

## **CHƯƠNG 4**

# **DI TRUYỀN HỌC VI SINH VẬT**

Chương này đề cập đến các nội dung liên quan đến vấn đề di truyền ở đối tượng vi sinh vật, gồm các nội dung như di truyền học phân tử, di truyền học vi sinh vật và kỹ thuật di truyền.

Vấn đề trung tâm của di truyền học phân tử là dòng thông tin trong tế bào (từ DNA đến protein), sự điều hòa dòng thông tin này. Các câu hỏi cần giải đáp là bằng cách nào thông tin trong một gen ở dạng trình tự các nucleotide được chuyển đổi thành trình tự amino acid của một protein (tuy nhiên, một số gen không mã hóa cho protein mà mã hóa cho RNA). Mặt khác cơ chế nào giúp sự sao chép của bộ gen để một bản sao phải được chuyển cho mỗi tế bào con trong quá trình phân bào. Các cơ chế điều hòa sự thể hiện của gen giúp thể hiện các gen cần thiết đúng liều lượng, đúng lúc để thích nghi với điều kiện thay đổi của môi trường từ bộ gen chứa thông tin mã hóa của tất cả các gen. Sự điều hòa còn thể hiện ở chỗ thậm chí khi một enzyme được tổng hợp và hiện diện trong tế bào, enzyme này có thể không có hoạt tính ở một số điều kiện nhất định.

Về di truyền vi sinh vật, trước tiên các đặc tính sinh học cơ bản của virút được đề cập vì đây là một đối tượng có đóng góp lớn cho sự phát triển của di truyền học vi sinh vật. Virút là những yếu tố di truyền không tế bào chỉ gồm nucleic acid được bao bọc bởi một vỏ protein. Virút có kích thước 0,02 – 0,03 $\mu$ m nhỏ hơn tế bào. Khi hiện diện bên ngoài tế bào, phần tử virus không có hoạt động biến dưỡng và được gọi là virion. Do không có bộ máy biến dưỡng nên virút cần xâm nhiễm vào tế bào chủ và dùng hệ thống ribosome, enzyme, các nguồn vật chất và năng lượng của tế bào để tự nhân đôi. Tế bào vi khuẩn, động vật, thực vật đều có thể bị nhiễm bởi các virút chuyên biệt. Bằng cách này, virút là một tác nhân quan trọng trong sự chuyển đổi thông tin di truyền và gây đột biến ở vi sinh vật. Thông tin di truyền trong bộ gen của vi sinh vật có thể được biến đổi do đột biến hay do sự chuyển gen từ vi sinh vật này sang vi sinh vật khác. Trong phương thức chuyển gen, sự thành công của phương thức này phụ thuộc vào hai bước: việc đưa thành công gen từ tế bào cho (donor) sang tế bào nhận (recipient) và sự tái tổ hợp các gen này vào trong bộ gen của tế bào nhận. Di truyền học vi sinh vật có vai trò quan trọng trong nghiên cứu di truyền do gen là nền tảng của hoạt động tế bào và do vi sinh vật là công cụ ưu việt để nghiên cứu chức năng của gen.

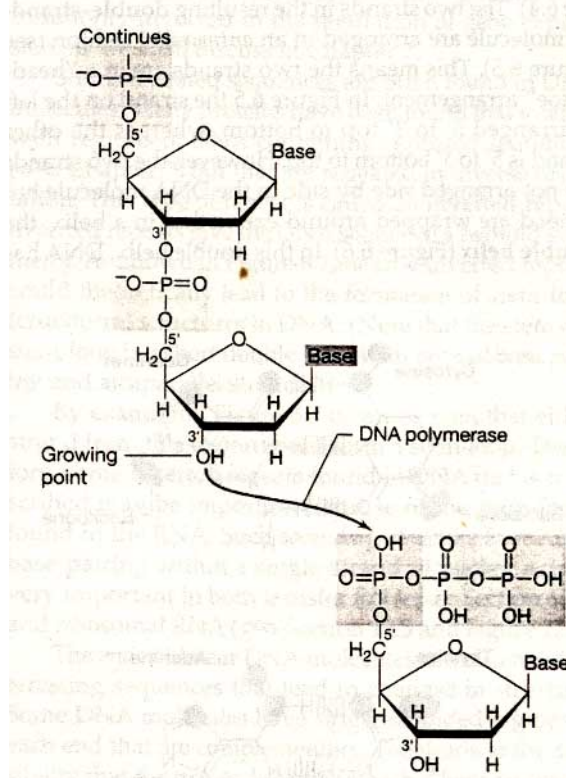
Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu di truyền học vi sinh vật có khả năng ứng dụng to lớn, đặc biệt là kỹ thuật di truyền hay kỹ thuật gen, tức là những kỹ thuật tinh tế nhằm phân lập một gen, nghiên cứu trình tự và sự điều hòa thể hiện của gen. Kỹ thuật di truyền được sử dụng trong nghiên cứu cũng như trong các ứng dụng thực tiễn. Việc ứng dụng kỹ thuật di truyền trong những ứng dụng có thể thương mại hóa thường được gọi là công nghệ sinh học.

### **1. Di truyền học phân tử**

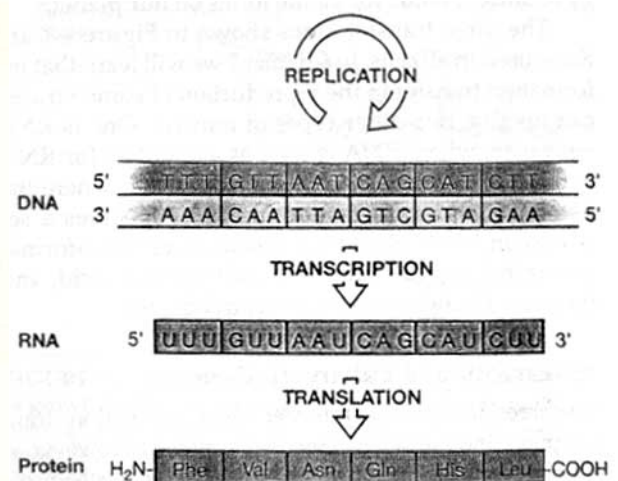
#### **1.1. Học thuyết trung tâm (central dogma)**

Trong tế bào prokaryote và eukaryote, DNA được dùng làm khuôn để thông tin di truyền được sao chép trung thực bằng sự bắt cặp của các base bổ sung trong quá trình

sao chép và trong sinh tổng hợp protein. Ba base sẽ mã hóa cho một amino acid. Có 20 amino acid khác nhau đi vào thành phần của hầu hết các protein. Thông tin di truyền được mã hóa trong trình tự các base purine và pyrimidine trong mạch polynucleotide. Trong nucleic acid, nhóm phosphate tạo liên kết cộng hóa trị giữa carbon vị trí số 3 trong đường ribose của một nucleotide này với carbon vị trí số 5 của đường ribose của nucleotide kế cận. Cấu tạo này làm phân tử nucleic acid phân cực và có đầu 3' và đầu 5'. Điều cần nhớ là các phân tử RNA và DNA mới đều được tổng hợp theo chiều từ 5' về 3' (Hình 4.1). Phân tử DNA được cấu tạo từ 4 loại base khác nhau là adenine, guanine, cytosine và thymidine. Các quá trình hỗ trợ cho sự tăng trưởng và phân chia của tế bào bao gồm: sao chép (replication) để nhân đôi DNA; phiên mã (transcription) để chuyển thông tin di truyền trong DNA thành RNA; dịch mã (translation) để chuyển thông tin di truyền trong RNA thành trình tự amino acid của protein. Sự truyền thông tin một chiều từ nucleic acid đến protein được gọi là học thuyết trung tâm (the Central Dogma) của sinh học phân tử (Hình 4.2).



Hình 4.1 Mạch DNA được kéo dài tại đầu 3' (tổng hợp theo chiều 5' – 3')



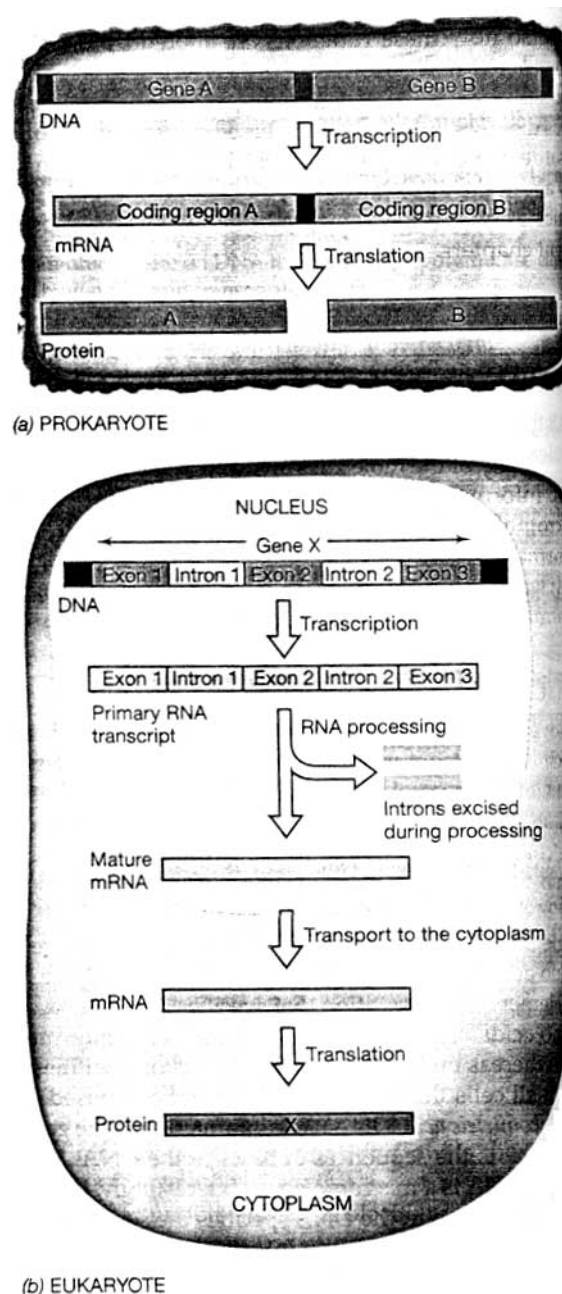
Hình 4.2 Học thuyết trung tâm (The Central Dogma)

## 1.2. Dòng thông tin trong prokaryote và eukaryote

Bộ gen của tế bào eukaryote được chứa trên một số nhiễm sắc thể. Mỗi nhiễm sắc thể chứa một phân tử DNA mạch thẳng và các nhiễm sắc thể nằm bên trong màng nhân. Do vậy, quá trình tổng hợp mRNA và quá trình dịch mã là tách biệt nhau về không gian, không bắt cặp nhau chặt chẽ như trong tế bào prokaryote (Hình 4.3). Ngoài ra, các gen trong tế bào eukaryote chứa những trình tự nucleotide không mang thông tin được gọi là intron xen kẽ với các đoạn trình tự mang thông tin được gọi là exon. Trong quá trình phiên mã, trước tiên một phân tử tiền mRNA (pre-mRNA, primary transcript)

chứa đầy đủ các introns và exons được tổng hợp từ DNA trong nhân. Khi phân tử di chuyển qua màng nhân vào tế bào chất thì các intron bị cắt bỏ để tạo thành mRNA hoàn chỉnh chỉ chứa exons.

Một số đặc điểm cần lưu ý khác là ở tế bào prokaryote, một phân tử mRNA thường chứa nhiều vùng mã hóa của các gen riêng biệt, được gọi là polycistronic. Đối với eukaryote, mRNA luôn luôn chỉ chứa vùng mã hóa thông tin của một gen (monocistronic).



**Hình 4.3** Khác biệt về dòng thông tin trong tế bào prokaryote (a) và eukaryote (b)

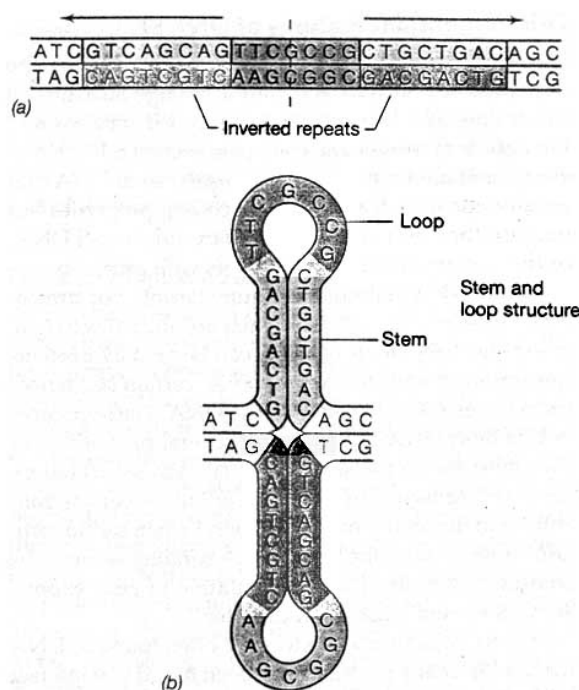
### 1.3. Đặc điểm cấu trúc nhiễm sắc thể của prokaryote

Nhiễm sắc thể ở prokaryote có cấu tạo đơn giản hơn ở tế bào nhân thật. Đó là một phân tử DNA xoắn kép và vòng kín. Cấu trúc này dẫn đến một số hệ quả quan

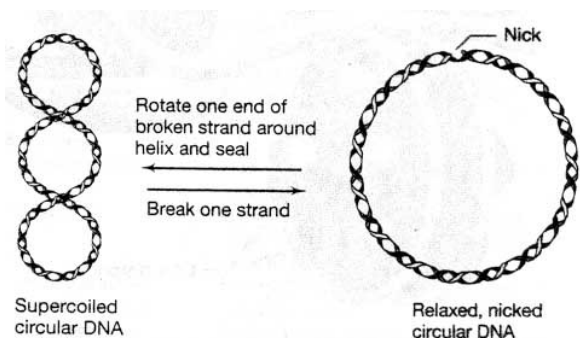
trọng về dòng thông tin ở tế bào prokaryote. Vòng xoắn hình thành hai loại khe trong phân tử. Protein gắn DNA (DNA-binding protein) có vai trò điều hòa sự thể hiện của gen thường gắn vào DNA ở khe lớn. Trình tự nucleotide có thể làm phân tử DNA hình thành cấu trúc bậc 2 trong đó các nucleotide trên một mạch DNA sẽ bắt cặp với nhau tạo thành cấu trúc thân-vòng (stem-loop) hay kẹp tóc (hair spin). Các cấu trúc này được hình thành tại một vùng nhất định trên phân tử DNA mà trình tự nucleotide có chứa các trình tự lặp lại đảo ngược (inverted repeat) (Hình 4.4). Các cấu trúc thân hoặc vòng chính là vị trí nhận biết (recognition site) để protein điều hòa gắn vào DNA.

Mặt khác, trong tế bào, phân tử DNA thường có dạng xoắn chặt hơn, gọi là siêu xoắn (supercoil) (Hình 4.5). Sự siêu xoắn gây khó khăn cho enzyme sao chép và phiên mã khi cần đọc một DNA mạch đơn dùng làm khuôn. Do vậy, cần có hệ enzyme topoisomerase giúp điều hòa mức độ xoắn này. Trong tế bào prokaryote, topoisomerase II giúp cho DNA hình thành cấu trúc siêu xoắn còn topoisomerase I giúp cấu trúc này giải xoắn. Khi bị đứt một base thì phân tử DNA mất cấu trúc siêu xoắn (Hình 4.6).

Tính chất mềm dẻo của phân tử DNA thay đổi theo chiều dài của phân tử này. Phân tử DNA dài thường rất mềm dẻo trong khi các đoạn DNA ngắn hơn 100bp thì cứng rắn hơn. Do vậy, ở DNA dài, một trình tự nucleotide nhất định (gồm một số trình tự lặp lại của 5 hoặc 6 adenine trên cùng một mạch và mỗi trình tự lặp lại này cách nhau bởi 4 – 5 base) có thể làm cong mạch DNA.



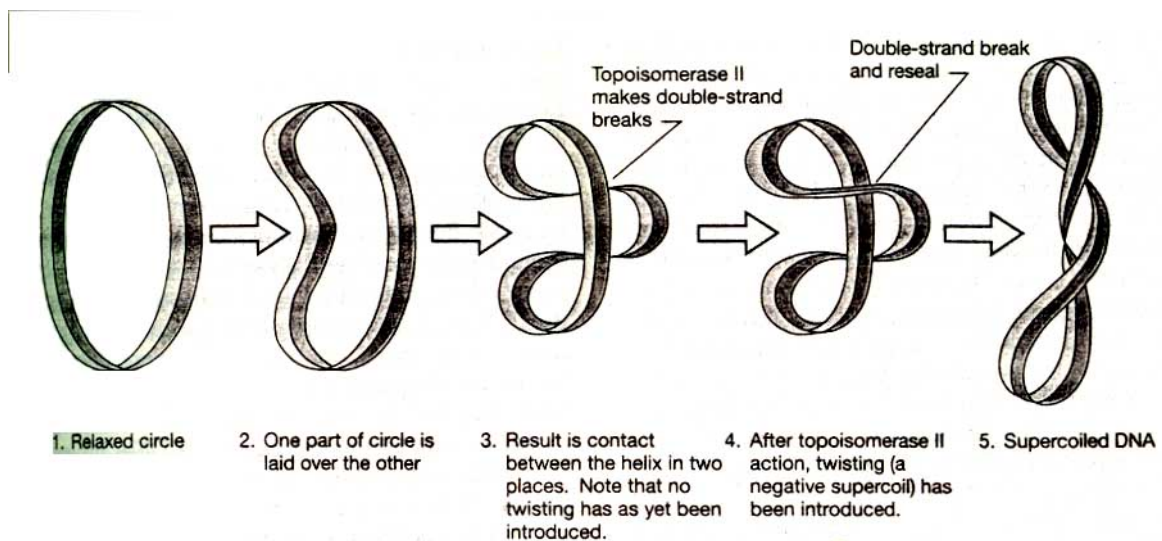
**FIGURE 6.7** Inverted repeats and the formation of a stem-loop structure. (a) Nearby inverted repeats in DNA. The arrows indicate the symmetry around the imaginary axis (dashed line). (b) Formation of stem-loop structures (cruciform structures) by pairing of complementary bases on the same strand.



**Hình 4.5** Dạng siêu xoắn và dạng mở của DNA mạch vòng

**Hình 4.4** Sự tạo thành cấu trúc thân-vòng (stem-loop) bởi các đoạn trình tự lặp lại đảo ngược





Hình 4.6 Sự hình thành cấu hình siêu xoắn ở DNA mạch vòng bởi hoạt tính của topoisomerase II

#### 1.4. Đặc điểm cấu trúc nhiễm sắc thể của eukaryote

So với tế bào prokaryote, kích thước nhiễm sắc thể của tế bào eukaryote lớn hơn nhiều. Ở eukaryote, DNA chứa một trình tự chuyên biệt được gọi là telomere ở hai đầu và một centromere ở giữa nhiễm sắc thể. Cấu trúc chung của một nhiễm sắc thể ở tế bào eukaryote là một loạt các nucleosome. Mỗi nucleosome chứa khoảng 200 cặp base. Khác với prokaryote, eukaryote gồm ba nhóm DNA: (1) DNA một bản sao, mã hóa cho các protein chủ yếu của tế bào; (2) DNA lặp lại trung bình, chứa một vài cho tới một số lượng lớn bản sao, mã hóa một số đại phân tử chính trong tế bào (histone, immunoglobulin, rRNA, tRNA); (3) DNA lặp lại cao hay DNA vệ tinh (satellite DNA), hiện diện với số lượng lớn bản sao và chiếm 20 – 30% tổng DNA trong tế bào, có chức năng chưa rõ.

#### 1.5. Các phương pháp nghiên cứu DNA

Vật liệu di truyền của tế bào có thể được nghiên cứu bằng một số phương pháp khác nhau như sau.

- DNA có thể được tinh chế theo qui trình: làm tan tế bào, làm biến tính và loại bỏ protein, thủy phân RNA bằng enzyme. Phân tử DNA có thể được phân đoạn bằng ly tâm gradient đẳng tỷ trọng hoặc bằng điện di gel. Cơ sở của sự khác biệt về tỷ trọng giữa các phân tử DNA là số cặp base G-C (guanine-cytosine) hay thành phần G-C. Cặp G-C có 3 liên kết hydrogen thay vì 2 như cặp A-T (adenine-thymine) do vậy gắn 2 mạch chặt hơn. Phân tử DNA có thành phần GC lớn sẽ có tỷ trọng nhỏ hơn. Khi ly tâm gradient tỷ trọng, ở vận tốc ly tâm lớn, phân tử DNA dừng lại ở vị trí trong ống ly tâm có tỷ trọng bằng với tỷ trọng của DNA.

Trong điện di, phân tử DNA có điện tích âm trong dung dịch điện di sẽ di chuyển về cực dương trong điện trường. Vận tốc di chuyển của các phân tử DNA khác nhau tùy thuộc kích thước của DNA do chúng phải chui qua các lỗ trong thạch agarose. DNA có thể được phát hiện dựa vào huỳnh quang khi nhuộm DNA với phẩm nhuộm ethydium

bromide. Mặt khác, DNA có thể được phát hiện bằng cách đánh dấu phóng xạ bằng một số phương pháp khác nhau để đưa  $^{32}\text{P}$  vào phân tử DNA.

- Cấu trúc của phân tử DNA có thể được khảo sát dựa vào điểm tan chảy (melting point) là giá trị phản ánh thành phần GC của DNA. Như đã đề cập, giữa cặp AT có hai liên kết hydrogen và cặp GC có 3 liên kết hydrogen. Ở điều kiện nhiệt độ phòng và nồng độ muối sinh lý bình thường của tế bào, DNA tồn tại ở dạng mạch kép. Ở nhiệt độ cao, liên kết hydrogen bị phá vỡ, hai mạch tách nhau. Quá trình này được gọi là sự tan chảy (melting). Các phân tử DNA khác nhau ở thành phần GC và AT. Khi thành phần GC của phân tử DNA cao, hai mạch được gắn với nhau chặt hơn và cần nhiệt độ cao hơn để làm tan chảy DNA. Do vậy, nhiệt độ tan chảy là đặc trưng cho mỗi phân tử DNA và có thể được xác định bằng thực nghiệm. Khi các phân tử DNA mạch đơn có trình tự bù trừ nhau sau khi bị đun tách, trong thời gian nguội dần sẽ tái bắt cặp với nhau thành mạch kép.

- Để biết trình tự chính xác của DNA cần sử dụng các phương pháp giải trình tự. Trình tự của các DNA khác nhau có thể được so sánh với nhau bằng một số phương pháp.

Trong kỹ thuật lai phân tử (hybridization), DNA mạch kép được đun để tách thành sợi DNA mạch đơn. Khi các sợi DNA mạch đơn khác nhau được trộn lại, nếu các vùng trên sợi DNA có trình tự bổ sung với nhau thì sẽ bắt cặp với nhau tại vùng này, khi đó hai vùng DNA này được gọi là lai với nhau. Phương pháp phát hiện sự giống nhau về trình tự này được gọi là lai phân tử. Sự lai có thể được phát hiện bằng cách đánh dấu một trong hai vạch bằng đồng vị phóng xạ hoặc bằng các chất phát quang. Phương pháp lai phân tử được sử dụng để so sánh sự tương đồng của DNA ở nhiều mức độ: trên toàn sợi nhiễm sắc thể hoặc trên một đoạn DNA nhỏ gọi là mẫu dò (probe). Trình tự các phân tử DNA cũng có thể được so sánh trực tiếp bằng cách giải trình tự bằng phương pháp hóa học (Maxam-Gilbert) hoặc phương pháp enzyme (Sanger).

### 1.6. Các yếu tố di truyền

Trong tế bào vi sinh vật có một số yếu tố di truyền (genetic element) không là thành phần của nhiễm sắc thể, ví dụ như bộ gen virút, plasmid, bộ gen ti thể, bộ gen diệp lục thể và các gen chuyển vị (transposable element) (Bảng 4.1).

Bộ gen virút có thể là DNA hoặc RNA, kiểm soát sự tự sao chép và truyền tế bào này sang tế bào khác của virút, hiện diện trong hầu hết prokaryote và eukaryote.

Plasmid chủ yếu được tìm thấy trong prokaryote nhưng cũng hiện diện ở eukaryote, là yếu tố di truyền kích thước nhỏ, hiện diện và sao chép độc lập với nhiễm sắc thể, phần lớn là phân tử vòng, mạch kép.

Gen nhảy là các đoạn DNA có khả năng di chuyển từ vị trí này lên vị trí kia trên nhiễm sắc thể, hiện diện trong cả prokaryote và eukaryote.

### 1.7. Enzyme cắt giới hạn và sự biến đổi DNA

Các enzyme cắt giới hạn (cắt hạn chế, restriction endonuclease) là nhóm các enzyme có tính chuyên biệt cao, có khả năng tấn công và phá vỡ DNA ở những trình tự chuyên biệt. Mỗi enzyme nhận diện một trình tự đối xứng (palindrome) riêng và cắt DNA mạch kép ở trình tự này. Chức năng của các enzyme này trong tế bào là phân hủy DNA

lạ (ví dụ như virút) xâm nhập vào tế bào. DNA trong tế bào được bảo vệ bằng cách bị biến đổi bởi một enzyme khác tại trình tự nhận biết tương ứng, do vậy trình tự này không thể đi vào trung tâm hoạt động của enzyme cắt giới hạn, do đó không bị thủy phân bởi hệ enzyme giới hạn của tế bào.

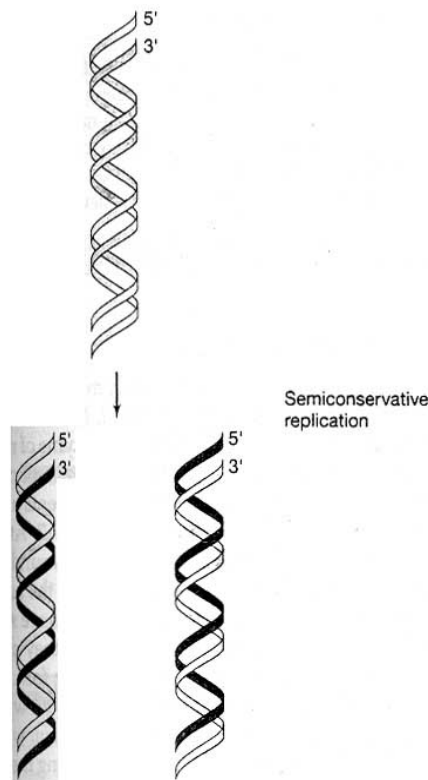
**Bảng 4.1** Các loại yếu tố di truyền

<b>TABLE 6.1</b> Kinds of genetic elements	
Element	Description
<b>Prokaryote</b>	
Chromosome	Extremely long, usually circular, double-stranded DNA molecule
Plasmid	Typically a relatively short, usually circular, double-stranded DNA molecule which is extrachromosomal
Viral genome	Single- or double-stranded DNA or RNA molecule
Transposable element	Double-stranded DNA molecule always found within another DNA molecule
<b>Eukaryote</b>	
Chromosome	Extremely long, linear, double-stranded DNA molecule
Plasmid	Typically a relatively short circular or linear double-stranded DNA molecule which is extrachromosomal
Mitochondrion or chloroplast	Intermediate-length DNA molecules, usually circular
Viral genome	Single- or double-stranded DNA or RNA molecules
Transposable element	Double-stranded DNA molecule always found within another DNA molecule

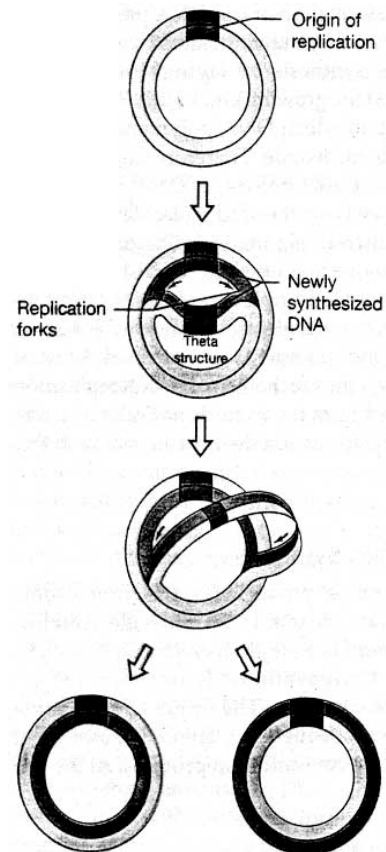
Nhiều enzyme cắt giới hạn đã được biết và được bán sẵn, có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu di truyền học phân tử và kỹ thuật di truyền do được dùng để cắt chuyên biệt phân tử DNA lớn thành các đoạn nhỏ hơn để dễ thao tác và nghiên cứu.

### 1.8. Sao chép DNA (DNA replication)

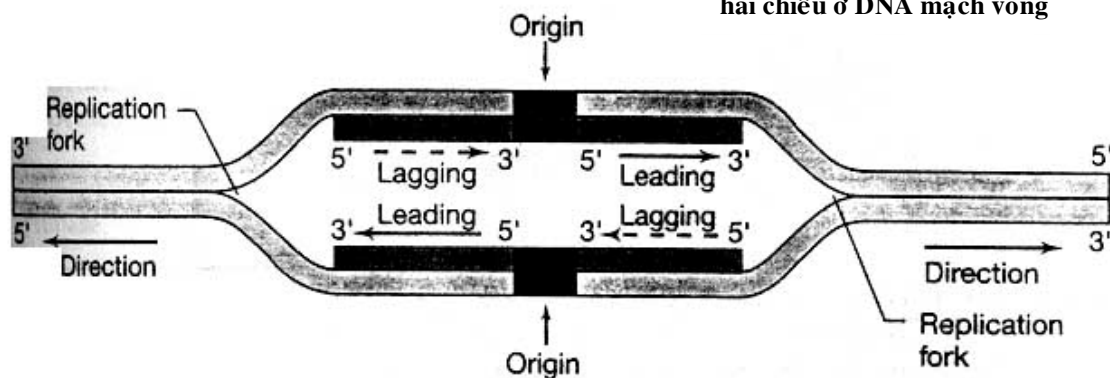
Cơ chế sao chép DNA bao gồm sự phá vỡ liên kết hydrogen trong phân tử DNA mạch kép để tạo ra hai khuôn (template) và tạo phân tử DNA mới chứa một mạch đơn cũ và một mạch mới tổng hợp có trình tự bổ sung (Hình 4.7). Ở *E. coli*, DNA polymerase III xúc tác sự tạo thành các liên kết cộng hóa trị giữa các nucleotide. Enzyme này không có tính chuyên biệt đối với nucleotide. Chính mạch DNA khuôn quyết định trình tự các nucleotide được nối với nhau. Mạch DNA mới luôn được tổng hợp theo chiều từ 5' đến 3'. Sự sao chép DNA được bắt đầu tại một trình tự đặc biệt khoảng 300 base gọi là trình tự khởi đầu sao chép (origin of replication, ORI), được nhận diện bởi các protein chuyên biệt là các nhân tố khởi sự sao chép. DNA mạch kép được giải xoắn để tiến hành sao chép nhờ hoạt tính của topoisomerase và hai mạch được tách nhau nhờ hoạt tính của helicase tạo thành chẻ ba sao chép (replication fork). Ở phân tử DNA mạch vòng, sự giải xoắn và tách mạch tạo thành hai chẻ ba sao chép ngược chiều nhau (Hình 4.8). Sự sao chép diễn ra đồng thời ở hai chẻ ba sao chép này (Hình 4.9). Ở chẻ ba sao chép, mạch khuôn DNA có chiều 3' – 5' được sao chép thành một mạch bổ sung liên tục, khuôn này được gọi là mạch trước (leading strand). Ở mạch khuôn DNA có chiều 5' – 3', sự tổng hợp mạch mới diễn ra gián đoạn (Hình 4.10).



**Hình 4.7** Tính bán bảo tồn của quá trình sao chép DNA



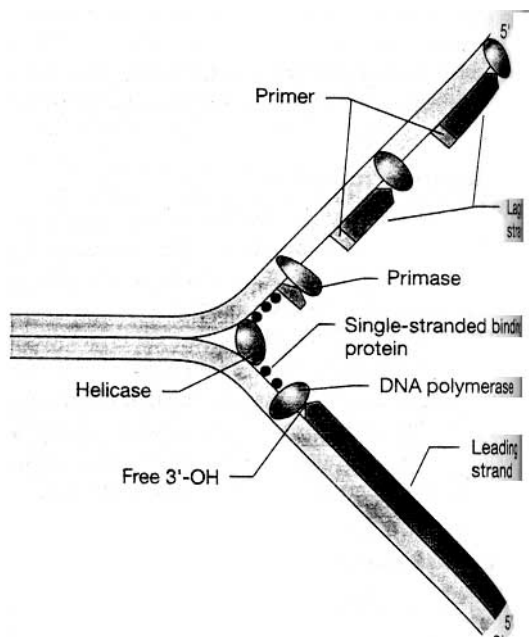
**Hình 4.8** Sao chép đồng thời theo hai chiều ở DNA mạch vòng



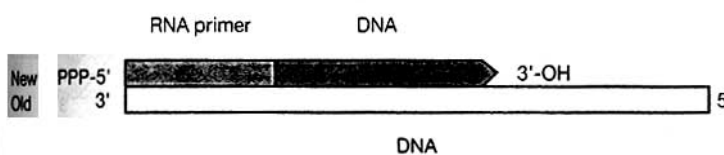
**Hình 4.9** Sự hình thành hai chẻ ba sao chép tại vị trí ORI ở DNA mạch vòng

DNA ở mạch này được tổng hợp từ tâm của chẻ ba sao chép (replication fork) hướng ra ngoài theo từng đoạn ngắn được gọi là đoạn Ozaki. Đầu tiên, những phân tử RNA nhỏ được tổng hợp bởi enzyme primase và được dùng làm mồi (primer) theo chiều 3' – 5' cho DNA polymerase tổng hợp các đoạn Ozaki (Hình 4.11). Sau đó, phân tử RNA này bị phân hủy và lỗ hổng được lấp đầy bằng DNA nhờ hoạt tính của DNA polymerase I. Các đoạn Ozaki được nối với nhau nhờ hoạt tính của DNA ligase (Hình 4.12). Mạch khuôn này được gọi là mạch sau (lagging strand).

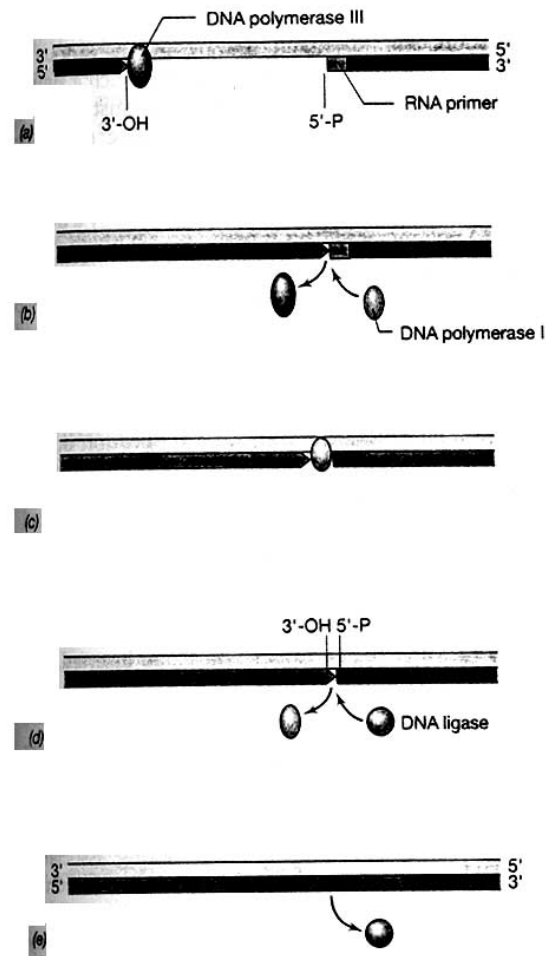




Hình 4.10 Các sự kiện xảy ra ở ba sao chép



Hình 4.11 Sự bắt cặp của đoạn mỗi RNA với DNA để bắt đầu sự tổng hợp DNA ở mạch sau

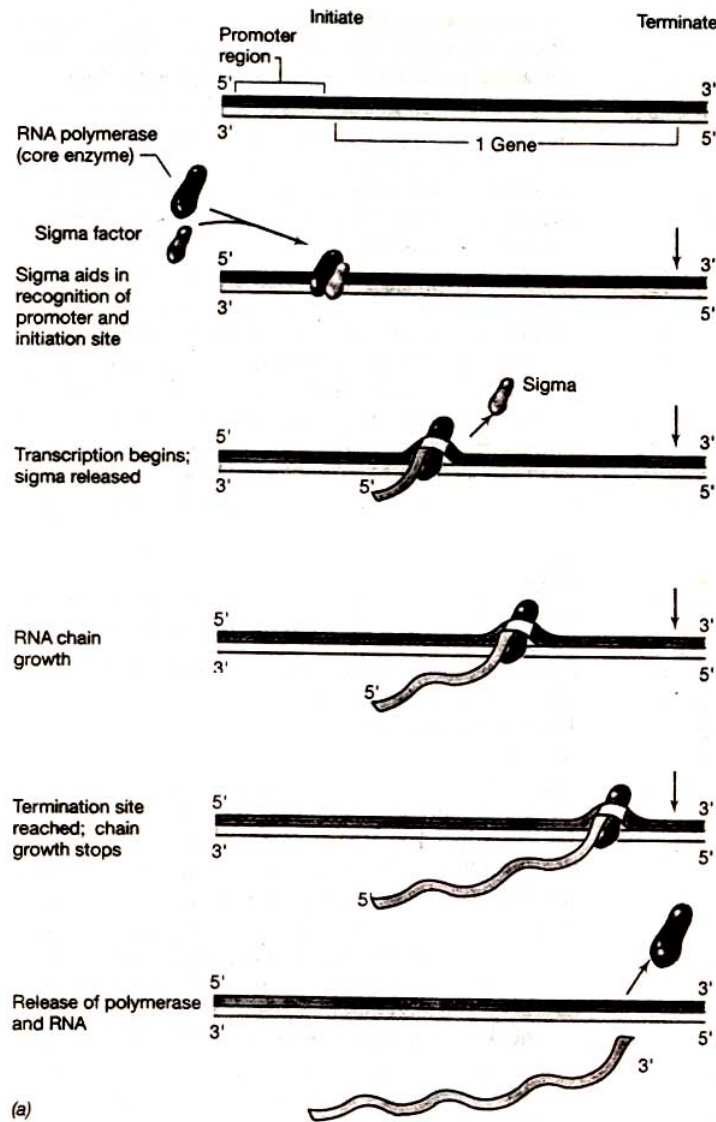


Hình 4.12 Cơ chế nối các đoạn Okazaki ở mạch sau

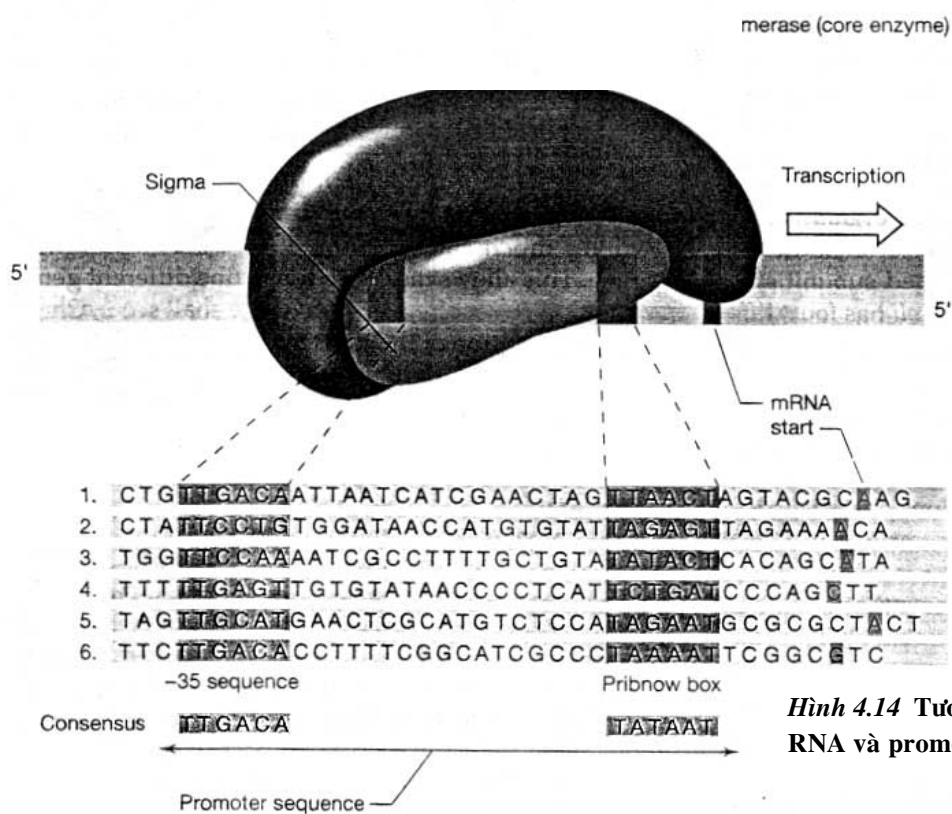
### 1.9. Phiên mã (transcription)

Phiên mã là quá trình tổng hợp DNA thành RNA. Có 3 loại RNA: (1) RNA ribosome, rRNA, là thành phần của ribosome; (2) RNA vận chuyển, tRNA, là phân tử vận chuyển amino acid trong sinh tổng hợp protein; (3) RNA thông tin, mRNA, là vật liệu chứa thông tin di truyền trung gian giữa DNA và protein. Khác với sự sao chép DNA, RNA chỉ được tổng hợp khi có trình tự nhận diện gọi là promoter, là nơi RNA polymerase gắn vào. RNA polymerase được cấu tạo bởi một số tiểu phần, trong đó tiểu phần sigma ( $\sigma$ ) có vai trò quan trọng trong nhận diện và gắn vào promoter (Hình 4.13). Trình tự nucleotide của promoter thay đổi nhưng có hai vùng được bảo tồn cao là các base ở vị trí -10 và -35 về phía thượng lưu so với điểm bắt đầu tổng hợp RNA (Hình 4.14, 4.15). Sau khi RNA polymerase gắn vào promoter, phân tử DNA mạch kép giải xoắn tạm thời và một mạch đơn được sử dụng làm khuôn để tổng hợp phân tử RNA có trình tự bù trừ với trình tự của mạch DNA dùng làm khuôn. Khi RNA polymerase đến vị trí kết thúc thì sự tổng hợp dừng. Khi đó, mRNA và enzyme rời khuôn.

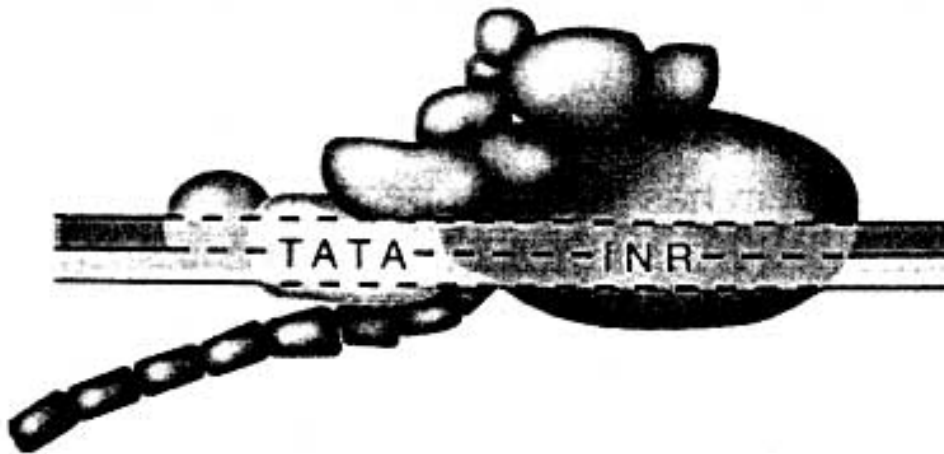
Tương tự trường hợp tổng hợp DNA, mạch RNA được kéo dài theo chiều 5' – 3'. Sự tổng hợp RNA sẽ kết thúc khi gặp tín hiệu là một cấu trúc kẹp tóc do sự bắt cặp bù trừ bên trong mạch của phân tử RNA.



Hình 4.13 Các bước trong quá trình tổng hợp mRNA



Hình 4.14 Tương tác giữa RNA và promoter



**Hình 4.15** Tương tác giữa RNA polymerase II với promoter ở tế bào eukaryote

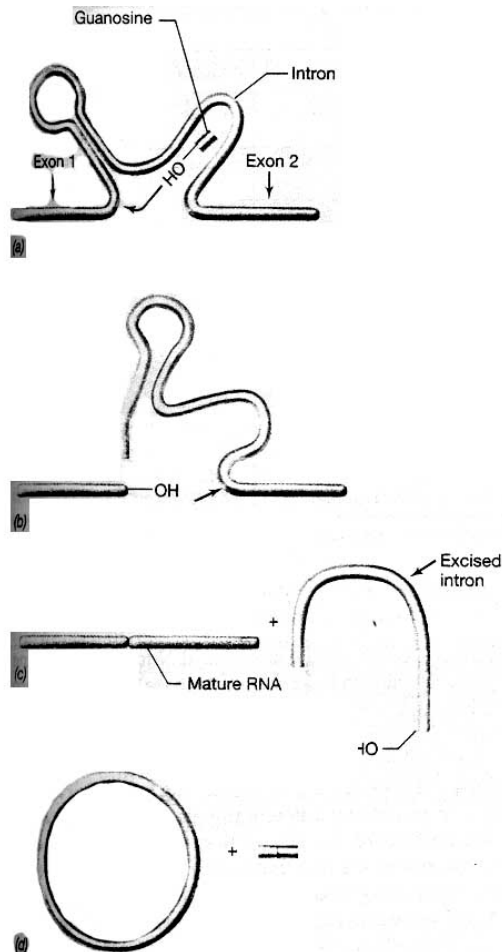
Ở tế bào prokaryote, các gene liên quan đến cùng một con đường biến dưỡng thường được liên kết thành nhóm. Ví dụ tất cả các gen liên quan đến sinh tổng hợp histidine được sắp xếp liên tiếp nhau. Khi RNA polymerase gắn vào promoter và tổng hợp mRNA, phân tử này chứa thông tin di truyền cho tất cả các enzyme liên quan đến sinh tổng hợp histidine. Phân tử mRNA này được gọi là mRNA đa gen (polygenic mRNA hay polycistronic mRNA). Cơ chế này giúp tế bào phối hợp tốt sự sinh tổng hợp đồng thời tất cả enzyme cần thiết dựa trên sự điều hòa bằng một promoter.

Các gen trong tế bào eukaryote chứa những trình tự nucleotide không mang thông tin được gọi là intron xen kẽ với các đoạn trình tự mang thông tin được gọi là exon. Quá trình phiên mã xảy ra trong nhân tạo ra tiền mRNA (pre-mRNA, primary transcript) chứa đầy đủ các introns và exons. Khi tiền m-RNA di chuyển qua màng nhân vào tế bào chất thì các intron trong tiền m-RNA bị cắt bỏ và mRNA hoàn chỉnh chỉ chứa exons đi vào tế bào chất (Hình 4.16). Sự cắt bỏ intron được xúc tác bởi một phân tử RNA nhỏ gọi là ribozyme. Đa số các ribozyme là các intron tự cắt (self-splicing intron). Ribozyme có thể cắt bên trong phân tử RNA và nối các đoạn exon tại các trình tự nhận diện nhất định (Hình 4.17).

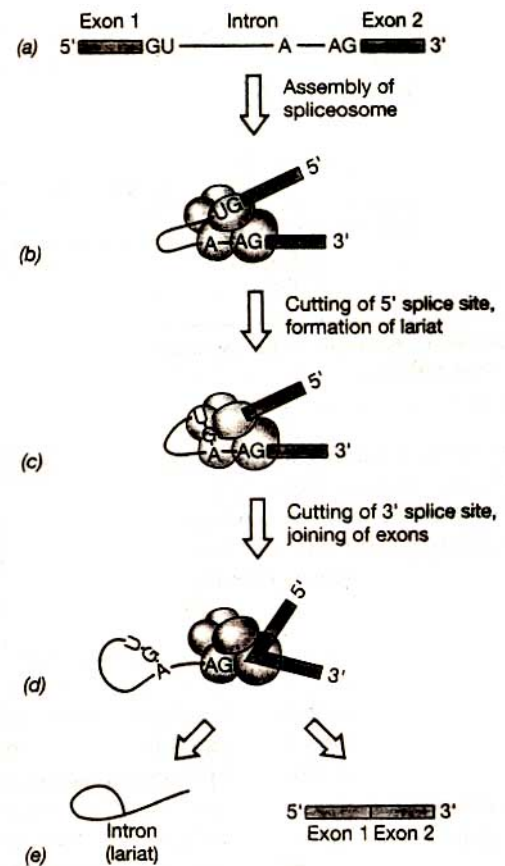
### **1.10. Mã di truyền (genetic code)**

Thông tin di truyền trên mRNA sẽ được đọc thành bộ ba (mã bộ ba, triplet codon) khi được chuyển thành trình tự amino acid trong phân tử protein. Có tất cả 64 mã bộ ba từ 4 loại nucleotide. Hầu hết các mã bộ ba được dùng để mã hóa amino acid nhưng có một số mã bộ ba mang tín hiệu dừng dịch mã (Bảng 4.2). Trong nhiều trường hợp, base thứ ba trong mã bộ ba là không quan trọng; có thể thay thế base này thành một base khác mà amino acid không thay đổi.

Mã di truyền vốn được xem là chung (universal) cho cả thế giới sinh vật. Tuy nhiên, sự tiến bộ của các kỹ thuật giải trình tự gen đã giúp phát hiện ra rằng một số bào quan và một số tế bào sử dụng mã di truyền hơi khác so với mã chung. Ví dụ như trong bộ gen ti thể và nhiễm sắc thể một số tế bào sử dụng mã bộ ba khác (Bảng 4.3). Các mã bộ ba này có quan hệ chặt chẽ với mã di truyền chung nên chắc chắn đã được biến đổi từ mã chung trong quá trình tiến hóa. Có thể giải thích sự biến đổi này là do sự cần thiết phải sắp xếp lại một mã bộ ba nhất định nào đó vì nó được sử dụng quá hiếm hoi.



**Hình 4.16** Cắt bỏ một intron khỏi mRNA ở tế bào eukaryote



**Hình 4.17** Sự tự cắt intron bởi ribozyme

Quá trình loại bỏ intron có thể tóm tắt như *Hình 4.16*. Trên intron có trình tự bảo tồn là GU ở đầu 5' và AG ở đầu 3'. Bên trong intron cần có vị trí A là điểm uốn. Một số phân tử riboprotein nhỏ gắn vào RNA hình thành thể cắt (spliceosome). Mỗi phân tử riboprotein này có chứa một đoạn RNA ngắn khác nhau có vai trò trong việc cắt loại intron. Đầu 5' được cắt trước, sau đó đầu 3' bị cắt và hai đầu của exon nối lại với nhau.

### 1.11. RNA vận chuyển (transfer RNA, tRNA)

Phân tử tRNA vận chuyển đóng vai là phân tử nối ghép, chọn đúng amino acid và vận chuyển đến mã bộ ba tương ứng. Phân tử này có một đầu chứa bộ ba đối mã (anticodon) có trình tự bù trừ với mã bộ ba của amino acid tương ứng được gắn cộng hóa trị vào đầu kia (đầu nhận, acceptor end) của phân tử tRNA. Việc gắn chuyên biệt mỗi amino acid vào một đầu của tRNA tương ứng được xúc tác bởi một enzyme chuyên biệt trong 20 là aminoacyl-tRNA synthetase (*Hình 4.18*). Trung tâm hoạt động của enzyme này chỉ nhận diện được amino acid tương ứng và tRNA có bộ ba đối mã tương ứng. Mỗi aminoacyl-tRNA synthetase nhận diện tRNA chuyên biệt qua trình tự của thân nhận (acceptor stem) của tRNA. Như vậy, việc lắp ghép chính xác amino acid vào mạch polypeptid đang tổng hợp trên ribosome được quyết định bởi sự bắt cặp bù trừ giữa mã bộ ba trên mRNA và bộ ba đối mã trên tRNA mang amino acid tương ứng.



**Bảng 4.2** Mã di truyền (ở dạng bộ ba trên mRNA)

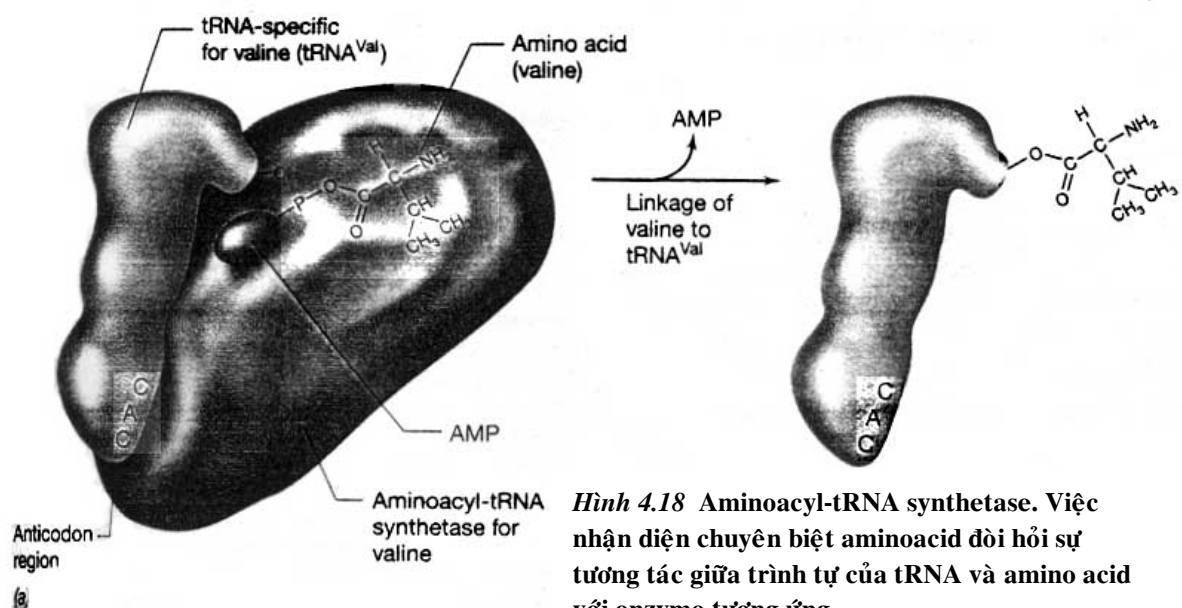
Codon	Amino acid	Codon	Amino acid	Codon	Amino acid	Codon	Amino acid
UUU	Phenylalanine	UCU	Serine	UAU	Tyrosine	UGU	Cysteine
UUC	Phenylalanine	UCC	Serine	UAC	Tyrosine	UGC	Cysteine
UUA	Leucine	UCA	Serine	UAA	None (stop signal)	UGA	None (stop signal)
UUG	Leucine	UCG	Serine	UAG	None (stop signal)	UGG	Tryptophan
CUU	Leucine	CCU	Proline	CAU	Histidine	CGU	Arginine
CUC	Leucine	CCC	Proline	CAC	Histidine	CGC	Arginine
CUA	Leucine	CCA	Proline	CAA	Glutamine	CGA	Arginine
CUG	Leucine	CCG	Proline	CAG	Glutamine	CGG	Arginine
AUU	Isoleucine	ACU	Threonine	AAU	Asparagine	AGU	Serine
AUC	Isoleucine	ACC	Threonine	AAC	Asparagine	AGC	Serine
AUA	Isoleucine	ACA	Threonine	AAA	Lysine	AGA	Arginine
AUG (start) <sup>a</sup>	Methionine	ACG	Threonine	AAG	Lysine	AGG	Arginine
GUU	Valine	GCU	Alanine	GAU	Aspartic acid	GGU	Glycine
GUC	Valine	GCC	Alanine	GAC	Aspartic acid	GGC	Glycine
GUA	Valine	GCA	Alanine	GAA	Glutamic acid	GGA	Glycine
GUG	Valine	GCG	Alanine	GAG	Glutamic acid	GGG	Glycine

<sup>a</sup> The boxes of codons are colored according to the scheme: ionizable: acidic, ionizable: basic, nonionizable polar, and nonpolar (Figure 2.12). The nucleotide on the left is at the 5'-end of the triplet.

<sup>b</sup> AUG encodes N-formylmethionine at the beginning of mRNAs of Bacteria.

### 1.12. Dịch mã (translation)

Thành phần protein và RNA trong ribosome quyết định các bước nhận diện và tạo thành liên kết peptid trong sinh tổng hợp protein. Cả tế bào prokaryote lẫn eukaryote đều sinh tổng hợp protein trên ribosome với cơ chế tương tự nhau. Tuy nhiên có sự khác biệt về ribosome giữa hai hệ thống tế bào này (một số kháng sinh có tác dụng của trên ribosome tế bào prokaryote nhưng không có tác dụng trên ribosome của tế bào eukaryote).



Mã bộ ba được đọc trên một cấu trúc trong tế bào chất là ribosome. Ribosome gồm hai tiểu phần được cấu thành từ RNA và protein. Tiểu phần 30S của ribosome gắn vào phần đầu của mRNA nơi có mã khởi đầu AUG (start codon). Để tổng hợp được phân tử protein có trình tự amino acid đúng đắn, phân tử mRNA cần được đọc đúng khung đọc (reading frame). Khuôn đọc là liên tục, không có tín hiệu bắt đầu cho mỗi mã bộ ba. Do vậy khi khung đọc bị lệch, ví dụ như chệch một base, thì một protein có trình tự hoàn toàn khác sẽ được tổng hợp.

Trong một số trường hợp quá trình dịch mã có thể diễn ra khác với cơ chế chung hoặc có sai sót. Ở virút có bộ gen rất nhỏ, như virút ΦX174, một đoạn DNA có thể mã hóa hai protein do sử dụng hai khung đọc có vị trí bắt đầu khác nhau. Hiện tượng này được gọi là gen gối đầu (overlapping gen) có thể gặp ở một số virút có bộ gen nhỏ.

Quá trình dịch mã có thể bị sai sót khi mã bộ ba của hai amino acid khác nhau chỉ khác nhau bởi một base (ví dụ UUU của Phe và UUA của leucine). Thực nghiệm đã chứng minh rằng tần suất sai sót trong dịch mã là  $10^{-3} - 10^{-4}$ . Một số kháng sinh như streptomycin, nomycin làm tăng tần suất sai sót bằng cách tác dụng lên ribosome tạo ra các phân tử protein bất bình thường làm tế bào không hoạt động chức năng bình thường được. Sai sót trong dịch mã cũng có thể được tạo ra do sự chệch khung dịch hoặc sự đọc nhầm codon kết thúc thành codon có nghĩa.

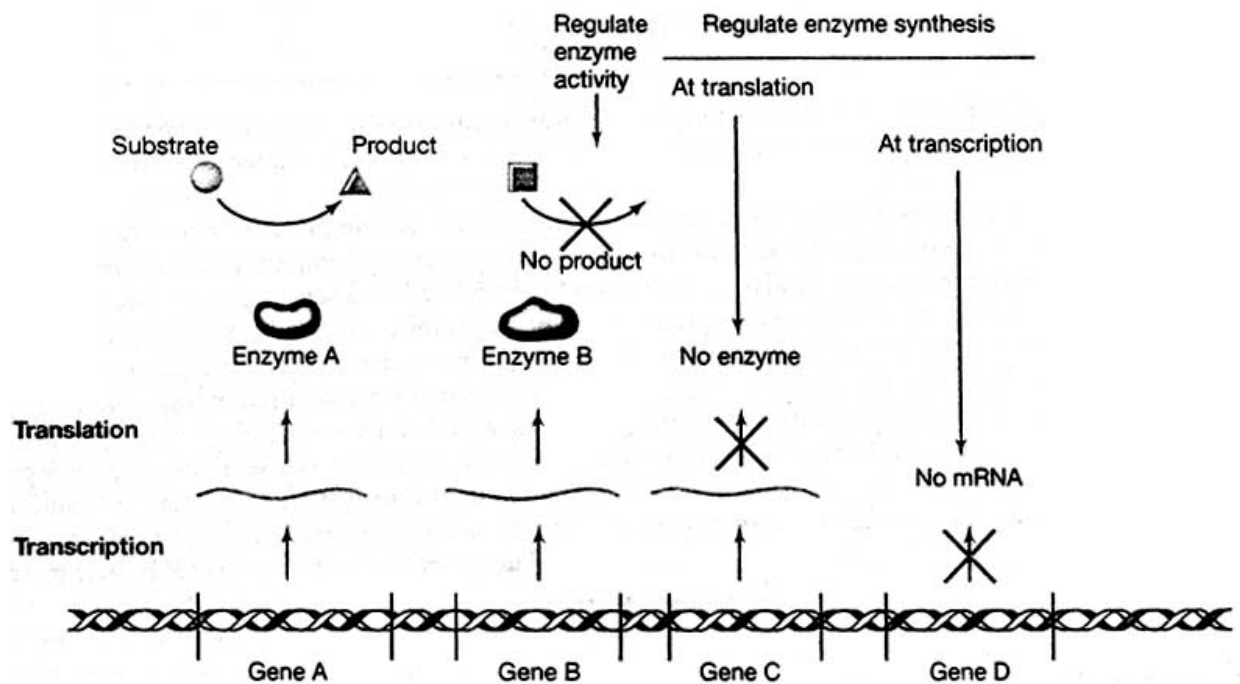
## 2. Điều hòa sự biểu hiện của gen

### 2.1. Tổng quát về sự điều hòa thể hiện của gen trong tế bào

Mặc dù nhiều phản ứng được xúc tác bởi enzyme được diễn ra trong một chu trình sống của tế bào nhưng chúng không xảy ra ở mức độ như nhau. Một số hợp chất được tế bào cần với số lượng lớn trong khi các hợp chất khác chỉ có nhu cầu với số lượng ít hơn. Ngoài ra, một số protein cần nhiều cho tế bào ở điều kiện này nhưng cần ít hơn ở điều kiện khác; một số protein khác lại được cần ở số lượng hầu như không đổi trong mọi điều kiện tăng trưởng của tế bào. Do tế bào cần tận dụng được tối đa tất cả tài nguyên sẵn có nên các quá trình tạo protein cần được điều hòa. Sự thể hiện của gen có thể được điều hòa ở mức phiên mã (transcription), kiểm soát sự sinh tổng hợp mRNA của gen (ví dụ gen D, Hình 4.19). Điều hòa ở mức dịch mã (translation) là sự kiểm soát sinh tổng hợp protein từ mRNA: gen được thể hiện ở mức phiên mã tạo ra mRNA, nhưng protein không được tạo thành (trường hợp gen C, Hình 4.19). Các gen được thể hiện thường trực (gen A, B, Hình 4.19) có sản phẩm protein được tạo thành thường trực trong tế bào. Tuy nhiên hoạt tính hoặc chức năng của protein có thể điều hòa bằng các biến đổi sau dịch mã.

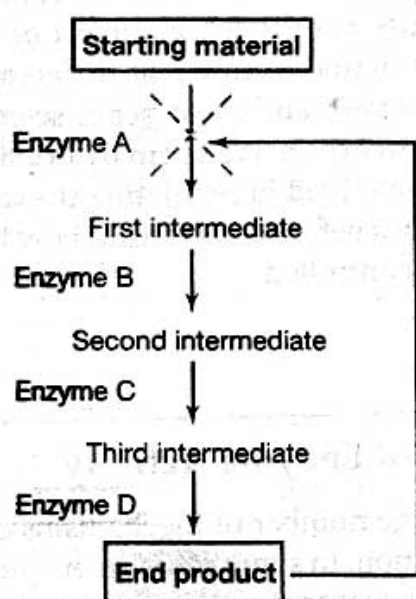
### 2.2. Điều hòa hoạt tính enzyme

Các con đường biến dưỡng trong tế bào có thể được điều hòa bằng cơ chế kìm hãm phản hồi (feedback inhibition), trong đó sản phẩm cuối của toàn bộ con đường biến dưỡng ức chế hoạt tính enzyme đầu tiên đặc trưng của con đường. Khi phản ứng đầu tiên này không xảy ra được, các enzyme tiếp theo sẽ đói cơ chất và sản phẩm cuối cùng sẽ không được tổng hợp (Hình 4.20).

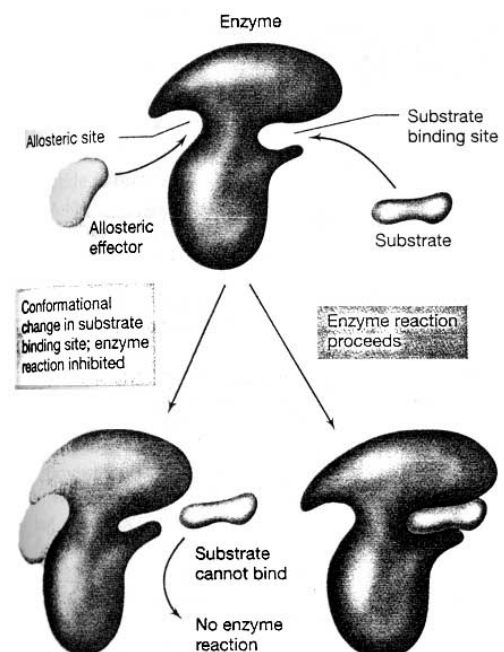


Hình 4.19 Các cơ chế được dùng trong điều hòa sự biểu hiện của gen

Sản phẩm cuối gắn vào enzyme ở một vị trí khác với trung tâm hoạt động gọi là trung tâm biến cấu (hay trung tâm khác vị trí, allosteric site). Khi đó, sản phẩm cuối được gọi là chất biến cấu (allosteric effector), làm thay đổi cấu hình protein và trung tâm hoạt động khiến cho cơ chất không gắn được vào trung tâm này và làm phản ứng không xảy ra (Hình 4.21). Hoạt tính enzyme có thể được điều hòa bằng biến đổi cộng hóa trị được xúc tác bởi một enzyme khác có tác dụng gắn thêm nhóm phosphate, nhóm methyl hay một nucleotide vào enzyme mục tiêu. Sự biến đổi này làm thay đổi cấu hình trung tâm hoạt động và hoạt tính của enzyme. Nhóm biến đổi này có thể được lấy ra khỏi enzyme bởi một enzyme khác và phục hồi lại hoạt tính của enzyme.



Hình 4.20 Kìm hãm phản hồi hoạt tính enzyme đầu tiên trong con đường chuyển hóa

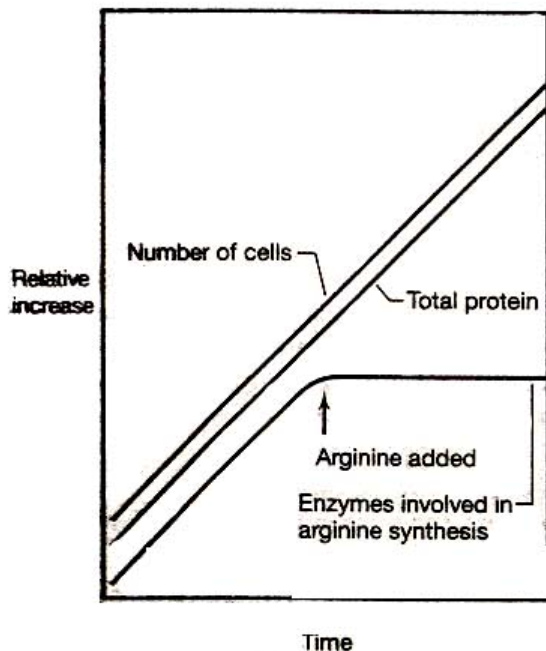


Hình 4.21 Cơ chế kìm hãm hoạt tính enzyme bằng effector biến cấu

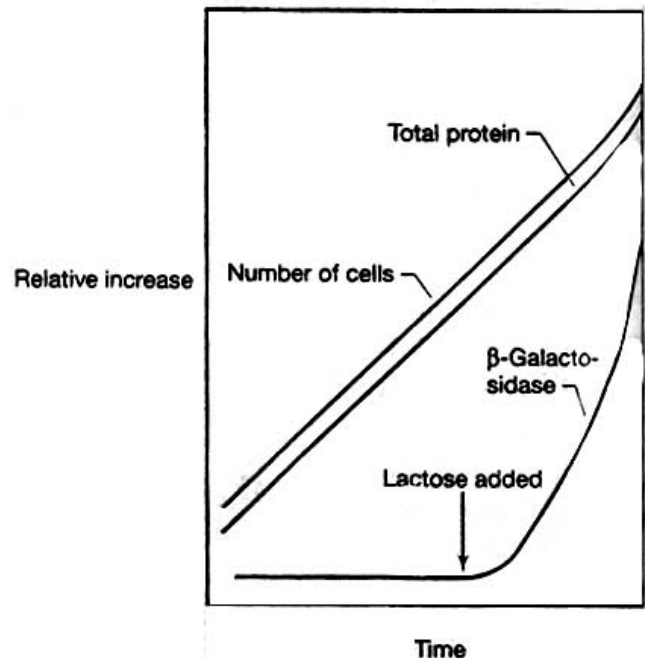


### 2.3. Điều hòa phiên mã bằng kiểm soát âm (negative control): cảm ứng (induction) và ức chế (repression)

Sự điều hòa còn thể hiện ở dạng làm thay đổi số lượng enzyme dựa vào cơ chế cảm ứng (induction) hoặc ức chế (repression) ở mức gen dựa trên tác dụng của một chất phân tử lượng thấp là effector (Hình 4.22, 4.23).



Hình 4.22 Ức chế tổng hợp enzyme liên quan đến sinh tổng hợp arginine do sự bổ sung arginine vào môi trường



Hình 4.23 Cảm ứng tổng hợp  $\beta$ -galactosidase do bổ sung lactose vào môi trường

Do sự tổng hợp protein làm tiêu tốn nhiều năng lượng nên sự điều hòa số lượng và chủng loại protein cần tổng hợp là rất hữu hiệu cho sự tăng trưởng tối ưu của vi sinh vật. Sự điều hòa này được thực hiện ở mức phiên mã thông qua việc kiểm soát sự gắn của RNA polymerase vào promoter của gen mã hóa protein.

Ở trường hợp điều hòa này cần có tín hiệu cho biết protein có cần thiết ở điều kiện môi trường hiện tại hay không. Thông thường tín hiệu này là một phân tử kích thước nhỏ gọi là chất tác động (effector). Chất này không trực tiếp gắn vào promoter mà gắn vào vị trí biến cấu trúc trên những phân tử protein điều hòa (regulatory protein).

Protein điều hòa trong trường hợp này là protein có thể gắn vào DNA ở vị trí chuyên biệt gọi là operator. Sự gắn của effector vào protein điều hòa sẽ làm tăng hoặc giảm ái lực hay độ gắn kết của protein này đối với operator.

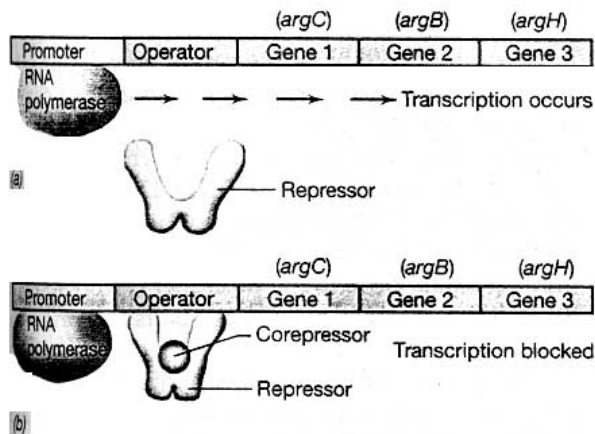
Ức chế (repression) là trường hợp điều hòa mà sự gắn effector vào protein điều hòa làm tăng ái lực của protein này đối với operator và ngăn cản sự phiên mã xúc tác bởi RNA polymerase (Hình 4.24). Ngược lại, cảm ứng (induction) là trường hợp điều hòa mà sự gắn effector vào protein điều hòa làm giảm ái lực của protein này với operator và do vậy không ngăn cản sự phiên mã bởi RNA polymerase (Hình 4.25).

Như vậy, ở ức chế (repression) và cảm ứng (induction), protein điều hòa gắn với một trình tự operator nằm gần promoter khiến cho RNA polymerase không gắn được vào

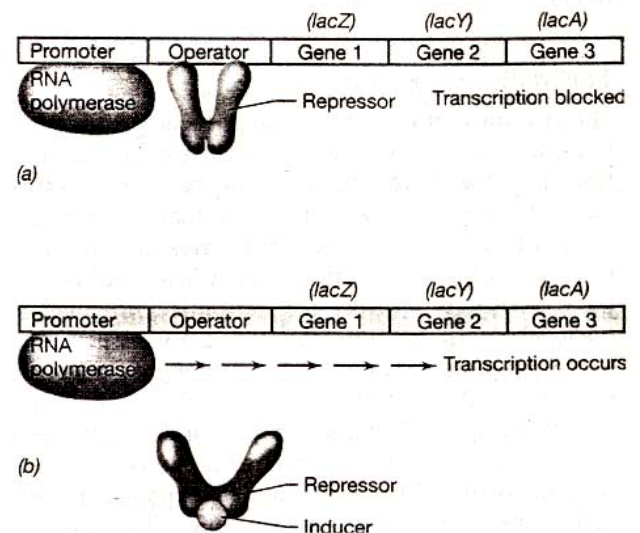


promoter. Vai trò của effector là hoạt hóa hoặc bất hoạt khả năng gắn của protein điều hòa vào operator.

Trong cơ chế điều hòa này, sự gắn protein điều hòa vào DNA sẽ ngăn cản sự tổng hợp mRNA; trường hợp này, protein điều hòa được gọi là protein ức chế (repressor protein). Do vậy, các cơ chế ức chế và cảm ứng đã xét ở trên được gọi là các cơ chế kiểm soát âm (negative control).



Hình 4.24 Cơ chế ức chế sự biểu hiện gen

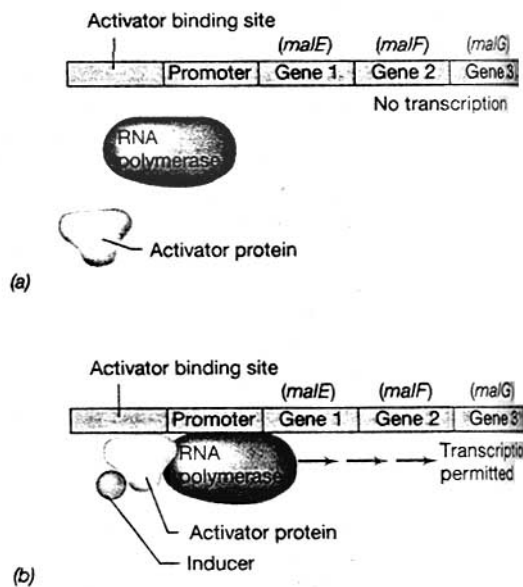


Hình 4.25 Cơ chế cảm ứng sự biểu hiện gen

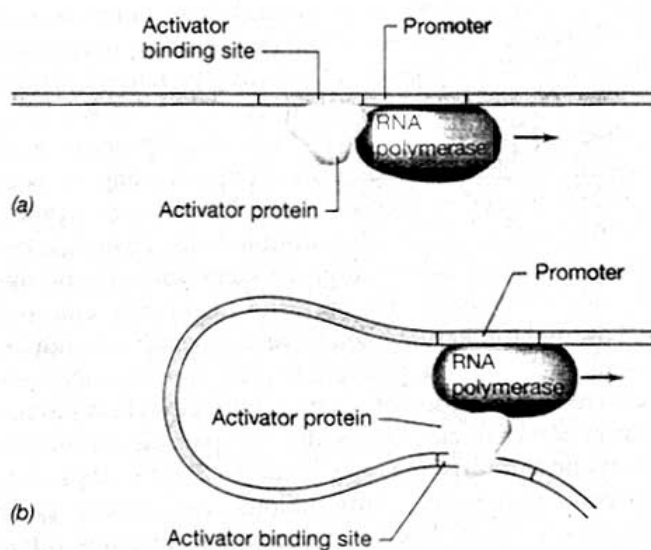
### 2.3. Điều hòa phiên mã bằng kiểm soát dương (positive control): protein hoạt hóa (activator protein)

Sự tương tác giữa protein điều hòa và DNA có thể tăng cường sự tổng hợp mRNA. Trường hợp này được gọi là các cơ chế kiểm soát dương tính (positive control). Protein điều hòa sẽ tương tác với một vùng DNA gần promoter và việc gắn vào làm tăng cường ái lực của RNA polymerase vào promoter. Protein điều hòa được gọi là protein hoạt hóa (activator protein), trình tự DNA mà protein gắn vào được gọi là vị trí gắn activator (activator binding site).

Một ví dụ điều hòa bằng kiểm soát dương là trường hợp các enzyme cần cho biến dưỡng maltose ở *E. coli* (Hình 4.26). Các enzyme này chỉ được tổng hợp khi môi trường có maltose. Sự thể hiện của các gen mã hóa cho các enzyme này được điều hòa bằng activator protein. Protein này bình thường không gắn được vào activator binding site. Maltose có vai trò là một effector có tác dụng làm đổi cấu hình activator, giúp protein này tăng ái lực với activator binding site. Chỉ khi activator protein gắn vào DNA, RNA polymerase mới tổng hợp mRNA. Các gen được điều hòa bởi kiểm soát dương thường có promoter với trình tự bảo tồn không hoàn hảo. Do vậy, RNA polymerase khó gắn vào promoter. Sự gắn của activator có tác dụng giúp RNA polymerase gắn vào promoter hoặc giúp enzyme này bắt đầu tổng hợp mRNA. Activator binding site có thể nằm gần promoter, khi đó activator tương tác trực tiếp với RNA polymerase. Ngoài ra, vị trí gắn của activator có thể xa promoter; trường hợp này activator uốn cong giúp DNA để tương tác với enzyme này (Hình 4.27).



Hình 4.26 Điều hòa bằng cơ chế kiểm soát dương (positive control)



Hình 4.27 Các phương thức tương tác giữa activator với RNA polymerase

## 2.6. Đặc điểm cấu trúc của DNA binding protein

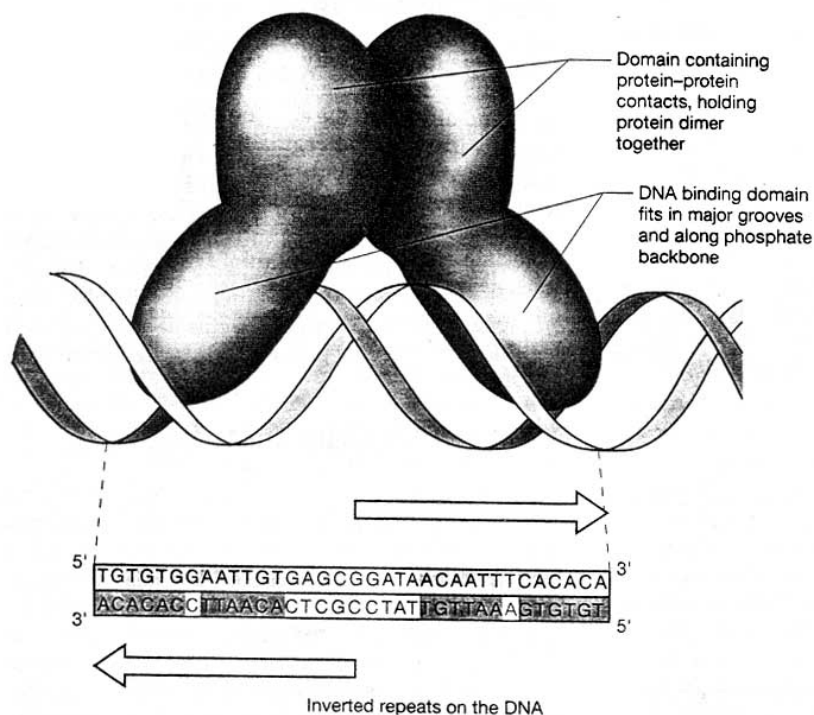
Các DNA binding protein có một số đặc điểm cấu trúc chung. Ba dạng cấu trúc thường gặp là: (1) xoắn-gập-xoắn (helix-turn-helix motif); (2) ngón kẽm (zinc finger) và (3) dây kéo leucine (leucine zipper).

Trong cấu trúc xoắn-gập-xoắn, protein có một đoạn trình tự amino acid tạo thành một xoắn  $\alpha$ -helix có vai trò nhận diện trình tự chuyên biệt trên DNA. Đoạn này được nối bằng một tripeptide với một đoạn xoắn  $\alpha$ -helix thứ hai có vai trò ổn định xoắn nhận diện thông qua tương tác kỵ nước. Tripeptide thường bắt đầu bằng glycine là nơi gập lại của mạch polypeptide (Hình 4.29a). Sự gắn giữa đoạn xoắn nhận diện của phân tử

## 2.5. Tương tác giữa protein và nucleic acid

Tương tác giữa protein và nucleic acid là yếu tố trung tâm của các cơ chế sao mã, phiên mã, dịch mã và sự điều hòa của các quá trình này. Có hai loại tương tác: (1) tương tác không chuyên biệt là trường hợp protein có thể gắn vào vị trí bất kỳ trên nucleic acid; (2) tương tác chuyên biệt là trường hợp protein gắn vào một trình tự chuyên biệt trên DNA. Sự tương tác giữa các protein histones mang điện tích dương và DNA mang điện tích âm trong nucleosomes của nhiễm sắc thể ở tế bào eukaryote là tương tác không chuyên biệt. Tương tác giữa các amino acid trong protein với các base, nhóm phosphate và đường của nucleic acid là cơ sở của sự tương tác chuyên biệt. Trong trường hợp này protein tương tác đồng thời với trình tự chuyên biệt gọi là contact point. Trên DNA mạch kép, contact point hiện diện ở dạng các trình tự lặp lại đảo ngược (inverted repeat) hiện diện ở khe lớn (major groove). Mỗi protein gắn với DNA là một dimer, trong đó mỗi đơn phần (gọi là domain) tương tác với trình tự chuyên biệt trên một sợi của DNA mạch kép. (Hình 4.28).

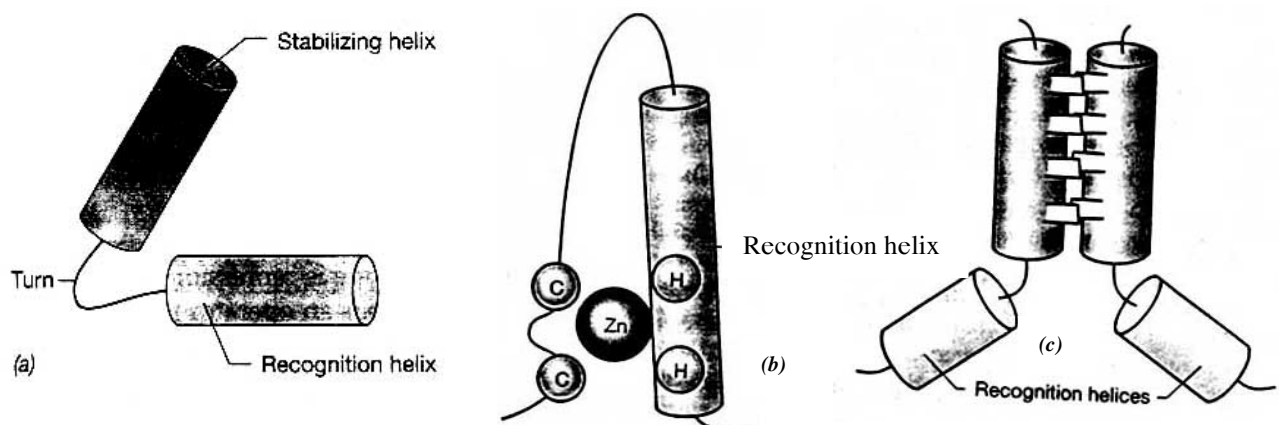
protein với DNA là do liên kết hydrogen và lực van der Waals. Cấu trúc xoắn-gập-xoắn là trường hợp các *lac*, *trp* repressor ở *E. coli*.



Hình 4.28 Protein gắn DNA dạng dimer gắn với inverted repeats

Cấu trúc zinc finger thường gặp ở protein điều hòa trong tế bào eukaryote. Đặc điểm của cấu trúc này là một xoắn  $\alpha$ -helix (hình dạng giống ngón tay) có vai trò nhận diện được ổn định một ion kẽm được gắn vào thông qua hai amino acid cysteine (C) và hai histidine (H) (Hình 4.29 b).

Cấu trúc leucine zipper được hình thành nhờ đặc điểm là sự hiện diện của các leucine cách khoảng 7 amino acid trong xoắn  $\alpha$ -helix của hai domain của protein. Cấu trúc dây kéo này không tương tác trực tiếp với DNA mà có vai trò tạo cấu hình không gian thích hợp cho hai xoắn  $\alpha$ -helix nhận diện được DNA (Hình 4.29c).



Hình 4.29 Các dạng cấu trúc DNA binding protein. a, helix-turn-helix; b, zinc finger; c, leucine zipper

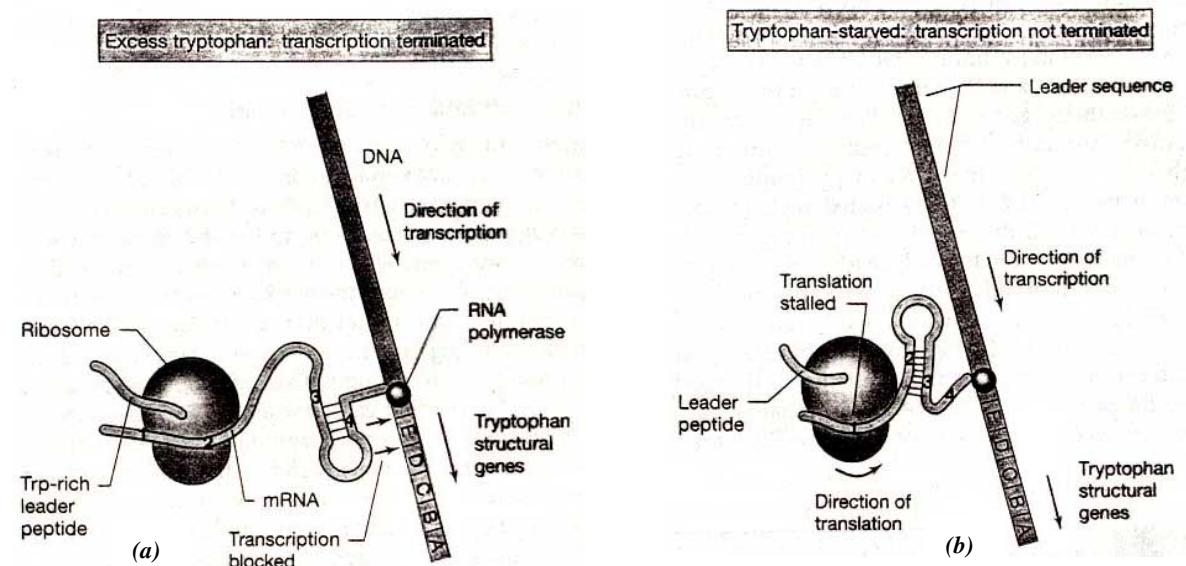
## 2.7. Điều hòa giảm số lượng (attenuation)

Điều hòa giảm số lượng (attenuation) là cơ chế điều hòa cần có sự bắt cặp của phiên mã và dịch mã do vậy tồn tại chủ yếu ở prokaryote. Cơ chế này thường gặp ở operon mã hóa các gen liên quan đến sinh tổng hợp amino acid, ví dụ như trường hợp điều hòa tryptophan operon ở *E. coli*.

Trong cơ chế này có sự tham gia của một trình tự nuleotide là trình tự tiên phong, hay gen tiên phong (leader sequence, leader gene), còn gọi trình tự làm giảm số lượng (attenuator). Đây là trình tự mã hóa cho một polypeptide ngắn có sự lặp lại của amino acid mà các sản phẩm của gen trong operon tham gia tổng hợp. Trình tự tiên phong thường là gen đầu tiên trong operon và chứa một trình tự base cuối gen cho phép mRNA tương ứng có thể tự bắt cặp bên trong phân tử tạo thành cấu trúc kẹp tóc khác nhau có tác dụng ngăn cản hoặc cho phép RNA polymerase tiếp tục phiên mã các gen nằm sau gen tiên phong trong operon.

Khi tế bào có nhiều tryptophan, peptide tiên phong được tạo thành bao gồm cả đoạn nhiều tryptophan cho đến mã kết thúc của gen tiên phong. Phần còn lại trên phân tử mRNA sẽ hình thành cấu trúc kẹp tóc ngăn cản RNA polymerase tiếp tục phiên mã các gen còn lại trong operon. Ngược lại, khi tế bào ít tryptophan, ribosome sẽ dừng lại tại vị trí của mRNA tương ứng với polytryptophan vì không có tRNA-tryptophan sẵn có trong tế bào. Ở cấu hình như vậy, phần còn lại của mRNA của gen tiên phong tạo thành cấu trúc kẹp tóc không ngăn cản RNA polymerase tiếp tục phiên mã các gen còn lại là các gen có vai trò trong sinh tổng hợp tryptophan (Hình 4.30).

Cần nhớ, ở *E. coli*, ngoài cơ chế điều hòa này, tryptophan operon còn bị điều hòa bởi cơ chế ức chế trong đó tryptophan là effector làm tăng ái lực của protein điều hòa đối với operator, ngăn cản sự gắn RNA polymerase vào promoter.

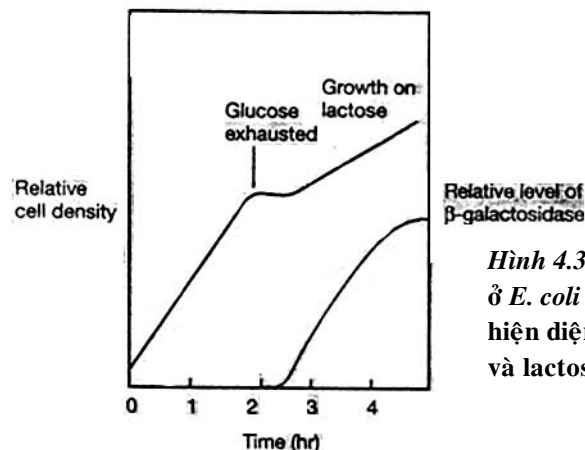


**Hình 4.30** Điều hòa bằng cơ chế giảm số lượng (attenuation). Trường hợp Tryptophane operon: a, thừa tryptophan, sự phiên mã bị dừng; b, thiếu tryptophan, sự phiên mã xảy ra



### 2.8. Điều hòa toàn cục (global regulation): ức chế dị hóa (catabolite repression)

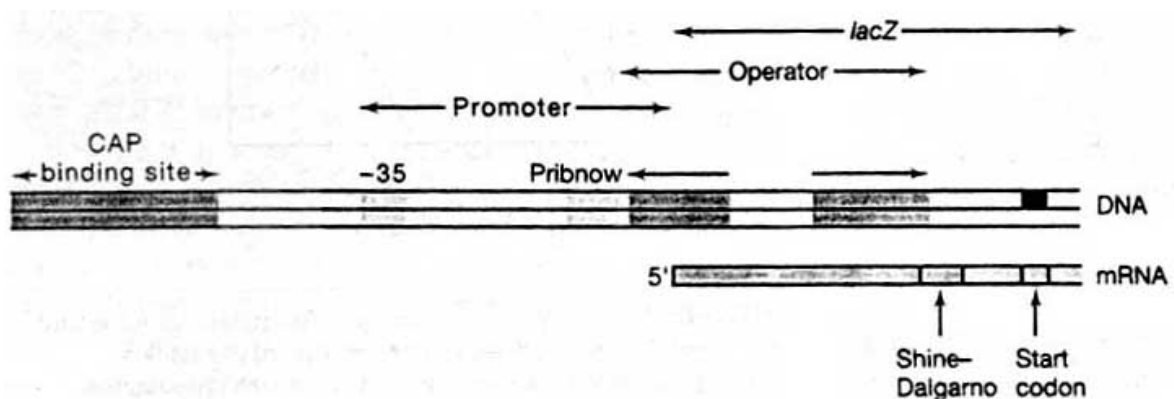
Một cơ chế điều hòa khác cho phép tế bào điều hòa nhiều gen khác nhau cùng một lúc để đáp ứng sự thay đổi của môi trường được gọi là điều hòa toàn cục (global regulation). Ví dụ, sự tăng trưởng hai pha (diauxic growth) trên glucose và lactose ở *E. coli*, còn gọi là sự ức chế dị hóa (catabolite repression). Khi có mặt đồng thời của hai nguồn carbon này trong môi trường, tế bào sẽ ức chế sự tổng hợp các enzyme sử dụng lactose ( $\beta$ -galactosidase); glucose được tế bào ưu tiên dùng. Khi môi trường cạn kiệt glucose, sự ức chế này sẽ được giải tỏa để tổng hợp các enzyme cần cho biến dưỡng lactose (Hình 4.31).



Hình 4.31 Sự tăng trưởng hai pha ở *E. coli* trong môi trường có sự hiện diện đồng thời của glucose và lactose

Cơ chế điều hòa này phụ thuộc vào sự gắn của một phức hợp protein hoạt hóa dị hóa CAP (catabolite activator protein) và cAMP vào vùng promoter của lactose operon. Khi tế bào có nhiều glucose, nồng độ cAMP trong tế bào thấp, cAMP không gắn vào CAP và protein này bất hoạt (Hình 4.32). Cần nhớ là ở *E. coli* lactose operon còn được điều hòa bởi cơ chế kiểm soát âm, trong đó lactose có vai trò là chất cảm ứng biến cấu. Do vậy để operon này được phiên mã cần có hai điều kiện: (1) lượng cAMP đủ lớn để gắn vào CAP và (2) có chất cảm ứng là lactose.

Điều hòa toàn cục cũng là cơ chế điều hòa khi môi trường chuyển giữa hai trạng thái hiếu khí và kỵ khí, sự đói nitrogen, các sốc nhiệt (heat shock) và stress ôxi hóa (oxidative stress).



Hình 4.32 Các trình tự tham gia vào điều hòa phiên mã lactose operon ở *E. coli*

### 2.9. Điều hòa do mật độ tế bào (*quorum sensing*)

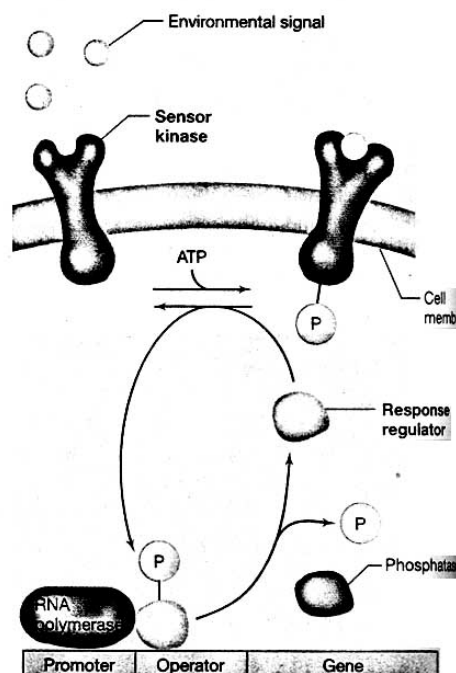
Đây là cơ chế điều hòa có liên quan đến mật độ tế bào hiện diện trong quần thể. Trong trường hợp này, tế bào có enzyme tổng hợp một hợp chất là homoserine lactone được acyl hóa (acylated homoserine lactone, AHL). Hợp chất này được tiết ra ngoài. Khi mật độ tế bào đủ lớn, hàm lượng hợp chất lactone này cao và trở thành effector hoạt hóa một activator protein. Ví dụ được biết nhiều về cơ chế điều hòa này là *lux operon* ở vi khuẩn phát sáng *Vibrio fischeri*.

### 2.10. Hệ thống điều hòa hai thành phần (*two-component regulatory system*)

Trong tự nhiên, vi sinh vật hiện diện trong môi trường thường thay đổi về nhiệt độ, pH, ôxi, chất dinh dưỡng... Tế bào đáp ứng để thích nghi với môi trường bằng các hệ thống hai thành phần (*two component system*). Hệ thống hai thành phần bao gồm một protein cảm biến (*sensor protein*) và một protein điều hòa đáp ứng (*response regulator* protein).

Protein cảm biến thường có hoạt tính kinase. Trước tiên, protein này tự phosphoryl hóa (*autophosphorylation*) khi điều kiện môi trường thay đổi, sau đó chuyển nhóm phosphate này cho protein đáp ứng. Protein điều hòa đáp ứng thường là protein gắn DNA (*DNA-binding protein*) không có hoạt tính khi ở cấu hình bình thường và có hoạt tính (gắn được vào DNA) khi bị phosphoryl hóa, trở thành một repressor. Ngoài hai thành phần nêu trên, hoạt động của hệ thống này còn cần đến enzyme phosphatase có vai trò loại bỏ nhóm phosphate khỏi protein điều hòa để ngừng đáp ứng (Hình 4.33).

Một số hệ thống hai thành phần đã được nghiên cứu rõ là sự đồng hóa nitrogen ở *E. coli*, sự cố định đạm ở *Klebsiella*, sự tạo bào tử ở *Bacillus*. Có ít nhất 50 hệ thống hai thành phần hiện diện ở tế bào *E. coli*. Những hệ thống tương tự cũng được phát hiện ở tế bào eukaryote như nấm men *Saccharomyces cerevisiae*.



Hình 4.33 Điều hòa sự biểu hiện của gen bằng hệ thống hai thành phần

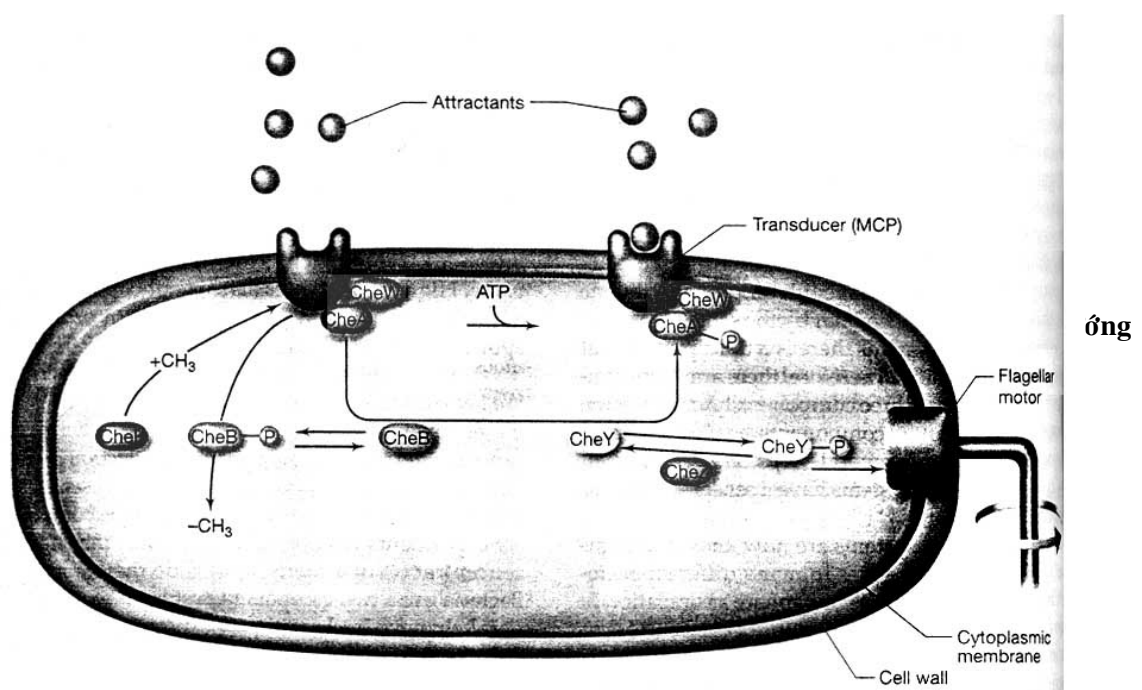
### 2.11. Cơ chế của tính hướng hóa (chemotaxis)

Tính hướng hóa (chemotaxis) ở vi sinh vật liên quan đến một số protein cảm nhận những thay đổi về nồng độ theo thời gian của chất dẫn dụ (attractant) hoặc chất xua đuổi (repellent). Các protein cảm biến (transducer) này được gọi là protein hướng hóa nhận methyl (methyl-accepting chemotaxis protein, MCP). Mỗi loại MCP có thể cảm biến một số hợp chất khác nhau. MCP có thể gắn trực tiếp với chất dẫn dụ, chất xua đuổi hoặc gắn gián tiếp thông qua tương tác với các protein gắn khác hiện diện ở vùng chu chất (periplasmic binding protein), tạo ra một loạt tương tác với protein trong tế bào chất và cuối cùng làm đảo ngược chiều quay của tiên mao (Hình 4.34). Trong đa số trường hợp, sự quay ngược chiều kim đồng hồ của tiên mao giúp vi khuẩn di động (chạy) còn quay cùng chiều kim đồng hồ làm vi khuẩn dừng. Sự tăng nồng độ chất dẫn dụ hoặc sự giảm nồng độ chất xua đuổi có tác dụng kéo dài thời gian di động, trường hợp ngược lại sẽ rút ngắn thời gian di động và làm tế bào dừng.

## 3. Những đặc điểm sinh học của virút

### 3.1. Đại cương về virút

Virút có đóng góp lớn cho sự phát triển của di truyền học vi sinh vật, là những yếu tố di truyền không tế bào, chỉ gồm nucleic acid được bao bọc bởi một vỏ protein. Virút có kích thước 0,02 – 0,03 $\mu\text{m}$  nhỏ hơn tế bào. Khi hiện diện bên ngoài tế bào, phần tử virus không có hoạt động biến dưỡng, được gọi là virion. Do không có bộ máy biến dưỡng nên virút cần xâm nhiễm vào tế bào chủ và dùng hệ thống ribosome, enzyme, các nguồn vật chất và năng lượng của tế bào để tự nhân đôi. Tế bào vi khuẩn, động vật, thực vật đều có thể bị nhiễm bởi các virút chuyên biệt.

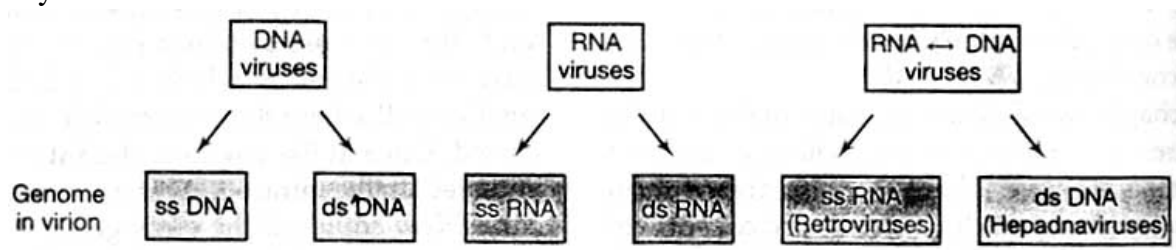


**Hình 4.34** Cơ chế của tính hướng hóa: tương tác của protein cảm biến, các protein hướng hóa (Che) và protein quay tiên mao

### 3.2. Virion

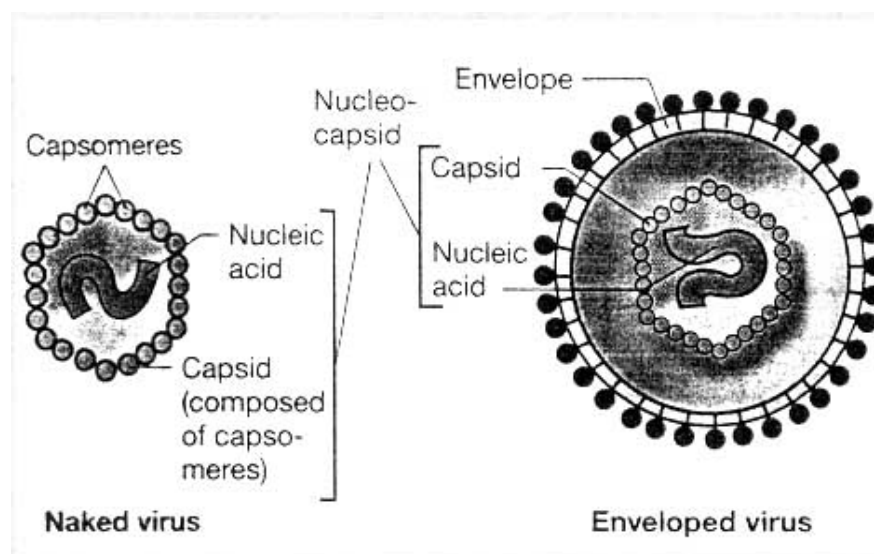
Bộ gen của virút nhỏ hơn nhiều so với vi khuẩn: bộ gen virút lớn nhất được biết cho đến nay là 190kb so với 590kb của một bộ gen vi khuẩn nhỏ nhất. Bộ gen này có thể là DNA mạch kép, DNA mạch đơn, RNA mạch kép hoặc RNA mạch đơn (Hình 4.35). Bộ gen nằm bên trong virút và được bao bọc bởi một vỏ protein gọi là nucleocapsid. Sự đa dạng về bộ gen của virút đã gây ra nhiều vấn đề riêng đối với việc sao chép bộ gen và tạo mRNA. Một số virút có bộ gen được phân đoạn thành vài phân tử nằm bên trong vỏ protein.

Vỏ protein bao gồm một số tiểu phần protein gọi là capsomere tạo hình chuỗi xoắn hoặc thành một vỏ 20 mặt (icosahedron) chung quanh nucleic acid. Những cách sắp xếp này rất hiệu quả về mặt hình học nhằm làm giảm số lượng capsomere cần để bao bọc bộ gen, cũng như giúp sự tự lắp ghép (sự tương tác giữa các protein cùng loại) xảy ra.



Hình 4.35 Phân biệt virút theo bộ gen

Các cấu trúc trên là thành phần tối thiểu của một virút. Ngoài ra, một số virút còn có các cấu trúc khác như đuôi hoặc đầu đỉnh có vai trò quan trọng trong sự xâm nhiễm tế bào chủ. Các virút động vật còn có màng bao (envelope) chung quanh nucleocapsid. Màng này có nguồn gốc từ tế bào chủ có thành phần lipid tương tự màng tế bào chủ nhưng chứa thêm một số protein được mã hóa bởi bộ gen của virút (Hình 4.36)



Hình 4.36 So sánh giữa virút có và không có màng bao (envelope)



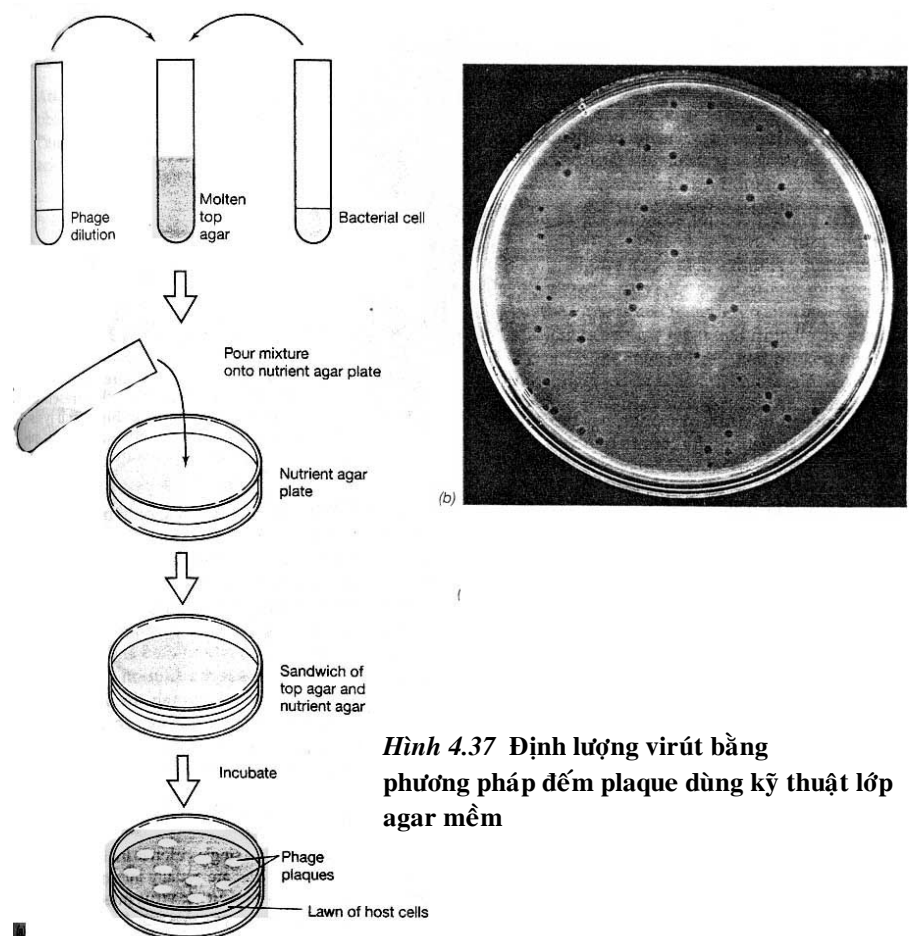
### 3.3. Nuôi cấy và định lượng virút

Virút là những ký sinh nội bào bắt buộc. Do vậy, để lưu giữ hoặc nuôi cấy virút trong phòng thí nghiệm, cần nuôi tế bào chủ và gây nhiễm với virút. Trường hợp virút ở vi khuẩn (thực khuẩn thể hay bacteriophage), có thể giữ virút trong vi khuẩn bằng các kỹ thuật nuôi cấy vi sinh bình thường. Đối với virút động vật, cần sử dụng kỹ thuật nuôi tế bào động vật, trong đa số trường hợp là nuôi trên bề mặt thành trong bình nuôi cấy ngập trong môi trường giàu dinh dưỡng và có thành phần phức tạp.

Virút được định lượng bằng cách trải huyền phù chứa virút lên bề mặt môi trường rắn chứa tế bào chủ đang tăng trưởng mạnh. Virút xâm nhiễm vào tế bào chủ, sinh sản và các virút hậu thế lại xâm nhiễm tế bào chung quanh tạo thành một vùng trong không có sinh khối. Vùng trong này được gọi là plaque (vùng tan). Số lượng virút có trong mẫu phụ thuộc vào số lượng các plaque thu được (Hình 4.37).

### 3.4. Sự xâm nhập và sao chép của virút trong tế bào chủ

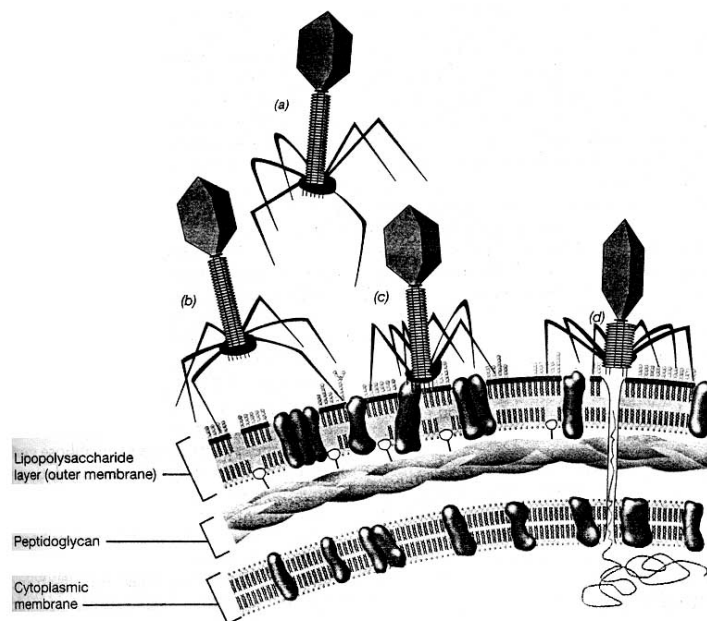
Virút có hai loại chu trình sinh sản trong tế bào chủ: (1) chu trình tan, ác tính (lytic, virulent), trong đó các phần tử virút mới được tạo ra và làm vỡ tế bào chủ để được phóng thích ra ngoài; (2) bộ gen của virút được gắn vào trong bộ gen của tế bào chủ, được sao chép cùng với bộ gen tế bào chủ. Chu trình sinh sản này được gọi là chu trình tiềm tan (lysogenic) ở thực khuẩn thể, hay chu trình biến nạp (transformation) ở virút động vật.



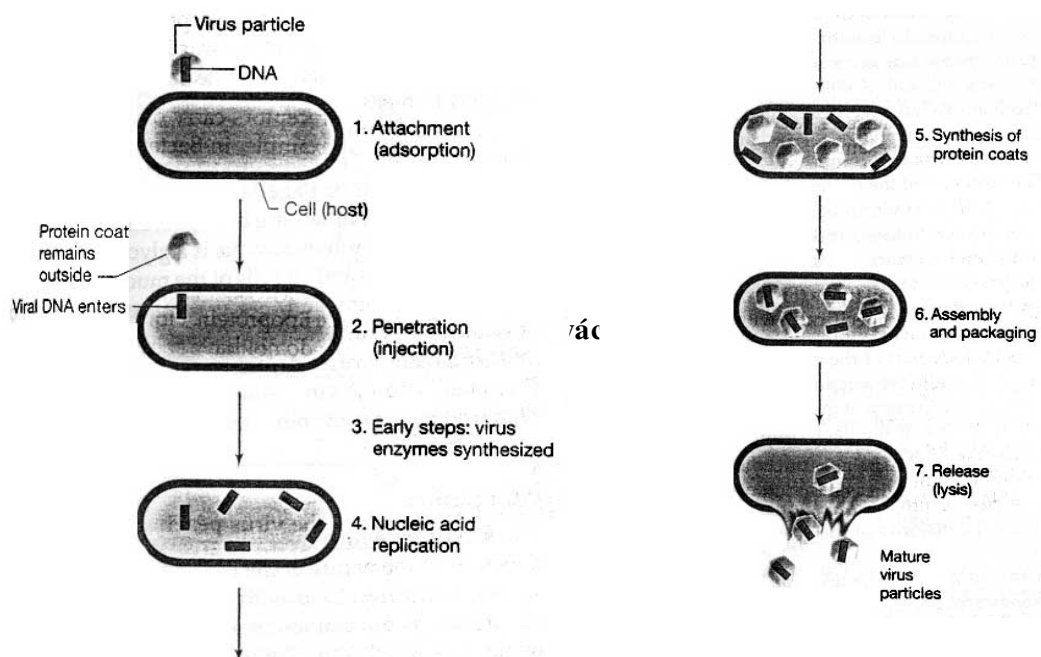
**Hình 4.37 Định lượng virút bằng phương pháp đếm plaque dùng kỹ thuật lớp agar mềm**

Trong bất kỳ trường hợp nào, để sinh sản, virút cần xâm nhiễm vào tế bào chủ, thường qua hai bước: bước gắn và bước xâm nhập. Đầu tiên là bước gắn (attachment) chuyên biệt lên bề mặt của tế bào chủ. Protein của virút gắn chuyên biệt lên thụ quan trên bề mặt tế bào (Hình 4.38). Bước thứ hai là bước xâm nhập (penetration). Trường hợp của thực khuẩn thể, ở bước này, vách và màng tế bào bị chọc thủng bởi hoạt tính của enzyme để virút bơm bộ gen vào bên trong tế bào trong khi vỏ protein nằm lại bên ngoài (Hình 4.39).

Tế bào chủ tự bảo vệ tránh sự xâm nhiễm của virút bằng cách không có receptor để virút không thể gắn lên bề mặt, hoặc có các enzyme cắt giới hạn để phân hủy nucleic acid của virút.



Hình 4.38 Sự gắn phage T4 lên vách tế bào *E. coli* và tiêm DNA



Hình 4.39 Các bước trong chu trình sao chép của thực khuẩn thể

Ở chu trình tan của thực khuẩn thể, người ta còn phân biệt thời kỳ eclipse (eclipse period) là thời kỳ bộ gen của virút tách khỏi vỏ protein và thời kỳ tiềm tàng (latent period) là thời kỳ tiếp theo sau khi virút vào bên trong tế bào nhưng chưa tạo thành phần tử virút mới được giải phóng khỏi tế bào.

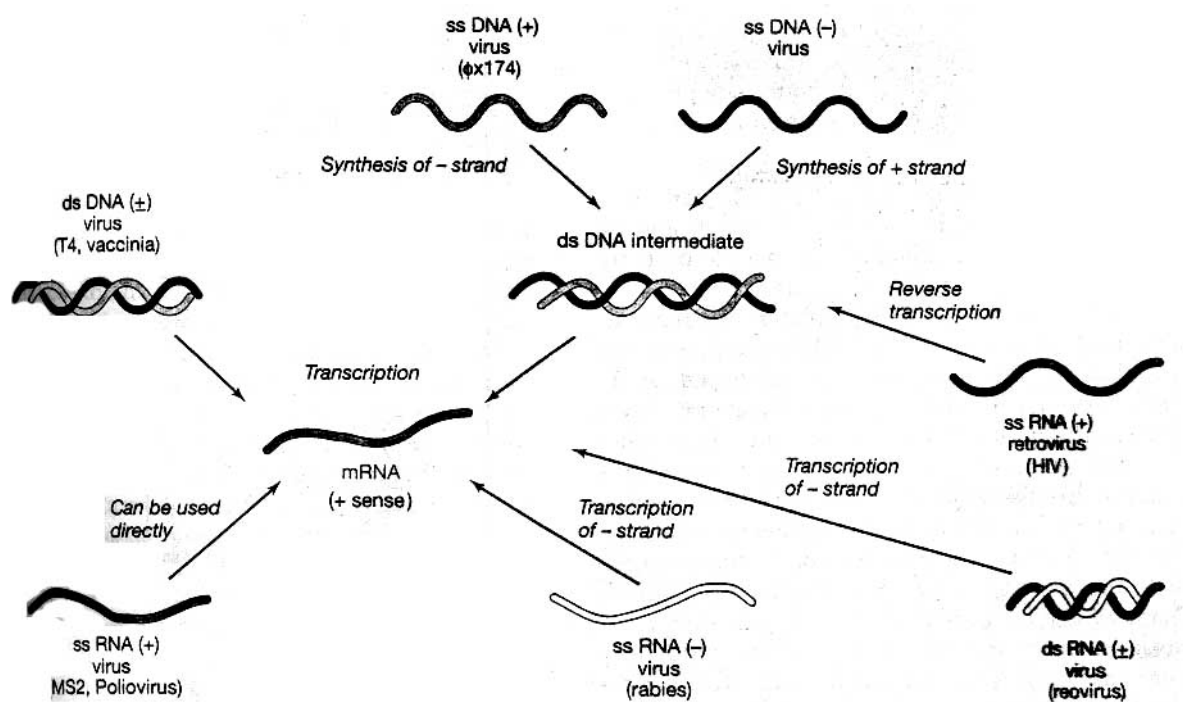
Ngoài cơ chế xâm nhiễm nêu trên, ở tế bào nhân thật, virút có thể xâm nhập vào tế bào một cách không chuyên biệt bằng quá trình ẩm bào (endocytosis).

Sau khi vào tế bào chủ, virút điều khiển một số sự kiện sau:

- Kiểm soát bộ máy sinh tổng hợp của tế bào chủ, ngăn cản sự sinh tổng hợp protein của tế bào, giúp sự thể hiện các gen của virút.
- Sao chép bộ gen của virút.
- Tổng hợp protein vỏ.
- Lắp ghép bộ gen vào vỏ protein tạo ra những phần tử virút chưa hoạt động.
- Phóng thích ra khỏi tế bào

Các sự kiện này gộp thành một đáp ứng tăng trưởng rất nhanh của virút sau khi xâm nhiễm, diễn ra khoảng 20 – 30 phút ở vi khuẩn và 8 – 40 giờ ở tế bào động vật.

Trong chu trình tiềm tan, virút cần ức chế sự thể hiện của các gen dùng để khởi mào chu trình tan và sát nhập một bản sao của bộ gen dưới dạng DNA mạch kép vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ. Bộ gen của virút được giữ ở trạng thái tiềm tan này cho đến khi nhận được tín hiệu để chuyển thành chu trình tan như mô tả ở trên. *Hình 4.40* tổng hợp các phương thức tổng hợp mRNA của virút trong tế bào chủ.



**Hình 4.40** Các phương thức tổng hợp mRNA của virút sau khi xâm nhiễm vào tế bào chủ

### 3.5. Các đặc tính chung về sự sao chép của các nhóm virút khác nhau trong tế bào chủ

- Kích thước và bộ gen nhỏ nên phụ thuộc nhiều vào hệ enzyme của tế bào chủ để sinh sản. Ví dụ như SV40 và ΦX174. Ở ΦX174 còn có sự chồng gen trong đó một trình tự nucleotide được dịch mã trên hai khung dịch nhằm tận dụng khả năng mã hóa

của bộ gen. Ở các virút có kích thước lớn hơn thì cấu trúc và chu trình sống trở nên phức tạp hơn.

- Kết thúc sự sinh tổng hợp của tế bào chủ bằng một số phương pháp: (1) tạo protein ức chế RNA polymerase của tế bào chủ (ví dụ phage T4, T7); (2) sinh tổng hợp RNA polymerase mới hoặc nhân tố sigma mới không gắn được vào promoter các gen của tế bào chủ (phage T7); (3) bất hoạt nhân tố dịch mã (ở poliovirus); (4) phân hủy DNA tế bào chủ (phage T4). Ở trường hợp T4, bộ gen của virút mã hóa cho enzyme phân hủy DNA tế bào chủ nhưng không phân hủy DNA của virút do được đánh dấu bằng một nucleotide chuyên biệt là hydroxymethylcytosine.

- Các gen khác nhau của virút được phiên mã vào thời điểm khác nhau trong chu trình xâm nhiễm. Thông thường, RNA polymerase của tế bào chủ sẽ phiên mã các gen sớm (early gene) trong đó có gen mã hóa cho RNA polymerase chuyên biệt của virút hoặc nhân tố sigma mới. Các protein này giúp cho sự thể hiện của các gen giữa (middle gene) hoặc gen muộn (late gene) là các gen liên quan đến sự sao chép bộ gen, tổng hợp các protein cấu trúc và lắp ghép. Các protein làm tan (lytic protein) được tổng hợp vào thời kỳ rất muộn trong chu trình nhiễm và giúp phóng thích các phần tử virút ra khỏi tế bào.

- Các cơ chế sao chép DNA như sao chép cuộn vòng (rolling circle replication) ở phage  $\lambda$  hoặc bắt cặp base các đoạn lặp lại ở đầu cuối của bộ gen ở T4 và T7 có thể tạo ra những phân tử DNA lớn do sự nối liền các đầu của nhiều bản sao của bộ gen (concatemer). Các concatemer này sau đó bị cắt thành những đoạn bộ gen có chiều dài thích hợp cho virút (thường dài hơn bộ gen một ít). Do vậy, ở các phần tử khác nhau của cùng loài virút, có phân tử mang gen nhiều hơn một bản sao, phân tử khác chứa bản sao dư nhưng chỉ ở phần cuối của gen. Cơ chế này giúp cho virút có thể sao chép nhanh chóng bộ gen vào giai đoạn cuối của chu trình tan.

- Các virút có bộ gen là RNA có chung một khó khăn là tế bào chủ không có bộ máy để sao chép RNA thành RNA. Trong trường hợp này, enzyme giúp cho sự phiên mã RNA thành cDNA (enzyme phiên mã ngược) cần được chứa sẵn trong virion của virút (trường hợp rhabdovirus, reovirus) hoặc RNA cần được dịch mã ngay phần chứa enzyme phiên mã ngược (trường hợp MS2 và poliovirus).

## 4. Di truyền học vi sinh vật

### 4.1. Đột biến (mutation)

Đột biến là những biến đổi được di truyền trong trình tự base của nucleic acid, tạo ra vi sinh vật bị đột biến gọi là thể đột biến (mutant). Tái tổ hợp di truyền là quá trình mà các gen từ hai bộ gen khác nhau được kết hợp với nhau. Thể đột biến có kiểu gen bị biến đổi, khác với kiểu gen của cha mẹ. Tuy nhiên, kiểu hình tức là những đặc điểm nhìn thấy được của thể đột biến có thể thay đổi hoặc không.

Kiểu gen của một chủng được ký hiệu bằng ba chữ thường in nghiêng và một chữ hoa tiếp theo, cho biết gen liên quan đến quá trình đang xét. Ví dụ *hisC* có nghĩa là gen mã hóa cho protein HisC.

Kiểu hình của chủng được ký hiệu bằng bộ ba chữ (chữ đầu viết hoa) và kết thúc bằng dấu + hoặc -. Ví dụ chủng  $\text{Thr}^+$  có nghĩa là chủng có thể tự tổng hợp threonine, còn chủng  $\text{Thr}^-$  là chủng không có khả năng tự tổng hợp threonine. Một chủng trợ dưỡng



(khuyết dưỡng, auxotroph) là chủng đột biến mất khả năng tổng hợp một nhu cầu dinh dưỡng thiết yếu vốn có ở bố mẹ (chủng bố mẹ được gọi là nguyên dưỡng, prototroph).

#### 4.2. Cơ sở phân tử của đột biến

Đột biến có thể xảy ra ngẫu nhiên ở mức tần số  $10^{-6}$  do sai sót trong quá trình sao chép hoặc do chiếu xạ tự nhiên. Đột biến có thể được cảm ứng bằng những chất gây đột biến, ví dụ như các chất đồng dạng (analog) có cấu tạo tương tự như các base purine, pyrimidine trong DNA. Tế bào đưa các chất này vào trong DNA và trong các lần sao chép tiếp theo, các analog này dễ gây ra sự bắt cặp sai dẫn đến hậu quả là gắn nhầm một base sai vào mạch DNA mới tổng hợp. Các chất đột biến hóa học khác tác dụng trực tiếp với DNA và làm thay đổi base. Tia UV được hấp thụ bởi các base purine và pyrimidine trong DNA, có thể dẫn đến sự tạo thành dimer của thymine trên cùng một mạch, do vậy ngăn cản sự bắt cặp bình thường của các base trong quá trình sao chép. Các tia chiếu xạ ion hóa có thể tạo ra các gốc tự do trong tế bào tấn công vào khung của phân tử DNA làm đứt DNA. Các yếu tố sinh học như gen nhảy (transposon) hoặc thực khuẩn thể Mu gây đột biến bằng cách gắn đoạn DNA của mình vào gen trong bộ gen của tế bào, do vậy làm gián đoạn thông tin di truyền.

Đột biến có thể do sự thay đổi ở một cặp base, gọi là đột biến điểm (point mutation) hoặc do mất một đoạn gen hoặc thêm vào của một số cặp base. Việc thêm vào chỉ một base có thể có ảnh hưởng rất lớn lên trình tự amino acid trong sản phẩm của gen do sự dịch chuyển khung đọc trong quá trình dịch mã mRNA. Mặt khác, sự chuyển đoạn (transposition) là sự chuyển một đoạn DNA từ vị trí này qua vị trí khác trên gen.

Nếu gen bị đột biến là một thành phần của operon, đột biến này có thể gây ảnh hưởng phân cực (polar effect) lên các gen khác trong operon. Tác dụng của một đột biến nhất định nào đó có thể bị đảo ngược bởi một đột biến thứ hai trong cùng một gen hay trong một gen khác, đột biến này được gọi là đột biến ức chế (suppressor).

Cần lưu ý rằng tế bào có các hệ thống sửa sai DNA (DNA repair system) để sửa chữa các tổn thương trên DNA. Một ví dụ là hệ thống SOS. Tuy nhiên hệ thống này cũng có sai sót nên DNA đã sửa chữa có thể vẫn còn mang đột biến.

#### 4.3. Thử nghiệm Ames

Một ứng dụng của các chủng đột biến là để xác định tính gây đột biến của hóa chất được tổng hợp nhân tạo hoặc tự nhiên. Thử nghiệm Ames (Ames test) ứng dụng sự hồi biến của chủng vi khuẩn bị đột biến khuyết dưỡng. Khi tế bào khuyết dưỡng His<sup>-</sup> được trải trên môi trường không có histidine, chủng này không sống được. Tuy nhiên, nếu chủng được xử lý bằng một chất gây đột biến, chất này có thể tạo đột biến ngược hay hồi biến giúp cho chủng có thể tăng trưởng được trên môi trường không có histidine.

#### 4.4. Tái tổ hợp di truyền (genetic recombination)

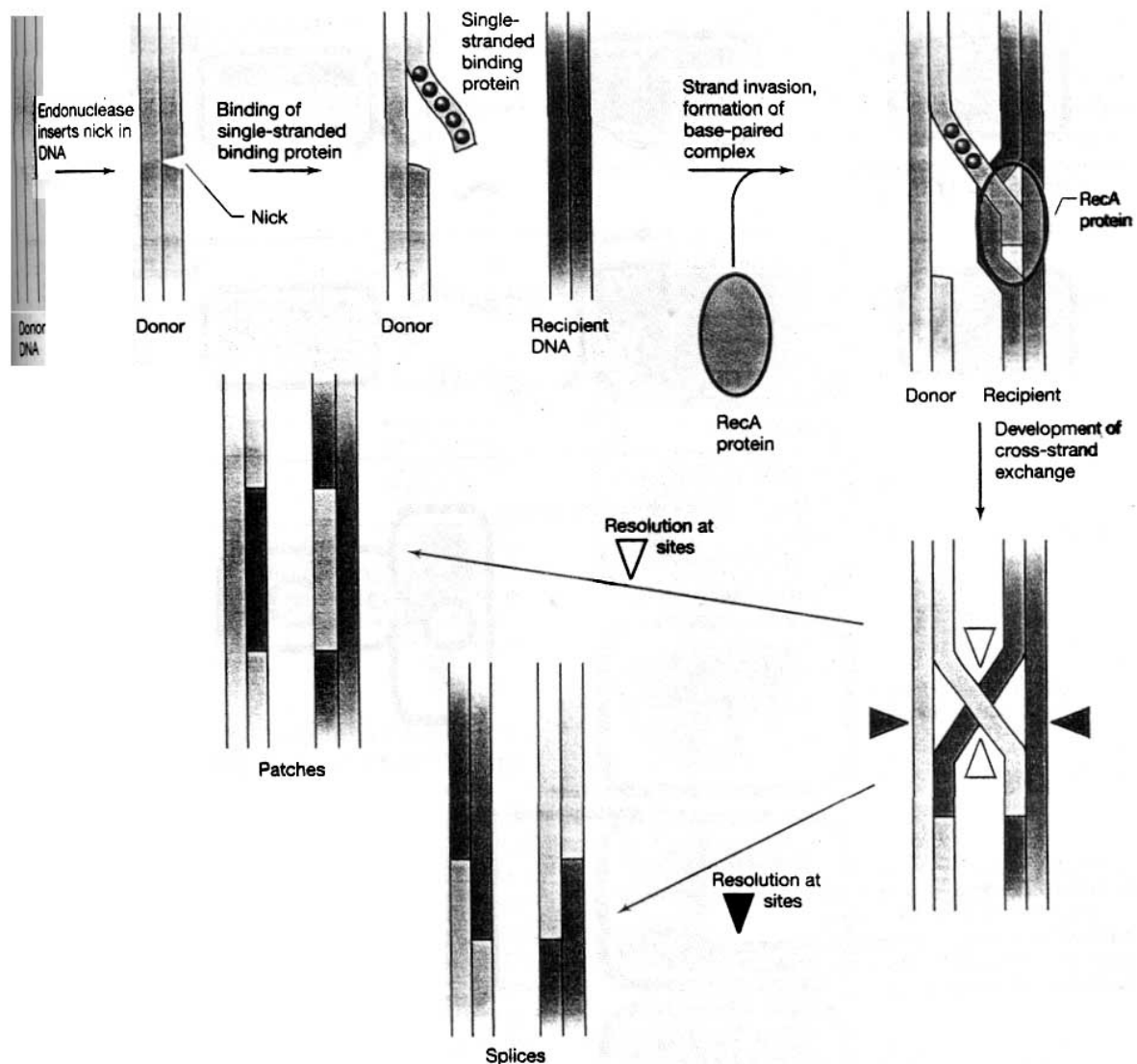
Sự tái tổ hợp phổ thông hay là sự tái tổ hợp tương đồng (general or homologous recombination) xảy ra khi có sự tương đồng cao về trình tự và cần được xúc tác bởi một enzyme được gọi là protein RecA. Các bước của quá trình này là như sau: (1) tạo một vết đứt trên DNA (nicking); (2) mở vòng DNA xoắn kép; (3) bắt cặp giữa các đoạn tương đồng trên hai phân tử DNA mạch đơn (cần enzyme RecA); (4) cắt và nối các

mạch DNA và làm trao đổi đoạn trên các mạch DNA này (Hình 4.41). Điều quan trọng là quá trình tái tổ hợp này chỉ tạo ra được kiểu gen mới nếu hai mạch đơn tham gia trao đổi đoạn tương đồng có trình tự khác nhau ở ngoài vùng cắt và nối. Để phát hiện được các đột biến gây ra bởi trao đổi đoạn tương đồng thì hậu thế mang đột biến này cần có kiểu hình khác với bố mẹ.

#### 4.5. Biến nạp (transformation)

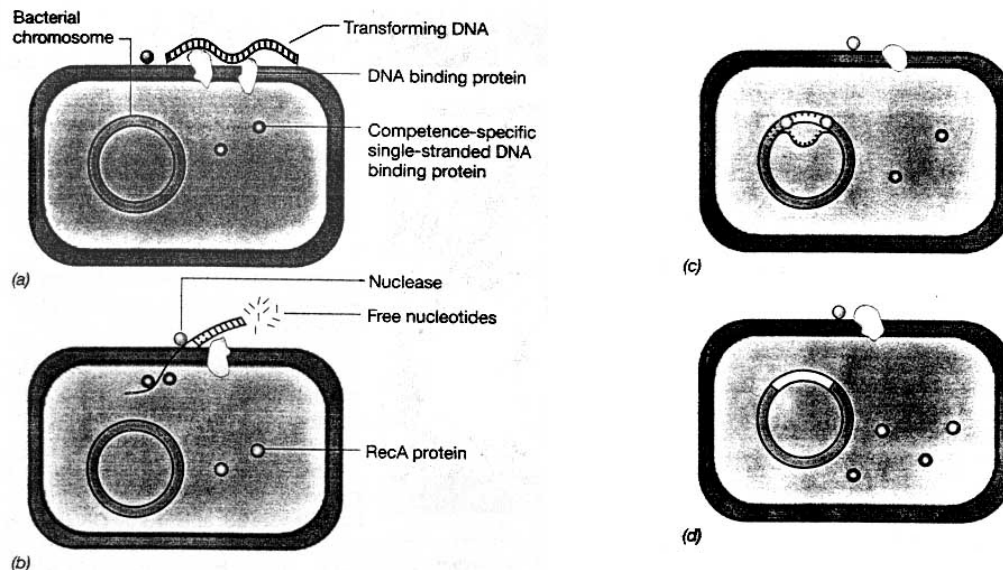
Ở vi khuẩn, sự chuyển gen ngoại lai vào tế bào (xảy ra trước quá trình trao đổi đoạn tương đồng) có thể diễn ra theo ba cơ chế: biến nạp (transformation), tải nạp (tải nạp) và giao nạp (conjugation).

Biến nạp là quá trình tế bào tiếp nhận DNA trần từ bên ngoài. Trong trường hợp này, tế bào cần phải có một trạng thái sinh lý nhất định cho phép DNA gắn chặt lên bề mặt tế bào gọi là tính khả nạp (competence). Ở *E. coli*, tính khả nạp của chủng có thể được tăng cường bằng cách xử lý trước tế bào với  $\text{CaCl}_2$ . DNA cũng có thể được đưa vào tế bào bằng cách điện khoan (electroporation), tạo ra những lỗ nhỏ tức thời trên bề mặt tế bào cho phép DNA đi qua.



Hình 4.41 Tóm tắt cơ chế phân tử của tái tổ hợp di truyền

Cơ chế biến nạp có thể được tóm tắt như trên *Hình 4.42*. DNA được gắn lên vách tế bào thông qua các protein gắn DNA (a). Enzyme nuclease trên vách sẽ thủy phân một mạch DNA, cho phép mạch đơn còn lại đi vào trong tế bào (b). Trong tế bào, mạch đơn còn lại của DNA được mang và bảo vệ bởi một số protein chuyên biệt. Mạch DNA này được sát nhập vào nhiễm sắc thể bởi cơ chế tái tổ hợp với sự xúc tác của các RecA protein (c). Một tế bào có kiểu gen mới sẽ được tạo thành khi đoạn DNA này được sao chép chung với bộ gen của tế bào khi tế bào phân chia (d). Các tế bào eukaryote cũng có thể được xử lý để trở nên khả nạp.



**Hình 4.42** Cơ chế truyền DNA bằng tải nạp ở một vi khuẩn gram dương

#### 4.6. Tải nạp (transduction)

Trong tải nạp, đoạn DNA của tế bào cho được mang bởi một virút. Trong trường hợp này, bộ gen của virút được thay thế một phần hoặc toàn bộ bởi DNA của tế bào cho. Do vậy các phần tử virút này có thể mất khả năng tự sao chép do các gen cần thiết đã bị mất.

Ở chu trình tiềm tan của phage  $\lambda$ , bộ gen của virút có thể mang theo gen của vi khuẩn khi nó bị cắt một cách không chính xác ra khỏi bộ gen tế bào chủ. Trong trường hợp này, những gen này của vi khuẩn luôn luôn được đưa vào bộ gen của phần tử virút mới. Hiện tượng này được gọi là tải nạp chuyên biệt (specialized transduction) do chỉ thực hiện tải nạp trên một số gen nhất định của vi khuẩn cho.

Ngược lại tải nạp chung (generalized transduction) có thể chuyển một gen bất kỳ từ vi khuẩn cho sang tế bào nhận. Quá trình này được thực hiện ở những thực khuẩn thể phân hủy DNA của tế bào chủ thành những đoạn có kích thước cỡ bộ gen của virút. Các đoạn DNA này có thể được đưa nhằm vào các phần tử virút mới được tạo thành và thông qua các phần tử virút này chúng được chuyển vào một tế bào vi khuẩn khác ở chu kỳ xâm nhiễm tiếp theo. Phage 22 ở *Salmonella typhimurium* và P1 và Mu ở *E. coli* thực hiện tải nạp chung.

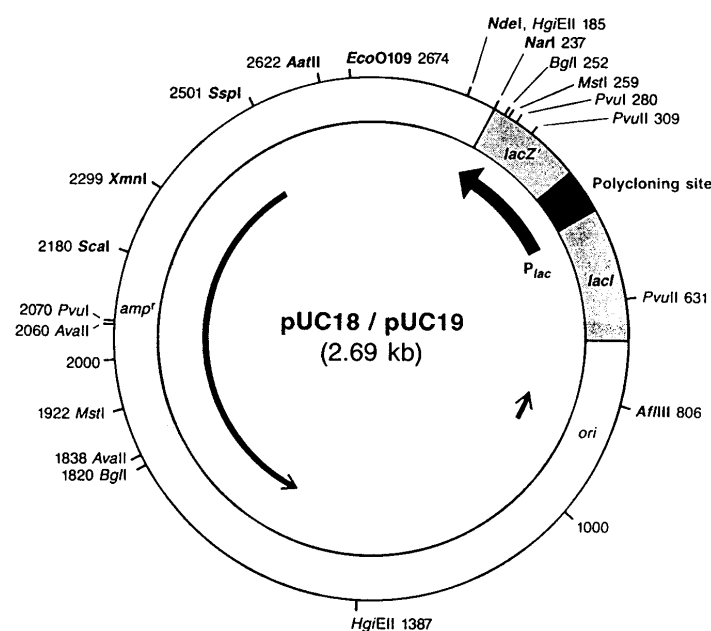
Một số phage ôn hòa (tiềm tan) có thể làm thay đổi kiểu hình ở vi khuẩn mà không cần tải nạp. Trong trạng thái tiềm tan, sự thể hiện của gen của virút đã mang lại

cho tế bào những đặc tính mới. Hiện tượng này được gọi là biến đổi bởi phage (phage conversion). Ví dụ như sự sản xuất độc tố bởi vi sinh vật gây bệnh như *Corynebacterium diphtheriae* và cấu trúc polysaccharide bề mặt tế bào như *Salmonella anatum*.

#### 4.7. Plasmid

Plasmid là những phân tử DNA vòng, kích thước nhỏ có thể tự sao chép độc lập so với nhiễm sắc thể của tế bào chủ. Sự hiện diện của plasmid có thể được phát hiện bằng kỹ thuật cho phép tách DNA plasmid ra khỏi DNA của nhiễm sắc thể. Điều này liên quan đến sự khác biệt về tỷ trọng giữa hai loại phân tử do hiện tượng siêu xoắn (supercoiling) của phân tử DNA vòng, nhỏ hơn so với phân tử DNA bộ gen. Sự khác biệt về tỷ trọng này có thể được tăng cường bằng cách bổ sung các hợp chất có thể xen vào giữa các cặp base như ethidium bromide. Phân tử plasmid xoắn chặt nên không thể gắn nhiều ethidium bromide như trường hợp DNA nhiễm sắc thể.

Plasmid là phân tử DNA có khả năng tự sao chép do có chứa một trình tự kiểm soát tần số sao chép và số lượng bản sao của plasmid trong tế bào gọi là trình tự khởi đầu sao chép (origin of replication, *Ori*) (Hình 4.43). Đa số plasmid có số bản sao được kiểm soát chặt chẽ ở mức vài bản sao trong một tế bào; ngược lại, một số plasmid có sự khởi đầu sao chép không được kiểm soát chặt chẽ và có thể tạo đến 20 – 30 bản sao trong tế bào chủ. Các enzyme cần cho sự sao chép plasmid là các enzyme của tế bào, được mã hóa bởi nhiễm sắc thể của tế bào chủ. Trong khi đó, plasmid chỉ mã hóa các gen điều hòa (ví dụ như *Ori*) để kiểm soát sự sao chép.



Hình 4.43 Sơ đồ cấu trúc của plasmid pUC18/pUC19

Một số plasmid có gen điều khiển sự truyền từ một tế bào này sang một tế bào khác trong giao nạp. Ngoài ra, plasmid còn chứa các gen mang lại cho tế bào chủ những kiểu hình mới như tính kháng kháng sinh, tạo ra độc tố, khả năng biến dưỡng những cơ chất không bình thường như thuốc trừ sâu, dung môi công nghiệp.



Tính kháng kháng sinh được mang lại bởi các plasmid R. Các plasmid này đóng vai trò rất quan trọng trong tính kháng thuốc ở những vi sinh vật gây bệnh do: (1) có khả năng cho tế bào tính kháng đồng thời đến 5 loại kháng sinh khác nhau; (2) có thể phát tán nhanh trong quần thể tế bào thông qua quá trình giao nạp.

Tính kháng đa kháng sinh này của plasmid là do sự hiện diện đồng thời của một số transposon trong phân tử plasmid, mỗi loại cho tính kháng đối với một loại kháng sinh nhất định (thường là gen mã hóa cho một enzyme xúc tác sự biến đổi và làm mất hoạt tính của kháng sinh trước khi phân tử này vào tế bào và đến được phân tử mục tiêu). Cơ chế này khác với tính kháng kháng sinh do đột biến trên nhiễm sắc thể; ở trường hợp này, tính kháng kháng sinh liên quan đến đột biến trên phân tử mục tiêu của kháng sinh.

Một tế bào có thể chứa đồng thời một số plasmid khác nhau. Tuy nhiên, một số plasmid có thể không tương thích với nhau nên không thể cùng hiện diện bên trong một tế bào. Tính không tương thích này có thể do sự giống nhau của các trình tự kiểm soát sự sao chép của plasmid.

#### 4.8. Sự giao nạp (conjugation)

Sự giao nạp ở vi khuẩn được thực hiện thông qua những yếu tố di truyền đặc biệt gọi là plasmid (Hình 4.44). Các plasmid giao nạp xúc tiến sự chuyển gen bằng cách làm biến đổi bề mặt tế bào sao cho tế bào chứa plasmid tiếp xúc với tế bào không có plasmid. Việc này được thực hiện thông qua sự tổng hợp khuẩn mao pili giúp hai tế bào tiếp xúc, bắt cặp nhau. Sau đó một cầu giao nạp (conjugative bridge) được hình thành để truyền DNA. Trước khi chuyển plasmid cho tế bào nhận, plasmid được sao chép bằng cơ chế sao chép cuộn vòng (rolling circle replication) và một phân tử DNA mạch đơn được chuyển cho tế bào nhận. Tế bào này sau đó sao chép dựa trên khuôn DNA mạch đơn này để có được phân tử plasmid vòng mạch kép. Kết quả của quá trình giao nạp là cả tế bào cho và tế bào nhận đều có plasmid. Tế bào nhận trở thành tế bào cho trong các chu kỳ giao nạp tiếp theo.

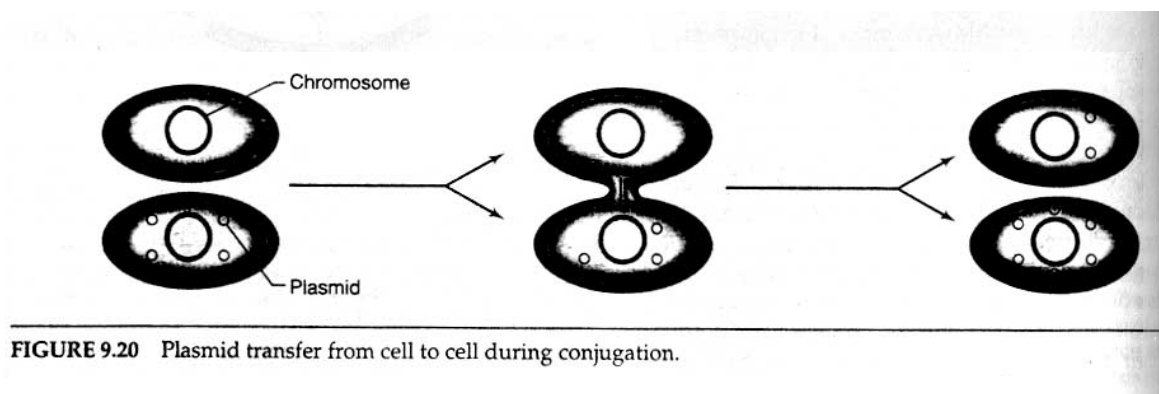


FIGURE 9.20 Plasmid transfer from cell to cell during conjugation.

Hình 4.44 Sự truyền plasmid từ tế bào cho sang tế bào nhận trong giao nạp

Một số plasmid như yếu tố F ở *E. coli* có thể thực hiện việc cho gen trên nhiễm sắc thể. Các chủng *E. coli* có khả năng này được gọi là các chủng Hfr. Yếu tố F có chứa những trình tự điều khiển sự sát nhập (insertion sequence) tương đồng với trình tự tương ứng trên nhiễm sắc thể giúp yếu tố F sát nhập vào nhiễm sắc thể của tế bào. Mặt khác, F còn chứa một trình tự quyết định sự chuyển gen gọi là trình tự khởi đầu chuyển (origin

of transfer). Trong quá trình giao nạp, trình tự này giúp F được chuyển sang tế bào nhận và có thể mang theo các gen của nhiễm sắc thể nằm ngay dưới hạ lưu của trình tự chuyển. Các bước của quá trình chuyển gen của F là tương tự với trường hợp của plasmid. Tuy nhiên do các gen của nhiễm sắc thể nằm liền sau trình tự chuyển nên gen này được chuyển trước cả các gen của F. Do vậy, nếu cầu giao nạp bị gãy trước khi toàn bộ nhiễm sắc thể được chuyển thì tế bào nhận vẫn có kiểu gen là F<sup>-</sup>.

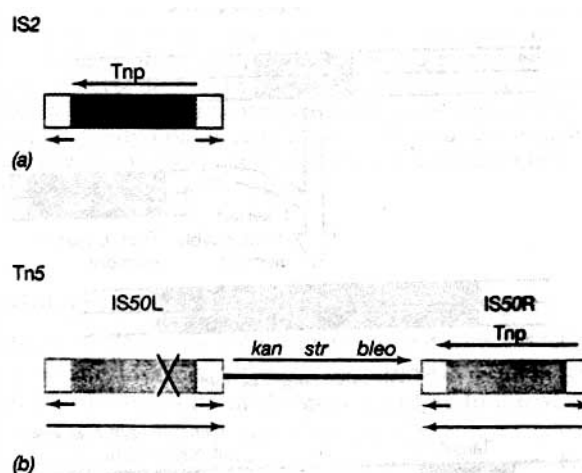
Tương tự như trường hợp sự cắt không chính xác phage lamda ở tải nạp chuyên biệt đã làm tăng tần số chuyển một số gen trên nhiễm sắc thể của tế bào cho sang tế bào nhận, sự cắt không chính xác yếu tố F cũng dẫn đến hệ quả là F chứa một số gen của nhiễm sắc thể. Sự giao nạp nhân tố F này sẽ có tác dụng truyền với tần số cao một số gen chuyên biệt của nhiễm sắc thể sang tế bào nhận.

Plasmid còn mang lại cho tế bào những đặc tính thú vị. Ví dụ như, plasmid mã hóa cho sự tạo thành các khuẩn mao pili. Tế bào nhận plasmid có cấu trúc pili trên bề mặt và trở nên mẫn cảm với sự xâm nhiễm của phage bởi một số phage RNA (phage có bộ gen RNA) sử dụng các pili này làm thể nhận.

Sự giao nạp với các chủng Hfr được dùng để lập bản đồ nhiễm sắc thể. Gen được truyền một cách tuần tự, theo đường thẳng. Như vậy, bằng cách chủ động phá vỡ sự giao nạp theo thời gian và phân tích gen thu được ở tế bào nhận, có thể xác định được sự sắp xếp của các gen trên nhiễm sắc thể. Hai gen được truyền càng sớm thì khoảng cách giữa chúng trên nhiễm sắc thể càng gần nhau.

#### 4.9. Gen chuyển vị (transposon) và trình tự sát nhập IS (insertion sequence)

Gen Tn (transposon) và trình tự sát nhập IS (insertion sequence) là các trình tự có thể chuyển vị trí trên bộ gen, gọi chung là gen chuyển vị hay gen nhảy (Hình 4.45).



**Hình 4.45 Cấu trúc của gen chuyển vị IS2 và Tn5. Tnp: transposase; kan: kanamycin; str: streptomycin; bleo: bleomycin**

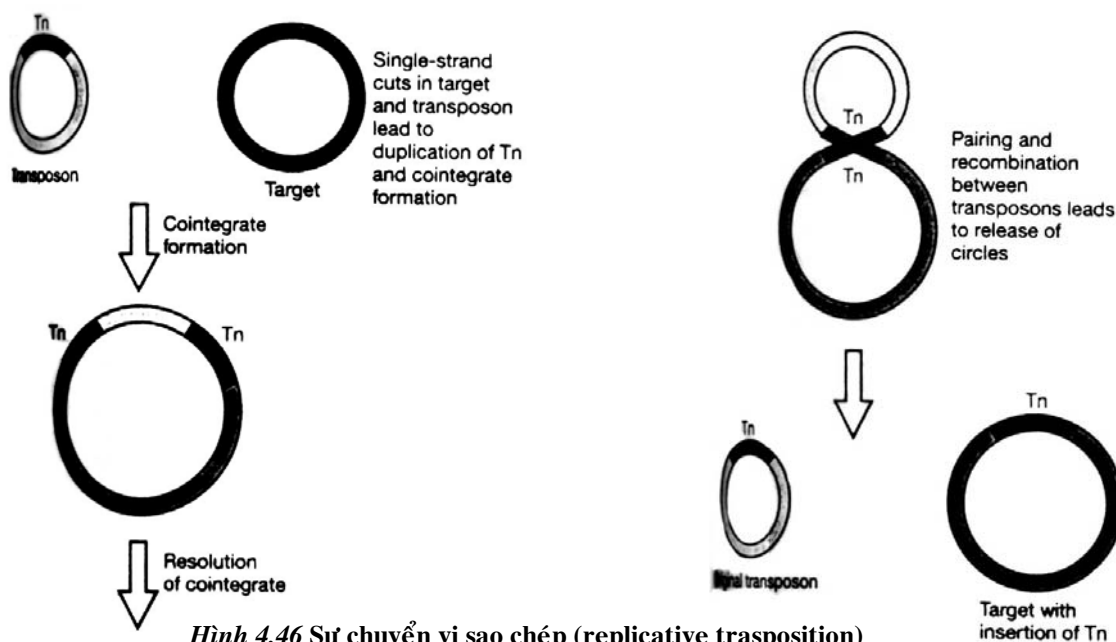
Transposon khác với trình tự sát nhập ở chỗ chúng có mang thêm một số gen phụ khác, ví dụ như gen kháng kháng sinh. Tần số chuyển vị của Tn và IS khá thấp chỉ khoảng 10 – 100 lần cao hơn so với tần số đột biến tự nhiên (tức là khoảng  $10^{-5} - 10^{-4}$ ). Ở đầu của hai loại trình tự này có chứa các trình tự lặp lại (repeated sequence) và bên trong có chứa trình tự mã hóa cho enzyme transposase cho phép sát nhập Tn và IS vào

mọi vị trí trên một DNA bất kỳ. Transposase có vai trò nhận diện trình tự lặp lại, cắt và nối các đoạn DNA.

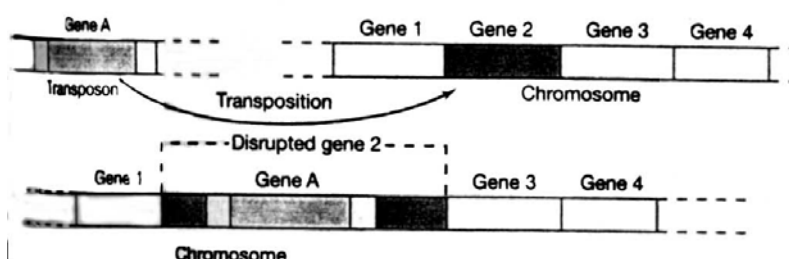
Trong sự chuyển vị gen, sự gắn gen chuyển vị vào một vị trí mục tiêu sẽ dẫn đến việc sao chép và nhân đôi trình tự vị trí mục tiêu này. Hai trình tự vị trí mục tiêu sẽ nằm hai bên gen chuyển vị. Lưu ý rằng sự gắn bởi transposase được thực hiện ở hai đầu bằng, không cần có yếu tố đầu dính. Có hai dạng chuyển vị gen (transposition) là chuyển vị sao chép và chuyển vị bảo tồn.

Chuyển vị sao chép (replicative transposition) là sự chuyển vị trong đó một bản sao vẫn ở lại ở vị trí cũ và một bản sao khác được chuyển đến vị trí mới, ví dụ như trường hợp thực khuẩn thể Mu. Trong trường hợp này, enzyme transposase sẽ cắt một mạch DNA tại hai đầu chứa trình tự lặp lại của các gen chuyển vị cũng như tại vị trí đích. Gen chuyển vị sau đó được nối với DNA tại vị trí chuyển vị thông qua các đầu mạch đơn sao cho hai mạch đơn của gen chuyển vị tách nhau thành hai bản sao mạch đơn (Hình 4.46). Sau đó các phần mạch đơn sẽ được lấp đầy thành mạch kép bằng DNA polymerase. Như vậy gen chuyển vị được sao đôi sau khi sát nhập vào vị trí chuyển vị. Sau đó hai gen chuyển vị cùng chỗ (cointegrate) được tách nhau bởi cơ chế trao đổi đoạn tương đồng để một gen chuyển vị tách ra và còn lại một bản sao ở vị trí mới.

Ở chuyển vị bảo tồn (conservative transposition) gen chuyển vị bị cắt ra khỏi vị trí và gắn vào vị trí mới, không làm tăng bản sao, ví dụ như trường hợp của Tn5. Nếu gen chuyển vị được sát nhập vào bên trong một gen thì gen này bị bất hoạt và tạo thành một đột biến khuyết (knock-out mutant) (Hình 4.47).



Hình 4.46 Sự chuyển vị sao chép (replicative transposition)



Hình 4.47 Đột biến do chuyển vị. Gen 2 bị gián đoạn do sự chuyển vị của gen A

**FIGURE 9.32** Transposon mutagenesis. The transposon moves into the middle of gene 2. Gene 2 is now disrupted by the transposon and is inactivated. Gene A of the transposon will be expressed in both locations.

#### 4.10. Sự đảo đoạn và hiện tượng biến đổi pha

Một dạng đột biến khác xảy ra do sự đảo ngược trình tự một đoạn DNA trong bộ gen. Đột biến này có ý nghĩa điều hòa nếu đoạn DNA bị đảo ngược này chứa promoter. Do chiều của promoter qui định chiều tổng hợp mRNA nên sự đảo chiều của promoter có thể sẽ làm thể hiện một gen hoàn toàn khác. Đây là cơ chế có vai trò làm thay đổi các kiểu tiên mao ở *Salmonella*.

#### 4.11. Lập bản đồ gen bằng các phương pháp chuyển gen

Các cơ chế chuyển gen nêu trên được dùng để dựng bản đồ trật tự sắp xếp của gen trên nhiễm sắc thể vi khuẩn. Phương pháp giao phối gián đoạn (interrupted mating) được dùng để xác định sơ bộ trật tự của gen do những đoạn DNA lớn có thể được chuyển gen thông qua sự giao nạp. Để xác định chính xác trật tự của các gen liên kết chặt chẽ với nhau (nằm rất gần nhau) thì tải nạp là phương pháp hữu hiệu nhất do trường hợp này cho phép chuyển được như ng đoạn DNA ngắn.

Các cơ chế trao đổi vật liệu di truyền nêu trên cũng được sử dụng để xác định vị trí của gen trên nhiễm sắc thể. Ví dụ như bằng các phương pháp này vị trí của khoảng 1.900 gen của *E. coli* đã được xác định vị trí và đã cho biết rằng các gen tham gia vào một con đường biến dưỡng nhất định thường kết tụ với nhau hoặc liên kết rất chặt với nhau trên nhiễm sắc thể. Sự sắp thành nhóm các gen như vậy đã dẫn đến khái niệm operon cho rằng các gen liên kết chặt chẽ với nhau thì được điều hòa bởi một cơ chế chung.

#### 4.12. Di truyền học vi sinh vật nhân thật

Ở các sinh vật nhân thật, thường xuyên có sự sắp xếp lại các gen để tạo những tổ hợp gen mới do sự sinh sản hữu tính. Ở vi sinh vật nhân thật có hiện tượng biến đổi các thế hệ (alteration of generations) trong đó số nhiễm sắc thể trong mỗi tế bào có thể thay đổi theo cơ số hai. Trong chu trình sống, hai tế bào đơn bội chứa một bộ gen đơn bội sẽ trở thành giao tử và dung nạp với nhau tạo thành một hợp tử lưỡng bội. Quá trình này giúp tạo ra những tổ hợp mới của các gen do sự sắp xếp lại trật tự của các gen từ hai bộ gen của giao tử.

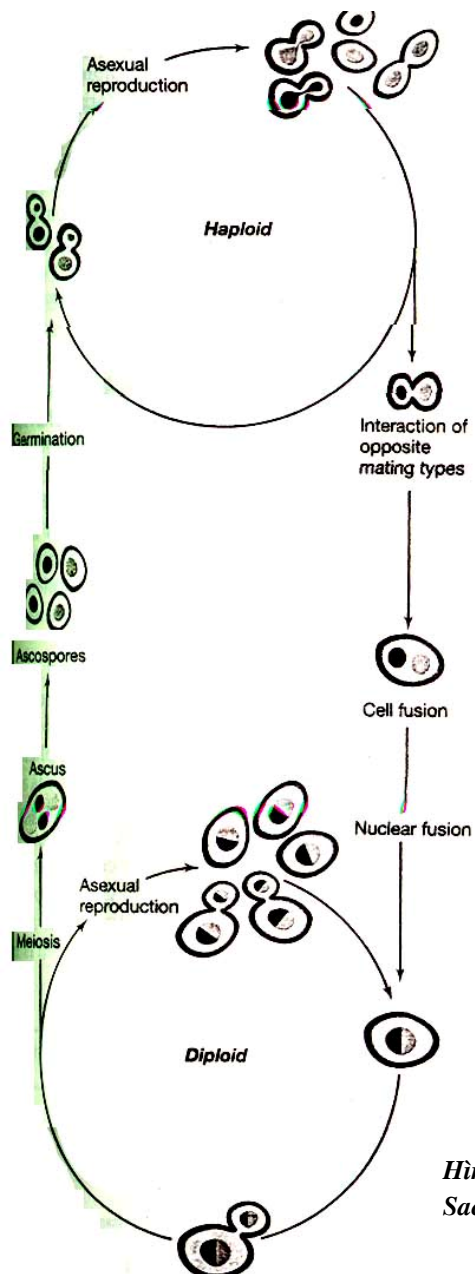
Giao tử thường được hình thành bằng quá trình giảm phân (meiosis). Trong quá trình này, một tế bào lưỡng bội được phân thành hai tế bào trong đó số nhiễm sắc thể không được nhân đôi vì cặp nhiễm sắc thể tương đồng được tách đôi và chia về hai tế bào con. Mỗi tế bào đơn bội này sao đôi nhiễm sắc thể và phân bào tạo thành bốn giao tử đơn bội từ một tế bào lưỡng bội ban đầu.

Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* là đối tượng tế bào nhân thật được nghiên cứu nhiều nhất về di truyền học. Trong phần lớn chu trình sống, nấm men tồn tại ở dạng đơn bội. Các tế bào này có thể trở thành giao tử khi hai tế bào khác nhau về kiểu giao phối (mating type). Các kiểu giao phối khác nhau ở các hormone tiết và thụ thể tương ứng. Mỗi một hợp tử lưỡng bội tạo ra do sự giao phối sẽ giảm phân để tạo ra bốn nang bào tử (ascospore) đơn bội; mỗi bào tử này khi nảy mầm sẽ tạo ra một tế bào sinh dưỡng đơn bội. Nấm men là đối tượng tốt để nghiên cứu di truyền học vì có thể tách biệt bốn bào tử, cho nảy mầm riêng biệt và xác định dễ dàng các kết quả của quá trình sinh sản hữu tính (Hình 4.48). Kiểu giao phối (mating type) của tế bào nấm men được qui định bởi



cơ chế hộp (cassette mechanism) trong locus MAT. Các gen mã hóa cho hai kiểu giao phối ( $\alpha$  và  $\alpha$ ) hiện diện đồng thời ở hai vị trí khác nhau trên bộ gen. Trình tự DNA ở hạ lưu của promoter trong locus MAT có thể được thay thế bởi gen mã hóa của một trong hai kiểu giao phối. Khi đó gen của kiểu giao phối nào được gắn vào locus MAT thì sẽ quyết định kiểu giao phối của tế bào (Hình 4.49). Như vậy, kiểu giao phối ở nấm men có thể thay đổi qua lại phụ thuộc vào gen qui định kiểu giao phối nào được sao chép và một bản sao được gắn vào hộp MAT.

Các tế bào nhân thật không chỉ chứa gen trong nhân nhưng còn chứa gen trong hai bào quan trong tế bào chất là ti thể và diệp lục thể. Các bào quan này cũng cần được nhân đôi để truyền lại cho các tế bào hậu thế. Do vậy các thông tin di truyền mang bởi các bào quan này được di truyền độc lập với các gen của nhân. Các bào quan này chứa bộ gen nhỏ trong đó có các gen mã hóa cho rRNA và tRNA dùng để sinh tổng hợp protein bên trong bào quan. Trong ti thể, một số codon được dịch mã khác hơn so với hệ thống của tế bào.



Hình 4.48 Vòng đời của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* ( $2n=32$ )

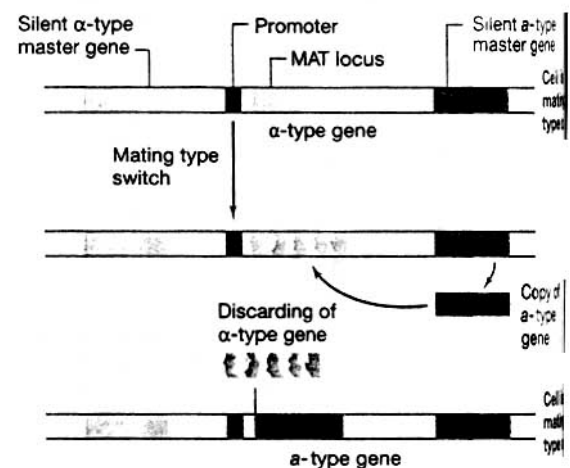


FIGURE 9.37 The cassette mechanism involved in the switch in yeast from mating type  $\alpha$  to  $a$  and back again. Whichever "cassette" is inserted at the active locus (reading head) determines the mating type. The process shown is reversible, so type  $a$  can revert to type  $\alpha$ .

Hình 4.49 Cơ chế hộp trong chuyển đổi kiểu giao phối giữa  $a$  và  $\alpha$  ở nấm men *Saccharomyces cerevisiae*

## 5. Kỹ thuật di truyền và công nghệ sinh học

### 5.1. Dòng hóa phân tử (molecular cloning)

Mục đích của một chương trình nghiên cứu dùng kỹ thuật di truyền nhằm phân lập và làm thuần một gen được gọi là dòng hóa gen (gene cloning), về cơ bản là phân lập và thu nhận một gen nhất định từ một bộ gen lớn và phức tạp, sát nhập gen này vào một bộ gen nhỏ và dễ thao tác hơn. Các bước của qui trình dòng hóa gen có thể được tóm tắt như sau:

(1) Tách và phân đoạn DNA nguồn: DNA bộ gen được tách ra khỏi tế bào cho và được cắt thành những đoạn nhỏ bằng một enzyme cắt giới hạn (restriction endonuclease). Enzyme này nhận diện được các trình tự đối ngẫu được gọi là trình tự nhận biết (recognition site), cắt và tạo những đầu dính có phần mạch đơn có trình tự bù trừ nhau. Mặt khác một vector dòng hóa cũng được cắt bởi cùng một loại enzyme cắt giới hạn.

(2) Gắn các đoạn DNA bị cắt vào vector dòng hóa: khi trộn chung các đoạn DNA bộ gen và một vector được cắt cùng một loại enzyme, nhờ sự xúc tác của enzyme nối (ligase), các đoạn DNA lai được tạo thành trong đó vector dòng hóa được chèn vào bởi một đoạn DNA từ bộ gen.

(3) Biến nạp và giữ DNA tái tổ hợp trong tế bào chủ: hỗn hợp các phân tử DNA lai này được đưa vào một tế bào chủ để tạo thành ngân hàng DNA (DNA library, DNA bank), tức là tập hợp các dòng khác nhau của tế bào chủ, mỗi dòng chứa một vector có mang một đoạn DNA khác nhau từ bộ gen của tế bào cho. Nếu thiết lập được một ngân hàng DNA tốt thì ngân hàng này có chứa tất cả các gen ở dạng đoạn DNA bị cắt ngắn từ DNA nguồn.

(4) Phát hiện và làm thuần dòng mục tiêu: tìm dòng mục tiêu trong ngân hàng gen, phân lập và làm thuần dòng này.

(5) Nuôi cấy số lượng lớn tế bào của dòng mục tiêu để ly trích và nghiên cứu DNA tái tổ hợp.

### 5.2. Thở mang gen: vector

Vector trong kỹ thuật di truyền là phân tử DNA kích thước nhỏ dùng để mang gen, sao chép, thao tác trên gen. Các vector dòng hóa có vai trò quan trọng vì chúng giúp cho sự chuyển các gen tái tổ hợp được tạo ra trong một ống nghiệm vào tế bào chủ và lưu giữ được DNA tái tổ hợp trong tế bào này nhờ khả năng tự sao chép. Ngoài ra, do vector là các phân tử DNA phân tử lượng nhỏ nên các phân tích sau đó trên DNA tái tổ hợp sẽ dễ dàng hơn. Plasmid và các bacteriophage là những vector dòng hóa hữu dụng nhất.

### 5.3. Vector dòng hóa là plasmid

Các plasmid tái tổ hợp có thể được chuyển vào tế bào bằng sự biến nạp. Sau khi vào tế bào, các phân tử DNA này tự sao chép. Một số plasmid hiện diện ở trạng thái đa bản sao trong tế bào nên làm tăng số lượng DNA tái tổ hợp trong mỗi tế bào.

Các plasmid có thể mang các dấu hiệu di truyền dùng cho mục đích chọn lọc (selective genetic marker), ví dụ như gen kháng kháng sinh, được dùng để tuyển chọn các tế bào chủ đã nhận được plasmid trong quá trình biến nạp.

Một ưu điểm khác của plasmid là kích thước nhỏ nhờ vậy có thể tăng kích thước của DNA được gắn vào do kích thước tổng của một phân tử DNA có thể được biến nạp vào tế bào là có giới hạn. Bản thân plasmid có kích thước càng lớn thì kích thước đoạn DNA có thể gắn vào càng nhỏ.

Plasmid là vector dòng hóa thường được chọn và cấu trúc sao cho chỉ chứa một vị trí nhận biết duy nhất của một enzyme cắt hạn chế nhất định. Điều này giúp biết được vị trí chính xác của đoạn DNA tái tổ hợp trong plasmid. Mặt khác người ta thường cấu trúc trong phân tử plasmid một đoạn trình tự ngắn chứa trình tự nhận diện duy nhất của nhiều enzyme cắt giới hạn gọi là polycloning site, cho phép có thể sử dụng nhiều loại enzyme cắt hạn chế khác nhau để gắn DNA vào plasmid tại vị trí này.

Nếu vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn nằm bên trong một trong các gen mang tín hiệu chọn lọc thì plasmid có thêm đặc điểm hữu dụng khác là cho phép chọn lọc được tế bào chủ nào có chứa plasmid mang DNA tái tổ hợp do sự chèn vào của đoạn DNA này làm gen tương ứng bị mất hoạt tính. Hiện tượng này được gọi là sự bất hoạt chèn (insertion inactivation). Ví dụ ở plasmid pUC18/pUC19, việc gắn một DNA ngoại lai vào polycloning site nằm bên trong gen *lacZ* sẽ tạo một kiểu hình để chọn lọc dòng mang gen tái tổ hợp là *LacZ<sup>-</sup>* (tức là không có  $\beta$ -galactosidase).

#### 5.4. Vector dòng hóa là phage $\lambda$

Các thực khuẩn thể ở *E. coli* cũng là các vector dòng hóa hữu dụng. Trong điều kiện *in vitro*, người ta có thể dùng enzyme cắt giới hạn để loại bỏ 1/3 bộ gen của chúng và thay bằng DNA ngoại lai. Sau đó DNA tái tổ hợp này được đưa vào phần tử virút. Phần tử virút này trở thành một hệ thống giúp chuyển DNA ngoại lai vào tế bào chủ.

Ví dụ, có thể dùng phage  $\lambda$  được gắn DNA ngoại lai để chuyển các gen này vào tế bào *E. coli* bằng cơ chế tải nạp. Phage  $\lambda$  hoang dại không được dùng để dòng hóa gen vì có chứa quá nhiều trình tự nhận biết cắt giới hạn. Thay vào đó người ta cấu trúc lại một phage  $\lambda$  được biến đổi chứa ít trình tự nhận biết hơn dùng cho mục đích dòng hóa. Ví dụ như một phage  $\lambda$  được biết đổi sao cho chỉ chứa hai trình tự nhận biết của một enzyme cắt giới hạn thì có thể cắt bỏ đoạn DNA nằm giữa hai trình tự này và thay bằng một đoạn DNA ngoại lai. Các phage được biến đổi tương tự được gọi là vector thay thế (replacement vector) và cho phép dòng hóa được đoạn DNA ngoại lai kích thước lớn.

#### 5.5. Các vector dòng hóa khác

Cosmid là các vector kết hợp được các ưu điểm của plasmid và phage  $\lambda$ . Đây là phân tử plasmid trong đó có gắn vị trí *cos* của phage  $\lambda$  cho phép plasmid tái tổ hợp có thể được đưa vào trong phần tử phage  $\lambda$ . Nhờ vậy, plasmid tái tổ hợp được chuyển vào tế bào một cách hữu hiệu hơn bằng cơ chế tải nạp so với biến nạp nhưng lại có thể được lưu giữ bền hơn trong phần tử phage.

Dự án bộ gen người (Human Genome Project) nhằm lập bản đồ và giải trình tự toàn bộ bộ gen con người đã góp phần thiết lập được một vector mới gọi là nhiễm sắc thể nhân tạo nấm men (yeast artificial chromosome, YAC). Vector này có kích thước

khoảng 10kb, có thể mang đoạn DNA có kích thước 200 – 800kb và được thiết kế sao cho có thể sao chép như một nhiễm sắc thể bình thường của nấm men.

Thực khuẩn thể M13 có bộ gen mạch đơn có thể được gắn các trình tự nhận biết giới hạn để trở thành một vector dùng để giải trình tự DNA theo phương pháp của Sanger.

### 5.6. Tế bào chủ

*E. coli* là vi sinh vật được dùng làm tế bào chủ phổ biến nhất trong kỹ thuật tái tổ hợp gen. Tuy nhiên, đặc tính là một vi sinh vật gây bệnh cơ hội ở người và không có khả năng tiết enzyme ra ngoài môi trường gây khó khăn cho quá trình tinh chế các protein tái tổ hợp là những nhược điểm cho việc sử dụng vi khuẩn này trong sản xuất công nghiệp.

*Bacillus subtilis* là vi khuẩn gram dương, không gây bệnh, không tạo nội độc tố, tiết protein vào môi trường. Các vector dòng hóa và qui trình biến nạp hữu hiệu cũng đã được thiết lập trên đối tượng này. Tuy nhiên, loài prokaryote có một số nhược điểm quan trọng như plasmid không ổn định trong tế bào chủ nên nguy cơ mất gen tái tổ hợp trong tế bào chủ này cao. Do vậy, loài này chưa là một tế bào chủ hoàn hảo cho các ứng dụng trong công nghiệp.

Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* là tế bào eukaryote được nghiên cứu di truyền kỹ nhất. Do vậy, nấm men này cũng được nghiên cứu sử dụng làm tế bào chủ để thể hiện gen eukaryote. Các virút động vật như SV40, retrovirus... được dùng để dòng hóa gen vào tế bào hữu nhũ. Trong trường hợp này, chúng sát nhập bộ gen của mình cùng với DNA tái tổ hợp vào bộ gen của tế bào chủ.

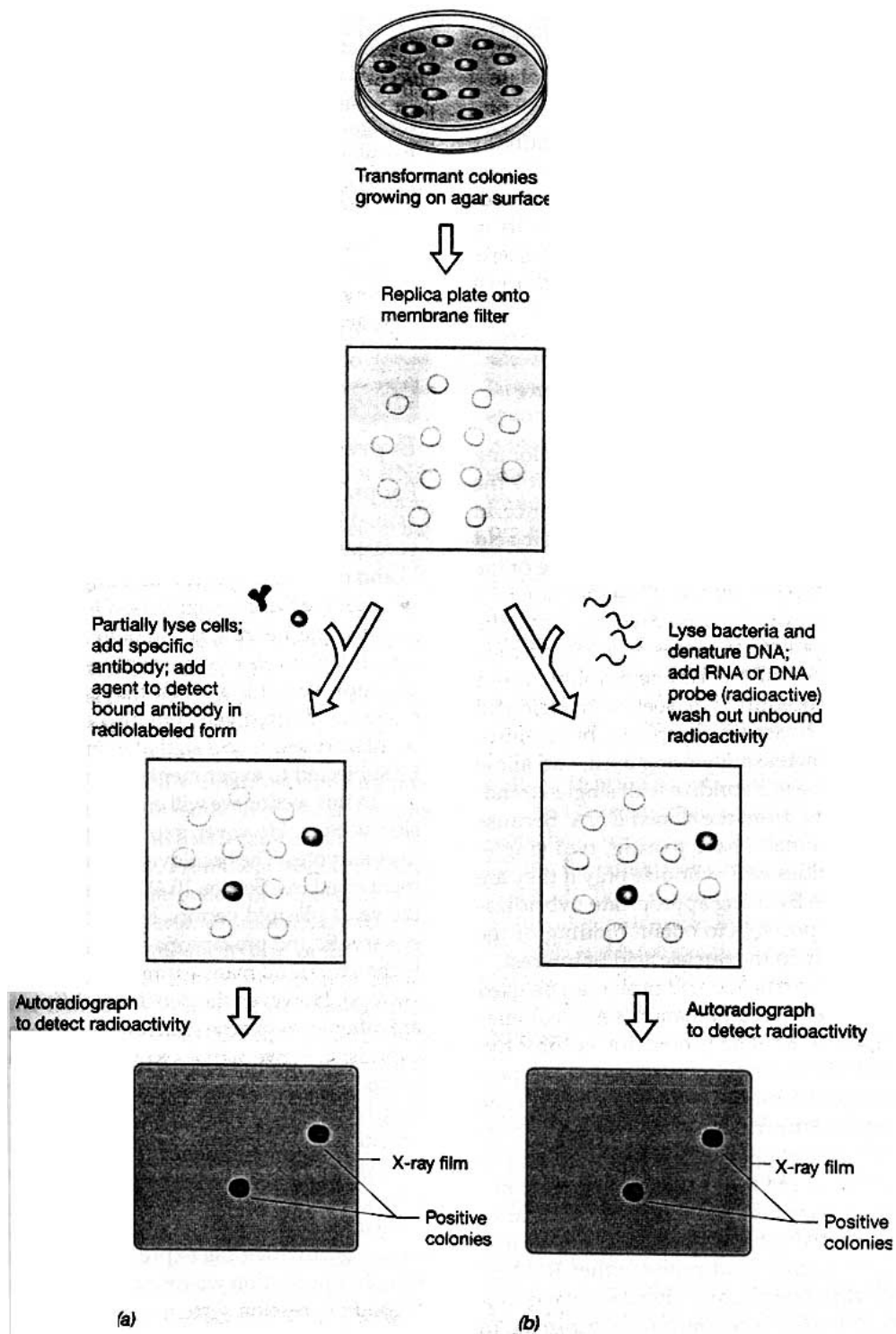
### 5.7. Tuyển chọn dòng mục tiêu

Sau khi đã thiết lập được ngân hàng DNA, cần tìm dòng tế bào chủ mục tiêu chứa gen quan tâm.

Nếu gen này được thể hiện trong tế bào chủ là vi khuẩn tạo thành sản phẩm protein thì có thể được phát hiện bằng một trong các cách như sau: (1) dùng phương pháp lai (Western blotting, Immunoblotting) dựa trên một kháng thể đặc hiệu với sản phẩm protein của gen; (2) đo đặc hoạt tính của protein nếu là enzyme; (3) bổ trợ cho một đột biến khuyết ở tế bào chủ (trường hợp gen ngoại lai là đồng dạng với gen của tế bào chủ).

Trường hợp gen ngoại lai không được thể hiện trong tế bào chủ, người ta dùng phương pháp lai khuẩn lạc (colony hybridization) để phát hiện gen mục tiêu. Trong trường hợp này, cần phải tạo một mẫu dò (probe) là một đoạn DNA ngắn có trình tự đã biết bù trừ với một phần của gen mục tiêu. Đánh dấu mẫu dò bằng phóng xạ hoặc không phóng xạ. Để chọn lọc dòng mục tiêu, người ta tạo ra các bản sao ở dạng các khuẩn lạc của các dòng tế bào chủ trên bề mặt hộp môi trường, dung giải tế bào để phơi trần DNA. Sau đó, DNA này được lai với mẫu dò để tìm khuẩn lạc chứa DNA lai được với mẫu dò (Hình 4.50).





**Hình 4.50** Tuyển chọn dòng mục tiêu. a, Phương pháp sử dụng kháng thể chuyên biệt; b, phương pháp lai khuẩn lạc

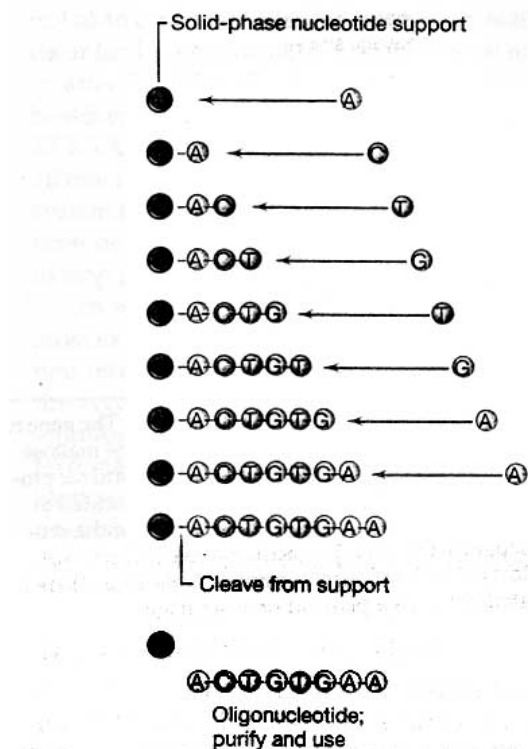
### 5.8. Vector biểu hiện (expression vector)

Trong nhiều trường hợp, mục đích của dòng hóa gen là nhằm để tổng hợp protein tái tổ hợp với số lượng lớn. Nếu gen mã hóa protein này không có cùng nguồn gốc với tế bào chủ, thì gen không được thể hiện. Trong trường hợp này, cần dùng đến vector thể hiện (expression vector) là vector được thiết kế sao cho gen ngoại lai được gắn vào vector và có thể được điều hòa bởi hệ thống của tế bào chủ, tức là gen được đặt dưới sự kiểm soát của một promoter được nhận diện bởi RNA polymerase của tế bào chủ. Để tối ưu hóa sự sinh tổng hợp protein hay thể hiện của gen, vector thể hiện cần hiện diện nhiều bản sao trong tế bào, gen ngoại lai cần được gắn dưới một promoter mạnh có ái lực cao với RNA polymerase của tế bào chủ, vị trí gắn cho phép tạo được mRNA có khung dịch mã đúng và mRNA tạo thành cần được dịch mã một cách hữu hiệu.

Sự thể hiện của một gen có thể được kiểm soát bằng cách đặt dưới một hệ thống điều hòa tắt mở (regulatory switch) như *lac*, *trp* hoặc ức chế lamda. Trong trường hợp này, gen ngoại lai chỉ được thể hiện khi môi trường nuôi cấy tế bào chủ được chuyển về những điều kiện thích hợp.

### 5.9. 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 điển 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 (Hình 4.51).

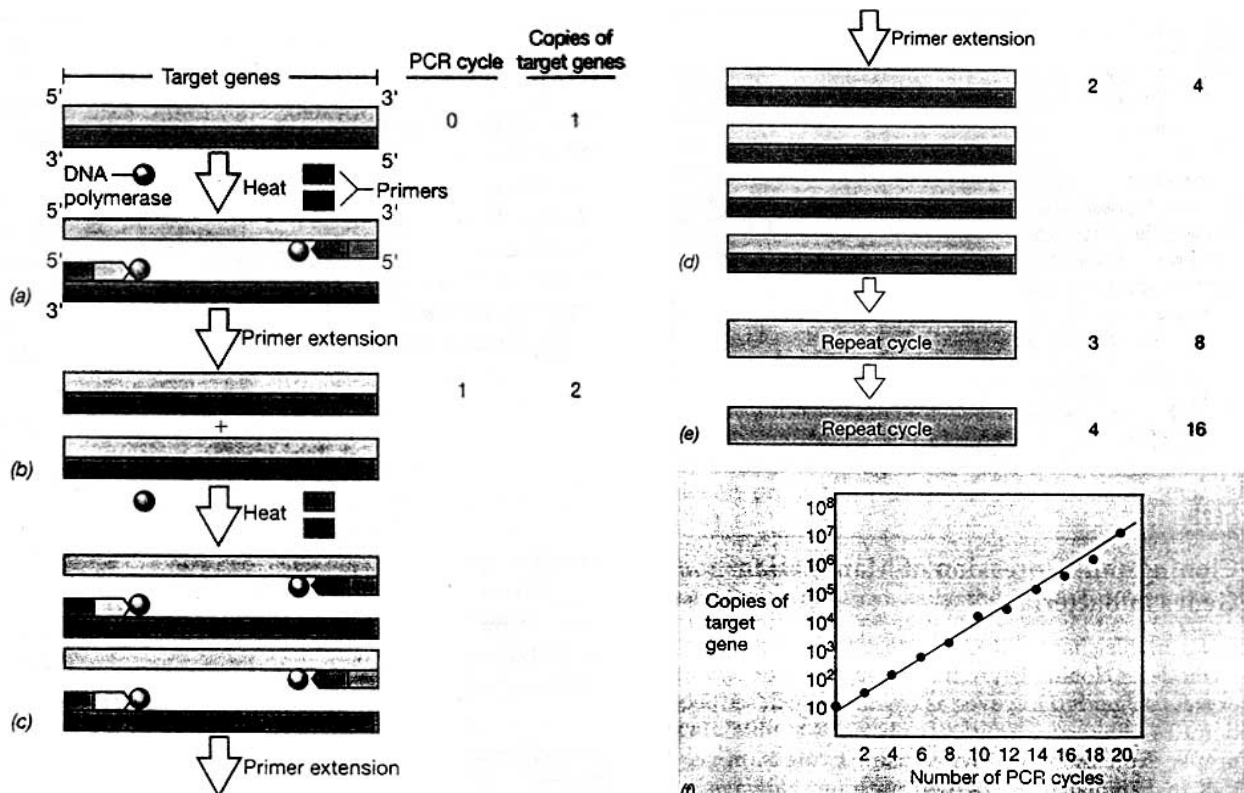


Hình 4.51 Tổng hợp hóa học một trình tự oligonucleotide bằng quy trình pha rắn

FIGURE 10.10 Solid-phase procedure for synthesis of a DNA fragment of defined sequence. Chemical synthesis proceeds by adding one nucleotide at a time to the growing chain.

### 5.10. Khuếch đại bản sao DNA bằng kỹ thuật PCR

Trong một số ứng dụng về công nghệ di truyền, cần sử dụng một lượng lớn các trình tự DNA chuyên biệt. Phản ứng chuỗi polymerase PCR (polymerase chain reaction) cho phép nhân số lượng bản sao của một đoạn DNA lên  $10^6$  lần. Phản ứng bao gồm các chu kỳ lặp lại của các bước như: (1) đun nóng DNA để tạo mạch đơn; (2) làm nguội, bổ sung primer (đoạn DNA ngắn có trình tự bổ sung với hai đầu của đoạn DNA cần nhân bản); (3) kéo dài primer dựa vào khuôn DNA nhờ sự xúc tác của enzyme *Taq* DNA polymerase. Sau đó một chu kỳ mới gồm ba bước như trên lại được lặp lại (Hình 4.52). DNA polymerase được sử dụng cần phải có tính bền nhiệt, chịu được nhiệt độ của bước (1). Do vậy nguồn enzyme từ vi khuẩn ưa nhiệt *Thermus aquaticus* là *Taq* DNA polymerase thường được dùng cho phản ứng này. Mỗi chu kỳ sẽ làm tăng gấp đôi số lượng bản sao của DNA ban đầu. Phản ứng PCR được kết hợp với qui trình định vân tay DNA (DNA fingerprinting) cho phép nhận diện được một đoạn DNA nhất định có số lượng rất nhỏ.



Hình 4.52 Phản ứng PCR để khuếch đại bản sao DNA

### 5.11. Dòng hóa và biểu hiện gen của tế bào nhân thật trong vi khuẩn

Khi cần dòng hóa và thể hiện gen của sinh vật nhân thật trong tế bào *E. coli*, cần phải xem xét những khác biệt của sự biểu hiện gen của hai hệ thống.

Tế bào eukaryote chứa nhiều DNA hơn vi khuẩn trong đó một bộ phận lớn là các trình tự lặp lại không mang mã. Ngoài ra, gen còn chứa các trình tự không mang mã bên trong gen được gọi là intron (xen lẫn với trình tự mang mã là exon) cần được cắt khỏi tiền mRNA (mRNA sơ cấp) khi mRNA này đi ra khỏi nhân vào tế bào chất (quá trình chế biến mRNA).

Do vậy, thông thường, để dòng hóa và thể hiện gen của tế bào nhân thật, người ta thiết lập ngân hàng DNA bù trừ (complementary DNA, cDNA, library) thay cho ngân hàng DNA bộ gen. Trong trường hợp này, mRNA được trích ly và thu nhận từ cơ quan, mô, tế bào, sau đó cDNA được tạo thành bằng phản ứng phiên mã ngược được xúc tác bởi enzyme reverse transcriptase (RTase).

Việc nhận diện một phân tử mRNA nhất định được thực hiện bằng phản ứng lai phân tử sử dụng mẫu dò. Mẫu dò DNA này được tổng hợp hóa học dựa trên thông tin biết được từ trình tự amino acid của protein tạo bởi mRNA. Sử dụng bản mã di truyền, từ một trình tự amino acid có thể thiết lập được trình tự nucleotide tương ứng. Mẫu dò này được đánh dấu và dùng để nhận diện phân tử mRNA tương ứng sau khi tổng các phân tử mRNA từ cơ quan, mô, tế bào được tách ra theo kích thước bằng điện di trên thạch agarose.

Một phương pháp có thể dùng để làm giàu phân tử mRNA mục tiêu là bổ sung kháng thể chuyên biệt với protein mã hóa bởi mRNA vào hệ thống polysome. Trên polysome có chứa mRNA mục tiêu, phân tử protein được tổng hợp sẽ tương tác với kháng thể tạo thành tủa trong đó có chứa cả mRNA.

Để thể hiện một gen của eukaryote trong tế bào prokaryote, gen này được gắn dưới một promoter mạnh và cần có một trình tự gắn của ribosome vi khuẩn. Một phương pháp khác là gắn gen của eukaryote dung hợp với một gen của prokaryote để thể hiện thành một protein dung hợp (fusion protein), trong đó protein của eukaryote được gắn vào sau một trình tự amino acid của protein tế bào prokaryote. Sau đó, phần polypeptide của prokaryote được loại khỏi protein tạo thành protein eukaryote thuần.

#### **5.12. Tạo đột biến điểm (site-directed mutagenesis)**

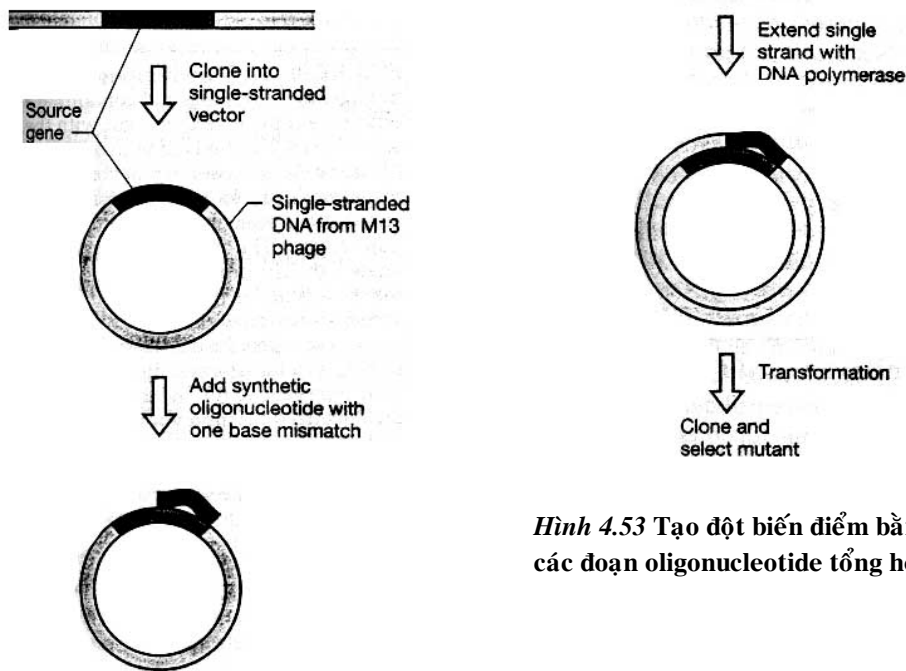
Kỹ thuật di truyền có ảnh hưởng quan trọng đối với cả sinh học cơ bản và ứng dụng. Một ảnh hưởng quan trọng trong nghiên cứu cơ bản là lĩnh vực nghiên cứu di truyền học.

Ngày nay, các nhà di truyền học vi khuẩn có thể biến đổi trình tự nucleotide một cách chuyên biệt bằng đột biến điểm (site-directed mutagenesis). Người ta tổng hợp một đoạn oligonucleotide ngắn có chứa trình tự được biến đổi một base. Trong phản ứng *in vitro*, oligonucleotide này sẽ bắt cặp với đoạn tương đồng trên mạch đơn của gen ban đầu. Sử dụng DNA polymerase, người ta có thể kéo dài oligonucleotide này dựa trên trình tự của gen ban đầu thành một phân tử DNA mạch kép. Gen này sau đó được gắn vào một vector thể hiện và được đưa vào tế bào chủ. Như vậy, có thể thực hiện sự thay thế một amino acid chuyên biệt trên phân tử protein (Hình 4.53).

Các thí nghiệm đột biến điểm được dùng để kiểm tra bằng thực nghiệm các giả thiết về mối quan hệ giữa cấu trúc bậc một với chức năng của phân tử protein.

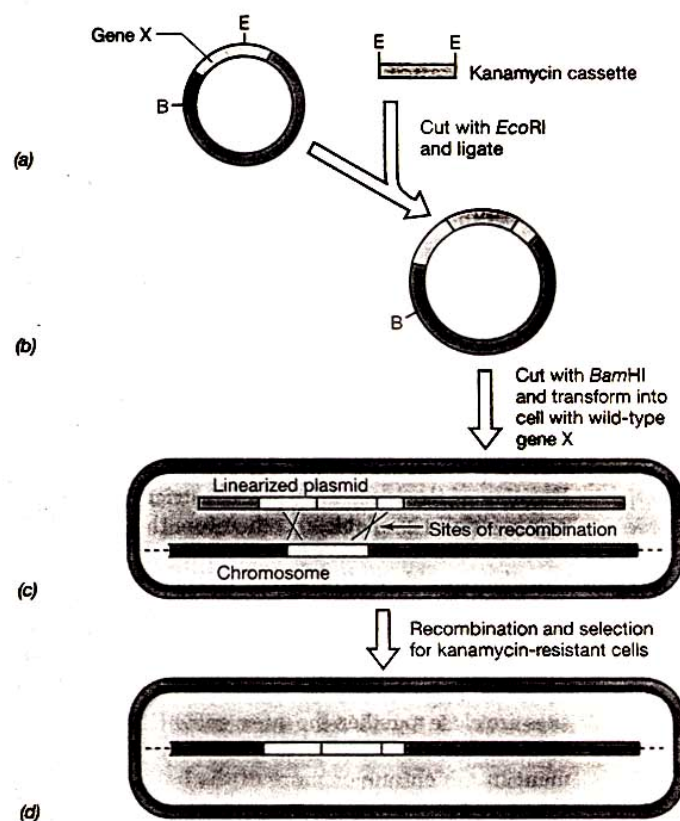
Một phương pháp để tạo đột biến khác là đột biến hộp (cassette mutagenesis). Trong trường hợp này, một đoạn DNA (cassette) trên gen ban đầu được lấy ra khỏi gen và thay bằng một đoạn tương ứng chứa DNA tổng hợp và được thay đổi một hoặc vài cặp base (Hình 4.54).





Hình 4.53 Tạo đột biến điểm bằng các đoạn oligonucleotide tổng hợp

Người ta cũng tiến hành thay thế đoạn DNA trong gen ban đầu bằng một đoạn có tính kháng kháng sinh, được gọi là đột biến phá vỡ gen (gen disruption). Khi đó thể đột biến sẽ trở nên kháng kháng sinh nhưng lại không thể hiện kiểu hình của gen đã bị phá vỡ.



Hình 4.54 Tạo đột biến phá vỡ gen bằng cơ chế hộp (cassette mechanism)

### 5.13. Ứng dụng thực tiễn của kỹ thuật di truyền

Kỹ thuật di truyền mở ra khả năng to lớn để cải thiện các quá trình có ý nghĩa kinh tế và trong điều trị bệnh. Y học, nông nghiệp, công nghiệp đều có thể có những ứng dụng quan trọng của kỹ thuật dòng hóa và thể hiện gen. Ngoài ra, kỹ thuật gen góp phần thúc đẩy mạnh mẽ các nghiên cứu di truyền học ở sinh vật bậc cao và là công cụ hùng mạnh để nghiên cứu cơ bản về di truyền vi sinh vật.

Những lĩnh vực ứng dụng thực tiễn chính của kỹ thuật tái tổ hợp gen là: (1) sản xuất những sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật, ví dụ như kháng sinh; (2) sản xuất vắc xin phòng chống virus; (3) sản xuất protein của động vật hữu nhũ; (4) tạo ra các thực vật, động vật chuyển gen; (5) phân lập và ứng dụng nguồn gen vi sinh trong xử lý môi trường; (6) tạo các thuốc điều hòa sự thể hiện của gen; (7) liệu pháp gen chữa trị các bệnh di truyền.

Ở động vật hữu nhũ, nhiều protein có giá trị y học chỉ được tổng hợp với số lượng nhỏ, khó có thể thu nhận, tinh chế và ứng dụng trong thực tế. Việc dòng hóa các gen tương ứng và thể hiện gen này trong hệ thống vi khuẩn cho phép tổng hợp được các protein này với số lượng lớn. Ví dụ như insulin, hormon tăng trưởng, hormon tuyến cận giáp, nhân tố tăng trưởng xương, các chất chống ung thư, chất điều tiết miễn dịch, vắc xin (Hình 4.55)...

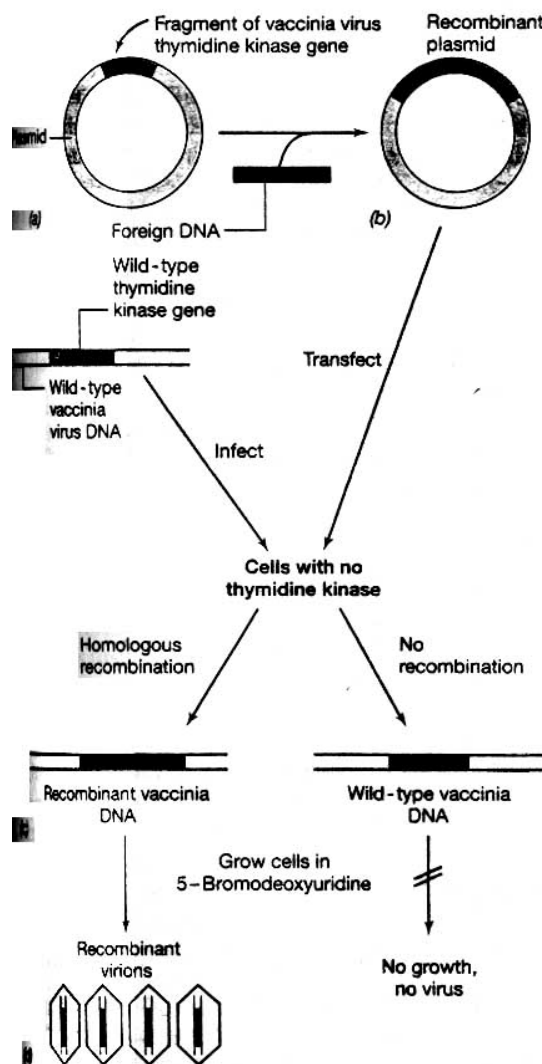
Kỹ thuật di truyền được ứng dụng để tạo ra các cây kháng bệnh, cải thiện chất lượng sản phẩm, tạo các sản phẩm của cây dùng làm nguồn chứa protein tái tổ hợp hoặc có hiệu lực vắc xin. Vector dòng hóa thường được dùng ở hệ thống thực vật là plasmid Ti của vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, có khả năng chuyển gen ngoại lai vào thực vật (Hình 4.56).

### 5.14. Tổng hợp các nguyên tắc căn bản của kỹ thuật di truyền

Những nguyên tắc sau đây cần thiết cho sự phát triển của di truyền học (Hình 4.57):

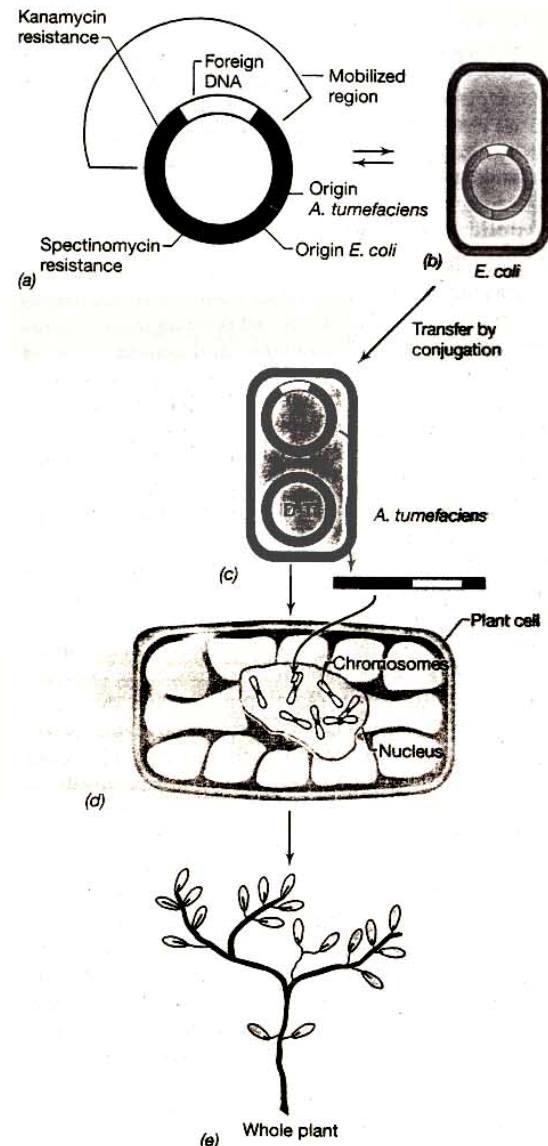
- Hóa học DNA: thiết lập các qui trình ly trích, giải trình tự và tổng hợp DNA.
- Enzyme học DNA: phát hiện enzyme cắt giới hạn, ligase và DNA polymerase.
- Sao chép DNA: hiểu được cơ chế sao chép DNA và tầm quan trọng của các vector DNA có khả năng sao chép độc lập.
- Plasmid và giao nạp: phát hiện plasmid, hiểu cơ chế sao chép của plasmid và cơ chế truyền plasmid từ tế bào cho sang tế bào nhận.
- Phage ôn hòa: hiểu được cơ chế sao chép và sát nhập của phage ôn hòa trong tế bào chủ, cơ chế tải nạp bởi phage.
- Biến nạp: phát hiện các phương pháp chuyển DNA trần vào tế bào.
- Hóa học và enzyme học RNA: biết phương pháp thao tác với mRNA, hiểu cấu trúc và cơ chế chế biến mRNA sơ cấp thành mRNA hoàn chỉnh ở tế bào eukaryote.
- Sao chép ngược: phát hiện enzyme phiên mã ngược RTase ở retrovirus, ứng dụng để tổng hợp DNA từ mRNA.
- Phiên mã: biết các nhân tố tham gia điều hòa sự phiên mã, phát hiện promoter và cơ chế điều hòa operon.
- Dịch mã: hiểu các bước của quá trình dịch mã, ý nghĩa quan trọng của sự gắn ribosome lên mRNA, vai trò của mã khởi đầu và ý nghĩa của khung đọc đúng.

- Hóa học protein: hình thành 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: hiểu cơ chế đánh dấu protein để tiết ra khỏi tế bào, các phương thức biến đổi sau dịch mã khác.
- Bộ mã di truyền: làm sáng tỏ bộ mã di truyền, tính toàn năng và một số mã ngoại lệ



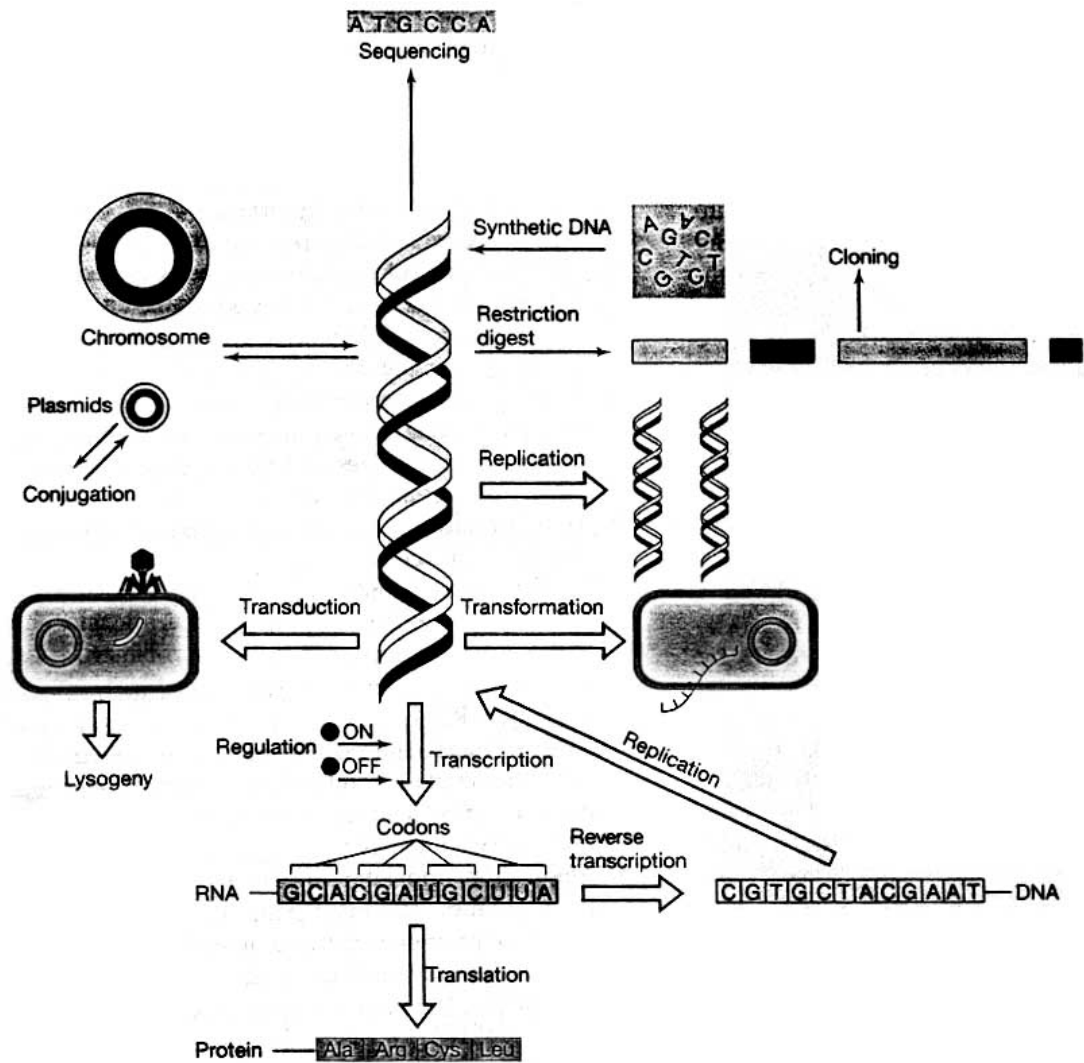
**FIGURE 10.18** Production of recombinant vaccinia virus. (a) Foreign DNA is cloned into a plasmid containing a small piece of the vaccinia virus thymidine kinase gene. (b) Recombinant plasmid formed. (c) The recombinant plasmid is then used to transfect host cells already infected with wild-type vaccinia. If recombination occurs, recombinant vaccinia DNA can be produced. (d) The cells are then placed in the presence of 5-bromodeoxyuridine, a compound that is toxic to cells having an active thymidine kinase. Only recombinant virions develop under these conditions. If the recombinant vaccinia virions contain genes for other viral coat proteins, these may be expressed.

**Hình 4.55** Nguyên tắc tạo vaccinia virus tái tổ hợp



**FIGURE 10.19** Production of transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. (a) Generalized plant transfection vector containing ends of T-DNA (in red), foreign DNA (in yellow), origin of replication elements for both *E. coli* and *A. tumefaciens*, and spectinomycin and kanamycin resistance markers. The kanamycin resistance marker can be selected for in plants. (b) The vector can be put into *E. coli* for cloning purposes and then transferred to *A. tumefaciens* by conjugation. (c) The resident Ti plasmid used for transferring the vector to the plant (D-Ti) is itself genetically engineered to remove key pathogenesis genes. (d) However, D-Ti can mobilize the T-DNA region of the vector for transfer to plant cells grown in tissue culture. From the recombinant cell, whole plants can be regenerated.

**Hình 4.56** Nguyên tắc tạo cây chuyển gen bằng *Agrobacterium tumefaciens*



Hình 4.57 Tổng hợp các quá trình nền tảng của kỹ thuật di truyền