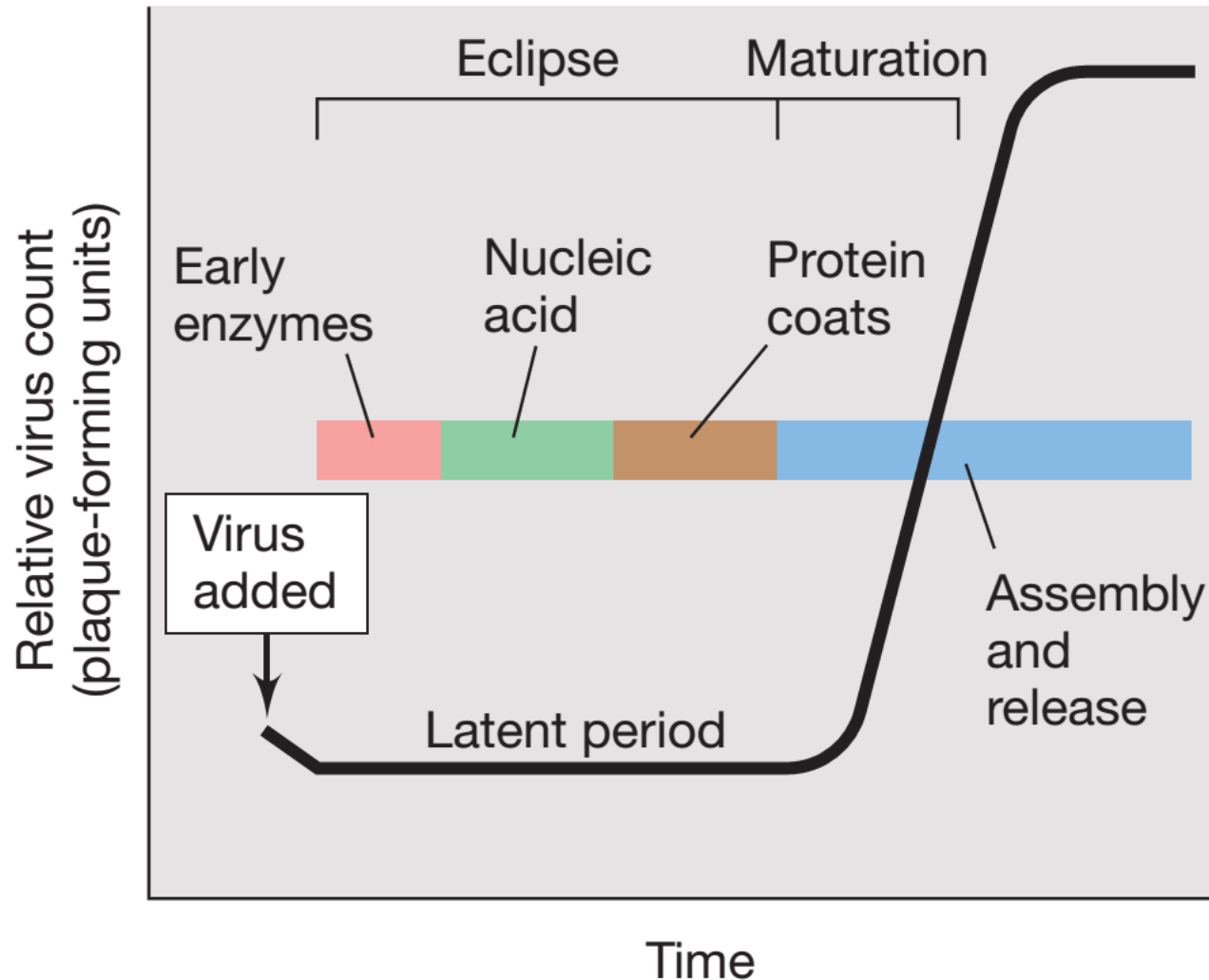
# Nuôi cấy và định lượng virút

- Nuôi cấy trong tế bào chủ
- Định lượng bằng kỹ thuật plaque (vòng tan)



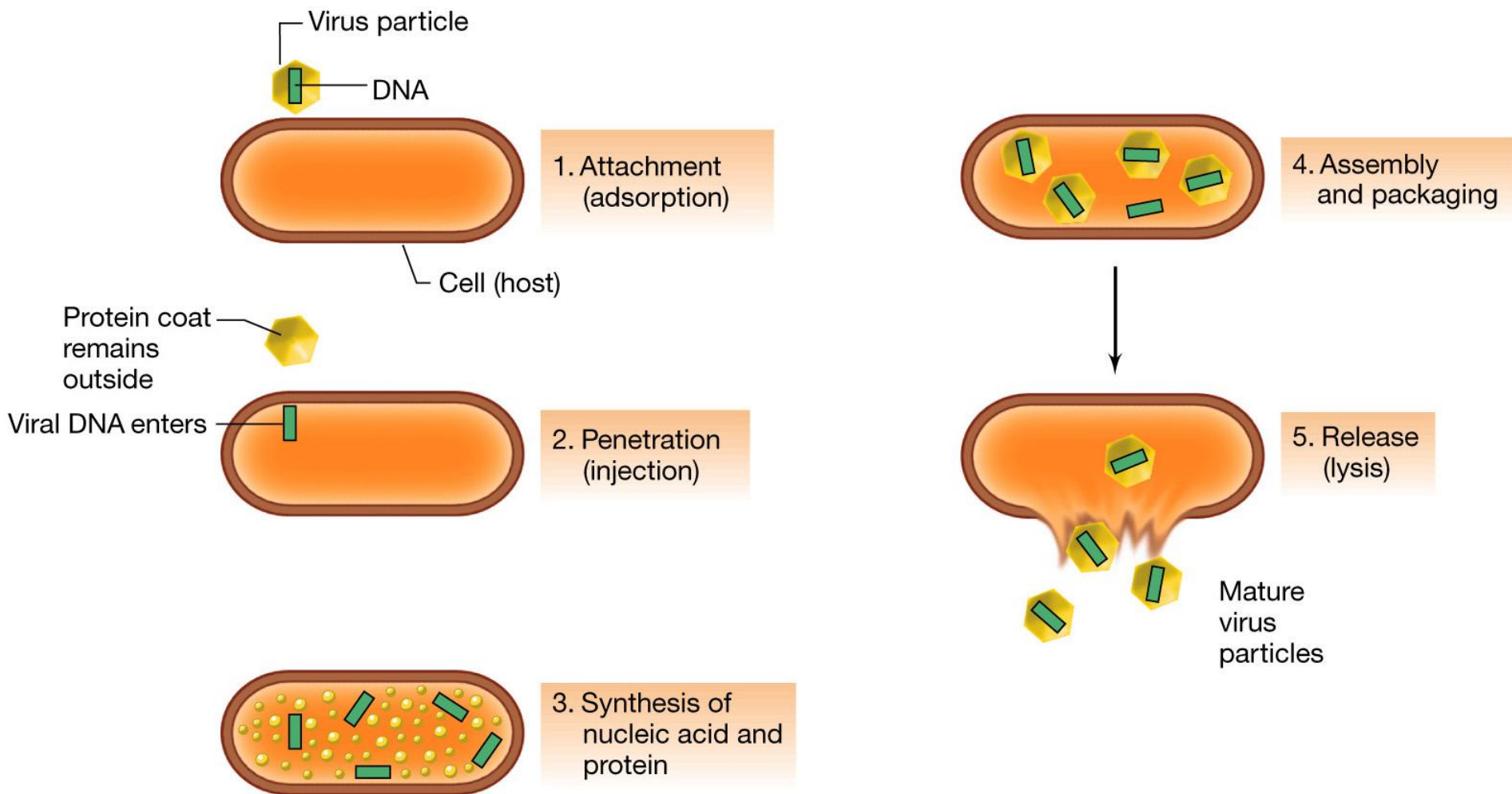
# **Sự nhân bản của virút trong tế bào chủ**

- **Các bước trong sự xâm nhiễm và nhân bản của virút trong tế bào chủ**
  - + **Nhận diện, bám dính (attachment)**
  - + **Xâm nhập (penetration)**
  - + **Biểu hiện của gen sớm**
  - + **Sao mã**
  - + **Biểu hiện gen muộn tạo các protein vỏ**
  - + **Lắp vỏ capsid (assembly) và nạp bộ gen (packaging)**
  - + **Phóng thích virút khỏi tế bào**
- **Đặc trưng tăng trưởng của virút: đường cong tăng trưởng đơn bậc (one-step-growth curve)**
  - + **Pha tiềm tàng (latent phase): thời gian có thể dài**
  - + **Pha trưởng thành (maturation phase): rất nhanh**
- **Hệ số nhân (burst size): số lượng phần tử virút được phóng thích từ 1 tế bào**
- **Thời gian của một chu kỳ nhân bản: 20-60 phút (phage), 8-40 giờ (virút động vật)**



**Figure 9.9** The one-step growth curve of virus replication.

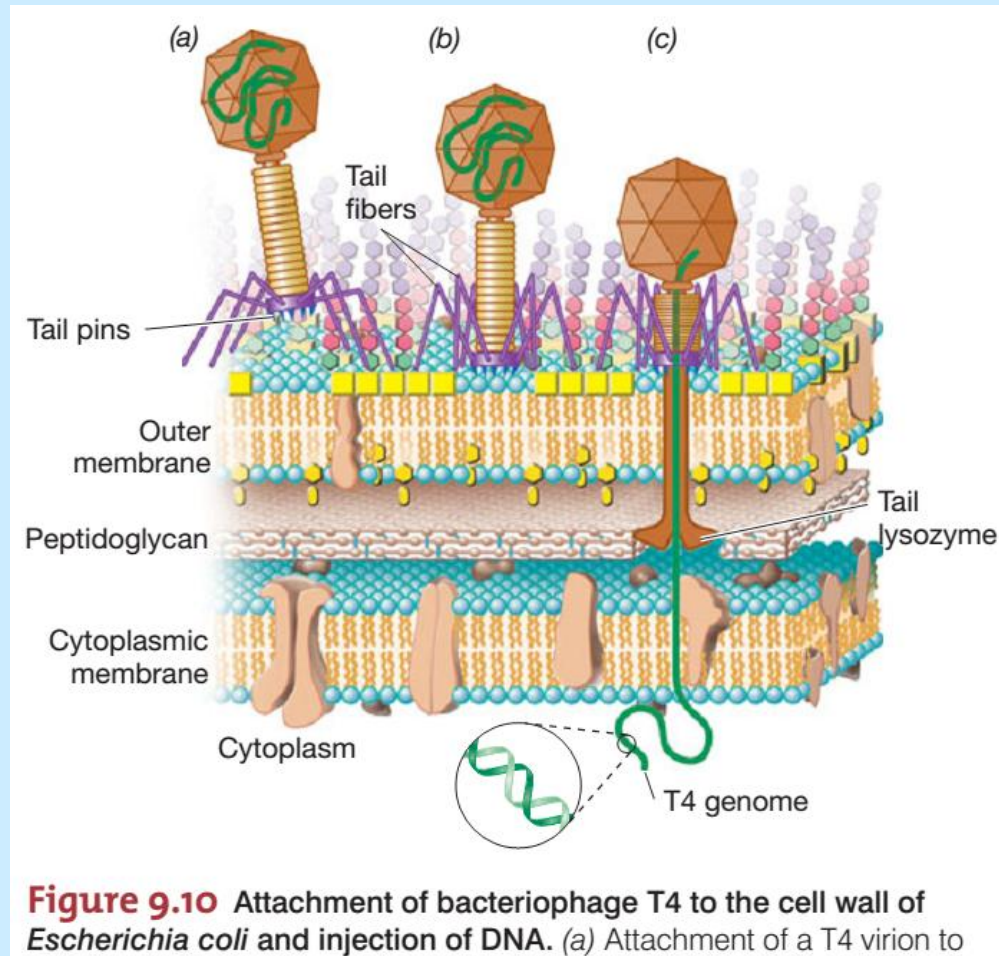






# Sự xâm nhiễm của virút vào tế bào chủ

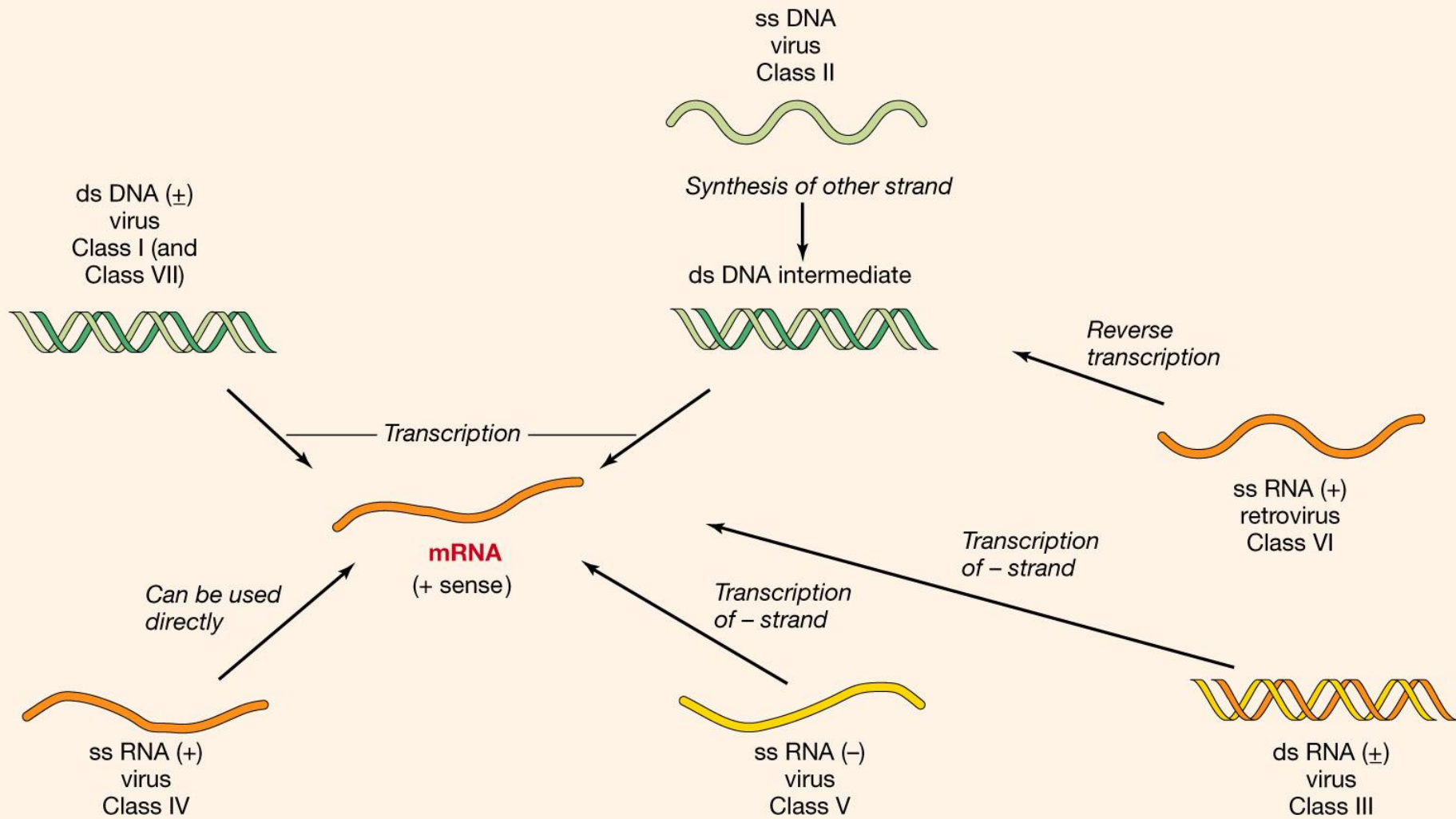
- Hai bước xâm nhiễm vào tế bào chủ:
  - + Gắn (attachement) chuyên biệt lên thụ quan bề mặt tế bào
  - + Xâm nhập (penetration): chuyển bộ gen vào tế bào chất
- Hệ thống phòng vệ của tế bào chủ: không receptor, enzyme cắt giới hạn
- Xâm nhập không chuyên biệt: ẩm bào (endocytosis)



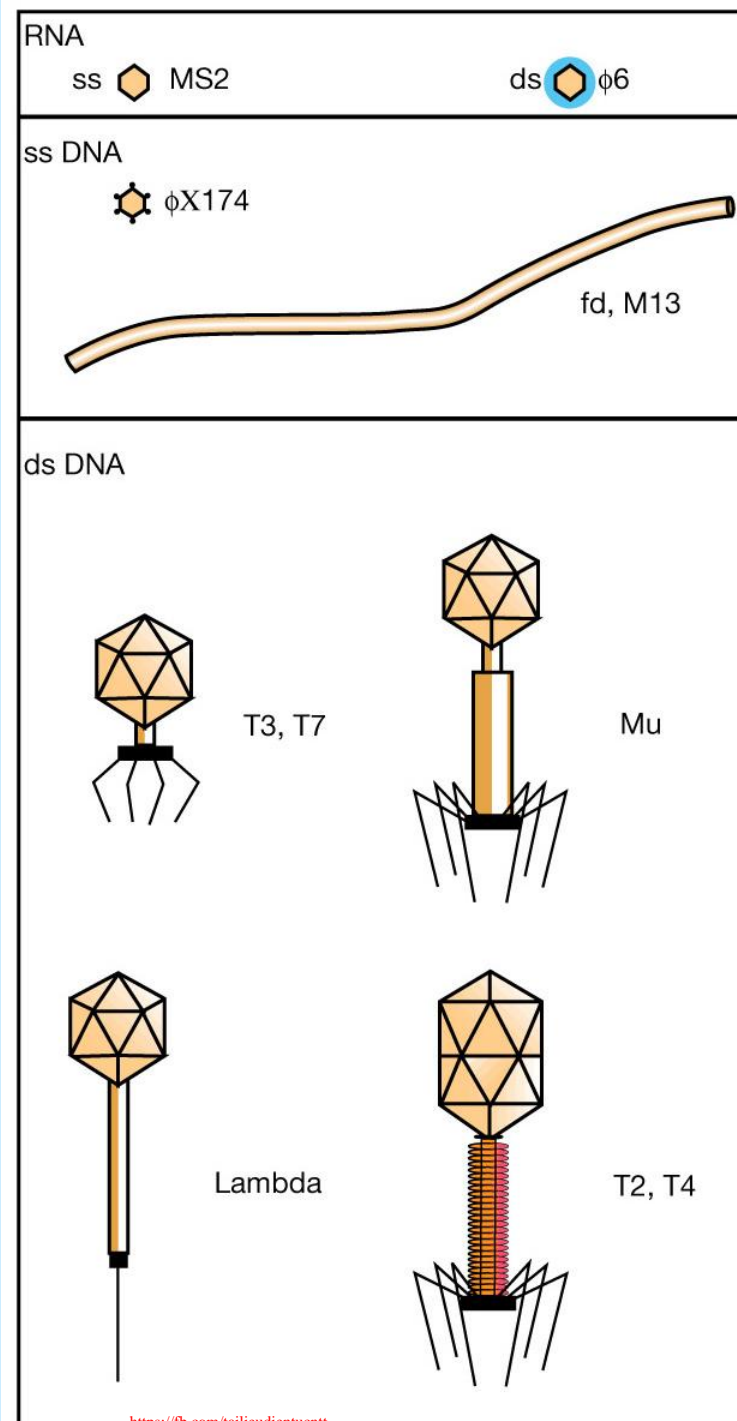
**Figure 9.10** Attachment of bacteriophage T4 to the cell wall of *Escherichia coli* and injection of DNA. (a) Attachment of a T4 virion to

# Phiên mã và dịch mã của vi rút

- **Gen sớm (early gene):** gen mã hóa các protein sớm (early protein) được biểu hiện trước khi xảy ra sự sao mã bộ gen của vi rút
- **Gen muộn (late gene):** gen mã hóa các protein muộn (late protein) được biểu hiện sau khi xảy ra sự sao mã bộ gen của vi rút
- **Phiên mã của gen sớm:** xảy ra ngay sau sự xâm nhập của vi rút vào bên trong tế bào chủ
- **Quy ước +/- của mạch nucleic acid ở vi rút**
  - **ssDNA+, ssRNA+:** khi mạch có trình tự tương ứng với mRNA
  - **ssDNA-, ssRNA-:** khi mạch có trình tự bổ sung với mRNA

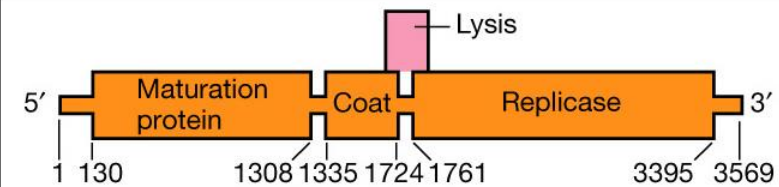


# Virus ở vi khuẩn (bacteriophage)

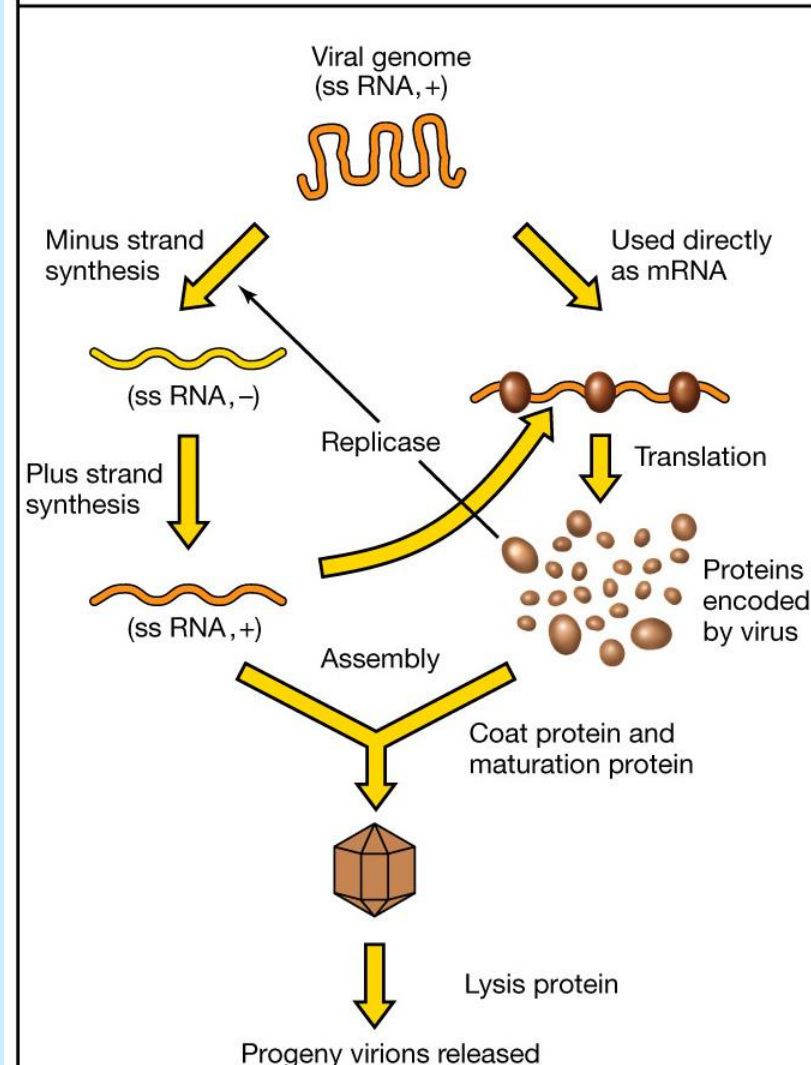


# RNA bacteriophage

- ssRNA (MS2); dsRNA ( $\phi 6$ )
- Các ssRNA ở vi khuẩn đường ruột xâm nhiễm vào tế bào chủ F+ thông qua pilus
- MS2: tế bào chủ là *E. coli*, bộ gen là ssRNA+, 3569 bases
- Bộ gen mã hóa 4 protein:
  - + RNA replicase: tổng hợp sợi ssRNA- để làm khuôn nhân bản các sợi ssRNA+
  - + Protein vỏ
  - + Protein làm tan tế bào chủ
  - + Protein trưởng thành
- Có hiện tượng gen gối đầu (overlapping gene)



(a) Genetic map of MS2

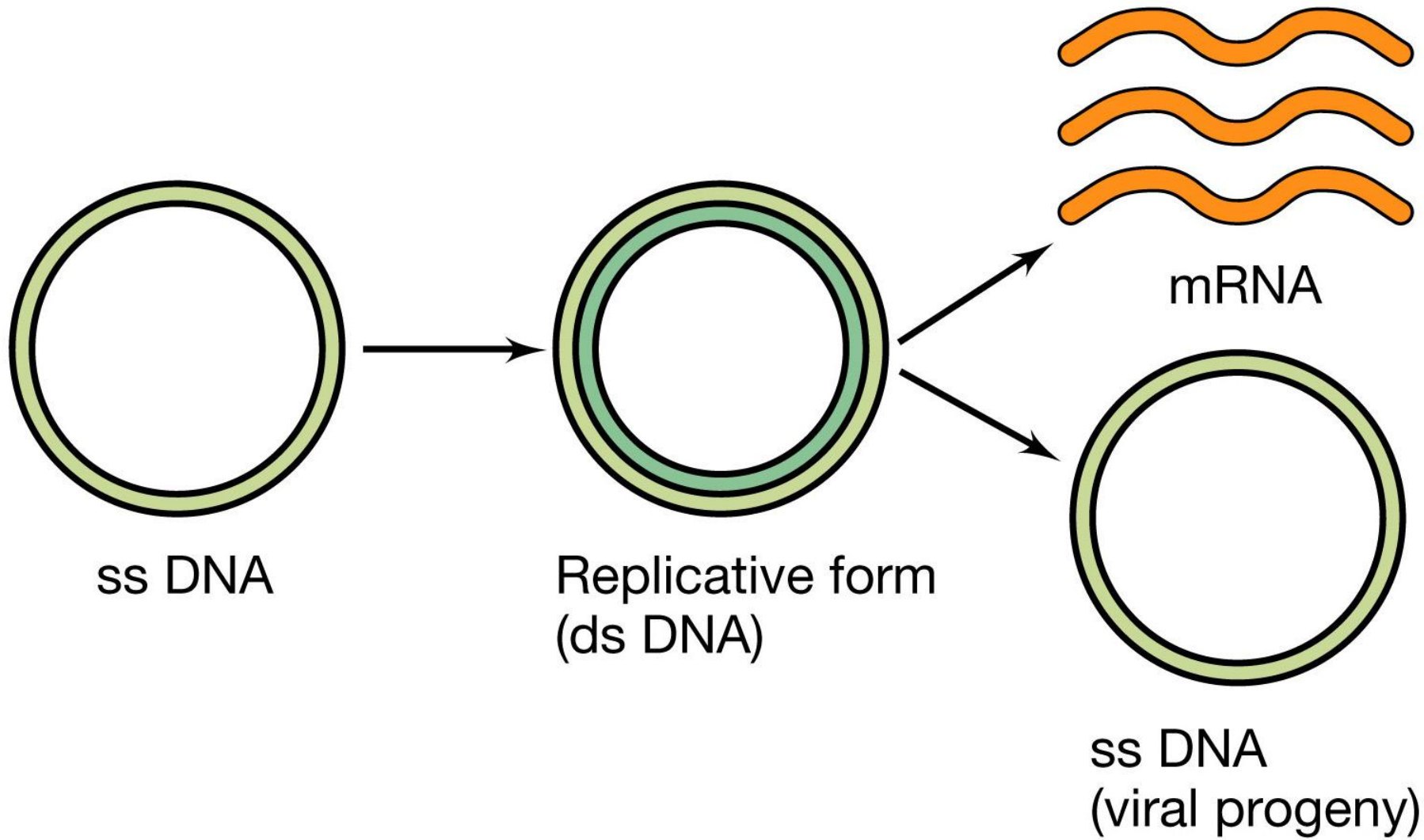


(b) Flow of events during viral multiplication

# ssDNA icosahedral bacteriophage

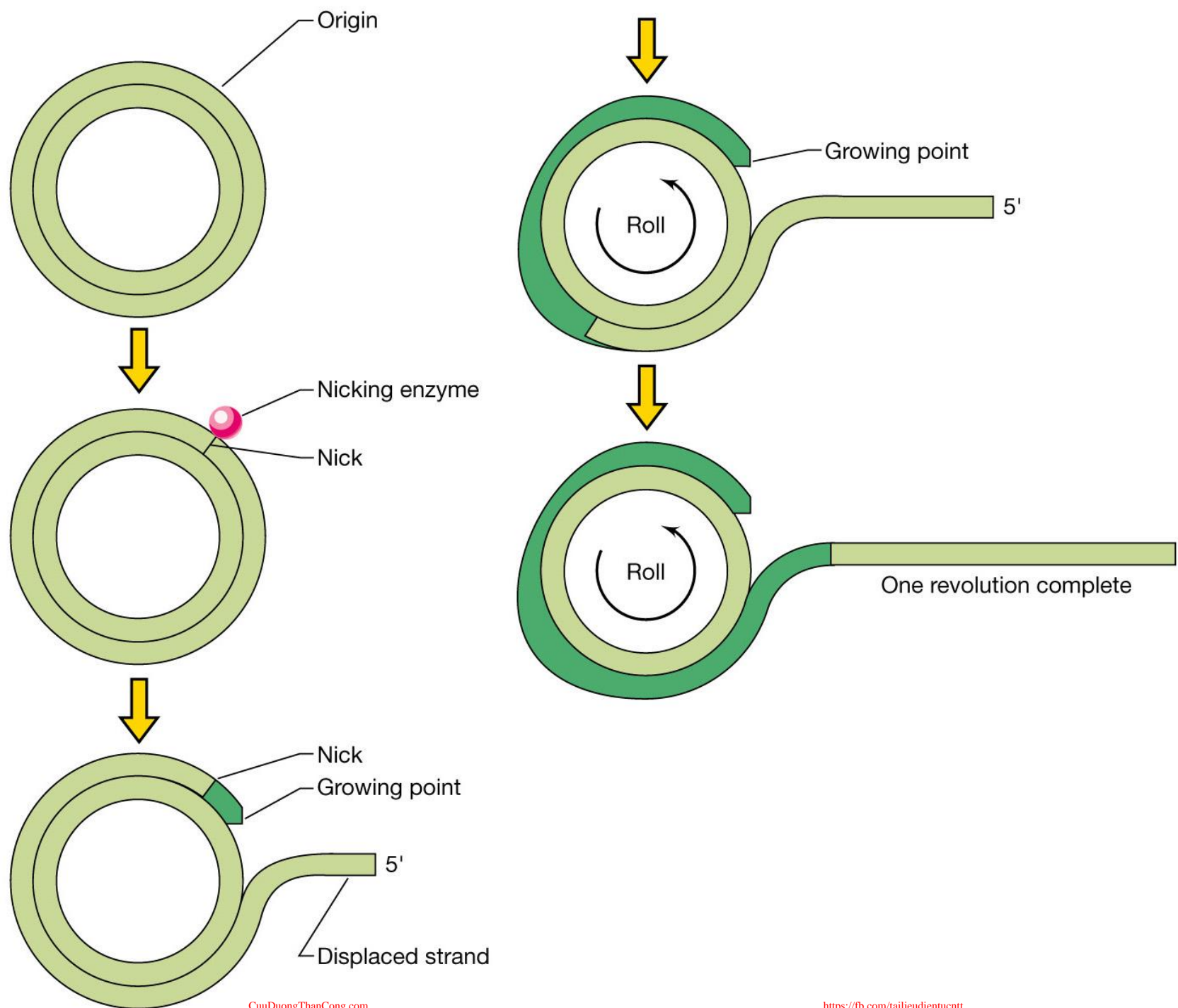
- Thực khuẩn thể hình đa diện, bộ gen ssDNA nhỏ
- $\phi$ X174 ở *E. coli*, bộ gen sợi đơn vòng ssDNA+, 5386 bases
- Có hiện tượng gen gối đầu
- Trong *E. coli*: primase, DNA polymerase, ligase và gyrase của tế bào chủ giúp sự tổng hợp dạng DNA mạch kép RF (replicative form)
- Sao mã bằng cơ chế cuộn vòng (rolling circle)
  - + Hình thành một đầu đứt đơn (nick) ở mạch + bởi protein A
  - + Tổng hợp sợi mới ở dạng thẳng bằng cách kéo dài đầu 3' của mạch + dựa trên khuôn mạch -
  - + Khi sợi mới đạt độ dài 1 bộ gen, protein cắt và nối mạch để tạo thành một bộ gen ssDNA+ mới
- Phiên mã: được thực hiện trên khuôn là sợi - của RF DNA





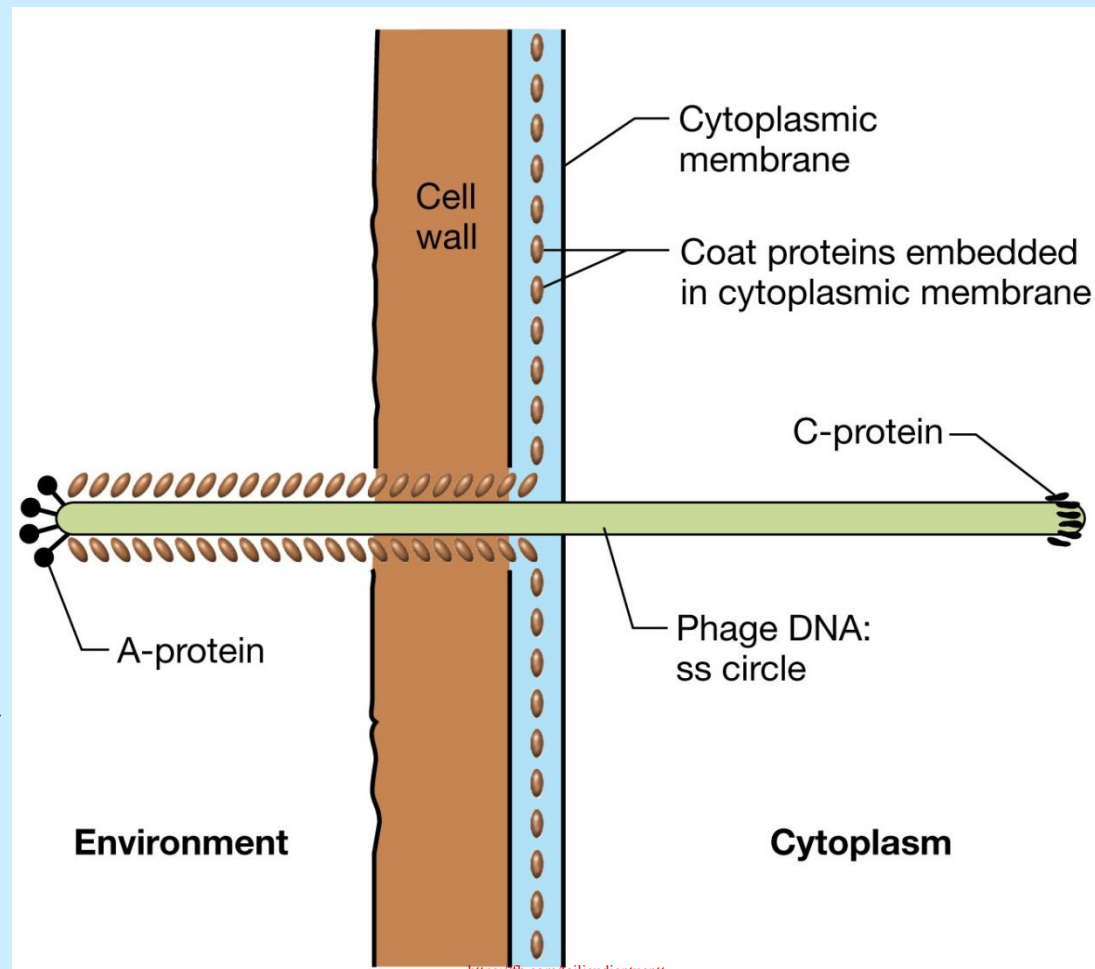
(b) Flow of events during  $\phi$ X174 replication





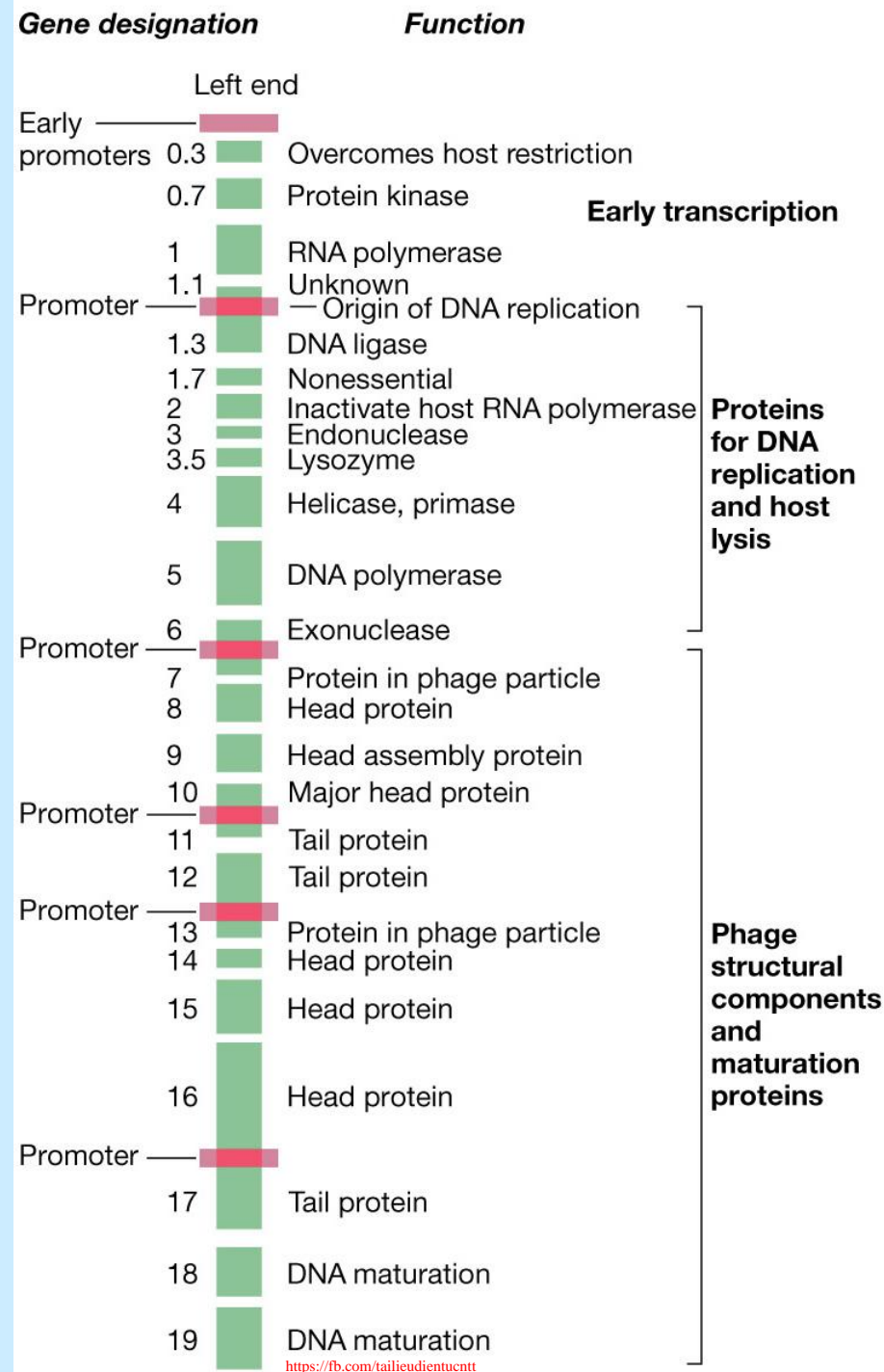
# ssDNA filamentous bacteriophage

- Thực khuẩn thể hình sợi
- M13, f1, fd ở *E. coli*
- M13: ứng dụng rộng rãi trong tạo dòng và giải trình tự gen, bộ gen sợi đơn vòng ssDNA+, 5386 bases
- Sao mã theo cơ chế tương tự  $\phi$ X174
- Virion thoát khỏi tế bào bằng phương pháp tạo chồi, không làm tan tế bào chủ (tế bào bị nhiễm không chết, chỉ bị giảm tốc độ tăng trưởng)



# dsDNA lytic bacteriophage: T7

- Dạng thực khuẩn thể có DNA thẳng mạch kép, nhân bản trong tế bào chủ bằng chu trình tan
- Bộ gen khá lớn, 39,9kb ở T7, có một trình tự lặp lại ở hai đầu
- Có hiện tượng gen gối đầu
- Các đặc điểm về nhân bản của T7:
  - + DNA của phage được bơm vào tế bào chủ từ đầu trái của bộ gen
  - + Một số gen sớm được phiên mã để ức chế hệ thống giới hạn của tế bào chủ: tạo RNA polymerase của virút, tạo hai protein bất hoạt RNA polymerase của tế bào chủ
- RNA polymerase của T7 sẽ phiên mã các gen còn lại của phage

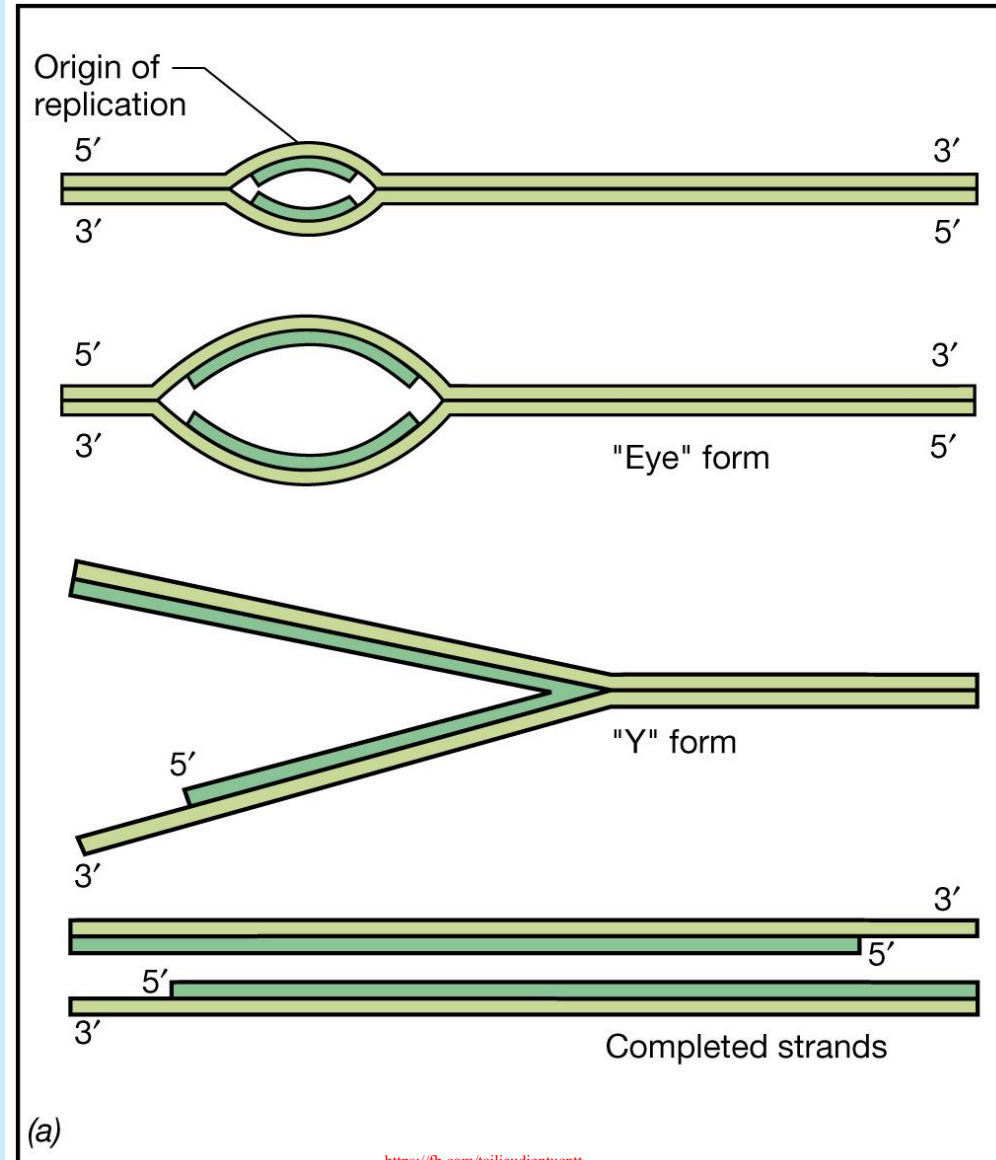


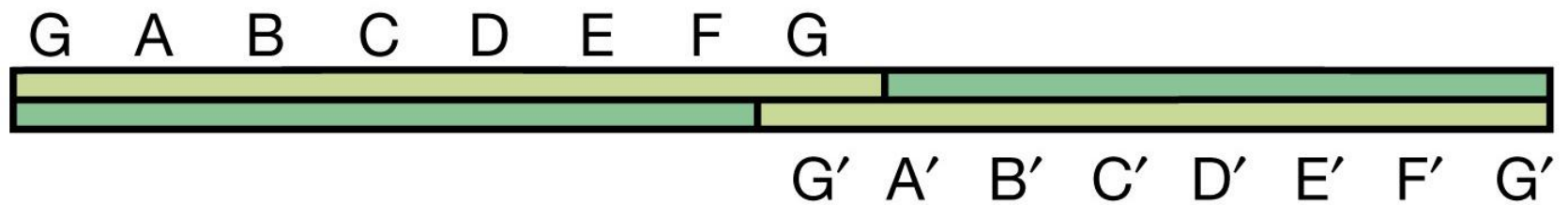
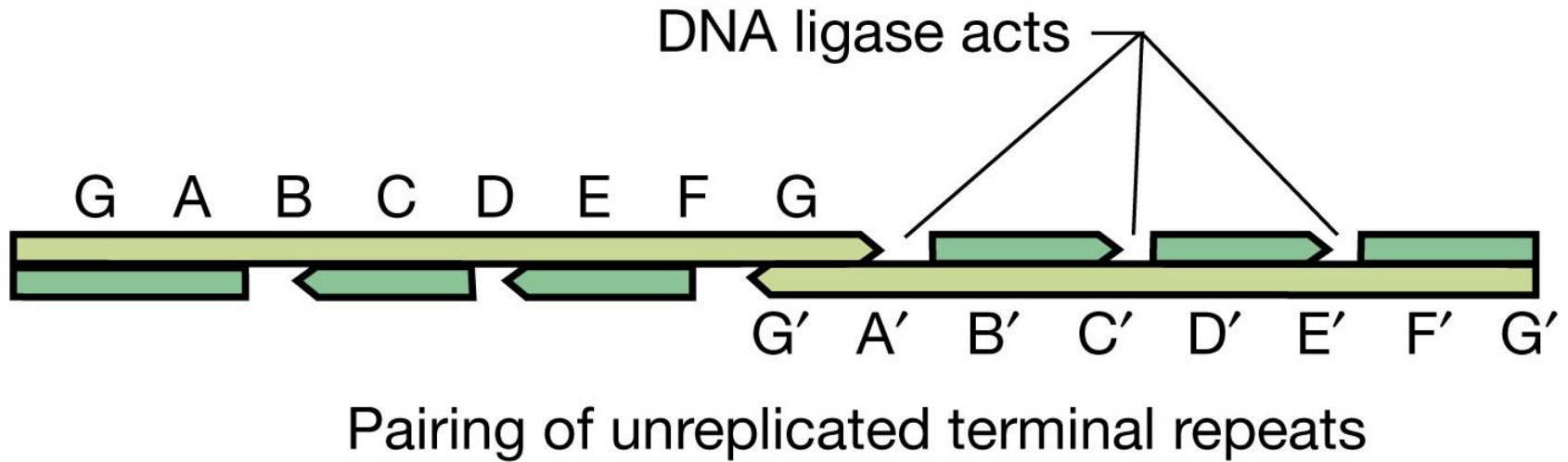
# Sự sao mã ở phage T7

+ Từ vị trí khởi đầu, sao mã theo hai chiều, hai đầu 5' mới không được sao chép hoàn toàn

+ Có sự bắt cặp bổ sung ở hai đầu của hai bộ gen để tạo bộ gen kép hoặc concatemer với nhiều bộ gen nối liên tiếp nhau

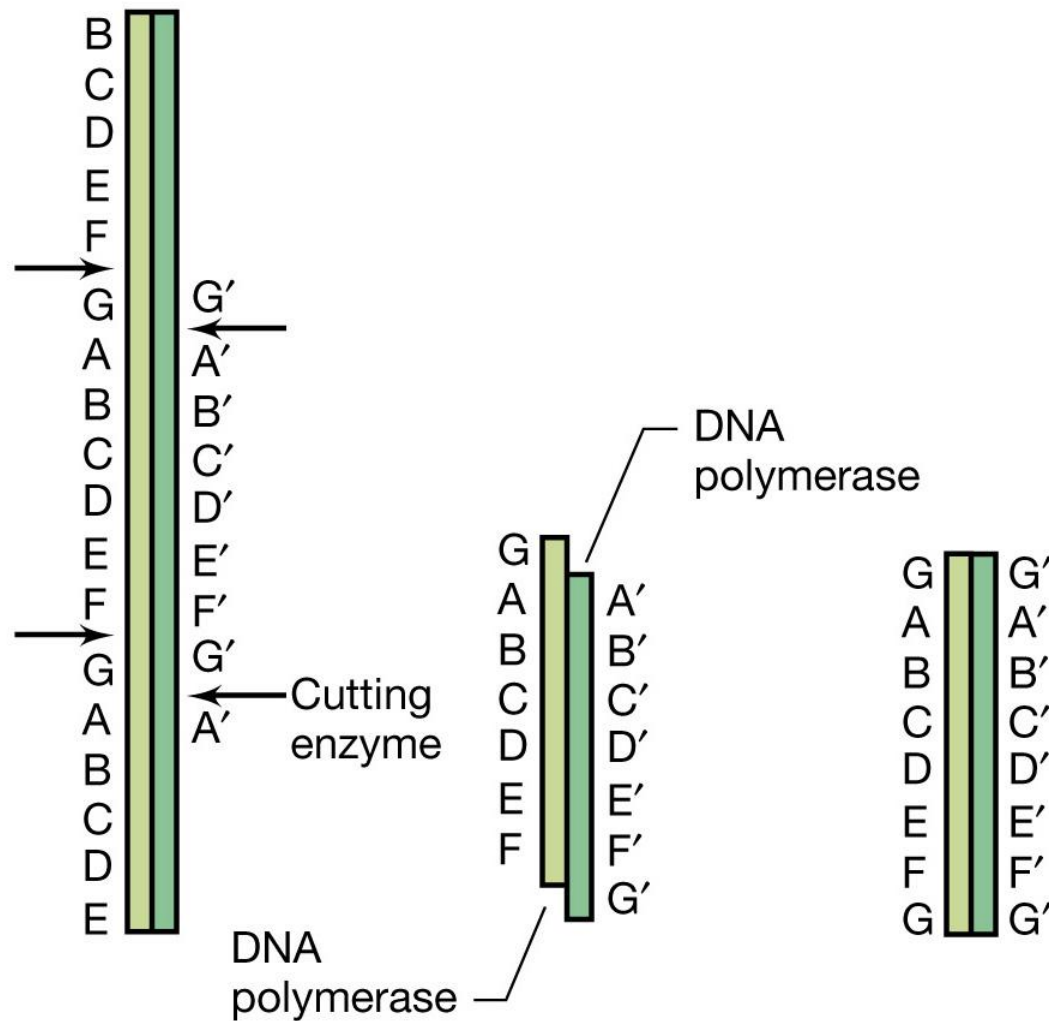
+ Endonuclease của phage cắt concatemer thành các bộ gen riêng biệt tại trình tự chuyên biệt





Joining of new and old molecules by DNA ligase, forming a concatamer

(b)



Cutting enzyme  
(arrows) makes  
single-stranded  
cuts

DNA polymerase  
completes the  
single-stranded  
cuts

Mature T7  
molecule,  
with terminal  
repeats

(c)

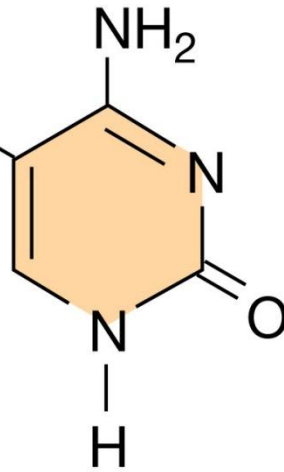
# Phage T4 và sự sao mã

- Cấu trúc virion phức tạp chứa 25 protein khác nhau
- Bộ gen dsDNA mạch thẳng, kích thước lớn  $1,7 \times 10^5$  bp mã hóa 135 protein khác nhau; hai đầu bộ gen có sự lặp lại trình tự
- Chứa 5-hydroxymethyl cytosine thay cho cytosine nên hầu như không bị giới hạn bởi enzyme của tế bào chủ; có sự glycosyl hóa ở một số 5-hydroxymethyl cytosine tại nhóm OH-
- Sao mã:
  - + Tạo concatemer nhiều bộ gen
  - + Phân tử này bị cắt không chuyên biệt vị trí
  - + Sự lắp ghép bộ gen vào phần đầu của vi rút theo cơ chế nạp đầy (head-full packaging) dẫn đến sự hiện diện của trình tự lặp lại ở hai đầu bộ gen
  - + Trình tự lặp lại ở hai đầu bộ gen của các T4 khác nhau có thể khác nhau



Site of  
glucosylation

HOH<sub>2</sub>C



Nearly  
replicated  
infecting  
DNA

Recombination

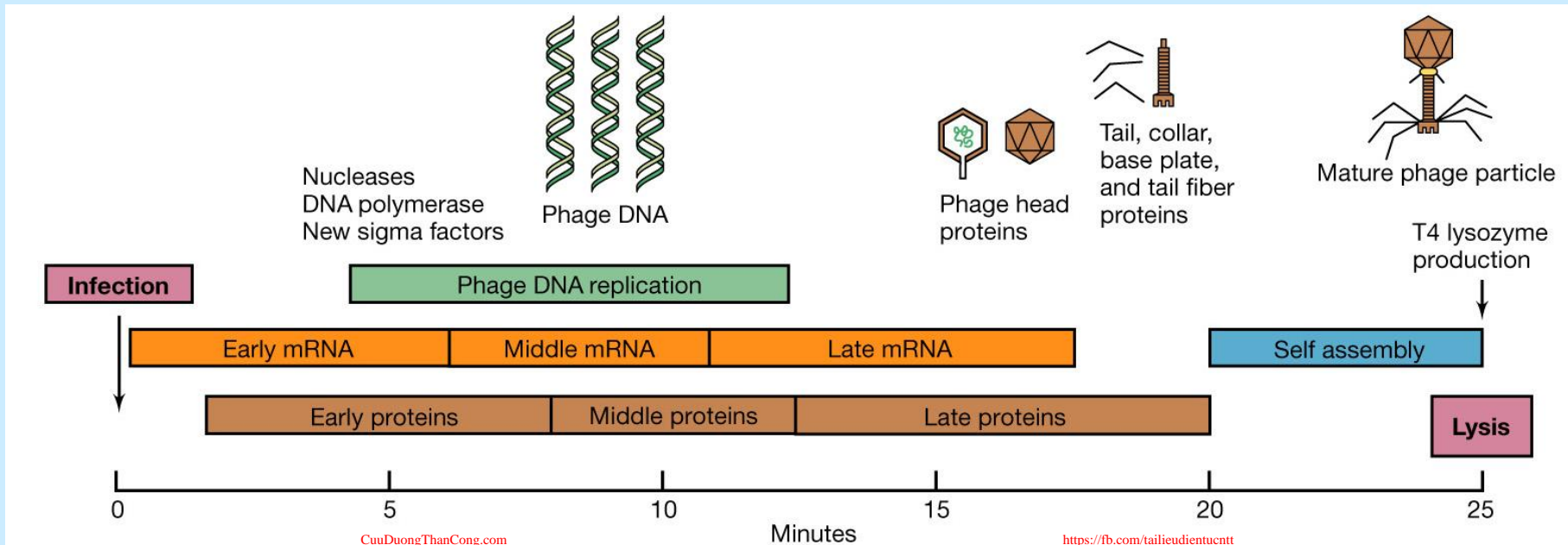
Enzyme  
acts

Long DNA  
molecules  
attacked  
by cutting  
enzyme

Molecules  
generated

# Biểu hiện các gen của phage T4

- Gen sớm, gen giữa và gen muộn
- Promoter của các gen sớm được nhận diện và gắn bởi nhân tố  $\sigma$  và RNA polymerase của tế bào chủ
- Các sản phẩm của gen sớm tạo sự biến đổi trên RNA polymerase tế bào chủ: gắn làm biến đổi cấu hình, biến đổi cộng hóa trị tiểu phần  $\alpha$  ...
- RNA polymerase bị biến đổi của tế bào chủ nhận diện và gắn vào promoter của gen giữa
- Promoter của gen muộn được nhận diện bởi một nhân tố  $\sigma$  do gen giữa mã hóa tạo điều kiện để RNA polymerase của tế bào chủ gắn vào

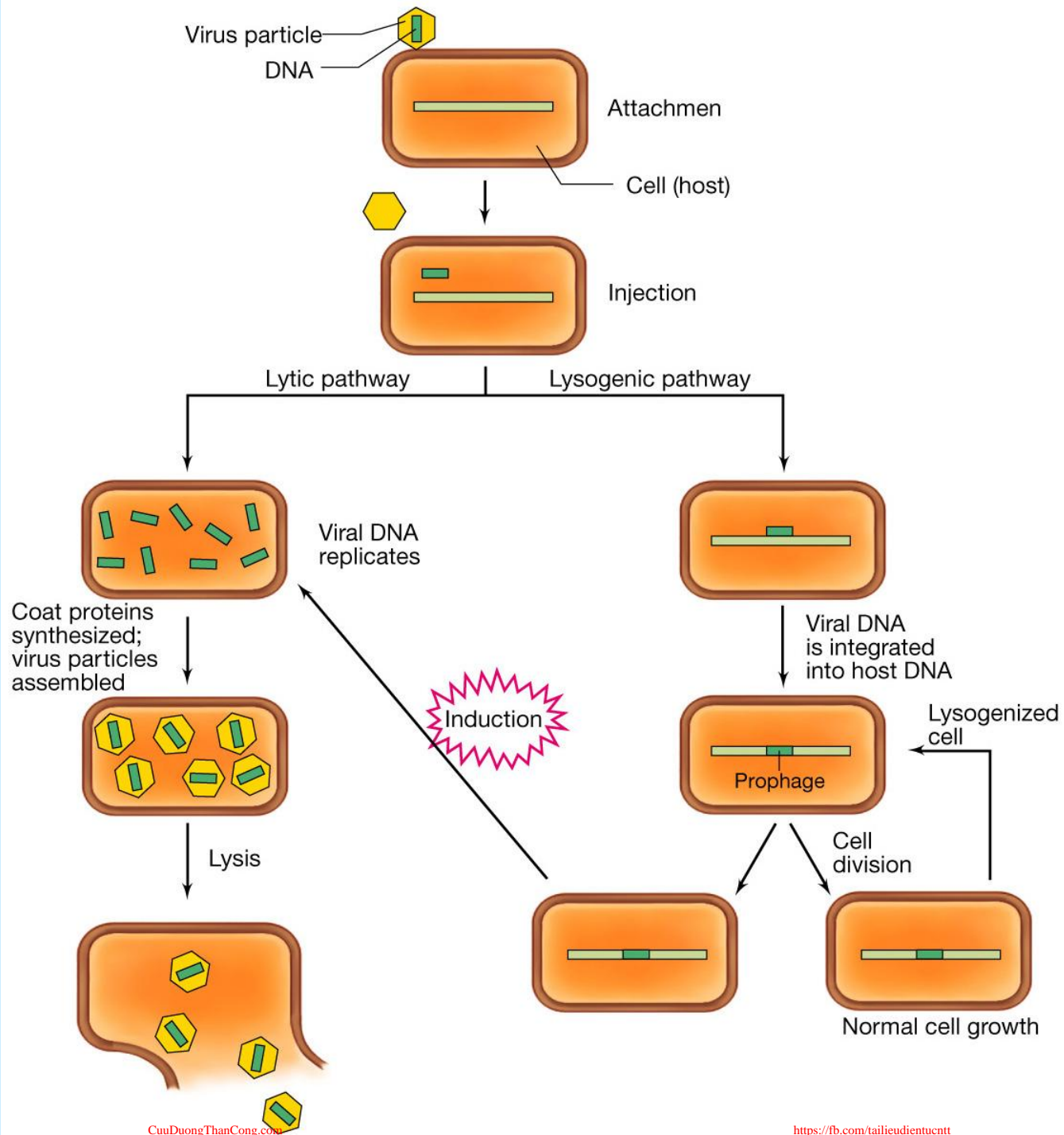


# Các đặc tính chung về sự nhân bản của virút

- Kiểm soát sự sinh tổng hợp của tế bào:
- + Tạo protein ức chế RNA polymerase của tế bào chủ (T4, T7)
- + Tạo RNA polymerase mới hoặc nhân tố sigma mới không gắn vào promoter các gen của tế bào chủ (T4)
- + Bất hoạt nhân tố dịch mã (ở poliovirus)
- + Phân hủy DNA tế bào chủ (T4)
  
- Gen virút được biểu hiện theo trật tự thời gian:
- + Gen sớm (early gene) mã hóa RNA polymerase, nhân tố sigma của virút hoặc phiên mã bởi RNA polymerase của tế bào chủ
- + Gen giữa (middle gene) và gen muộn (late gene) liên quan đến sự sao chép bộ gen, tổng hợp capsomere, lắp ghép

# Phage ôn hòa

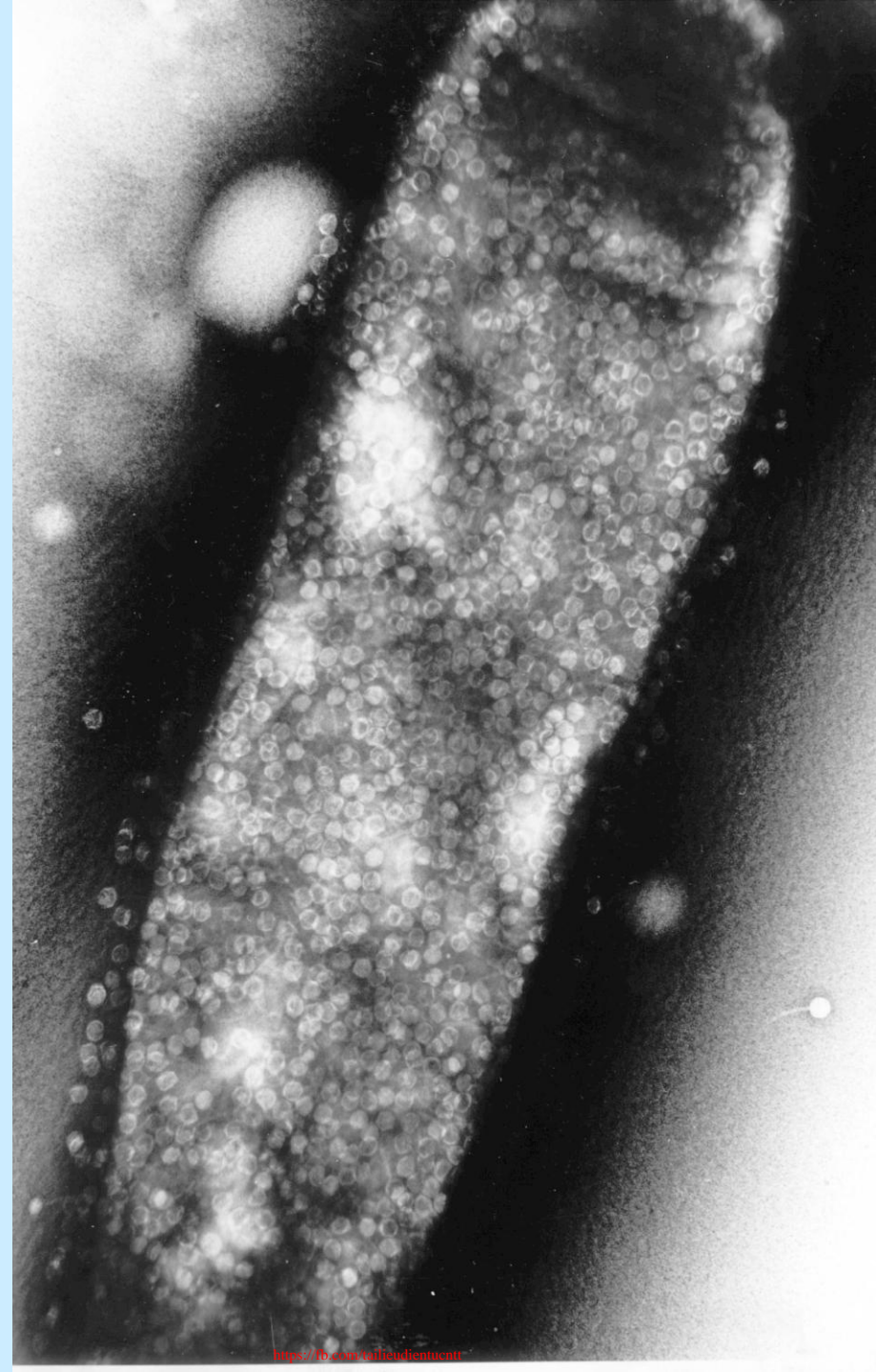
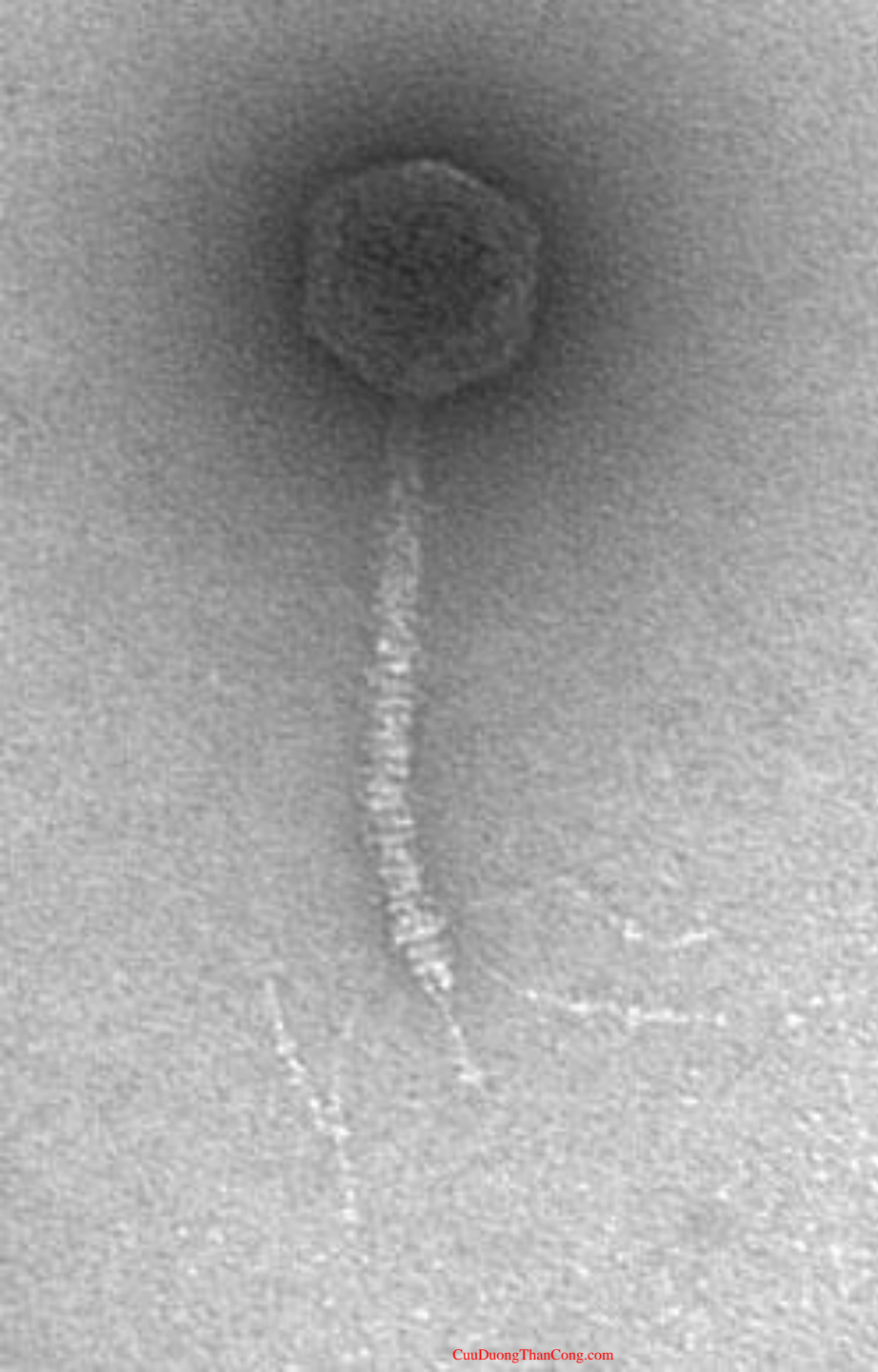
- Hai chu trình nhân bản trong tế bào
- Chu trình tan, ác tính (lytic, virulent):
  - + Kiểm soát bộ máy sinh tổng hợp của tế bào chủ, ngăn cản sự sinh tổng hợp protein của tế bào
  - + Sao chép bộ gen của virút
  - + Tổng hợp protein vỏ
  - + Lắp ghép thành những phần tử virút mới
  - + Phóng thích ra khỏi tế bào.
- Chu trình tiềm tan (lysogenic):
  - + Sát nhập bộ gen virút vào bộ gen của tế bào chủ
  - + Sao chép đồng thời với bộ gen của tế bào chủ
  - + Hoạt hóa sự thể hiện của các gen khởi mào chu trình tan
  - + Chuyển qua chu trình tan



# Đặc điểm sinh học của phage ôn hòa $\lambda$

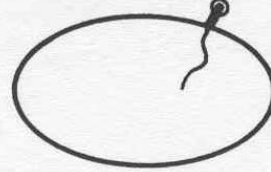
- Có hình dạng tương tự phage T
- Bộ gen DNA thẳng mạch kép có hai đầu 5' mạch đơn bổ sung nhau dài 12 nu (trình tự *cos*)
- Trong tế bào chủ bộ gen phage  $\lambda$  đóng vòng nhờ hai đầu bổ sung, kích thước 48,5kp
- Xâm nhiễm và sao mã:
  - + Sợi đuôi của  $\lambda$  nhận diện và gắn vào LamB trên bề mặt tế bào
  - + Bộ gen của  $\lambda$  đóng vòng
  - + Biểu hiện gen sớm và nhân bản bộ gen theo cơ chế  $\theta$
- Chu trình tan (lytic cycle):
  - + DNA bộ gen được nhân bản hữu hiệu hơn bằng cơ chế cuộn vòng tạo concatemer, nhiều bản sao bộ gen được tạo ra bởi enzyme cắt
  - + Các gen muộn được biểu hiện và bộ gen được lắp ghép vào đầu  $\lambda$
- Chu trình tiềm tan (lysogenic cycle): DNA bộ gen được sát nhập vào bộ gen tế bào chủ





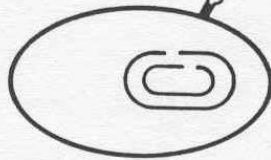


Adsorption,  
Penetration of linear,  
doublestranded  $\lambda$  genome



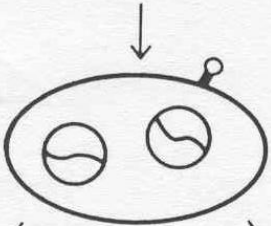
receptor: Lam B

DNA circularization



DNA ligase  
topoisomerase (gyrase)

Early expression and DNA  
replication ( $\theta$ -mechanism)



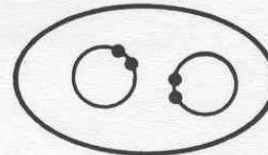
Lytic response

Lysogenic response

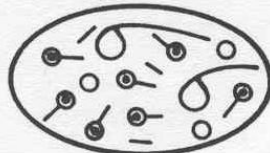
Late expression and DNA  
replication ( $\sigma$ -mechanism)  
Early expression stopped  
by cro repressor



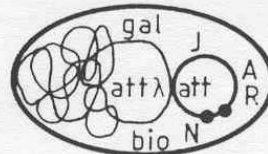
Expression stopped  
by cI repressor



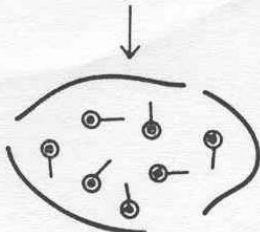
Phage morphogenesis



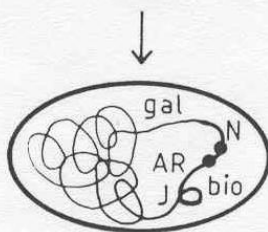
Int-promoted integration  
of prophage into the  
host chromosome

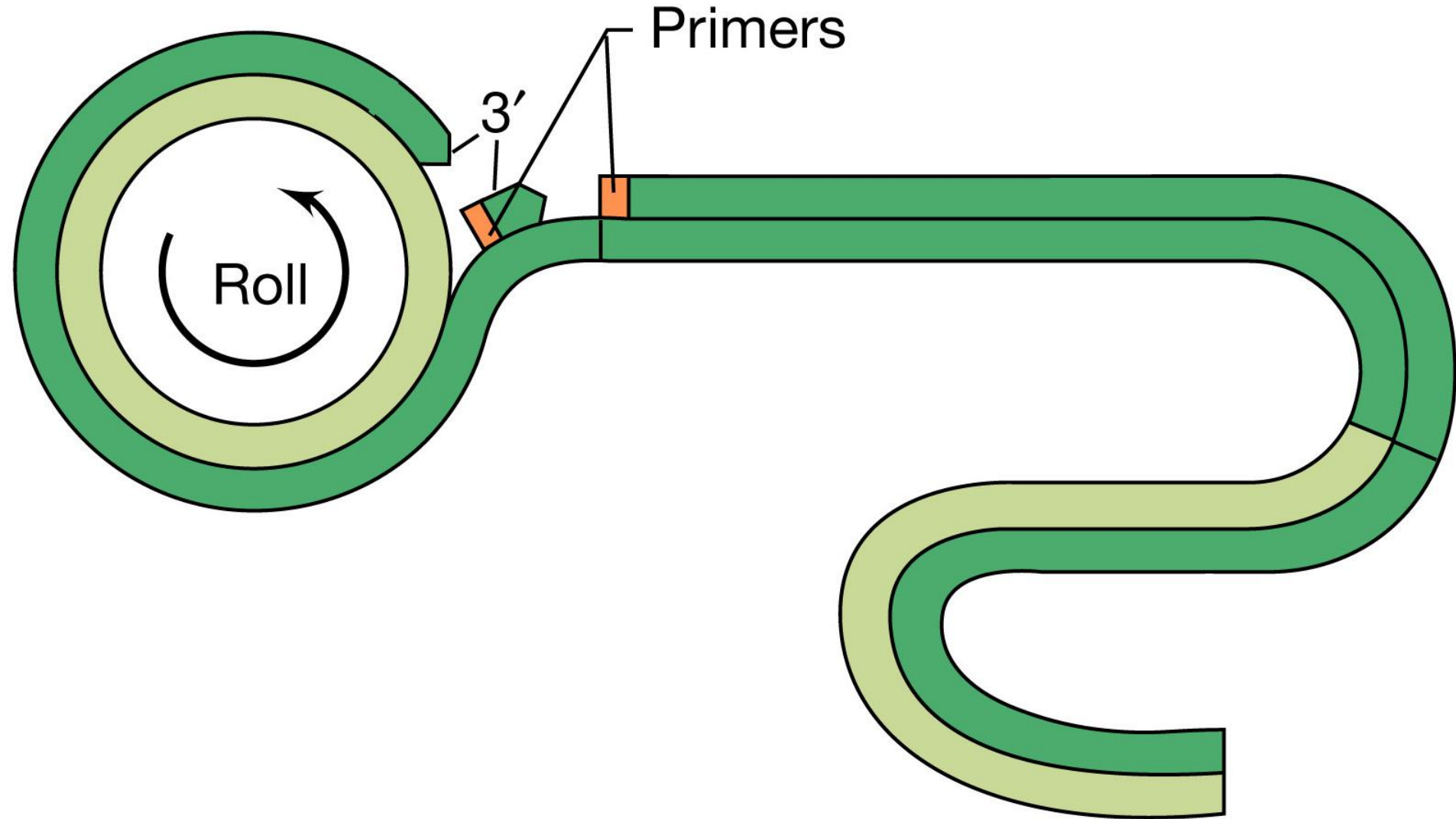


Phage liberation  
by cell lysis

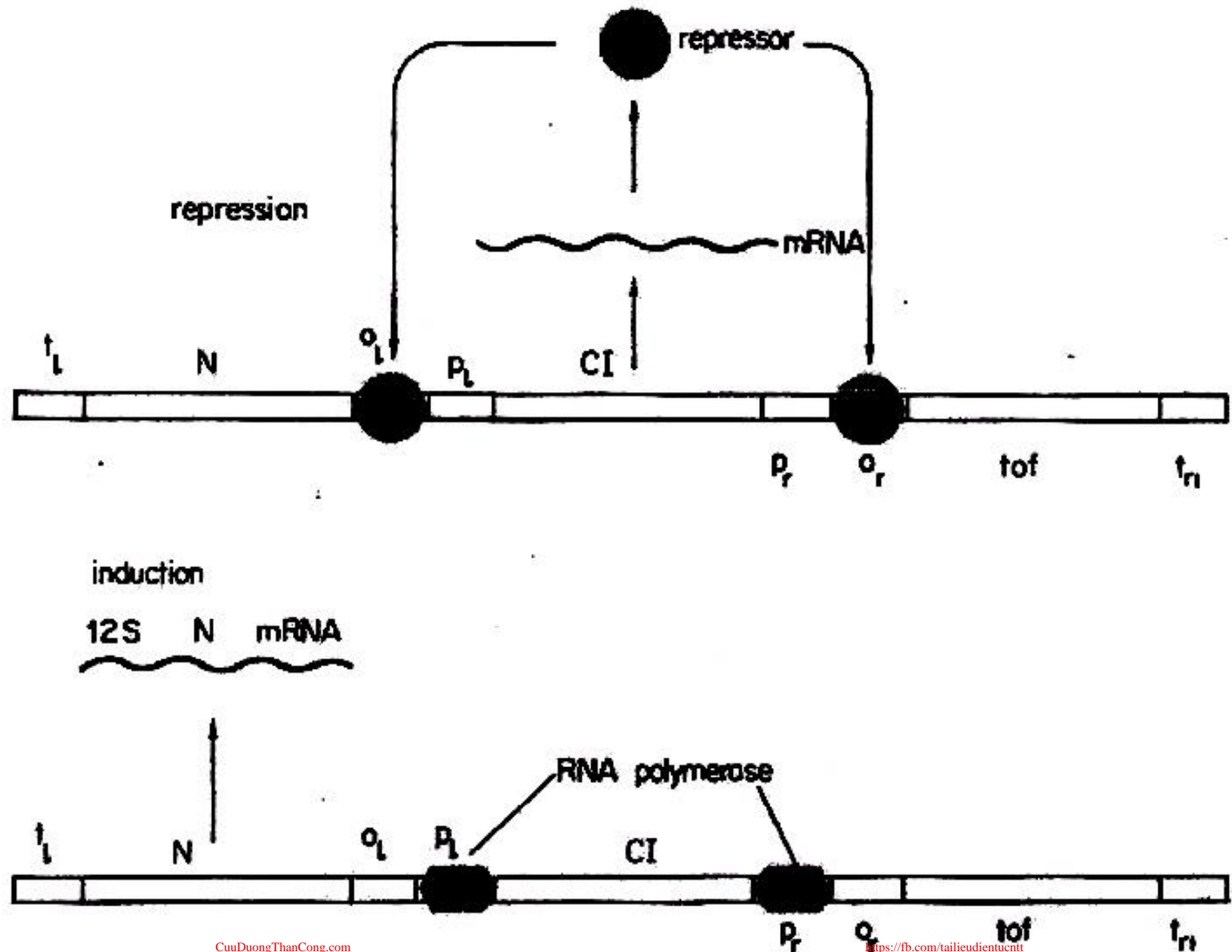


$\lambda$ -lysogenic  
derivative



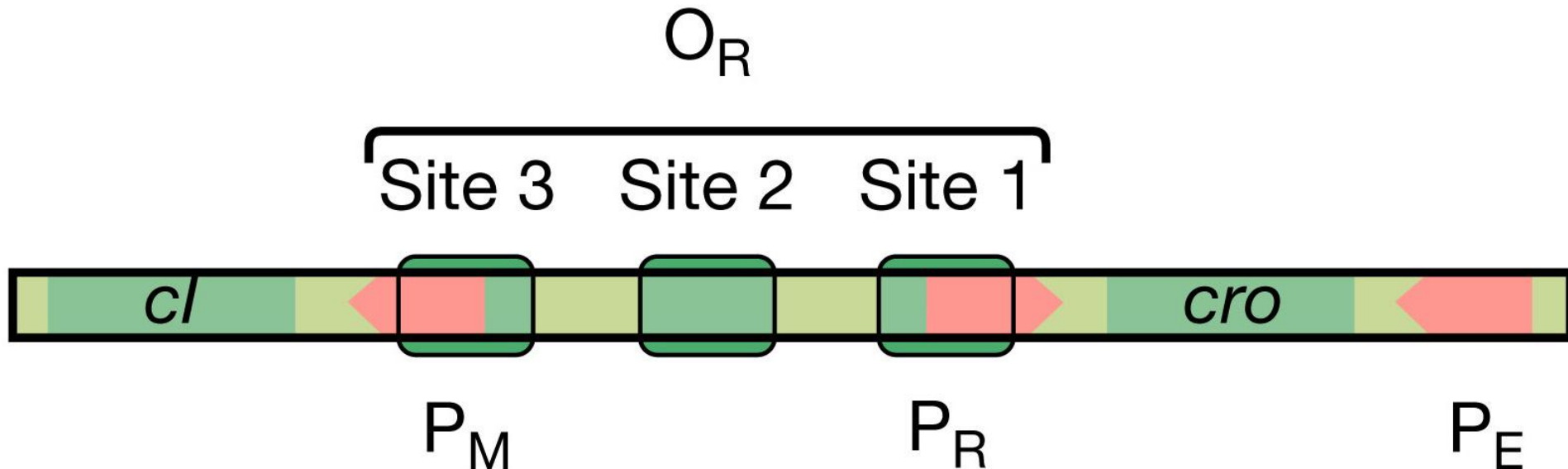


# Kiểm soát sự biểu hiện gen của phage $\lambda$ bởi cI trong *E. coli*



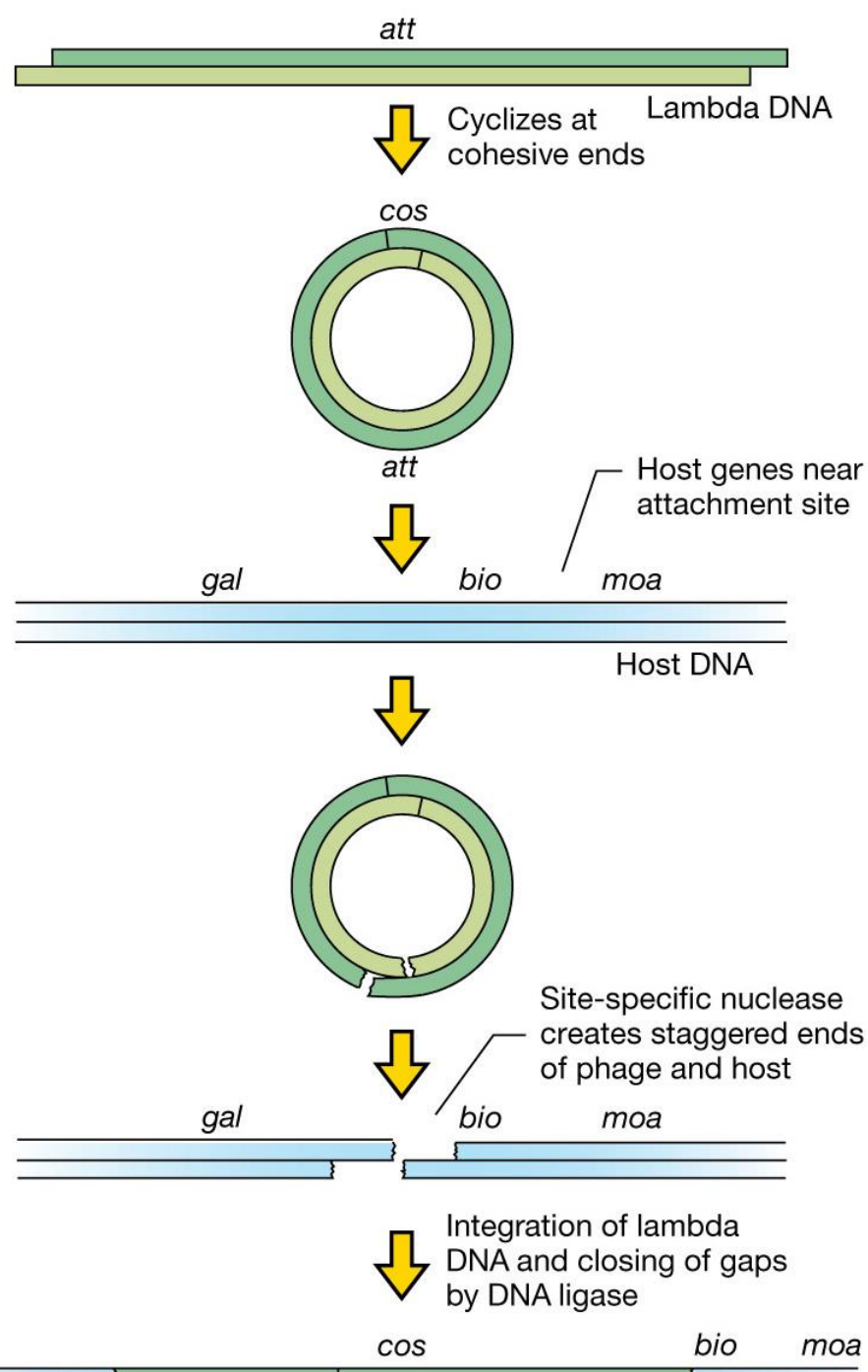
# Điều hòa sự biểu hiện gen ở phage $\lambda$ : chu trình tiềm tan

- $cI$  là repressor khi được tạo ra sẽ gắn vào  $O_R$  và  $O_L$  ức chế sự biểu hiện của toàn bộ các gen của  $\lambda$ , phage đi vào chu trình tiềm tan
- Promoter  $P_E$  cần được hoạt hóa bởi phức hợp protein  $cII$  và  $cIII$  mới cho phép sự phiên mã của  $cI$

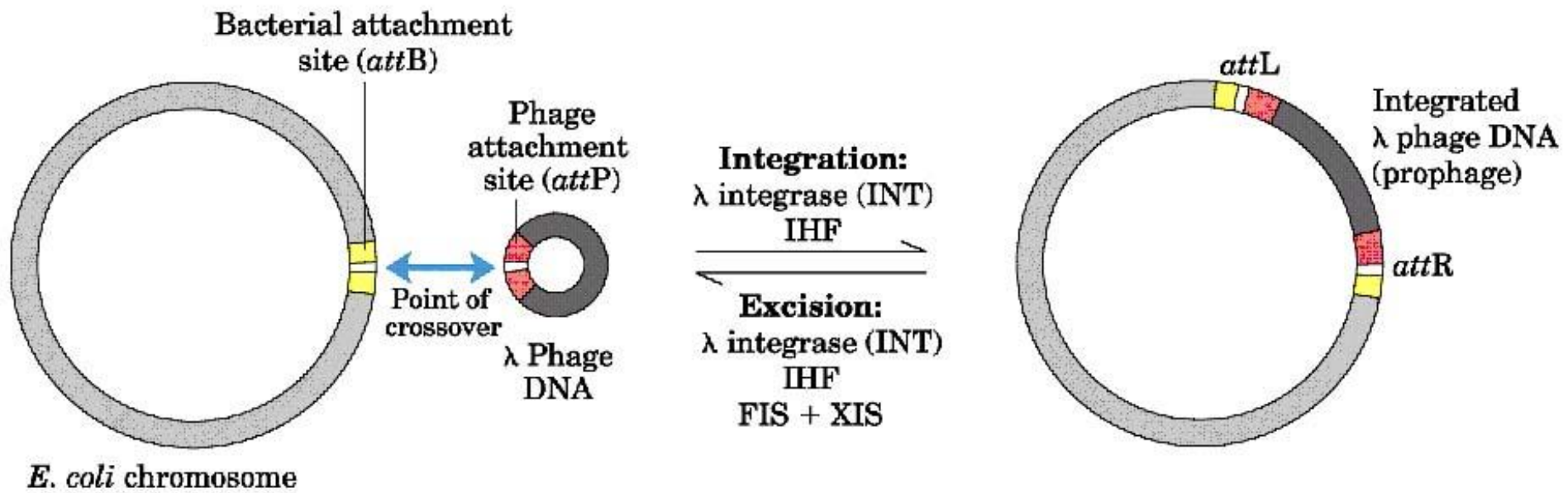


# **Sự sát nhập vào và tách ra của $\lambda$ DNA ở bộ gen tế bào chủ**

- Sự sát nhập  $\lambda$ DNA vào DNA bộ gen của tế bào chủ:
  - + Cần integrase được mã hóa bởi gen *int*
  - + Gen *int* được kiểm soát bởi một promoter chỉ hoạt động khi được hoạt hóa bởi cII
  - + Integrase nhận diện, cắt trình tự chuyên biệt là att (attachment site) hiện diện trên  $\lambda$ DNA và trên DNA *E. coli*, sát nhập  $\lambda$ DNA vào bộ gen
- Sự tách  $\lambda$ DNA khỏi DNA vi khuẩn:
  - + Excisionase do gen *xis* mã hóa và integrase cần cho sự tách  $\lambda$ DNA khỏi bộ gen
  - + Các tác nhân gây tổn thương DNA sẽ cảm ứng recombinase A trở nên có hoạt tính protease đối với  $\lambda$  repressor (cI) do vậy phage  $\lambda$  không thể đi vào chu trình tiềm tan nữa

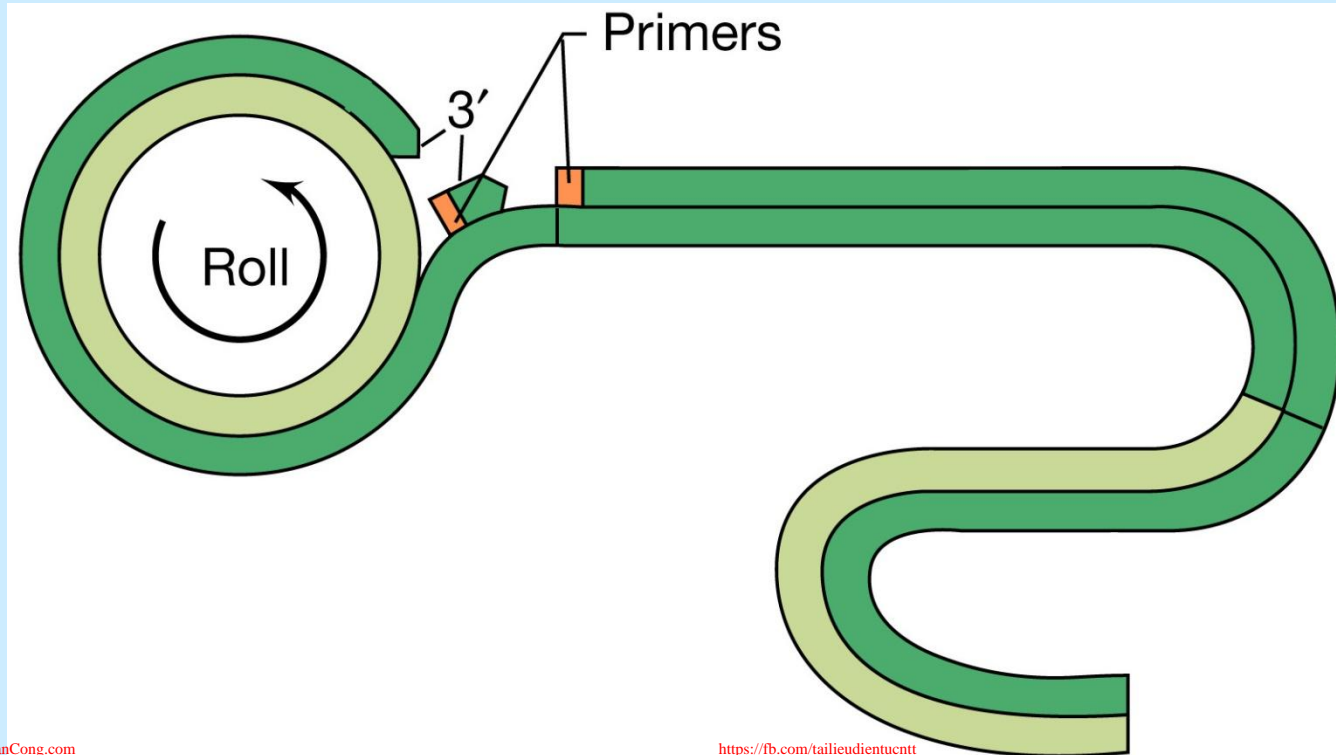






Sát nhập và  
tách  $\lambda$  khỏi tế  
bào *E. coli*

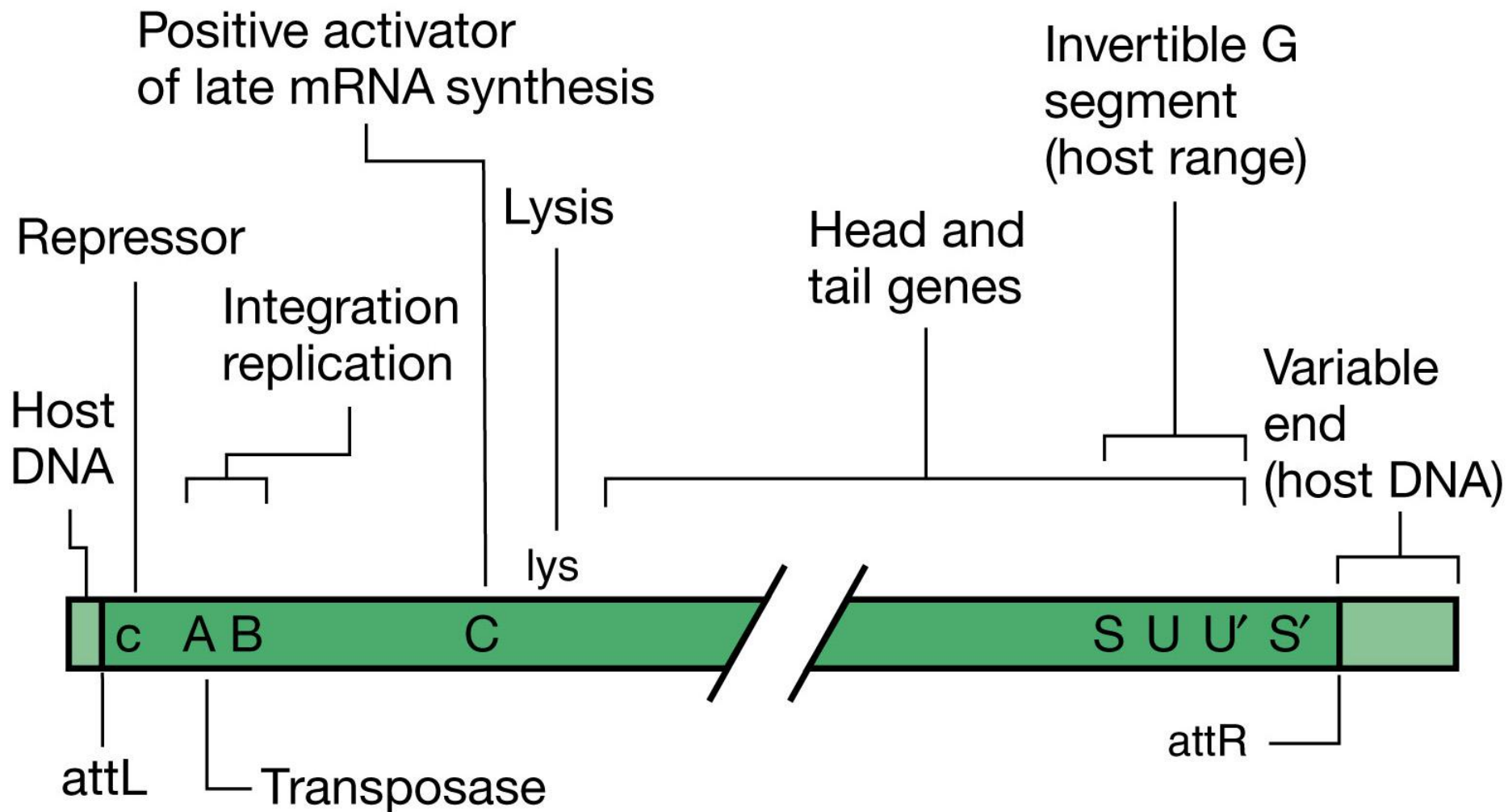
Sao chép theo  
cơ chế cuộn  
vòng



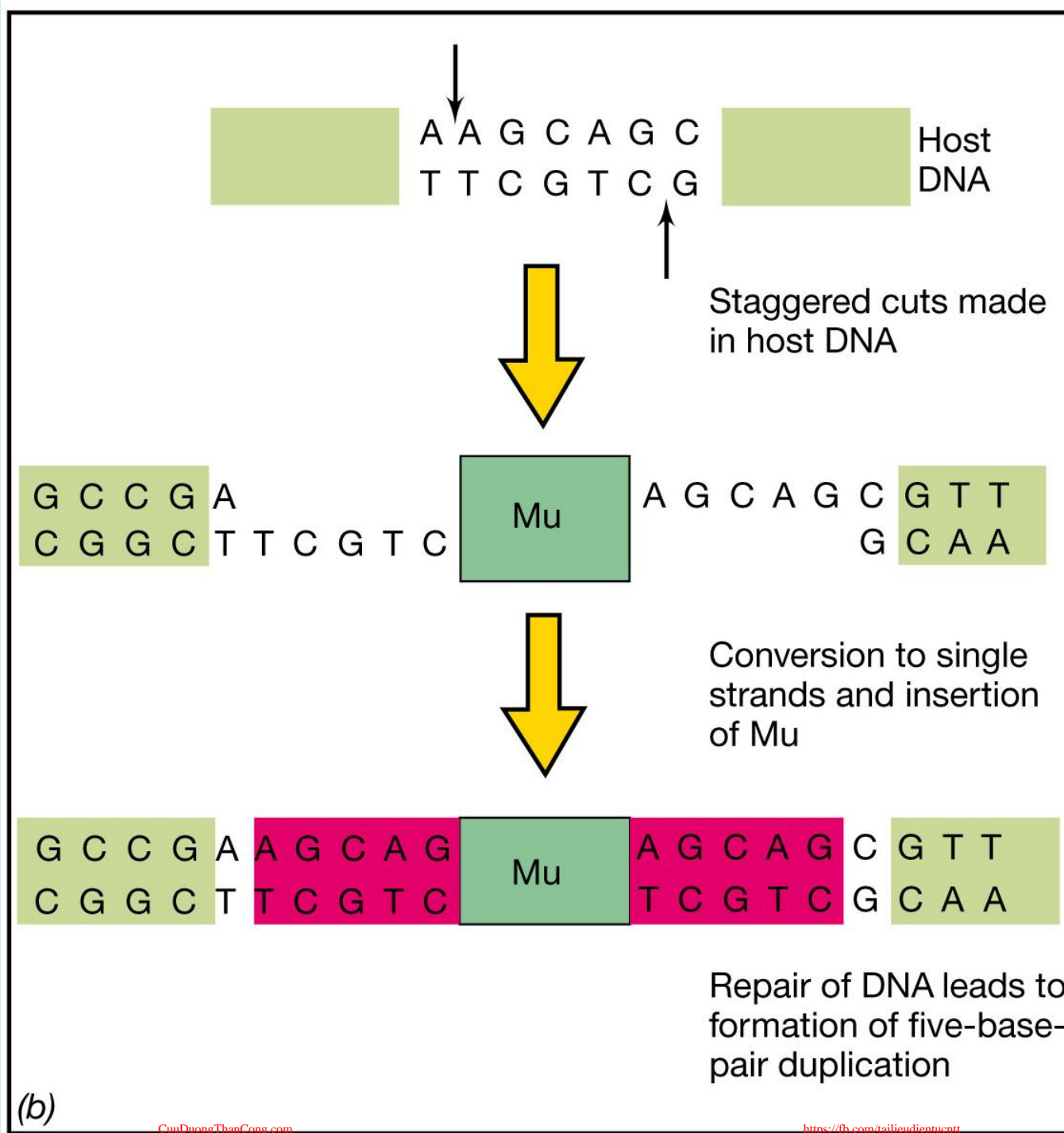


# Phage chuyển vị Mu

- Mu: mutator phage, tạo đột biến (bất hoạt chèn) khi gắn vào bộ gen của tế bào chủ
- Phage ôn hòa, có khả năng chuyển vị khi sao chép, hình dạng tương tự  $\lambda$ : đầu đa diện, thân, sáu sợi đuôi; có hệ thống biến đổi adenine để tự bảo vệ khỏi enzyme giới hạn của tế bào chủ
- Bộ gen 39kb:
  - + 37,2kb của Mu
  - + 50-150bp ở đầu 5' và 1 - 2kb ở đầu 3' là DNA của tế bào chủ nơi Mu đã gắn vào
- Sao chép DNA của Mu:
  - + DNA sát nhập vào DNA bộ gen tế bào chủ nhờ transposase tạo nên sự nhân đôi của trình tự 5nu của DNA tế bào chủ nơi gắn vào
  - + Sự nhân bản của MuDNA: chuyển vị sao chép vào nhiều vị trí trên DNA tế bào chủ
- Sự tạo các phần tử phage Mu làm tan tế bào chủ

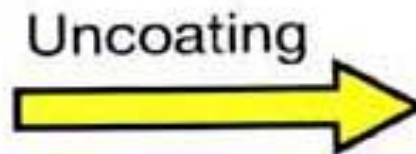
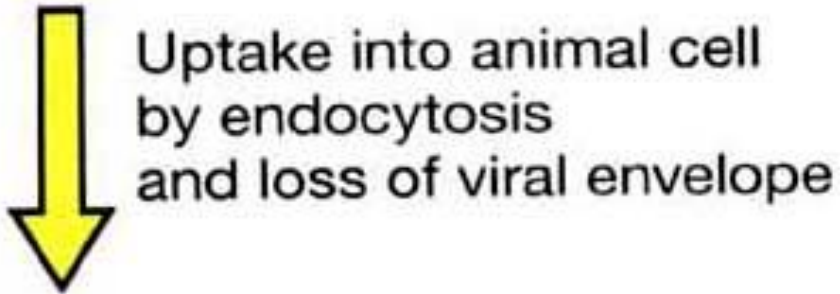
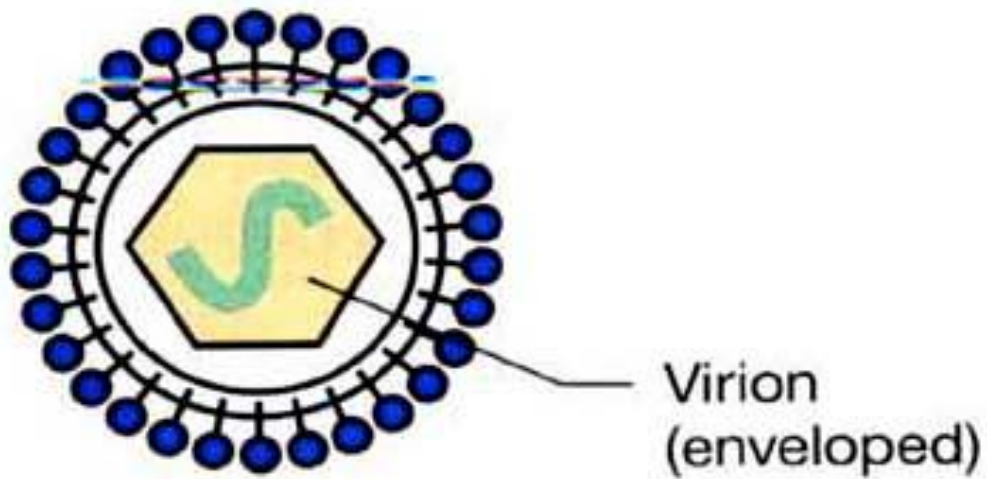


(a)



# Đặc điểm virút động vật

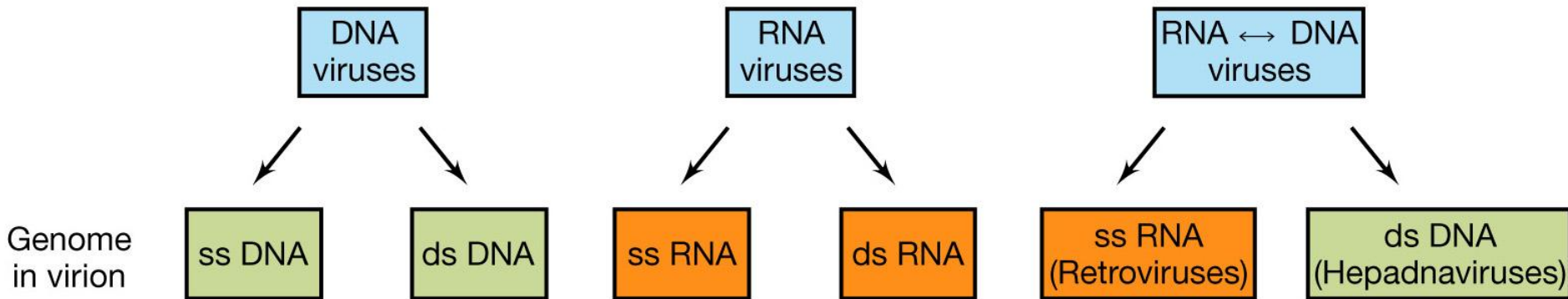
- Khác biệt giữa virút động vật và phage:
  - + Vị trí và phương thức sao mã, dịch mã trong tế bào
  - + Ở một số virút, ngoài vỏ capsid còn có màng bao (envelope) có nguồn gốc từ màng tế bào chủ
  - + Protein hiện diện trên màng bao (spike) được mã hóa từ bộ gen của virút
  - + Virút động vật xâm nhiễm vào tế bào bằng phương pháp ẩm bào cùng với vỏ capsid
  - + Virion ở virút động vật: dạng virút nguyên vẹn ngoài tế bào có màng bao
  - + Nucleocapsid: dạng virút trong tế bào, không có màng bao



Processes of  
virus  
multiplication

# Phân loại virút động vật

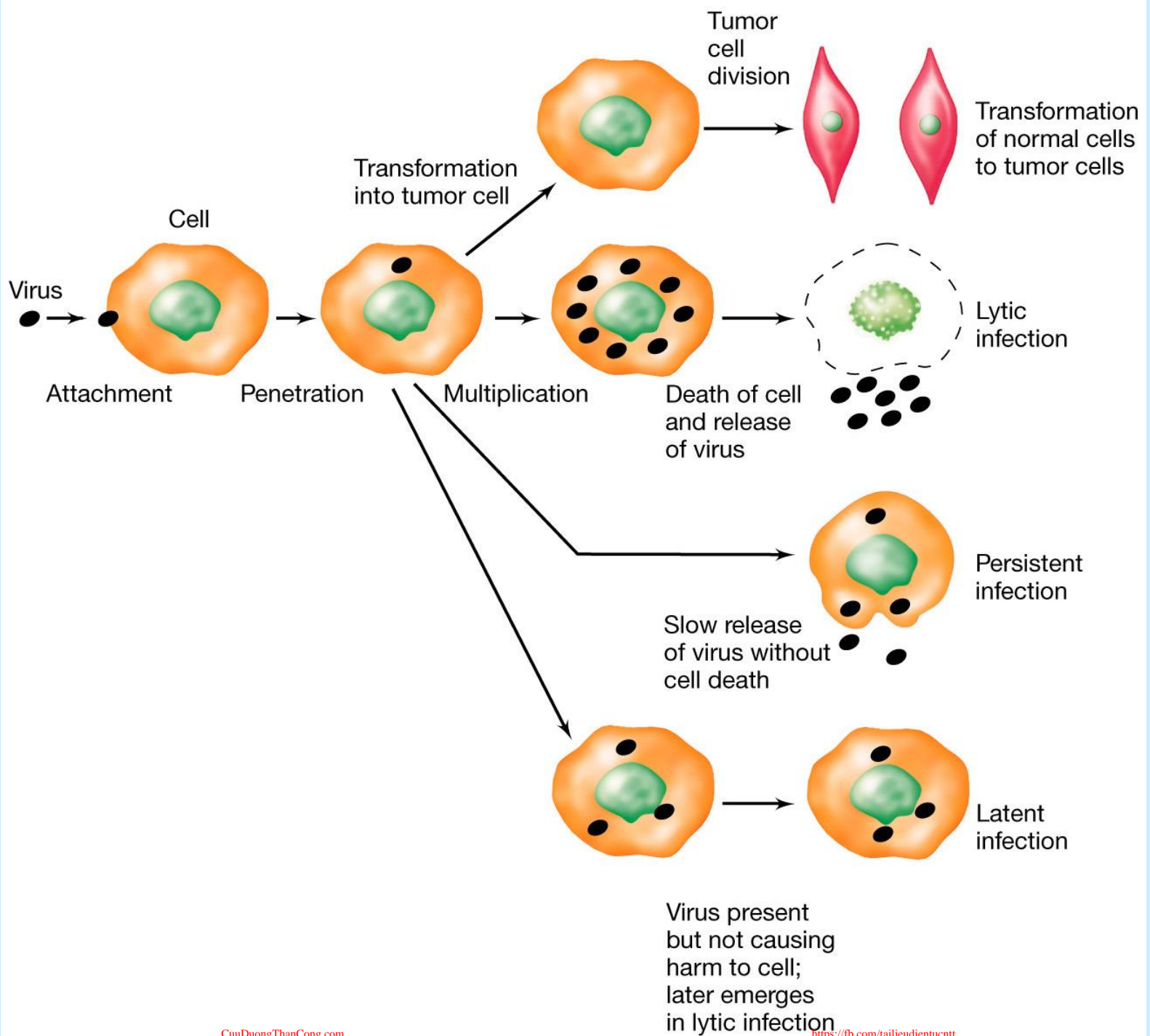
- Một số tiêu chí phân loại:
  - + Có hoặc không màng bao
  - + Bộ gen: ssDNA, dsDNA, partial dsDNA, ssRNA, dsRNA,
  - + Đặc điểm về cấu trúc
  - + Đặc điểm về sao mã, phiên mã





# **Ảnh hưởng của sự nhiễm virút lên tế bào động vật**

- Sinh sản và làm tan tế bào (lytic infection)
- Sinh sản, không làm tan tế bào (persistent infection)
- Hiện diện ở dạng tiềm tan một thời gian dài (latent infection)
- Cảm ứng tạo u lành tính (benign), ác tính (malignant) hoặc di căn (metastasis)
- Sự cảm ứng ung thư tác động lên hai gen:
  - + Proto-oncogene: kích thích tăng trưởng tế bào, sự biểu hiện được kiểm soát bởi tumor suppressor gene
  - + Tumor suppressor gene: ức chế tăng trưởng tế bào
- Cơ chế cảm ứng ung thư:
  - + Khởi mào (initiation): hoạt hóa proto-oncogene thành oncogene hoặc bất hoạt tumor suppressor gene làm tế bào bình thường trở thành tế bào ung thư tiềm tàng
  - + Tiến triển (promotion): các biến đổi môi trường cảm ứng tế bào ung thư tiềm tàng thành tế bào ung thư



# Virút động vật dạng ssRNA+

**Khá đa dạng, họ Picornavirus có vai trò quan trọng:**

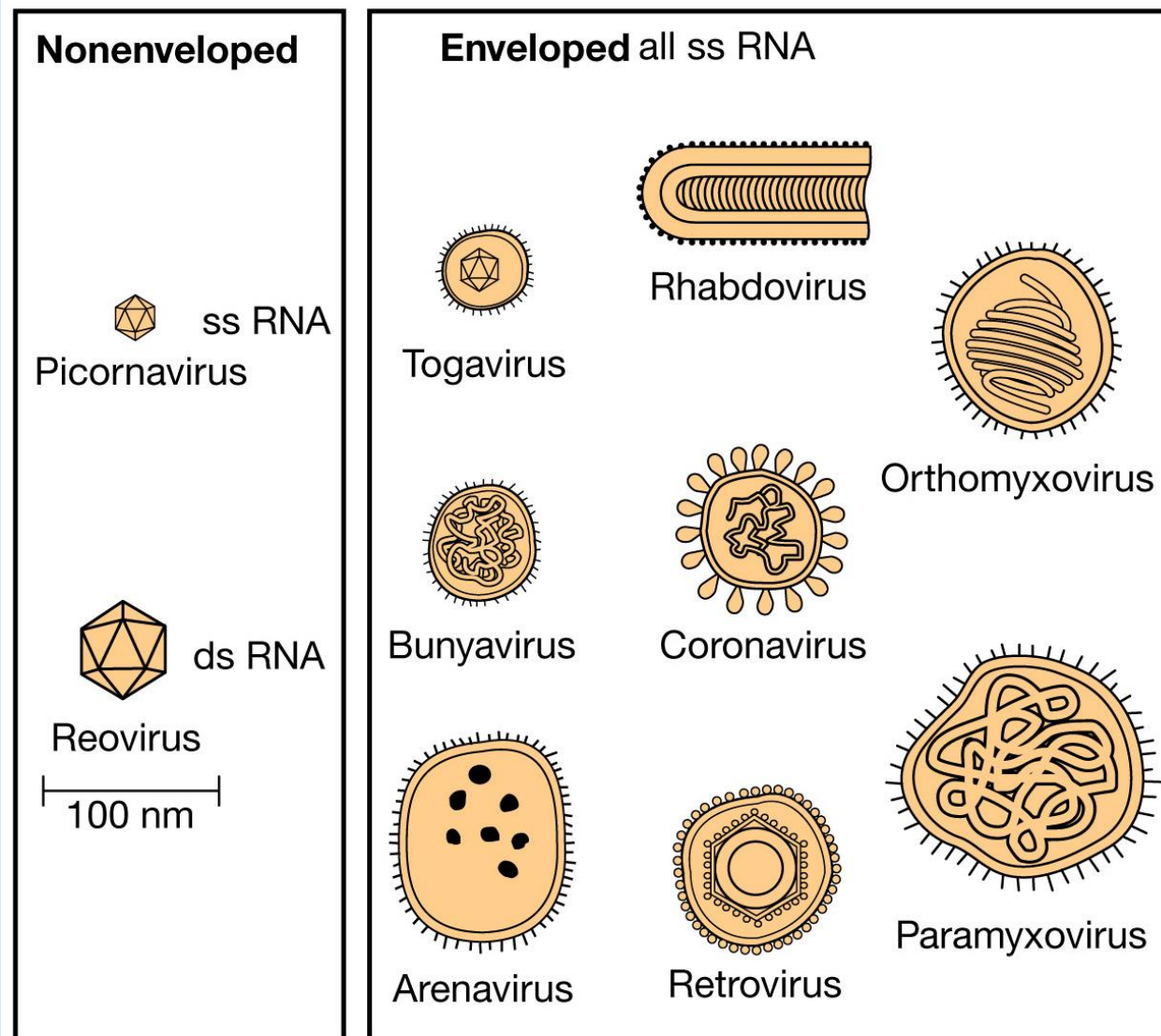
**+ Ở người:**

**Poliovirus, gây bại liệt; Rhinovirus, gây cảm; Hepatitis A virus, gây viêm gan siêu vi A**

**+ Ở động vật:**

**FMD, gây lở mồm long móng**

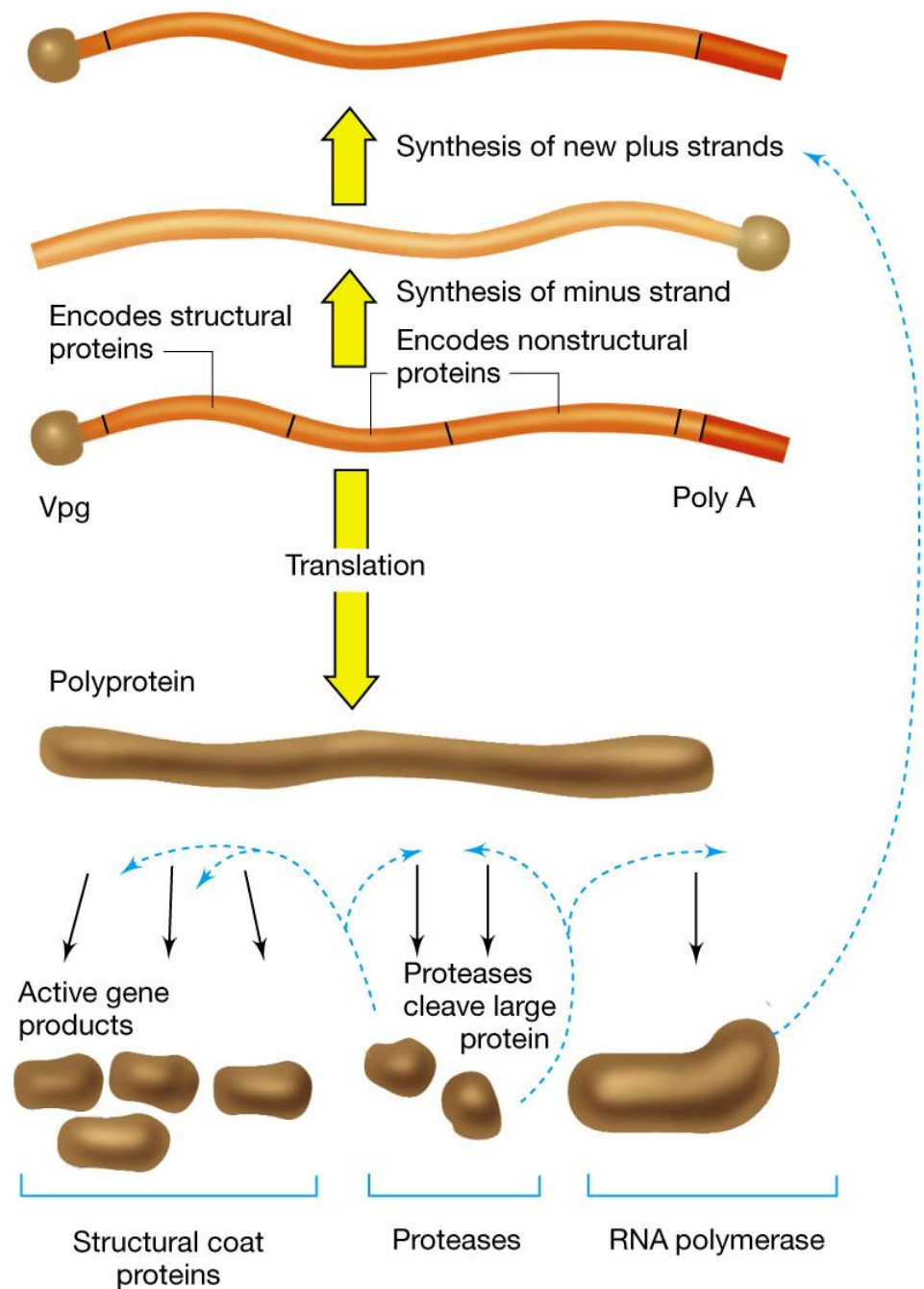
**+ Kích thước nhỏ 30nm, đầu đa diện, bộ gen ssRNA+**



(b) RNA viruses

# Sự nhiễm và nhân bản sao của poliovirus:

- + ssRNA+ được dùng làm mRNA
- + Đầu 5' chứa nhiều cấu trúc thân vòng là nơi ribosome gắn vào
- + Chứa một gen mã hóa một polyprotein được cắt thành 20 protein riêng lẻ sau dịch mã
- + Các protein quan trọng: VPg gắn với RNA bộ gen, 4 protein vỏ, RNA dependent-RNA polymerase, protease
- + Protease của virút bất hoạt cap-binding protein và ức chế sinh tổng hợp protein của tế bào chủ
- Cơ chế sao mã:
  - + RNA polymerase của virút: ssRNA+  $\rightarrow$   $10^3$  ssRNA-  $\rightarrow$   $10^6$  ssRNA+



(b)

# Virút động vật dạng ssRNA-

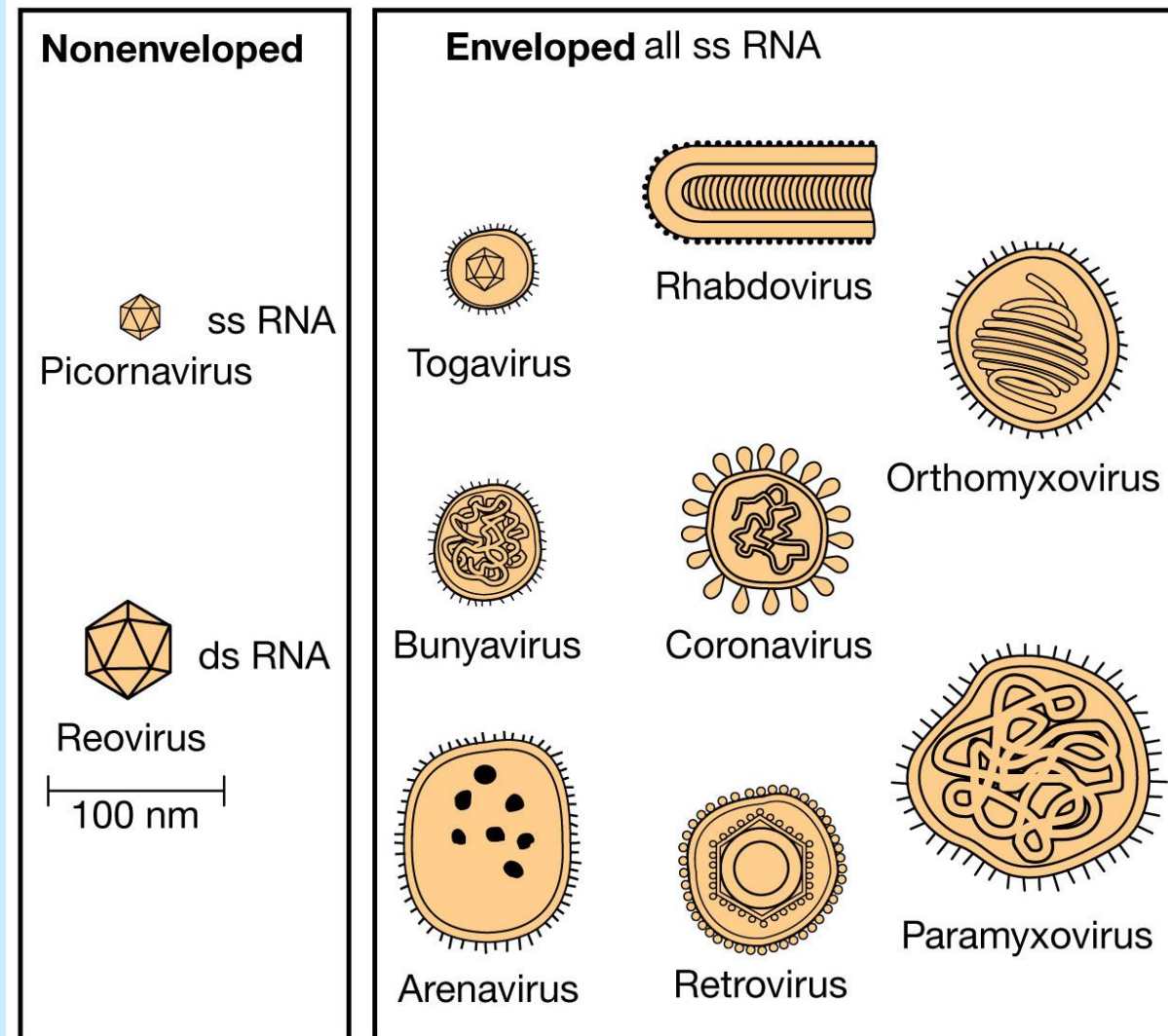
Một số virút quan trọng:

+ **Rhabdovirus**: rabies virus gây bệnh dại, vesicular stomatitis gây viêm miệng

+ **Orthomyxovirus**: influenza virus gây cúm

+ **Paramyxovirus**: gây bệnh sởi, quai bị

+ **Ebola virus**



(b) RNA viruses



# Rhabdovirus

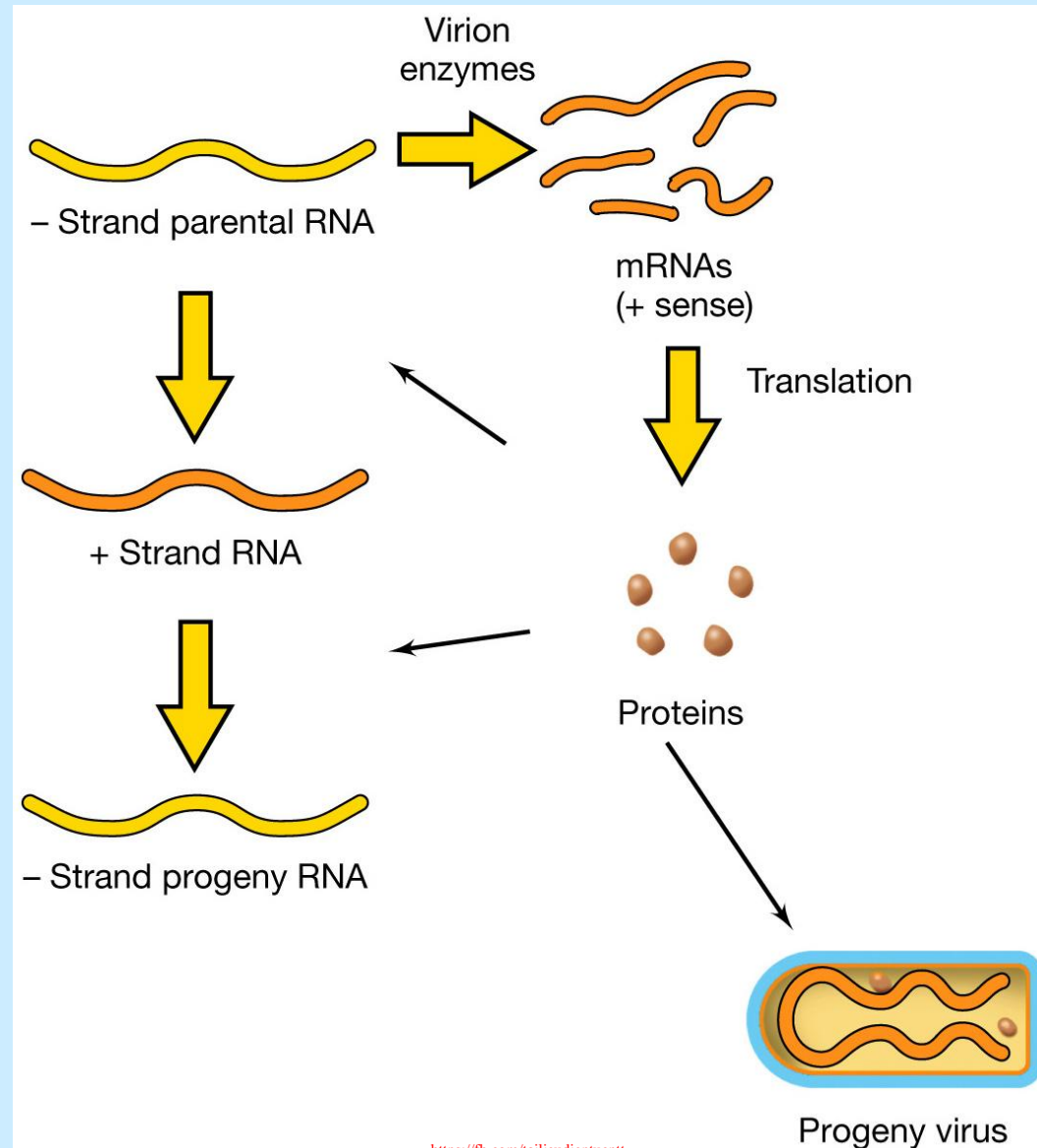
- Hình que 70 x 175nm, có màng bao, chứa một số enzyme cần cho xâm nhiễm và RNA-dependent RNA polymerase
- Đặc điểm nhân bản và sao mã:

+ ssRNA- làm khuôn để tạo thành các mRNA (ssRNA+ ngấn), được dịch mã thành protein của virút

+ ssRNA- làm khuôn để tạo thành ssRNA+ bổ sung của bộ gen, sau đó tạo thành các bộ gen ssRNA-

+ Các protein màng của virút, là glycoprotein, được tổng hợp và chuyển vị lên màng của tế bào chủ

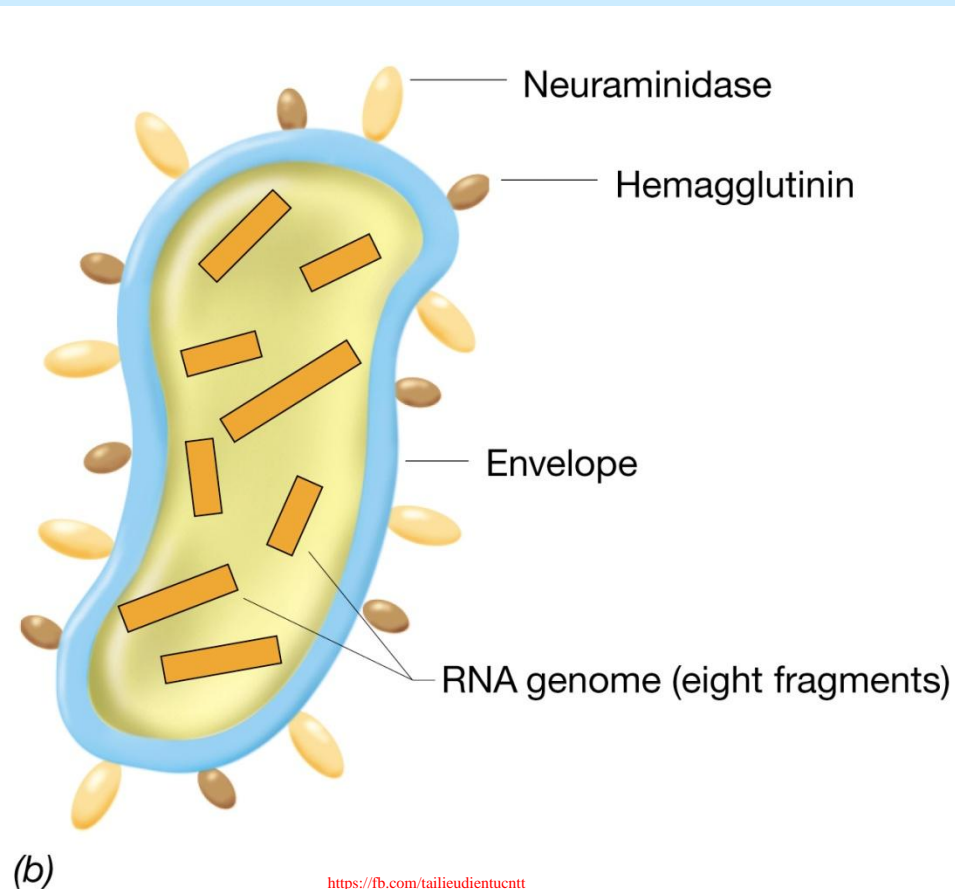
+ Khi nảy chồi để thoát khỏi tế bào, các nucleocapsid của virút sẽ được bao bằng màng của tế bào chủ có mang glycoprotein của virút





# Orthomyxovirus: influenza A virus

- Virion không có hình dạng đặc trưng (polymorphic), nucleocapsid có kích thước 6 - 9 x 60nm
- Trên màng có các protein đặc trưng:
  - + Hemaagglutinin: kháng nguyên làm kết tụ hồng cầu
  - + Neuraminidase: thủy phân sialic acid của màng tế bào chủ, ngăn ngừa sự hiện diện của sialic acid trong virion
- + RNA-dependent RNA polymerase
- + RNA endonuclease: cắt primer khởi 5' cap-mRNA của tế bào
- Bộ gen ssRNA- nhưng bị phân đoạn (influenza A virus: 8 phân đoạn, mã hóa cho 10 protein)

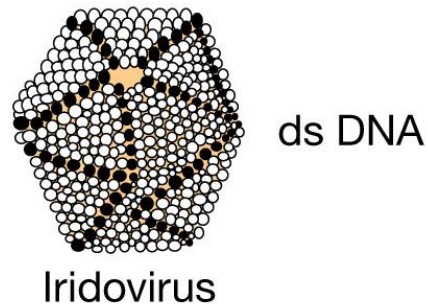
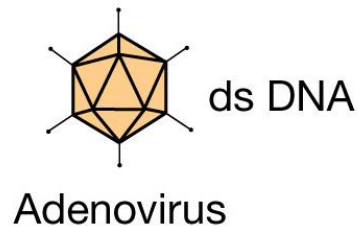


# Virút động vật có bộ gen DNA

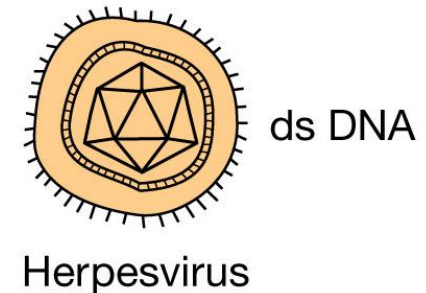
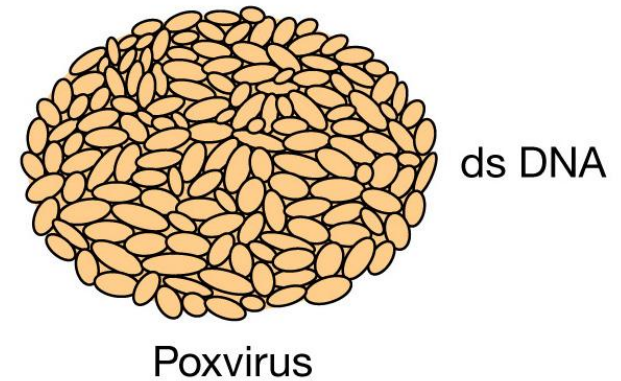
- Các họ virút có bộ gen dsDNA:  
papovavirus,  
herpesvirus, pox  
virus, adenovirus,  
iridovirus

- Họ virút có bộ gen ssDNA:  
parvovirus

## Nonenveloped



## Enveloped



100 nm

(a) DNA viruses

# Papovavirus: SV40

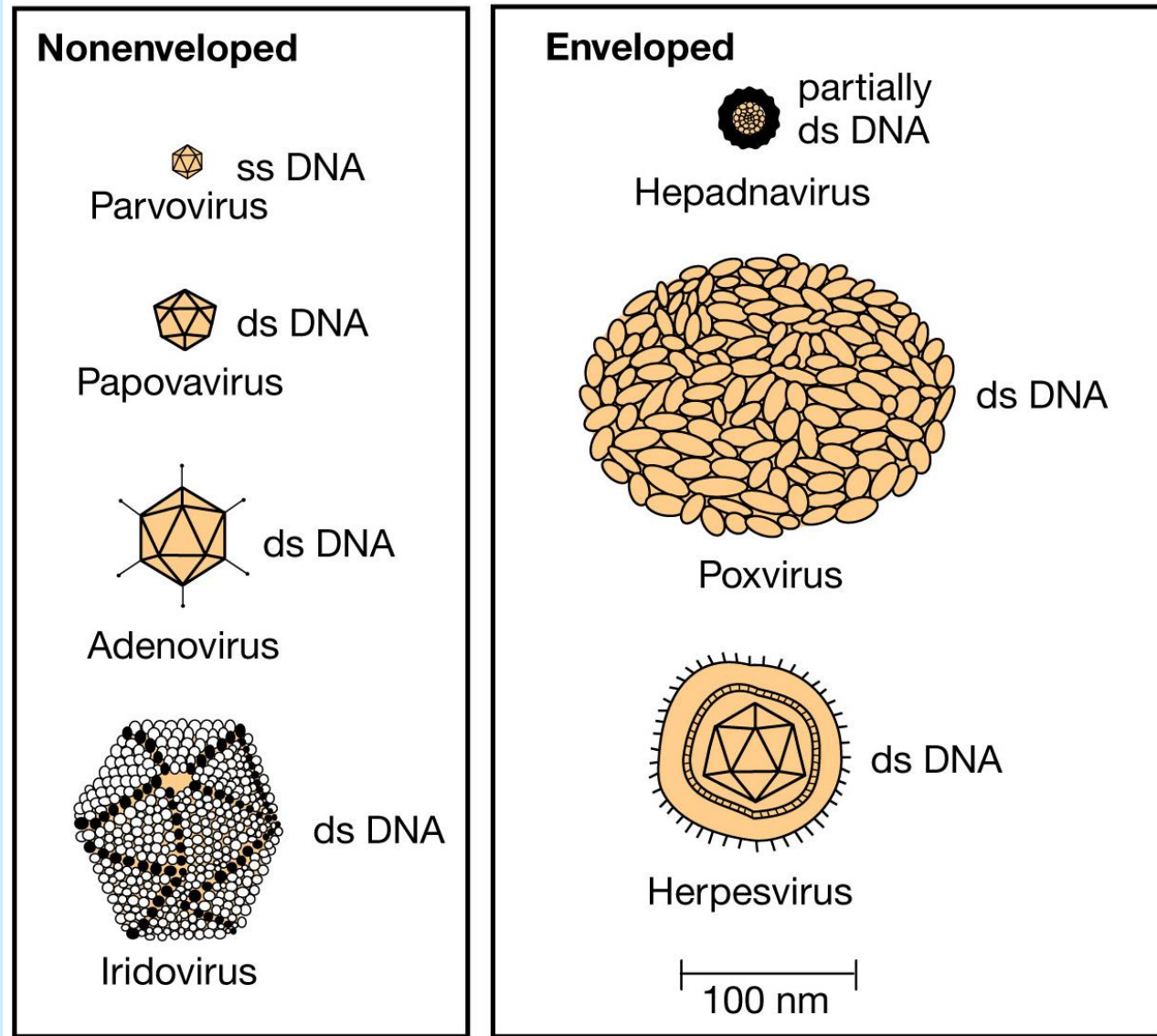
- Một số gây ung thư ở động vật, như simian virus 40 (SV40)
- SV40 hình khối đa diện, không có màng bao, kích thước 45nm
- Bộ gen dsDNA 5243bp, chứa intron, mạch vòng, có cấu trúc siêu xoắn
- Đặc điểm nhân bản:
  - + Hai pha: pha sớm và pha muộn
  - + Sao mã trong nhân, tổng hợp protein trong tế bào chất, lắp ghép virion trong nhân
- Pha sớm:
  - + Phiên mã vùng gen sớm bằng RNA polymerase của tế bào chủ tạo một mRNA sơ cấp
  - + mRNA bị chế biến loại intron và tách thành 2 mRNA trưởng thành
  - + Tạo hai protein T trong tế bào chất, sau đó trở lại vào nhân
  - + Protein T gắn vào ORI trên bộ gen virút, cảm ứng sự hình thành phức hợp replicase để sao mã bộ gen virút
  - + Cơ chế sao mã: tương tự ở tế bào chủ
- Pha muộn:
  - + Phiên mã vùng gen muộn ngược chiều với vùng gen sớm
  - + Các mRNA được chế biến, gắn đuôi poly A và chuyển vào tế bào chất để dịch mã
  - + Protein muộn của virút được chuyển ngược vào nhân để lắp ghép tạo virion
  - + Quá trình lắp ghép virion có sử dụng cả histone của tế bào chủ

# Họ Herpesvirus

Họ có nhiều thành viên gây nhiều bệnh trên người và động vật: sốt phồng da, da liễu, thủy đậu, bệnh zona, gây ung thư...

**Herpes simplex type I virus (sốt phồng da), cấu trúc phức tạp:**

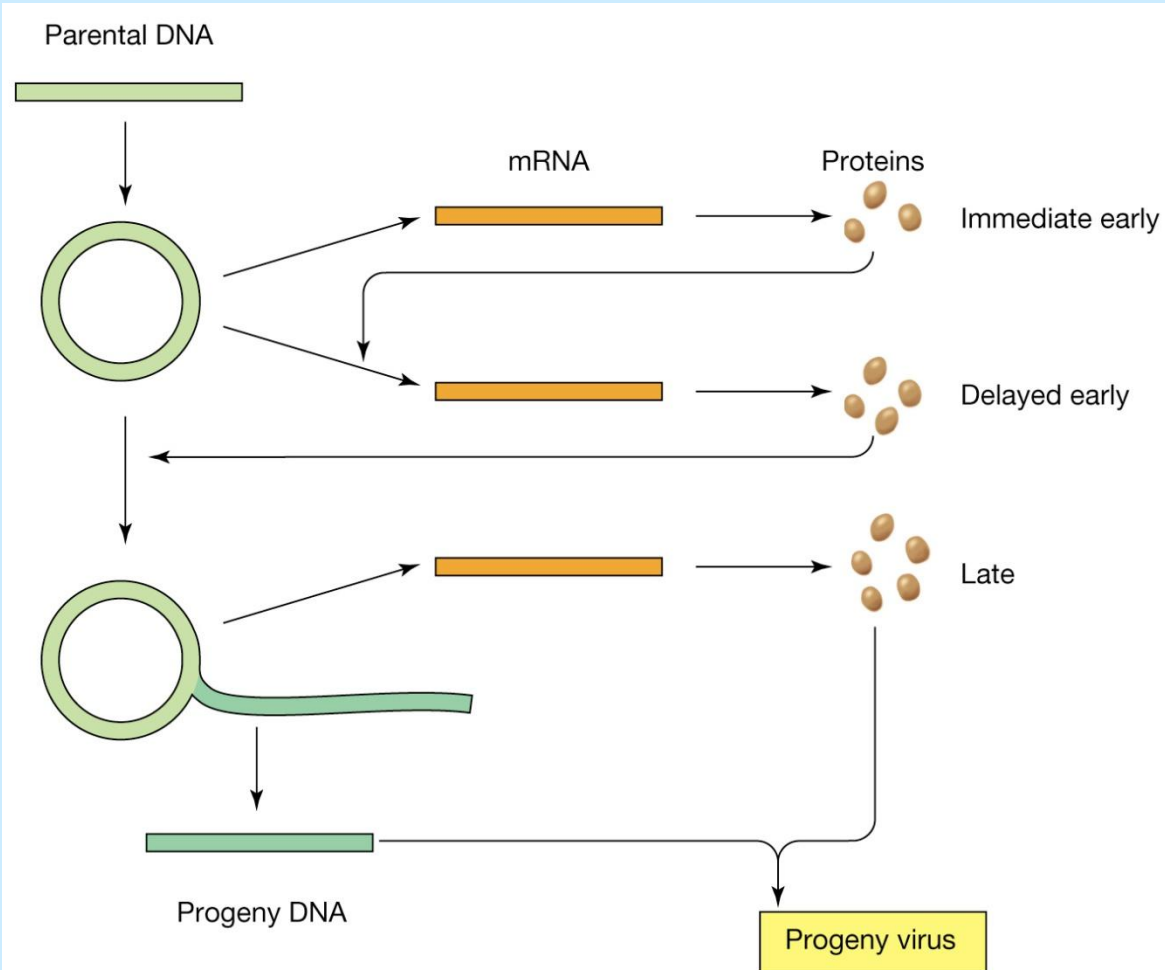
- Kích thước 150nm, có màng bao chứa một số spike nhỏ, capsid được tạo từ 162 capsomer
- Bộ gen dsDNA mạch thẳng, kích thước 152,2kb, mã hóa cho 84 protein khác nhau



(a) DNA viruses

# Đặc điểm nhân bản của Herpesvirus

- Nucleocapsid được chuyển vào nhân, vỏ capsid bị tách khỏi bộ gen, các protein trong capsid ức chế sự sinh tổng hợp các đại phân tử của tế bào chủ
- Vùng gen rất sớm (immediate early,  $\alpha$ ): mã hóa 5 protein có vai trò tăng cường sự tổng hợp các protein sớm trễ
- Vùng gen sớm trễ (delayed early,  $\beta$ ): mã hóa các protein cần cho sự sao mã DNA virút
- Vùng gen muộn (late,  $\gamma$ ): tạo protein vỏ capsid, spike
- Sao mã: trong nhân DNA virút nối hai đầu thành mạch vòng, sao mã theo cơ chế cuộn vòng
- Nucleocapsid được lắp ghép trong nhân, virút hình thành màng bao khi đi qua màng nhân và virion được phóng thích thông qua mạng lưới nội chất



(b)



# Pox virus: vaccinia virus

- Họ virus có cấu trúc phức tạp nhất, kích thước lớn nhất, có thể quan sát dưới kính hiển vi quang học, sao mã DNA diễn ra trong tế bào chất của tế bào chủ

- Các virút quan trọng:

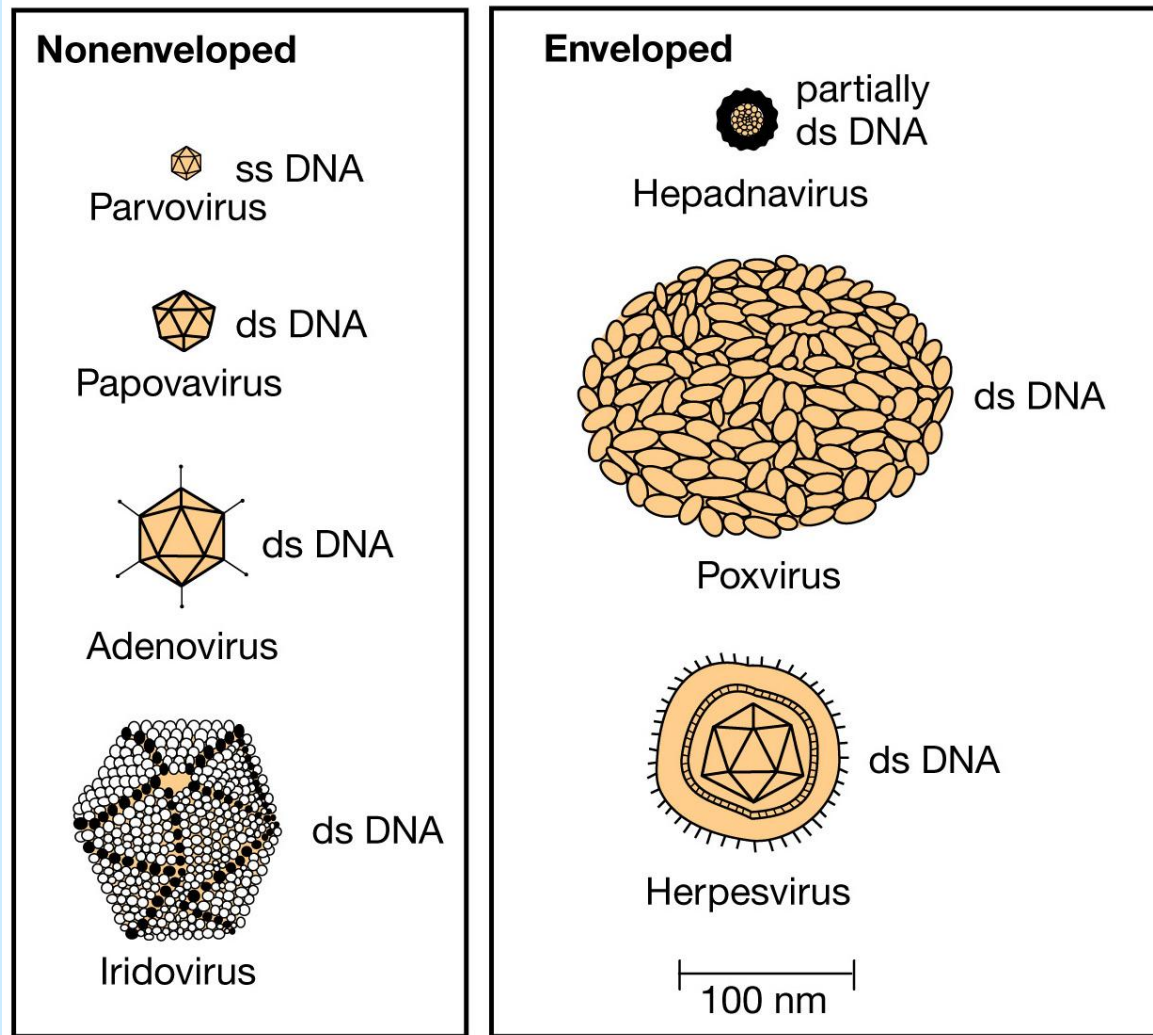
**Variola vera** (đậu mùa, smallpox), **vaccinia virus**, **cowpox virus** (đậu bò), **rabbit myxomatosis virus** (bệnh ở thỏ)

- **Vaccinia virus:**

- + Kích thước 400 x 240 x 200nm

- + Màng bao chứa chủ yếu là protein dạng sợi

- + Lõi nucleocapsid: capsomer và bộ gen 185kb mã hóa 150 - 200 gen, hai mạch nối với nhau ở hai đầu bằng liên kết phosphodiester từ nucleotide trên hai mạch



(a) DNA viruses

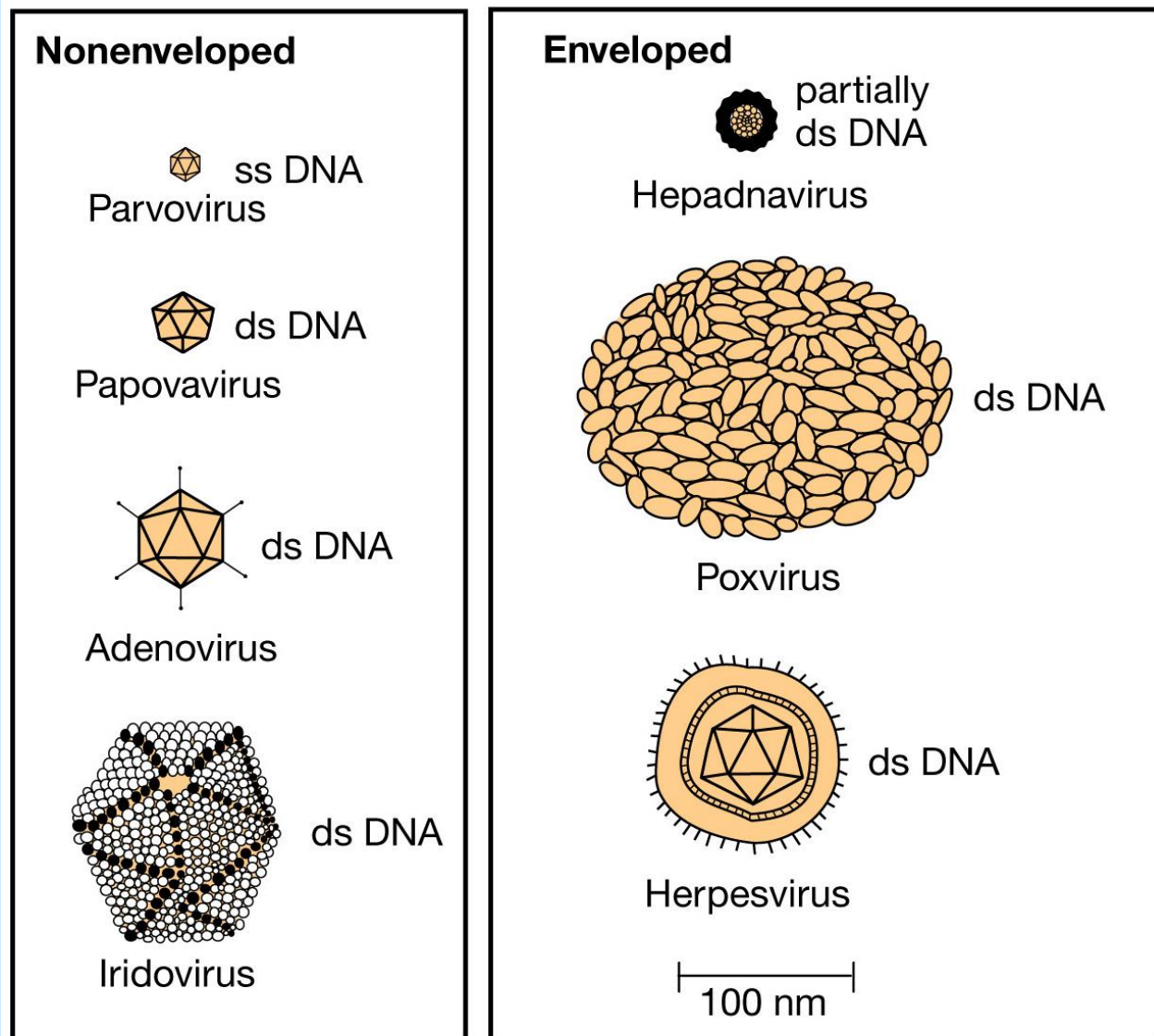


# Pox virus: vaccinia virus

- **Đặc điểm nhân bản của vaccinia virus:**
  - + **Xâm nhiễm bằng phương pháp thực bào**
  - + **RNA polymerase chứa trong virút phiên mã một số protein, trong đó có protein có tác dụng tách bộ gen khỏi vỏ capsid**
  - + **Hình thành inclusion body để thực hiện sao mã, phiên mã gen muộn, lắp ghép nucleocapsid, phóng thích virion khỏi tế bào qua màng tế bào chất**
- **Vaccinia virus được dùng rộng rãi làm vắc xin vector ở người và ĐV**

# Adenovirus

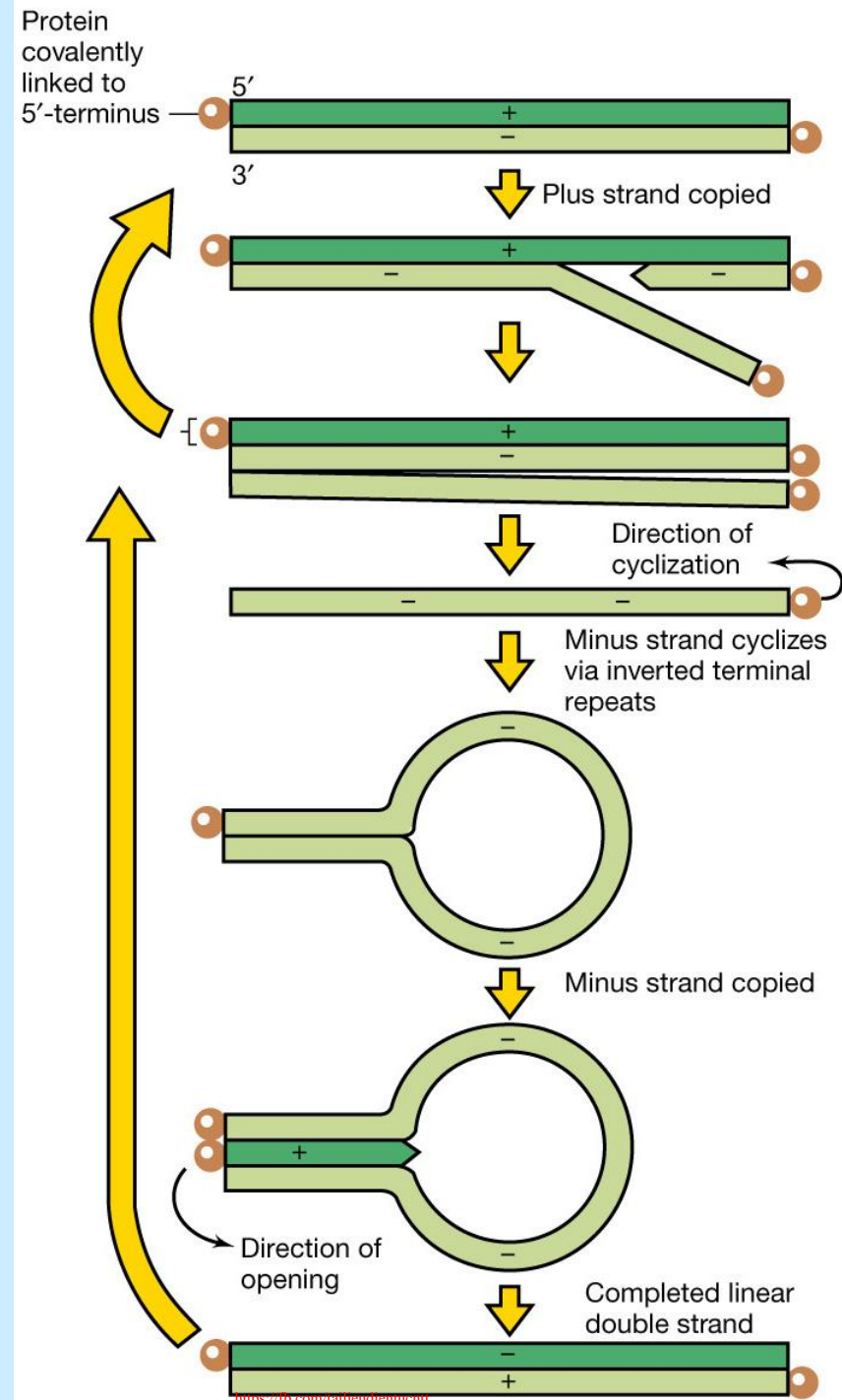
- Họ chứa các virút gây nhiễm nhẹ đường hô hấp ở người, nhiều virút không gây bệnh
- Không có màng bao. virion hình đa diện khoảng 60nm
- Bộ gen:
  - + DNA mạch thẳng kép 36kb,
  - + Hai đầu 5' có một protein gắn cộng hóa trị có vai trò primer trong sao mã
  - + Chứa các trình tự lặp đảo



(a) DNA viruses

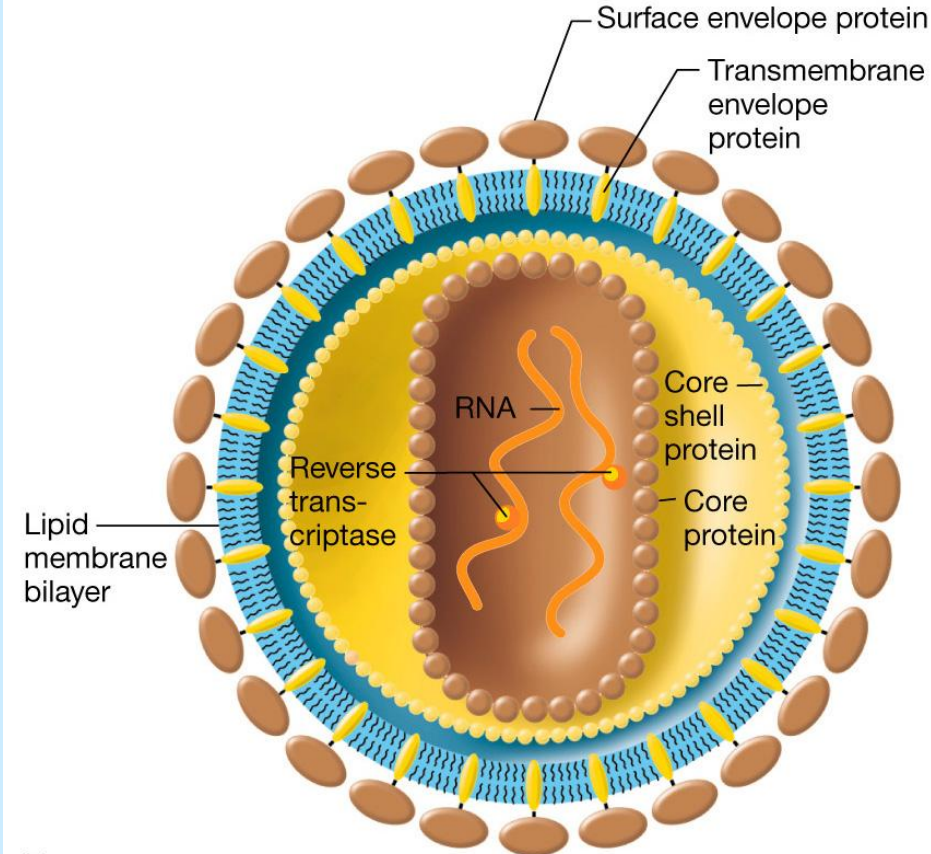
# Adenovirus

- **Đặc điểm nhân bản:**
  - + Virion được chuyển vào nhân, loại vỏ capsid
  - + Tổng hợp mRNA sớm bằng RNA polymerase của tế bào chủ
- **Đặc điểm sao mã:** sao mã lệch pha nhưng liên tục trên cả hai mạch
  - + Sử dụng primer là protein của virút và DNA polymerase của virút
  - + Sự sao mã độc lập trên một trong hai mạch tạo ra một phân tử mạch kép và một sợi mạch đơn
  - + Sợi mạch đơn tạo mạch vòng bằng các trình tự lặp đảo, sau đó bắt đầu tổng hợp mạch bổ sung

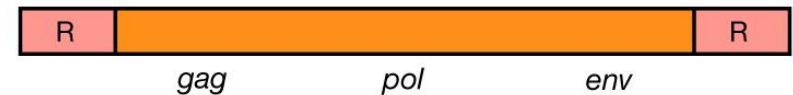


# Retrovirus

- Họ virus có bộ gen RNA nhưng tạo bản sao qua trung gian DNA nhờ enzyme reverse transcriptase (RTase)
- Có màng bao, virion chứa nhiều protein trong đó có 3 enzyme là RTase, integrase và protease
- Bộ gen hai mạch đơn ssRNA+, 8,5-9,5kb, đầu có cap 5' và có đuôi polyA, hai đầu 5' và 3' có đoạn lặp (R)
- Bộ gen chứa 3 vùng trình tự:
  - + gag: mã hóa các protein tạo capsid
  - + pol: mã hóa RTase và integrase
  - + env: mã hóa các protein màng bao



(a)



(b)



(c)

# Retrovirus

- Các bước nhân bản trong tế bào chủ:

+ **Xâm nhập**

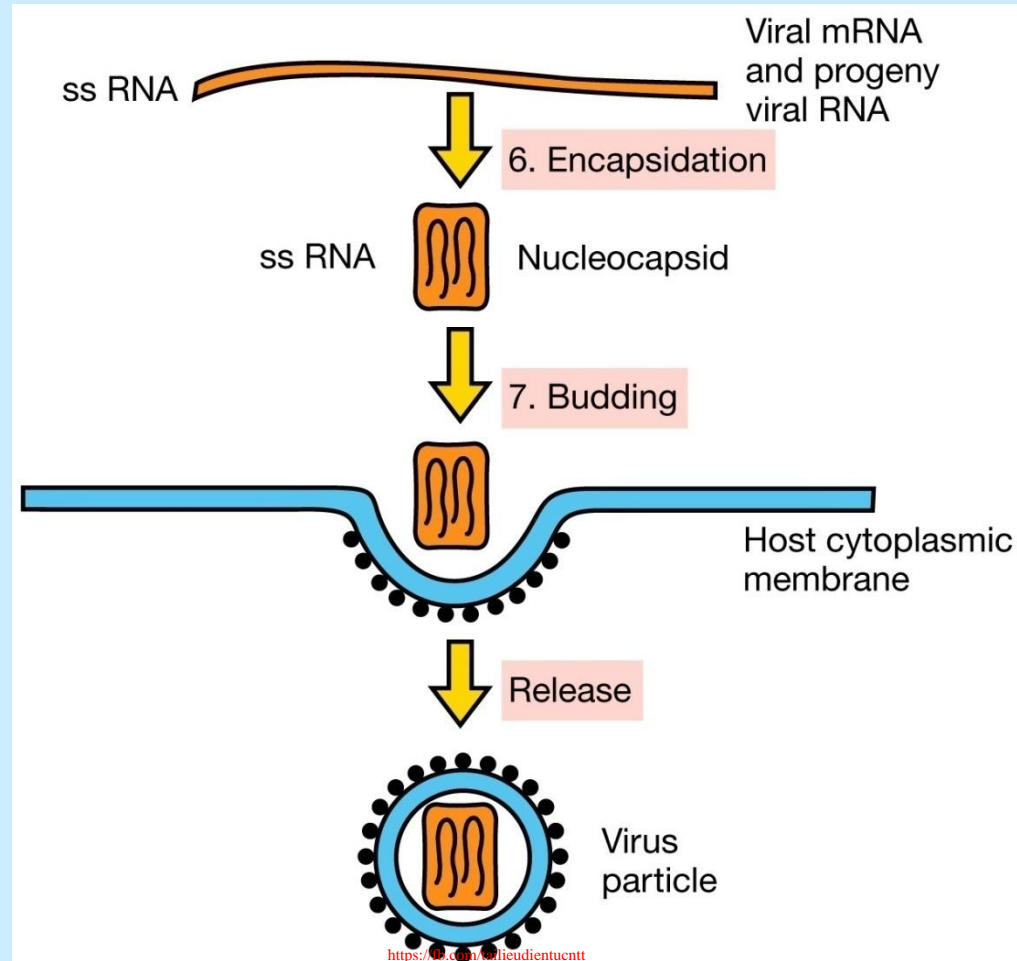
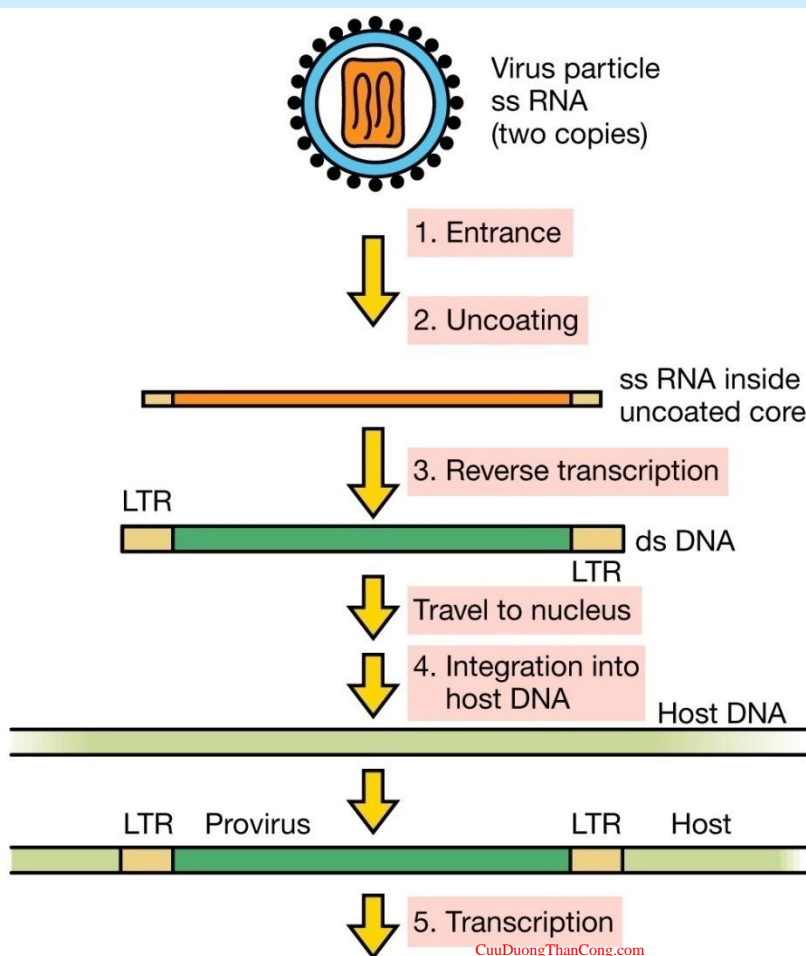
+ **Phiên mã ngược: RNA → cDNA → dsDNA** nhờ RTase

+ **Sát nhập vào DNA bộ gen** nhờ integrase

+ **Phiên mã bộ gen DNA** tạo mRNA thông tin và ssRNA+

+ **Lắp ghép bộ gen vào capsid**

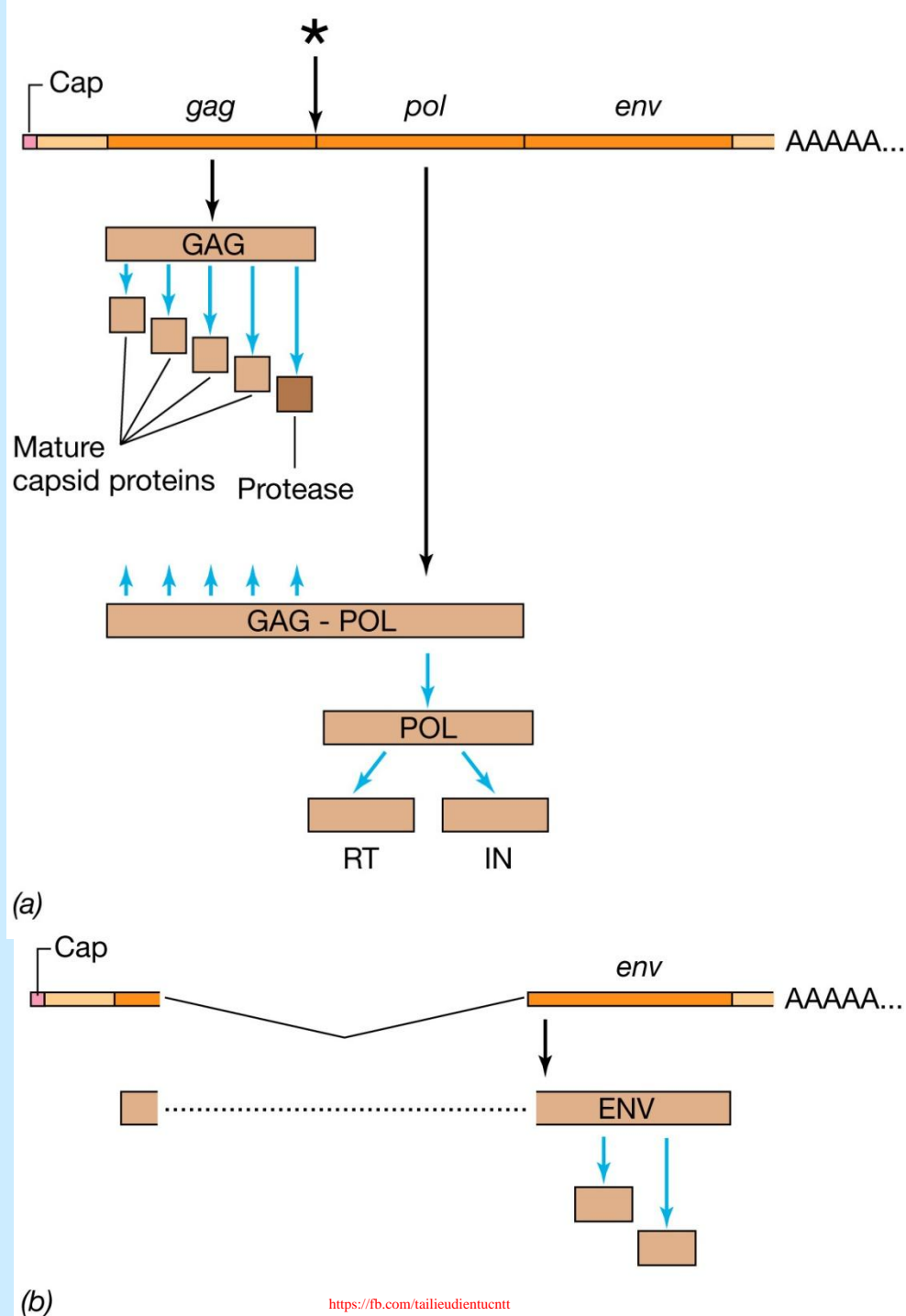
+ **Phóng thích phần tử virút mới** khỏi tế bào





# Biểu hiện gen của retrovirus

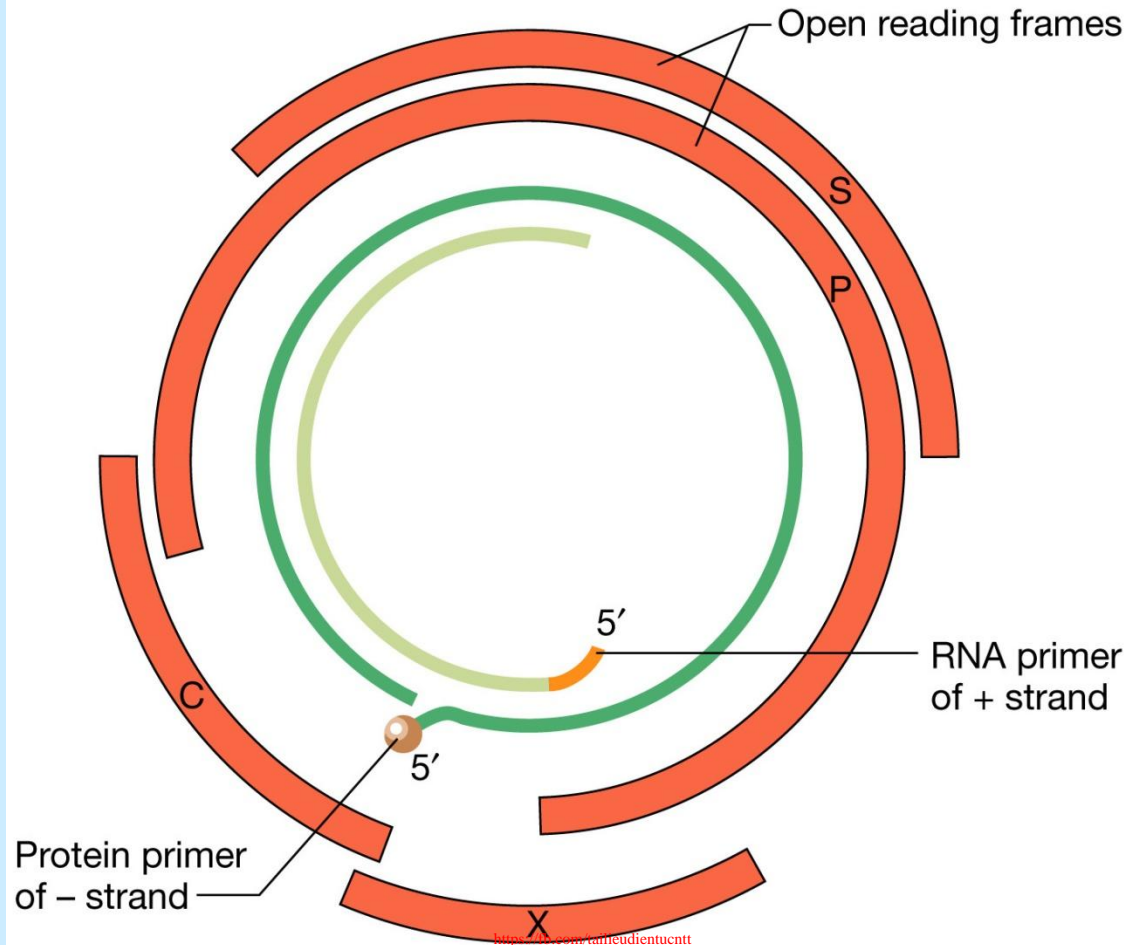
- LTR chứa một promoter mạnh, khi được hoạt hóa sẽ được gắn RNA polymerase của tế bào chủ để phiên mã bộ gen của retrovirus
- RNA được tạo thành có thể được dùng làm mRNA hoặc làm ssRNA+
- Sự dịch mã tạo ra protein gag sơ cấp, sau đó được cắt để tạo ra các protein cấu trúc
- Một số trường hợp dịch mã vượt (gắn amino acid vào ở vị trí tương ứng với stop codon, hoặc chuyển khung) sẽ tạo ra protein pol sơ cấp, được cắt thành RTase và integrase
- Một số ssRNA+ được chế biến loại bỏ vùng mã hóa gag và pol, chỉ còn lại vùng env và được dịch mã thành protein env sơ cấp và thủy phân thành các protein env





# Hepadnavirus

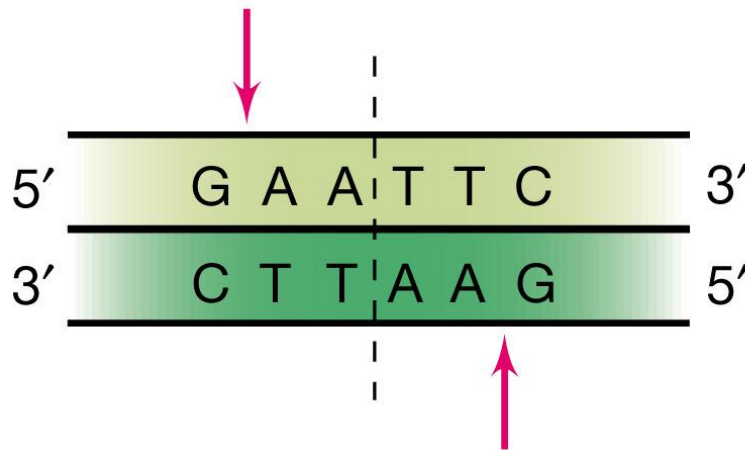
- Bộ gen DNA mạch kép không hoàn toàn
- Ví dụ: HBV (hepatitis B virus)
- Sau khi vào tế bào chủ, một protein của virion giúp sự hoàn tất bộ gen DNA mạch kép



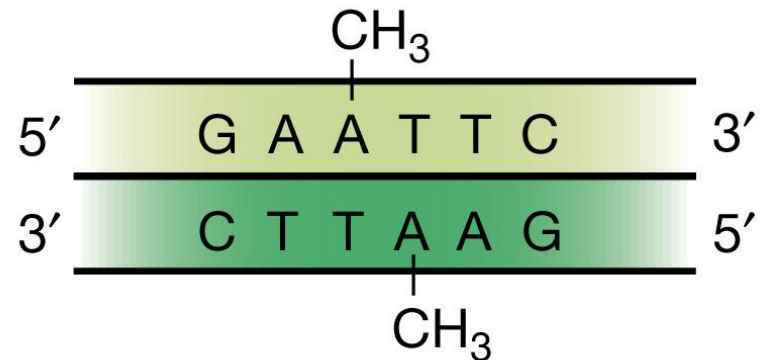
# Kỹ thuật di truyền

# Tạo dòng phân tử (molecular cloning)

- Tạo dòng phân tử: dùng kỹ thuật di truyền để phân lập và làm thuần một gen:
- + Tách và phân đoạn DNA nguồn
- + Gắn các đoạn DNA bị cắt vào vector dòng hóa
- + Biến nạp và giữ DNA tái tổ hợp trong tế bào chủ: ngân hàng DNA (DNA library, DNA bank)
- + Phát hiện và làm thuần dòng mục tiêu
- + Nuôi cấy dòng mục tiêu để ly trích và nghiên cứu DNA tái tổ hợp



(a)



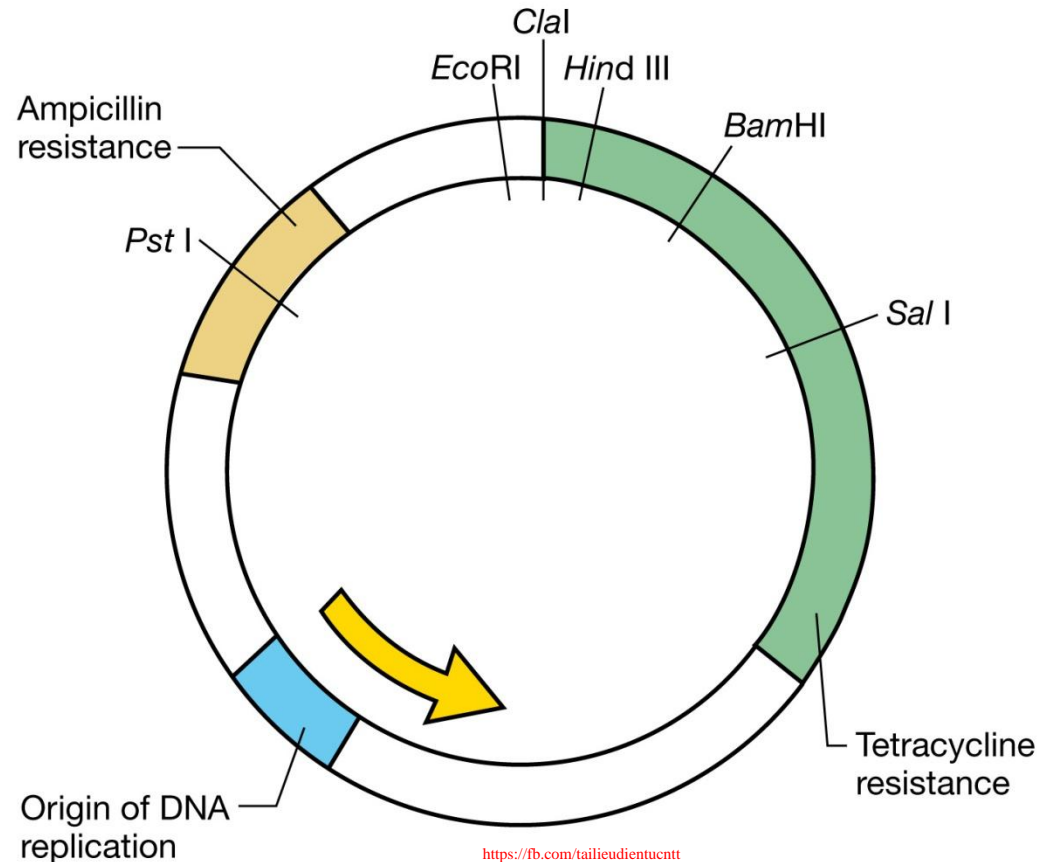
(b)

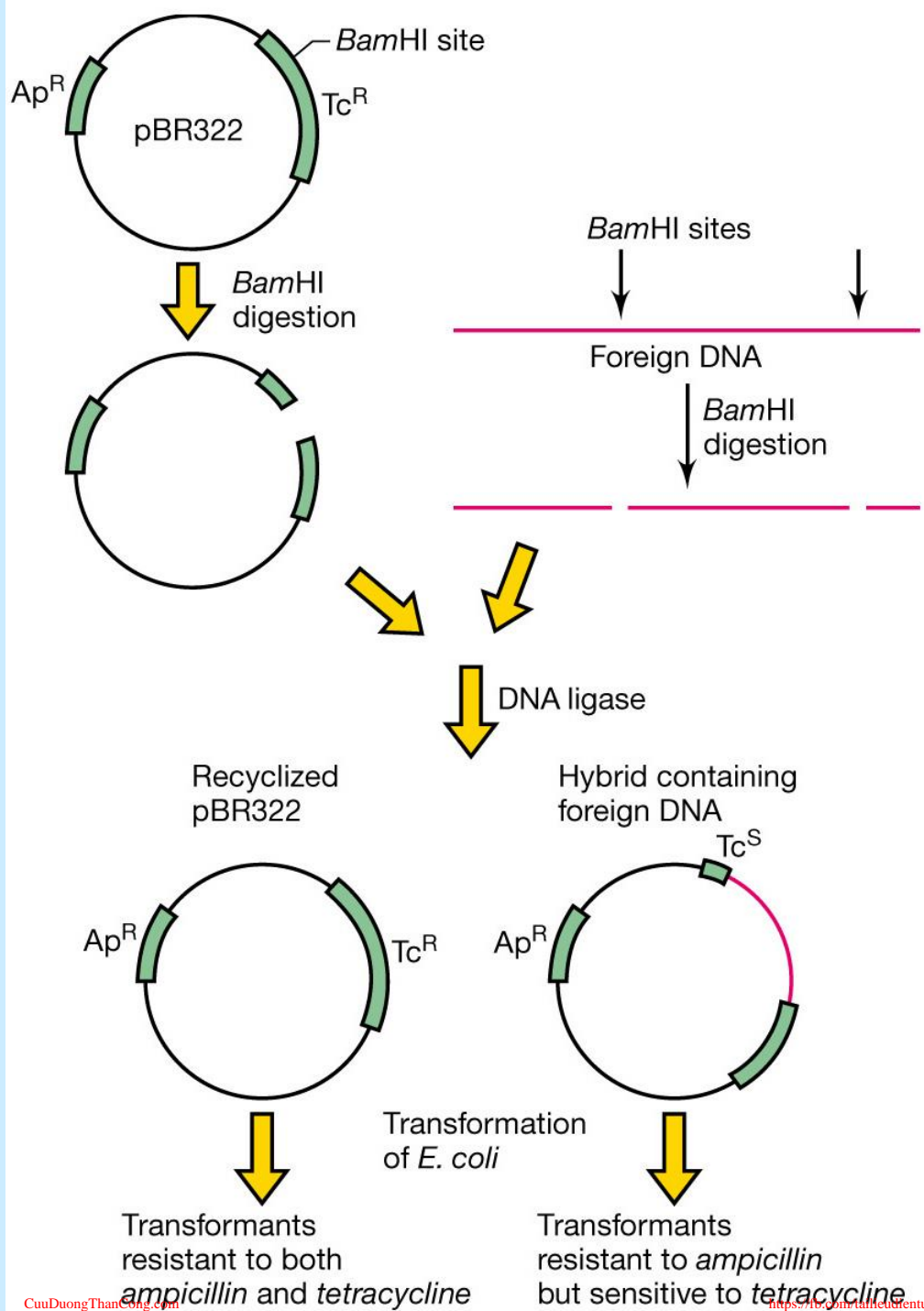
# Thể mang gen: vector

- **Vector: phân tử DNA kích thước nhỏ dùng để mang gen, sao chép, thao tác trên gen**
- **Vector tạo dòng và vector biểu hiện**
- **Vector tạo dòng: chuyển và lưu trữ gen tái tổ hợp trong tế bào chủ, nhân bản, thao tác, phân tích sau đó trên DNA tái tổ hợp sẽ dễ dàng hơn**
- **Vector biểu hiện: tạo sản phẩm của gen tái tổ hợp ở mức phiên mã, dịch mã, phân tích trình tự điều hòa sự biểu hiện của gen**

# Vector tạo dòng là plasmid

- Được chuyển vào tế bào bằng sự biến nạp
- Tự sao chép độc lập với bộ gen tế bào chủ
- Một số ở trạng thái đa bản sao làm tăng số lượng DNA tái tổ hợp trong tế bào
- Được chuyển vào tế bào bằng sự biến nạp
- Tự sao chép độc lập với bộ gen tế bào chủ
- Một số ở trạng thái đa bản sao làm tăng số lượng DNA tái tổ hợp trong tế bào
- Mang các dấu hiệu di truyền chọn lọc (selective genetic marker)
- Chứa polycloning site
- Cấu trúc cho phép tạo đột biến bất hoạt chèn dùng cho mục đích chọn lọc

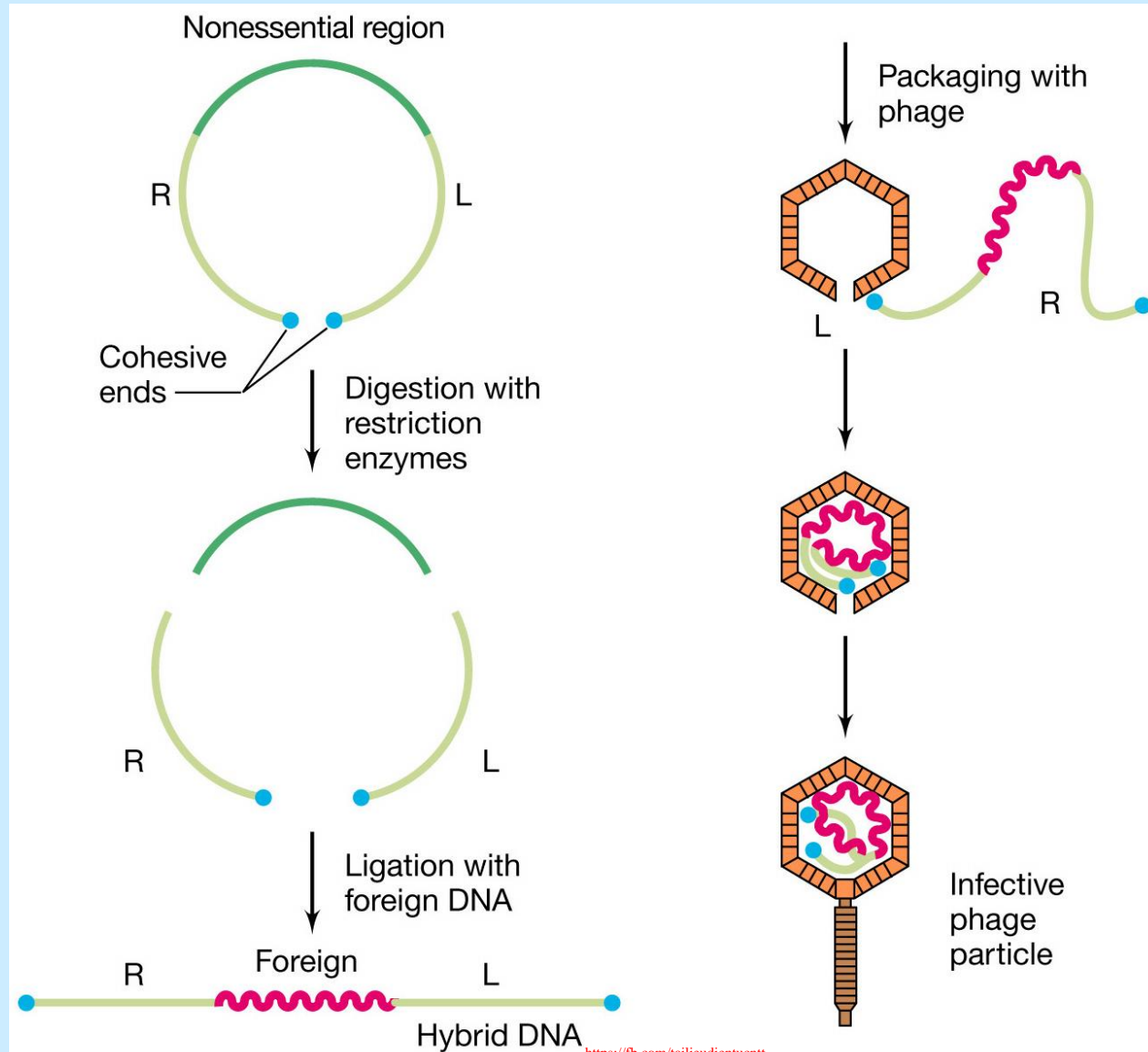






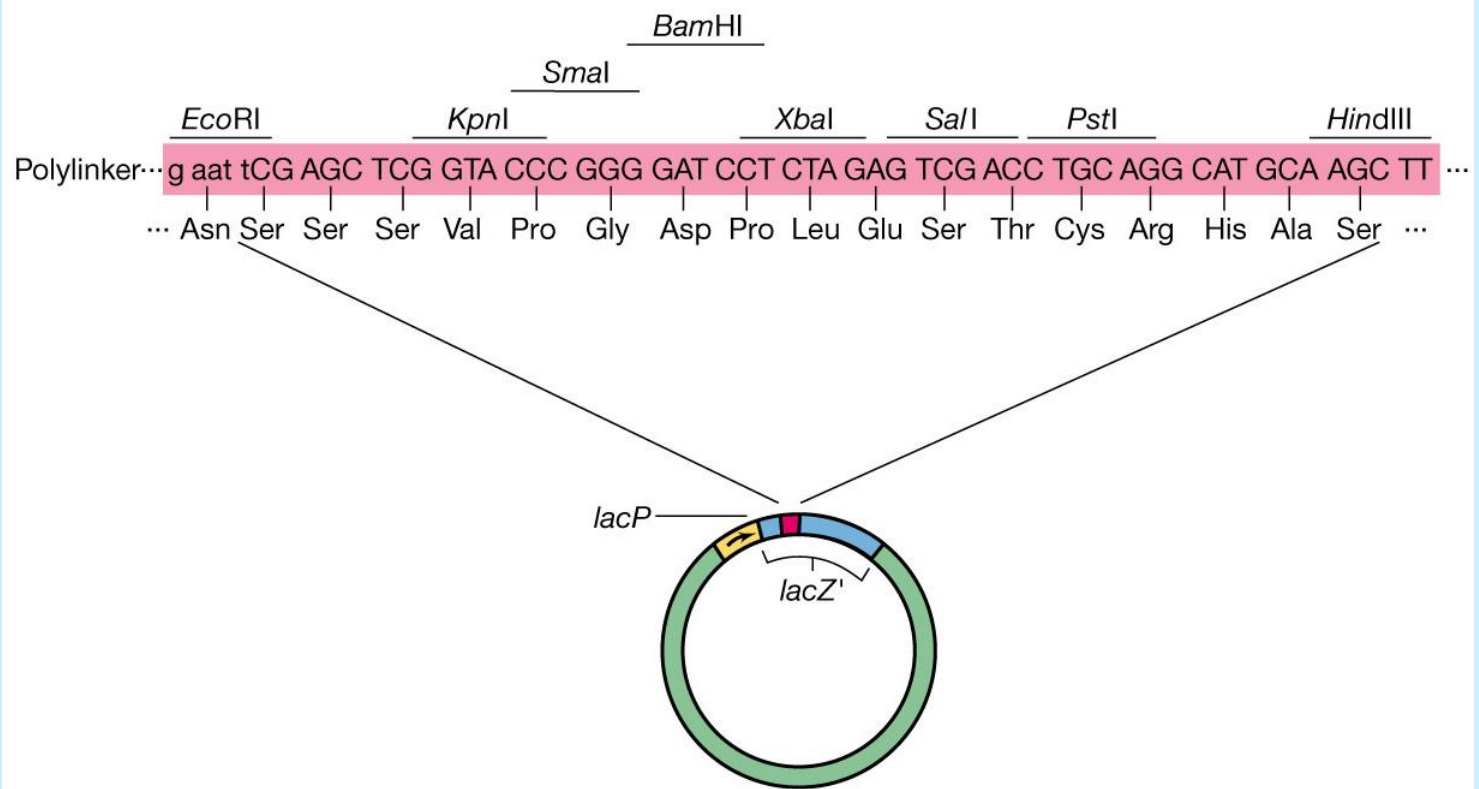
# Vector tạo dòng là phage $\lambda$

- Phage  $\lambda$  được loại bỏ 1/3 bộ gen chỉ giữ lại vùng chứa gen xâm nhập, tự sao và lắp ghép
- DNA ngoại lai được đưa vào tế bào chủ qua phage này, nhân bản và lưu trữ cùng với phage
- Vector phage  $\lambda$  chứa ít trình tự nhận biết của enzyme cắt giới hạn

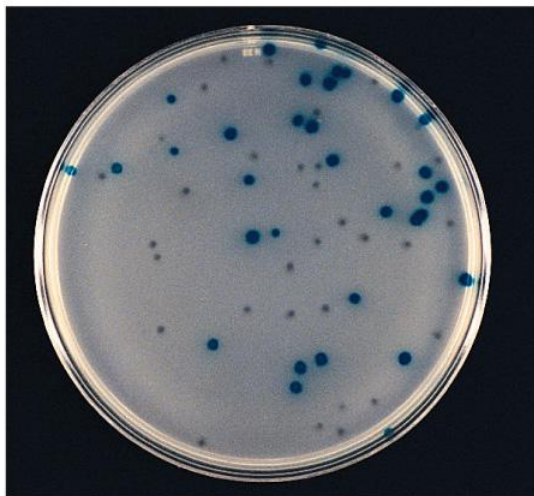


# Các vector tạo dòng khác

- Cosmid:
  - + Kết hợp được ưu điểm của plasmid và phage  $\lambda$
  - + Phân tử plasmid chứa vị trí *cos* của phage  $\lambda$  để lắp vào trong phân tử phage  $\lambda$
  - + Hiệu suất chuyển gen cao hơn
  - + Plasmid tái tổ hợp bền hơn trong tế bào chủ
- Nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (yeast artificial chromosome, YAC):
  - + Kích thước 10 kb mang được DNA 200 – 800kb
  - + Sao chép như một nhiễm sắc thể bình thường của nấm men
- Thực khuẩn thể M13:
  - + Bộ gen mạch đơn
  - + Thường dùng để giải trình tự DNA

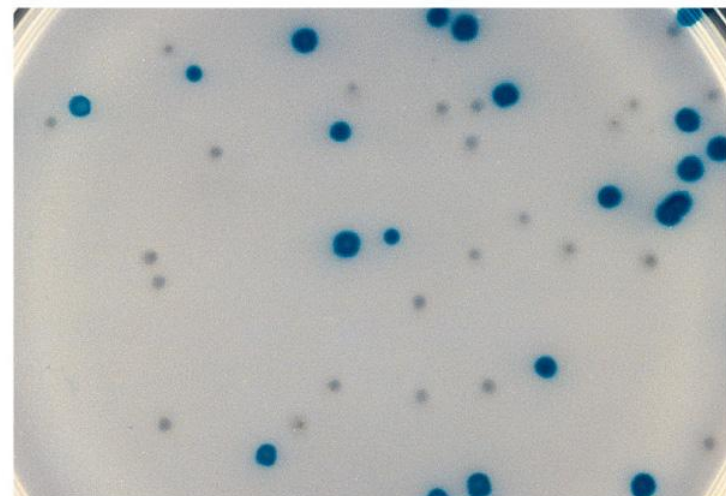


(a) M13mp18



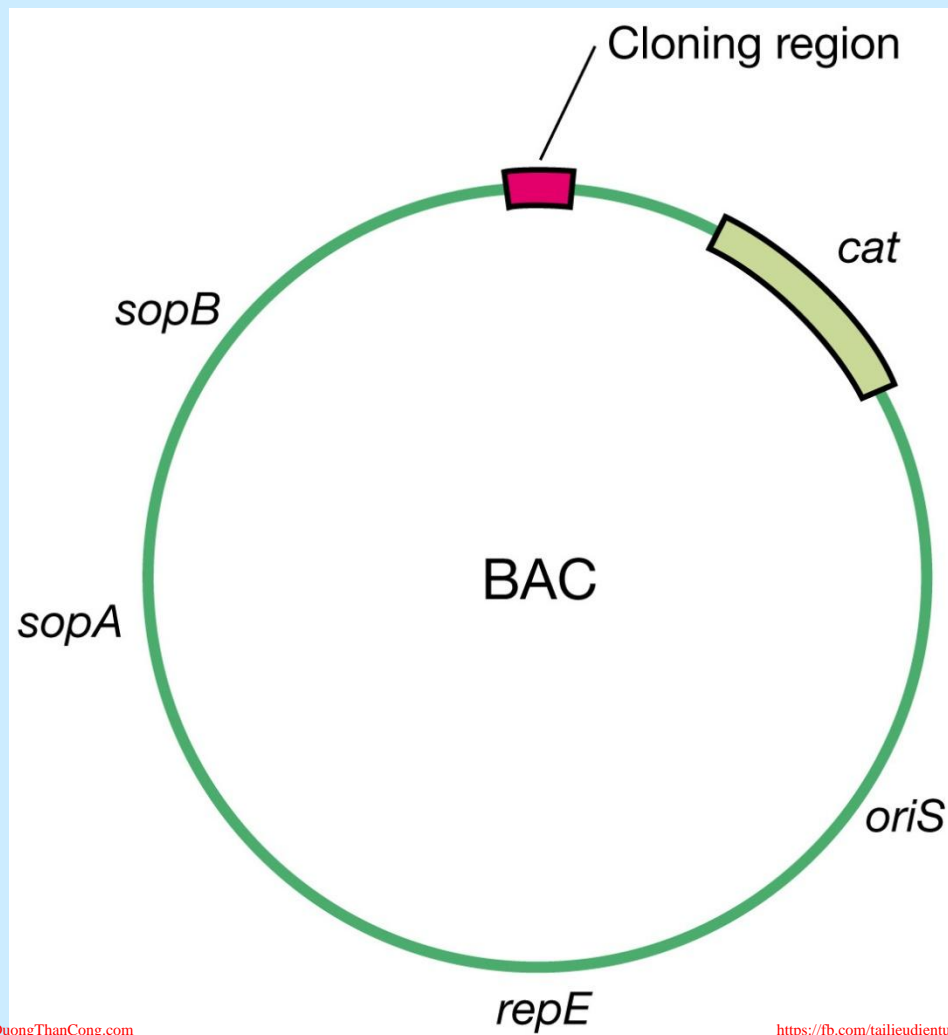
J. Parker

(b)



J. Parker

(c)



# Tế bào chủ

## - *E. coli*:

- + Tế bào chủ phổ biến nhất
- + Vi sinh vật gây bệnh cơ hội
- + Không tiết enzyme

## - *Bacillus subtilis*:

- + Không gây bệnh, không tạo nội độc tố, tiết protein
- + Plasmid không ổn định trong tế bào chủ

## - *Saccharomyces cerevisiae*:

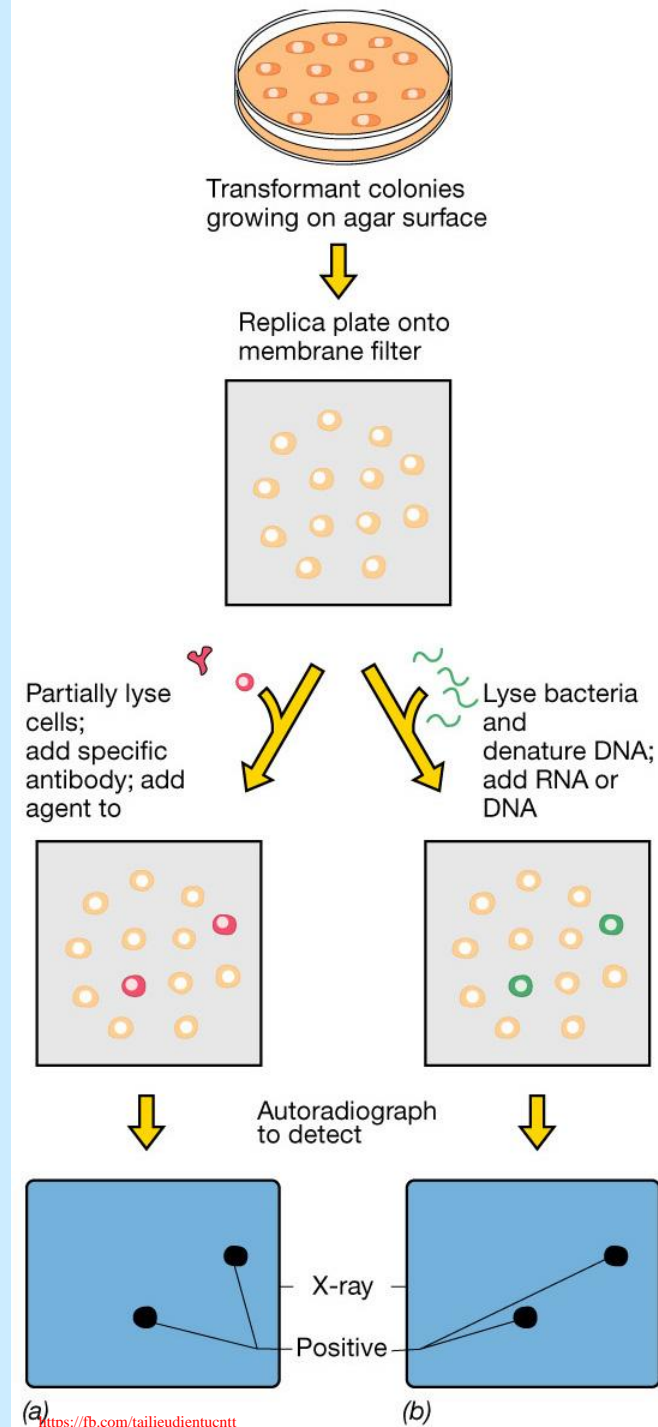
- + Tế bào eukaryote được nghiên cứu di truyền kỹ nhất
- + Sử dụng để thể hiện gen eukaryote

## - Virút động vật (SV40, retrovirus...):

- + Dùng để dòng hóa gen vào tế bào hữu nhũ, cơ chế tiềm tan

# Tuyển chọn dòng mục tiêu

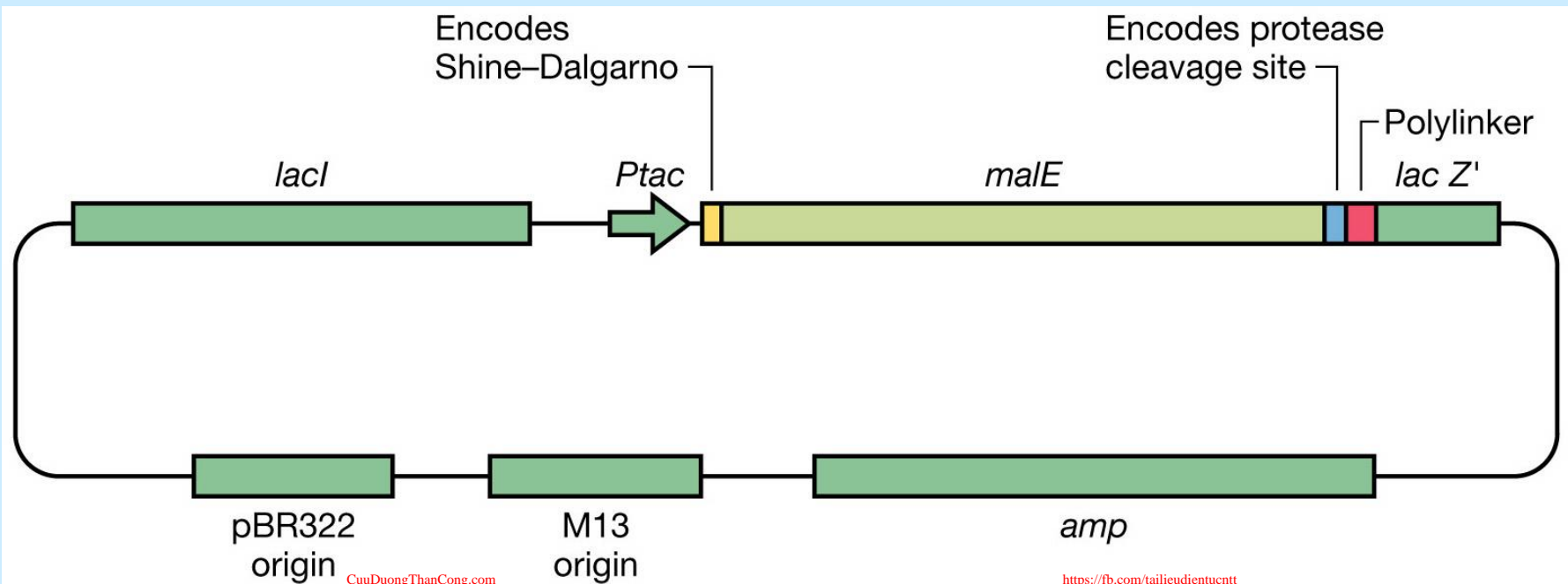
- Gen được biểu hiện trong tế bào chủ là vi khuẩn:
  - + Lai miễn dịch (Western blotting, Immunoblotting)
  - + Hoạt tính enzyme
  - + Bổ trợ đột biến (gen ngoại lai đồng dạng với gen của tế bào chủ)
- Gen ngoại lai không biểu hiện trong tế bào chủ:
  - + Lai *insitu*:
  - + Lai khuẩn lạc (colony hybridization): vector là plasmid
  - + Lai plaque (plaque colonization): vector là phage

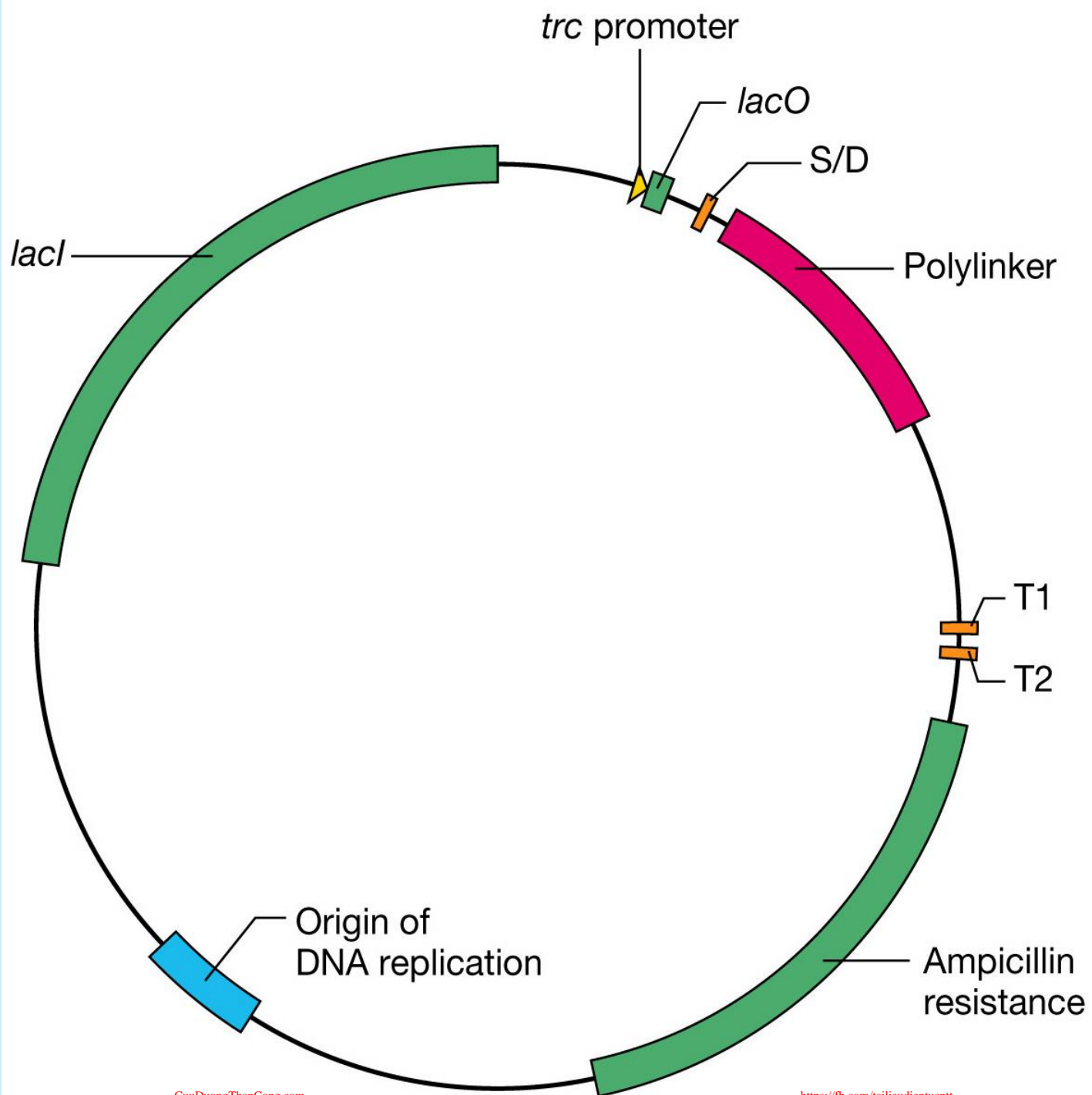


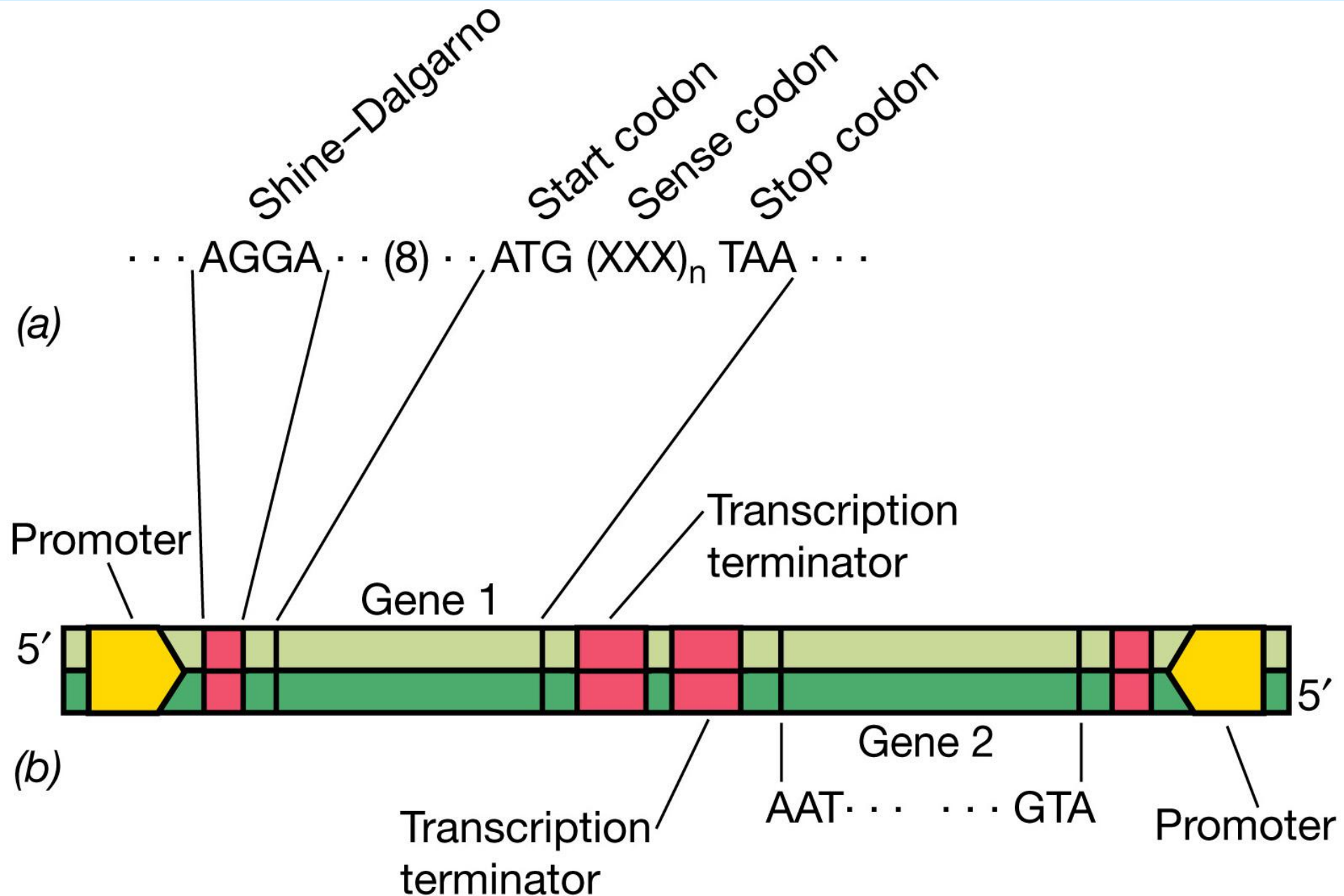


# Vector biểu hiện (expression vector)

- Để biểu hiện gen ngoại lai:
  - + Thu protein tái tổ hợp
  - + Nghiên cứu các yếu tố điều hòa thể hiện của gen
- Gen ngoại lai được kiểm soát bằng promoter được nhận diện bởi RNA polymerase của tế bào chủ:
  - + Promoter mạnh
  - + Khung dịch mã đúng
  - + Promoter thường dùng: *lac*, *trp* (cơ chế tắt mở)

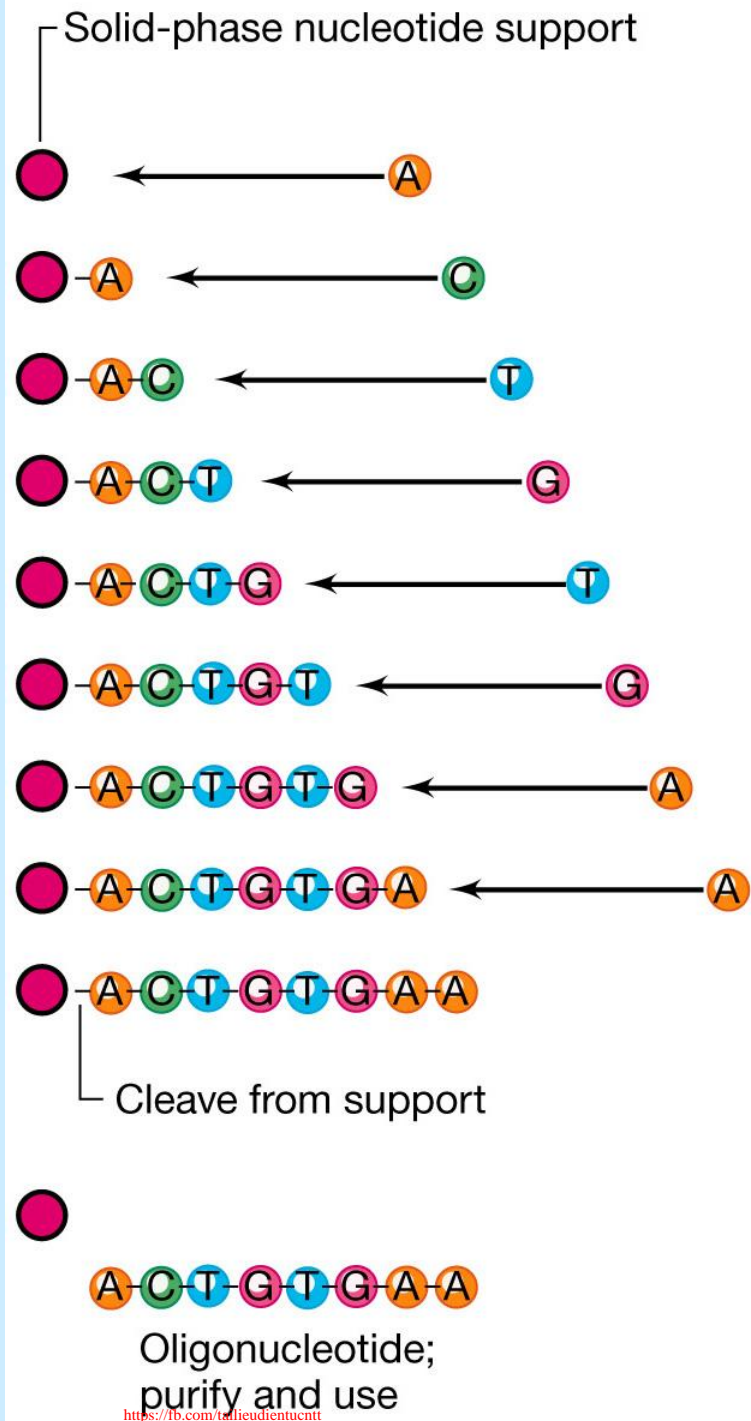






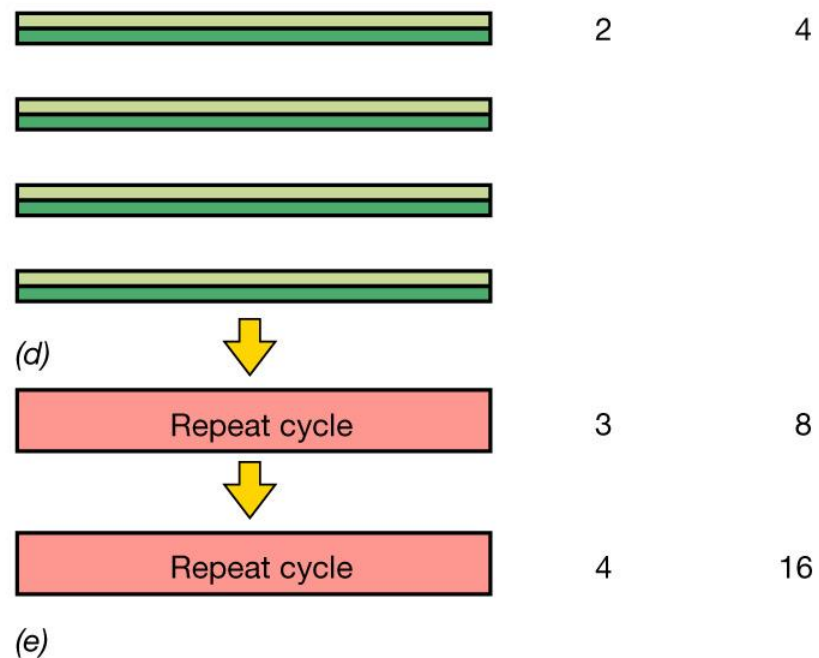
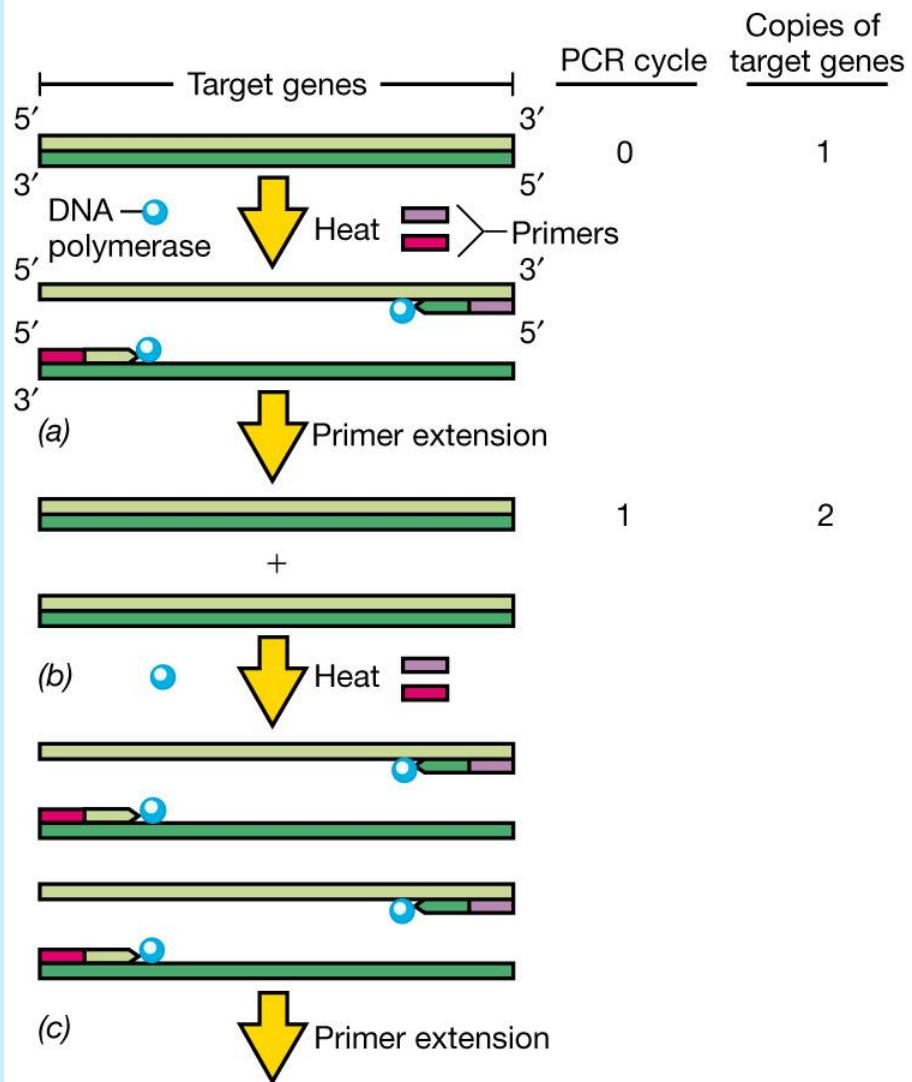
# Tổng hợp hóa học oligonucleotide

Ngày nay, về mặt kỹ thuật có thể tổng hợp hóa học được những đoạn DNA ngắn (30 – 35 base). Quy trình diễn hình để tổng hợp các đoạn DNA này là gắn nucleotide đầu tiên lên một giá thể rắn có lỗ, sau đó tuần tự gắn vào các nucleotide tiếp theo. Mạch DNA sẽ được kéo dài ra khỏi các lỗ. Các đoạn DNA tổng hợp này được dùng cho nghiên cứu và trong công nghệ di truyền.

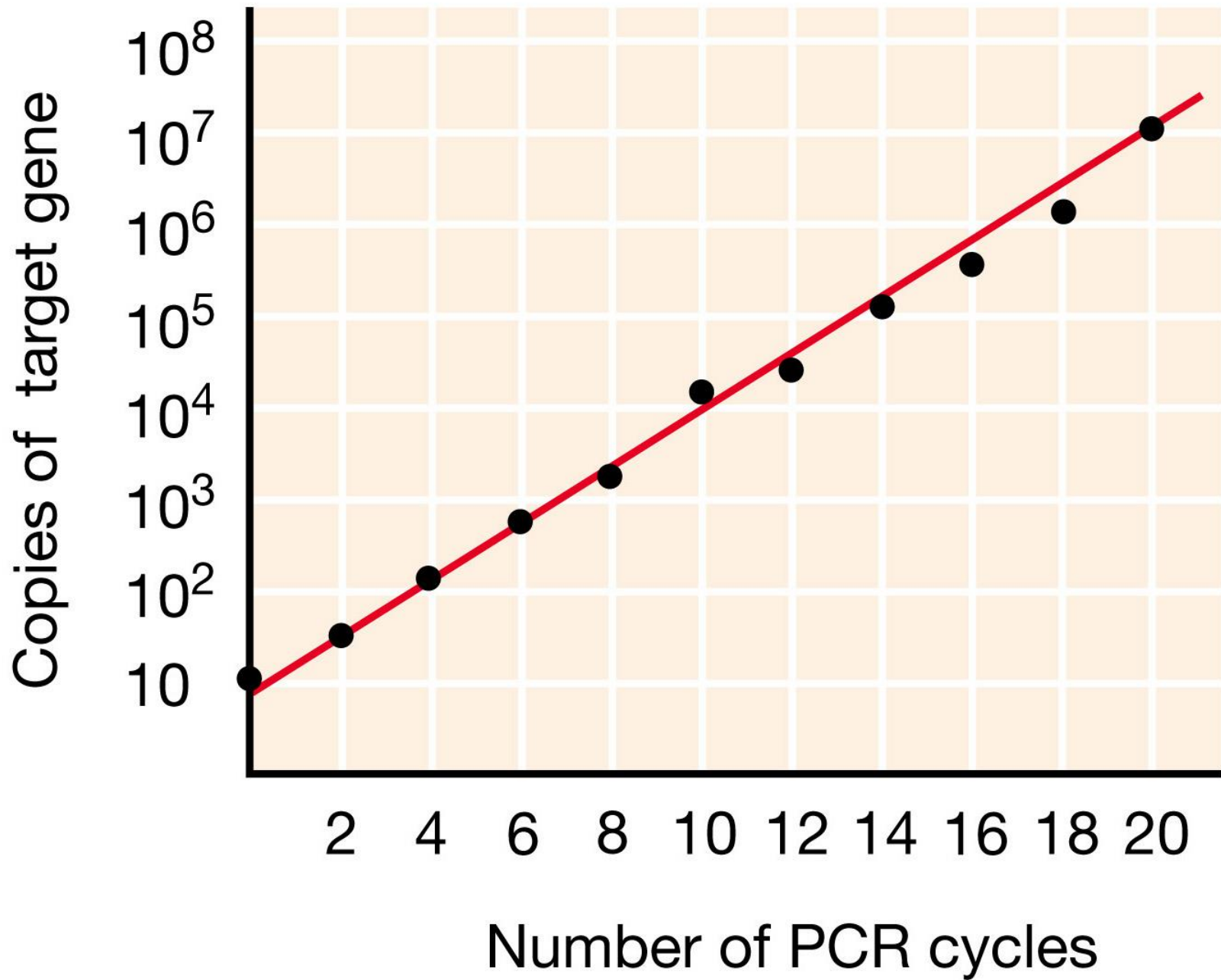


# Khuếch đại bản sao DNA bằng kỹ thuật PCR

- PCR (polymerase chain reaction): phản ứng chuỗi tổng hợp DNA bằng polymerase
- Khuếch đại số lượng bản sao đoạn DNA lên  $10^6$  lần
- Cặp mồi (19-30 nucleotide) được tổng hợp dựa vào trình tự nucleotide ở hai đầu của đoạn DNA cần khuếch đại
- Khuôn tổng hợp: đoạn DNA cần khuếch đại hoặc DNA chứa đoạn cần khuếch đại này
- Mỗi chu kỳ:
  - + Biến tính tạo mạch DNA mạch đơn
  - + Bắt cặp mồi-khuôn
  - + Tổng hợp (kéo dài) bằng *Taq* DNA polymerase chịu nhiệt
  - + Lặp lại nhiều chu kỳ (25 – 30 chu kỳ)



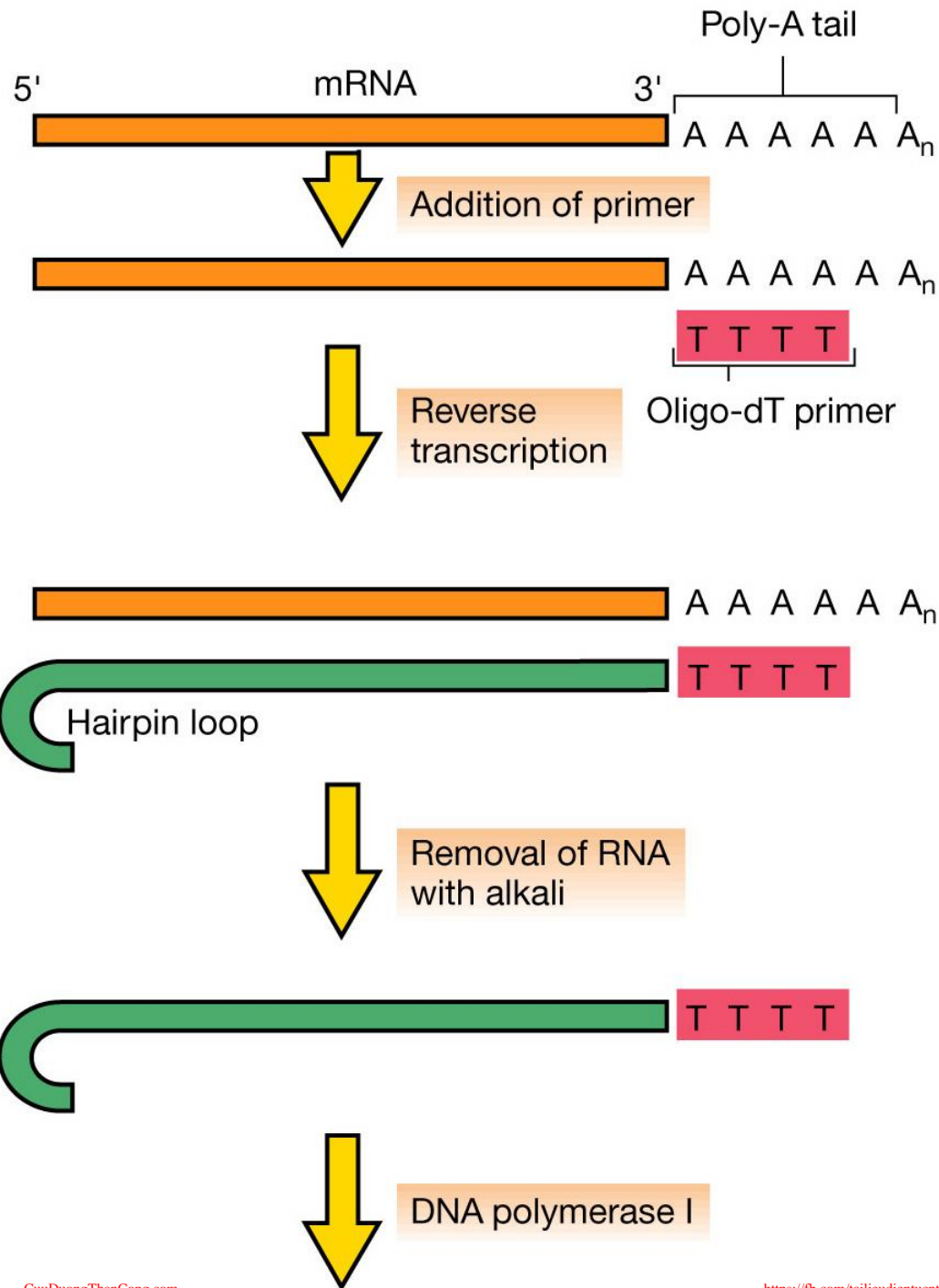


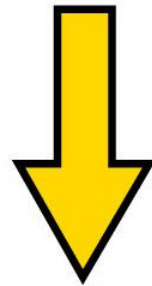
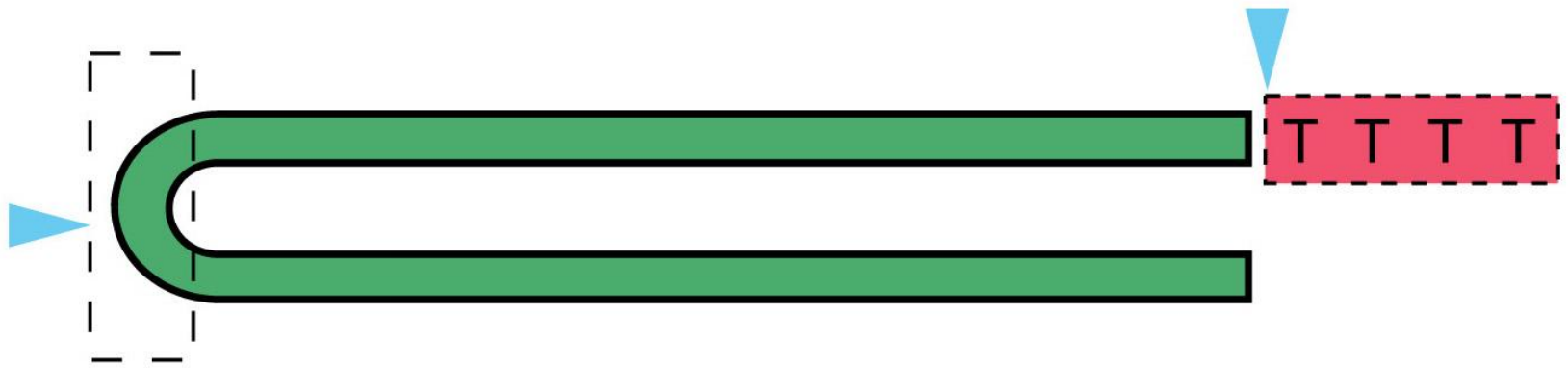


(f)

# Tạo dòng và biểu gen của tế bào nhân thật

- Thiết lập ngân hàng DNA bù trừ (complementary DNA, cDNA, library)
- Trích ly và thu nhận mRNA được từ cơ quan, mô, tế bào
- Tạo cDNA bằng phản ứng phiên mã ngược
- Tái tổ hợp vào một vector thể hiện có promoter mạnh, có một trình tự gắn của ribosome vi khuẩn
- Phương pháp khác:
  - + Gắn và thể hiện gen của eukaryote dung hợp với một gen của prokaryote
  - + Cắt bỏ phần polypeptide của prokaryote khỏi protein dung hợp





Single-strand-specific  
nuclease



Double-stranded DNA



Clone

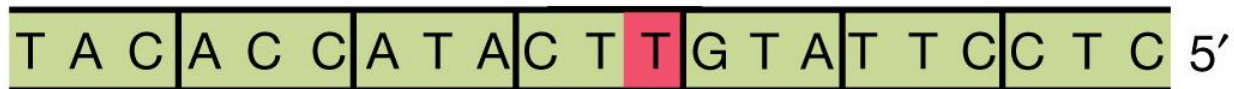
## Protein



## Possible mRNA codons



## DNA oligonucleotides (possible probes)



and so on

## Preferred DNA sequence



# Tạo đột biến

- Đột biến điểm (site-directed mutagenesis): đột biến *in vitro* sai khác một base:
  - + Dùng oligonucleotide có 1 base được biến đổi
  - + Gắn oligonucleotide này lên khuôn DNA ban đầu
  - + Kéo dài oligonucleotide bằng DNA polymerase thành DNA mạch kép
  - + Gắn vào một vector thể hiện và đưa vào tế bào chủ
  - + Kết quả: thay thế một amino acid chuyên biệt trên phân tử protein
  - + Dùng để kiểm tra bằng thực nghiệm giả thiết về mối quan hệ giữa cấu trúc bậc một với chức năng của phân tử protein
- Đột biến hộp (cassette mutagenesis): thay đổi một đoạn DNA (cassette)
  - + Một đoạn DNA trên gen ban đầu được lấy ra khỏi gen
  - + Thay bằng DNA tổng hợp, được thay đổi một hoặc vài cặp base
- Đột biến phá vỡ gen: thay một đoạn DNA trong gen ban đầu bằng một đoạn có tính kháng kháng sinh

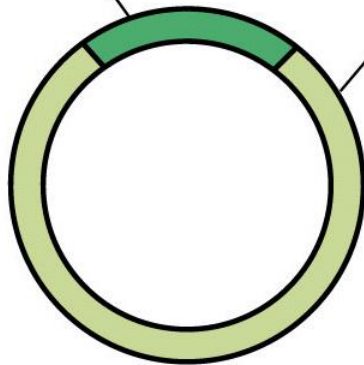




Source  
gene



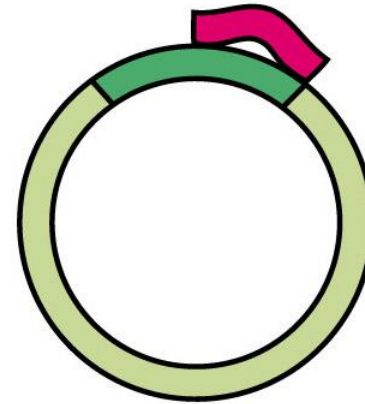
Clone into  
single-stranded  
vector



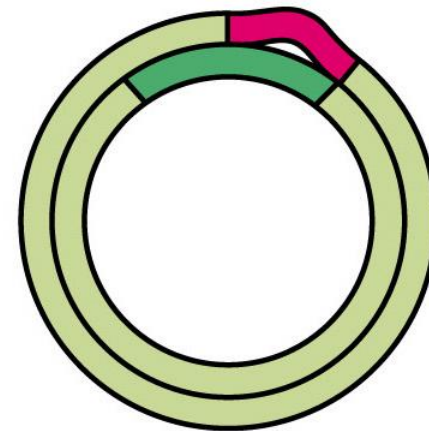
Single-stranded  
DNA from M13  
phage



Add synthetic  
oligonucleotide with  
one base mismatch

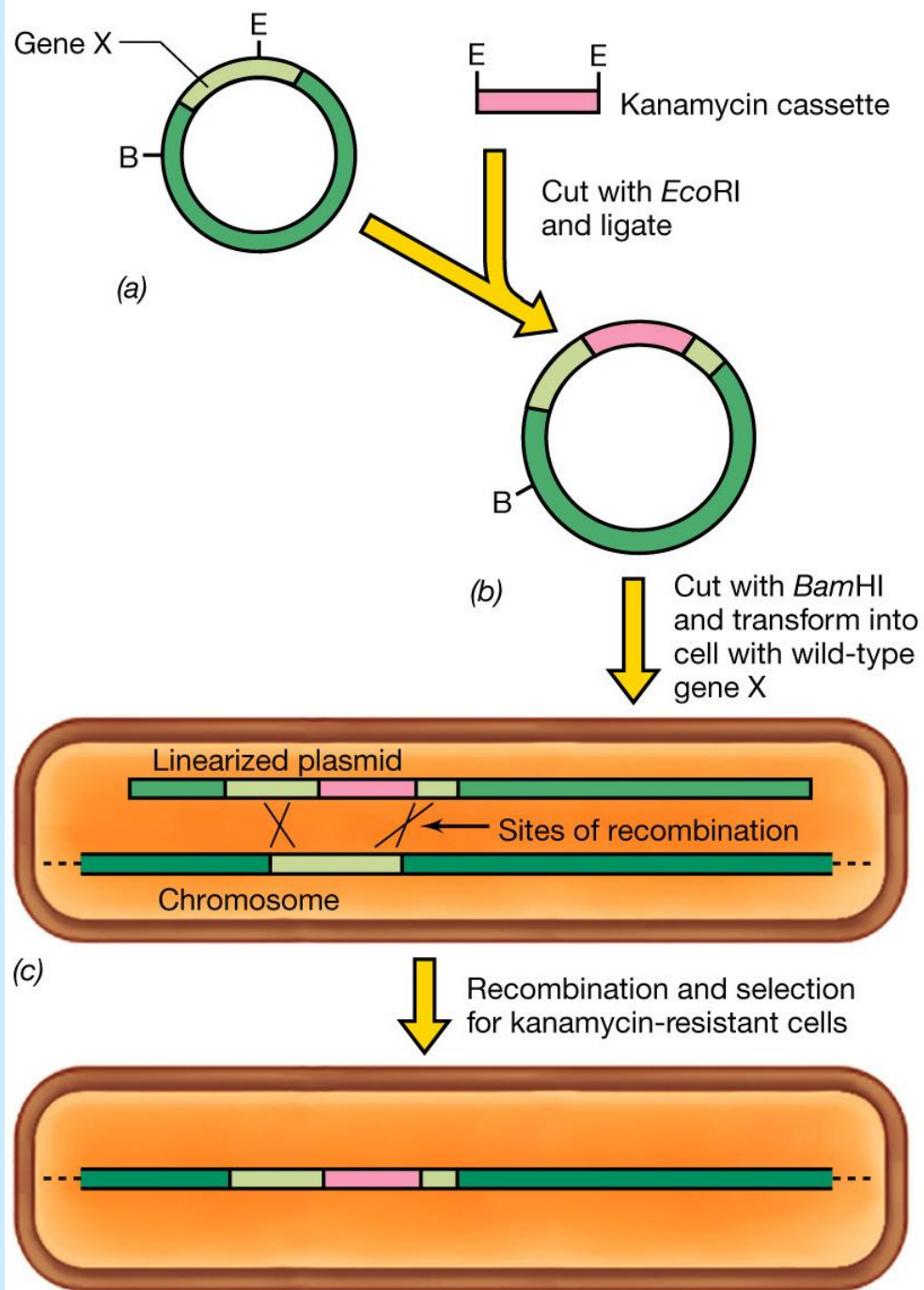


Extend single  
strand with  
DNA polymerase



Transformation

Clone and  
select mutant

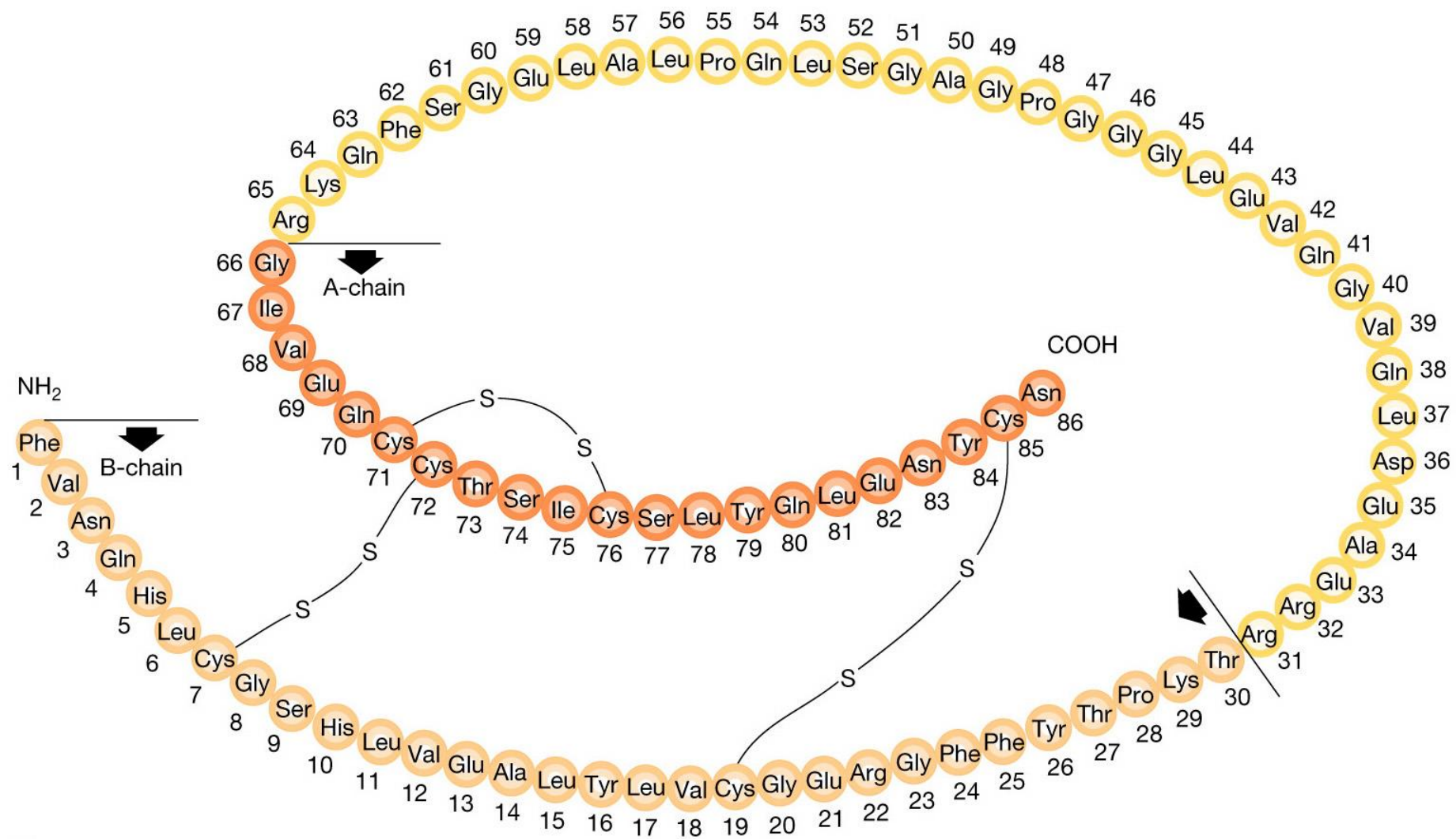


# Ứng dụng thực tiễn của kỹ thuật di truyền

- Sản xuất những sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật
- Sản xuất vắc xin phòng chống virus
- Sản xuất protein của động vật hữu nhũ
- Tạo ra các thực vật, động vật chuyển gen
- Phân lập và ứng dụng nguồn gen vi sinh trong xử lý môi trường
- Tạo các thuốc điều hòa sự thể hiện của gen
- Liệu pháp gen chữa trị các bệnh di truyền

# **Sản xuất protein hữu nhũ tái tổ hợp bằng vi sinh vật**

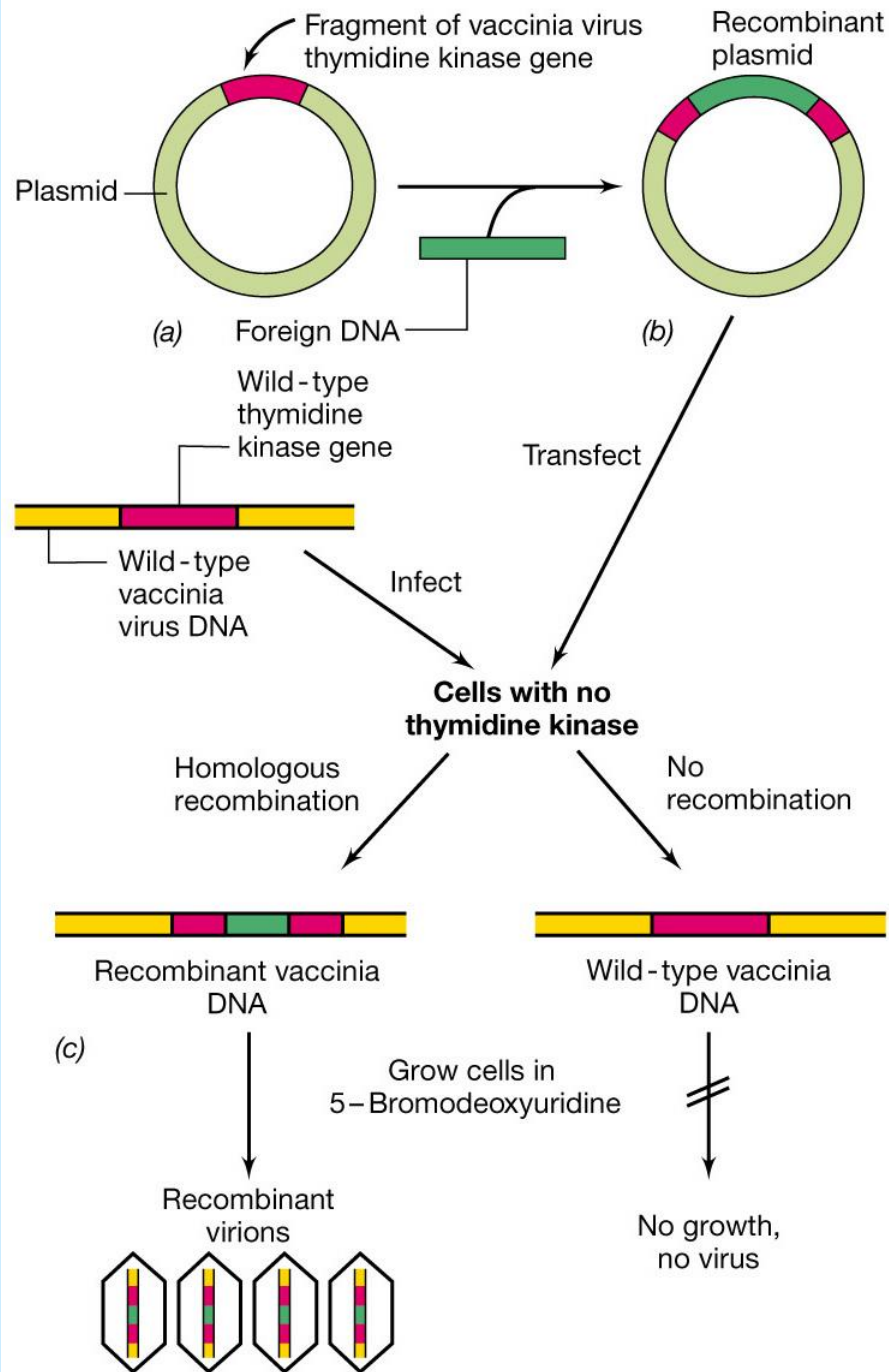
- Insulin**
- Vắcxin tái tổ hợp**
- Vắcxin DNA**
- Cytokine...**



(a)



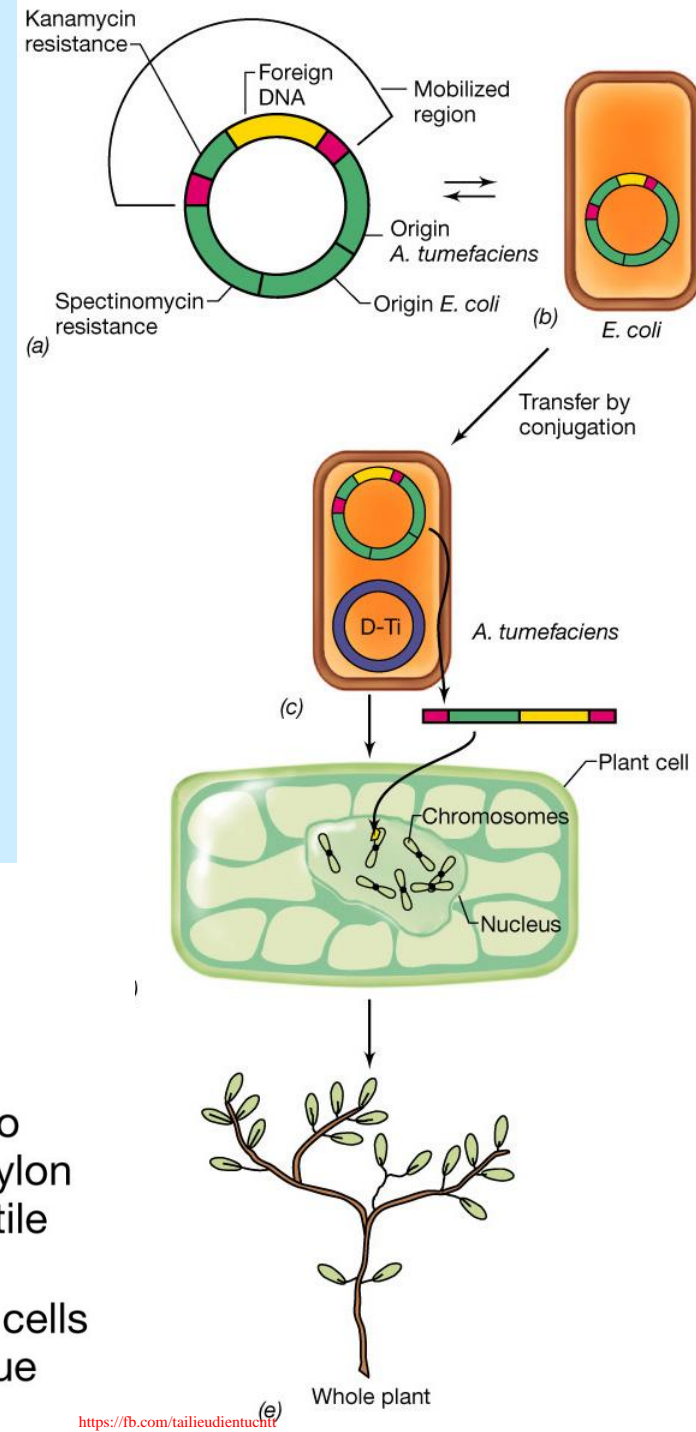
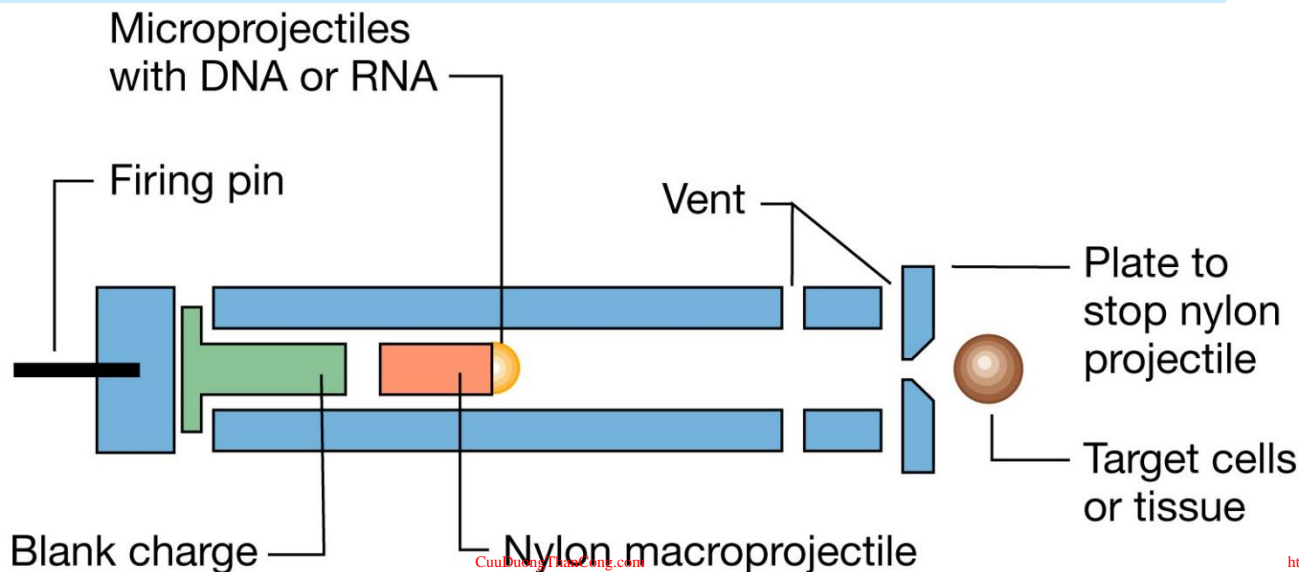
(b)





# Ứng dụng trong cây trồng

- Vector tạo dòng ở tế bào thực vật
- Ứng dụng trong công nghệ sinh học TV



# Ứng dụng trên vật nuôi và y học

- Động vật chuyển gen
- Di truyền học người

# **Các nguyên tắc căn bản của kỹ thuật di truyền (1)**

- **Hóa học DNA:** qui trình ly trích, giải trình tự, tổng hợp DNA
- **Enzyme học DNA:** enzyme cắt giới hạn, ligase, DNA polymerase
- **Sao chép DNA:** cơ chế sao chép DNA, sao chép độc lập của các vector
- **Plasmid và giao nạp:** plasmid, cơ chế sao chép, chuyển gen bằng plasmid
- **Phage ôn hòa:** cơ chế sao chép, sát nhập của phage ôn hòa, cơ chế tải nạp
- **Biến nạp:** các phương pháp chuyển DNA trần vào tế bào
- **Hóa học và enzyme học RNA:** phương pháp thao tác với mRNA, cấu trúc, cơ chế chế biến mRNA

# **Các nguyên tắc căn bản của kỹ thuật di truyền (2)**

- Sao chép ngược: RTase, tổng hợp DNA từ mRNA
- Phiên mã: các nhân tố tham gia điều hòa sự phiên mã, promoter và cơ chế điều hòa operon
- Dịch mã: các bước dịch mã, sự gắn ribosome lên mRNA, vai trò của mã khởi đầu và ý nghĩa của khung đọc đúng
- Hóa học protein: các phương pháp ly trích, tinh chế, thử hoạt tính và giải trình tự amino acid
- Sự tiết protein và biến đổi sau dịch mã: cơ chế tiết protein, các biến đổi sau dịch mã
- Bộ mã di truyền: bộ mã di truyền, tính toàn năng, mã ngoại lệ

