

Chương 4:

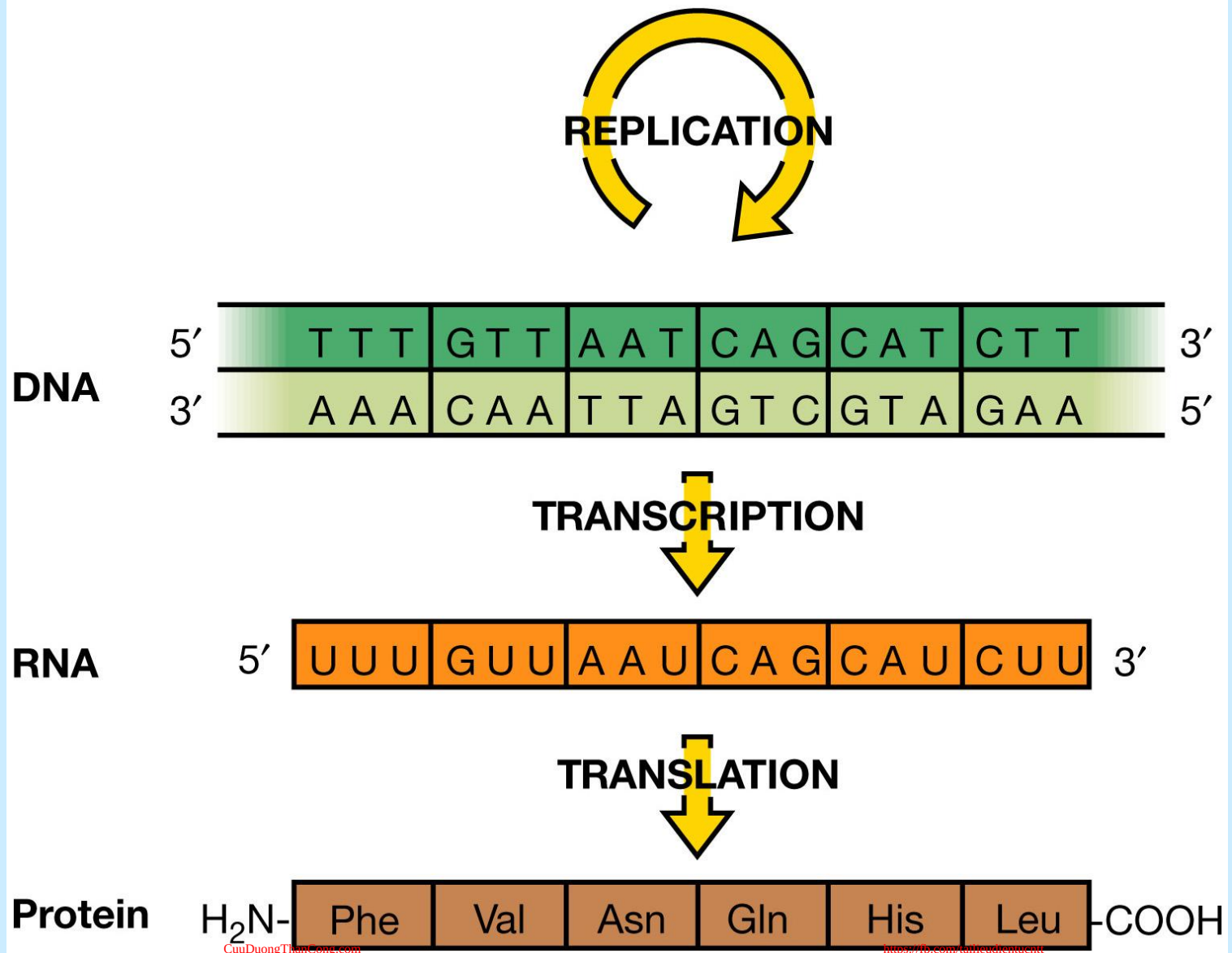
Di truyền học vi sinh vật

- 1. Di truyền học phân tử**
- 2. Điều hòa sự biểu hiện của gen**
- 3. Di truyền học vi sinh vật**
- 4. Đặc điểm sinh học của virút**
- 5. Kỹ thuật di truyền**

Di truyền học phân tử

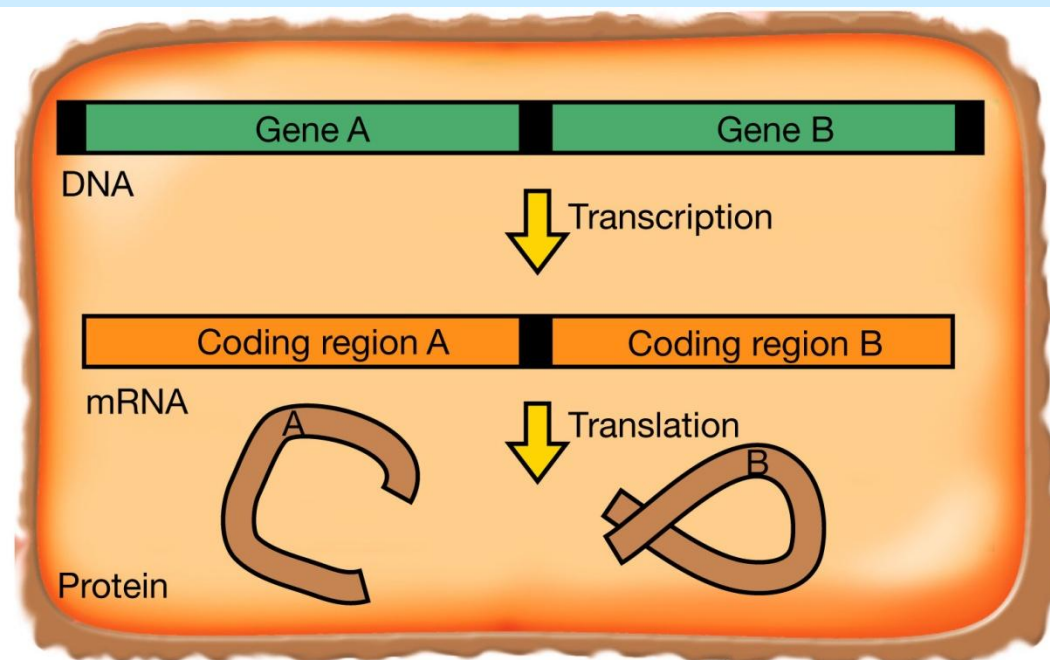
Học thuyết trung tâm

- DNA $\leftrightarrow$ DNA $\rightarrow$ RNA $\rightarrow$ Protein

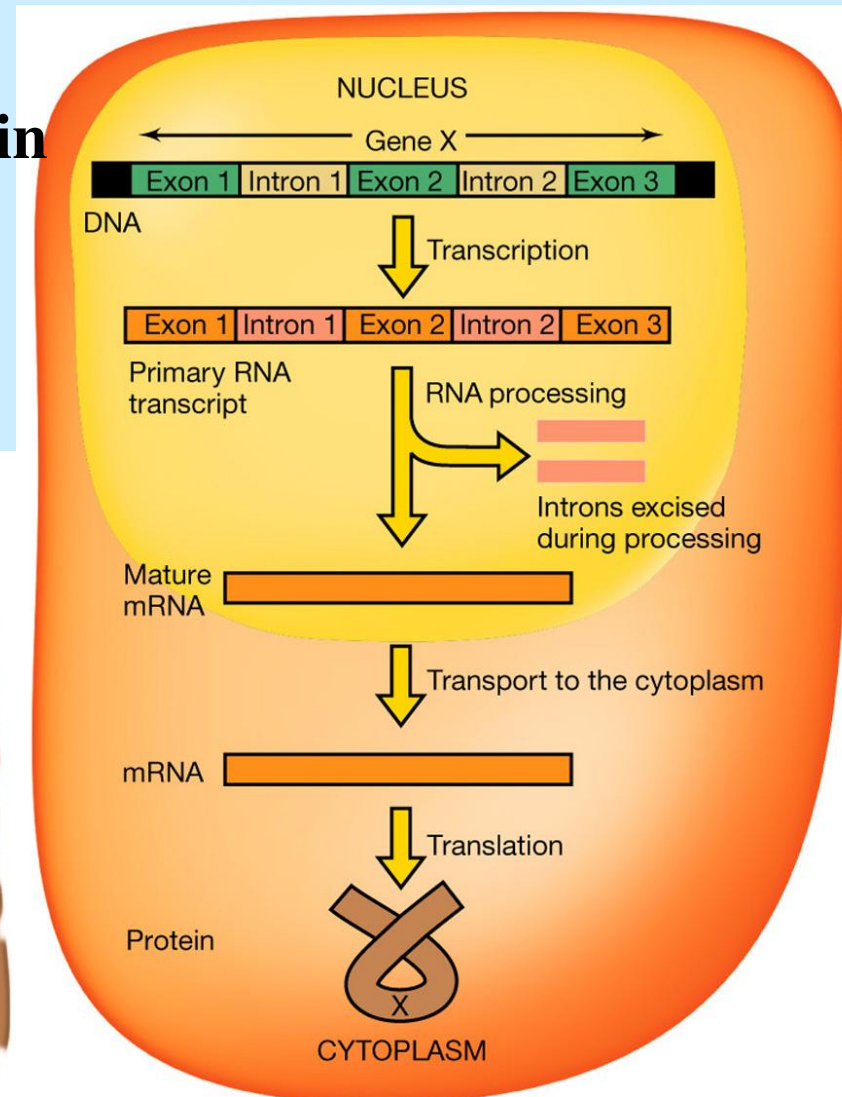


Dòng thông tin trong tế bào prokaryote và eukaryote

- **Prokaryote: DNA → RNA → Protein**
- **Eukaryote: DNA → pre-mRNA → RNA → Protein**



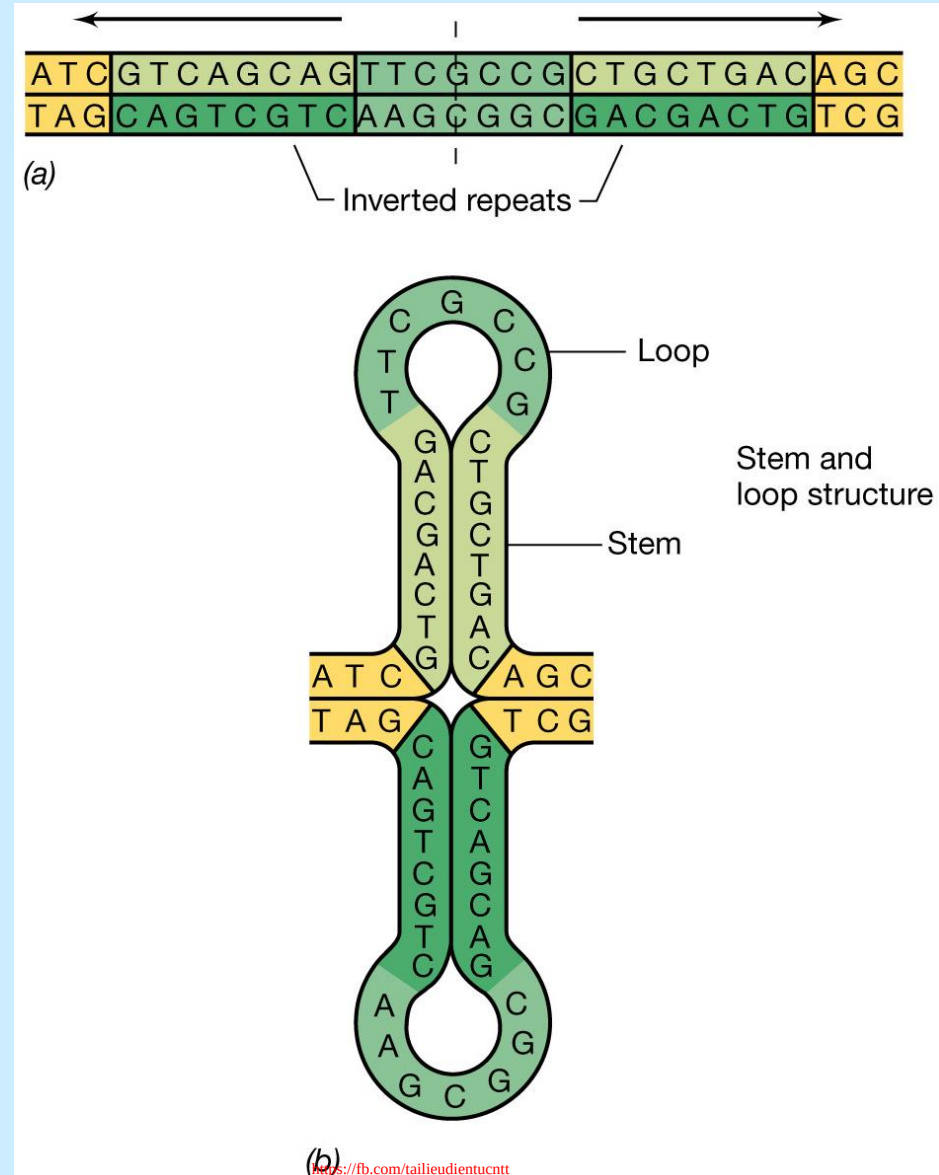
(a) Prokaryote

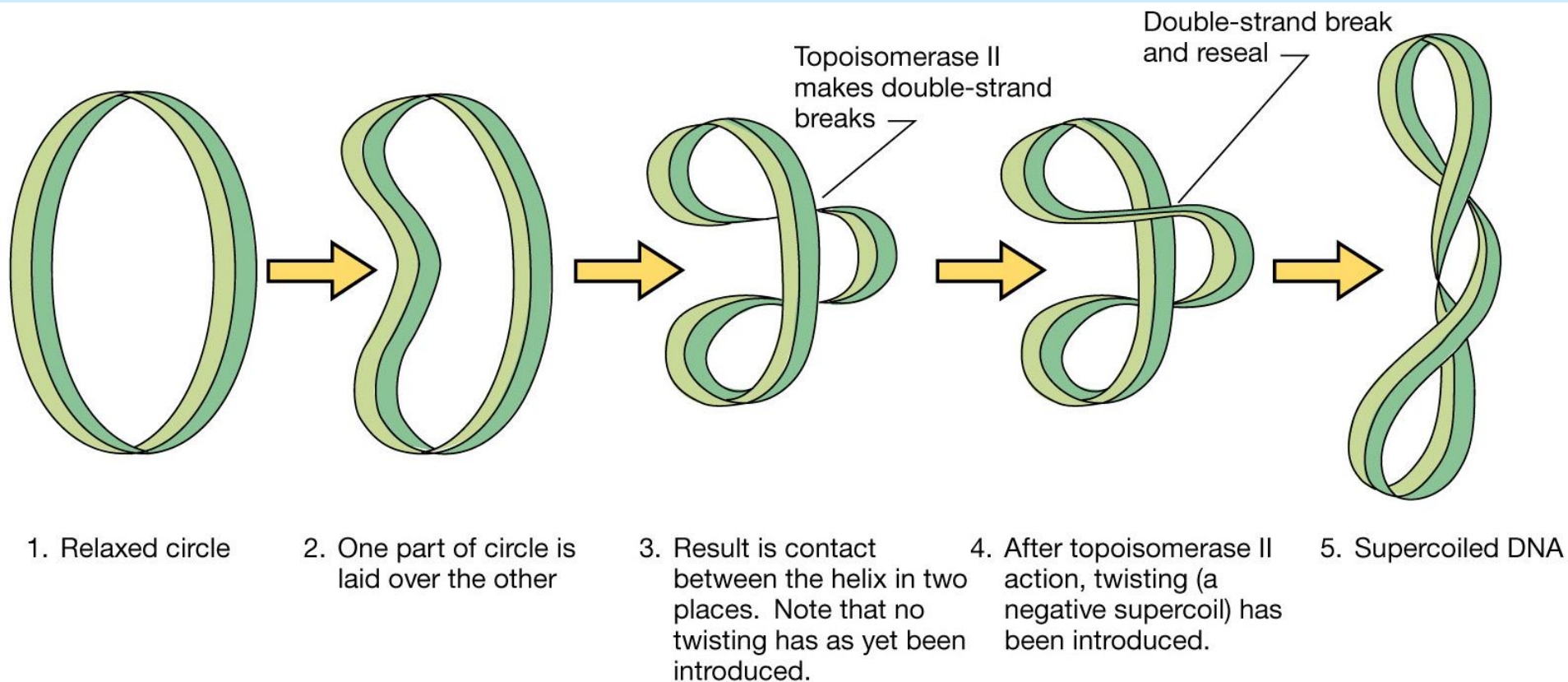
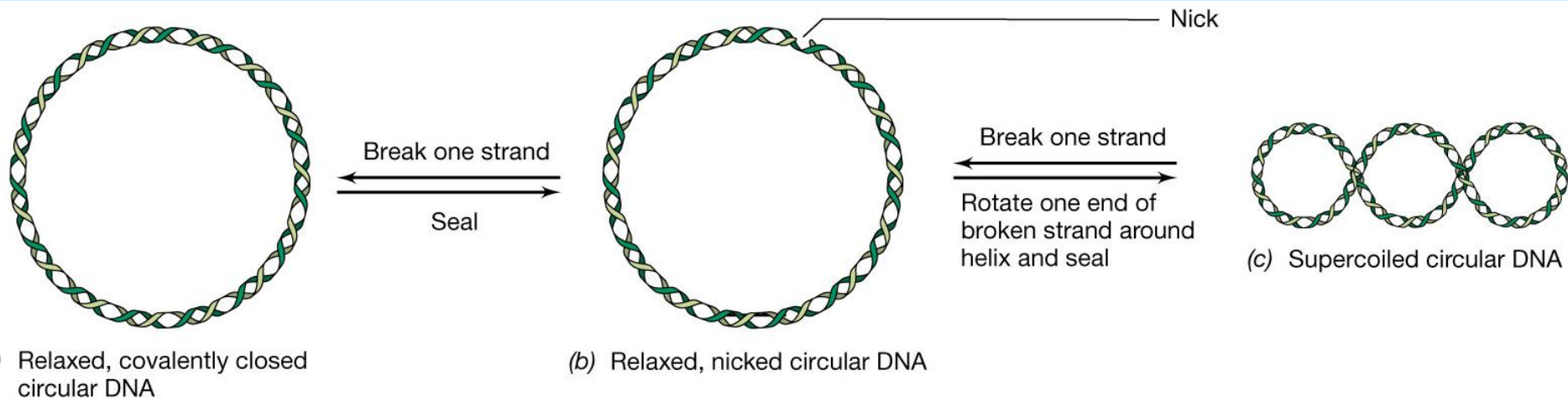


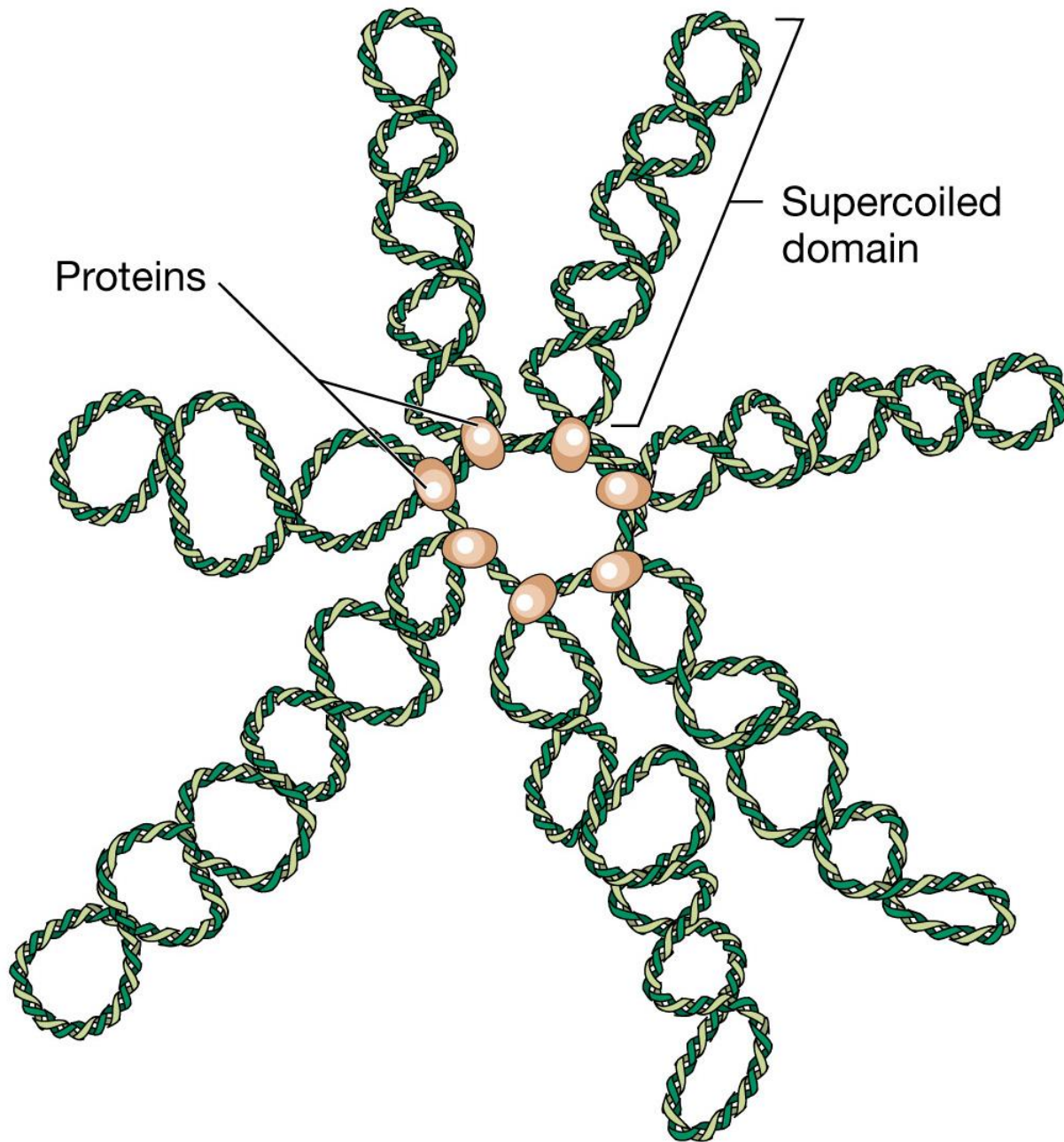
(b) Eukaryote

Đặc điểm cấu trúc nhiễm sắc thể của prokaryote

- Xoắn kép: khe nhỏ, khe lớn; DNA-binding protein gắn vào khe lớn
- Cấu trúc bậc hai: thân-vòng (stem-loop) hay kẹp tóc (hair spin) nơi nhận diện của protein điều hòa
- Cấu trúc siêu xoắn và cấu trúc vòng mở: topoisomerase (gyrase) II và I



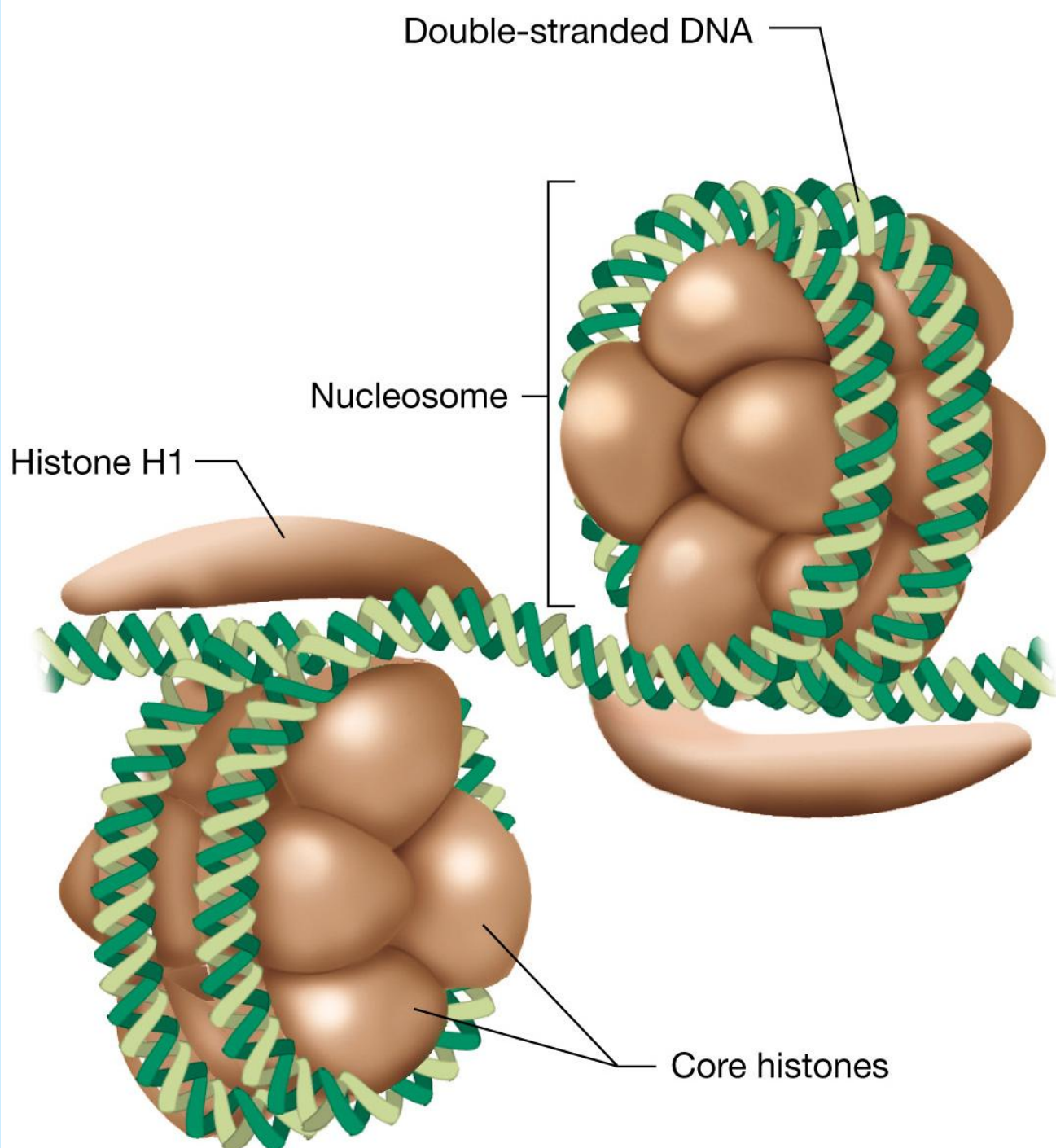




(d) Chromosomal DNA with supercoiled domains

Đặc điểm cấu trúc nhiễm sắc thể của eukaryote

- Kích thước lớn
- Nucleosome, chromatin, nhiễm sắc thể
- Telomere ở hai đầu và centromere ở giữa
- Ba nhóm DNA:
 - + DNA một bản sao: mã hóa protein
 - + DNA lặp lại trung bình: mã hóa histone, immunoglobulin, rRNA, tRNA
 - + DNA vệ tinh: 20% tổng DNA, chức năng chưa rõ



Các phương pháp nghiên cứu DNA

- Ly trích, tinh chế, phân đoạn (tủa ethanol, ly tâm đẳng tỷ trọng, điện di)
- Phát hiện: nhuộm bằng ethidium bromide, đánh dấu (phóng xạ, không phóng xạ)
- Nhân bản DNA: dòng hóa, khuếch đại bằng PCR
- Cấu trúc DNA:
 - + Thành phần GC: điểm tan chảy (melting point)
 - + Trình tự DNA: lai phân tử (molecular hybridization), giải trình tự
- Các phương pháp phân tích đoạn DNA (DNA fragment analysis)

Relative absorbance at 260 nm

1.2
1.0
0.8

72

76

80

84

88

92

96

°C

Single strands

Melting

$T_m = 85.0^\circ$

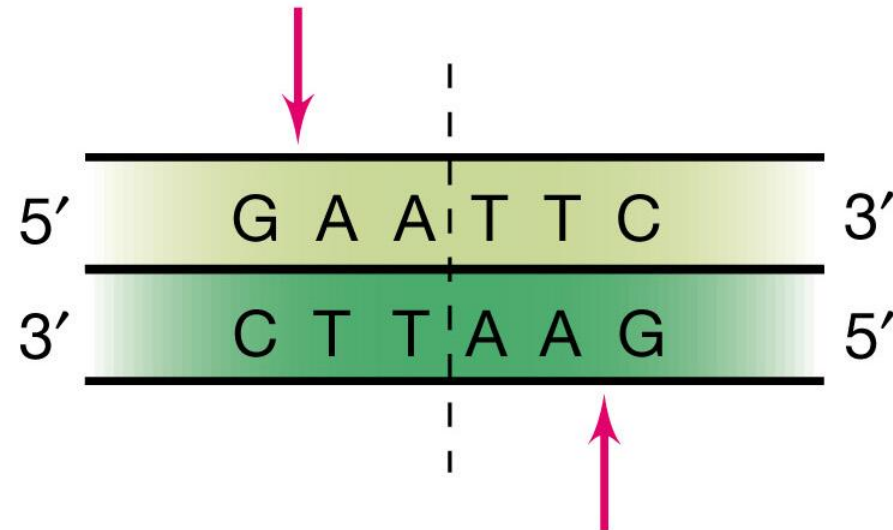
Double strand

Các yếu tố di truyền (genetic element)

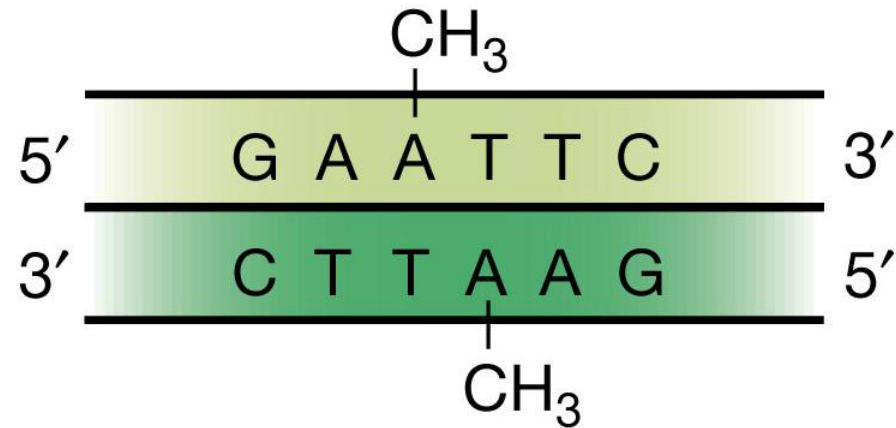
- Các yếu tố di truyền ngoài NST**
- Bộ gen virút**
- Plasmid**
- Bộ gen ti thể**
- Bộ gen diệp lục thể**
- Yếu tố di động (IS element), gen chuyển vị (transposon)**

Enzyme cắt giới hạn và sự biến đổi DNA

- Enzyme cắt giới hạn: nhận diện và cắt DNA ngoại sinh tại trình tự đối ngẫu
- Enzyme biến đổi: biến đổi DNA nội sinh tại trình tự đối ngẫu



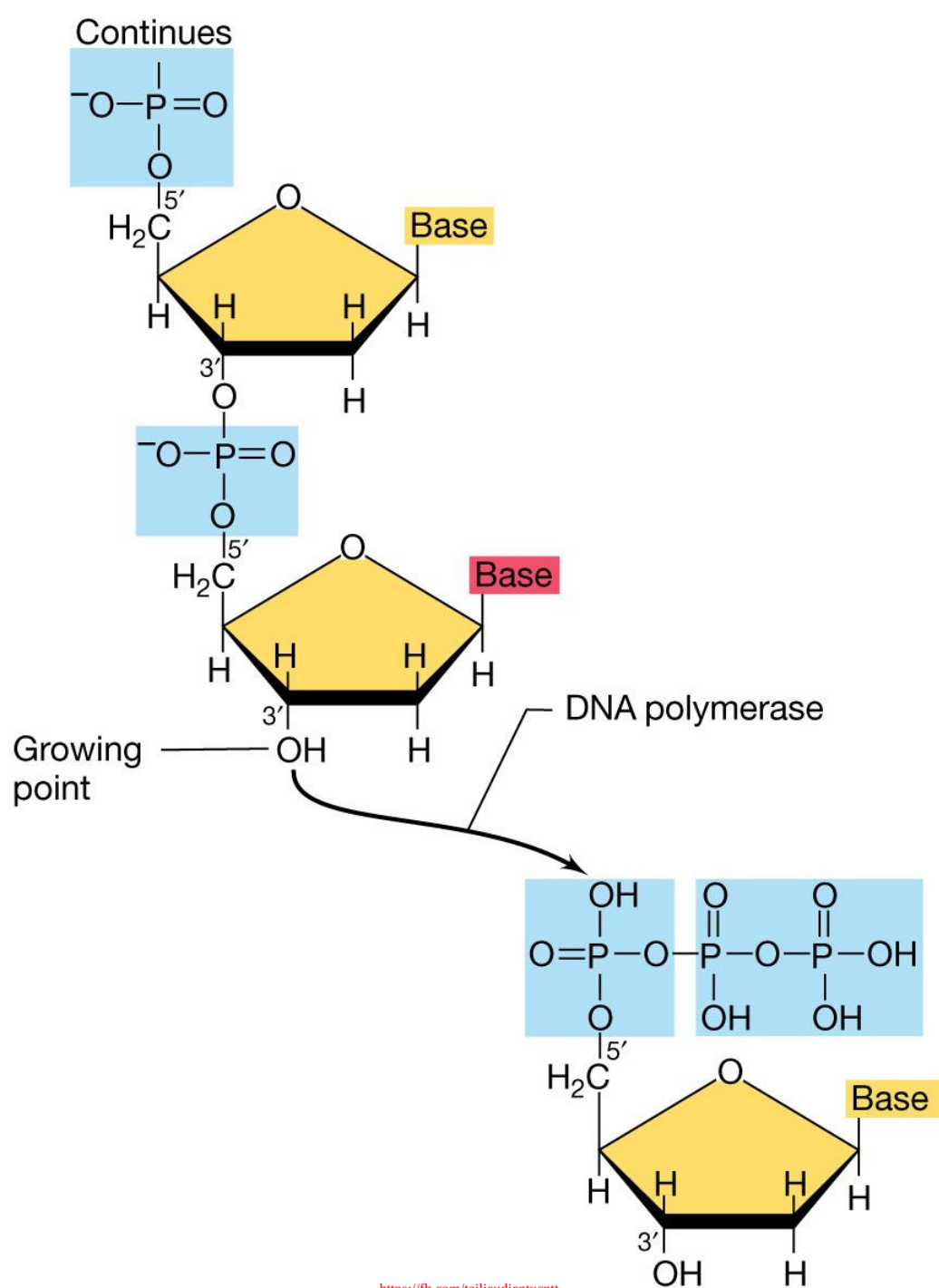
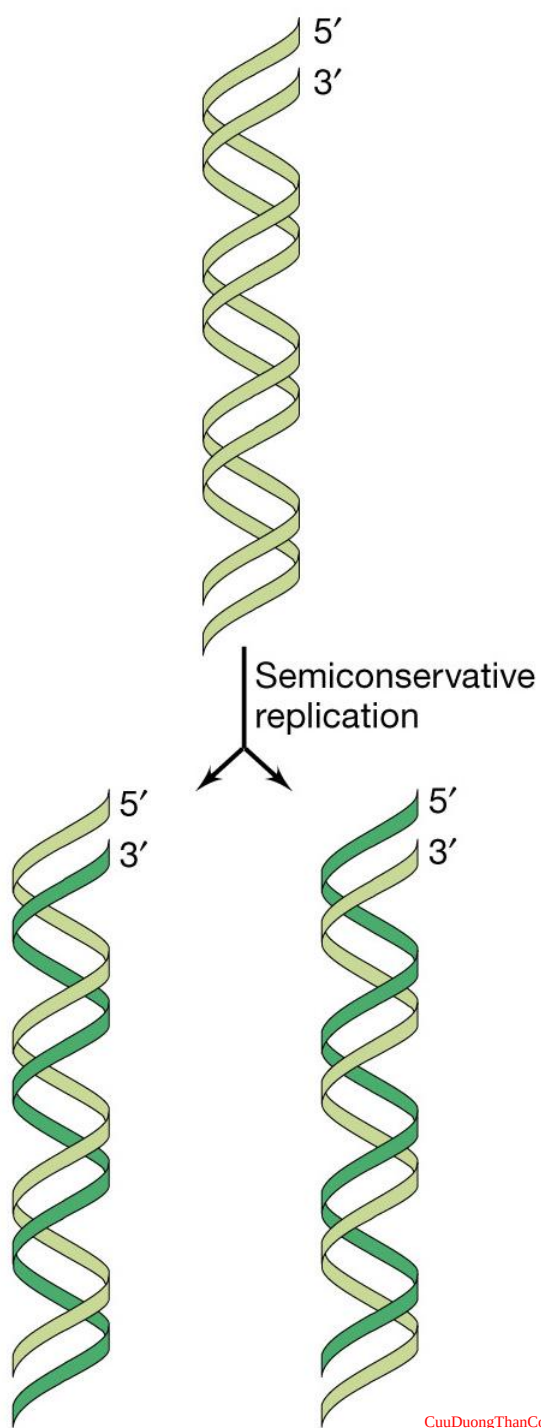
(a)



(b)

Sao chép DNA (replication)

- Tách mạch tạo 2 khuôn: ORI (origin of replication), topoisomerase, helicase, chẻ ba sao chép (replication fork)
- Sao chép 2 phân tử DNA mới bán bảo thủ:
 - + DNA polymerase III, tổng hợp theo chiều 5' – 3'
 - + DNA mạch vòng: hai chẻ ba sao chép ngược chiều
 - + Mạch trước (leading strand, 3' – 5'): tổng hợp liên tục, hướng đi vào chẻ ba (DNA polymerase III)
 - + Mạch sau (lagging strand, 5' – 3'): tổng hợp các đoạn Ozaki, hướng đi ra khỏi chẻ ba (primase, DNA polymerase III, DNA polymerase I, ligase)



RNA primer

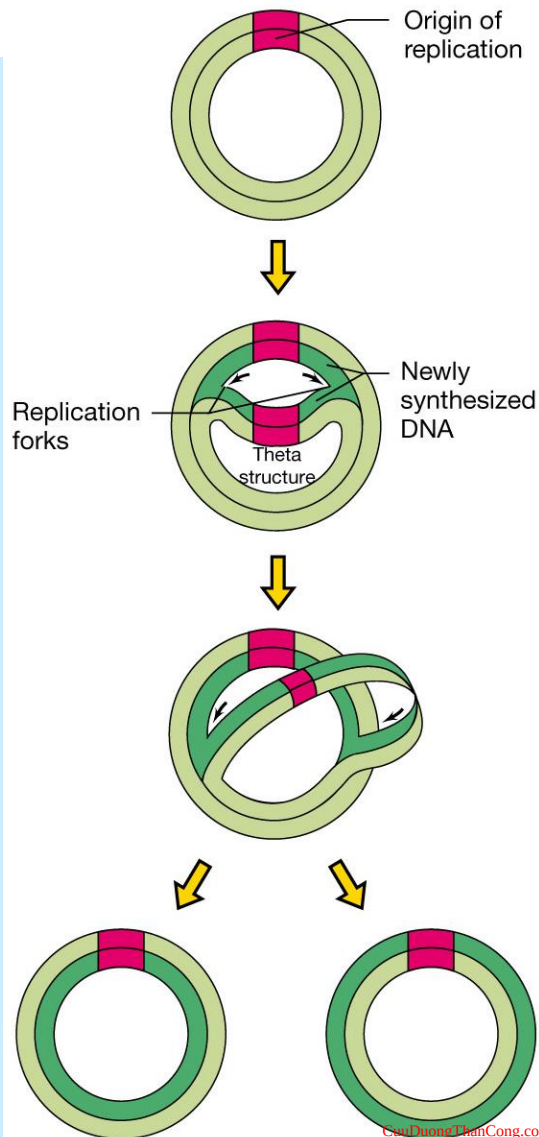
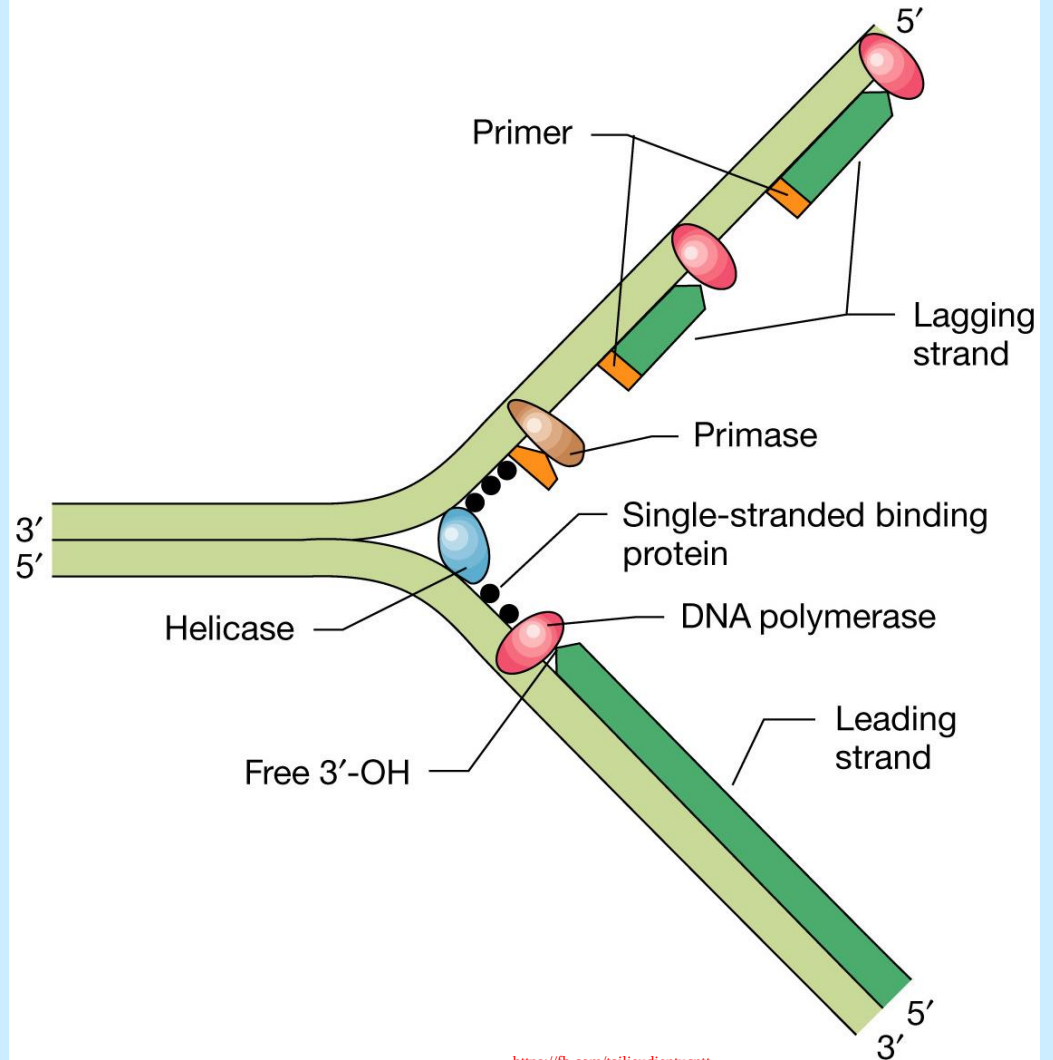
DNA

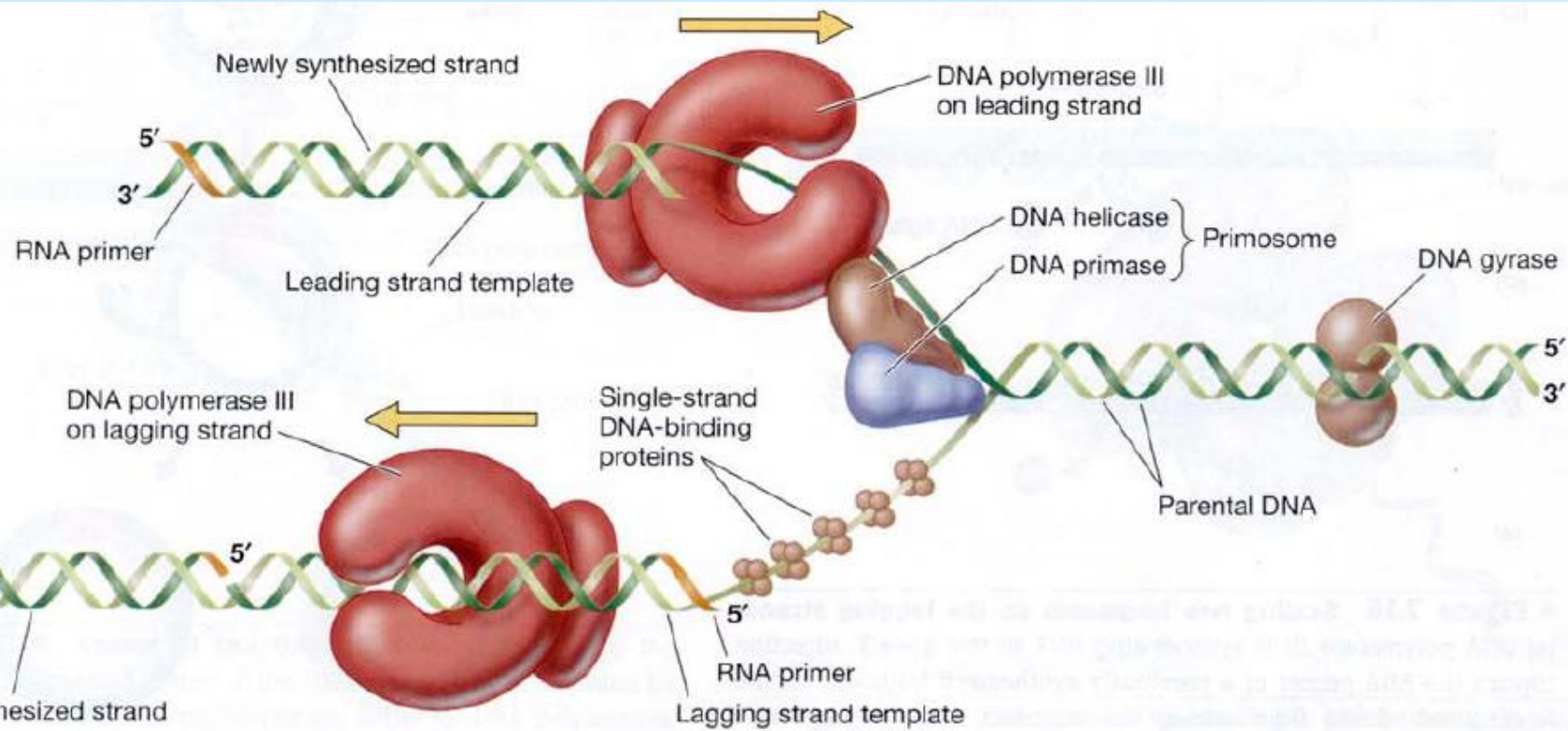
New
Old

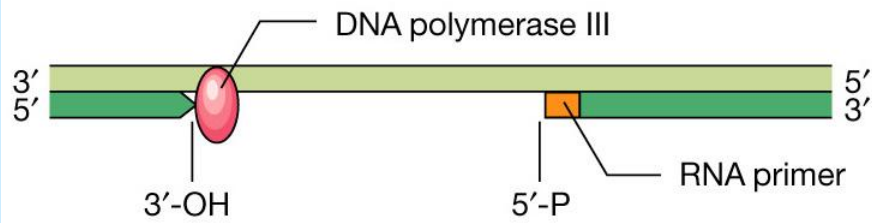
PPP-5'
3'



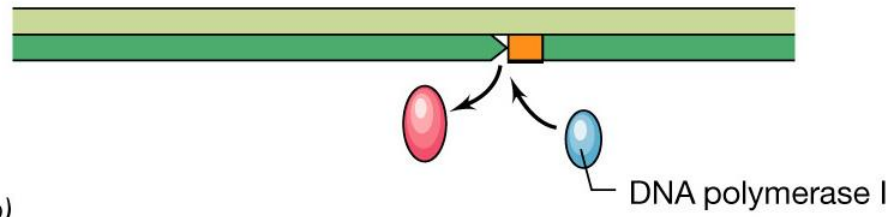
DNA







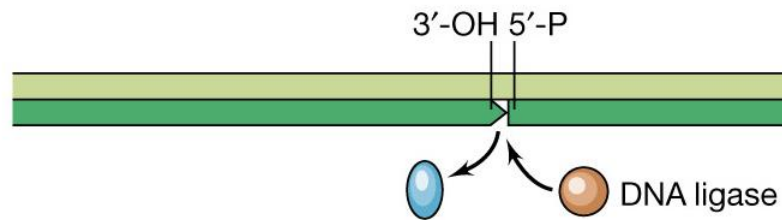
(a)



(b)



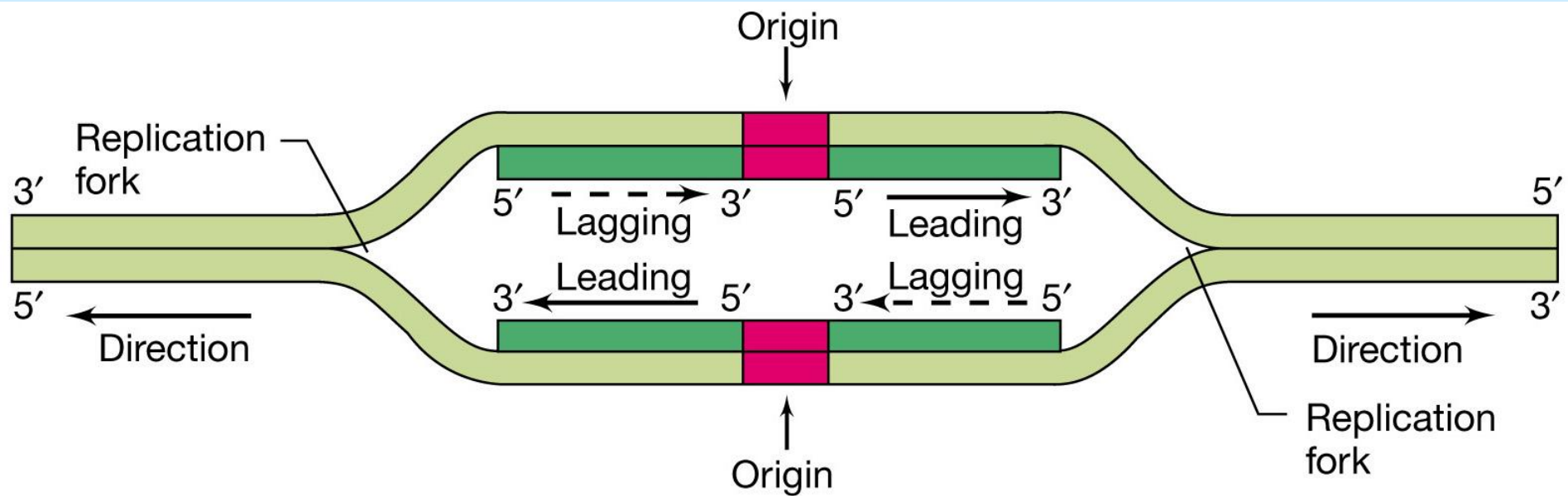
(c)



(d)



(e)



Phiên mã (transcription)

- **Promoter:** RNA polymerase nhận diện và gắn vào trình tự bảo tồn -10, -35 trên mạch mang mã (sense strand, 3'-5')
- **Sigma** tương tác với RNA polymerase lõi và DNA, rời khỏi enzyme khi phiên mã bắt đầu
- RNA polymerase tổng hợp theo chiều 5' – 3'
- Kết thúc phiên mã tại điểm kết thúc (cấu trúc bậc 2)
- Ở prokaryote: polycistronic
- Ở eukaryote:
 - + Pre-mRNA chứa exon và intron
 - + Intron: 5'-GU...A...AG-3', thể cắt (splicesome)
 - + RNA trong splicesome (ribozyme) cắt đầu 5', 3' và nối hai đầu

RNA polymerase
(core enzyme)

Sigma factor



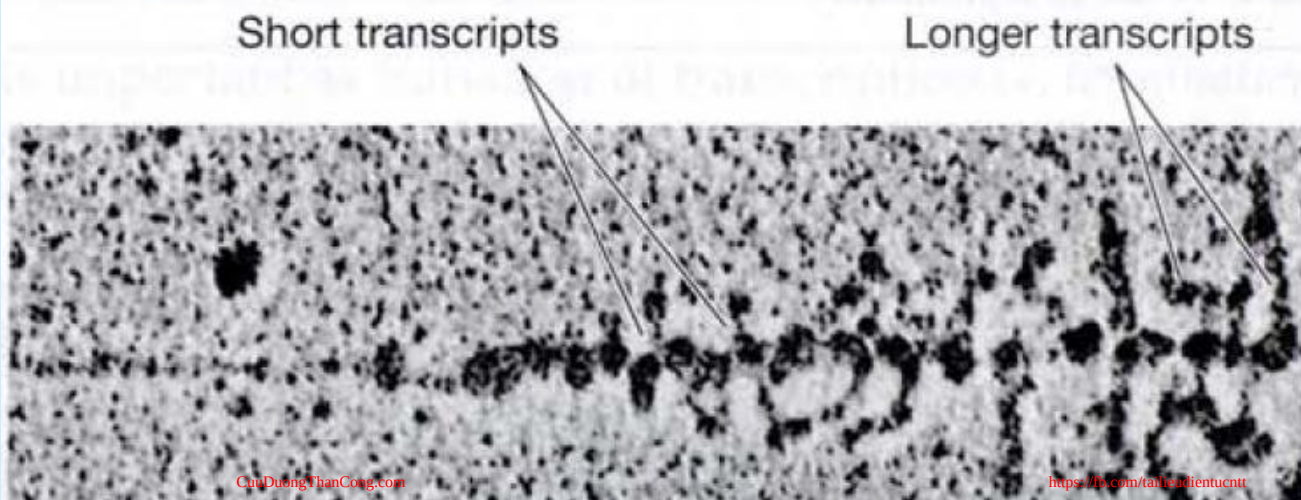
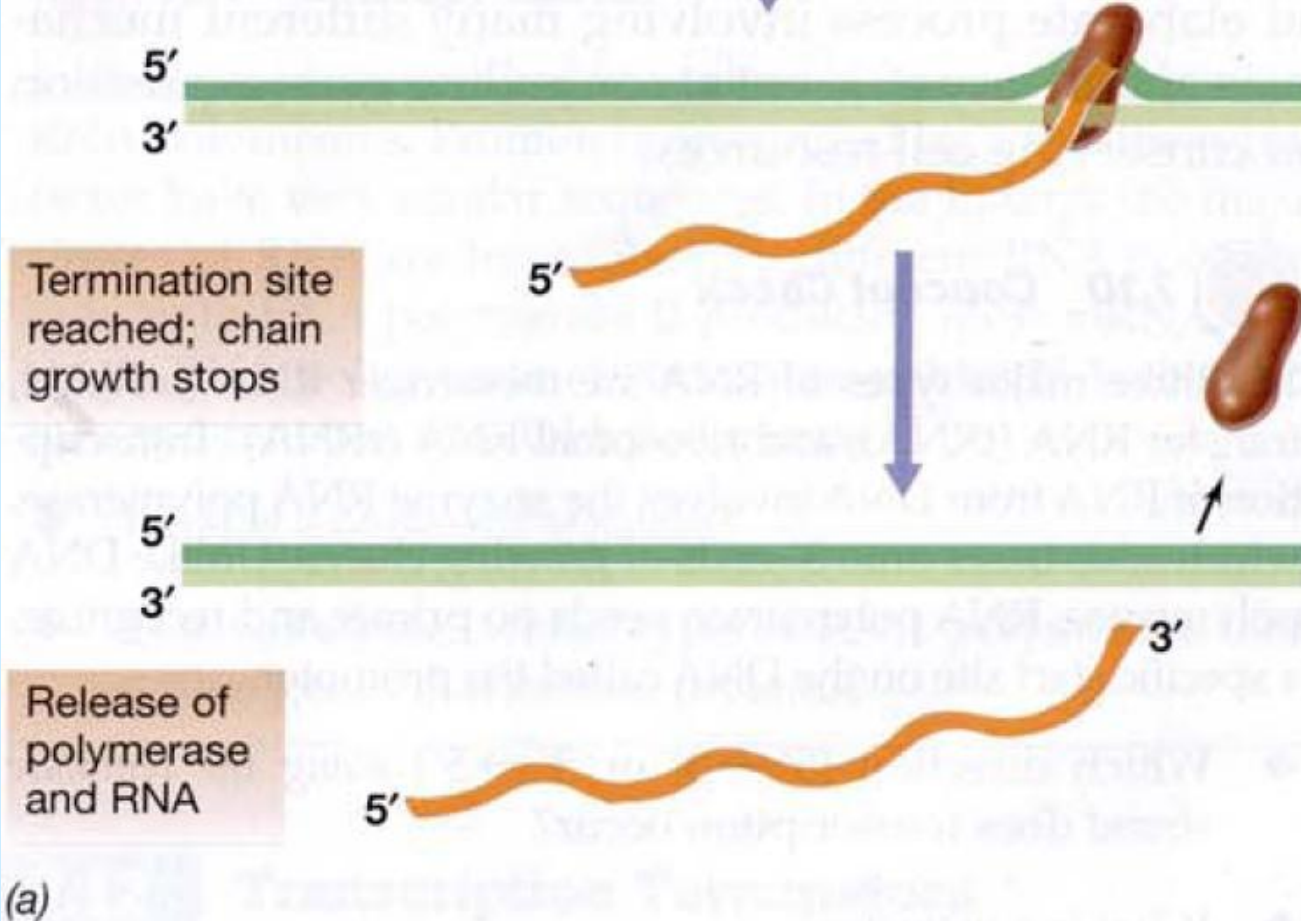
Promoter region

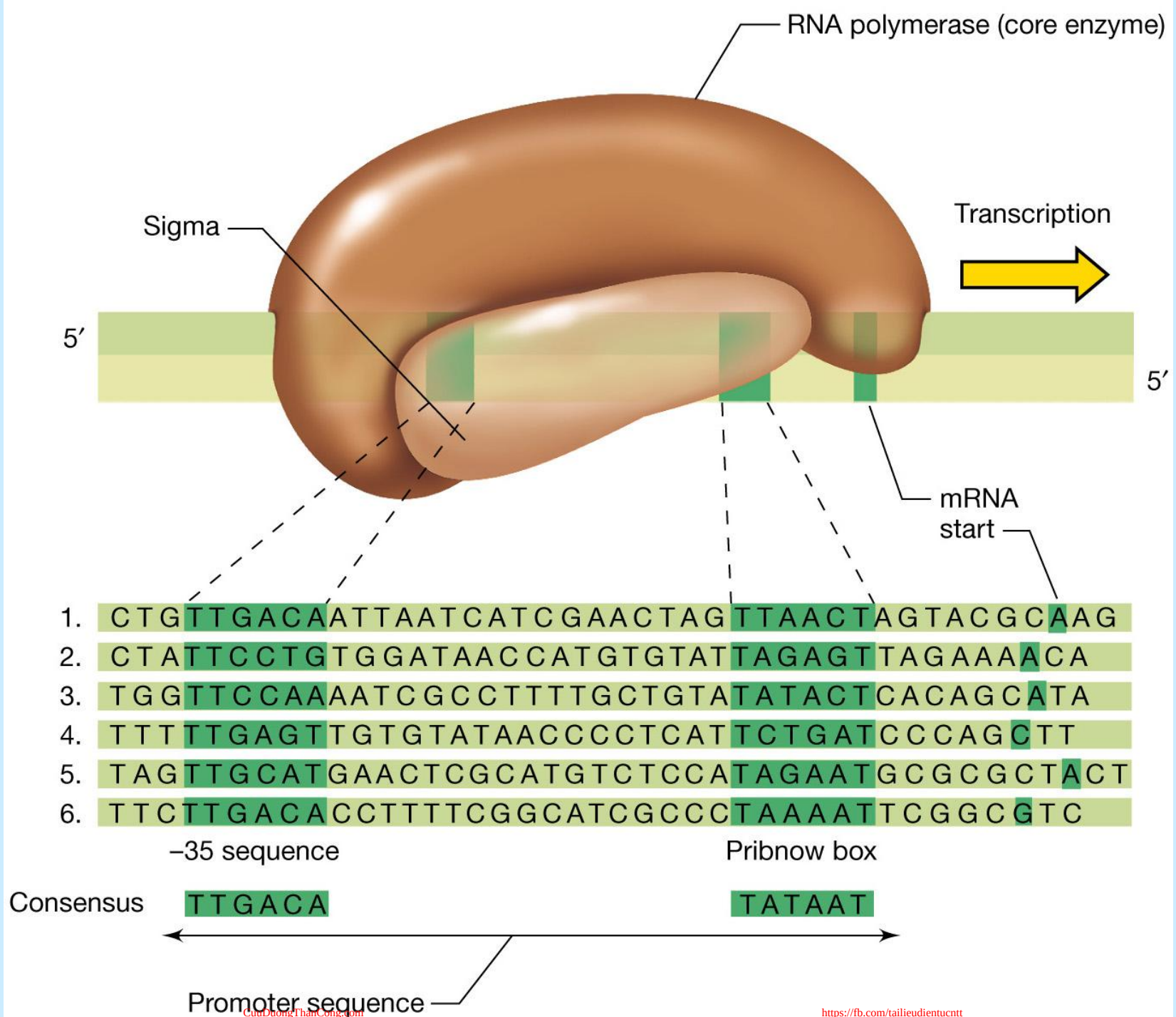
Gene(s) to be transcribed
(light green strand)

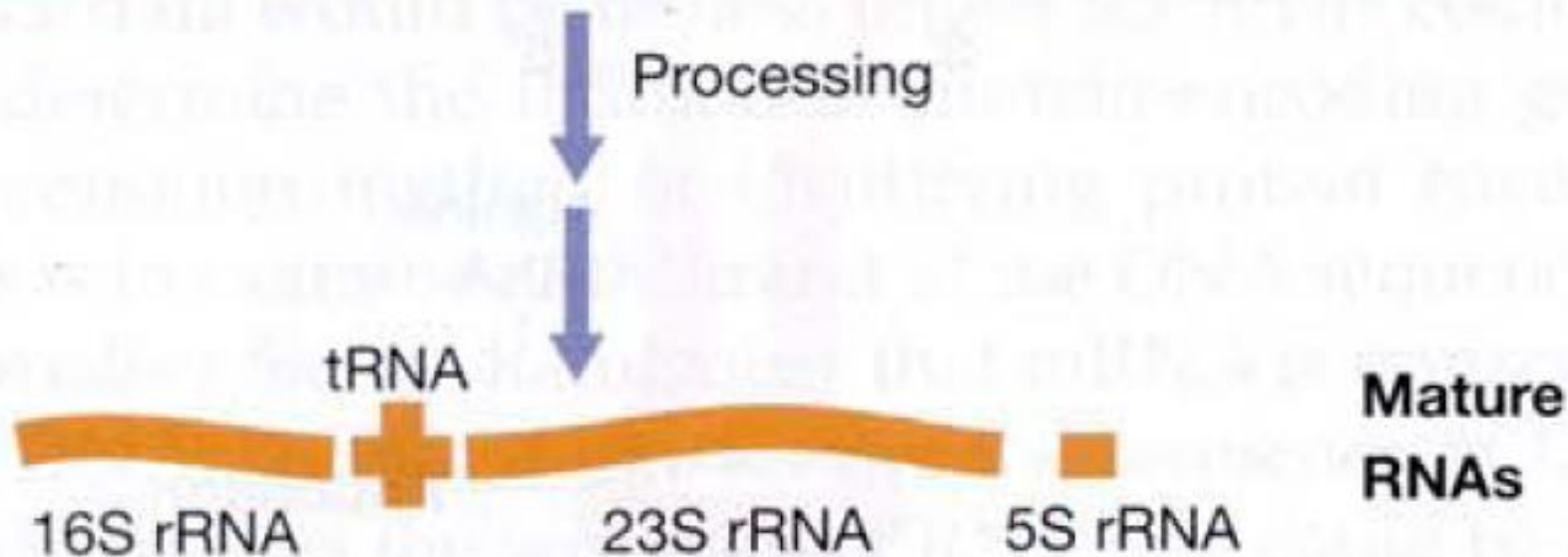
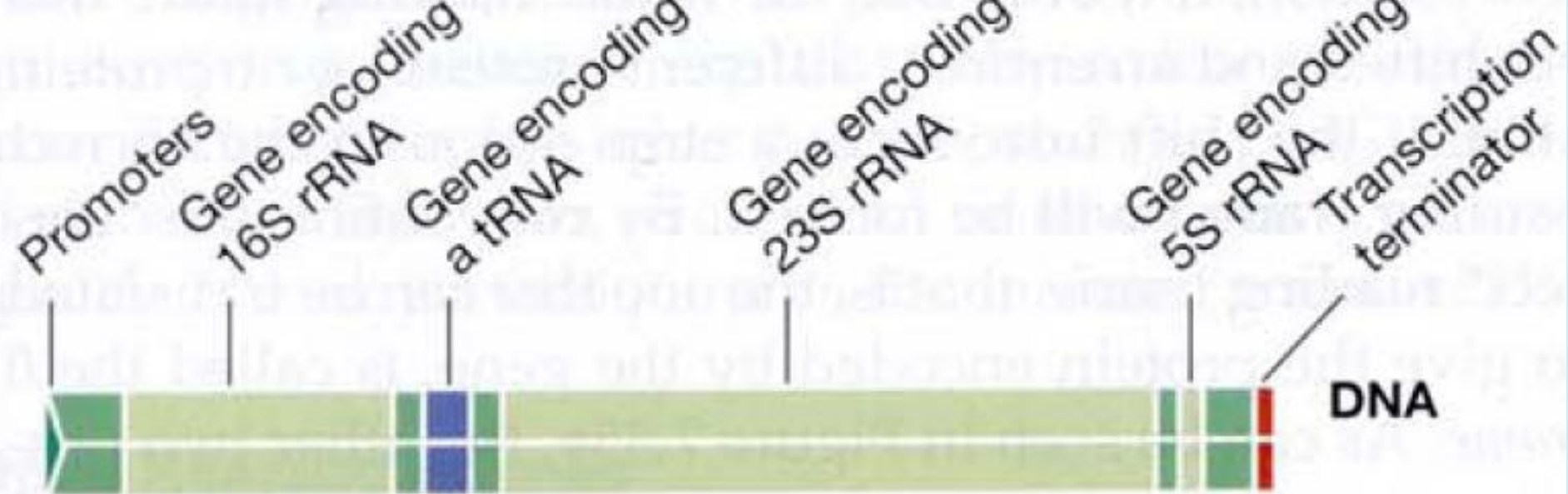
Sigma recognizes
promoter and
initiation site



Transcription begins; sigma
released. RNA chain growth
continues to termination site







T G C G	G G T C G A C T G	C C G A T	C A G T C G A C C	T T T T
A C G C	C C A G C T G A C	G G C T A	G T C A G C T G G	A A A A

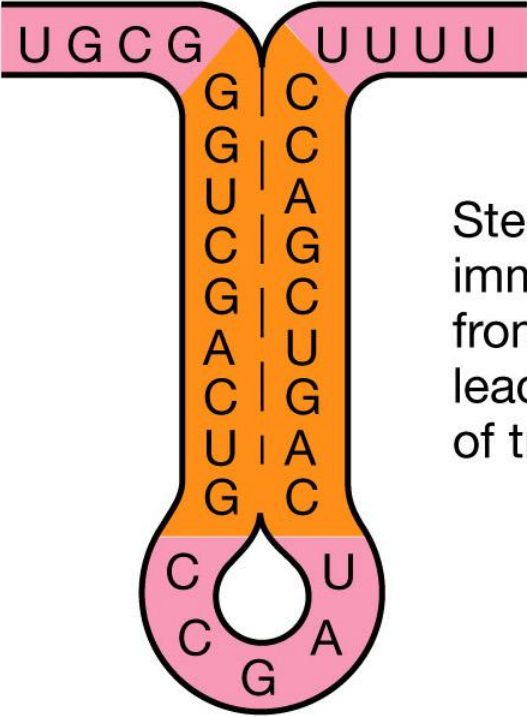
DNA with inverted repeats

↓ Transcription of one strand

U G C G	G G U C G A C U G	C C G A U	C A G U C G A C C	U U U U
---------	-------------------	-----------	-------------------	---------

RNA

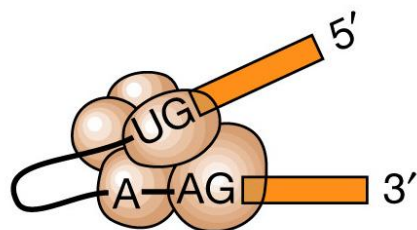
↓ Fold to form secondary structure



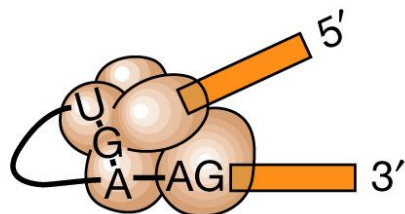
Stem-loop in RNA immediately upstream from a run of uracils leads to termination of transcription

Exon 1 Intron Exon 2
 5'  GU ——— A — AG  3'

(a)  Assembly of spliceosome

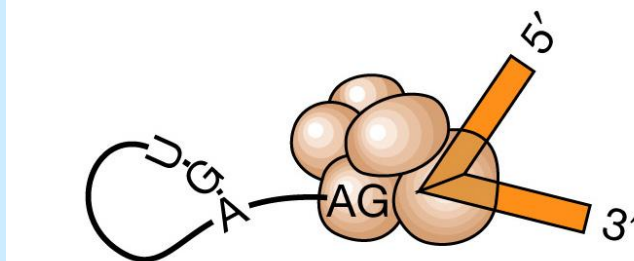


(b)  Cutting of 5' splice site, formation of lariat



(c)  Cutting of 3' splice site, joining of exons

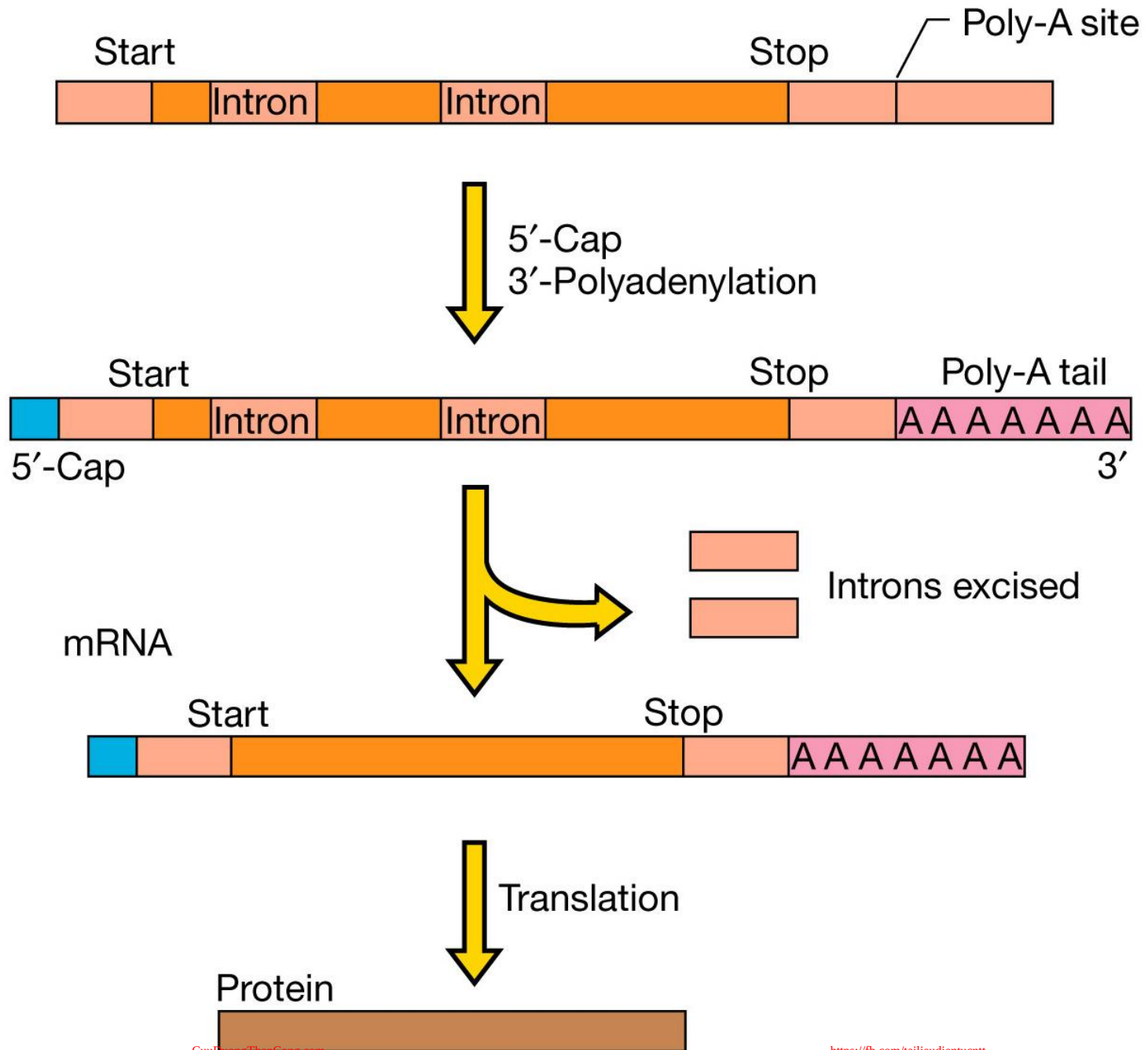
(c)  Cutting of 3' splice site, joining of exons

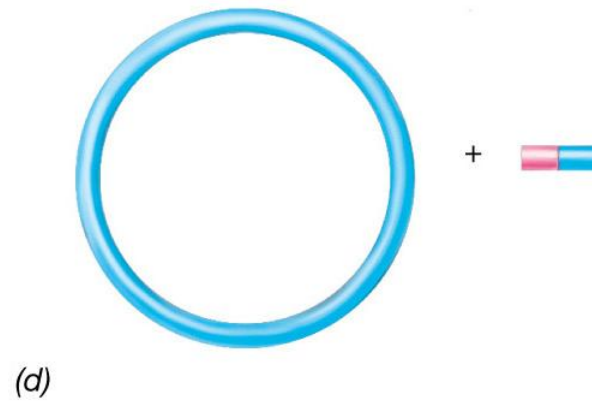
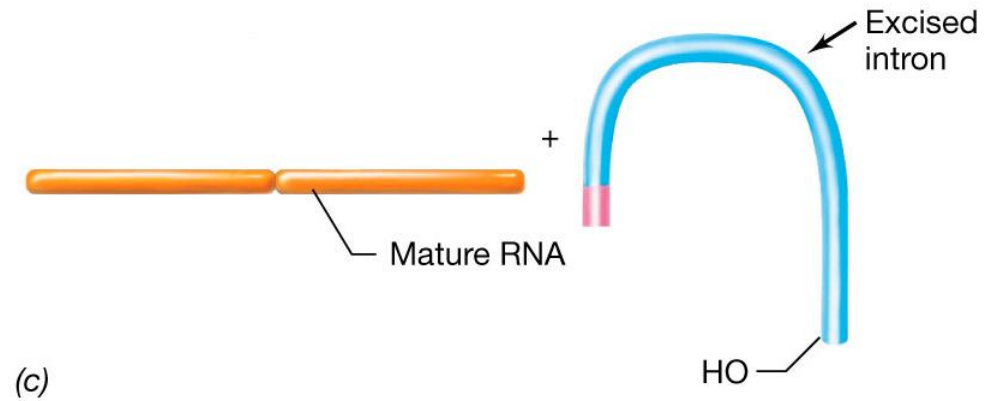
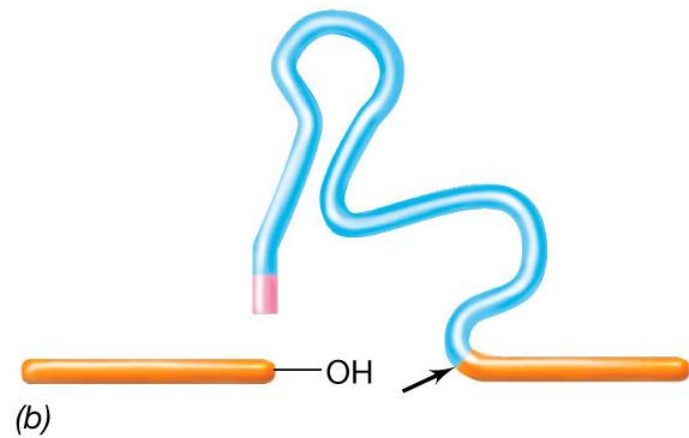
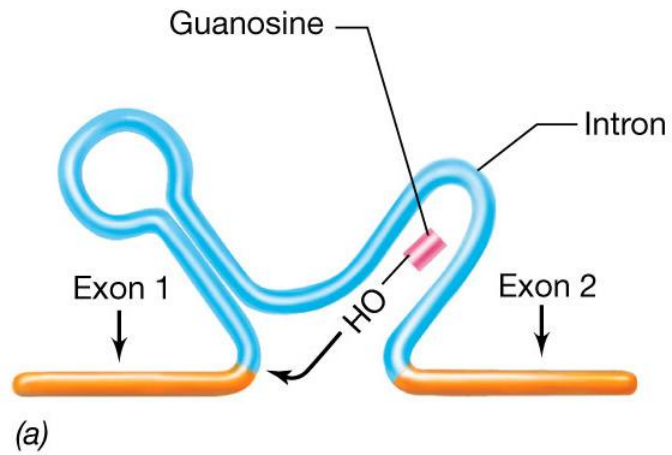


(d)  
 Intron (lariat) 5'   3'
 Exon 1 Exon 2

(e)

Pre-mRNA (primary transcript)



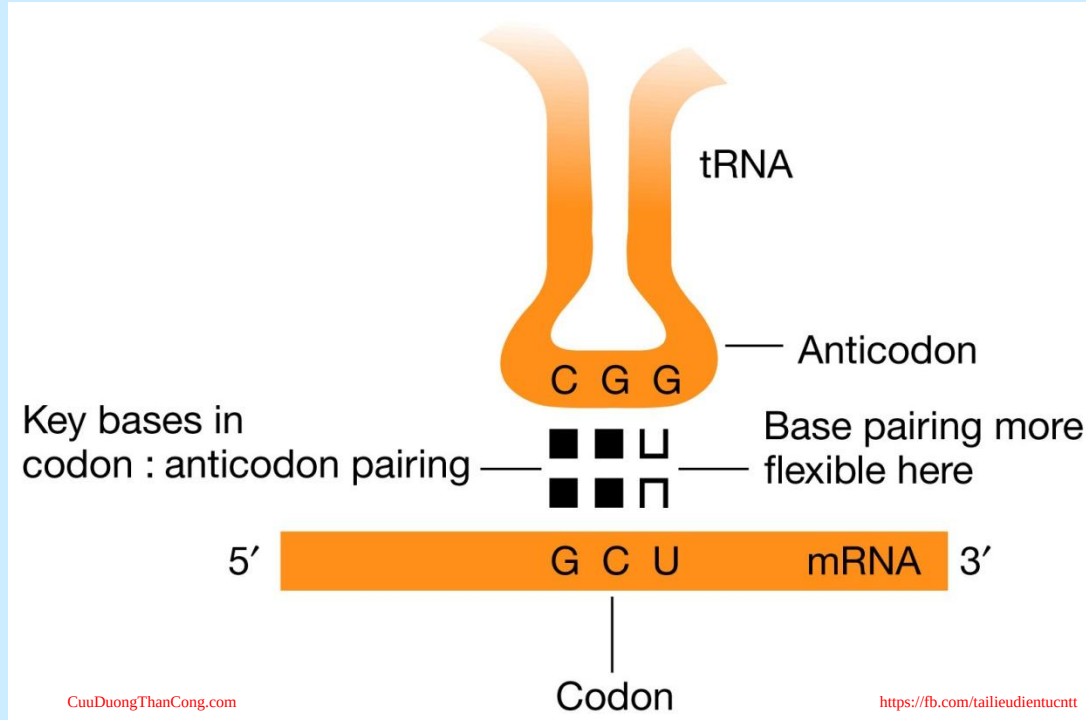


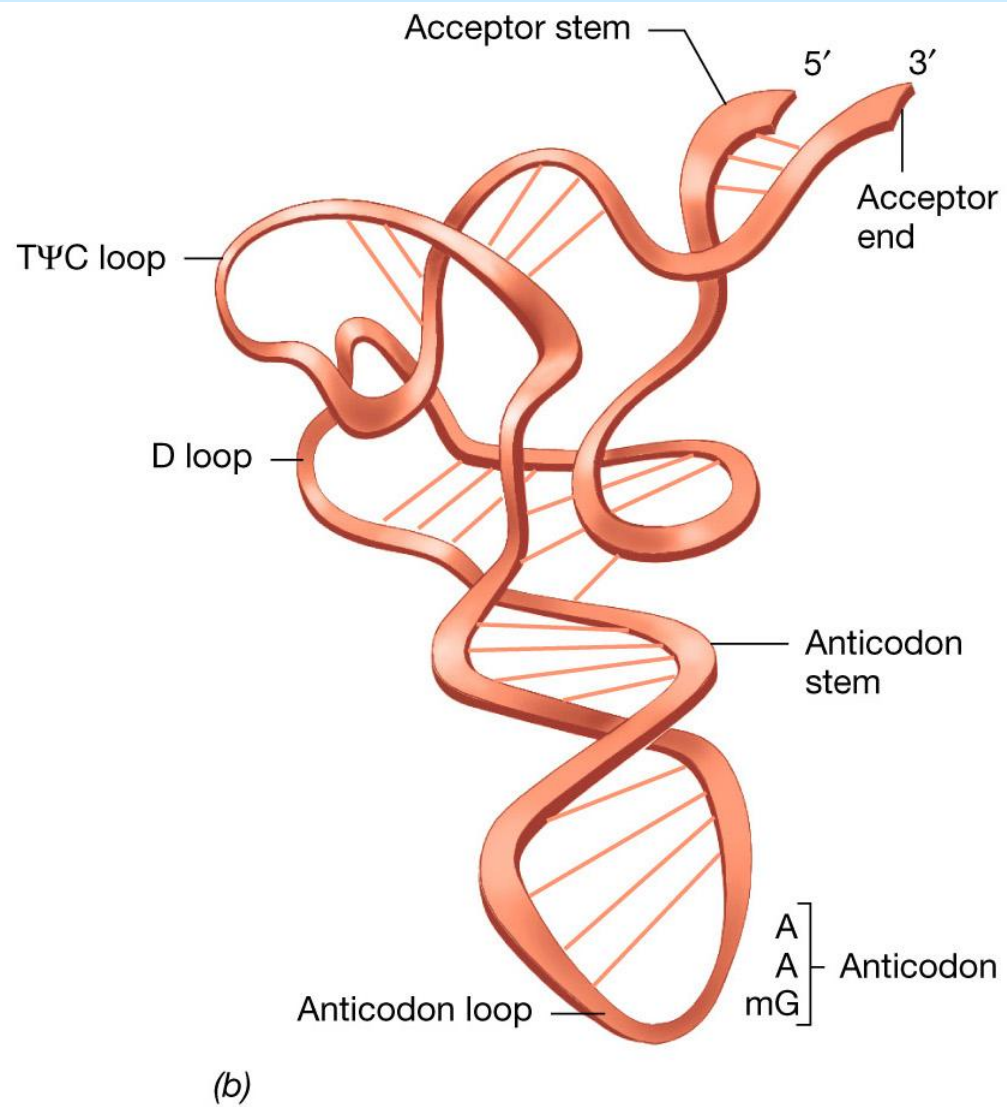
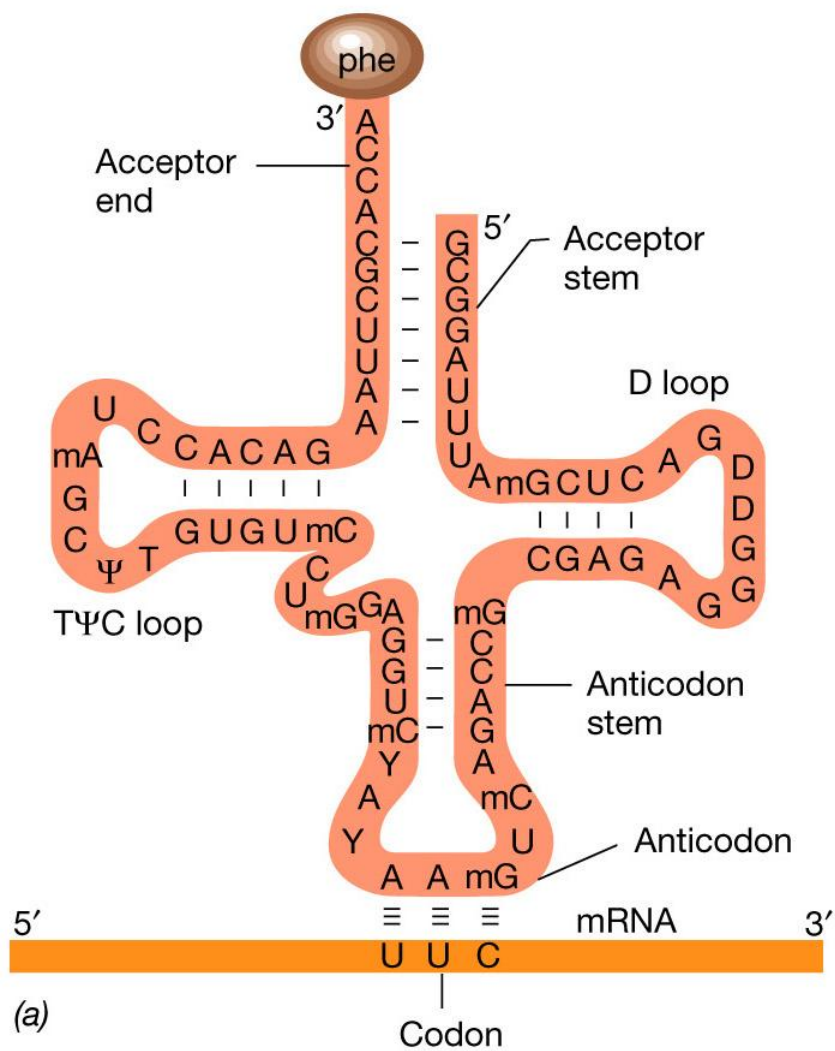
Mã di truyền

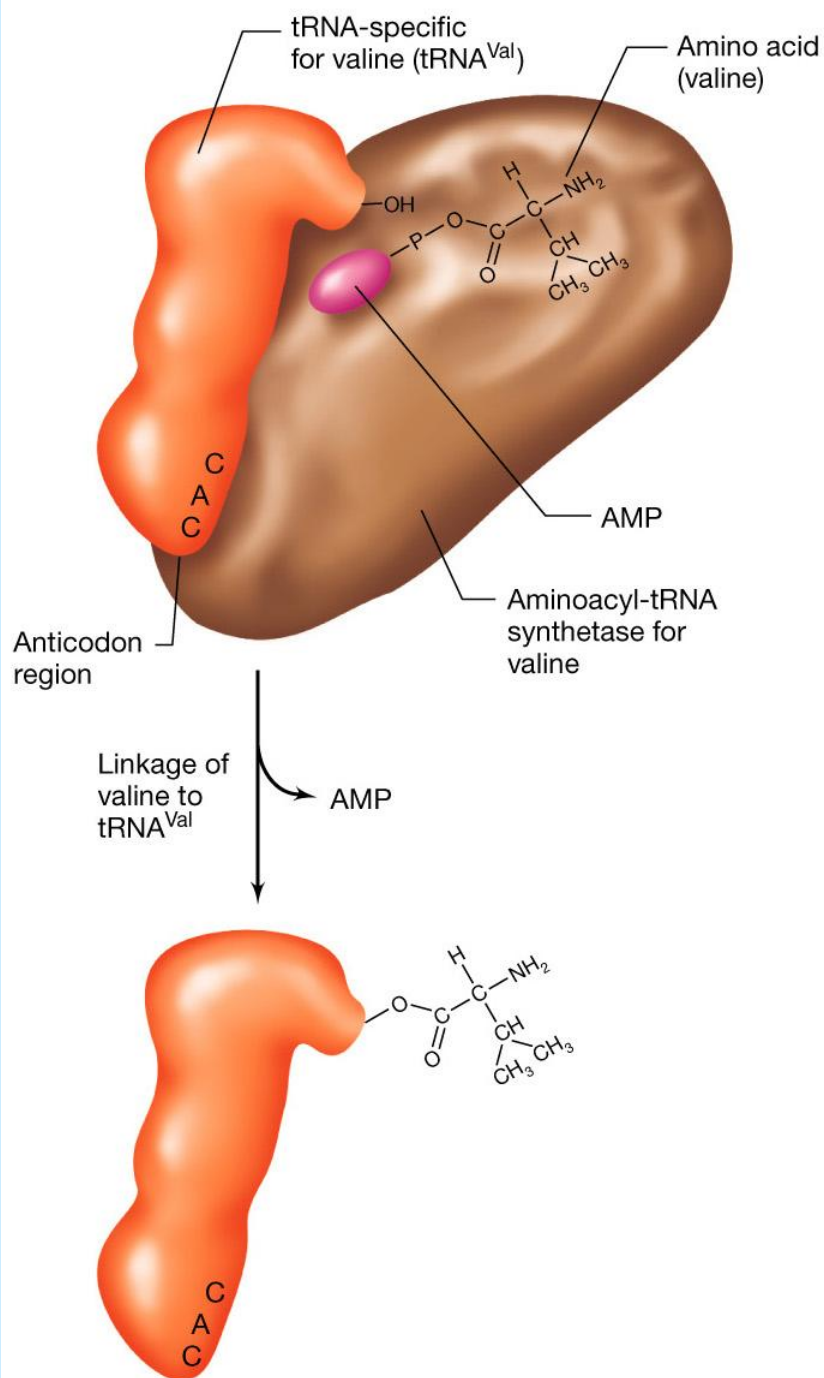
- 64 mã bộ ba
- Mã khởi đầu: AUG
- Mã kết thúc: UAA, UAG, UGA
- Có ngoại lệ

RNA vận chuyển (transfer RNA, tRNA)

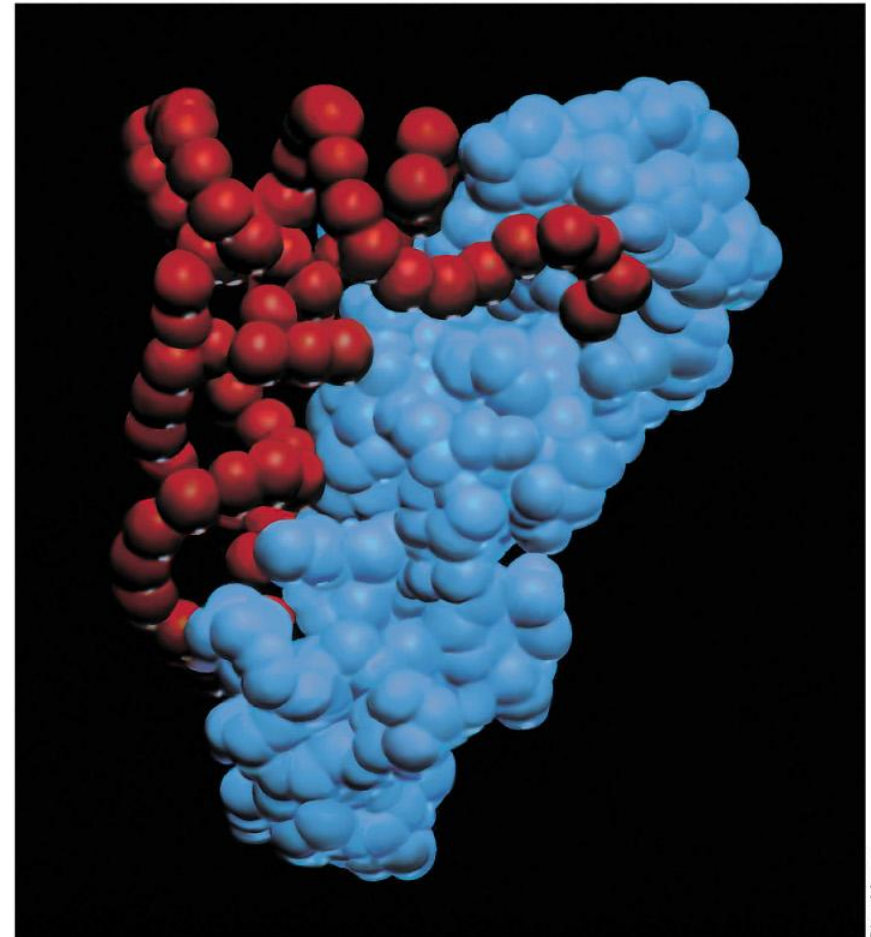
- Cấu trúc bậc 2: đầu mang bộ ba đối mã (anticodon), đầu mang amino acid (acceptor end)
- Mỗi tRNA tương tác với một aminoacyl-tRNA synthetase riêng
- Aminoacyl--tRNA synthetase có trung tâm nhận diện anticodon và trung tâm gắn amino acid







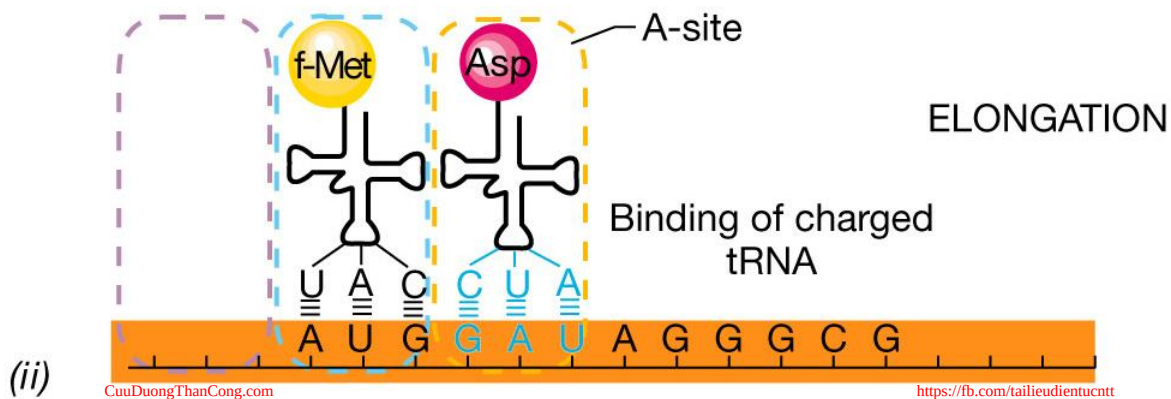
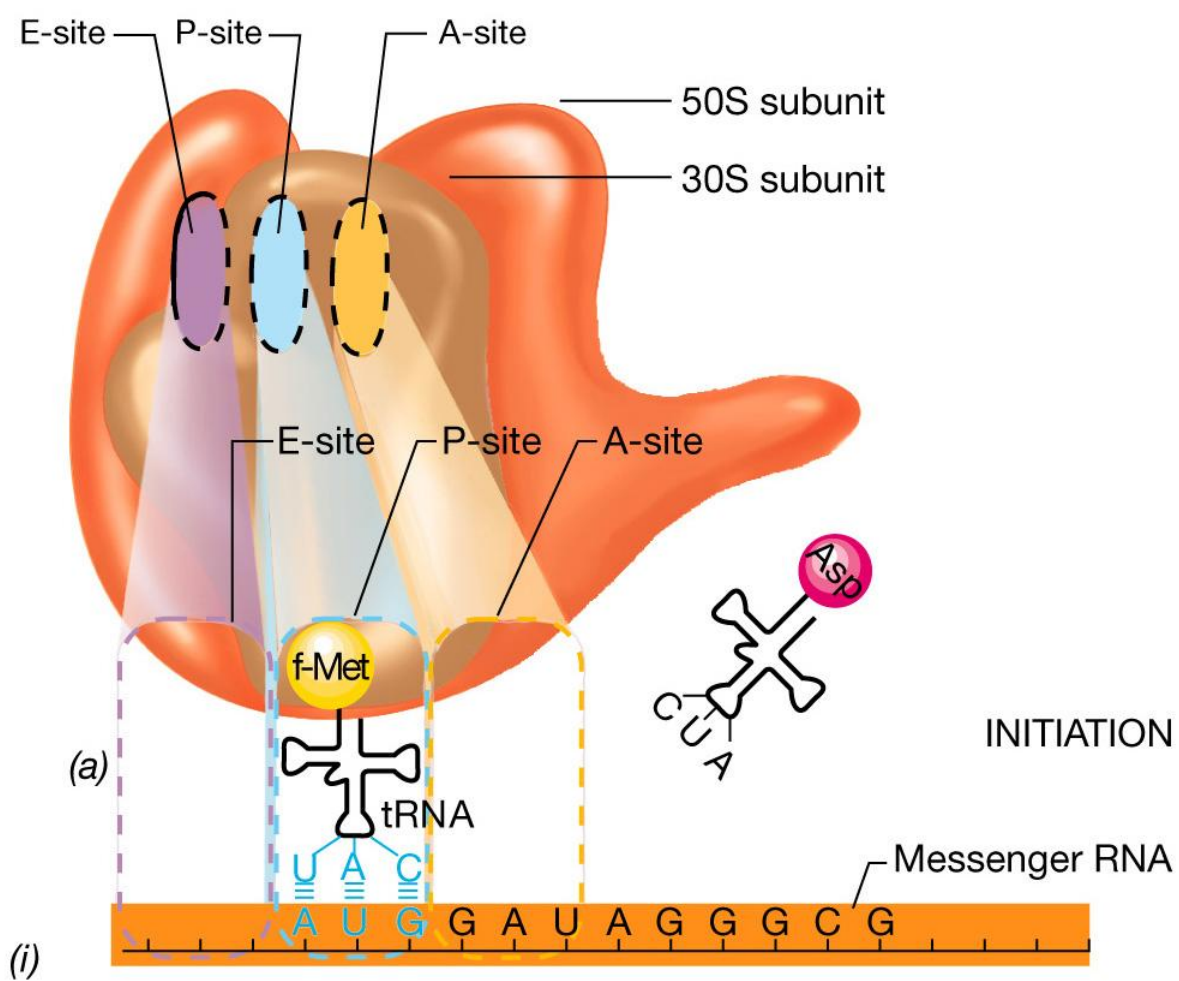
(a)

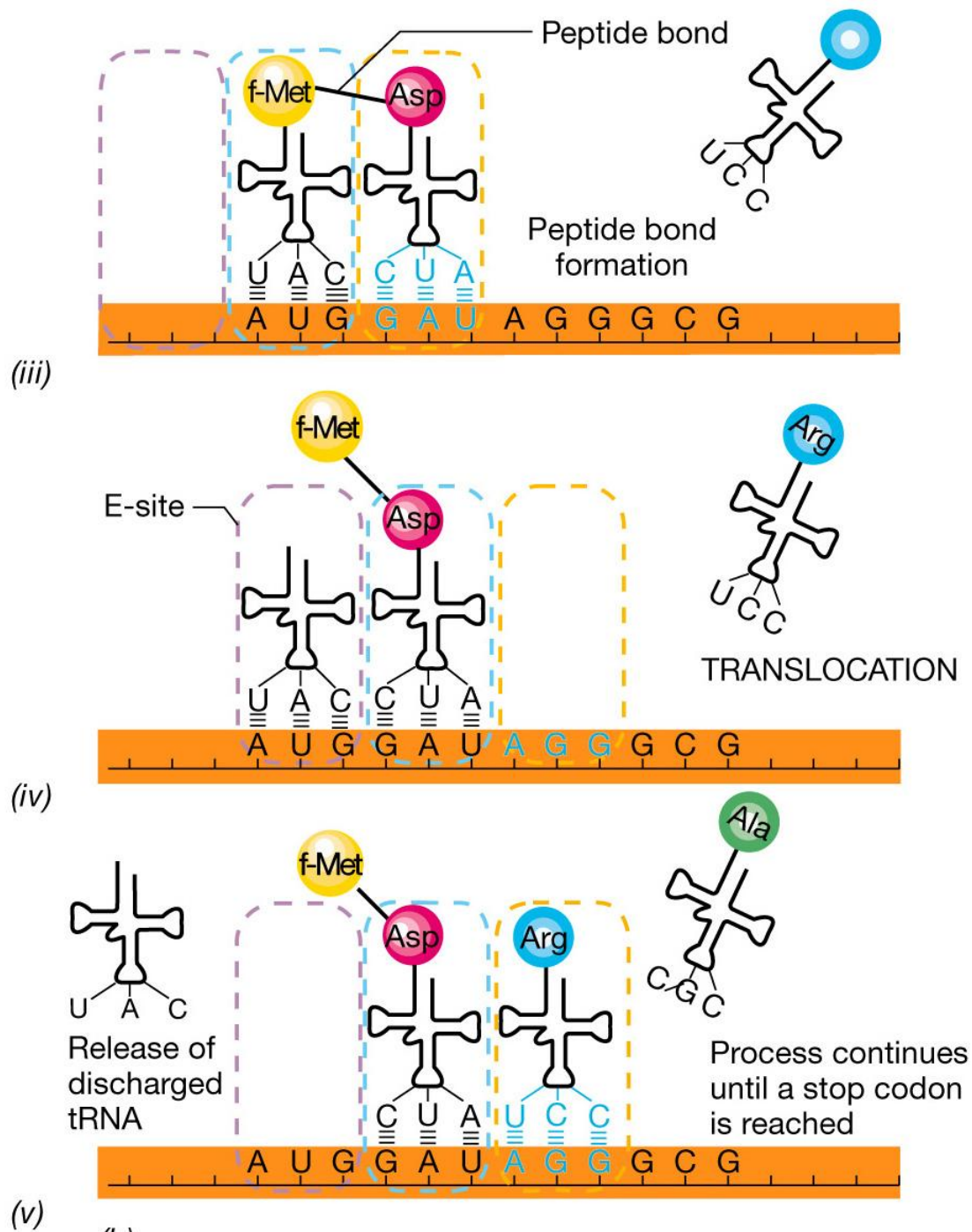


(b)

Dịch mã (translation)

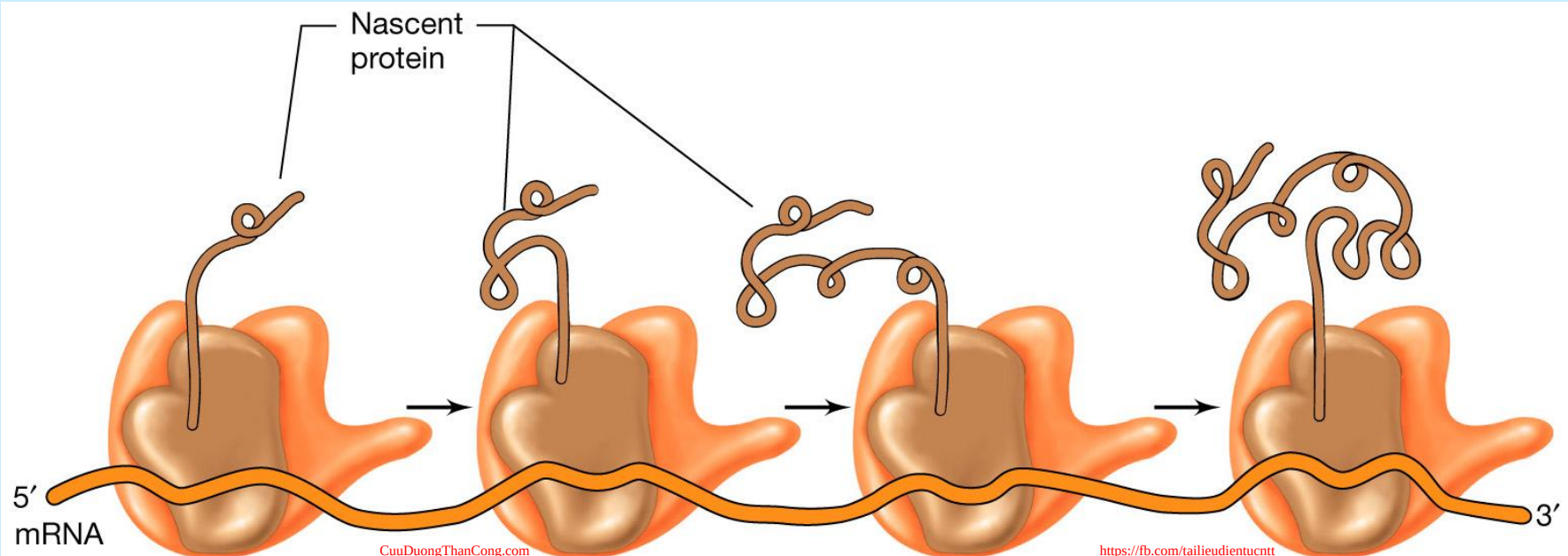
- **Ribosome: tiểu phần 30S và 50S (prokaryote), 40S và 60S (eukaryote)**
- **Prokaryote:**
 - + **Tiểu phần 30S gắn vào trình tự Shine-Dalgarno sequence trên đầu 5' của mRNA**
 - + **Shine-Dalgarno có trình tự bù trừ với đầu 3' của rRNA 16S**
 - + **Dịch mã polycistronic mRNA**
- **Eukaryote: tiểu phần 40S gắn vào mũ 5'-cap, dịch mã AUG đầu tiên**
- **Tiểu phần 50S, 60S:**
 - + **E-site (exit site): chứa tRNA không còn gắn amino acid**
 - + **P-site (peptide site): chứa tRNA mang chuỗi peptide**
 - + **A-site (acceptor site): chứa tRNA mang amino acid tiếp theo**





Dịch mã (translation)

- Sự dịch chuyển của ribosome cần nhân tố kéo dài (elongation factor) và GTP
- Tại codon kết thúc: Không có tRNA
- + Nhân tố phóng thích (release factor) nhận diện vị trí này, cắt peptide khỏi tRNA
- + Các tiểu phần ribosome tách nhau và rời mRNA
- Khung dịch mã (khung đọc, open reading frame ORF)
- Gen gối đầu (overlapping): một gen có hai khung đọc (ϕ X174)
- Tần suất sai sót trong dịch mã: $10^{-3} - 10^{-4}$



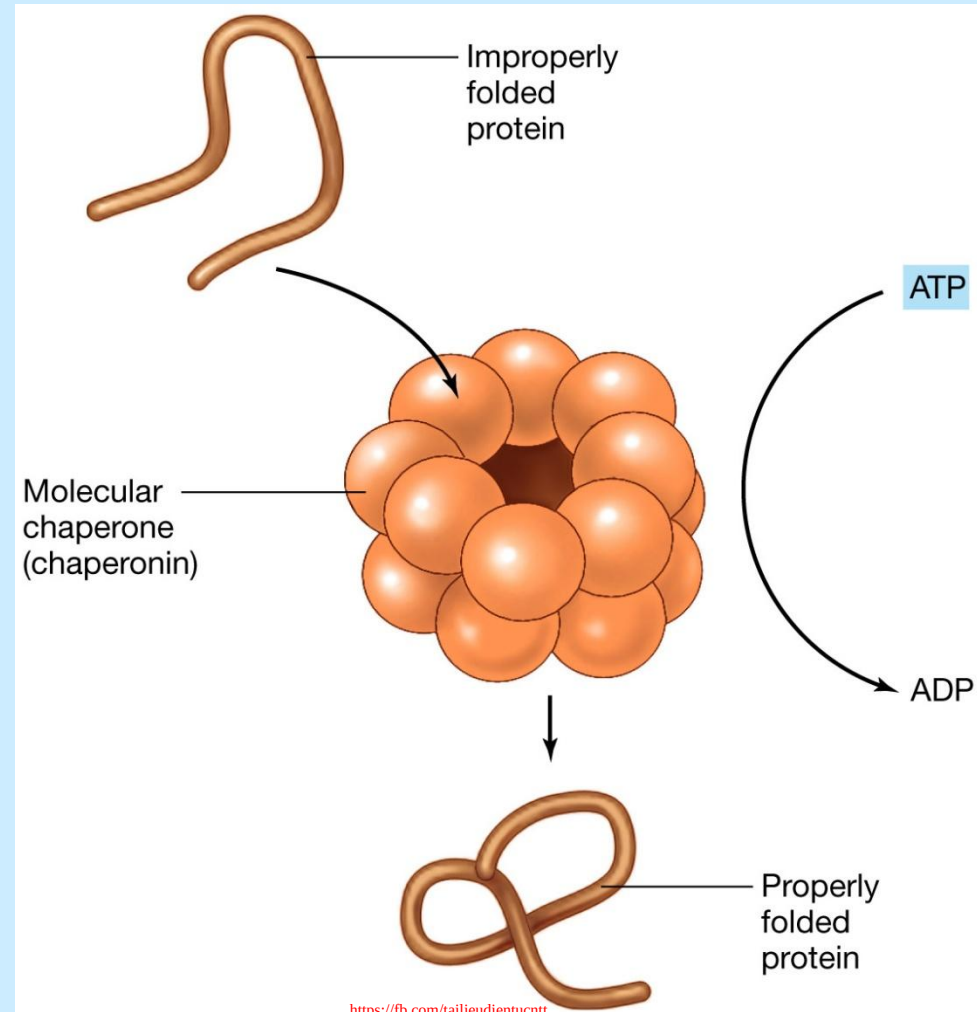
Biến đổi sau dịch mã (post-translation modification)

- Kiểm soát cấu hình và chức năng của sợi polypeptide đã được dịch mã

- Hai phương thức:

- + Cộng hóa trị: gắn thêm các nhóm phosphate, methyl, đường... vào protein bằng liên kết cộng hóa trị

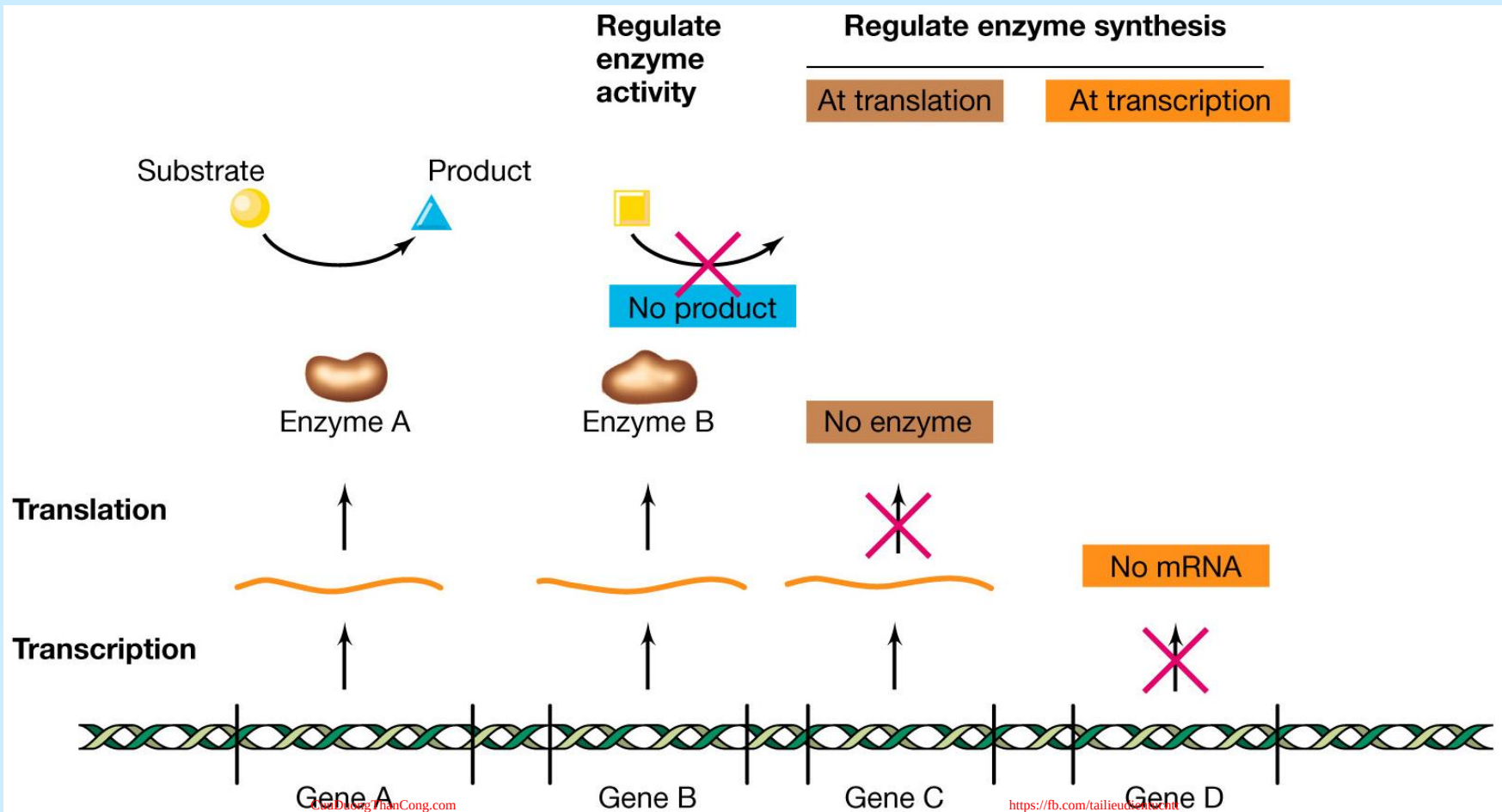
- + Không cộng hóa trị: gắn với chất phân tử lượng nhỏ, tương tác với polypeptide khác, tương tác với chaperone phân tử



Điều hòa sự biểu hiện của gen

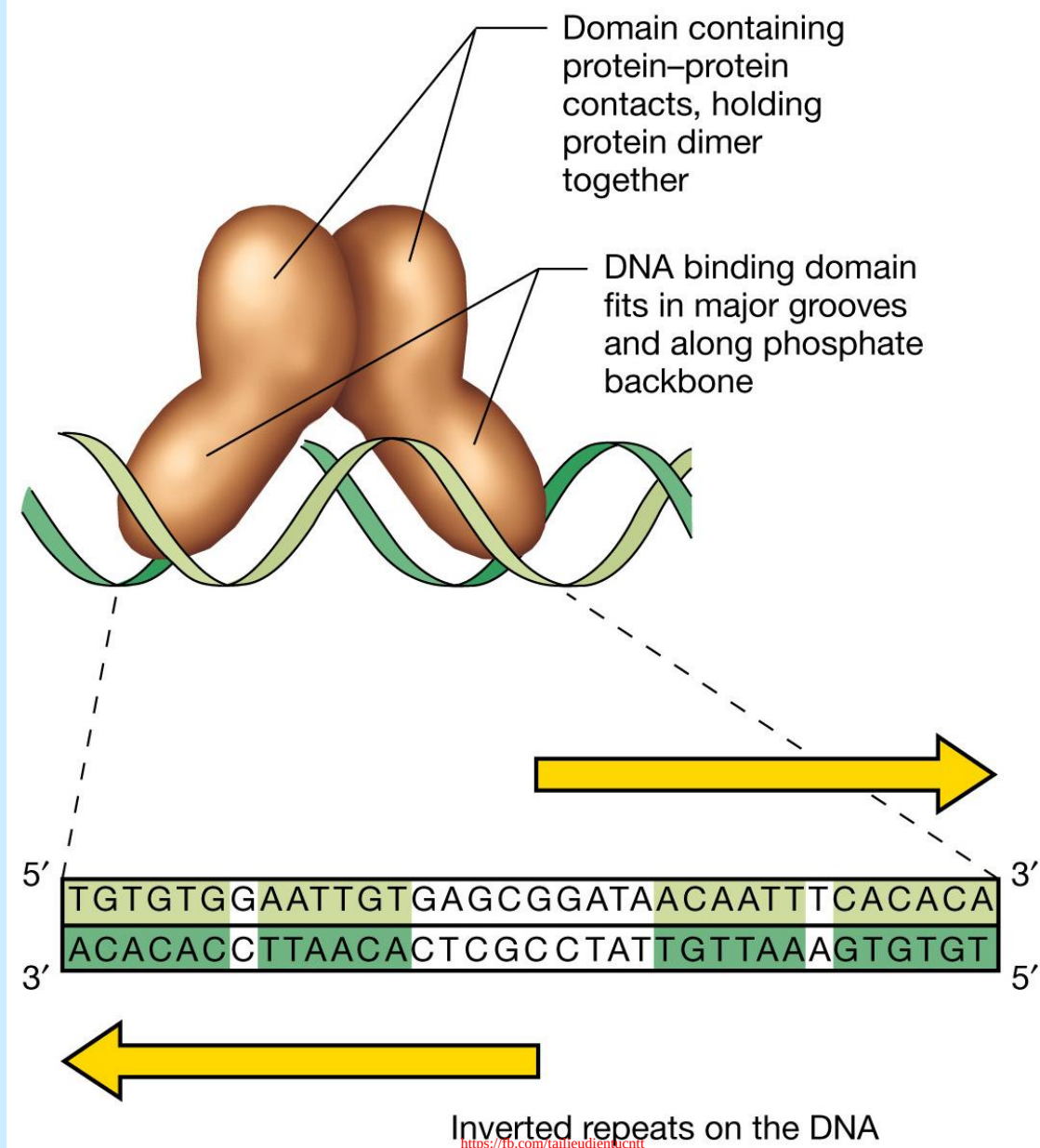
Điều hòa biểu hiện của gen

- Phiên mã: kiểm soát việc tạo thành mRNA
- Dịch mã: kiểm soát việc tạo thành protein
- Biến đổi sau dịch mã: kiểm soát chức năng của protein



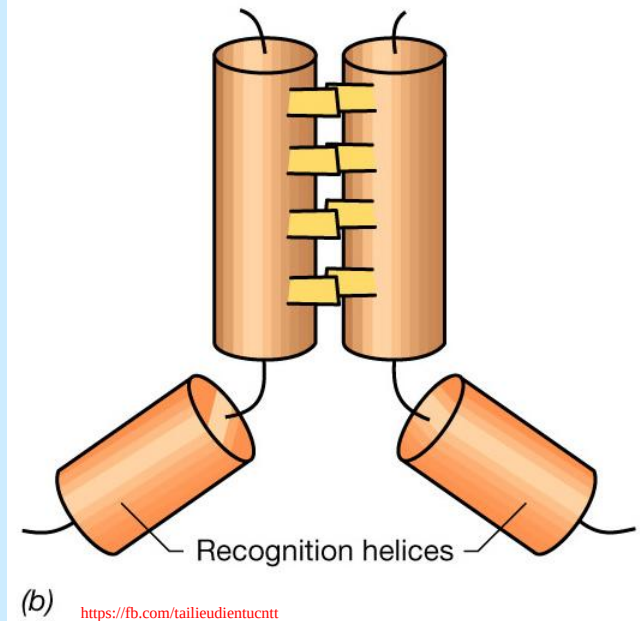
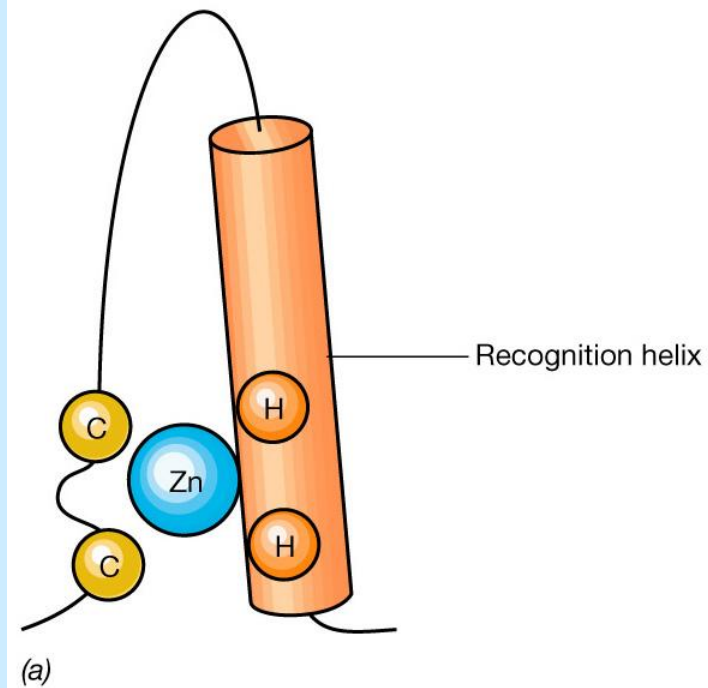
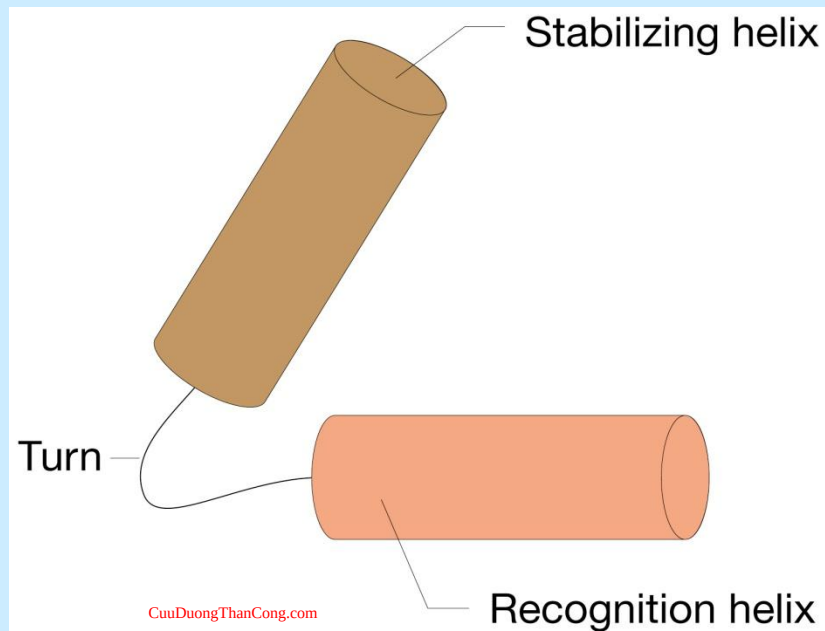
Tương tác giữa protein và nucleic acid

- Tương tác không chuyên biệt: histone-DNA
- Tương tác chuyên biệt: protein là dimer, mỗi monomer gắn vào một trình tự xác định trên một sợi DNA
- Đặc điểm của trình tự gắn protein: lặp lại đảo ngược (trên một mạch)



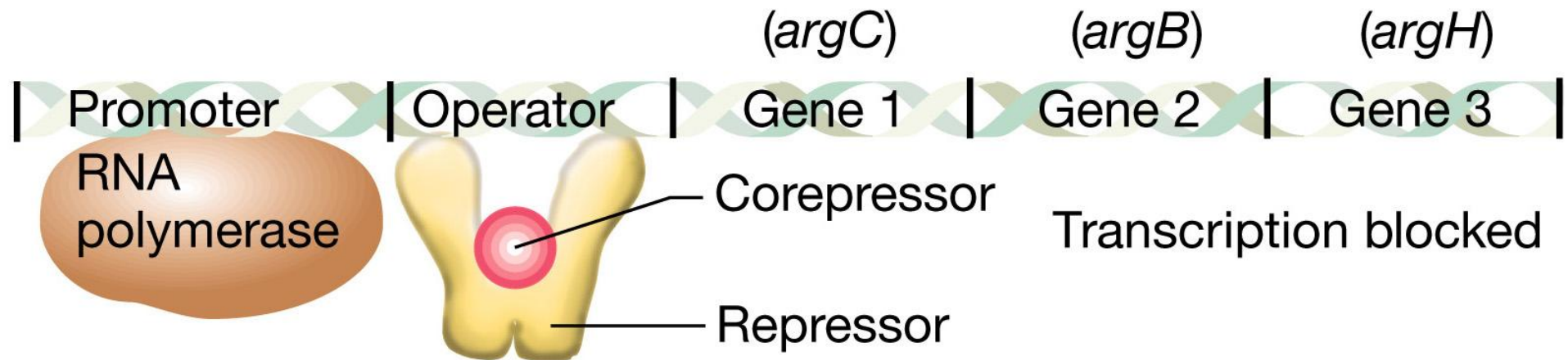
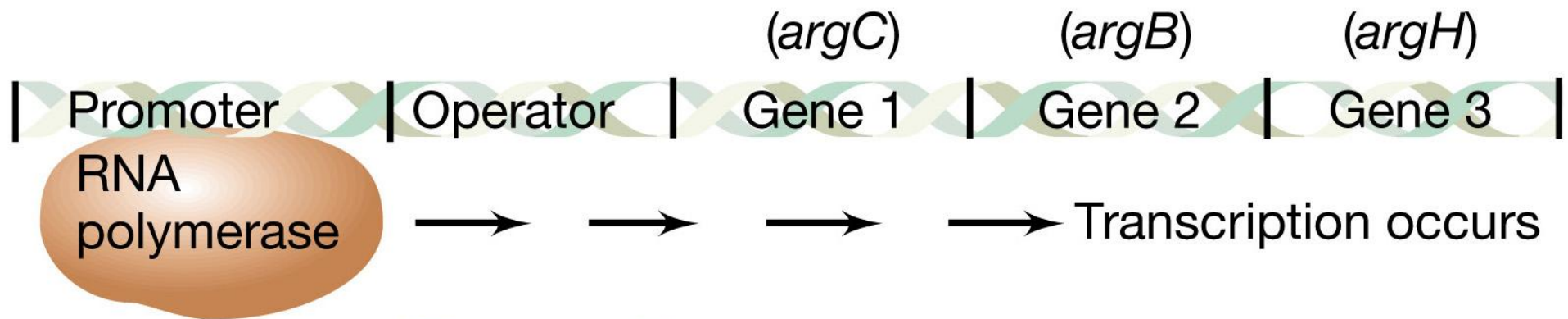
Đặc điểm cấu trúc của DNA binding protein

- Cấu trúc bậc 2 (xoắn α -helix), phần ổn định cấu hình và phần chứa trình tự nhận diện (nơi gắn)
- Xoắn-gập-xoắn (helix-turn-helix motif)
- Ngón tay gắn kẽm (zinc finger)
- Dây kéo leucine (leucine zipper)

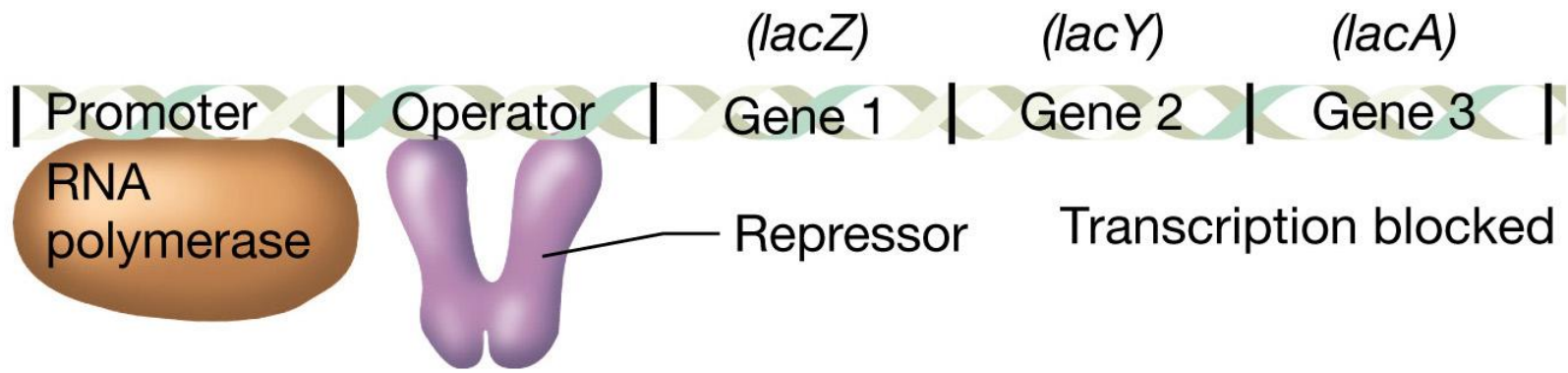


Điều hòa phiên mã: kiểm soát âm (negative control)

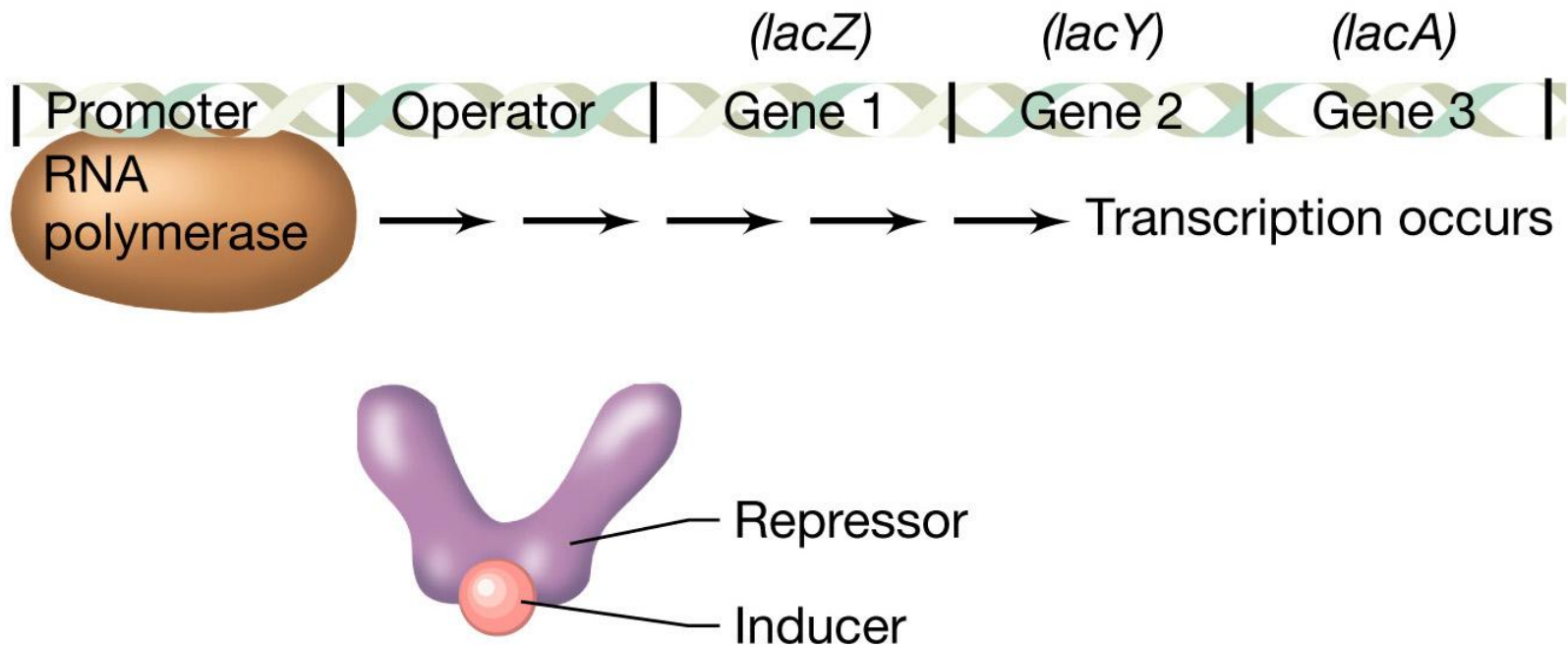
- Liên quan đến DNA-binding protein là repressor và operator
- Khi repressor gắn vào operator → không tạo mRNA
- Repressor được biến đổi sau dịch mã thông qua đó kiểm soát âm sự biểu hiện của gen
- Ví dụ: Repressor được hoạt hóa bởi Effector (Co-repressor) gắn vào operator, ức chế phiên mã (repression), *arg* operon
- Ví dụ: Repressor bị bất hoạt bởi Effector không gắn vào operator, cảm ứng (induction) sự biểu hiện của gen, *lac* operon



(b)



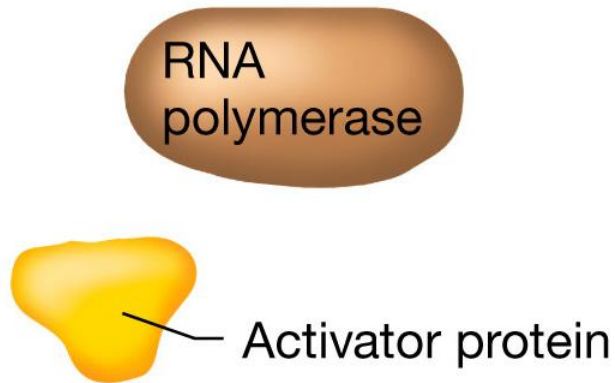
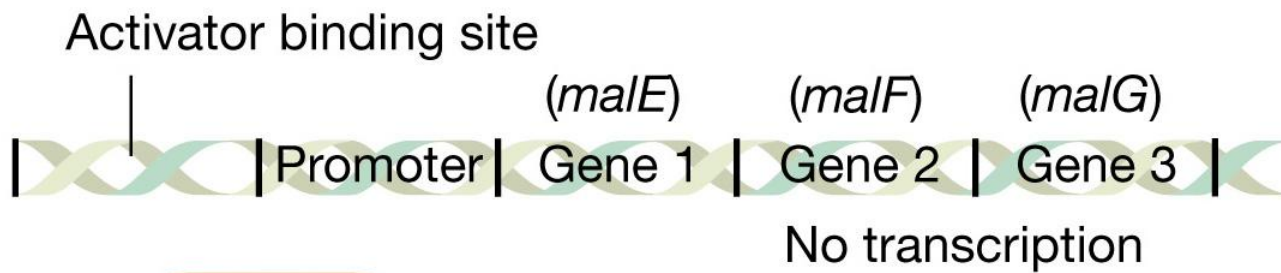
(a)



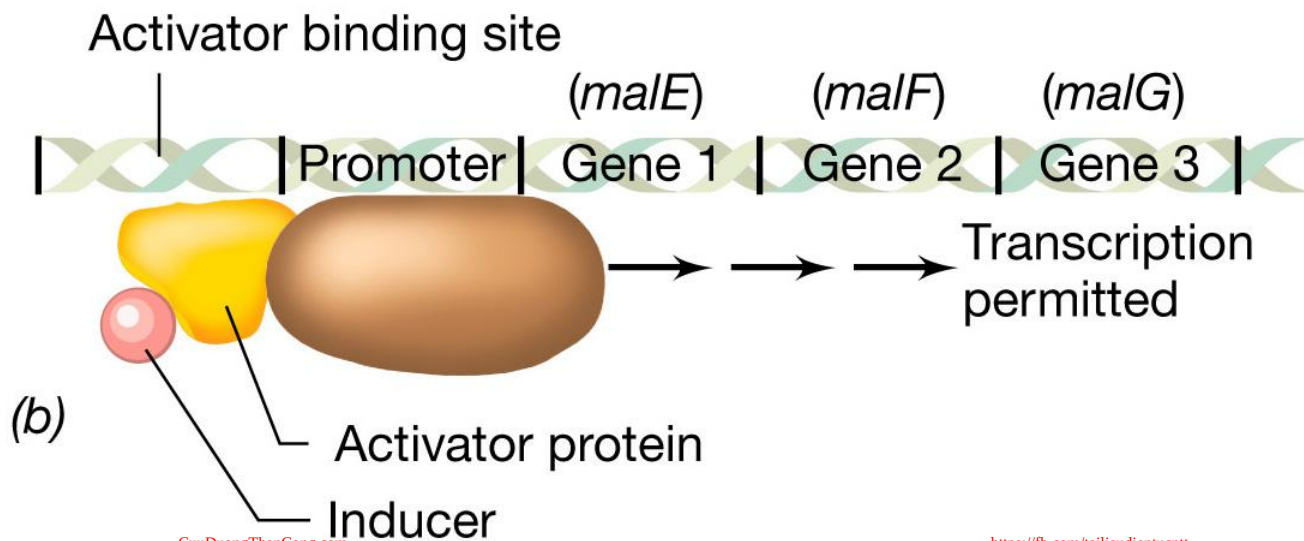
(b)

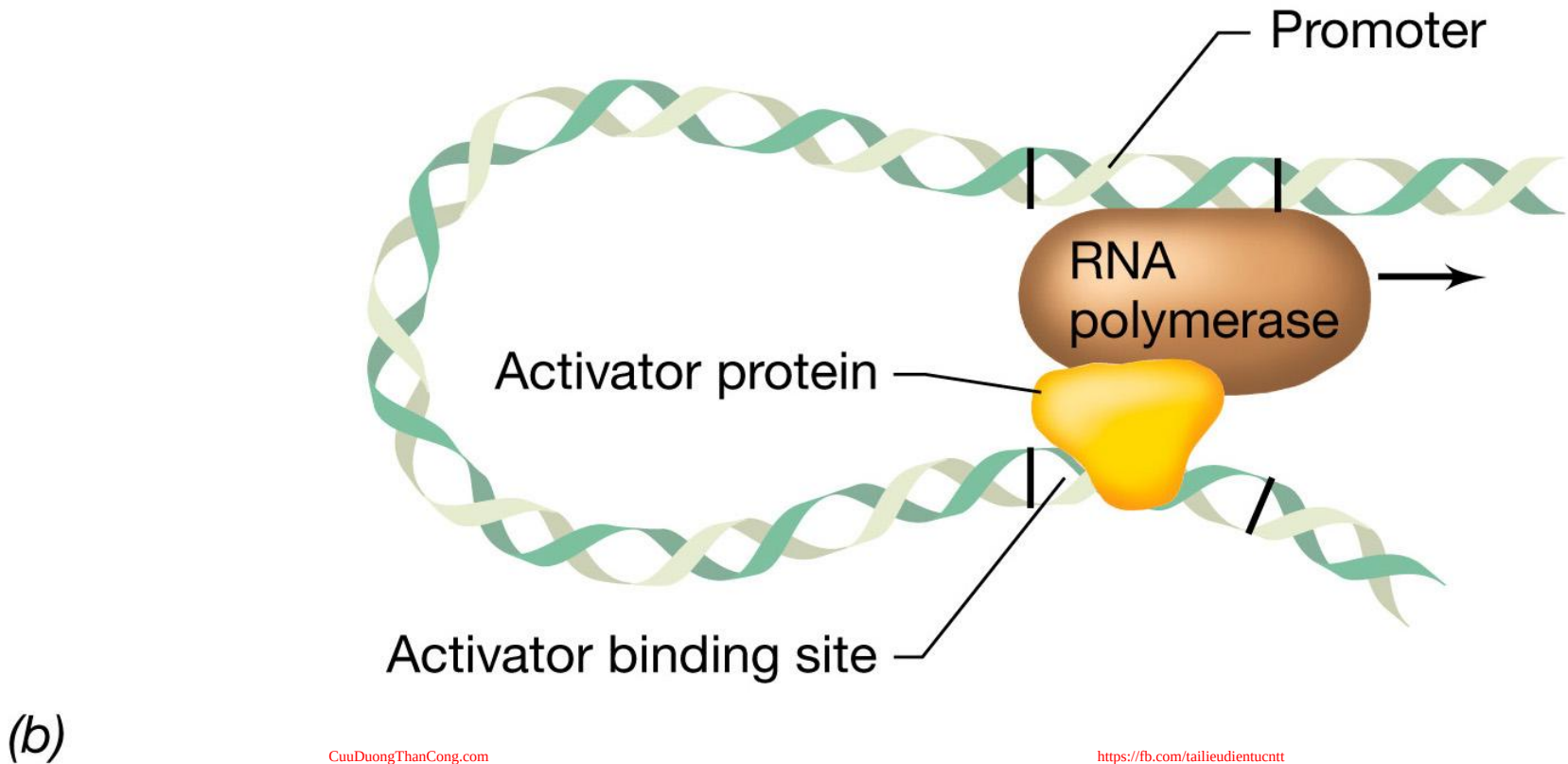
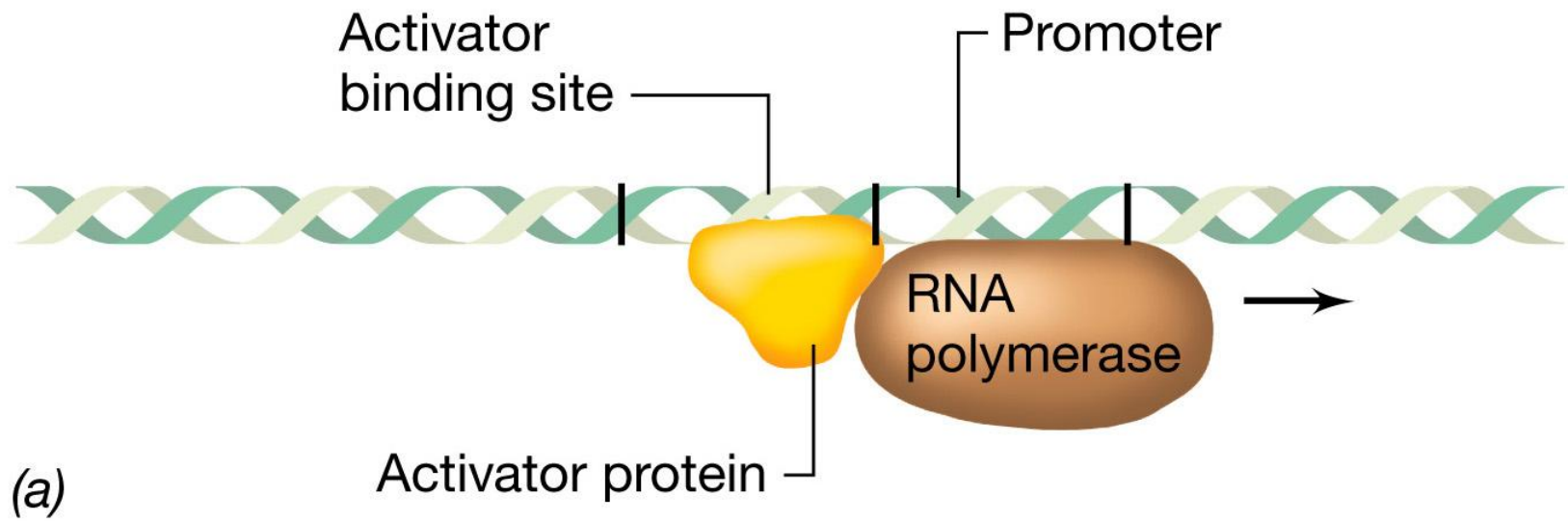
Điều hòa phiên mã: kiểm soát dương (positive control)

- Liên quan đến DNA-binding protein là activator và activator-binding site (DNA) hay enhancer
- Khi activator gắn vào activator-binding site → cho phép, tăng cường tạo mRNA
- Activator được biến đổi sau dịch mã thông qua đó kiểm soát dương sự biểu hiện của gen
- Ví dụ: *mal* operon



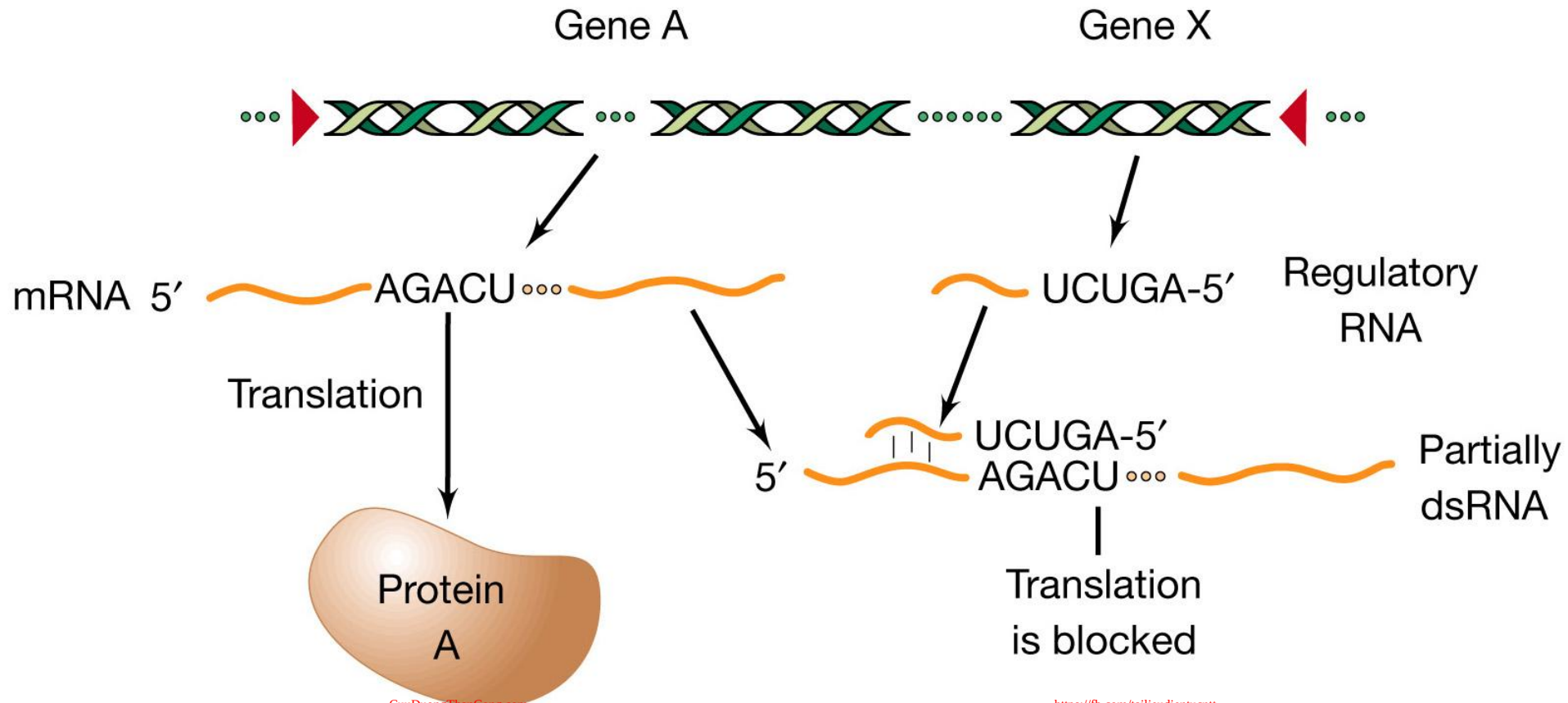
(a)



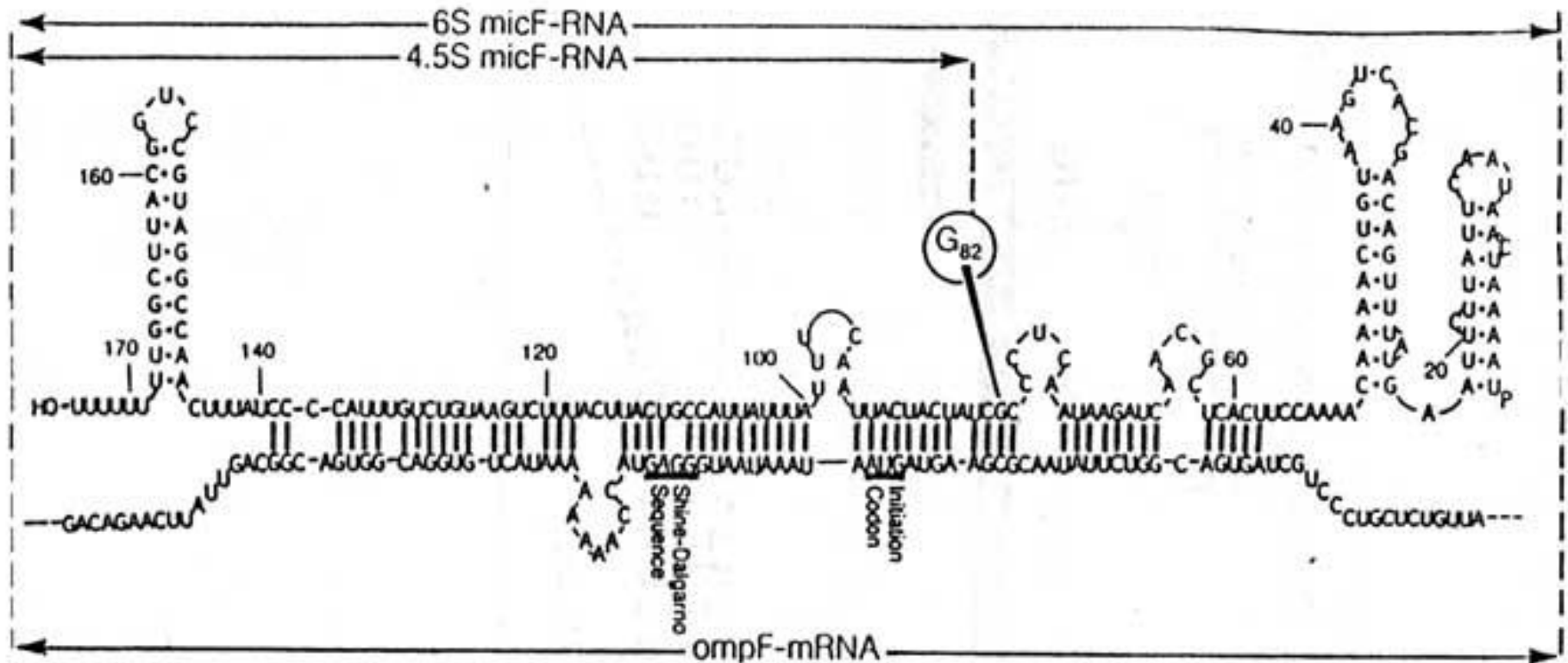


Điều hòa bằng RNA đối nghĩa

- Gen mã hóa cho một đoạn RNA ngắn có đầu 3' bù trừ với đầu 5' không mang mã của gen bị điều hòa
- Ví dụ *micF* và *ompF*



Sự hình thành thể lai giữa *micF*-RNA và *ompF* mRNA



Điều hòa sự biểu hiện gen ở mức sau dịch mã

- **Kìm hãm phản hồi (feed-back):** trung tâm biến cấu (allosteric site) và chất biến cấu (allosteric effector)
- **Biến đổi sau dịch mã cộng hóa trị:** gắn thêm các nhóm phosphate, methyl, đường

Starting material

Enzyme A

First intermediate

Enzyme B

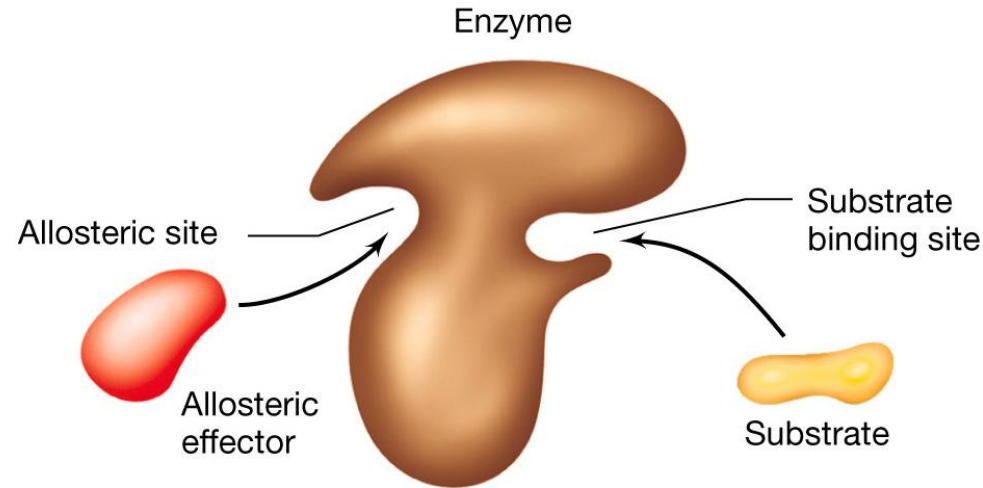
Second intermediate

Enzyme C

Third intermediate

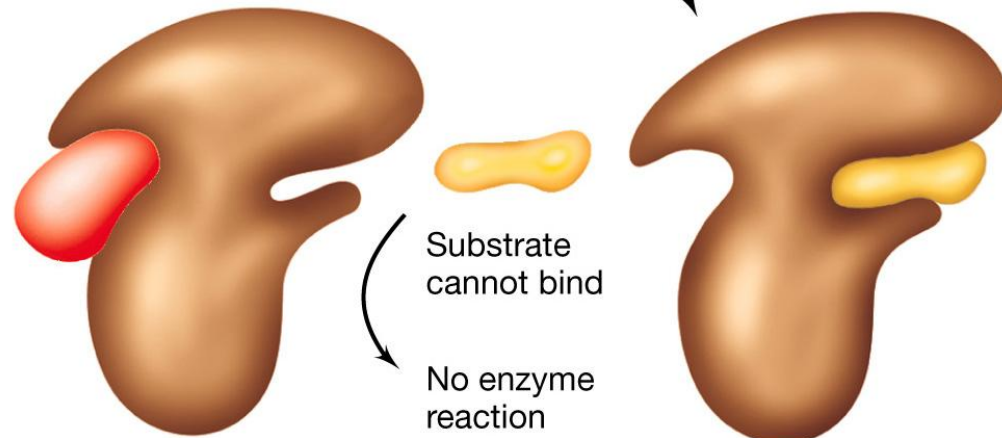
Enzyme D

End product



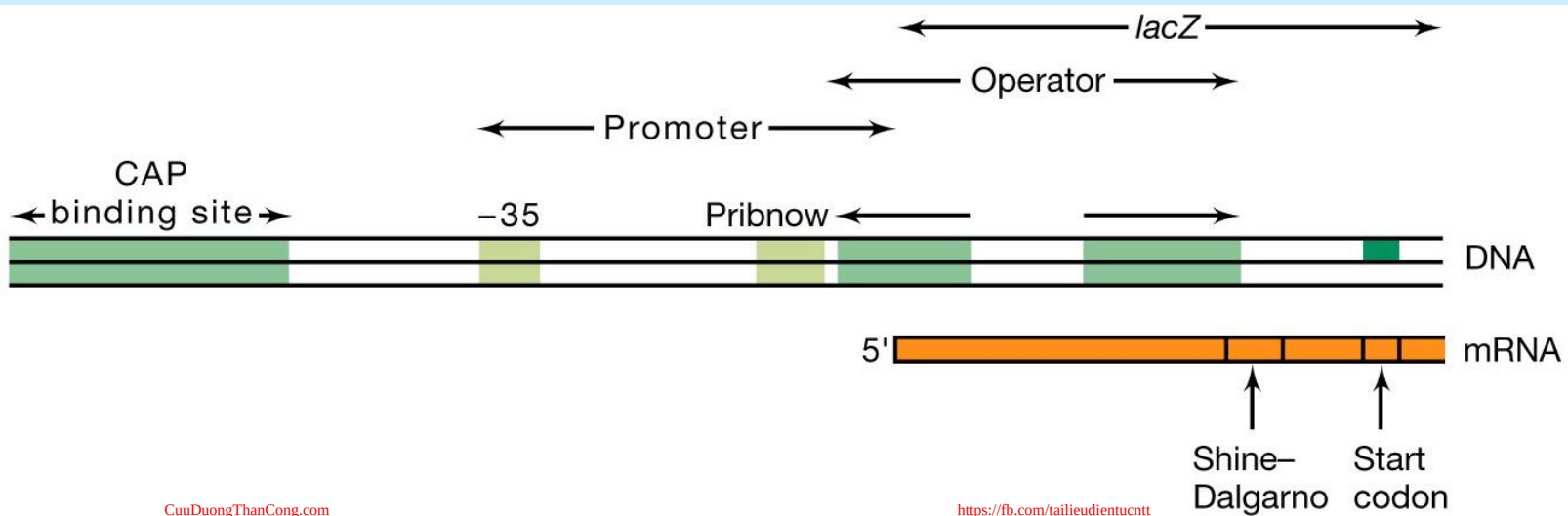
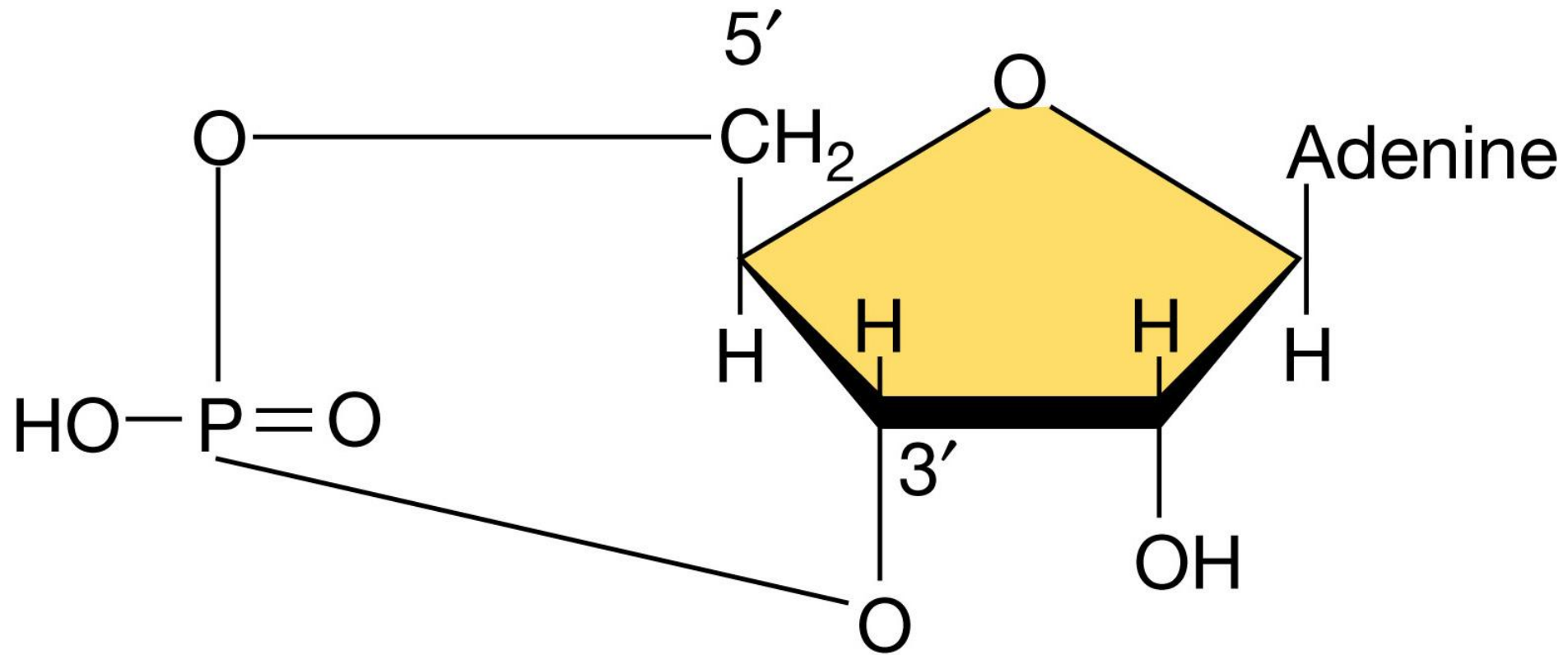
Conformational change in substrate binding site; enzyme reaction inhibited

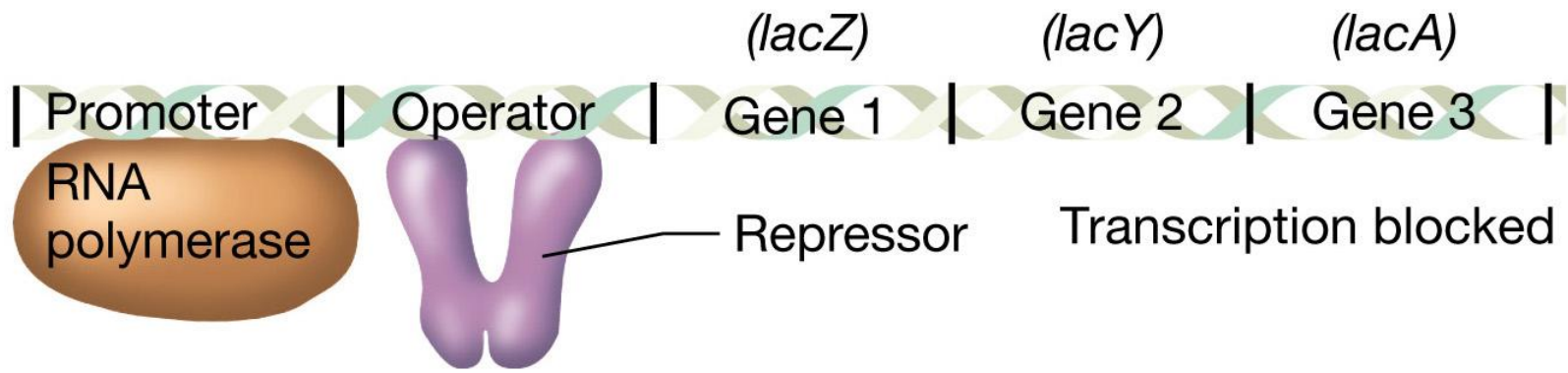
Enzyme reaction proceeds



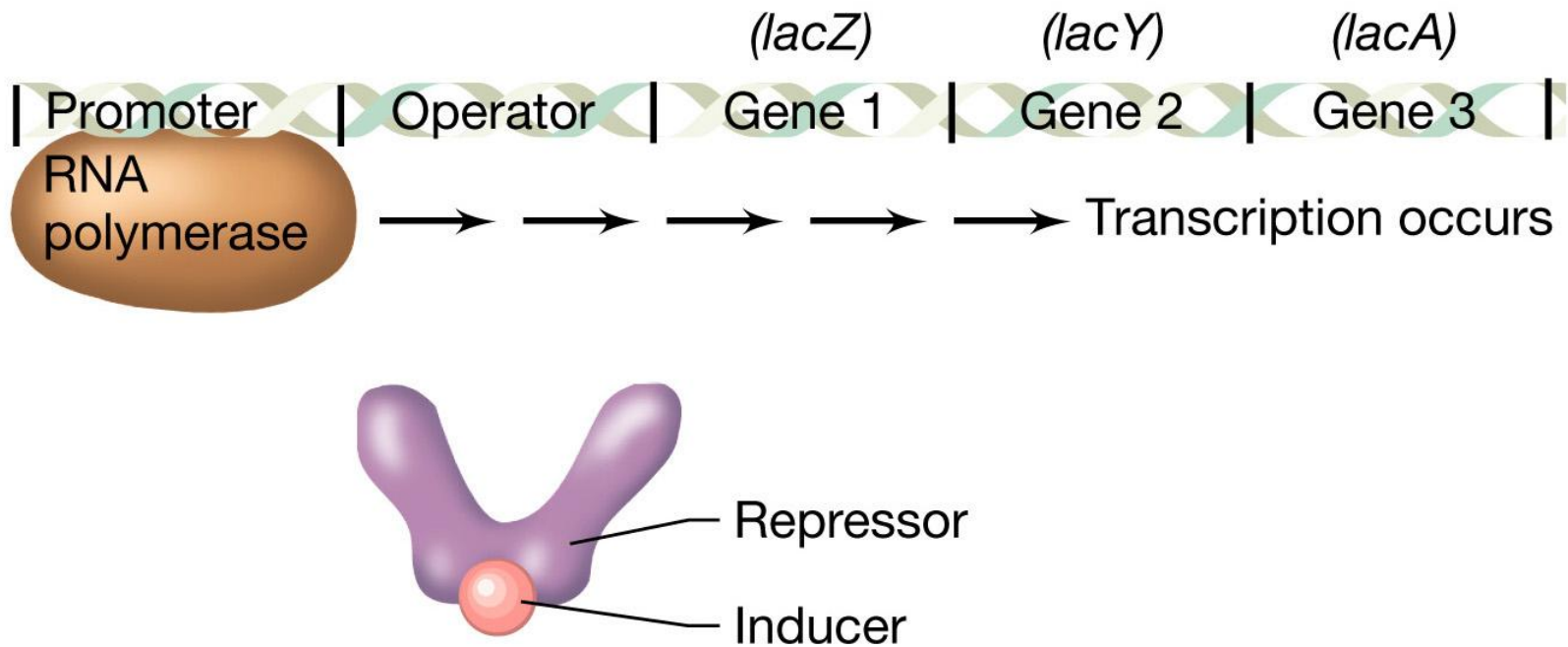
Điều hòa toàn cục (global regulation)

- Cơ chế ức chế dị hóa (catabolite repression)
- Điều hòa ảnh hưởng đồng thời nhiều gen khác nhau để đáp ứng với biến đổi của môi trường
- Ức chế dị hóa bởi glucose ở *E. coli* đối với sinh tổng hợp enzyme biến dưỡng các đường khác:
- Protein hoạt hóa dị hóa (catabolite activator protein, CAP)
- CAP tương tác với effector là cAMP gắn vào CAP-binding site ở vùng promoter, xúc tiến sự tổng hợp mRNA
- Nồng độ cAMP phụ thuộc nồng độ glucose trong môi trường





(a)

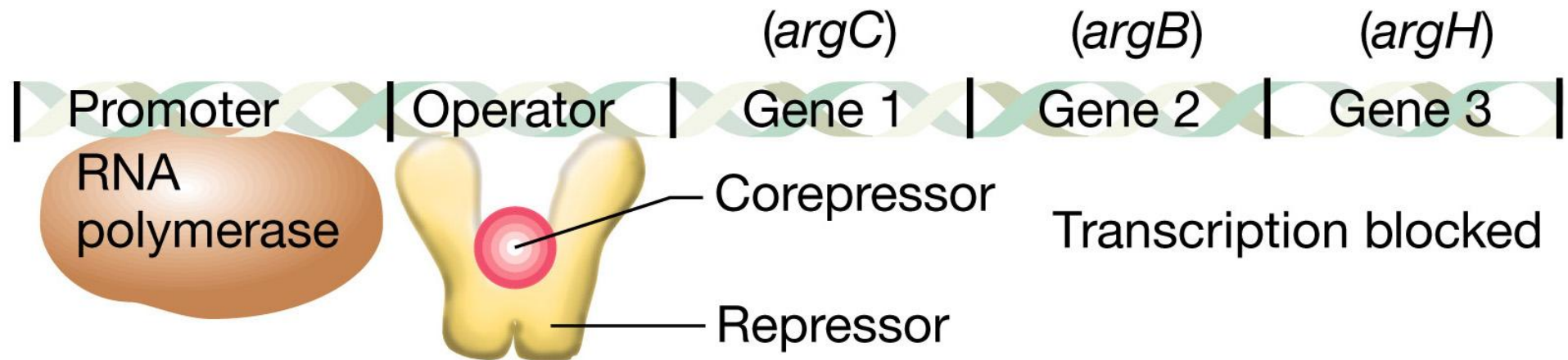
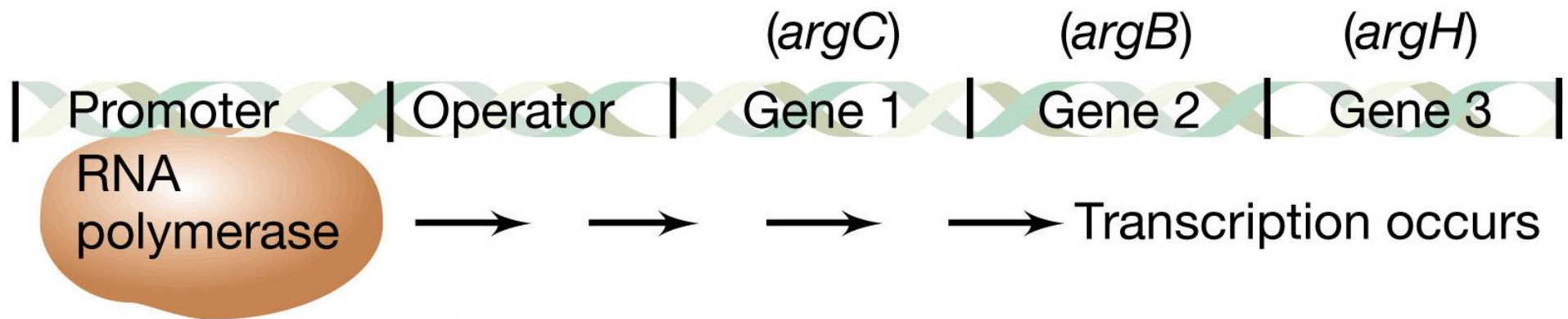


(b)

Use another slides

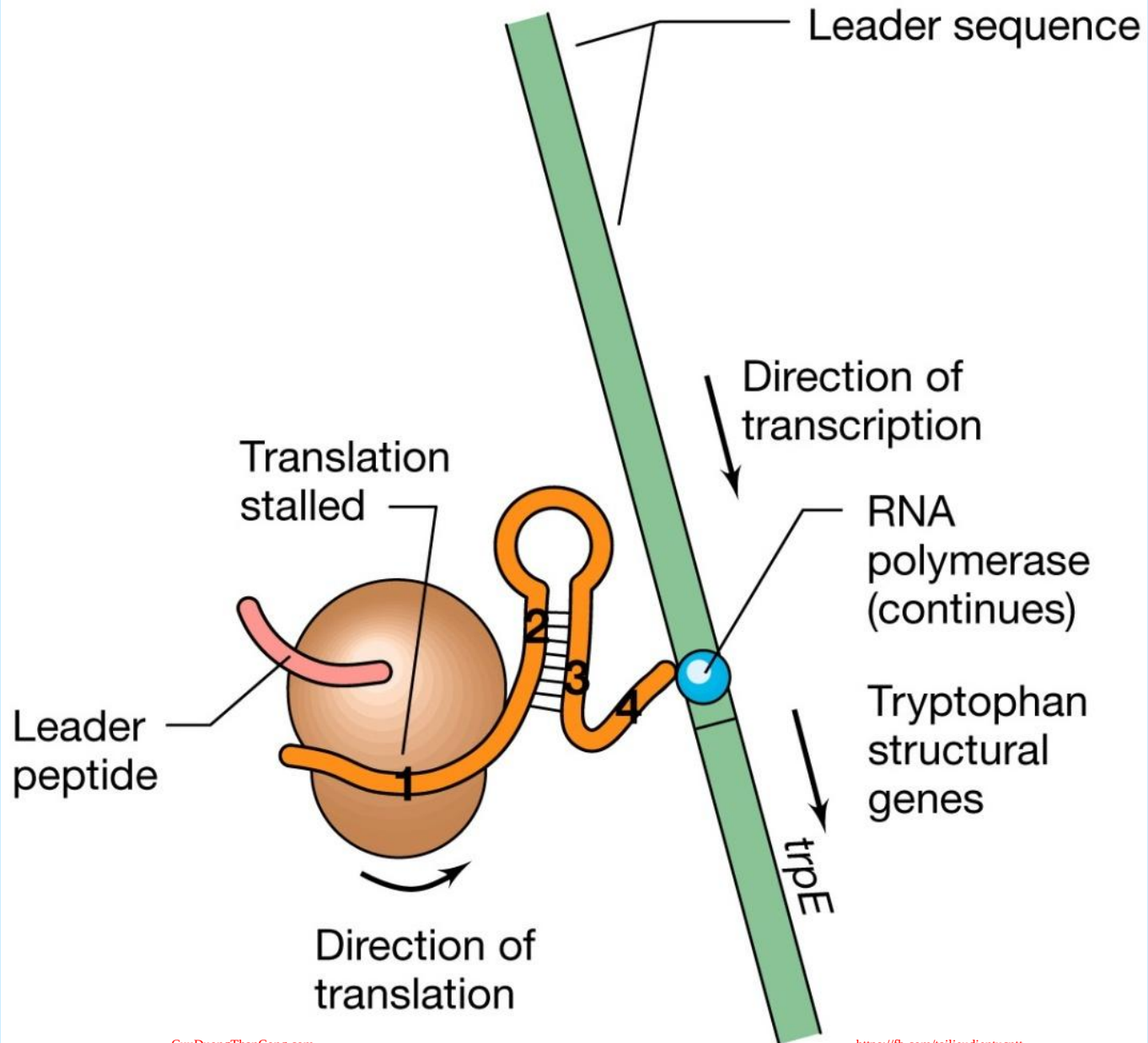
Điều hòa giảm số lượng (attenuation)

- Hiện diện ở prokaryote, các operon liên quan đến sinh tổng hợp amino acid
- Gen tiên phong (leader gene), gen giảm số lượng (attenuator): polypeptide chứa polyhomo-amino là amino acid cần được tổng hợp bởi operon
- Sự dịch mã của leader gene điều hòa phiên mã của các gen còn lại trong operon:
 - + Các vùng trong mRNA có thể tạo stem-loop với nhau
 - + Môi trường nhiều amino acid mục tiêu: dịch mã xảy ra trên vùng mRNA tương ứng với leader sequence, mRNA tạo stem-loop là tín hiệu RNA polymerase ngừng phiên mã
 - + Môi trường thiếu amino acid: dịch mã không xảy ra trên vùng mRNA tương ứng với leader sequence, mRNA tạo stem-loop khác cho phép mRNA tiếp tục phiên mã vùng còn lại của operon

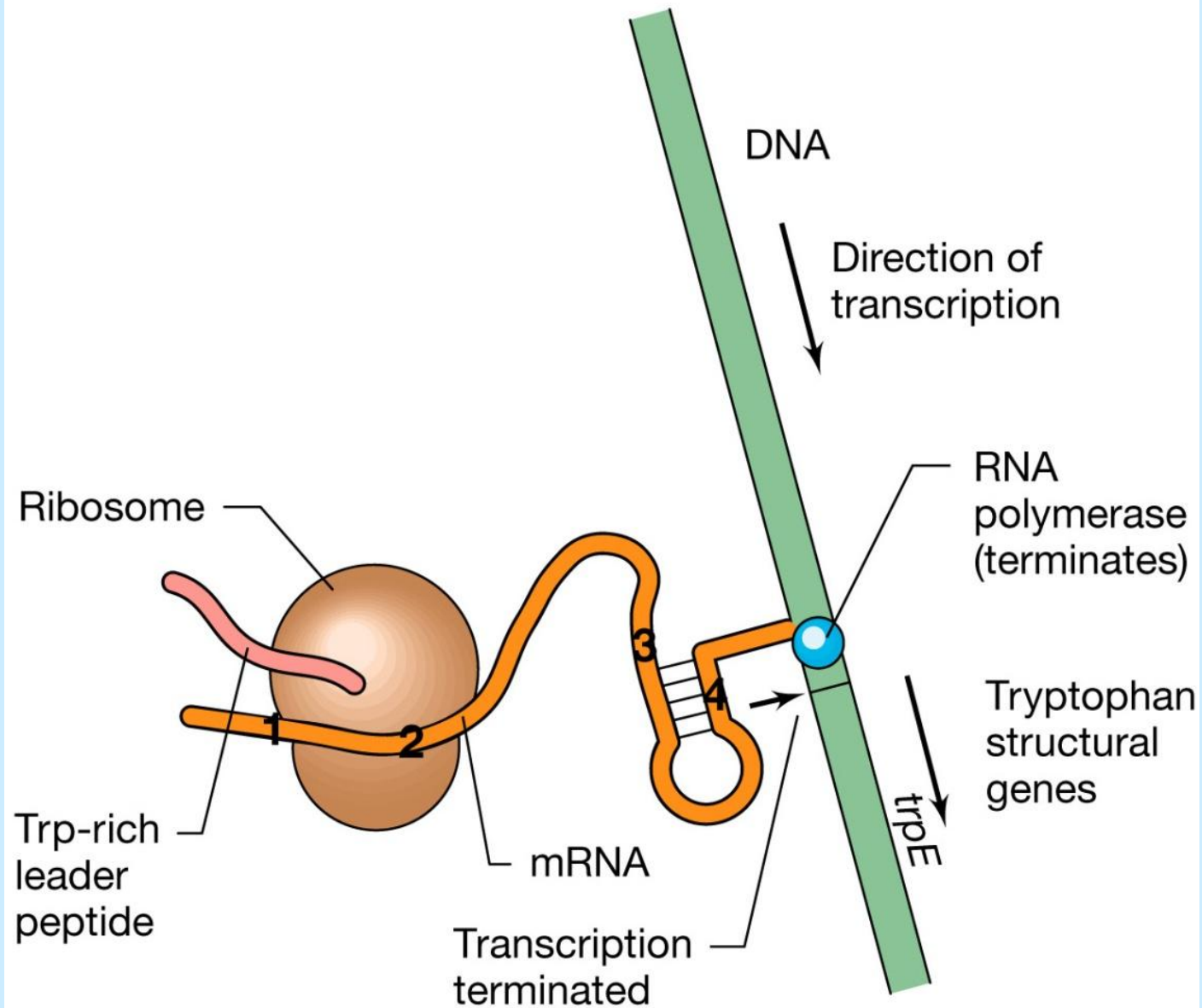


(b)

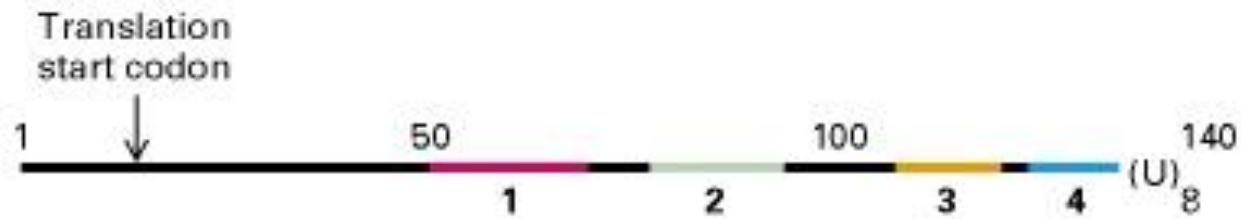
Tryptophan-starved: transcription not terminated



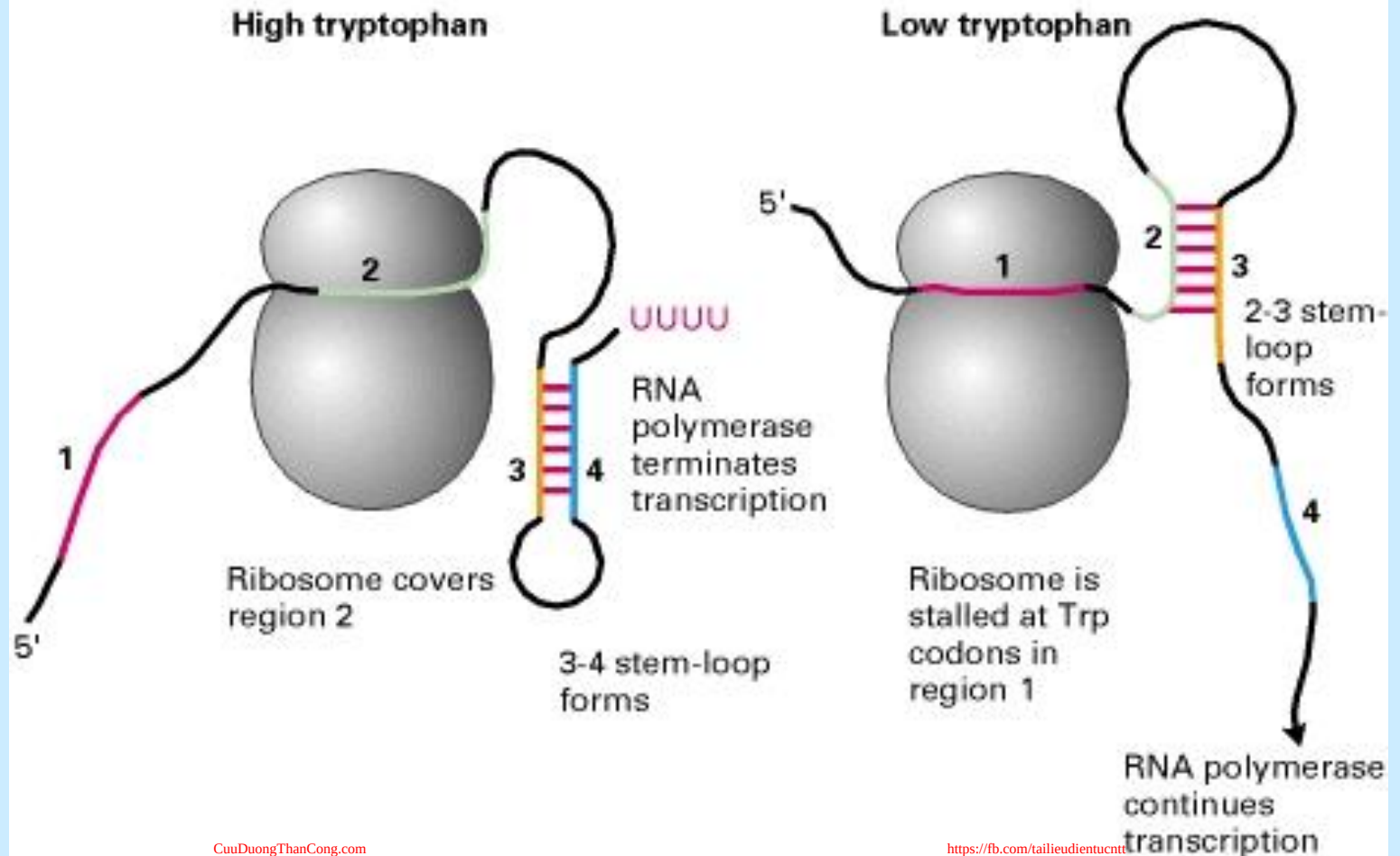
Excess tryptophan: transcription terminated

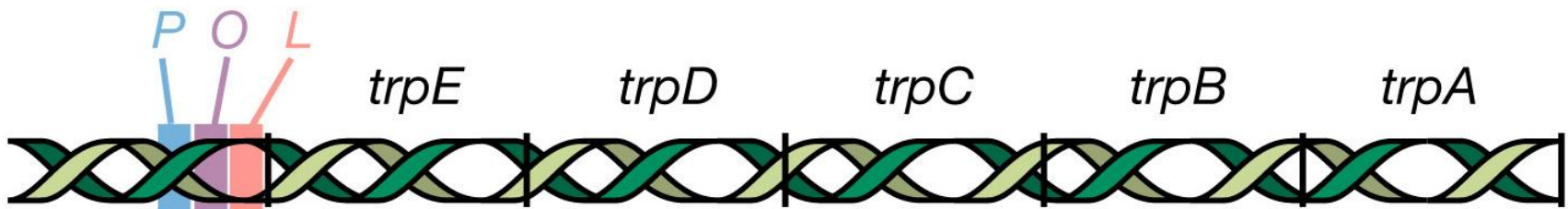


(a) *trp* leader RNA



(b) Translation of *trp* leader





Met-Lys-Ala-Ile-Phe-Val-Leu-Lys-Gly-Trp-Trp-Arg-Thr-Ser

(a)

Threonine

Met-Lys-Arg-Ile-Ser-Thr-Thr-Ile-Thr-Thr-Thr-Ile-Thr-Ile-Thr-Thr-Gly-Asn-Gly-Ala-Gly

Histidine

Met-Thr-Arg-Val-Gln-Phe-Lys-His-His-His-His-His-His-His-Pro-Asp

Phenylalanine

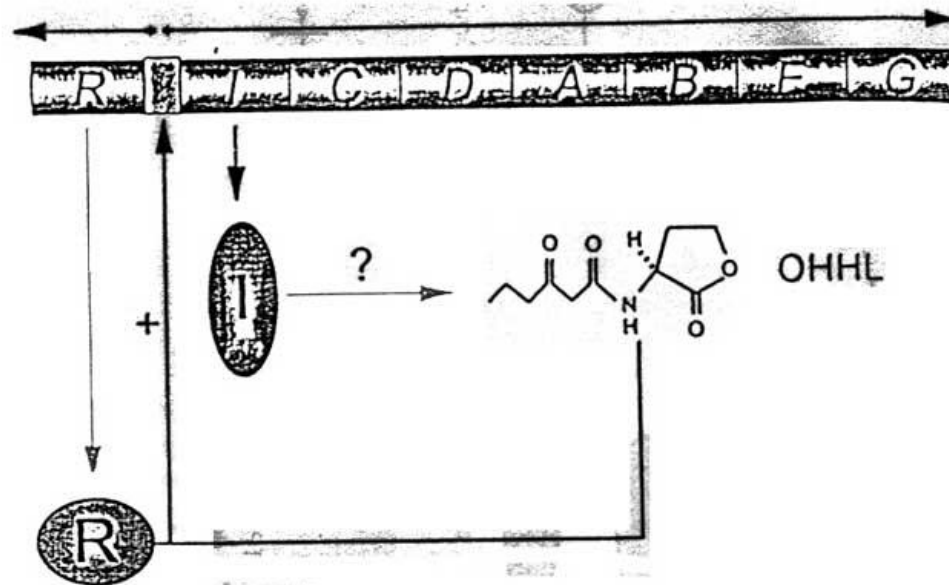
Met-Lys-His-Ile-Pro-Phe-Phe-Phe-Ala-Phe-Phe-Phe-Thr-Phe-Pro

(b)

Điều hòa do mật độ tế bào (quorum sensing)

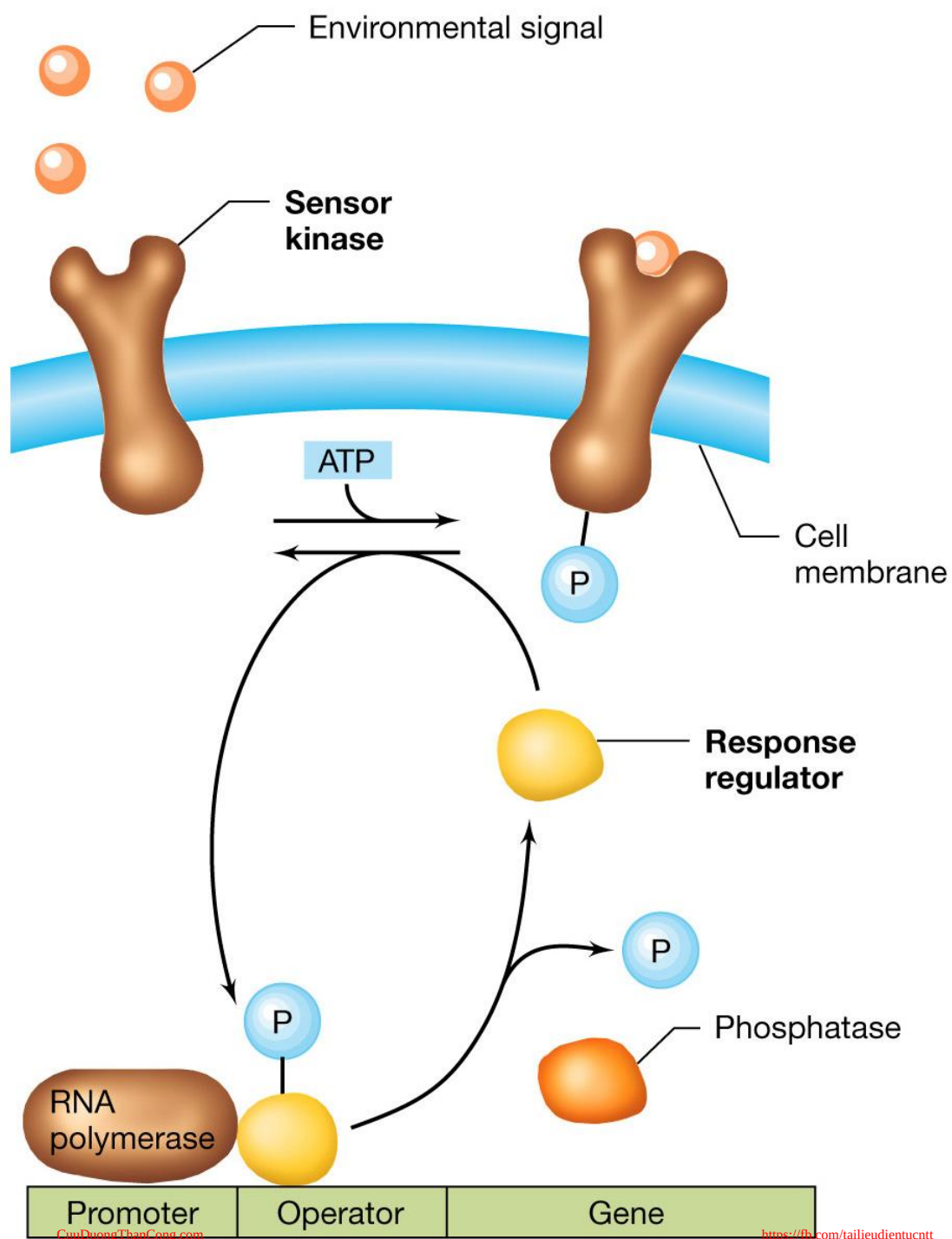
- Điều hòa liên quan đến mật độ tế bào và acylated homoserine lactone (AHL)
- Mật độ tế bào cao tạo nồng độ cao của AHL
- AHL hoạt hóa activator
- Ví dụ: điều hòa *lux* operon (chứa gen mã hóa luciferase) phát sáng ở *Vibrio fischeri*

Gen *lux* ở *Photobacterium fischeri*



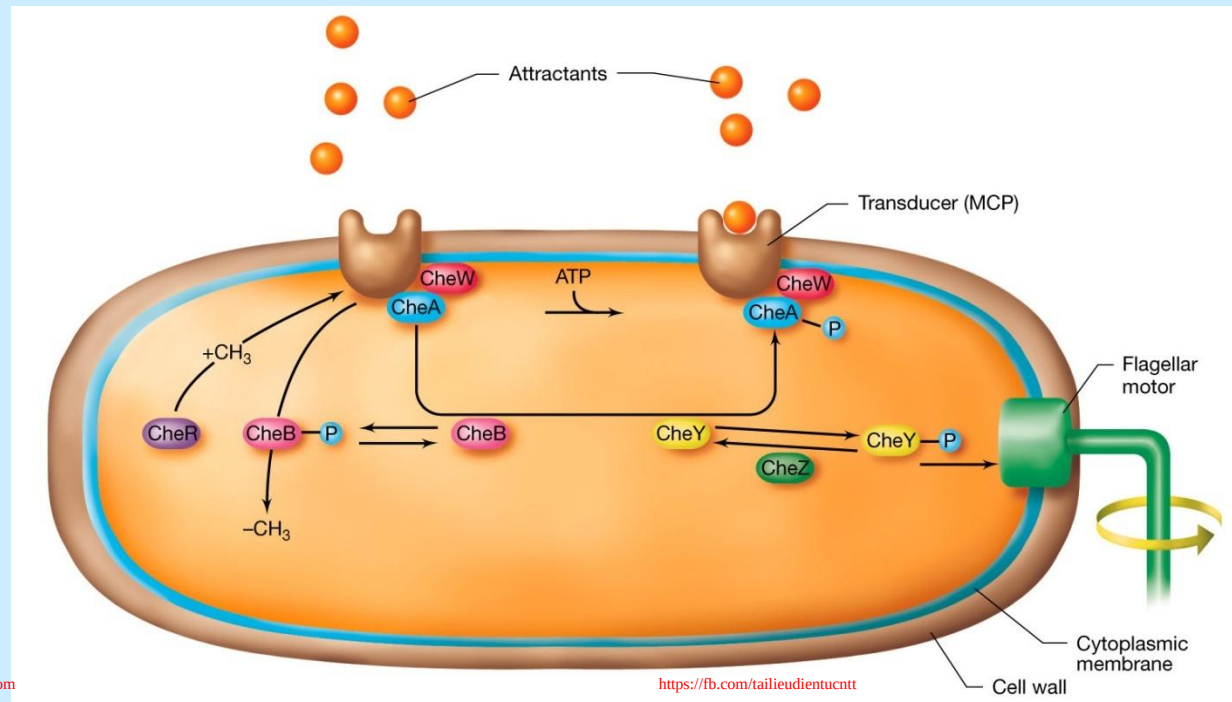
Hệ thống điều hòa hai thành phần (two-component regulatory system)

- Điều hòa giúp tế bào thích nghi với môi trường
- Protein cảm biến (sensor protein): Kinase
- Kinase tự phosphoryl hóa khi có tín hiệu từ môi trường và chuyển nhóm phosphate cho thành phần thứ hai
- Protein điều hòa đáp ứng (response regulator protein): DNA-binding protein có hoạt tính của một repressor khi bị phosphoryl hóa
- Phosphatase là một thành phần khác loại bỏ phosphate từ protein điều hòa để ngừng đáp ứng
- Đồng hóa nitrogen ở *E. coli*
- Cố định đạm ở *Klebsiella*
- Tạo bào tử ở *Bacillus*



Tính hướng hóa (chemotaxis)

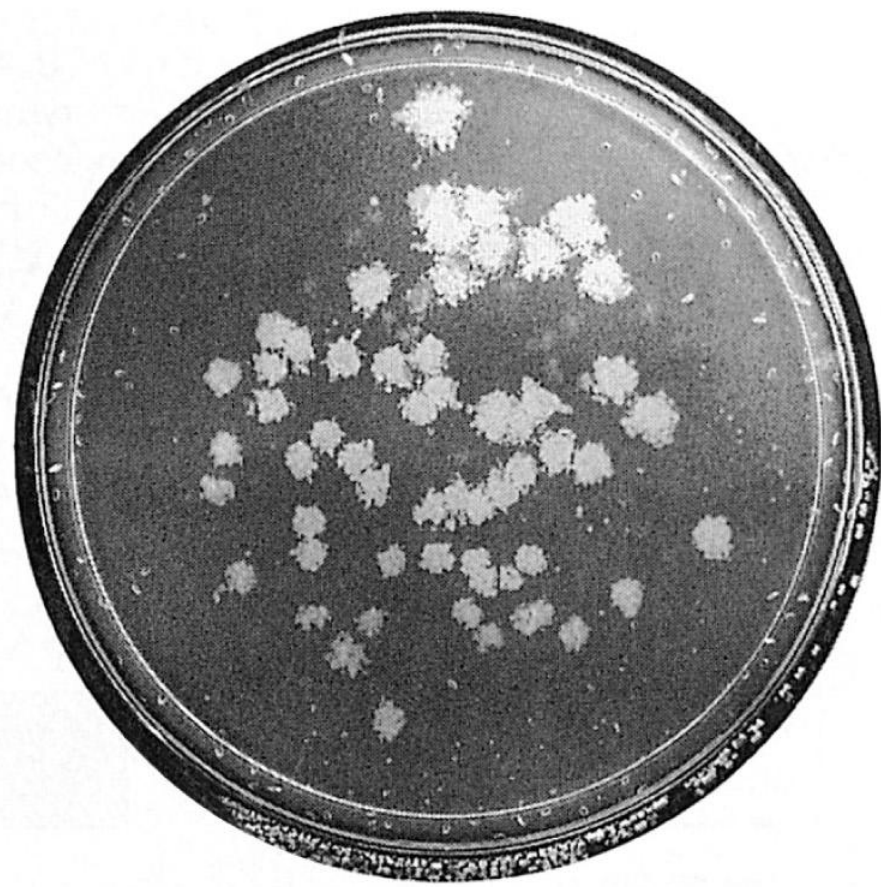
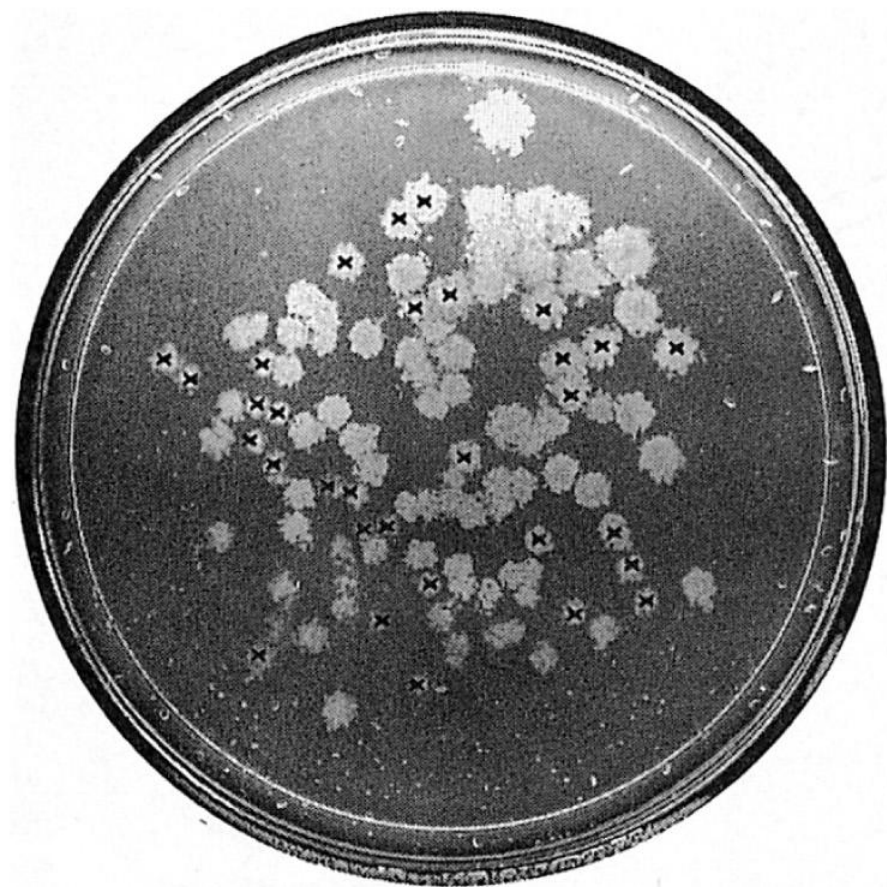
- Di động do chất dẫn dụ (attractant) hoặc chất xua đuổi (repellent) ở vi sinh vật
- Protein hướng hóa nhận methyl (methyl-accepting chemotaxis protein, MCP)
- Mỗi MCP có thể cảm biến một số hợp chất khác nhau
- MCP gắn trực tiếp với hợp chất hoặc gắn gián tiếp qua tương tác với các protein hiện diện ở vùng chu chất
- MCP tạo ra một loạt tương tác với protein trong tế bào chất và làm đảo ngược chiều quay của tiên mao

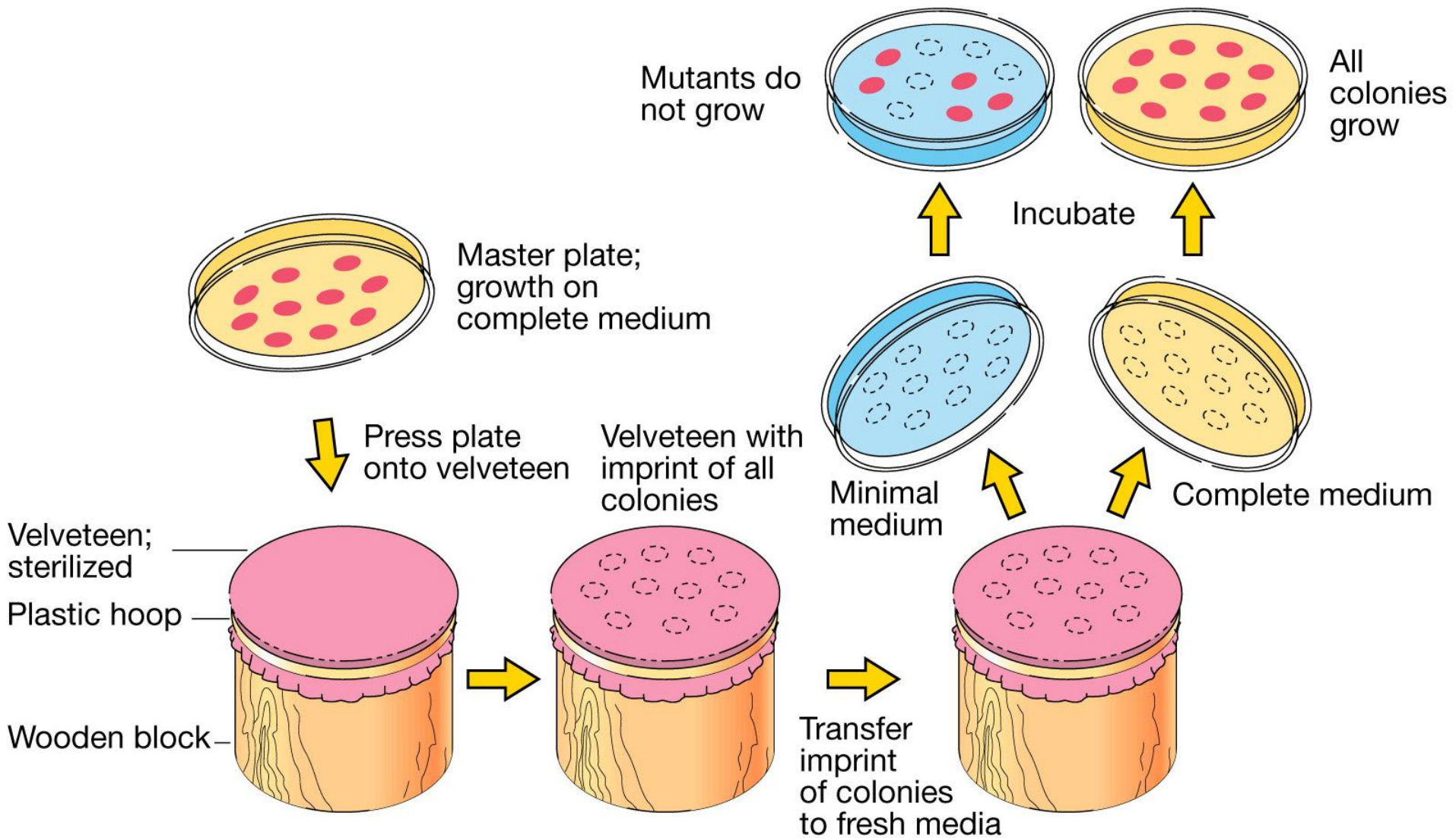


Di truyền học vi sinh vật

Đột biến (mutation)

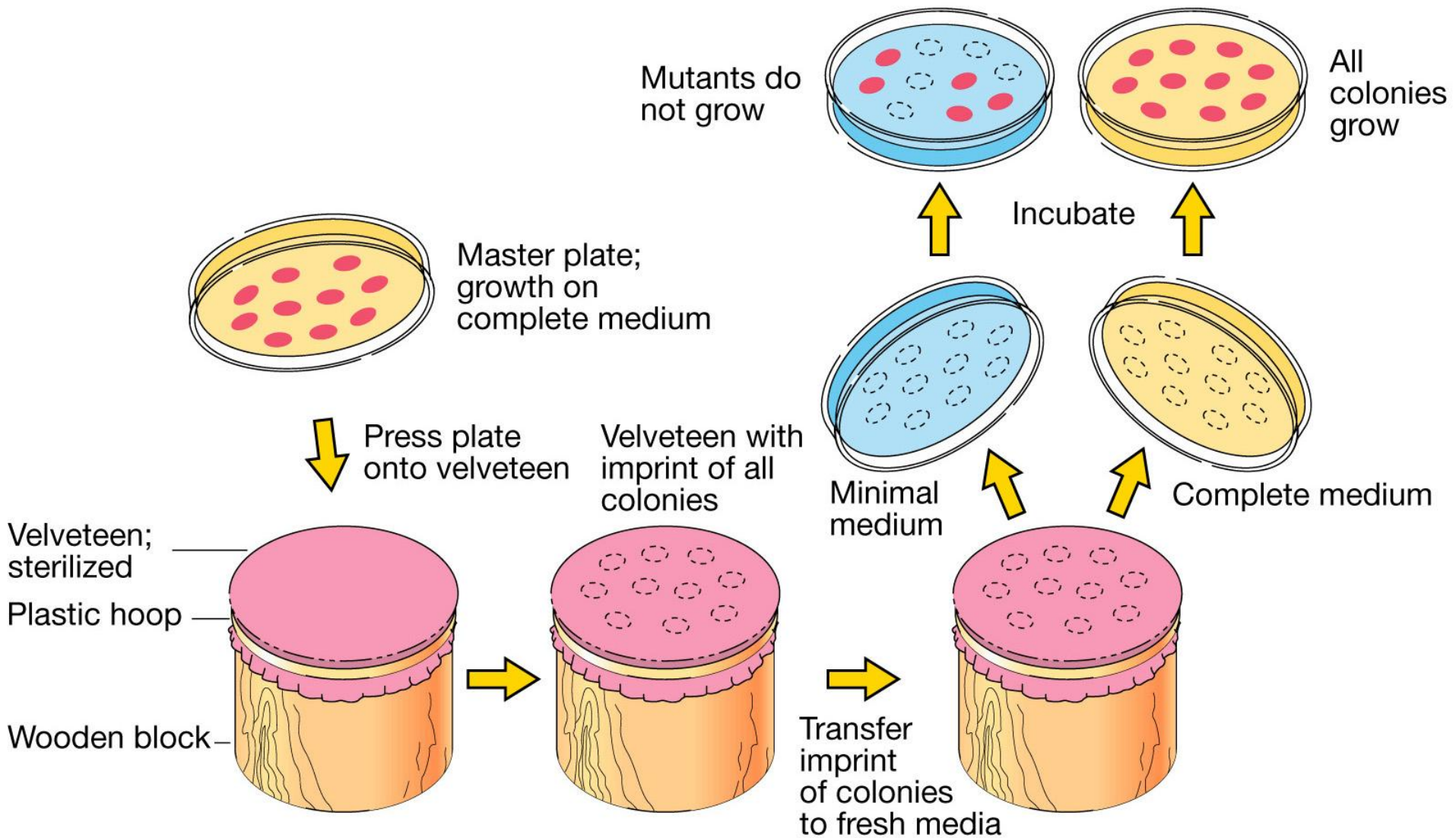
- Đột biến, thể đột biến (mutant)
- Thể đột biến có kiểu gen bị biến đổi, kiểu hình không nhất thiết thay đổi
- Ký hiệu:
 - + Kiểu gen *hisC*: gen mã hóa cho protein HisC
 - + Kiểu hình Thr⁻: mất khả năng tự tổng hợp threonine
- Khuyết dưỡng (trợ dưỡng): auxotroph
- Nguyên dưỡng: prototroph

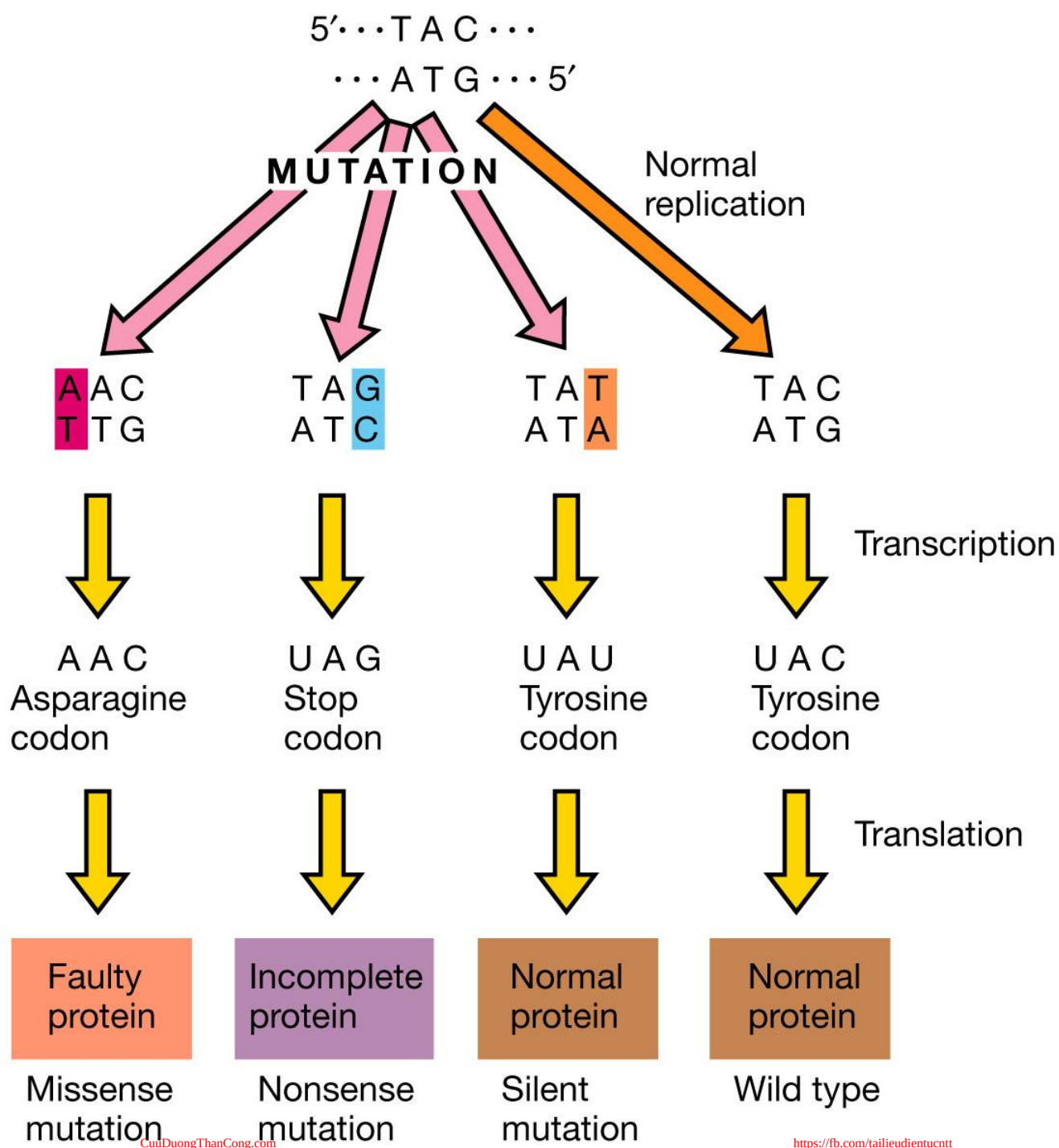




Cơ sở phân tử của đột biến

- Đột biến ngẫu nhiên: sai sót trong sao chép, chiếu xạ tự nhiên
- Đột biến nhân tạo:
 - + Hóa chất: các chất đồng dạng (analog), chất tác dụng trực tiếp với DNA Tia UV, tia chiếu xạ ion hóa
 - + Gen chuyển vị (transposon)
 - + Đột biến: thay đổi ở một cặp base, thêm một hoặc một số cặp base, mất đoạn, đảo đoạn, chuyển đoạn
- Hệ quả của đột biến:
 - + Lệch khung dịch mã
 - + Mất codon bắt đầu, codon kết thúc trên mRNA
 - + Gen không được thể hiện
- Đột biến ức chế (suppressor)





DNA

mRNA

Transcription

...GTGCCCTGTT...
...CACGGGACAA...



...GUG|CCC|UGU|U...
Shifted Reading Frame (+1)

Shifted Reading Frame (+1)



Insertion mutation

...GTGCCCTGTT...
...CACGGACAA...



...GUG|CCU|GUU|...
Normal Reading Frame (0)

Normal Reading Frame (0)



Deletion mutation

...GTGCTGTT...
...CACGACAA...



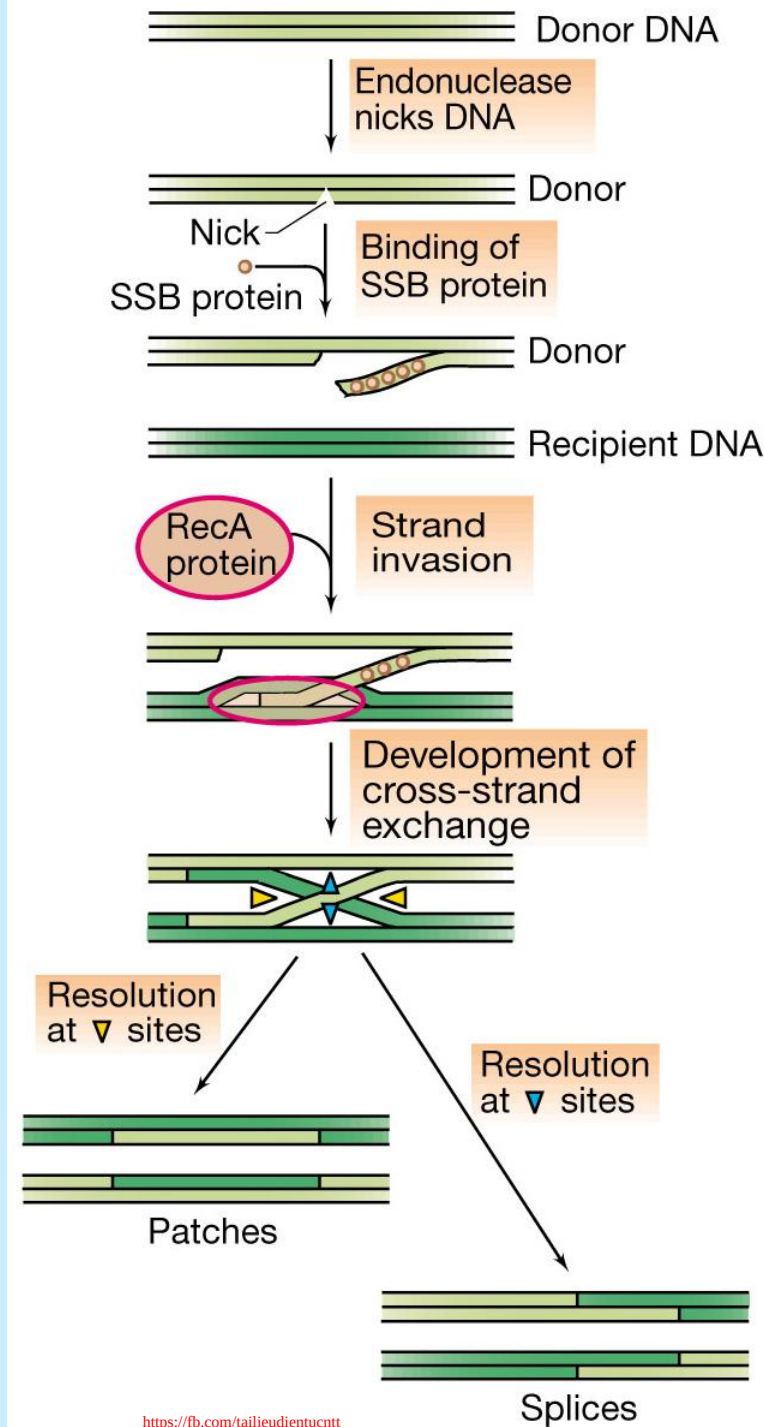
...GUG|CUG|UU...
Shifted Reading Frame (-1)

Shifted Reading Frame (-1)

Analog	Substitutes for
5-Bromouracil (a)	Thymine
2-Aminopurine (b)	Adenine

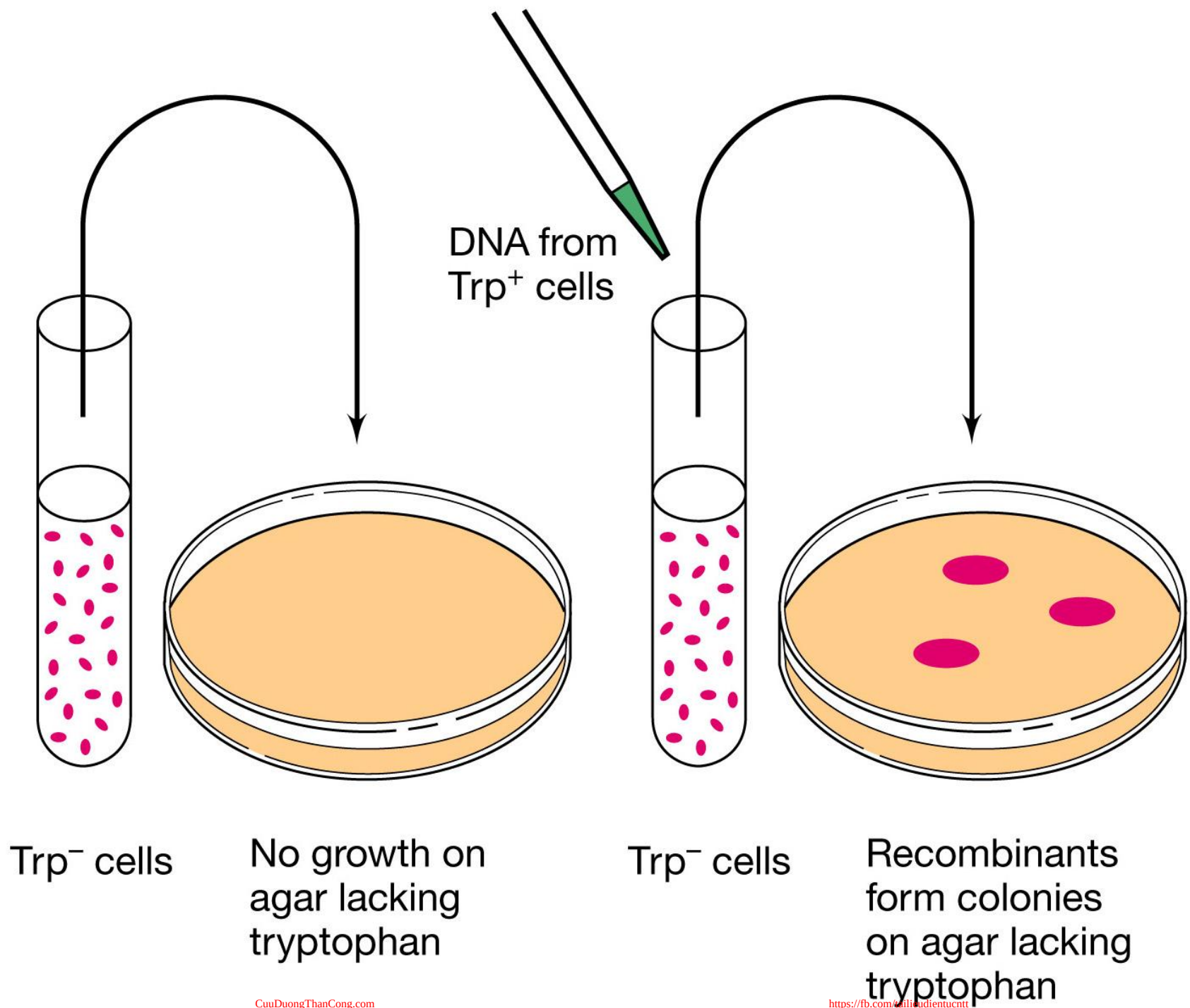
Tái tổ hợp di truyền (genetic recombination)

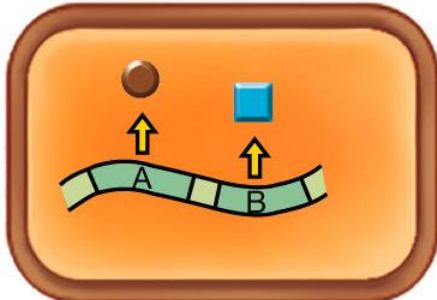
- Dựa trên sự tương đồng của hai đoạn trình tự
- Xúc tác bởi RecA – recombinase A (tái tổ hợp tương đồng) hoặc recombinase chuyên biệt (tái tổ hợp chuyên biệt trình tự)
- Các bước:
 - + Tạo một vết đứt trên DNA (nicking)
 - + Mở vòng DNA xoắn kép
 - + Bắt cặp giữa các đoạn tương đồng trên hai phân tử DNA mạch đơn
 - + Cắt và nối các mạch DNA sao cho trao đổi đoạn trên các mạch
 - + DNA kiểu gen mới được tạo ra khi hai mạch có trình tự khác nhau ở ngoài vùng cắt và nối



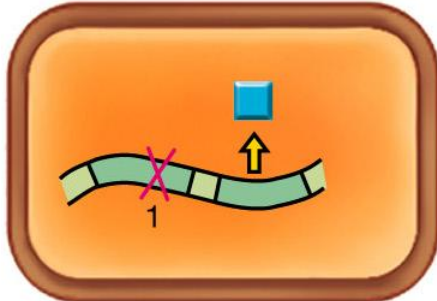
Bổ trợ di truyền (complementation)

- Trường hợp chủng vi sinh vật có một kiểu hình được quy định bởi một vài gen, chỉ một gen bị đột biến thì kiểu hình có dạng đột biến
- Nếu dạng đột biến được bổ sung một đoạn DNA chứa các gen tương ứng trong đó có gen hoang dại của gen đột biến thì chủng đột biến sẽ trở lại kiểu hình hoang dại: hiện tượng bổ trợ di truyền
- Hiện tượng bổ trợ di truyền:
 - + Chỉ xảy ra khi các đột biến ở trên bộ gen và trên DNA ngoại lai là không thuộc cùng một gen
 - + Bổ trợ về kiểu hình (biểu hiện gen mức phiên mã và dịch mã), không xảy ra sự trao đổi đoạn tương đồng (mức DNA)
- Được ứng dụng:
 - + Trong chọn lọc dòng tái tổ hợp mục tiêu
 - + Xác định đột biến có xảy ra ở cùng một gen trên hai DNA hay không

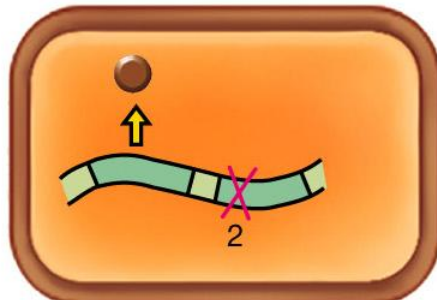




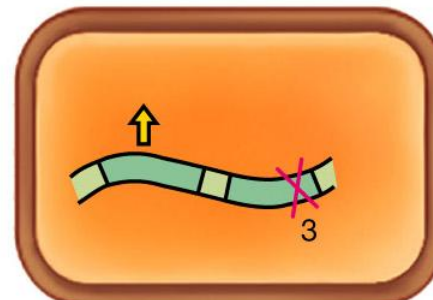
Wild-type cell: both genes are functional and cell is Trp^+



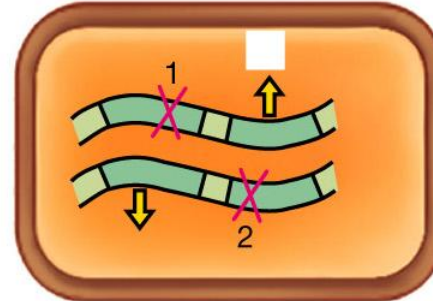
Mutant X: cell contains mutation 1 and is Trp^- (requires tryptophan for growth)



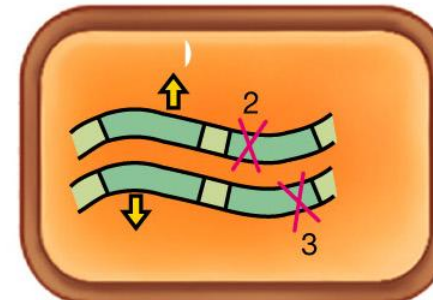
Mutant Y: cell contains mutation 2 and is Trp^-



Mutant Z: cell contains mutation 3 and is Trp^-



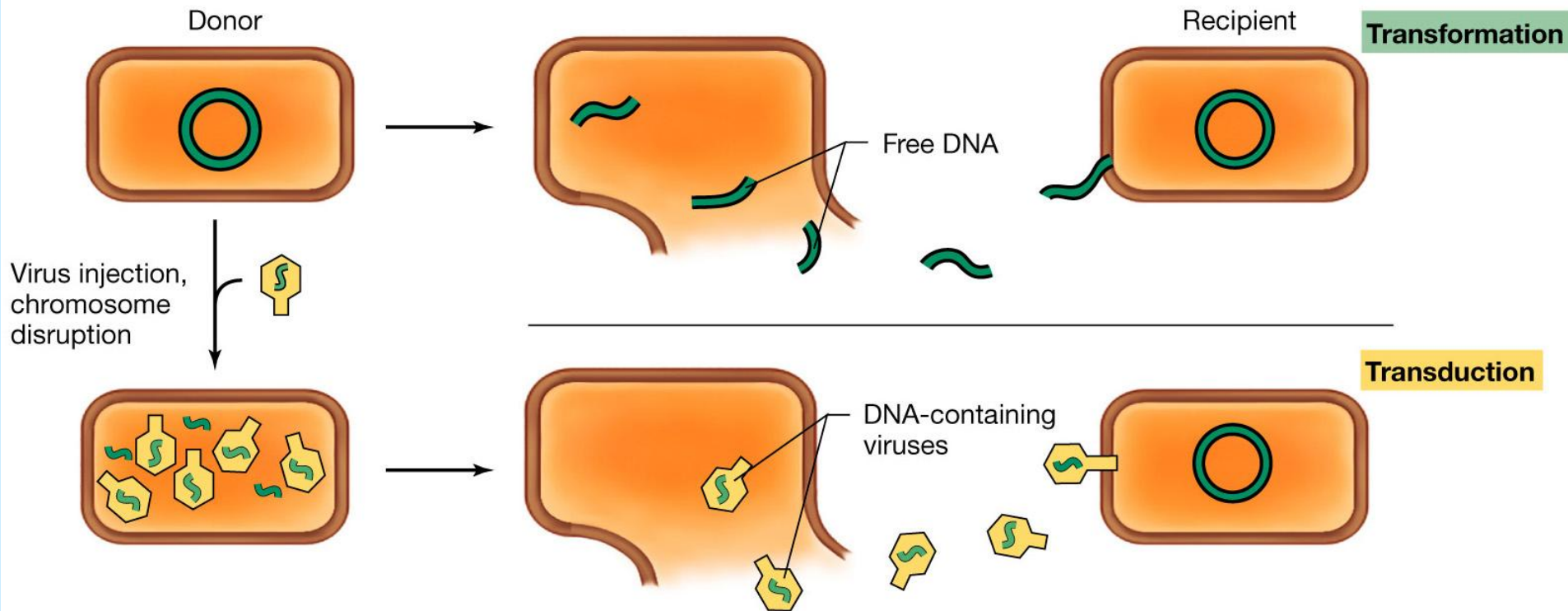
Trans test of mutations 1 and 2: complementation occurs (cell is Trp^+), therefore mutations are in separate genes



Trans test of mutations 2 and 3: no complementation occurs (cell is Trp^-), therefore mutations are in the same gene

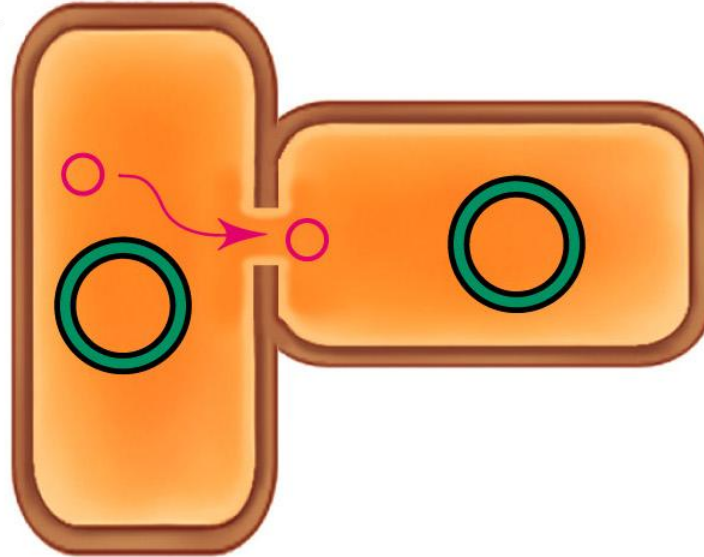
Các hiện tượng di truyền ở vi khuẩn

- Biến nạp (transformation)
- Tải nạp (induction)
- Giao nạp, tiếp hợp (conjugation)
- Chuyển vị gen (transposition)



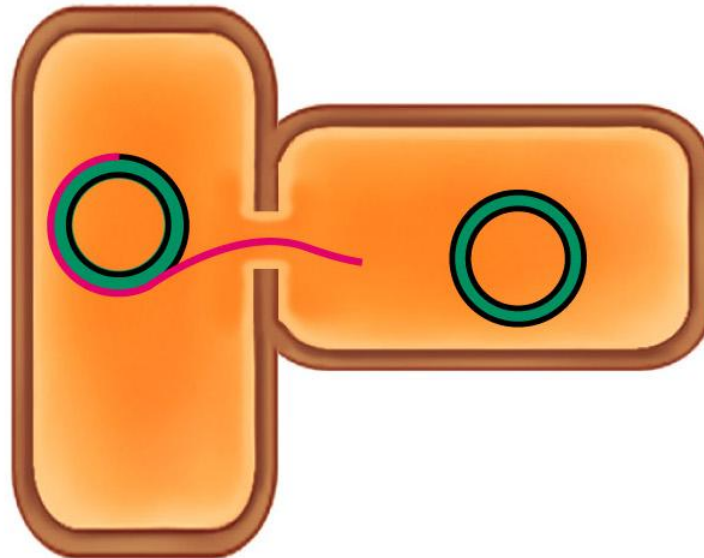
Conjugation: Plasmid transfer

Plasmid-containing donor



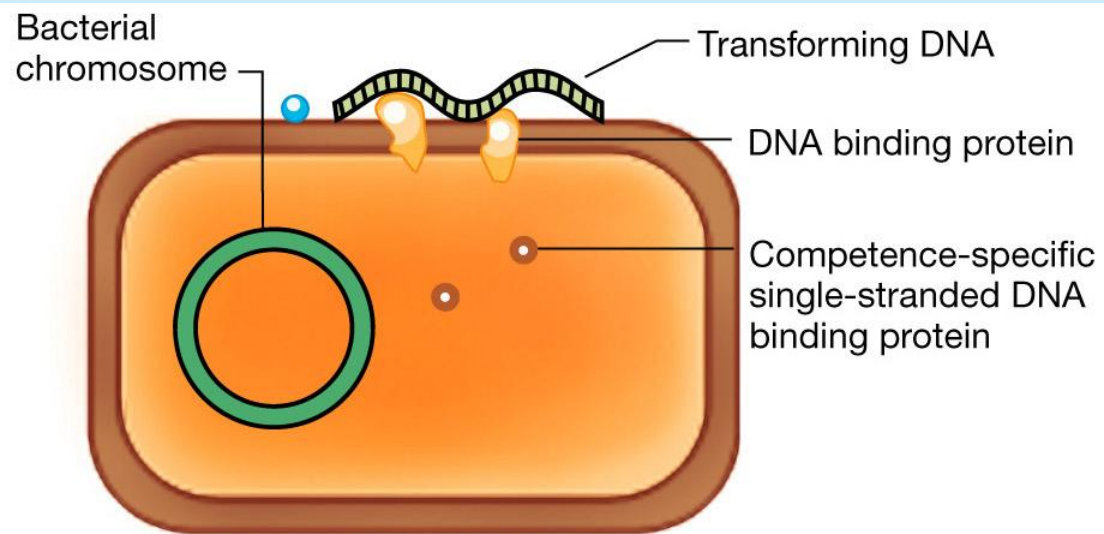
Conjugation: Chromosome transfer

Donor cell with integrated plasmid

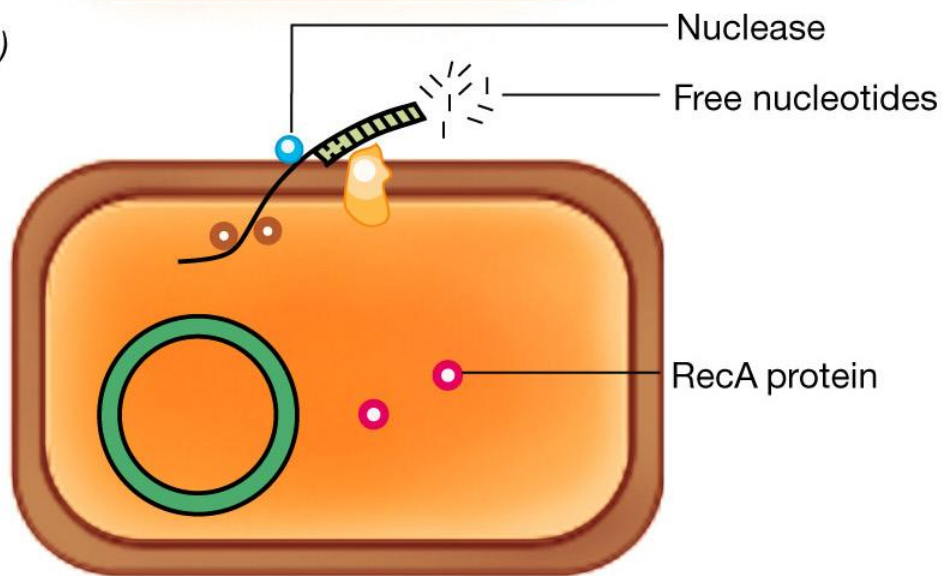


Biến nạp (transformation)

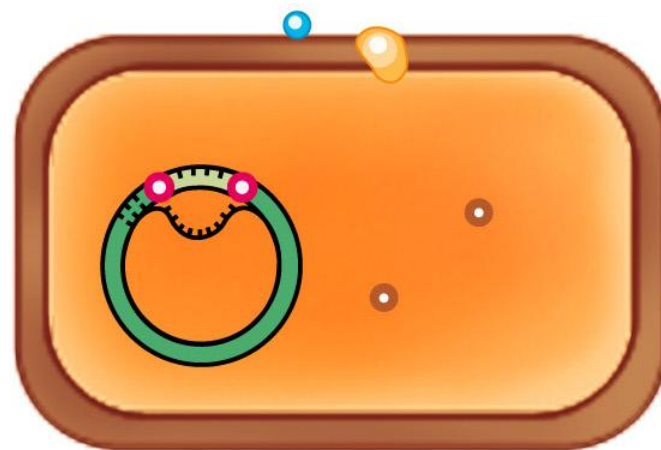
- Quá trình tế bào tiếp nhận DNA trần từ vào tế bào chủ
- Tính khả nạp (competence): có thể được tăng cường bằng xử lý hóa học, vật lý
- Cơ chế biến nạp:
 - + DNA gắn lên DNA-binding protein trên vách tế bào
 - + Nuclease thủy phân một mạch DNA, cho phép mạch đơn còn lại đi vào trong tế bào
 - + Mạch DNA được mang và bảo vệ bởi một số protein chuyên biệt
 - + Mạch DNA tái tổ hợp vào bộ gen bởi RecA protein
 - + Tế bào có kiểu gen mới được tạo thành khi tế bào phân chia



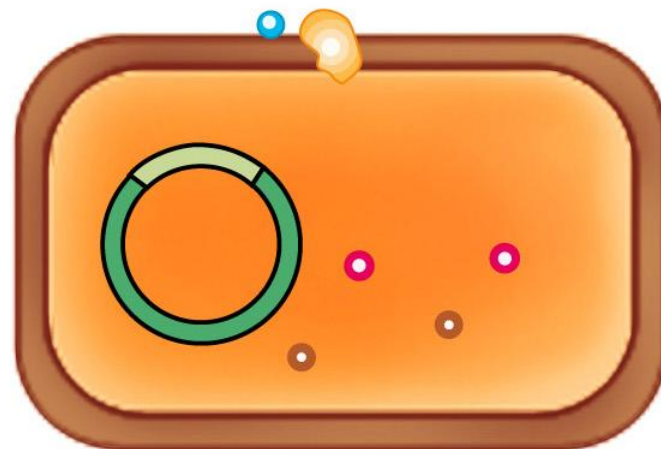
(a)



(b)



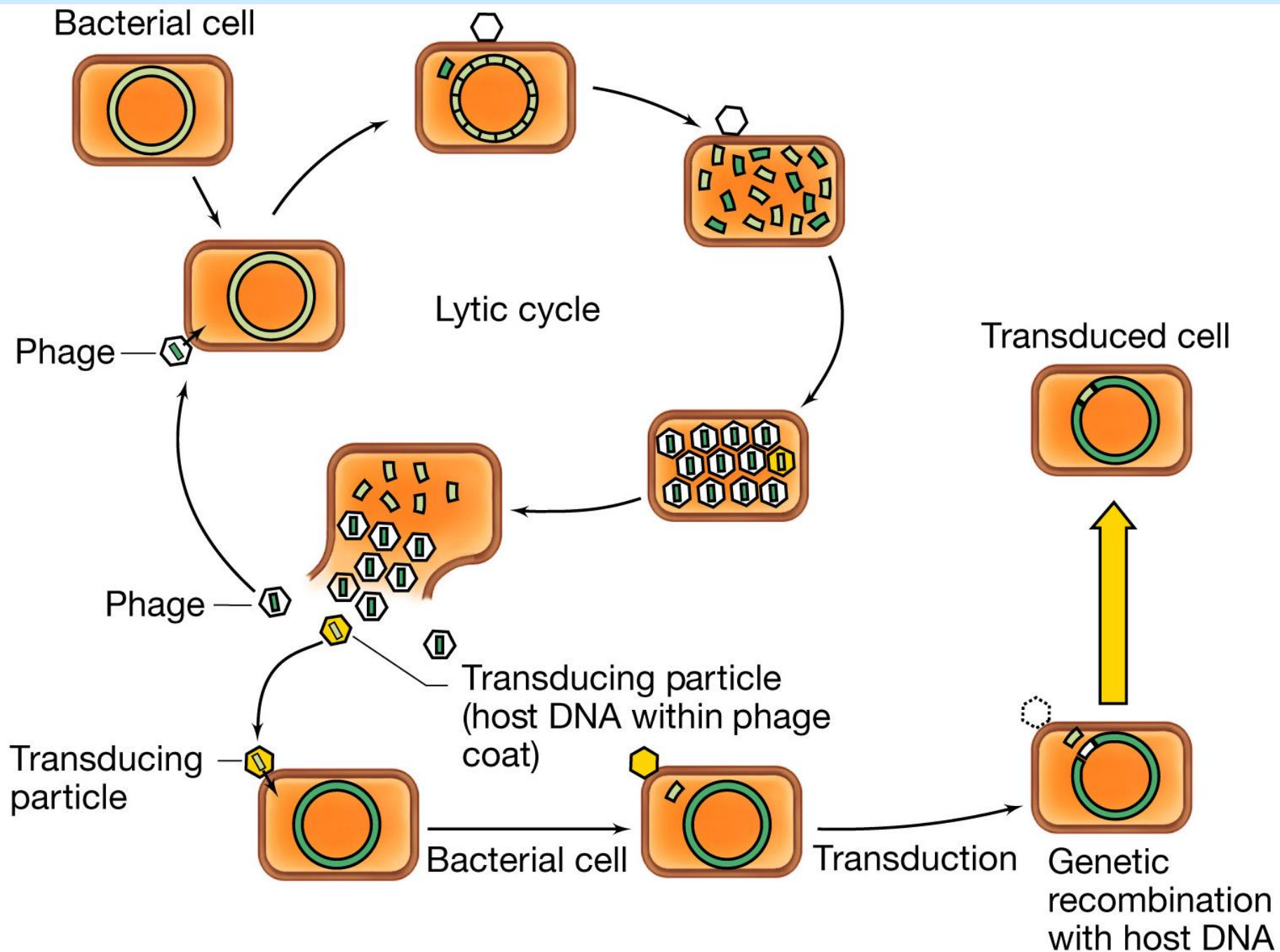
(c)

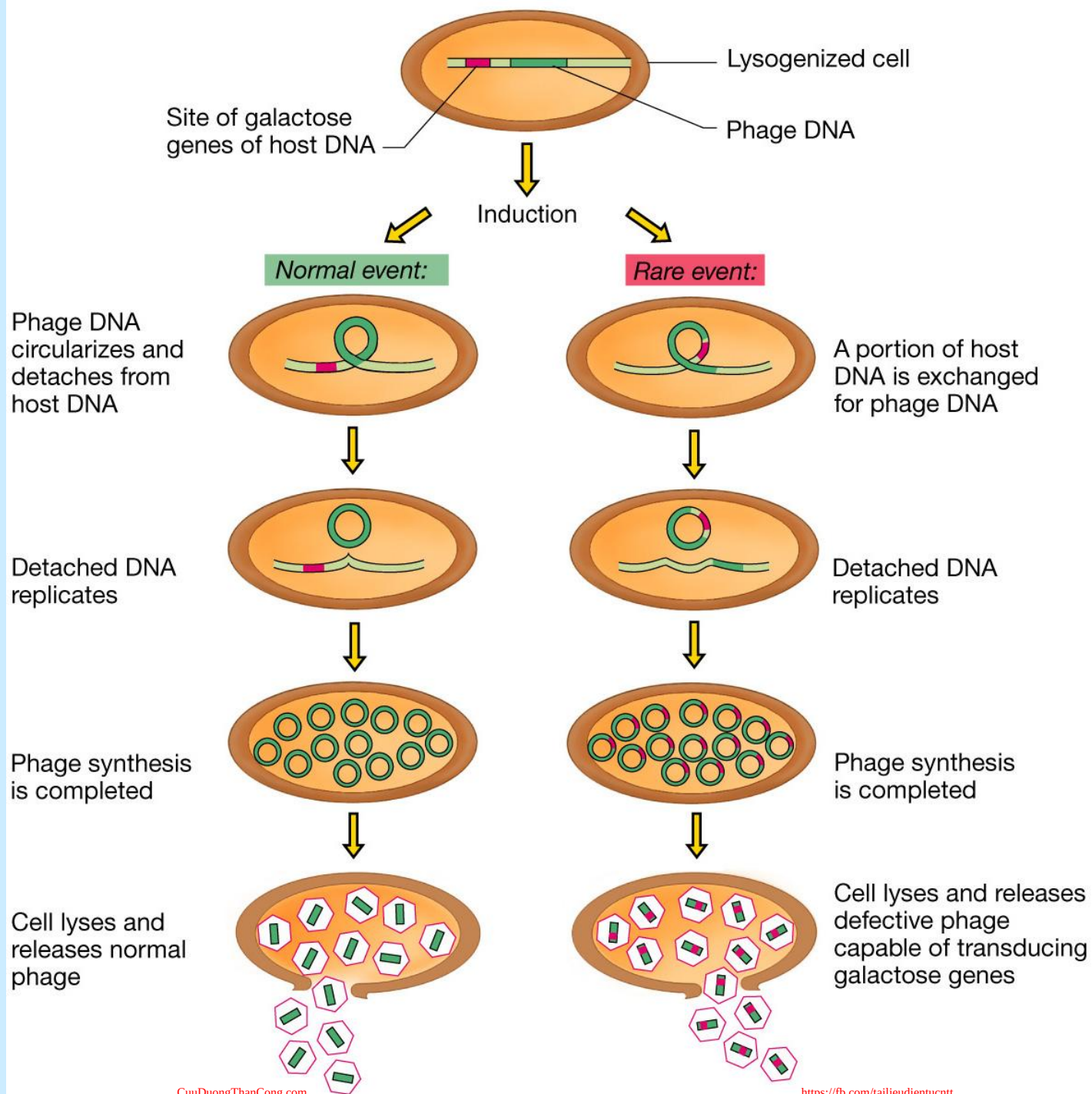


(d)

Tải nạp (transduction)

- DNA của tế bào cho được chuyển qua tế bào nhận bởi virút
- Tải nạp chuyên biệt (specialized transduction): tải nạp trên một số gen nhất định của vi khuẩn cho (virút mang theo gen của vi khuẩn khi bị cắt một cách không chính xác ra khỏi bộ gen tế bào chủ)
- Tải nạp chung (generalized transduction): tải nạp một gen bất kỳ từ vi khuẩn cho sang tế bào nhận (DNA của tế bào bị phân đoạn và lắp ngẫu nhiên vào vỏ virút mới)
- Biến đổi bởi phage (phage conversion): sự thay đổi kiểu hình ở vi khuẩn do sự thể hiện của gen virút tiềm tan



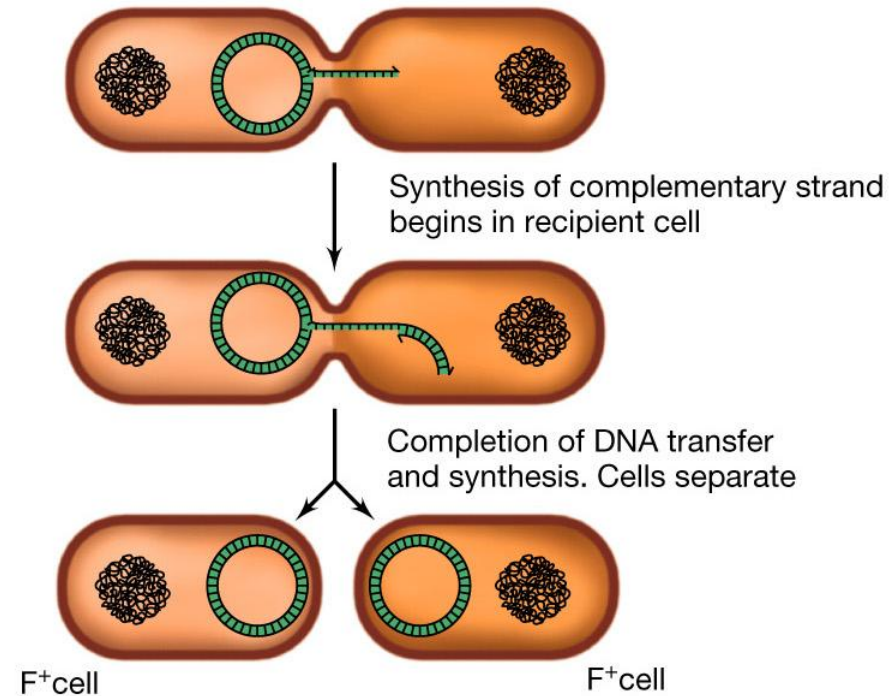
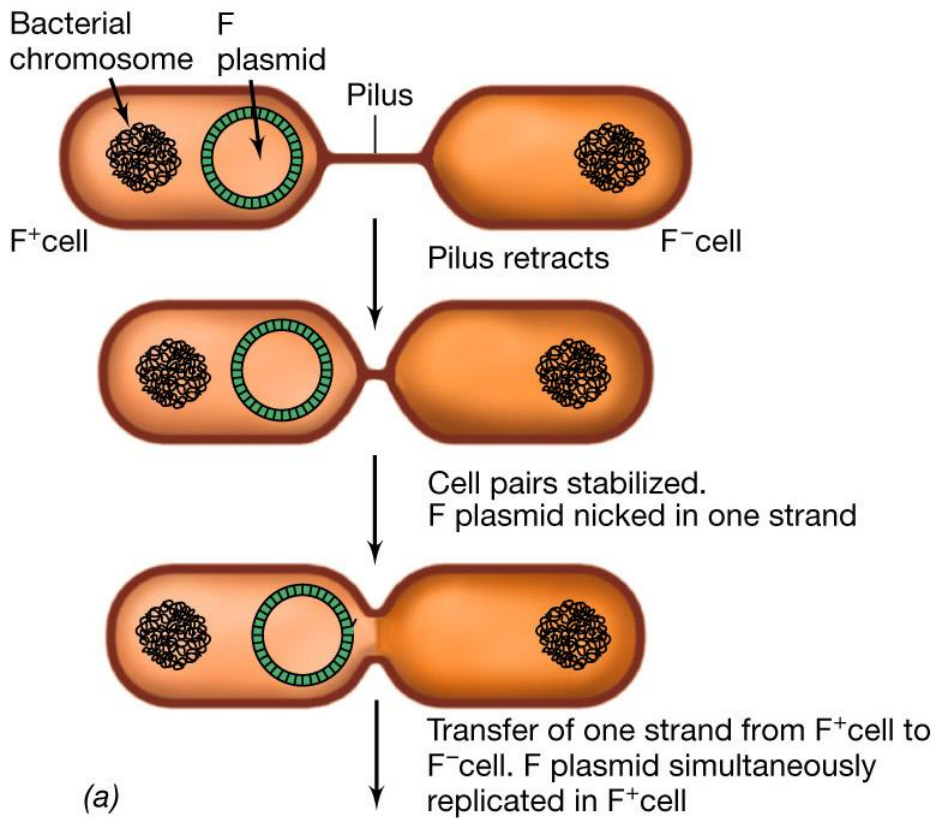


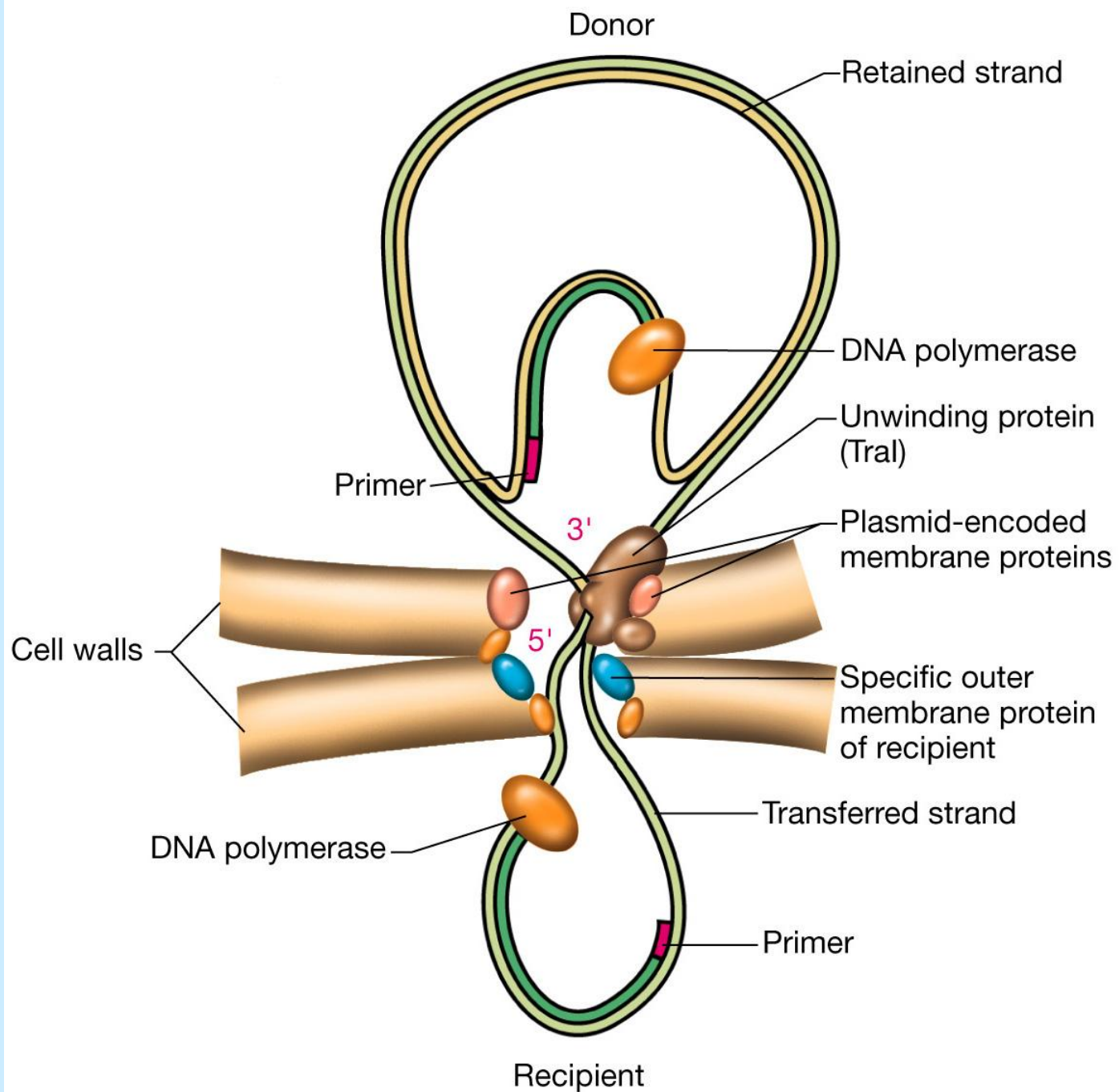
Plasmid

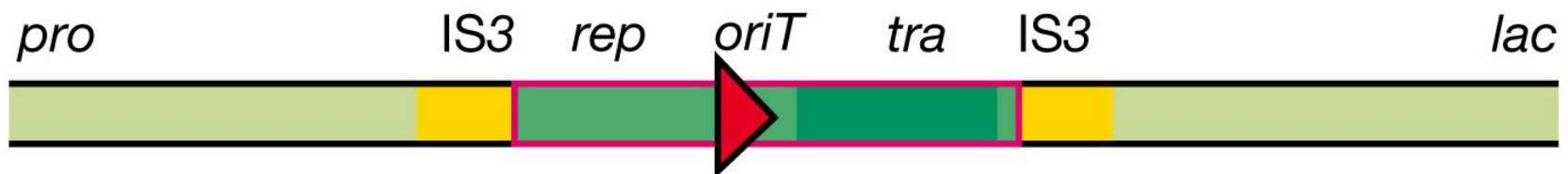
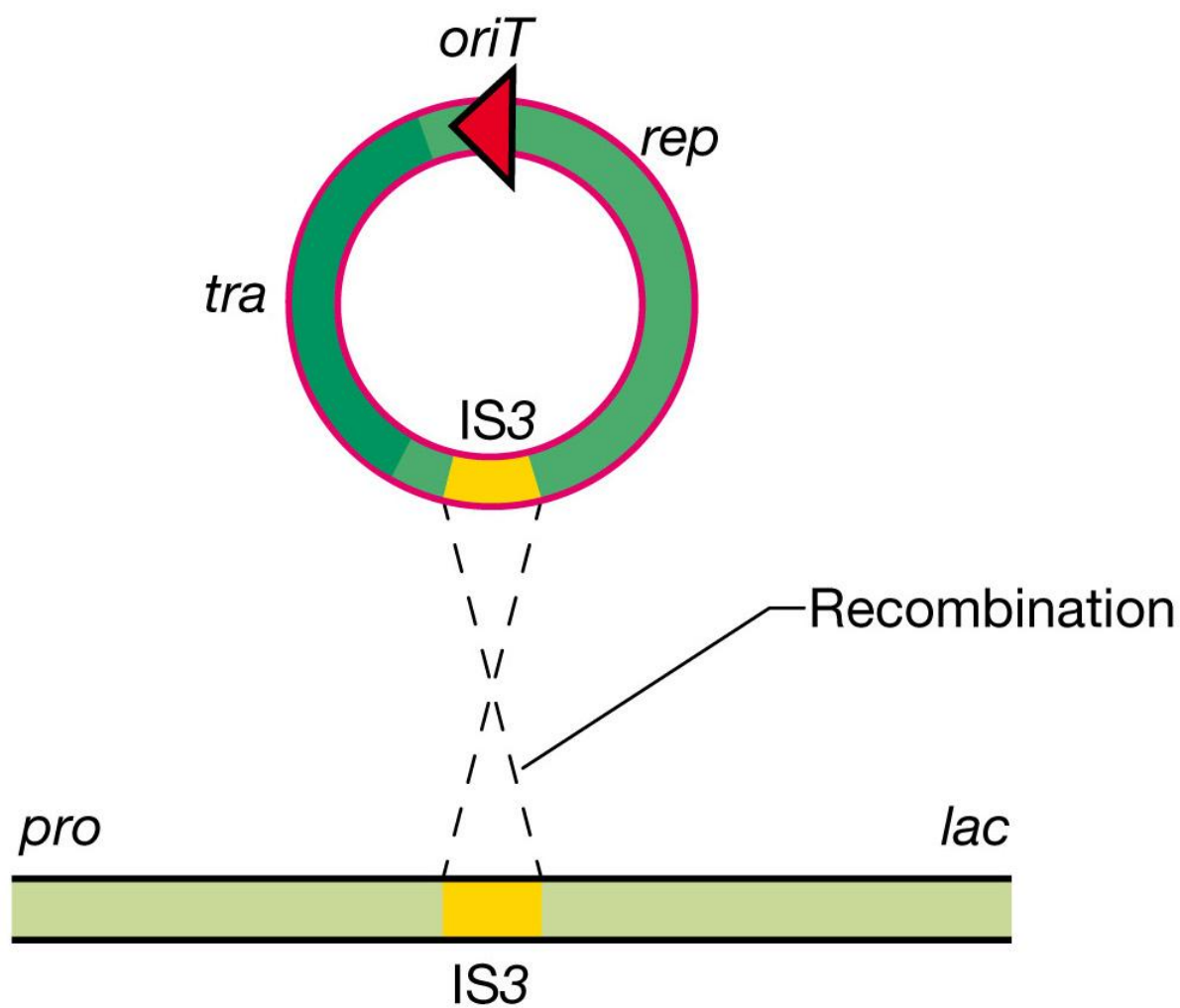
- **Phân tử DNA vòng, kích thước nhỏ có thể tự sao chép độc lập trong tế bào chủ**
- **Cấu trúc của plasmid:**
 - + **Mang trình tự ORI (origin of replication, *Ori*) kiểm soát tần số sao chép và số lượng bản sao của plasmid trong tế bào**
 - + **Gen điều khiển sự chuyển DNA trong giao nạp (một số)**
 - + **Các gen khác: 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**
- **Plasmid R: plasmid kháng thuốc**
 - + **Mang một số transposon mỗi loại cho tính kháng đối với một loại kháng sinh nhất định**
 - + **Kháng đồng thời đến 5 loại kháng sinh khác nhau**
 - + **Phát tán tính kháng thuốc nhanh trong quần thể thông qua quá trình giao nạp**
- **Tế bào có thể chứa đồng thời một số plasmid khác nhau nếu chúng tương thích (ORI khác nhau)**

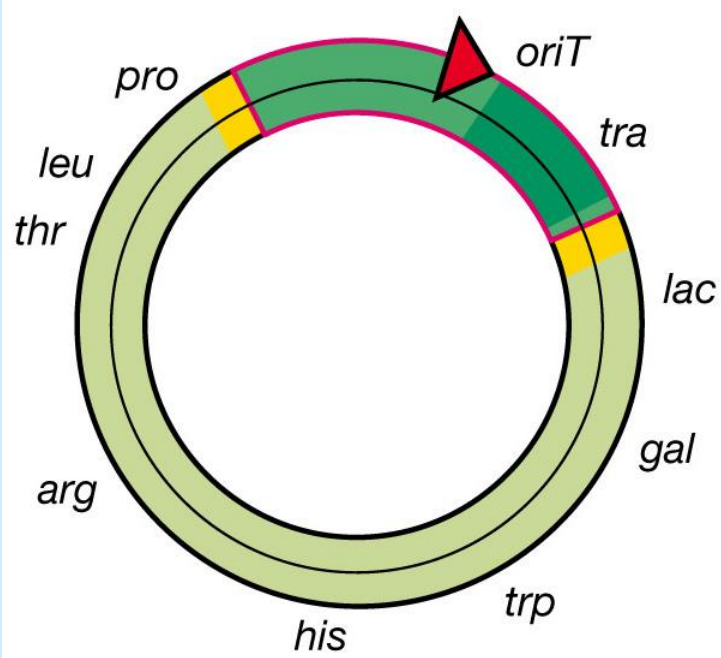
Sự giao nạp (conjugation)

- Chuyển DNA thông qua giao nạp ở vi khuẩn
- Plasmid xúc tiến sự giao nạp:
 - + Tổng hợp khuẩn mao pili giúp hai tế bào tiếp xúc
 - + Tạo cầu giao nạp (conjugative bridge) truyền DNA
 - + Plasmid sao chép bằng cơ chế sao chép cuộn vòng (rolling circle replication) và chuyển một bản sao cho tế bào nhận
 - + Tế bào nhận sao chép để có plasmid vòng mạch kép
- Yếu tố F ở *E. coli* thực hiện việc cho gen trên nhiễm sắc thể tế bào cho sang tế bào nhận (chủng Hfr):
 - + Sự hiện diện đồng thời của trình tự sát nhập (insertion sequence) ở yếu tố F và nhiễm sắc thể của tế bào
 - + F chứa trình tự khởi đầu chuyển (origin of transfer)
 - + Trình tự này giúp F mang theo các gen của nhiễm sắc thể nằm ngay dưới hạ lưu của trình tự chuyển từ tế bào cho sang tế bào nhận
 - + Sự cắt không chính xác khi sao chép và chuyển yếu tố F làm tăng tần số giao nạp chuyên biệt của nhiễm sắc thể sang tế bào nhận

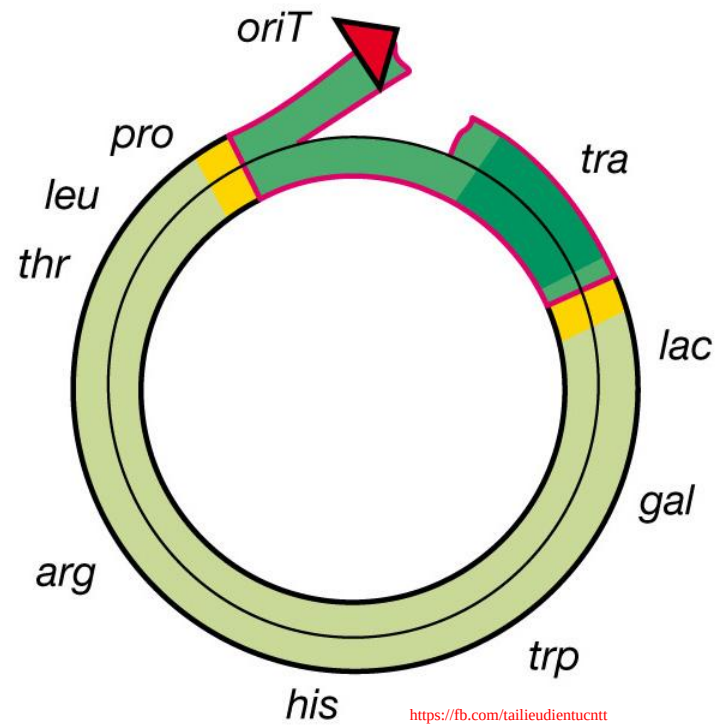






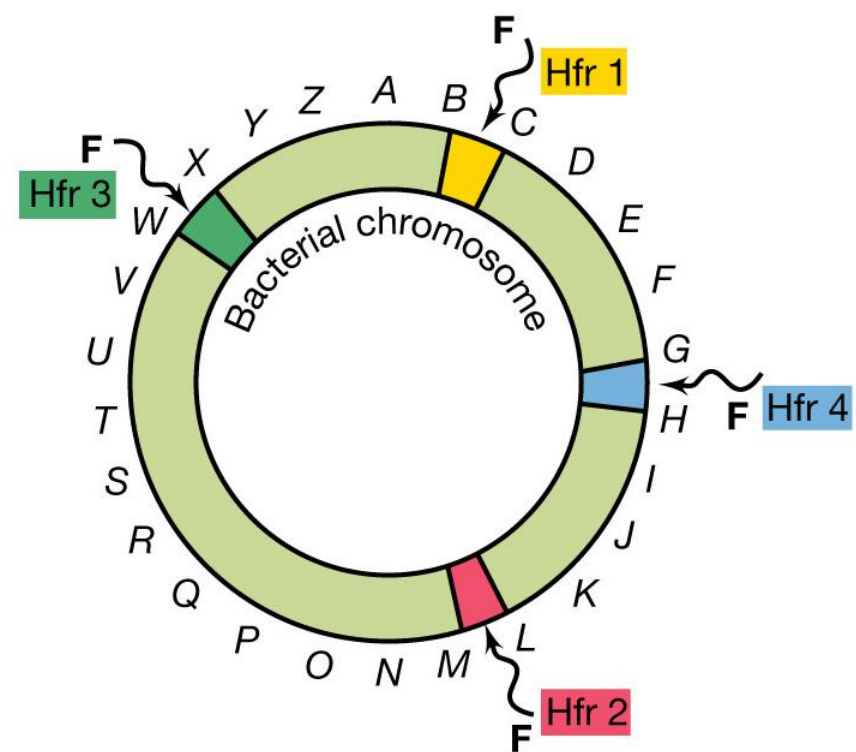


Transfer to F⁻ recipient

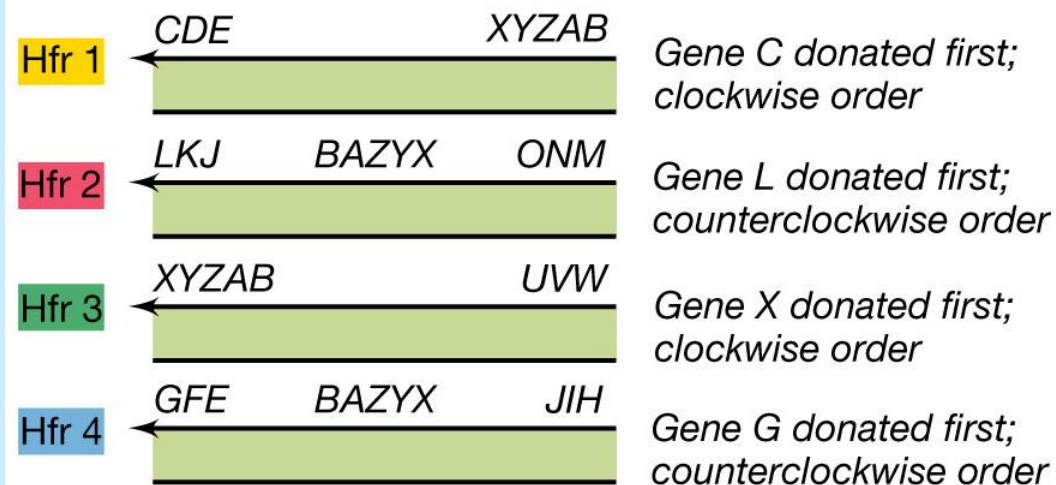


Lập bản đồ gen bằng các phương pháp chuyển gen

- Giao nạp gián đoạn (interrupted mating) được dùng để xác định sơ bộ trật tự của gen từ những đoạn DNA
- Tải nạp gián đoạn được dùng để xác định chính xác trật tự của các gen liên kết chặt chẽ với nhau (nằm rất gần nhau)



(a)

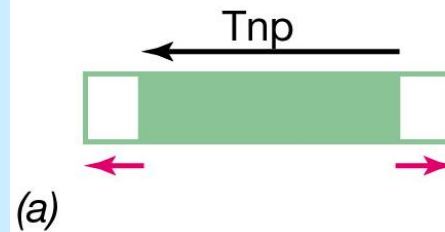


(b)

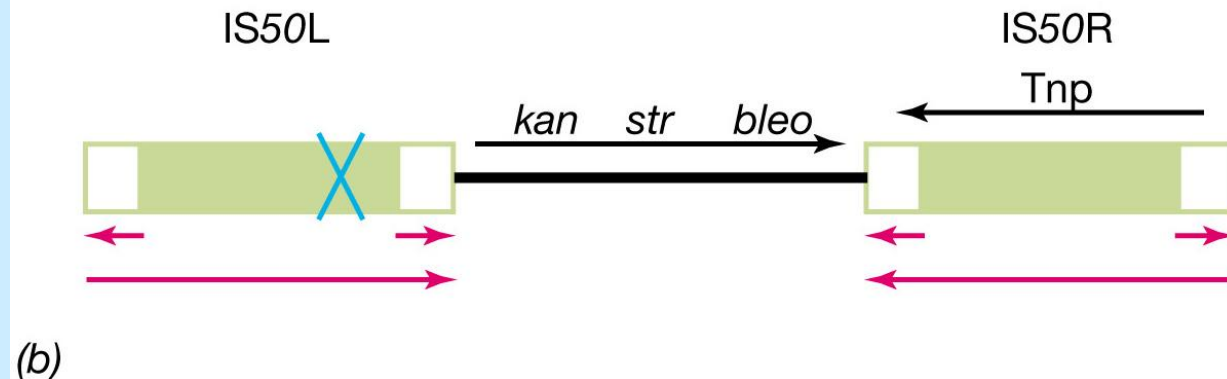
Trình tự sát nhập và gen chuyển vị (transposon)

- Trình tự sát nhập (insertion sequence IS)
- Gen chuyển vị hay gen nhảy (transposon Tn): IS + các gen khác
- Tần số chuyển vị của Tn và IS thấp (khoảng $10^{-5} - 10^{-4}$)
- Cấu trúc:
 - + Hai đầu chứa các trình tự lặp lại (repeated sequence)
 - + Bên trong mã hóa transposase: nhận diện, cắt và nối DNA

IS2

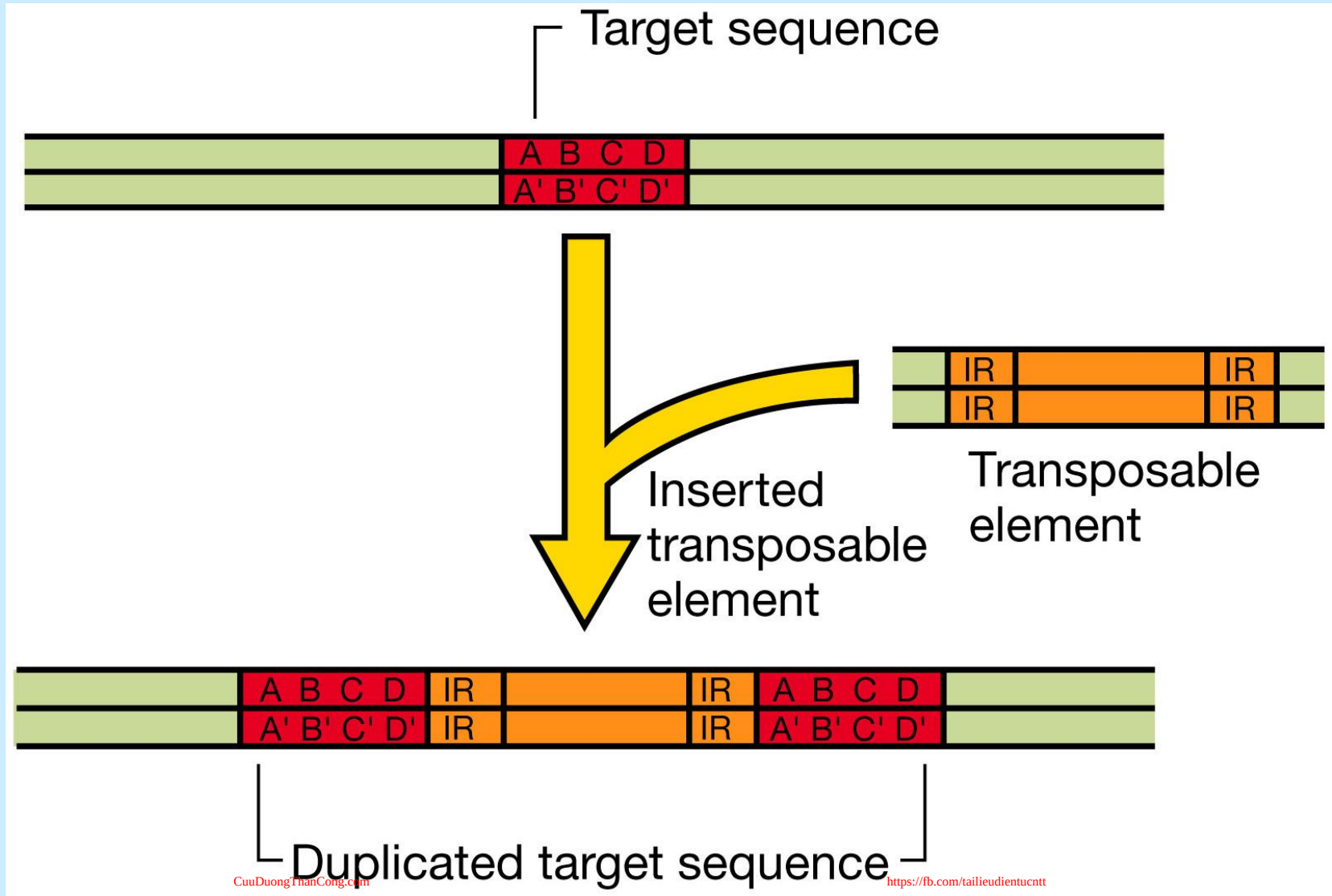


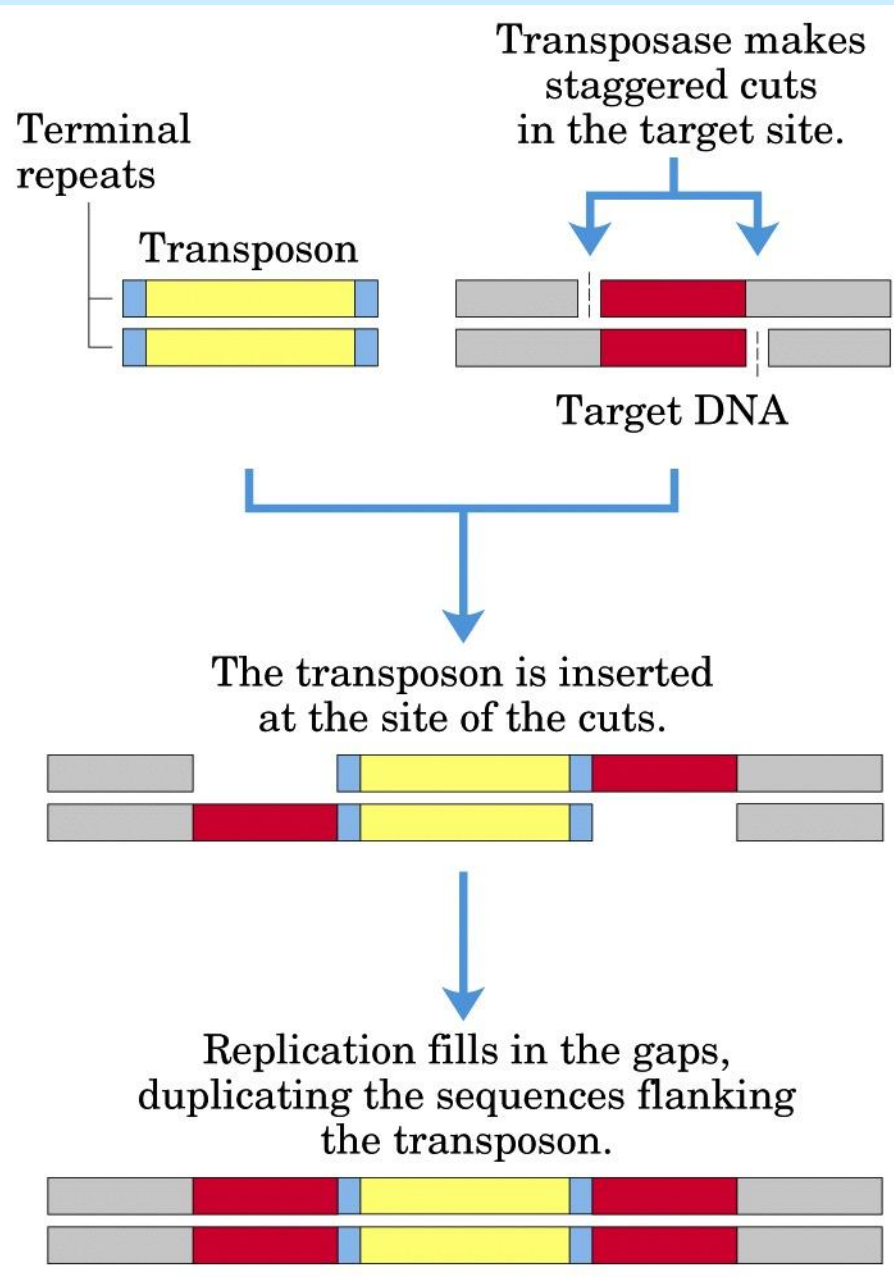
Tn5



Chuyển vị gen

Gen chuyển vị khi gắn vào vị trí mục tiêu sẽ nhân đôi trình tự vị trí mục tiêu này; hai trình tự vị trí mục tiêu sẽ nằm hai bên gen chuyển vị





Phương thức chuyển vị

- Chuyển vị sao chép (replicative transposition)

- + Một bản sao vẫn ở lại ở vị trí cũ và một bản sao khác được chuyển đến vị trí mới

- + Transposase cắt một mạch DNA tại hai đầu chứa trình tự lặp lại

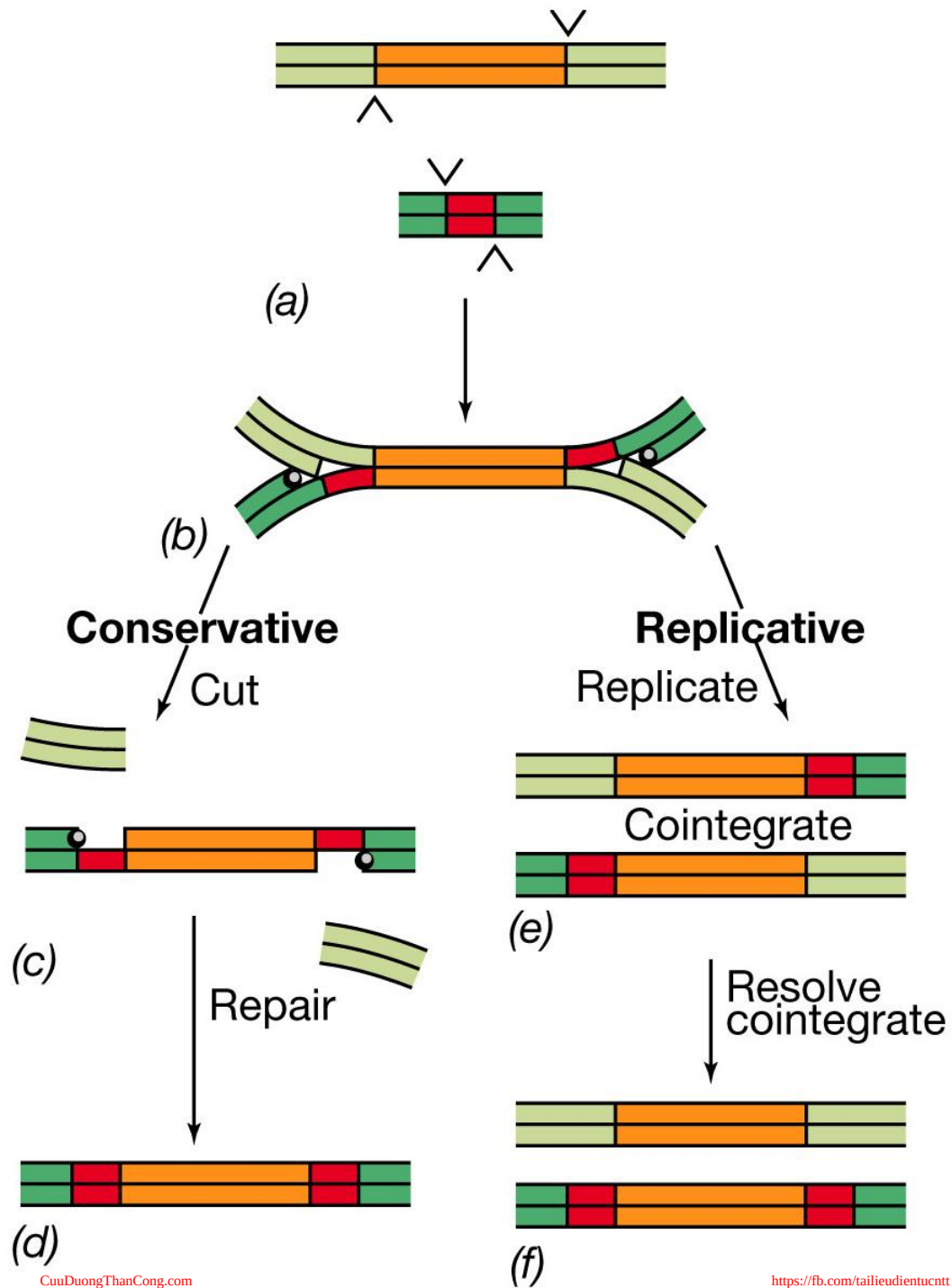
- + Gen chuyển vị được nối với DNA tại vị trí chuyển vị thông qua các đầu mạch đơn sao cho hai mạch đơn của gen chuyển vị tách nhau thành hai bản sao mạch đơn

- + Tạo mạch kép bằng DNA polymerase

- Chuyển vị bảo tồn (conservative transposition):

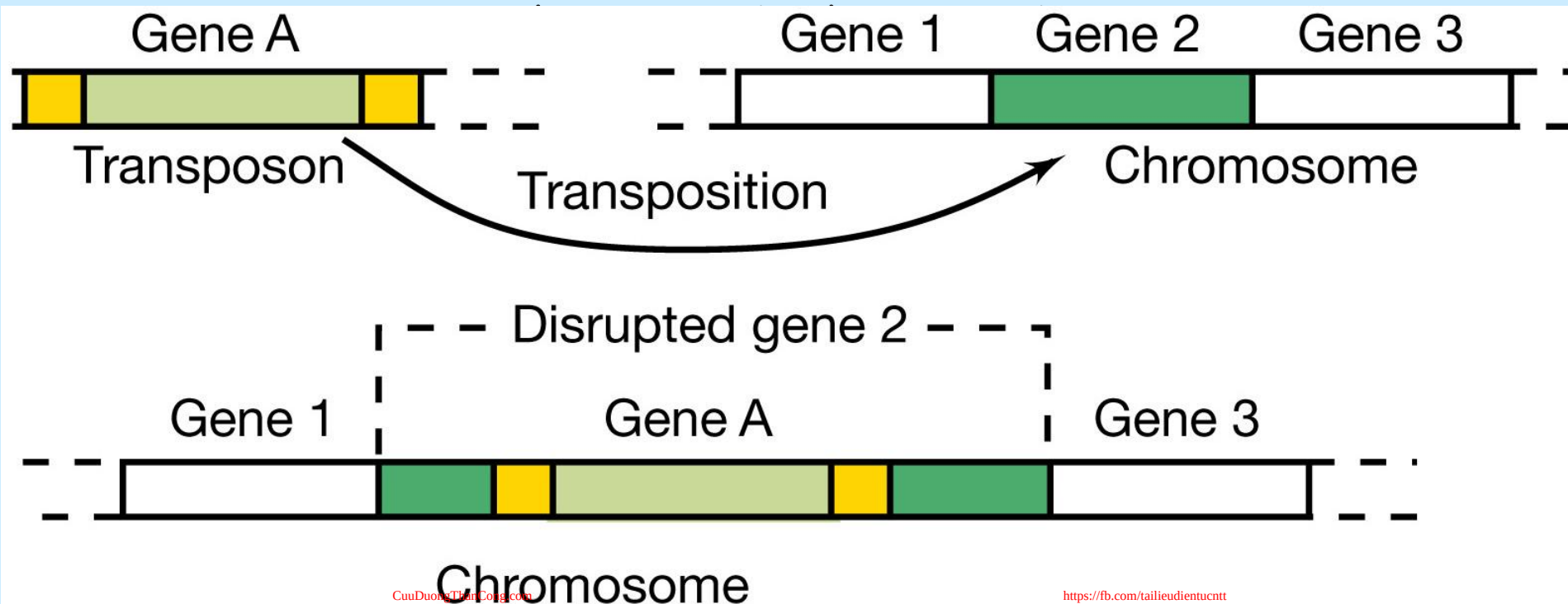
- + Gen chuyển vị bị cắt ra khỏi vị trí và gắn vào vị trí mới, không làm tăng bản sao

- + Cơ chế bất hoạt chèn một gen tạo đột biến khuyết (knock- out mutant)



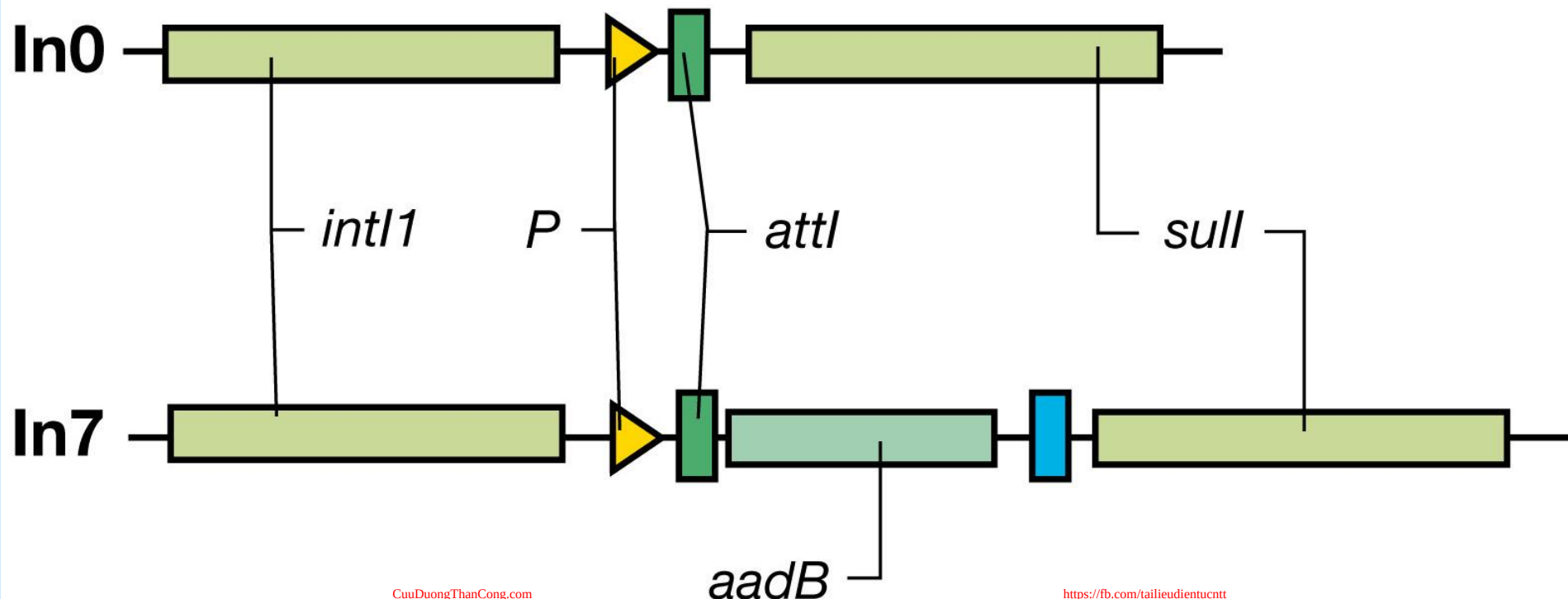
Đột biến do chuyển vị gen (transposon mutagenesis)

- Khi đích chuyển vị là bên trong một gen thì sự chuyển vị sẽ làm gen bị bất hoạt vì mất tính liên tục
- Gen chuyển vị là công cụ chuyển vị tốt khi có mang một gen chọn lọc ví dụ như gen kháng kháng sinh



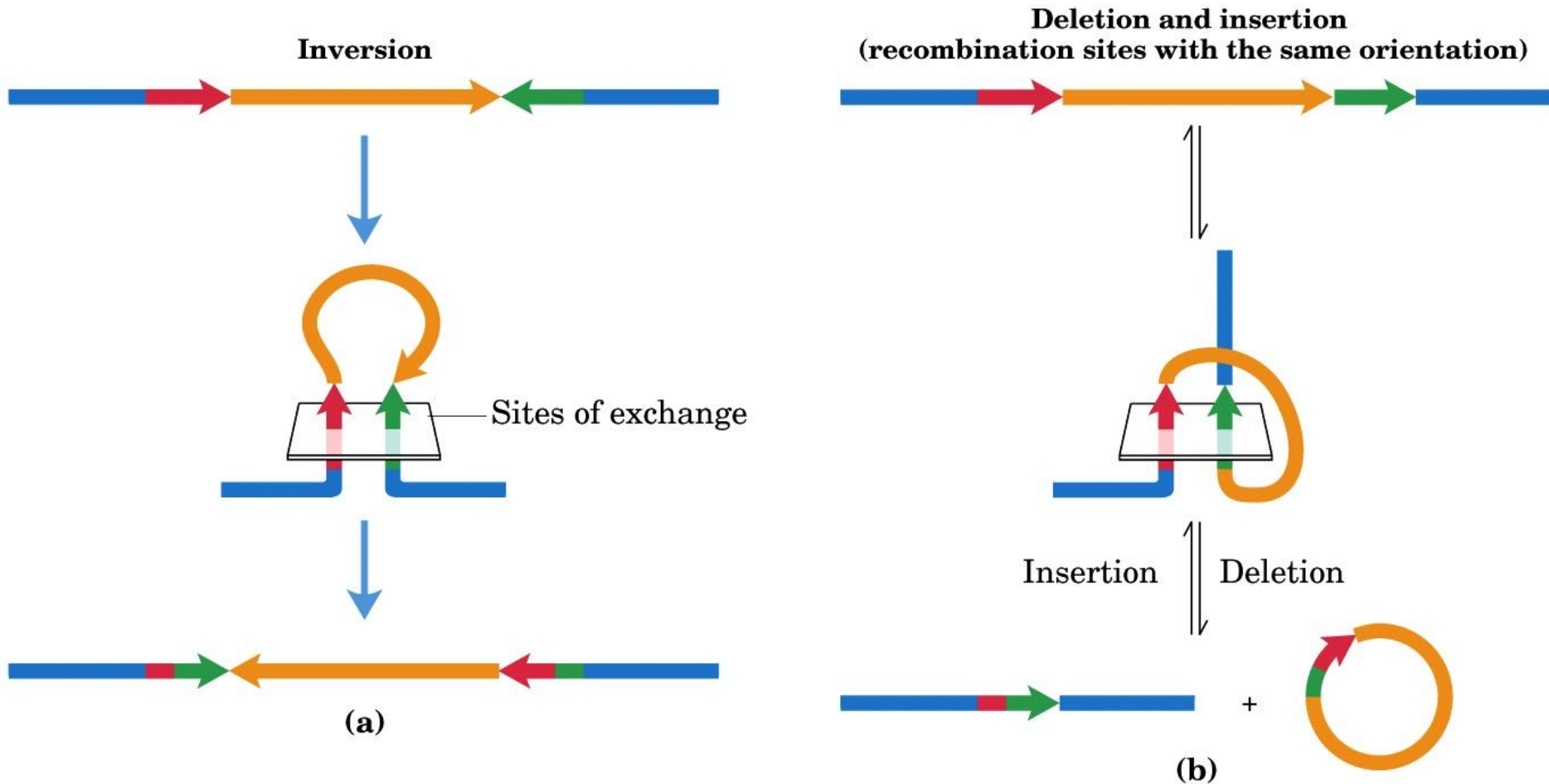
Integron

- Integron: transposon có khả năng tiếp nhận và biểu hiện các gen ngoại lai
- Cấu trúc integron:
 - + Gen mã hóa integrase xúc tác phản ứng tái tổ hợp gen chuyên biệt vị trí (site-specific recombination)
 - + Trình tự nhận diện bởi integrase nằm dưới một promoter
- Integrase nhận diện trình tự chuyên biệt trên gen ngoại lai, cắt và sát nhập đoạn DNA ngoại lai vào integron



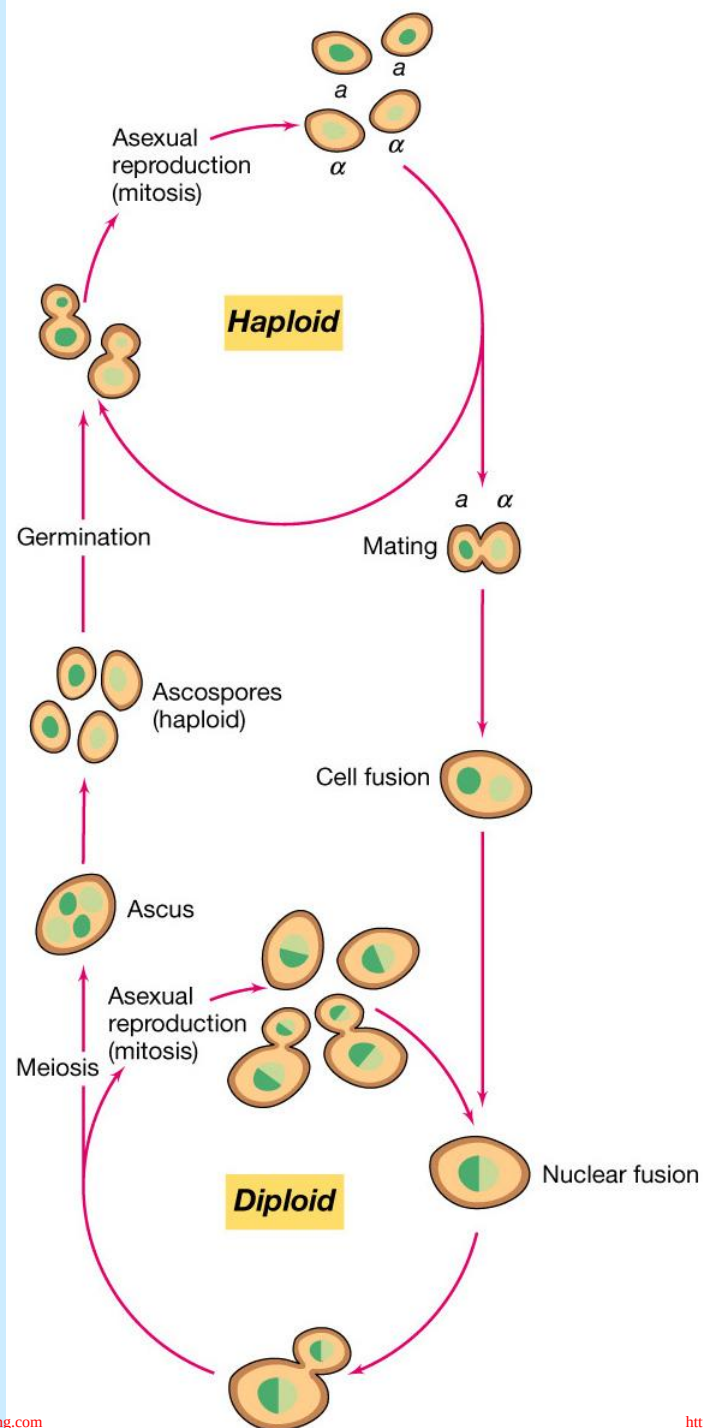
Sự đảo đoạn

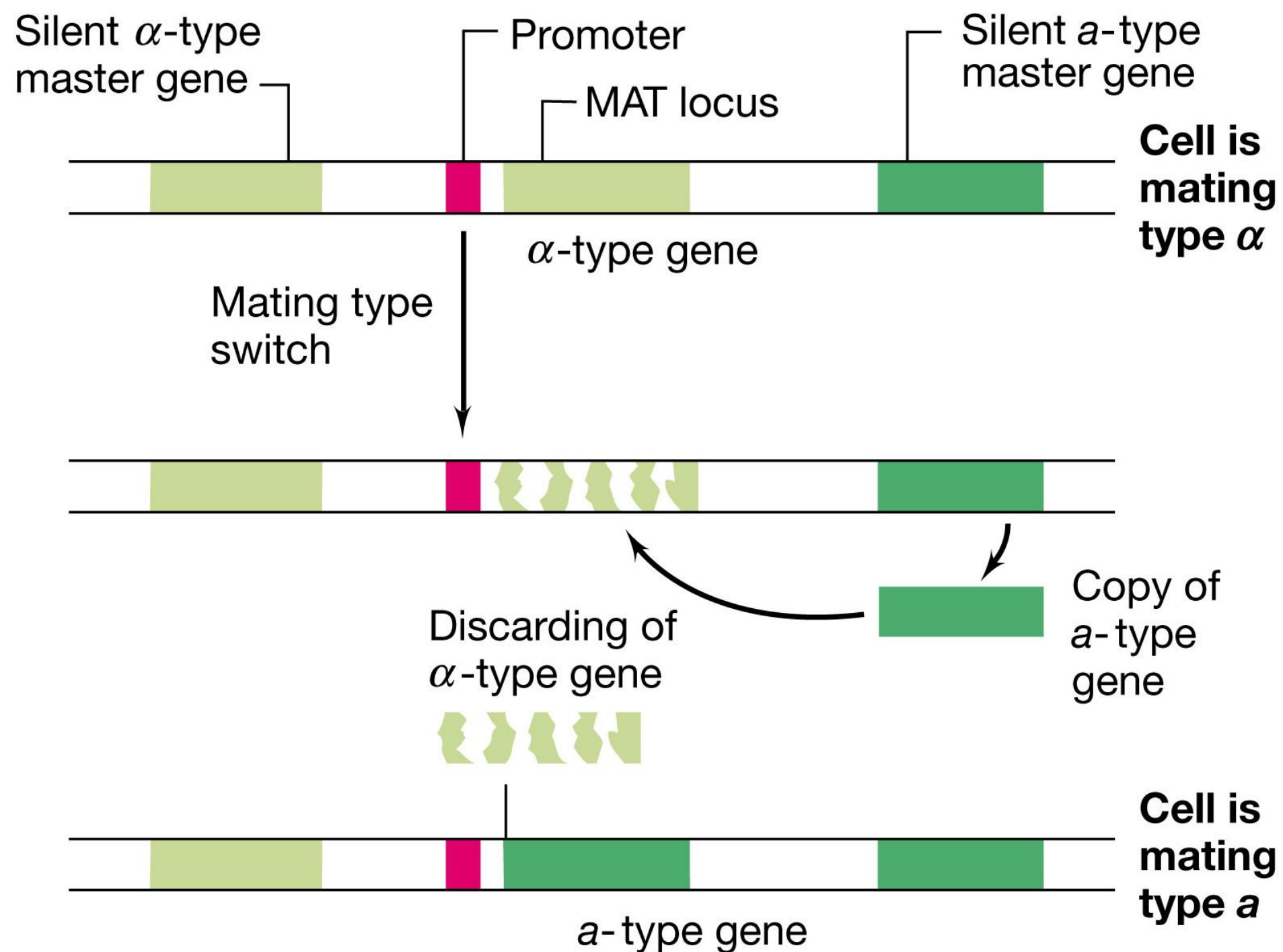
- Đột biến do đảo ngược trình tự DNA trong bộ gen
- Đoạn đảo ngược chứa promoter: biểu hiện một gen hoàn toàn khác



Di truyền học vi sinh vật nhân thật

- Đột biến tái tổ hợp thông qua tái tổ hợp giao tử
- Hình thành giao tử trong giảm phân tạo cơ hội trao đổi giữa hai đoạn tương đồng
- Chu trình sống của nấm men *Saccharomyces cerevisiae*:
 - + Giai đoạn đơn bội
 - + Hợp tử từ tế bào đơn bội khác nhau về kiểu giao phối
 - + Giảm phân tạo tứ nang bào tử đơn bội
- Phân tích tứ bào tử giúp nghiên cứu di truyền nấm men
- Kiểu giao phối (mating type) được qui định bởi cơ chế hộp (cassette mechanism) trong locus MAT:
 - + Gen mã hóa a và α hiện diện đồng thời ở hai vị trí khác nhau trên bộ gen
 - + Thay thế trình tự DNA ở hạ lưu của promoter bởi gen mã hóa a hoặc α quyết định kiểu giao phối của tế bào
 - + Kiểu giao phối phụ thuộc gen nào được sao chép và một bản sao được gắn vào hộp MAT





Di truyền học vi sinh vật nhân thật

- Gen trong ti thể và diệp lục thể:
 - + Bộ gen nhỏ mã hóa cho rRNA và tRNA dùng để sinh tổng hợp protein bên trong bào quan
 - + Được nhân đôi để truyền lại cho các tế bào hậu thế
 - + Được di truyền độc lập với các gen của nhân