

Chương 20.

DI TRUYỀN HỌC

VI SINH VẬT

Biên soạn: Phạm Thành Hồ, Nguyễn Lâm Dũng

20.1. MỞ ĐẦU

Mãi đến những năm 40 của thế kỷ trước, các đối tượng vi sinh vật mới bắt đầu được sử dụng vào nghiên cứu di truyền học. Tuy ra đời chậm, nhưng các phát minh quan trọng có tính cách mạng trong sinh học như *chứng minh trực tiếp ADN là vật chất di truyền, sao chép ADN, sinh tổng hợp protein, kỹ thuật di truyền*,... đều thực hiện trên các đối tượng vi sinh vật. Do vậy, có thể nói **di truyền học vi sinh vật** đã đóng vai trò “**cách mạng hóa**”, tạo ra những bước tiến nhảy vọt cho di truyền học nói riêng, hình thành Sinh học phân tử và sự phát triển Sinh học hiện đại nói chung cả về phương diện lí thuyết cũng như ứng dụng thực tiễn.

Di truyền học của vi sinh vật đã góp phần chủ yếu cho sự phát triển **di truyền học phân tử**, mà đỉnh cao chói lọi là sự ra đời **kỹ thuật tái tổ hợp ADN** hay **kỹ thuật di truyền** (KTDT), làm bùng nổ **Cách mạng Công nghệ sinh học**.

20.1.1. Tính cách mạng của Di truyền học vi sinh vật

Nhân loại đang sống ở cuối thập niên đầu tiên của thế kỉ 21 – *thế kỉ Công nghệ sinh học*. Di truyền học đi sâu vào các vấn đề cơ bản của *sự tồn tại và lưu truyền sự sống* nên nó giữ một vị trí đặc biệt quan trọng, có người ví “*Di truyền học là trái tim của Sinh học*”, vì không ít thì nhiều, nó liên quan và chi phối bất kì lĩnh vực nào của sinh học, từ các cơ chế phân tử của sự sống cho đến sự tiến hóa của toàn bộ thế giới sinh vật trên hành tinh của chúng ta.

Những phát minh lớn với số lượng tăng vọt của di truyền học đã có tác dụng *cách mạng hóa sinh học*, biến sinh học từ mô tả thành thực nghiệm

chính xác. Hội nghị Di truyền học thế giới ở Toronto (Canada) năm 1988 đã nêu phương châm "*Di truyền học hóa*" Sinh học.

Suốt thế kỉ XX, các nghiên cứu tập trung giải quyết vấn đề gen dẫn đến *Thời đại gen, Cách mạng di truyền*, mà đỉnh cao là việc hoàn tất *Bộ gen người* vào năm 2003 và mở ra *Thời đại sau Bộ gen* (Post-Genomeics Era).

Các đối tượng vi sinh vật đã góp phần chủ yếu vào *các phát minh nền tảng* không những của di truyền học phân tử, mà của sinh học phân tử và sinh học hiện đại nói chung. Điềm qua lịch sử các phát minh của sinh học phân tử sẽ thấy rõ vai trò cách mạng hóa của các đối tượng này.

20.1.1.1. Giả thiết một gen – một enzym

Vào năm 1941, G. Beadle và E. Tatum tiến hành thí nghiệm trên vi nấm *Neurospora crassa*. Công trình chứng minh mối liên hệ giữa gen và tính trạng thông qua việc kiểm soát các enzym – protein và qua đó *kiểm soát các phản ứng sinh hóa* trong tế bào. Giả thuyết này mở ra một trang mới về mối quan hệ chức năng giữa gen và enzym trong con đường trao đổi chất của cơ thể. Phát minh này có ý nghĩa quan trọng: đó là bước chuyển tiếp từ di truyền học cổ điển sang di truyền phân tử. Chính vì vậy, hai ông đã được nhận giải thưởng Nobel vào năm 1958.

20.1.1.2. Các chứng minh trực tiếp rằng ADN là vật chất di truyền

Ngay sau khi các định luật của Mendel được phát hiện lại vào năm 1900, di truyền học đã phát triển rất nhanh với thuyết di truyền NST và nhiều thành tựu khác như gây đột biến nhân tạo... Tuy nhiên cho đến 1940, vẫn chưa có một bước tiến triển nào trong hiểu biết *bản chất hoá học của vật liệu di truyền* và chưa hiểu được bằng cách nào *gen trên nhiễm sắc thể biểu hiện ra tính trạng*. Trong một thời gian dài, mặc dù có *nhiều số liệu gián tiếp cho thấy ADN là vật chất di truyền*, nhưng *protein* vẫn được coi là thành phần chủ yếu của vật liệu di truyền vì nó có cấu trúc phân tử khá phức tạp. Do vậy, các *chứng minh trực tiếp* trên các Vi sinh vật có ý nghĩa quyết định trong *xác nhận vai trò của ADN*.

a. Biến nạp: truyền thông tin di truyền nhờ ADN.

Năm 1928, Griffith phát hiện hiện tượng *biến nạp* (transformation) ở vi khuẩn *Diplococcus pneumoniae* (nay gọi là *Streptococcus pneumoniae*). Năm

1944, T.Avery, McLeod và McCarty đã xác định rõ *tác nhân gây biến nạp* là ADN. Hiện tượng biến nạp là bằng chứng trực tiếp đầu tiên xác nhận rằng *ADN mang thông tin di truyền*.

b. Sự xâm nhập của ADN virus vào vi khuẩn.

Năm 1952, A.Hershey và M.Chase đã tiến hành thí nghiệm với *bacteriophage T₂* (virus của vi khuẩn hay gọi tắt là **phage**) xâm nhập vi khuẩn *E. coli*, chứng minh trực tiếp rằng ADN của phage T₂ đã xâm nhập vào tế bào vi khuẩn và sinh sản tạo ra thế hệ phage mới mang tính di truyền có khả năng tiếp tục lây nhiễm các vi khuẩn khác. Kết luận: *Vật chất di truyền của phage T₂ là ADN*.

Năm 1952 đã diễn ra nhiều cuộc tranh luận sôi nổi về vai trò của *ADN*: *là vật chất di truyền*. Sau đó, năm 1953 mô hình Watson và Crick đã đặt dấu chấm kết cho giai đoạn nghi ngờ rằng ADN có là vật liệu di truyền hay không.

Các chứng minh trực tiếp nêu trên là *những tiền đề quan trọng* cho phát minh ra *mô hình cấu trúc chuỗi xoắn kép ADN của Watson và Crick*. Nó đã tạo nên bước phát triển mới cho sinh học dẫn đến sự hình thành sinh học phân tử hiện đại.

20.1.1.3. Chi tiết hóa “học thuyết trung tâm, của sinh học phân tử: ADN →ARN →Protein

a. Sao chép ADN

- Trong năm 1955, A. Kornberg và đồng sự đã phân lập *ADN polymerase I* từ vi khuẩn *E. coli*. Sau khi cho enzym này vào ống nghiệm muối chứa ADN và 4 loại nucleotit triphosphat, hỗn hợp này có thể *tổng hợp mạch ADN mới*.
- Năm 1958, trên đối tượng *E. coli*, M.Meselson và F. Stahl đã chứng minh *ADN sao chép theo cơ chế “bán bảo tồn”*: mỗi mạch bố mẹ sẽ làm khuôn cho sự tổng hợp mạch ADN mới.

Cho đến nay, toàn bộ chi tiết về sao chép ADN đều được thực hiện trên *E. coli*.

b. Các quá trình phiên mã, dịch mã và điều hòa sinh tổng hợp protein

Trên đối tượng *E. coli*:

– Năm 1961: S. Brenner, Fr. Jacob và M. Meselson đã *khám phá mARN* là phân tử mang thông tin di truyền của ADN từ nhân đến bộ máy sản xuất protein nằm trong tế bào chất. Điều này bác bỏ giả thuyết của Fr. Crick nêu ra năm 1958 cho rằng ARN của riboxom là phân tử trung gian mang thông tin di truyền từ nhân sang tế bào chất.

– 1961 – 1966: *Mã di truyền* được khám phá. (Giải Nobel)

– Ngoài 2 phát minh trên, toàn bộ các quá trình *phiên mã, dịch mã, cấu trúc của riboxom* đều thực hiện trước tiên trên *E. coli*.

– 1962: Phát hiện cơ chế *điều hòa sinh tổng hợp protein* ở Operon lactoz. (Giải Nobel)

– 1970: Phát hiện enzym *Reverse transcriptaz*. (Giải Nobel)

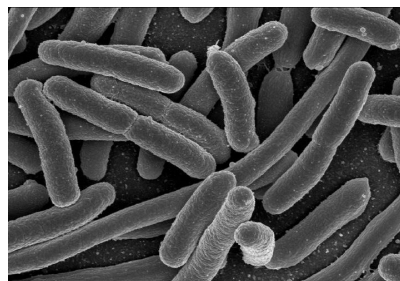
20.1.1.4. Những đóng góp cụ thể của các đối tượng làm mô hình chủ yếu

Việc tìm hiểu những đóng góp cụ thể của các đối tượng làm mô hình chủ yếu sẽ giúp hiểu rõ một cách hệ thống và cụ thể hơn về vai trò “*cách mạng trong cách mạng*” của di truyền Vi sinh vật.

a. Vi khuẩn Escherichia coli (E. coli)

– Các đóng góp chủ yếu: Đối tượng chủ yếu được dùng cho các nghiên cứu:

- ❖ Sao chép, phiên mã, dịch mã và tái tổ hợp.
- ❖ Đột biến.
- ❖ Điều hòa biểu hiện gen (Gen regulation).
- ❖ Kỹ thuật ADN tái tổ hợp (recombinant ADN technology).



– Đóng góp cho nghiên cứu các lĩnh vực khác: Trao đổi chất của tế bào (Cell metabolism),

gen ức chế vô nghĩa (Nonsense suppressors), sự tuyến tính (Colinearity) giữa

gen và polypeptit, các Operon, sự kháng thuốc dựa vào plasmid (Plasmid-bazod drug resistance) và sự vận chuyển tích cực (Active transport).

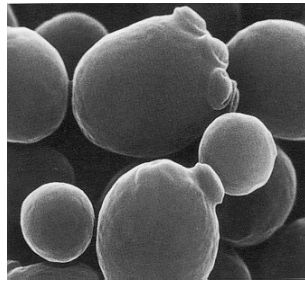
b. Nấm men Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae)

– Vai trò chủ yếu cho các nghiên cứu:

❖ Chu trình tế bào (Cell cycle): Sự xác định các gen kiểm soát phân bào nhờ các đột biến nhạy cảm nhiệt (temperature-sensible mutants (*cdc* mutants)) dẫn đến mô hình rất tốt cho nghiên cứu sự phân bào.

❖ Tương tác gen (Gen interaction): nghiên cứu sự ức chế gen (suppression). Hệ thống plasmid lai kép (two-hybrid plasmid system) giúp tìm các tương tác giữa các protein ở nấm men đã dẫn đến các bản đồ tương tác phức tạp, mà là khởi đầu cho sinh học các hệ thống (systems biology).

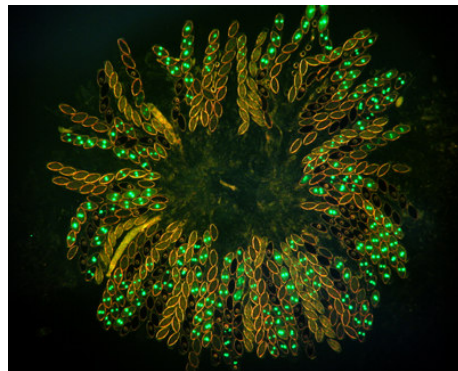
❖ Di truyền học ty thể: nhờ các đột biến “petite” mất khả năng hô hấp mà phát hiện các gen của ty thể. Nhờ chúng và các đột biến khác của ty thể



mà phân tích chi tiết cấu trúc và chức năng bộ gen ty thể.

❖ Di truyền học kiểu bắt cặp (Genetics of mating typ): Các alen *MAT* ở nấm men là các gen kiểu bắt cặp đầu tiên được xác định các đặc tính ở mức phân tử.

– Những đóng góp khác: Di truyền của khóa đóng mở (switching) giữa sự tăng trưởng kiểu nấm men (yeast-like) và sợi (filamentous); di truyền học sự thoái hóa (senescence).



c. Nấm sợi *Neurospora crassa*:

– Các đóng góp chủ yếu:

- ❖ Di truyền sinh hóa và trao đổi chất.
- ❖ Di truyền học của giảm phân.
- ❖ Di truyền ty thể.

– Các đóng góp khác: sự đa dạng các loài nấm

và thích nghi (adaptation), di truyền tế bào (cytogenetics), các gen kiểu bất cặp, các gen dung hợp thể dị nhân (heterokaryon-compatibility gens).

20.1.1.5. Kỹ thuật di truyền và sự mở đầu cách mạng Công nghệ sinh học

a. Enzym giới hạn (restriction endonucleaz): Năm 1962, W.Arber lần đầu tiên chứng minh rằng có những enzym đặc biệt hạn chế (restriction) sinh sản của phage trong tế bào *E. coli*. Năm 1968: Enzym cắt giới hạn đầu tiên được khám phá: *EcoR* I. Đến năm 1970, Hamilton Smith và cộng sự đã tách được một loại enzym cắt giới hạn mới từ vi khuẩn *Haemophilus influenzae*, gọi là *Hind* II.



Hamilton Smith, Nobel 1978 cùng D.Nathans và W.Arber

Enzym này là công cụ đầu tiên trong kỹ thuật di truyền. (Giải Nobel)



Paul Berg, Nobel 1980 cùng Dita Danil Montalini

b. Kỹ thuật ADN tái tổ hợp: Năm 1972, nhóm của Paul Berg tạo nên phân tử ADN tái tổ hợp *in vitro* đầu tiên từ ba nguồn khác nhau: nguyên bộ gen virus SV 40 gây ung thư ở khỉ, một phần bộ gen của phage và các gen của operon lactoz của *E. coli*. Năm 1973, nhóm Cohen, Helenski, Boyer đã

lần đầu tiên thu nhận được các *sản phẩm có hoạt tính từ ADN tái tổ hợp ở E. coli* (Giải Nobel)

c. *Sản xuất protein tái tổ hợp*: Năm 1977 được xem là năm mở màn cho kỷ nguyên của công nghệ sinh học khi lần đầu tiên *hormon tăng trưởng ở người xomatostatin* được sản xuất thành công bằng con đường tái tổ hợp gen vào vi khuẩn *E. coli*. Năm 1978, đã sản xuất *insulin người* lần đầu tiên nhờ công nghệ gen.

d. *Genomeics*: Sự xác định chính xác trình tự (sequencing) từng nucleotit của ADN hay gọi ngắn là giải trình tự chuỗi (sequencing) thành công ở các vi sinh vật và bộ gen người đã tạo nên khoa học về bộ gen gọi là *genomeics* (genome - bộ gen) hay *bộ gen học*. *Genomeics* giúp xác định nhanh chóng trình tự nucleotit của ADN bộ gen và các chức năng của chúng.



Vi khuẩn *Haemophilus influenza*

Những sinh vật đầu tiên được hoàn tất giải trình tự chuỗi đầu tiên cũng là các Vi sinh vật.

– 1995: Hai vi khuẩn, cũng là hai *sinh vật có cấu tạo tế bào đầu tiên* được hoàn tất giải trình tự chuỗi (sequencing) bộ gen là *Haemophilus influenza* và *Mycoplasma genitalium*.

– Tháng 5/1996, nấm men *Saccharomyces cerevisiae*, sinh vật Nhân thực Eukaryota đầu tiên được giải trình tự chuỗi hoàn tất.

– Tháng 9/1997: đăng tải trình tự bộ gen hoàn chỉnh của *E. coli*.

Toàn bộ việc giải trình tự chuỗi ADN ở tất cả các sinh vật, kể cả bộ gen người đều sử dụng các công cụ từ các đối tượng Vi sinh vật như enzyme cắt giới hạn, vector plasmid tạo dòng, NST nhân tạo của nấm men (YAC) và vi khuẩn (BAC).

20.1.1.6. Sự hấp dẫn đối với các nhà vật lý và hóa học

Di truyền học hiện đại đã hình thành những phương pháp phân tích di truyền (methodes of genetic analysis) cho phép phát hiện các quá trình sinh học của tính di truyền và biến dị đến cấp độ phân tử và nguyên tử, tức những phạm trù nghiên cứu chủ yếu của vật lý và hóa học. Các vi sinh vật như vi nấm, vi khuẩn và phage đã đóng vai trò quyết định trong vấn đề này. Dĩ

nhiên, sự nhận thức các quá trình di truyền ở cấp độ phân tử chỉ trở thành hiện thực sau phát minh chuỗi xoắn kép ADN. Nhiều người cho rằng vai trò hàng đầu trong sự hình thành di truyền học phân tử là việc sử dụng rộng rãi các phương pháp vật lý và hóa học. Vật lý và hóa học đã và đang đóng vai trò quyết định trong các nghiên cứu những cơ chế phức tạp và mối quan hệ của bộ gen với các quá trình sinh tổng hợp trong tế bào. Tuy nhiên ý nghĩa căn bản của các quan niệm di truyền phân tử là sự tăng vọt *năng lực phân giải di truyền* (genetic resolving power) nhờ việc sử dụng *các vi sinh vật*. Vì thế có thể nói rằng sự phát triển các quan niệm di truyền phân tử trở thành hiện thực nhờ di truyền học vi sinh vật.

Đánh giá vai trò của các nhà vật lý học trong sự phát triển của *di truyền học phân tử*, có thể phân họ thành 2 nhóm. Một nhóm tham gia trực tiếp vào các thí nghiệm di truyền vi khuẩn và bacteriophage (Delbruck, Benzer, Fris, Levental,...) và họ đã thực hiện những công trình rất thú vị, tuy nhiên họ không tạo ra phương pháp nào mới trong phân tích di truyền (genetic analysis). Sự tham gia của họ vào di truyền học rất có lợi nhờ nguồn sáng tạo của tư duy vật lý. Nhóm các nhà vật lý khác tham gia vào di truyền học bằng các “suy diễn trí tuệ” và ít có đóng góp cho di truyền học phân tử.

Trên thực tế, mầm mống của di truyền học phân tử đã chứa đựng ngay trong học thuyết về gen của Mendel, trong các nguyên lý di truyền nhiễm sắc thể của Morgan.

Trong những năm 1940, một giai đoạn mới của di truyền học bắt đầu. Vào thời điểm này có một nhóm các nhà khoa học quan tâm đến *bản chất của gen*. Phần lớn họ là các nhà vật lý học, họ khác các nhà di truyền học cổ điển cả về tư duy lẫn định hướng. Đa số các “tân binh,, này rất ít biết về những thành tựu di truyền học trong vài thập niên trước đó, thậm chí cả sinh học nói chung. Sự quan tâm của họ đến sinh học chỉ giới hạn chủ yếu vào vấn đề *thông tin di truyền có cơ sở vật lý như thế nào?*

Việc các nhà vật lý học tham gia giải quyết các vấn đề sinh học thì không phải điều lạ, vì ngay Mendel xuất thân cũng là một nhà vật lý học. Tuy nhiên sự cuốn hút các nhà vật lý học đến với di truyền học vào những năm 1940 còn có nguyên nhân đặc biệt. Đúng vào thời điểm này, khi mà giới khoa học ngừng phổ biến ‘*sinh lực luận*’, thì nhà vật lý học nổi tiếng Niels Bohr,

được giải Nobel về *thuyết cơ lượng tử* (Quantic Mechanics), nêu ra quan điểm rằng *một số quá trình sinh học có thể không giải thích trọn vẹn bằng các khái niệm vật lý cổ điển*. Sau khi xây dựng *thuyết cơ lượng tử*, Bohr phát triển các khái niệm tổng quát hơn. Năm 1932, tại hội nghị quốc tế về quang học, Bohr đã phát biểu rằng: “Sự công nhận tầm quan trọng rất lớn của các nguyên tử căn bản trong các chức năng của các sinh vật tự nó không đủ để giải thích một cách toàn diện các hiện tượng sinh học. Vấn đề là ở chỗ làm thế nào khi phân tích các hiện tượng tự nhiên không bỏ sót một số đặc điểm rất quan trọng để hiểu về sự sống trên cơ sở thí nghiệm vật lý”.

Năm 1935, Max Delbrück, học trò của Bohr, trong bài báo “*Về bản chất các đột biến gen và cấu trúc gen*” đã giải thích rằng, chính *Di truyền học* là lĩnh vực sinh học, mà trong đó những giải thích từ các quan điểm vật lý và hóa học dường như “không đủ” theo quan niệm mà Bohr nêu ra. Ông chỉ ra rằng “nếu như trong vật lý các số đo, về căn bản, dẫn đến đo không gian và thời gian, còn khái niệm căn bản của di truyền học - sự khác nhau trong tính trạng - chẳng lẽ có thể biểu thị trong những đơn vị tuyệt đối”. Theo Delbrück, *di truyền học có tính độc lập và gen là phân tử có tính ổn định cao trong một thời gian dài không phụ thuộc tác động của môi trường*.

Năm 1945, ngay sau thế chiến thứ II, quyển sách nhỏ “*Thế nào là sự sống ?*” (*What is the life ?*) đã được xuất bản. Tác giả của cuốn sách là E. Schrödinger, một trong những nhà vật lý học nổi tiếng xây dựng *thuyết cơ học lượng tử*. Quyển sách đã thu hút được sự chú ý của công chúng, đặc biệt là các nhà vật lý học, vì trong đó Schrödinger cổ vũ cho nghiên cứu sinh học tìm các quy luật vật lý mới.

Bắt đầu quyển sách, Schrödinger cho rằng “việc vật lý và hóa học hiện đại chưa có khả năng giải thích các quá trình sống không có nghĩa là không thể giải thích nhờ các khoa học này”. Ông cho rằng chính tính di truyền là chủ đề cần được giải thích. Điều làm cho Schrödinger ngạc nhiên là làm thế nào các gen nhỏ bé có thể kháng lại những dao động của môi trường diễn ra liên tục mà như hình dạng môi của dòng họ Gabsburg được truyền qua nhiều thế kỷ. Ông cho rằng *nhhiễm sắc thể* là một *tinh thể á chu kỳ* (aperiodic crystal), trên đó có sự sắp xếp các *mã di truyền* (gnetic code) theo một thứ tự

chính xác. Schrödinger cho rằng trong chất sống có “những quy luật vật lý chưa biết đến”.

Các quan điểm của Bohr và Schrödinger đã cổ vũ nhiều nhà vật lý học chuyển sang nghiên cứu di truyền học với *hoài bão lãng mạn là tìm ra các quy luật vật lý mới trong bản chất cấu trúc gen*. Đến năm 1965, kỷ niệm 100 năm công trình của Mendel, bản chất của gen đã được sáng tỏ, nhưng không tìm ra quy luật vật lý mới, ngoài chuyện đứt và nối các liên kết hydro.

Tuy nhiên, có thể nói di truyền học được tiếp thêm một nguồn sinh lực mới đó là các nhà vật lý, hóa học với ***các công cụ và tư duy chính xác*** thực hiện thí nghiệm trên những đối tượng Vi sinh vật có nhiều ưu thế. Họ bắt đầu các nghiên cứu từ những *sinh vật đơn giản nhất* đó là các *phage*, *vi khuẩn* - là các sinh vật nhân sơ. M. Delbruck, một nhà vật lý học đã chuyển hoàn toàn sang nghiên cứu sinh học, đã phát biểu rằng lĩnh vực *nghiên cứu virus của vi khuẩn là sân chơi tuyệt vời*, nơi mà nhiều câu hỏi sâu xa có thể nảy sinh. Thêm vào đó hóa học trên đà phát triển của mình đã cung cấp nhiều *phương pháp tinh vi* mới để xác định đánh giá các kết quả thí nghiệm.

20.2. ƯU THẾ CỦA CÁC ĐỐI TƯỢNG VI SINH VẬT

Trong nghiên cứu di truyền học, các đối tượng vi sinh vật có nhiều ưu thế hơn hẳn các động vật thực vật bậc cao.

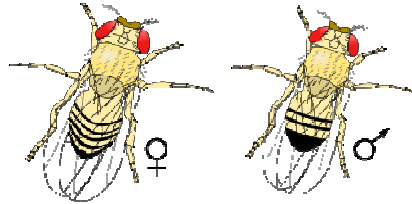
20.2.1. Thời gian thế hệ ngắn, tốc độ sinh sản nhanh

Trong điều kiện thuận lợi, tế bào *E.coli* có thể phân chia một lần trong 20 phút, còn bacteriophage có thể trong 30 - 40 phút tạo ra hàng trăm cá thể, nấm men có thể phân chia tế bào trong 2 giờ. Đặc điểm của nghiên cứu di truyền học là theo dõi qua nhiều thế hệ nên các đối tượng vi sinh giúp rút ngắn đáng kể thời gian thí nghiệm. Nếu so thời gian thế hệ của ruồi giấm 2 tuần, của chuột 2 tháng, của người 20 năm thì các vi sinh vật hơn hẳn. Nếu nhà di truyền học phải chờ 2 tuần để có một thế hệ ruồi giấm, thì đối với *E.coli*, thí nghiệm hôm trước, qua ngày sau đã có thể đánh giá kết quả.

20.2.2. Tăng vọt số lượng cá thể

Các vi sinh vật đơn bào, mỗi tế bào là một cá thể. Nếu đủ dinh dưỡng các vi sinh vật sinh sản nhanh tạo quần thể có *số lượng cá thể lớn* có thể khoảng 10^{10} - 10^{12} tế bào/ml. Tế bào *E.coli* có đường kính 1 μm (micromet)

nếu đủ dinh dưỡng và mọi điều kiện thuận lợi khác thì sau 44 giờ có thể tạo ra một lượng sinh khối nặng bằng quả đất. Ruồi giấm là đối tượng thuận tiện cho di truyền học quần thể cũng chỉ có thể đạt tới 10^5 - 10^6 cá thể. Nhờ số lượng lớn cá thể của vi sinh vật, có thể *phát hiện các sự kiện di truyền hiếm hoi* (như đột biến hay các dạng tái tổ hợp) với tần số 10^{-8} - 10^{-11} .



Ruồi giấm

Như vậy, số lượng cá thể lớn giúp nâng cao *năng suất phân giải* (resolving power) di truyền, tức khả năng phát hiện các đột biến và tái tổ hợp có tần số xuất hiện rất nhỏ.

Ưu thế này lại được tăng thêm nhờ môi trường nuôi đơn giản, dễ nuôi cấy, dễ nhân giống, mà điều kiện *nuôi cấy không công kênh*, ít tốn diện tích hơn so với nuôi ruồi, nuôi chuột và trồng cây. Môi trường nuôi cấy dễ kiểm soát theo công thức chặt chẽ như khi làm thí nghiệm hóa học.

20.2.3. Cấu tạo bộ gen đơn giản

Vi khuẩn và virus có bộ gen là *ADN trần* dễ tiến hành thí nghiệm trực tiếp trên ADN cũng như chiết tách tinh sạch. Số locus cũng ít hơn so với các sinh vật khác. Các vi nấm và vi tảo có thể tồn tại ở dạng *đơn bội* (n) với thời gian dài, nên các *gen lặn* có thể biểu hiện ngay, mà khỏi phải tiến hành lai phân tích hay đưa về dạng đồng hợp tử lặn. Tuy nhiên, các vi sinh vật kể trên có trạng thái *lưỡng bội* (2n) nên cũng dễ dàng thực hiện *phân tích tái tổ hợp*.

Các tính trạng ở vi sinh vật cũng đơn giản hơn, xác định di truyền các tính trạng này ít phức tạp hơn, nên dễ nghiên cứu. Đối với các tính trạng sinh hóa hay tính đề kháng thì có thể dễ dàng sử dụng *môi trường chọn lọc* để phát hiện.

20.2.4. Dễ thu nhận các đột biến

Các phân tích di truyền học phần lớn dựa vào những khác biệt của dạng *bình thường so với đột biến*. Tần số đột biến ở thực vật và động vật

khoảng $10^{-5} - 10^{-7}$, khó thu nhận và cần thời gian dài khoảng vài thế hệ để khẳng định đúng là dạng đột biến. Nhiều đột biến ở động vật dễ gây chết nên số lượng đột biến thu nhận được ở động vật rất hạn chế.

Các đột biến ở vi sinh vật có thể thu nhận dễ dàng, thậm chí có tần số xuất hiện thấp 10^{-10} , mà việc xác nhận dạng đột biến cũng rất nhanh.

Nhờ ưu thế này mà di truyền học vi sinh vật phát triển rất nhanh hình thành nên di truyền học phân tử và sinh học phân tử.

20.2.5. Dễ nghiên cứu bằng các kỹ thuật vật lý hóa học

Đa số các vi sinh vật có *cấu tạo đơn bào* nên quần thể của chúng có *độ đồng nhất cao hơn* so với các tế bào sinh vật đa bào bậc cao bắt nguồn từ nhiều loại mô khác nhau. Cấu tạo tế bào vi sinh vật đơn giản, dễ chiết tách, tinh sạch ADN. Có thể *nuôi vi sinh vật đồng nhất* (synchronous culture) tức là đa số các tế bào ở những giai đoạn phát triển gần giống nhau. Độ đồng nhất cao của vật liệu thí nghiệm tạo thuận lợi cho việc sử dụng các phương pháp vật lý hóa học trong nghiên cứu di truyền.

Do những ưu điểm kể trên, với việc sử dụng các đối tượng vi sinh vật, di truyền học đã bước vào giai đoạn nghiên cứu di truyền “*trong ống nghiệm*” (*in vitro*).

Mặc dù các vi sinh vật có những đặc điểm riêng nhưng chúng vẫn tuân theo các quy luật di truyền chung, các kết quả thu được có thể ***đối chiếu*** áp dụng cho các vi sinh vật bậc cao.

20.3. CÁC ĐẶC ĐIỂM CỦA DI TRUYỀN HỌC VI SINH VẬT

20.3.1. Nghiên cứu trực tiếp ở cấp độ tế bào và cấp độ phân tử

Di truyền học cổ điển sử dụng các mô hình đối tượng như đậu Hà Lan *Pisum sativum*, cây bắp (ngô) *Zea mais*, ruồi giấm *Drosophila melanogaster* và chuột nhắt *Mus musculus*, là những sinh vật đa bào mà sự biểu hiện tính trạng phải trải qua một quá trình phát triển phức tạp và kèm theo biệt hóa. Ví dụ, tế bào hồng cầu ở động vật có vú chỉ chuyên sản xuất hemoglobin. Dĩ nhiên mọi biểu hiện sống đều liên quan đến tế bào, nhưng các quan sát ở những đối tượng trên là *gián tiếp*.

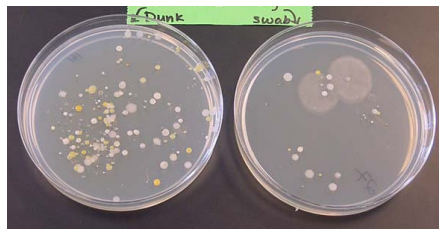
Trong khi đó, nhiều đối tượng vi sinh vật như vi khuẩn *Escherichia coli*, nấm men *Saccharomyces cerevisiae* là sinh vật đơn bào nên các quan sát

thực hiện *trực tiếp hơn ở mức tế bào*. Ví dụ, trên môi trường tối thiểu với lượng muối hữu cơ và glucos cho trước, một tế bào *E. coli* có thể tổng hợp tất cả các hợp chất cần thiết cho sự tăng trưởng, sống sót và sinh sản. Nếu tế bào bị đột biến mất khả năng tổng hợp một chất nào đó như một loại axit amin thì nó không mọc được trên môi trường tối thiểu. Trên môi trường có bổ sung thuốc kháng sinh thì chỉ có các tế bào đề kháng mới mọc được.

Hơn nữa, các tế bào vi sinh vật có nhu cầu dinh dưỡng đơn giản để kiểm soát thành phần môi trường nuôi, dễ nuôi cấy, dễ nhân giống, dễ dàng thu nhận nhiều loại đột biến phục vụ cho nghiên cứu trực tiếp và nhanh chóng ở cấp độ tế bào, phân tử. Do vậy, chúng là những đối tượng lý tưởng cho nghiên cứu di truyền học phân tử.

20.3.2. Dòng tế bào

Đặc điểm của các tế bào vi sinh vật là rất nhỏ bé, phải nhìn dưới kính hiển vi mới thấy được. Do vậy khó có thể quan sát từng tế bào riêng lẻ, hơn nữa, bằng cách này cũng không ghi nhận được các tính trạng biến dưỡng, tính đề kháng và nhiều tính trạng khác. Do vậy, di truyền vi sinh vật không nghiên cứu từng tế bào riêng lẻ mà là **dòng của tế bào**, tức tập hợp của nhiều tế bào bắt nguồn từ một tế bào ban đầu nhờ sinh sản vô tính. Thông thường, tế bào vi sinh vật được cấy lên môi trường thạch đặc, rồi trải đều để các tế bào nằm rời xa ra thì mỗi tế bào mọc lên thành một cụm rời gọi là **khuẩn lạc** (colony). Mỗi khuẩn lạc cũng là một **dòng tế bào** (clone) gồm các tế bào bắt nguồn từ sự phân chia của một tế bào ban đầu.



Khuẩn lạc (colony) của vi sinh vật

Mỗi khuẩn lạc dễ nhìn thấy bằng mắt thường, có tối thiểu 10^7 (mười triệu) tế bào. Như vậy, các tính trạng ở vi sinh vật được ghi nhận qua một quần thể gồm hàng trăm triệu, hàng tỉ tế bào.

Dòng tế bào mang một đặc tính di truyền nào đó gọi là **chủng** (strain). Ví dụ: chủng vi khuẩn tạo nhiều vitamin B₁₂ hay chủng vi khuẩn mất khả năng tổng hợp một axit amin nào đó.

20.3.3. Các tính trạng

Các đột biến ở vi sinh vật thường được phát hiện theo sự biến đổi các tính trạng sau:

a. *Hình thái*: kích thước, hình dạng tế bào hay khuẩn lạc, có màng nhân hay không, khả năng di động...

b. *Sinh hóa*: sự hiện diện của các sắc tố, màu sắc đặc trưng.

c. *Nuôi cấy*: như kiểu hô hấp, kiểu dinh dưỡng (khuyết dưỡng - auxotroph) hoặc nhu cầu đòi hỏi các nhân tố tăng trưởng.

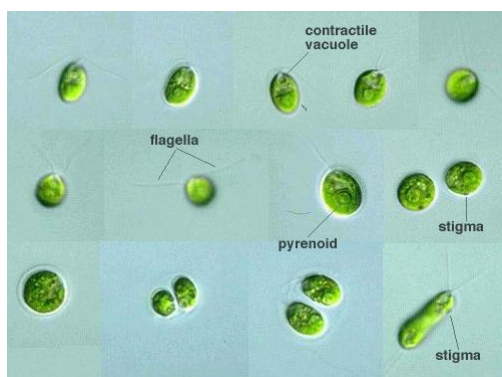
d. *Tính đề kháng*: như kháng thuốc, kháng phage, chịu nhiệt...

e. *Miễn dịch*: như các phản ứng kháng thể, kháng nguyên...

Các đột biến có thể xuất hiện ngẫu nhiên hay do gây tạo ra nhờ các *tác nhân gây đột biến*. Mỗi gen có *tần số đột biến* đặc trưng.

Các tính trạng ở vi sinh vật được kí hiệu bằng 3 chữ tắt tiếng Anh hoặc đôi khi chữ hoa đầu tiên. Kèm theo kí hiệu còn thêm dấu + hoặc – hoặc chữ tắt để giải thích rõ thêm tính trạng. Ví dụ: *lac*⁻ để chỉ mất khả năng tổng hợp lactoz; *his*⁺ - tổng hợp histidin; *str*^S – nhạy cảm (Sensitive) với Streptomycin, *str*^R – đề kháng (Resistant) với Streptomycin.

Để chỉ hai giới tính khác nhau không dùng hai kí hiệu ♀ và ♂ thay vào đó là các chữ như *mt* (+), *mt* (-) (mating typ) (ở *Chlamydomonas reinhardtii*), hoặc A, a (ở *Neurospora crassa*) hay a và α (vi nấm).



Tảo đơn bào *Chlamydomonas*

20.3.4. Cấu trúc bộ gen

ADN hiện diện trong bộ gen (Genome) của tất cả các loại tế bào từ vi khuẩn đến người. Giữa các sinh vật nhân sơ Prokaryota và nhân chuẩn Eukaryota có sự khác nhau đáng kể về kích thước, thành phần cấu tạo và tổ chức của ADN trong tế bào.

Bộ gen của vi khuẩn *E. coli* và đa số các sinh vật nhân sơ là *một phân tử ADN có dạng vòng tròn kín*. Khái niệm nhiễm sắc thể hiện nay được dùng cho cả vi khuẩn, nên nói *nhiễm sắc thể vi khuẩn* ta hiểu đó là *sợi ADN*. Ty thể và lục lạp cũng có ADN riêng, mà cấu trúc bộ gen cũng tương tự vi khuẩn.

Đa phần *ADN của Eukaryota* như *nấm sợi, nấm men, vi tảo* được tổ chức thành *nhiều nhiễm sắc thể* trong nhân tế bào. Mỗi nhiễm sắc thể chứa 1 *phân tử ADN thẳng mạch kép kèm theo một số protein như histon*. Các nhiễm sắc thể có *số lượng và hình dạng đặc trưng* cho tế bào của mỗi loài sinh vật nhân chuẩn.

Các virus có bộ gen rất đa dạng: ADN mạch đơn hoặc kép, ARN mạch đơn hoặc kép, nhưng chỉ một loại phân tử.

20.3.5. Kiểu sinh sản

Các *nấm sợi, nấm men, vi tảo* có các quá trình *sinh sản vô tính và hữu tính* về căn bản giống các sinh vật bậc cao, thực hiện qua *nguyên phân và giảm phân*.

Các vi khuẩn không có các cơ chế nguyên phân và giảm phân, phân chia tế bào theo cơ chế *trực phân*, nhưng cũng có sinh sản vô tính và sự trao đổi thông tin di truyền tương tự sinh sản hữu tính được gọi là ***quá trình cận hữu tính***.

Các virus chỉ sinh sản trong tế bào chủ sống với nhiều cơ chế khác nhau phụ thuộc kiểu virus.

20.3.6. Vấn đề biến dị ở vi sinh vật

Mãi đến năm 40, G. Beadle và E. Tatum lần đầu tiên sử dụng vi nấm *Neurospora crassa* vào nghiên cứu di truyền học. Việc sử dụng chậm trễ các đối tượng vi sinh vật vào nghiên cứu di truyền, một phần lớn do vấn đề ***biến dị***. Trong khi ở thực vật, động vật sự di truyền ở các ***tính tập nhiễm*** (do luyện tập hay bị nhiễm trong đời sống cá thể) đã được khẳng định là không

có thì ở vi sinh vật vấn đề được hiểu ngược lại: chúng *biến đổi trực tiếp* dưới tác động môi trường. Nhiều hiện tượng thực tế tạo cảm giác các vi sinh vật biến đổi dưới tác động trực tiếp của môi trường. Ví dụ, hiện tượng các vi sinh vật nhờn thuốc hay các chất độc. Lúc đầu thuốc kháng sinh sử dụng với liều thấp, dần dần các vi sinh vật nhờn thuốc nên phải sử dụng liều cao. Trước đây một quan niệm phổ biến là các vi sinh vật biến đổi theo những quy luật di truyền khác. Có thể nói vấn đề biến dị ở vi sinh vật là *thành trì cuối cùng của chủ nghĩa Lamack* (công nhận sự *di truyền tính tập nhiễm*).



*Max Delbruck, Nobel 1969 cùng
với A.D.Hershey và S. Lurila*

Tuy nhiên một số nhà di truyền học cho rằng biến dị ở vi sinh vật cũng tuân theo quy luật di truyền chung. Hiện tượng quen thuốc được giải thích là phần lớn tế bào nhạy cảm bị diệt, một số ít bị đột biến kháng thuốc còn sống sót nhờ *sinh sản nhanh* đã tạo quần thể mới với kiểu gen kháng thuốc nên gây cảm giác “nhờn thuốc”.

Tiếp theo nhiều thí nghiệm xác đáng chứng minh rằng biến dị ở vi sinh vật cũng xuất hiện do các đột biến ngẫu nhiên. Đó là *thử nghiệm dao động* (fluctuation test) của P.Luria và M.Delbruck (1943) và đặc biệt là phương pháp *in hay đóng dấu* của E. Lederberg (1952).

Cho đến nay, thực tế cho thấy các dữ liệu nghiên cứu di truyền phân tử từ ADN, ARN, protein và các quá trình khác thu được từ các đối tượng vi sinh vật hoàn toàn có thể áp dụng cho sinh vật bậc cao. Hơn thế nữa, nếu thiếu những nghiên cứu ở mức độ đơn giản hơn trên các đối tượng này thì khó hiểu được những cơ chế phức tạp hơn rất nhiều ở sinh vật bậc cao.

20.4. CÁC ỨNG DỤNG THỰC TẾ

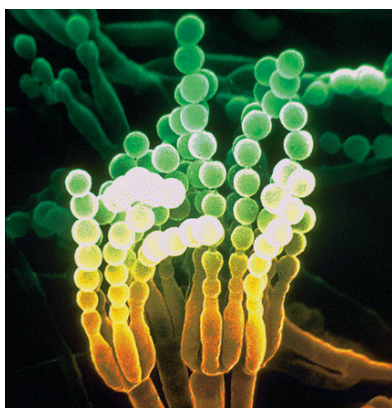
Di truyền học là *cơ sở khoa học* của chọn giống. Các thành tựu của di truyền học được ứng dụng sớm, nhanh và nhiều hơn cả cho đến nay là trong chọn giống. Bước đầu, chọn giống đột biến được ứng dụng và đã được những thành tựu ngoạn mục làm cơ sở cho sự phát triển của *công nghiệp lên men*. Bước phát triển tiếp theo có tính chất cách mạng là ứng dụng công nghệ gen dẫn đến sự bùng nổ của *Công nghệ sinh học*, mà thế kỷ 21 được mang danh.

20.4.1. Chọn giống đột biến

Các thành tựu của Công nghiệp vi sinh vật không thể tách rời với những tiến bộ nhảy vọt trong *chọn lọc các chủng có năng suất cao*. Các phương pháp chọn lọc đột biến được ứng dụng vào chọn giống làm *tăng năng suất* tạo các sản phẩm, làm *biến đổi bản chất hoá học* các chất và *khắc phục* một số *nhược điểm* của chủng được dùng trong sản xuất công nghiệp.

Phương pháp chọn giống này có các đặc điểm:

- Thu nhận kết quả rất nhanh.
- Chỉ đánh giá sản phẩm thu được, không quan tâm các biến đổi sinh lí, sinh hoá.



Vi nấm Penicillium chrysogenum

Quá trình chọn giống các chủng *Penicillium chrysogenum* ở Mỹ có thể lấy làm ví dụ điển hình cho phương pháp này. Từ dòng ban đầu có sản lượng 60mg/l, chọn các đột biến ngẫu nhiên được dòng 150mg/l, và sau đó sử dụng các đột biến nhận được do tác động tia X và UV. Việc chọn lọc theo nguyên tắc: lấy dòng có sản lượng cao nhất đem gây đột biến rồi chọn chủng có năng

suất cao hơn. Qua nhiều bước trung gian cuối cùng cho đến nay nhận được dòng E.15.1 có sản lượng 7000mg/l. Trong bảng 20.2 không nêu một thành tựu quan trọng là tạo chủng không sản sinh ra *sắc tố độc*, phải tốn kém nhiều cho việc loại bỏ sắc tố. Việc nhận các *đột biến không tổng hợp sắc tố* đã làm giảm đáng kể chi phí sản xuất và các dòng này được sử dụng để nâng cao năng suất trong quá trình chọn giống tiếp theo.

Phương pháp chọn giống đột biến được sử dụng để tạo các chủng sản sinh ra nhiều axit amin (như glutamic axit) hay các nucleotit. Ngoài ra còn có thể nhận các đột biến liên quan đến cơ chế điều hoà trao đổi chất:

- Các *đột biến cơ cấu* (constitutive mutants): tạo sản phẩm không cần chất cảm ứng (inducer).
- Các *đột biến kháng ức chế ngược* là các đột biến tạo sản phẩm nhiều mà không bị ức chế bởi sản phẩm cuối (end product repression).

Phương pháp này đã đem lại những thành tích ngoạn mục, góp phần tích cực cho sự phát triển của công nghiệp lên men vi sinh như:

- Chủng *Penicillium chrysogenum* ban đầu có năng suất 60 mg/l và nay đạt 60000 mg/l, hơn chủng ban đầu đến 1.000 lần.
- Chủng *Corynebacterium glutamicum* tạo glutamic axit đạt hơn 200g/l (ban đầu 20g/l).



Vi khuẩn Corynebacterium glutamicum

- Chủng *Serratia marcescens* sinh ra biotin đạt 600mg/l.



*Vi khuẩn Serratia
marcescens*

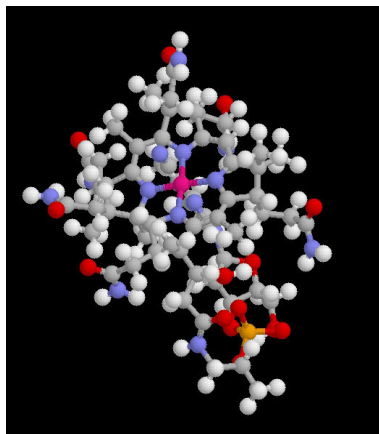
– *Riboflavin* (vitamin B₂) là sản phẩm thương mại được tổng hợp bằng phương pháp lên men và phương pháp hoá học. Siêu sản xuất riboflavin do 2 chủng vi nấm *Eremothecium ashbyii* và *Ashbya gossypii* với sản lượng hơn 20 g/l, gấp 40000 lần nhu cầu của nó.



Eremothecium ashbyii
trên môi trường

sinh vitamin B₂ ngay

– Sản xuất vitamin B₁₂ trong công nghiệp do các chủng vi khuẩn *Propionibacterium shermanii* hoặc *Pseudomonas denitrificans*. Các chủng đột biến sản sinh một lượng sản phẩm lớn hơn rất nhiều so với nhu cầu của tế bào, thậm chí lớn hơn nhiều lần khối lượng khô của nó. *Pseudomonas denitrificans* sinh ra vitamin B₁₂ gấp 100000 lần nhu cầu của nó.



20.4.2. Cuộc Cách mạng công nghệ sinh học

Công nghệ sinh học (Biotechnology, CNSH) là một thuật ngữ khoa học do kỹ sư người Hungary là Karl Ereky nêu ra vào năm 1917 để

chỉ quá trình nuôi lợn với quy mô lớn bằng thức ăn là củ cải đường *lên men* nhờ các vi sinh vật. Sau đó vào năm 1961, tạp chí khoa học “*Journal of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology*” (Tạp chí kỹ thuật và công nghệ vi sinh sinh hóa) được đổi tên thành “*Biotechnology and Bioengineering*” (“Công nghệ sinh học và kỹ thuật sinh học”). Tuy nhiên, thuật ngữ này ít được nhắc đến trong hơn 50 năm và chỉ được sử dụng rộng rãi sau phát minh ra Kỹ thuật di truyền-Gentic engineering (KTDT) vào đầu những năm 70 của thế kỷ trước, cho nên có lúc người ta coi đó là sự “*bùng nổ*” của CNSH.

Trước thập kỷ 70, CNSH được hiểu là sự *lên men công nghiệp* (industrial fermentation) vi sinh vật để tạo thương phẩm. Trong những thập kỷ 60 và 70, *công nghệ lên men* đã phát triển thành một *ngành công nghiệp lớn* trên thế giới với doanh số gần trăm tỉ USD/năm. Sự hoàn thiện các trang thiết bị ở tất cả các khâu và sự kiểm soát, điều khiển phản ứng của tế bào ở trình độ cao làm tăng sản lượng đáng kể. Tuy nhiên, khâu quyết định làm giảm đáng kể giá thành là *năng suất chủng giống*. Phương pháp chọn giống cổ điển được thực hiện với những chủng phân lập từ thiên nhiên và sau đó gây đột biến bằng tia tử ngoại, tia phóng xạ hay bằng hóa chất.



CNSH thuở khởi đầu

Đầu thập niên 1970, CNSH đã chuyển sang một *giai đoạn mới cao hơn hẳn về chất nhờ KTDT*. Các kĩ thuật mới cho phép *tạo giống trực tiếp nhanh hơn, tận dụng nguồn gen từ nhiều sinh vật khác nhau để tạo các chủng sản lượng cao, mà ít tốn công sức để phân lập và gây đột biến như trước đây*. Nhờ *khả năng vượt giới hạn tiến hóa của KTDT*, các vi sinh vật, các tế bào động thực vật có thể được sử dụng như các “*nhà máy sinh học*” (biological factories) để sản xuất hàng loạt các protein người như insulin, hormone tăng trưởng, interferon,... Các động vật và thực vật có thể trở thành *bioreactor tự nhiên* tạo các sản phẩm từ gen lạ đưa vào, không cần lai tạo và chọn lọc các biến dị bằng lai trong loài như trước đây. Ngoài ra, KTDT đồng thời cung cấp các phương pháp trị liệu và chẩn đoán mới để chữa trị bệnh ở người. Cần nhấn mạnh rằng, KTDT là *công nghệ cao*, gồm nhiều công đoạn phức tạp và nó thực sự đã tạo nên một cuộc cách mạng.

Sự ra đời của *Cách mạng sinh học mới* làm cho thuật ngữ *Công nghệ sinh học* trở nên thông dụng vào nửa sau những năm 70. Trước 1973, người ta thường dùng các từ “*Vi sinh công nghiệp, Công nghệ lên men, Kĩ thuật sinh hoá*”... *Công nghệ sinh học* là một thuật ngữ *rất đạt*, đã bao hàm trong nó tất cả những tên đã gọi về các lĩnh vực ứng dụng trước đây và với nội dung mới. Nó phản ánh những thành tựu hết sức to lớn của sự phát triển sinh học trong nhiều thập niên trước đó. Cách mạng sinh học mới cao hơn hẳn về chất so với “*Cách mạng xanh*” vào những năm 60.

Từ thuở sơ khai thời cổ La Mã-Hi Lạp, khoa học là một hệ thống nhất. Đến thời Phục hưng, sự phát triển khoa học dẫn đến sự tách biệt thành các ngành và chuyên ngành. Điều này cũng thể hiện rõ trong sinh học cho đến nay. Sự xuất hiện của cách mạng mới đã tạo ra các lĩnh vực đa ngành và *hợp nhất các ứng dụng sinh học ở cấp độ tế bào và phân tử*, đồng thời *gắn liền với công nghệ*, dưới tên gọi chung là CNSH và được coi như “*quyền lực ghê gớm nhất mà loài người giành được kể từ sau thành tựu phân hạch nguyên tử*” hay “*Chúa tể của thế kỉ 21*”.

Khó kể hết những thành tựu vô cùng to lớn của CNSH đến mức mà thế kỷ 21 được mang danh là *thế kỷ công nghệ sinh học*. Ở đây chỉ nêu tiếp một số ứng dụng chủ yếu liên quan đến các đối tượng vi sinh vật.

20.4.3. Giải mã các bộ gen của vi sinh vật

Ngay từ năm 1995, Cr. Venter đã hoàn tất việc giải kí tự chuỗi của 2 loài vi khuẩn *Haemophilus influenzae* (1830121bp) và *Mycoplasma genitalium* (0,58Mb). Hiện nay, số vi sinh vật được giải kí tự chuỗi bộ gen đã xong là hơn 200 loài. Ngoài ra, nhiều loài quan trọng khác gồm: *Streptomyces coelicolor* (9,05Mb – 1996), *Bacillus subtilis* (4,21Mb – 1997), *Agrobacterium tumefaciens* (6,67Mb – 2001), *Xanthomonas campestris* (5,08Mb – 2002) và *Corynebacterium glutamicum* (3,31Mb – 2003) đã biết được chi tiết về bộ gen.

Sự hiểu biết genomeics vi sinh vật có ý nghĩa hết sức quan trọng về mặt khoa học cơ bản cũng như ứng dụng, mà dự án nêu sau là một ví dụ về nghiên cứu đi sâu vào bản chất sự sống.

Từ năm 2001, dự án tế bào vi sinh vật (Microbial Cell Project – MCP) được thực hiện với bốn mục tiêu: 1) Xác định các protein vi sinh tổ hợp thành các bộ máy protein để thực hiện nhiều quá trình nội bào quan trọng cho sự sống ; 2) Đánh giá đặc tính môi trường nội bào và các hiệu quả của nó lên các protein và bộ máy protein để thực hiện các chức năng ; 3) Đánh giá đặc tính phân bố, số lượng, các luồng protein và bộ máy protein nội bào ; 4) Dùng điện toán xây dựng các mô hình gen – gen, gen – protein, các tương tác protein – protein và hoá sinh nội bào.

20.4.4. Công nghệ protein tái tổ hợp

Những thí nghiệm tạo dòng gen đầu tiên được thực hiện ở vi sinh vật. Nhờ thao tác dễ dàng lại có công nghệ lên men phát triển mạnh, các vi sinh vật đã cung cấp rất nhiều sản phẩm ở quy mô công nghiệp do KTDĐT, từ các protein, ADN, ARN đến các phân tử nhỏ.

Từ lâu, các nhà khoa học mong muốn sản xuất các protein với số lượng lớn. Công nghệ gen cho phép sản xuất nhiều loại *protein tái tổ hợp* (recombinant protein – r-protein) khác nhau không những với *số lượng lớn* mà còn có *chất lượng protein tốt hơn*. Công nghệ *r-protein* thật sự đang phát triển với nhiều thành tựu rất ngoạn mục.

Nhiều protein trị bệnh được biểu hiện ở các hệ thống vi khuẩn, nấm men. Chúng cần cho chữa trị một số bệnh, nhưng chiết tách từ cơ thể thì số

lượng ít. Các *r-protein* đầu tiên được sản xuất nhờ các *vi sinh vật chủ* như *E. coli* hay nấm men *S. cerevisiae*. Cụ thể là sáu trong bảy loại protein trị liệu với tổng doanh số không dưới 15 tỉ USD, mà bằng sáng chế (patent) đã hết hạn (thường khoảng 15 – 20 năm), được nêu trên bảng 20.1.

Các protein tái tổ hợp được sản xuất gồm các nhóm chủ yếu:

Bảng 20.1: Sáu loại r-protein trị liệu do E. coli hay S. cerevisiae tạo ra

STT	Tên sản phẩm	Các bệnh được điều trị	Năm hết hạn patent
1	Insulin	Tiểu đường	2001
2	Interferon alpha	Viêm gan siêu vi C, mụn cóc qua đường tình dục, ung thư	2002
3	Interferon beta	Xơ cứng (Multiple sclerosis)	2003
4	Hormone tăng trưởng người	Thiếu năng tăng trưởng (Growth deficiency)	2003
5	Erythropoetin	Thiếu máu	2004
6	G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)	Hóa trị liệu giảm bạch cầu trung tính (Chemotherapy-induced neutropenia)	2006

- Các protein trị liệu như một số nêu trên bảng 20.1.
- Các enzym: ADNz I, alginat lyaz, phenylalanin amoni lyaz, alpha-1-antitrypsin.
- Các kháng thể dùng trong chẩn đoán và chữa trị nhiều bệnh.

20.4.5. Tạo các giống vi sinh vật nhờ kĩ thuật di truyền

E. coli, *Saccharomyces cerevisiae* là những đối tượng đầu tiên được sử dụng KTDТ để tạo ra các chủng sản xuất các *r-protein* người, tiếp đó là nhiều vi sinh vật khác. Sau đây là vài ví dụ cụ thể.

a. Thiết kế trao đổi chất (Metabolic Design)

KTDТ đã *can thiệp vào quá trình trao đổi chất ở cấp độ gen* để sản xuất các chất phân tử nhỏ. Các ứng dụng đầu tiên của *metabolomics*, công

nghe gen *điều khiển trao đổi chất*, thực hiện ở vi sinh vật. Hai ví dụ điển hình đầu tiên là tạo dòng tế bào *E. coli* sinh tổng hợp các chất, mà vốn nó không có khả năng này, như *xanh indigo* và sắc tố đen *melanin*. Sự tạo dòng một gen từ *Pseudomonas putida* vào *E.coli* làm nó có khả năng tổng hợp *indigo xanh* trong môi trường có tryptophan. Sự tạo dòng gen *tyrosinaz* cho *E. coli* làm nó biến tyrosin thành *dopaquinone* và chất này ngẫu nhiên biến thành *melanin* khi có không khí.

Tiếp theo, các sản phẩm trao đổi chất sơ cấp và thứ cấp được sản xuất từ các dòng thiết kế như *các chủng sử dụng lactoz, chuyển hoá xyloz, sản xuất etanol từ pentoz, phân giải các chất dị sinh (xenobiotics),...*

b. Công nghệ bề mặt tế bào nấm men

Các protein trên bề mặt tế bào nấm men cũng được tổng hợp bên trong tế bào, nhưng sau đó chúng được đưa ra gắn lên bề mặt tế bào. Dựa vào sự hiểu biết các gen tương ứng, *công nghệ bề mặt tế bào* (cell surface technology) đã ra đời. Sử dụng CN gen để cố định protein ngoại lai trên bề mặt tế bào nhằm thay đổi và cải thiện chức năng của tế bào. Tiềm năng ứng dụng đa dạng của nó gồm: sản xuất các enzym, kháng thể, kháng nguyên, thụ thể,....

Bước đầu, các nhà nghiên cứu đã thành công trong biểu hiện các enzym như glycosyl hydrolase, glucosylamylaz, lipaz,... PTN Công nghệ sinh học phân tử của Đại học KHTN (TPHCM) đã tạo được chủng nấm men gắn protein GFP (green fluorescence protein – protein phát huỳnh quang xanh lục của sứa) và chủng gắn alpha-amylaz.

c. Sự can thiệp của KTDT vào sản xuất etanol nhiên liệu

Nấm men *S. cerevisiae* và vi khuẩn *Zymomonas mobilis* là 2 vi sinh vật chủ yếu có khả năng sử dụng trong lên men etanol nhiên liệu. Nấm men vẫn giữ vai trò chủ yếu, nhưng nó không lên men xyloz, pentoz và một số loại đường khác. Do tầm quan trọng chiến lược cấp thiết, hiện tại và trong tương lai có rất nhiều nỗ lực được tập trung cho cải thiện chủng giống nhằm sử dụng tốt hơn nguồn nguyên liệu đa dạng và thuận tiện cho quy trình công nghiệp. Các nghiên cứu chủ yếu nhằm thiết kế:

– *Các chủng sử dụng lactoz để tận dụng phụ phẩm công nghiệp sữa.*

- Các chủng vi sinh có khả năng chuyển hoá xyloz mà nấm men không đồng hoá.
- Các chủng nấm men phân giải tinh bột để lên men bột khô phải qua đường hoá.
- Các chủng vi sinh vật để sản xuất etanol từ pentoz.

Ngoài ra, vấn đề quan trọng khác là sản xuất enzym cellulaz giá rẻ để giá thành etanol nhiên liệu đủ sức cạnh tranh với xăng dầu.

Chuyển hoá sinh khối thực vật thành etanol nhiên liệu là một điểm nóng của CNSH hiện đại.

d. Cải biến các chủng vi sinh vật sản xuất vitamin

- Riboflavin (Vitamin B2): Phương pháp mới sử dụng các loài *Candida* hoặc chủng *Bacillus subtilis* tái tổ hợp cho sản lượng 20 – 30g/l.
- Tổng hợp các tiền chất của vitamin: Gần đây (1990) đã thành công trong tạo dòng các gen cho sự sinh tổng hợp carotenoid vòng, chứa β -caroten từ *Erwinia uredovora*. Sau khi 4 gen sinh tổng hợp β -caroten được chuyển vào *Z. mobilis* và *Agrobacterium tumefaciens*, các khuẩn lạc màu vàng thu được trên các đĩa thạch. Các thể tiếp hợp sản xuất 220 – 350 μ g β -caroten trên gram khối lượng khô ở phaz ổn định trong môi trường nuôi.
- Sinh tổng hợp L-ascorbic axit được cải biến nhờ KTDT. L-ascorbic axit (Vitamin C) được hiện tổng hợp thương mại theo một quy trình đất tiền, bao gồm 1 giai đoạn lên men Vi sinh vật và một số giai đoạn hóa học bắt đầu với D-glucoz. Giai đoạn cuối cùng trong quá trình là sự chuyển hoá 2-keto-L-glucosnic axit (2-KLG) thành L-ascorbic axit dưới xúc tác là axit. Do đó, cách tốt nhất để chuyển hoá glucoz thành 2-KLG là chế tạo một Vi sinh vật có mang tất cả các enzym cần thiết. Việc chuyển hóa D-glucoz thành 2,5-DKG bằng *Erwinia herbicola* bao gồm nhiều bước xúc tác bởi enzym, trong khi đó sự chuyển đổi 2,5-DKG thành 2-KLG do *Corynebacterium sp.* đòi hỏi chỉ một bước. Chiến lược đơn giản nhất để thiết kế một sinh vật có khả năng chuyển D-glucoz thành 2-KLG là tách gen 2,5-DKG reductaz từ *Corynebacterium sp.* và cho biểu hiện trong *Erwinia herbicola*.

Các tế bào *Erwinia* được biến nạp gen 2,5-DKG reductaz có khả năng chuyển hoá trực tiếp D-glucoz thành 2-KLG, vì các enzym nội bào của

Erwini nằm ở màng trong của vi khuẩn *chuyển glucoz thành 2,5-DKG* và *2,5-DKG reductaz* xúc tác *chuyển 2,5-DKG thành 2-KLG*. Do đó, bằng thao tác gen, khả năng chuyển hoá của 2 Vi sinh vật rất khác nhau lại được kết hợp thành một và do đó có khả năng tạo sản phẩm cuối của *quá trình chuyển hoá được thiết kế*. Sinh vật loại này rất hữu ích như là một nguồn 2-KLG cho sản xuất L-ascorbic axit, bằng cách đó thay thế 3 công đoạn đầu của quy trình hiện đang được sử dụng.

Thông qua *đột biến điểm định hướng* bằng oligonucleotit đã thu được đột biến 2,5-DKG reductaz có hoạt tính cao hơn khoảng 2 lần và bền với nhiệt hơn dạng enzym tự nhiên.

Tóm lại, KTDĐT đã thể hiện quyền lực to lớn trong cải biến sinh giới về nhiều mặt, không những thay đổi các tính trạng khác nhau, mà can thiệp cả đến chi tiết các thành phần và quá trình trao đổi chất. Trên các đối tượng vi sinh vật, công nghệ gen được ứng dụng đầu tiên, kỹ thuật đa dạng, hiệu quả hơn cả và hàng loạt sản phẩm đã xâm nhập thị trường từ năm 1982.

20.5. BIẾN DỊ Ở VI SINH VẬT

Biến dị và đột biến có ý nghĩa quan trọng trong nghiên cứu di truyền học. Các đột biến gồm nhiều loại khác nhau và chúng được thu nhận dễ dàng từ các vi sinh vật nhờ các phương pháp phát hiện chuyên biệt. Các đột biến gen bắt nguồn từ những biến đổi phân tử trên ADN. Con người có thể sử dụng các tác nhân vật lí và hóa học gây nên các *đột biến nhân tạo* hay *cảm ứng*.

Các nghiên cứu về hội biến giúp hiểu rõ hơn về các ức chế trong gen của sự dịch mã

Biến dị ở vi sinh vật cũng tuân theo các quy luật di truyền như ở sinh vật bậc cao. Nó có nhiều loại và số lượng rất lớn, cung cấp *nguyên liệu* thường xuyên cho quá trình tiến hóa và nghiên cứu di truyền học. Nhiều *phương pháp phát hiện* và *chọn lọc* các đột biến khác nhau được sử dụng để thu nhận các đột biến có tần số xuất hiện rất thấp. Chúng góp phần đáng kể cho các nghiên cứu di truyền. Các thay đổi thêm, mất hay thay thế các nucleotit trên phân tử ADN dẫn đến các biến đổi phân tử, gây ra các đột biến gen như: lệch khung, sai hay nhầm nghĩa và im lặng. Phát minh ra các *tác*

nhân gây đột biến vật lí và hóa học làm tăng đáng kể nguồn đột biến phục vụ cho nghiên cứu và chọn giống. Con người có thể tăng nguồn biến dị bằng lai tạo hay sử dụng các tác nhân gây đột biến.

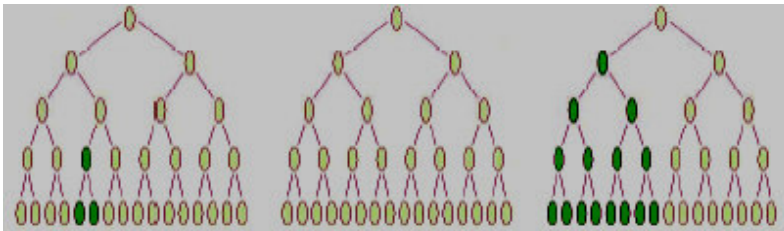
20.5.1. Đại cương về biến dị ở vi sinh vật

20.5.1.1. Biến dị ở vi sinh vật cũng tuân theo quy luật di truyền chung

Có nhiều phương pháp chứng minh biến dị ở vi sinh vật cũng do các đột biến. Ở đây chỉ nêu 2 phương pháp chủ yếu: *thử nghiệm dao động* (fluctuation test) và đặc biệt là phương pháp *in* hay *đóng dấu* của E. Lederberg (1952).

a. Nguyên lý của thử nghiệm dao động (fluctuation test)

Năm 1943, Luria và Delbrück tiến hành thí nghiệm như sau. Lấy 20 ống nghiệm cho vào mỗi ống một ít môi trường nuôi (1ml) lỏng với một ít tế bào vi khuẩn nhạy cảm với bacteriophage và ủ cho chúng sinh sản đạt 10^8 tế bào/ml. Lấy dịch nuôi 20 ống nuôi riêng lẻ và 20 ống với số dịch nuôi tương tự từ bình lớn nuôi chung và dịch từng ống cấy lên các hộp Petri môi trường đặc chứa bacteriophage. Nếu đột biến là sự kiện *ngẫu nhiên* thì số lượng thể đột biến (mutants) ít (2 ở hình bên trái) hay nhiều (8 – hình bên phải) do xuất hiện muộn hay sớm như mô tả trên hình 20.1.



Hình 20.1: Đột biến là sự kiện ngẫu nhiên: số lượng thể đột biến phụ thuộc thời điểm xuất hiện.

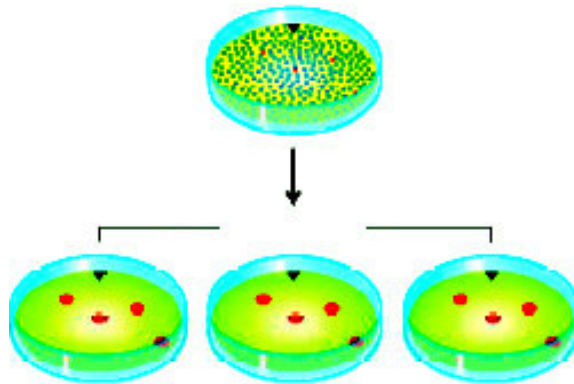
Số lượng thể đột biến (các tế bào tô đậm) ít (2 ở hình bên trái) hay nhiều (8 – hình bên phải) do xuất hiện muộn hay sớm trong dòng tế bào.

Kết quả cho thấy có sự *dao động* (fluctuation) về số lượng khuẩn lạc kháng phage mọc lên từ dịch nuôi của 20 ống nuôi riêng lẻ. Cụ thể: 11 ống không có khuẩn lạc đề kháng, số còn lại có 1, 1, 3, 5, 5, 6, 35, 64 và 107 khuẩn lạc/hộp Petri. Trong khi đó, dịch nuôi 20 ống từ bình lớn nuôi chung ít

có sự dao động từ hộp Petri này sang hộp khác và trong khoảng 14 – 26 khuẩn lạc/hộp Petri hay thuốc kháng sinh.

b. Phương pháp in hay đóng dấu

Các vi khuẩn được cấy để mọc rồi từng khuẩn lạc trên môi trường có dinh dưỡng. Dùng miếng nhung (có nhiều lông mịn) ấn nhẹ lên bề mặt môi trường thường để ghi dấu các khuẩn lạc nhờ các lông mịn, sau in đúng các vị trí khuẩn lạc trên môi trường có phage hay thuốc kháng sinh. Các khuẩn lạc đột biến kháng phage hay kháng sinh mọc lên được. Căn cứ vị trí khuẩn lạc không mọc ở bản sao tách các đột biến tương ứng (hình 20.2).



Hình 20.2: Phương pháp in dùng phát hiện các đột biến.

Như vậy, phương pháp in cho biết phát hiện các đột biến đề kháng các nhân tố bất lợi nào đây của môi trường trong quần thể vi khuẩn *từ trước khi* các tế bào của chúng *tiếp xúc với tác nhân* này. Điều đó có nghĩa rằng, ví dụ, streptomycin không phải là nguyên nhân gây biến dị kháng thuốc, mà chỉ là *tác nhân chọn lọc* giữ lại các đột biến đã xuất hiện trước khi tiếp xúc với thuốc. Các đột biến này có kiểu hình giúp cho vi khuẩn thích nghi với biến đổi của môi trường và *nhờ sinh sản nhanh* sau một thời gian ngắn quần thể có kiểu hình mới.

Các kết quả nghiên cứu này khẳng định các vi sinh vật cũng *tuân theo các quy luật di truyền* như các động vật và thực vật. Điều này có ý nghĩa rất lớn cho sự phát triển của di truyền học và sinh học phân tử. Do vậy, giải Nobel Y học năm 1969 được trao P.Luria và M.Delbruck về đóng góp này.

20.5.1.2. Quá trình đột biến tự nhiên

Đột biến theo nghĩa rộng chỉ các biến đổi di truyền xảy ra đột ngột. Từ xa xưa, con người đã nhận thấy nhiều đột biến tự nhiên. Nhiều giống cây trồng và vật nuôi bắt nguồn từ các đột biến.

Đột biến gen là đột biến được hiểu theo nghĩa hẹp, là chỉ những biến đổi xảy ra bên trong cấu trúc gen. Mỗi đột biến gen dẫn đến sự thay đổi trình tự nucleotit tạo ra các alen khác nhau. Đột biến có thể xảy ra do biến đổi nhiều nucleotit, có thể do 1 nucleotit. Đột biến gen không phát hiện được khi quan sát tế bào học.

Bảng 20.2: Tần số đột biến ngẫu nhiên của một số gen

Sinh vật	Đột biến	Tần số	Căn cứ đánh giá
Phage T2	Kìm hãm tan r → r ⁺	1.10 ⁻⁸	đột biến/1 sao chép
<i>E.coli</i>	Lên men lactoz		các tế bào đột biến /
	<i>lac</i> → <i>lac</i> ⁺	2.10 ⁻⁷	1 lần phân bào
	<i>leu</i> ⁻ → <i>leu</i> ⁺	7.10 ⁻¹⁰	đột biến /1 tế bào
	<i>arg</i> ⁺ → <i>arg</i> ⁻		đột biến /1 tế bào
	<i>trp</i> ⁺ → <i>trp</i> ⁻	4.10 ⁻⁹	đột biến /1 tế bào
	<i>ara</i> ⁺ → <i>ara</i> ⁻	6.10 ⁻⁸	đột biến /1 tế bào
	Kháng Streptomycin	2.10 ⁻⁶	
	<i>Str</i> ^S → <i>Str</i> ^R	4.10 ⁻¹⁰	đột biến /1 tế bào
<i>Neurospora crassa</i>	adenin <i>ade</i> ⁻ → <i>ade</i> ⁺	4.10 ⁻⁸	đột biến/ 1 bào tử vô tính

Trong tự nhiên, dù giữ trong điều kiện nào, tất cả các gen đều có đột biến, được gọi là *đột biến tự nhiên* hay *ngẫu nhiên* (spontaneous mutation). Các đột biến tự nhiên thường xuất hiện rất ít. Khái niệm *tần số đột biến* được dùng để đánh giá mức độ xuất hiện nhiều hay ít đột biến ở một gen. Có người phân biệt *tần số* (frequency) với *tốc độ* (rat) đột biến.

Các gen khác nhau của cùng 1 sinh vật có thể có tần số đột biến khác nhau. Nhưng *tần số đột biến tự nhiên* đối với mỗi gen là một số *ổn định*.

Tần số đột biến được đánh giá theo các căn cứ khác nhau như: trên 1 lần sao chép, 1 lần phân bào hay trên 1 giao tử và trên 1 tế bào / 1 thế hệ (bảng 20.2).

Để dễ hiểu các số trên có thể tính đảo ngược lại. Ví dụ: Ở *E.coli* đột biến từ nhạy cảm với streptomycin sang kháng tức $Str^S \rightarrow Str^R$ với tần số 4.10^{-10} đột biến tính trên 1 tế bào/1 thế hệ. Để dễ hiểu ta có thể tính ngược lại tức trong 10 tỉ tế bào của một thế hệ có 4 đột biến Str^R (resistance) kháng streptomycin xuất hiện ngẫu nhiên.

Tuy tần số đột biến của từng gen là rất thấp, nhưng tổng các đột biến của nhiều gen là một số đáng kể, có ý nghĩa quan trọng cho tiến hóa.

Đột biến ảnh hưởng đến mọi tính trạng khác nhau của sinh vật và tác động theo mọi hướng.

20.5.2: Các loại đột biến thường gặp ở vi sinh vật

Vi sinh vật cũng có các loại đột biến như ở sinh vật bậc cao. Ở đây chỉ nêu các đột biến thường gặp ở vi sinh vật và có ý nghĩa quan trọng đối với di truyền phân tử.

20.5.2.1. Đột biến gen hay đột biến điểm

Biến đổi rất nhỏ trên một đoạn ADN, thường liên quan đến 1 nucleotit hay 1 cặp nucleotit.

a) *Đột biến đồng nghĩa* (Samesense) còn gọi là *trung tính* (neutral) hay *im lặng* (silent), khi codon mã hóa cho một axit amin bị biến đổi, thường ở bazơ thứ ba nên vẫn mã hóa cho axit amin đó (do tính suy thoái của mã di truyền).

b) *Đột biến vô nghĩa* (Non-sense) khi codon mã hóa cho một axit amin biến thành một trong ba codon *UAA*, *UAG* và *UGA* là các *codon kết thúc* không mã hóa cho axit amin nào.

c) *Đột biến sai nghĩa* (Mis-sense): Khi codon của axit amin này biến thành codon mã hóa cho axit amin khác, làm thay đổi axit amin tương ứng trên phân tử protein.

d) *Đột biến lệch khung*: Sự thêm 1 bazơ hay làm mất 1 bazơ dẫn đến các codon sai nghĩa hay vô nghĩa so với codon tương ứng ban đầu từ điểm biến đổi về sau, sự dịch mã bị lệch khung có tính dây chuyền từ bộ ba bị sai.

20.5.2.2- Đột biến nhiễm sắc thể

Các đột biến nhiễm sắc thể hay còn gọi là sai hình nhiễm sắc thể xuất hiện ở sinh vật nhân thực.

– *Biến đổi trên 1 nhiễm sắc thể*: mất đoạn, lặp đoạn, đảo đoạn.

– *Biến đổi giữa các nhiễm sắc thể*: chuyển đoạn.

– *Đột biến bộ gen (genome mutation)*

Đa bội thể (Polyploidy) hiểu theo nghĩa rộng là sự thay đổi số lượng nhiễm sắc thể gồm: *Đa bội thể nguyên* (Polyploidy hay Euploidy) ($2n \rightarrow 3n, 4n, \dots$), *đa bội thể lai* còn gọi *dị bội thể* (Allopolyploidy) ($2n A + 2n B$) và *đa bội lệch* (Aneuploidy), hay *đa nhiễm*: (ví dụ: $2n + 1$ hoặc $2n - 1$).

20.5.2.3- Các biến đổi vi cấu trúc

Các thay đổi thành phần nucleotit của gen.

a) *Đột biến thay thế*: Thay một nucleotit này bằng nucleotit khác.

– *Đồng chuyển* (Transition) khi pyrimidin được thay thế bởi pyrimidin hay purin bởi purin. Ví dụ: T thay cho C hoặc ngược lại.

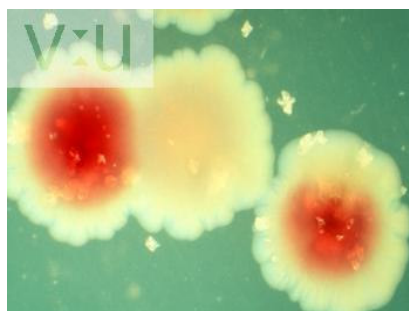
– *Đảo chuyển* (Transversion) khi pyrimidin được thay thế bởi purin hay purin bởi pyrimidin. Ví dụ: T hay C thay cho A hoặc G và ngược lại.

b) *Mất nucleotit* (Deletion): Mất một phần nucleotit của gen.

c) *Đột biến xen nucleotit* (Insertion mutant): Thêm 1 hay nhiều nucleotit vào gen.

20.5.2.4- Các đột biến kiểu hình

a) *Các đột biến hình thái*: Các biến đổi ảnh hưởng đến hình dạng, màu sắc và kích thước. Ví dụ: một dạng đột biến khuẩn lạc màu đỏ ở *Serratia marcescens*.



Hình 20.3. Đột biến khuẩn lạc màu đỏ ở *Serratia marcescens*

b) Đột biến sinh hóa:

- Các đột biến khuyết dưỡng (Auxotrophe mutation) làm mất khả năng tổng hợp các chất.
- Các đột biến có điều kiện: Các đột biến có thể không có biểu hiện trong những điều kiện giới hạn nhất định (restrictive condition) và có biểu hiện trong các điều kiện cho phép (permissive condition). Ví dụ, các đột biến nhạy cảm với nhiệt độ cao có biểu hiện ở nhiệt độ tương ứng.
- Đột biến đề kháng: Các biến đổi sinh hóa giúp kháng lại được các tác nhân bất lợi.

20.5.2.5. Đột biến và hồi biến

a) Đột biến thuận hay trực tiếp (Direct mutation): Biến đổi từ kiểu hình hoang dại sang khác thường.

b) Hồi biến (Reversion): Đột biến từ kiểu hình đột biến quay về kiểu hình hoang dại.

– *Hồi biến thật hay đột biến nghịch.* Biến đi trở lại y như ban đầu.

Ví dụ: adenin → guanin → adenin

↑ ↑

Đột biến thuận Đột biến nghịch.

– *Đột biến ức chế hay kìm hãm (Supressor):* Đột biến ở một điểm khác. Cả hai cùng tạo kiểu hình gần như hoang dại.

- Đột biến kìm hãm ngoài gen: Xảy ra ở gen khác với gen bị đột biến.

- Đột biến kìm hãm trong gen: Xảy ra ở nucleotit khác trong gen đưa gen trở về trạng thái tạo kiểu hình hoang dại.

Nói chung, các đột biến là các *biến đổi rất đa dạng* của vật chất di truyền và có *nhiều tác động* khác nhau.

20.5.3- Các phương pháp phát hiện đột biến

Để nghiên cứu chi tiết về các đột biến, cần có các phương pháp phát hiện chúng một cách tương đối đầy đủ và chính xác. Đây là công việc khó khăn vì đa số đột biến ở dạng lặn và nhiều dạng khó phát hiện.

Sự hoàn thiện các phương pháp phát hiện đột biến đã góp phần đáng kể cho sự phát triển của di truyền học và sinh học.

20.5.3.1- Các hệ thống chọn lọc đột biến ở vi sinh vật

Muốn phát hiện các đột biến có hiệu quả cần có hệ thống chọn lọc để tìm thấy các đột biến hiếm hoi trong khối rất lớn các dạng không đột biến. Các hệ thống chọn lọc đột biến có nhiều và phụ thuộc vào các đột biến khác nhau. Bảng 20.3 nêu các cách phát hiện 3 dạng đột biến.

Bảng 20.3. Cơ sở phát hiện các kiểu hình đột biến của 3 loại đột biến căn cứ kiểu hình

<i>Kiểu gen</i>	Đột biến có điều kiện (nhạy cảm nhiệt độ)		Đột biến khuyết dưỡng		Đột biến đề kháng	
	<i>Nhiệt độ thường</i>	<i>Nhiệt độ cao</i>	<i>Không bổ sung</i>	<i>Có bổ sung</i>	<i>Không tác nhân</i>	<i>Có tác nhân</i>
Kiểu hoang dại	Bình thường	Bình thường	Tăng trưởng	Tăng trưởng	Tăng trưởng	Không
Đột biến	Bình thường	Đột biến	Không	Tăng trưởng	Tăng trưởng	Tăng trưởng

Khái niệm *lực phân giải* (resolving power) được dùng để chỉ khả năng phát hiện các đột biến rất hiếm. Lực phân giải càng lớn khi phát hiện được các đột biến càng hiếm. Ví dụ, các đột biến đề kháng có độ phân giải cao vì khi cấy số lượng rất lớn tế bào lên môi trường chọn lọc có chứa tác nhân thì phần lớn tế bào chết, chỉ số rất ít tế bào có đột biến đề kháng mọc thành khuẩn lạc.

20.5.3.2- Phương pháp đề kháng

Ở vi khuẩn, các tác nhân chọn lọc thường là thuốc và phage. Các đột biến dễ dàng được phát hiện trên môi trường agar có thuốc hay phage ở dạng các khuẩn lạc được mọc lên như trên hình 20.3.

20.5.3.3- Phương pháp làm giàu chậm: (Default enrichment method)

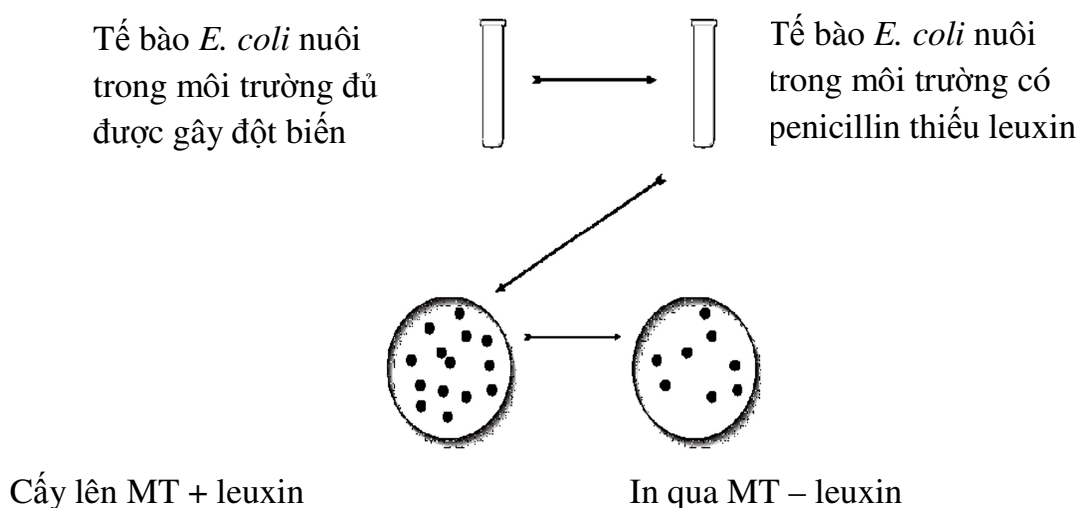
Việc phát hiện các *đột biến khuyết dưỡng* khó khăn hơn. Dung dịch vi khuẩn pha loãng được cấy lên bề mặt môi trường agar tối thiểu để mọc rồi thành khuẩn lạc. Một lớp môi trường tương tự được đổ lên trên, phủ lớp mỏng. Hộp Petri được ủ để các khuẩn lạc bình thường mọc lên. Sau đó, đổ phủ lên thêm một lớp môi trường dinh dưỡng có bổ sung và ủ tiếp cho chất bổ sung khuếch tán. Các đột biến khuyết dưỡng sẽ mọc sau, khi có chất bổ sung, nên khuẩn lạc nhỏ hơn do mọc chậm.

20.5.3.4- Phương pháp làm giàu hạn chế (*Limited enrichment method*)

Đây là dạng đơn giản hơn của phương pháp làm giàu chậm. Các vi khuẩn được cấy trên môi trường tối thiểu có một ít bổ sung. Trong điều kiện đó, các đột biến khuyết dưỡng mọc đến khi hết chất dinh dưỡng bổ sung thì dừng, nên tạo *khuẩn lạc nhỏ*. Các vi khuẩn bình thường tiếp tục mọc tạo khuẩn lạc to.

20.5.3.5- Phương pháp làm giàu nhờ penixilin

Phương pháp được áp dụng cho các vi khuẩn. Penixilin có tác động diệt các vi khuẩn bình thường khi phân chia. Các vi khuẩn được cho vào môi trường tối thiểu có penixilin. Các vi khuẩn đang tăng trưởng bị diệt, chỉ các tế bào đột biến không tăng trưởng còn sống sót. Sau đó, hỗn hợp được cấy lên môi trường không có penixilin thì các đột biến khuyết dưỡng mọc lên với tỉ lệ tương đối cao hơn (hình 20.4).



Hình 20.4. Phương pháp penicillin chọn lọc âm tính

(ví dụ chọn leu⁻)

Các tế bào *E. coli* được nuôi trên môi trường đủ và gây đột biến. Rửa sạch tế bào khỏi MT đủ và chuyển sang MT có penicillin thiếu leuxin (– leuxin). Sau đó cấy tế bào lên hộp Petri chứa MT có leuxin (MT + leuxin), các tế bào mọc lên thành khuẩn lạc. In các khuẩn lạc sang hộp Petri chứa MT tối thiểu không có leuxin. So sánh 2 hộp Petri xác định được dòng tế bào đột biến: mọc trên MT đủ (+ leuxin) và không mọc trên MT thiếu leuxin (– leuxin)

20.5.3.6. Phương pháp lọc

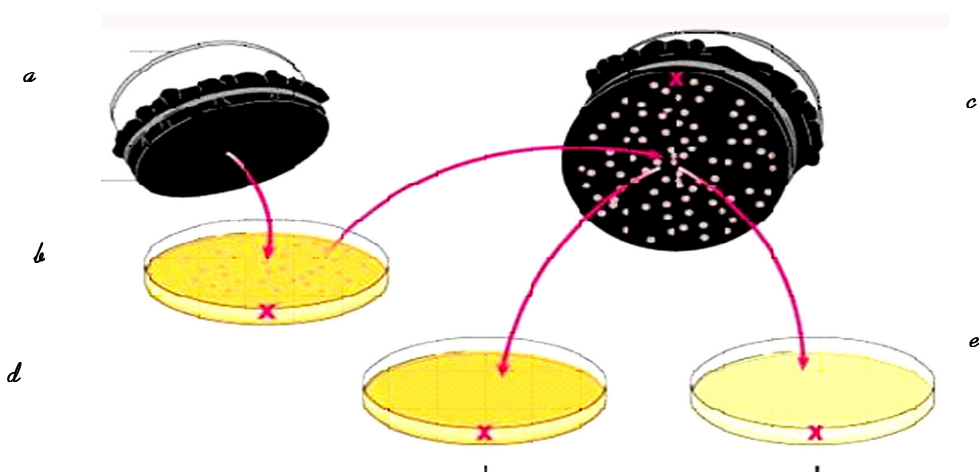
Phương pháp được sử dụng để chọn lựa các đột biến khuyết dưỡng ở nấm sợi.

Dung dịch các bào tử được nuôi trong môi trường dinh dưỡng thiếu chất bổ sung. Các đột biến thiếu chất bổ sung không mọc được, các dạng bình thường mọc ra nhiều sợi. Khi lọc qua màng lọc sợi thủy tinh, các dạng bình thường nhiều sợi bị giữ lại, các dạng đột biến đi qua màng lọc. Dung dịch có nhiều dạng đột biến được cấy lên môi trường có chất bổ sung và kiểm tra tìm các dạng đột biến.

20.5.3.7- Phương pháp in

Các vi khuẩn được cấy để mọc rời từng khuẩn lạc trên môi trường có dinh dưỡng. Dùng miếng nhung (có nhiều lông mịn) in đúng các vị trí khuẩn lạc trên môi trường tối thiểu. Các khuẩn lạc đột biến không mọc lên được. Căn cứ vị trí khuẩn lạc không mọc ở bản sao tách các đột biến khuyết dưỡng (hình 20.4 phía trên).

Ngoài các phương pháp nêu trên còn có các phương pháp chuyên biệt để phát hiện nhiều loại đột biến khác.



Hình 20.5. Phương pháp in

a) Khúc gỗ bọc miếng nhung vô trùng. b) Đĩa gốc trên môi trường đầy đủ. c) Miếng nhung đã in dính tế bào tương ứng các khuẩn lạc. d) Môi trường đủ hoặc có bổ sung chất cần thiết. e) Môi trường tối thiểu không có bổ sung

20.5.4- Cơ chế phân tử của đột biến

20.5.4.1- Các biến đổi trên ADN

Tất cả các đột biến đều do những thay đổi trình tự nucleotit trên ADN. Các đột biến có thể xảy ra *ngẫu nhiên* (spontaneously) hay *gây tạo* (cảm ứng - induced) bởi các tác nhân gây đột biến (mutagens). Các đột biến có thể do thay đổi từng cặp bazơ hay những trình tự dài hơn.

Đột biến điểm (Point mutation) là biến đổi trình tự của một cặp bazơ. Đột biến điểm có thể do *chuyển đổi hoá học* bazơ này thành bazơ khác hoặc do *bắt cặp sai* trong sao chép. Sự biến đổi gồm nhiều kiểu:

- *Sự đồng chuyển*: thay cặp G·C bằng A·T và ngược lại.
- *Sự đảo chuyển*: thay A·T bằng T·A và ngược lại.
- *Sự bắt cặp sai* (Bazơ mispairing) là sự bắt cặp không theo đúng nguyên tắc của mô hình Watson-Crick, mà là adenin với cytosin, thymine với guanin.
- *Xen đoạn* (Insertion) là sự thêm vào một đoạn cặp bazơ vào ADN. *Tăng đôi đoạn* (Duplication) là một dạng đặc biệt của xen đoạn.
- *Mất đoạn* (deletion) là sự mất đi một trình tự ADN, mà trình tự hai bên nối lại với nhau trừ trường hợp mất đầu mút nhiễm sắc thể.

Transposon hay *phần tử di động* (transposable element) là trình tự ADN có khả năng tự xen vào (hay bản sao chính nó) ở vị trí mới trên bộ gen (genome), mà không cần có quan hệ gì với locus mục tiêu. *Xen đoạn* là kiểu đột biến *phổ biến nhất* và do sự di chuyển của các phần tử di động (ch. VI).

Phần lớn *đột biến ngẫu nhiên* do sự hiện diện của các *bazơ bất thường* trên ADN. Ngoài ra, một số *bazơ bị biến đổi* (modified bases) như thường gặp hơn cả là *5-methylcytosin*, được tạo ra do *enzym methylaz* thêm nhóm *metyl* vào một số *cytosin* ở những điểm đặc biệt trên ADN.

20.5.4.2- Các sai hỏng trong sao chép ADN

Các đột biến có thể xảy ra do sai lầm khi sao chép ADN.

Mỗi bazơ tồn tại ở 2 dạng cấu trúc được gọi là tautomer. Ví dụ, adenin bình thường mang nhóm NH_2 cung cấp nguyên tử hydro cho sự bắt cặp bổ sung với dạng *keto* ($C = O$ - keto form) của thymine. Khi có biến đổi tautomer, adenin chuyển sang cấu trúc hiếm là *dạng imino NH* sẽ bắt cặp bổ sung với cytosin. Thymine có thể chuyển sang *dạng enol* (COH) không có trong ADN bình thường và bắt cặp với guanin. Khả năng bắt cặp sai của bazơ với tautomer không đúng đã được Watson và Crick nêu lên.

Sự bắt cặp sai này có thể là các đột biến đồng chuyển, trong đó purin thay bằng purin khác và pyrimidin thay bằng pyrimidin khác.

Các biến đổi trên, ngoài việc thay thế các nucleotit trên mạch ADN còn có thể làm tăng thêm hay khuyết các nucleotit gây nên các kiểu đột biến ảnh hưởng đến sinh tổng hợp protein.

20.5.4.3- Ảnh hưởng của đột biến gen đến sinh tổng hợp protein

Sau khi tìm hiểu về dịch mã và mã di truyền, cần lưu ý đến biến đổi ảnh hưởng đến nghĩa codon và vị trí biến đổi ở đầu hay cuối mạch polypeptit.

a) Đột biến lệch khung

Hai kiểu đột biến có hiệu quả nặng là *thêm bazơ* (addition) và *mất bazơ* (deletion). Các biến đổi này thường làm enzym mất hoạt tính. Sự thêm 1 bazơ hay làm mất 1 bazơ dẫn đến *sự dịch mã lệch khung*. Từ điểm biến đổi về sau, từ bộ ba bị sai cái sai sẽ kéo dài liên tục đến cuối mạch polypeptit. Ví dụ:

– *Bình thường:*

mARN: CCG GGA AGC AAU

Polypeptit: Pro Gly Ser Asn

– *Đột biến lệch khung xen đoạn (Frameshift - insertion)*

mARN: CCG AGG AAG CAA

Polypeptit: Pro Arg Lys Gln

– *Đột biến lệch khung mất đoạn (Frameshift - deletion)*

mARN: CCG GAA GCA AUG

Polypeptit: Pro Glu Asp Met

Sự tổng hợp mạch polypeptit có thể bị kết thúc sớm nếu sự lệch khung dẫn đến codon kết thúc.

b) Đột biến thay thế (Base substitution)

Đột biến thay thế bazơ nếu là đột biến sai nghĩa (mis-sense) sẽ có hiệu quả thay đổi từ axit amin này thành axit amin khác trong mạch polypeptit, còn nếu là đột biến vô nghĩa (non-sense) hay đột biến trung tính (hay im lặng) sẽ không ảnh hưởng đến mạch polypeptit Ví dụ:

– *Bình thường:*

mARN: CCG GGA AGC AAU

Polypeptit: Pro Gly Ser Asn

– *Sai nghĩa (Missense):*

mARN: CCG GCA AGC AAU

Polypeptit: Pro Val Ser Asn

– *Vô nghĩa (Nonsense)*

mARN: CCG UGA AGC AAU

Polypeptit: Pro STOP

20.5.4.4- Sai hỏng ngẫu nhiên

Ngoài các sai hỏng trong sao chép, phân tử ADN còn chịu các sai hỏng ngẫu nhiên có thể dẫn đến đột biến. Hai kiểu sai hỏng ngẫu nhiên thường gặp là mất purin (depurination) và mất amin (desamination). Mất purin là kiểu sai

hỏng thường hơn, xảy ra khi liên kết glycosidic giữa C1 của pentoz với bazơ bị đứt và làm mất A hoặc G.

Sự mất amin của cytosin tạo ra uracil. Các gốc U không được sửa sai sẽ bắt cặp bổ sung với A trong sao chép, gây ra đồng chuyển G-C→A-T. Trong các enzym sửa sai, uracil ADN-glycosylaz nhận biết đặc hiệu uracil trên ADN và cắt rời tạo lỗ hỏng, sau đó được tổng hợp lại đúng theo mạch bổ sung.

Trên phân tử ADN, một số cytosin được methyl hóa thành 5-methyl cytosin, chất này mất nhóm amin biến thành thymine. Sai hỏng này không bị uracil-ADN-glycosylaz phát hiện nên không được sửa lại. Sự chuyển C → T do mất amin thường xảy ra ở các điểm có 5-methyl cytosin. Kiểu biến đổi này có ở cả vi khuẩn và tế bào sinh vật bậc cao.

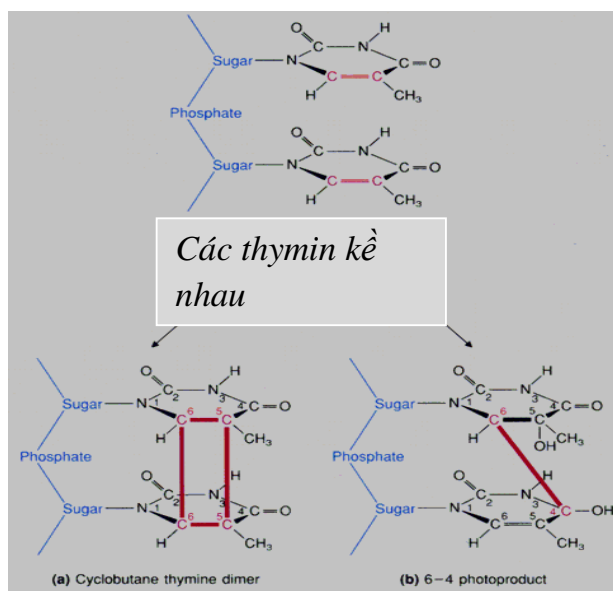
20.5.5. Đột biến nhân tạo hay cảm ứng

Các tác nhân làm *tăng tần số đột biến* cao hơn mức tự nhiên được gọi là các ***tác nhân gây đột biến (mutagen)***. Các tác nhân vật lý như phóng xạ, tia X, tia tử ngoại gây đột biến. Nhiều hóa chất là tác nhân gây đột biến như các đồng đẳng của các bazơ nitric, HNO₂ (nitrous axit), các chất alkyl hóa mạch... Các đột biến loại này được gọi là đột biến *nhân tạo* hay đột biến *cảm ứng* (induced mutation).

Đối với các vi sinh vật, các tác nhân gây đột biến chủ yếu là *tia tử ngoại* và *một số hóa chất*.

20.5.5.1-Tác động của tia tử ngoại

Tia tử ngoại có bước sóng dài (10⁻⁵ - 10⁻⁶ cm) nên khó tạo ion, có lẽ chỉ tác động đến những chất hấp thụ nó trực tiếp. Trong tế bào, các chất hữu cơ có mạch vòng chủ yếu như purin và pyrimidin hấp thụ trực tiếp tia tử ngoại. Mối liên quan chặt chẽ giữa tia tử ngoại và các cấu phần của ADN đã được chứng minh. ADN hấp thụ tia tử ngoại mạnh nhất ở bước sóng 2537Å, đây chính là bước sóng làm tăng tần số đột biến.

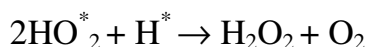
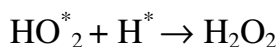
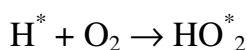


Hình 20.6. Tác động của tia tử ngoại tạo các dimer thymine

Dưới tác động của tia tử ngoại, cytosin gắn thêm phân tử nước vào liên kết C = C của mạch vòng (hình 3.6) và thymine bị đứt liên kết C = C mạch vòng nối 2 phân tử thành thymine dimer.

Ston và các cộng sự đã nhận thấy tần số đột biến tăng lên ở *Staphylococcus aureus* khi môi trường nuôi chúng được chiếu tia UV trong thời gian ngắn trước khi cấy vào. Đây là tác động gián tiếp của tia tử ngoại.

Có thể khi hiện diện oxy, tia tử ngoại tạo ra nhiều hơn các gốc peroxit:



Các peroxit là những phân tử có phản ứng mạnh, chúng dễ tạo các đột biến.

Hiện tượng **quang phục hồi** (photoreactivation) là một đặc điểm trong tác động của tia UV. Sau khi chiếu tia tử ngoại lên tế bào, nếu để ngoài ánh sáng, thì các sai hỏng phần lớn được phục hồi. Ánh sáng có tác động hoạt hóa enzym sửa sai, cắt đứt các thymine dimer.

20.5.5.2- Các tác nhân gây đột biến hóa chất

Ngay từ đầu những năm 1930, Xakharov và Lobashov (Liên Xô) đã tiến hành thử nghiệm gây đột biến bằng hóa chất, nhưng hiệu quả chưa rõ. Vào

những năm 40, trong thế chiến thứ hai ở Anh, Auerbach và Robson đã chứng minh hơi ngạt nitơ và sulfua có khả năng gây đột biến ở *Drosophila* (thời này Đức bắn hơi ngạt sang nước Anh, nên họ phải nghiên cứu tác động sinh học của các chất độc này). Về sau, nhiều nhóm hóa chất gây đột biến đã được tìm ra.

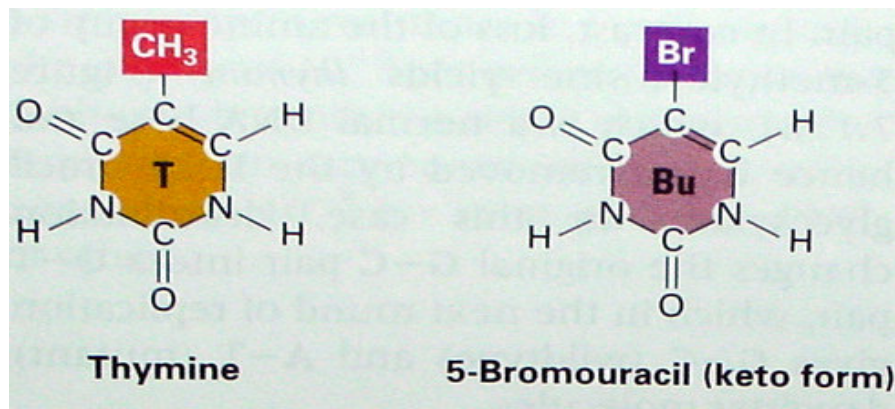
Có nhiều hóa chất gây biến dị di truyền, đến nay tìm ra những hóa chất cho hiệu quả đột biến cao hơn cả phóng xạ.

Các hóa chất gây đột biến có đặc điểm là có thể chỉ gây hiệu quả đột biến đối với một số lượng ít đối tượng.

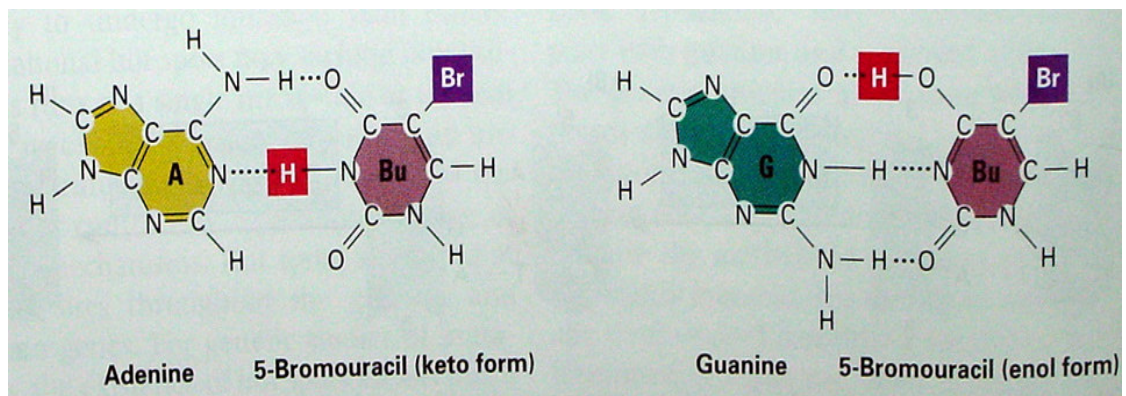
Ví dụ: Streptomycin chỉ gây đột biến ở tảo đơn bào và một số vi sinh vật, không gây đột biến trên nhiều đối tượng khác.

Các tác nhân gây đột biến hóa học có thể chia thành các nhóm sau:

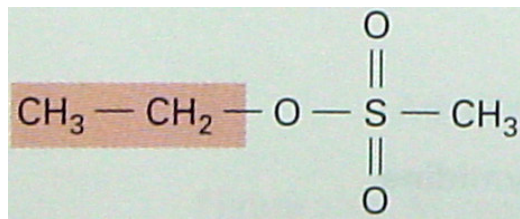
– **Nhóm 1:** Các chất ức chế tổng hợp nitơous bazơ trong cấu trúc ADN như coffein, etyl uretan...



Hình 20.7. Thymine và 5-Bromuracil (dạng keto)



Hình 20.8. Adenin bắt cặp với 5-Bromuracil và Guanin với 5-Bromuracil



Hình 20.9. Công thức của etyl metansulfonat (EMS)

- **Nhóm 2:** Các chất đồng đẳng với nitơous bazơ như coffein, 5-bromuracil (hình 20.7 và 20.8), các chất gần giống với nitơous bazơ, nên nó làm ADN gắn nhầm khi tổng hợp.
- **Nhóm 3:** Các chất alkyl hóa làm đứt mạch ADN như etyl metansulfonat (EMS) (hình 20.9), metyl metansulfonat (MMS), etylen imine (EI), nitrosoguanidin (NG),...
- **Nhóm 4:** *Các chất khác như nhóm oxy hóa, khử.*

Ngược với sai hỏng sao chép, các tác nhân gây đột biến như nitrous axit và khí ngạt nitơ (nitơ mustard) có thể gây biến đổi trực tiếp trên ADN.

- Nhóm 5: các chất chêm vào ADN

Nhóm các chất gồm proflavin, màu acridin và các chất được gọi là ICR (ICR compound) là những chất có phân tử mặt phẳng tương tự cặp bazơ. Chúng có thể chêm vào phân tử ADN làm thêm hoặc mất bazơ. Chúng thường gây đột biến lệch khung do thêm hay mất bazơ.

Tất cả các tác nhân gây đột biến đều là tác nhân gây ung thư (carcinogen), nhưng các tác nhân gây ung thư không phải đều gây đột biến. Hiện nay nhiều tác nhân gây đột biến được sử dụng trong chọn giống nhằm tăng nguồn biến dị. Bên cạnh đó với nạn ô nhiễm trên thế giới người ta phát hiện nhiều tác nhân đột biến hóa học mới xuất hiện trong môi trường.

20.5.6. Hồi biến

Quá trình đột biến, nói chung, có tính thuận nghịch, nghĩa là nếu một gen A đột biến thành a ($A \rightarrow a$) thì, ngược lại alen a cũng có thể đột biến quay lại thành A ($a \rightarrow A$). Thông thường một dạng được gọi là đột biến khi nó mang kiểu hình khác với dạng hoang dại. Ví dụ, ruồi giấm hoang dại được bắt từ thiên nhiên vào phòng thí nghiệm có mắt đỏ. Trong quá trình nuôi xuất hiện dạng đột biến mắt trắng. Đột biến từ mắt đỏ hoang dại sang mắt trắng gọi là **thuận** vì từ hoang dại thành đột biến. **Hồi biến** là trường hợp từ trạng thái đột biến do biến dị di truyền quay trở về kiểu hình hoang dại như đột biến từ mắt trắng trở lại thành mắt đỏ. Hồi biến do **đột biến nghịch** (back mutation) hoặc do **đột biến ức chế** hay **kìm hãm** (supression).

20.5.6.1. Các đột biến nghịch

Đột biến nghịch có được khi gen đột biến có sự biến đổi quay trở lại có y cấu trúc như gen hoang dại ban đầu. Trường hợp này khó xảy ra và khi lai trở lại với dòng hoang dại thì thế hệ con tất cả đều có kiểu hình hoang dại. Ví dụ:

- Đột biến nghịch: $m^- \rightarrow m^+$, khi lai với dạng hoang dại cho thế hệ con đều hoang dại
- Đột biến ức chế: $m^-su^+ \rightarrow m^-su^-$, khi lai với dạng hoang dại trong thế hệ con sẽ có một ít kiểu hình đột biến.

20.5.6.2- Đột biến ức chế

Đột biến ức chế (Suppressor mutation) là đột biến có tác động ngược lại hay kìm hãm của một đột biến khác. Các đột biến ức chế có những tính chất sau:

- Đột biến ức chế xảy ra ở điểm khác với đột biến bị ức chế. Khi lai thể hồi biến (revertant) với dạng hoang dại sẽ xuất hiện dạng đột biến bị ức chế do tái tổ hợp làm tách rời không bị kìm hãm bởi đột biến ức chế (hình 20.10).

- Đột biến ức chế có thể xảy ra trong cùng một gen, ngoài gen hoặc ở gen khác.

- Các đột biến ức chế có thể thực hiện tác động bằng nhiều cách khác nhau. Ví dụ, các đột biến ức chế có thể tác động lên sự phiên mã, dịch mã hay những biểu hiện sinh lí khác của tế bào.

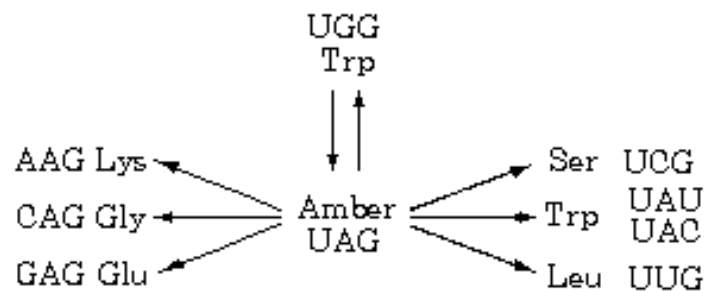
Đột biến kìm hãm thường gặp hơn, nó có được do 1 đột biến thứ hai làm cho biểu hiện kiểu hình của đột biến không biểu hiện ra được nên có kiểu hình hoang dại. Đột biến kìm hãm có thể xảy ra ngay trên cấu trúc gen. Ví dụ: đột biến thuận mất một nucleotit, đột biến kìm hãm xảy ra gần chỗ đó thêm vào một nucleotit. Đột biến kìm hãm có thể do sự bổ sung trong chu trình trao đổi chất. Sai hỏng do đột biến thứ hai tạo sản phẩm bù trừ được đột biến thứ nhất.

Vào năm 1962, S.Benzer và Chemp mô tả đột biến được gọi là đột biến *amber* ở locus rII của phage T4. Chúng có thể trở về kiểu hình hoang dại do đột biến khác (đột biến ức chế) ở bộ gen của tế bào chủ. Các đột biến ức chế được phát hiện ở nhiều gen khác của phage T4 và *E.coli*. Các nghiên cứu sử dụng hệ thống gen- enzym cho thấy, các đột biến *amber* dẫn đến sự kết thúc

sớm hơn bình thường sự mọc dài của mạch polypeptit và ở trong các tế bào chỉ các đoạn có đầu NH₂ của các polypeptit tương ứng được tổng hợp. Nhờ đột biến ức chế, tổng hợp mạch polypeptit được hồi phục.

A.Haren, khi nghiên cứu sự kiểm soát di truyền đối với tổng hợp enzym photphataz kiềm ở *E.coli*, đã so sánh thành phần các gốc axit amin trên phân tử enzym của dạng hoang dại và ở các thể hồi biến trong gen mã hóa cho enzym. Kết quả trên hình 20.10 cho thấy các ức chế đối với *amber* liên quan đến một thay thế nucleotit trong codon.

Trên cơ sở các số liệu này đã xác định được codon - *amber* là **UAG**. Sau đó, 2 codon chấm dứt khác được tìm ra là *ochre* **UAA** và *opal* **UGA**.



Hình 20.10. Sự thay thế các axit amin do các đột biến ức chế đối với các đột biến *amber* ở gen cấu trúc của enzym photphataz kiềm

Các biến dị ức chế được dùng để nghiên cứu sâu hơn về cơ chế dịch mã. Ví dụ, các đột biến ảnh hưởng tới anticodon của tARN, làm thay đổi tính đặc hiệu mã hóa của nó, có thể tạo khả năng ức chế đột biến khác ở mức phiên mã. Các đột biến ức chế đối với codon vô nghĩa (nonsense-suppressor) thường xảy ra trên các tARN, mà anticodon của nó có thể bị biến thành anticodon bổ sung với codon kết thúc do sự thay thế một nucleotit. Các nonsense - suppressor như vậy thường là trội.

Có thể xảy ra các đột biến *ức chế* đối với các *đột biến nhằm nghĩa*. Ví dụ, tARN^{gly} của axit amin glycine có anticodon CCC thường bắt cặp với GGG (gly) trên mARN. Sự biến đổi đột biến của anticodon thành CUC dẫn đến chỗ tARN^{gly} đột biến bắt cặp với GAG (glutamic axit). Như vậy, nếu như

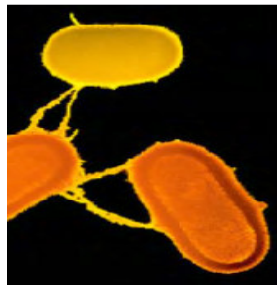
đột biến thuận ở một gen cấu trúc nào đó biến codon GGG (glycine) thành GAG (glutamic axit) của đột biến nhầm nghĩa (missens mutation), thì sự ức chế đối với đột biến này có thể do đột biến của tARN^{gly} với anticodon CUC sẽ gắn glycine vào chỗ bị đột biến (ở đột biến nhầm nghĩa là glutamic axit).

Các đột biến xảy ra trên tARN có thể là đột biến ức chế đối với các đột biến lệch khung.

Sự ức chế ở mức phiên mã có thể xảy ra do các đột biến trên các gen mã hóa một số protein của *ribosom*.

20.6- DI TRUYỀN HỌC VI KHUẨN

Các vi khuẩn có quá trình sinh sản cận hữu tính nên vẫn thực hiện được tái tổ hợp di truyền. Ở vi khuẩn, thông tin di truyền được truyền một chiều từ thể cho sang thể nhận và tạo ra hợp tử từng phần. Tái tổ hợp ở vi khuẩn có thể thực hiện bằng các đoạn ADN trần trong biến nạp, hay phage trong tải nạp, nhờ giao nạp khi 2 tế bào khác giới tính gắn với nhau. Bản đồ di truyền vi khuẩn được xây dựng nhờ các phương pháp khác nhau: giao nạp gián đoạn hoặc không gián đoạn, tái tổ hợp hay dùng mất đoạn.



Plasmid là những ADN vòng tròn có thể tồn tại độc lập hoặc chèn vào ADN tế bào chủ có vai trò quan trọng trong chuyển gen.

Transposition là sự chuyển vị gen gồm IS, Tn và phage Mu. Các phần tử di động có thể gây biến đổi sự biểu hiện gen.

Vào những năm 1940, tái tổ hợp ở vi khuẩn *E. coli* được chứng minh. Từ đó đến nay, vi khuẩn *E. coli* trở thành đối tượng mô hình cho di truyền học và sinh học phân tử. Những nghiên cứu trên đối tượng này đã phát hiện các cơ chế căn bản của sự sống ở cấp độ phân tử như sao chép ADN, sinh tổng hợp protein và điều hòa biểu hiện gen. Ngoài ra, các phát hiện về các

quá trình di truyền đặc biệt ở vi khuẩn như biến nạp, tải nạp, giao nạp, transposition và plasmid có ý nghĩa quan trọng cho sự phát triển của di truyền học phân tử và góp phần xây dựng nên kỹ thuật di truyền. Trong một thời gian dài, các nghiên cứu di truyền học được tiến hành ở các sinh vật nhân thực Eukaryota, còn ở vi khuẩn thì chưa vì cho rằng không có sinh sản hữu tính. Khác với virus, vi khuẩn và cổ vi khuẩn (bacteria and archaea) là những tế bào sống thực hiện các chức năng căn bản của tế bào.

Các sinh vật Prokaryota như vi khuẩn, vi khuẩn lam cũng có các quá trình sinh sản tương đương sinh sản hữu tính, được gọi là *cận hữu tính* (parazuality). Sự di truyền nhờ các quá trình cận hữu tính này ở vi khuẩn có những đặc điểm:

- Sự *truyền thông tin một chiều* từ tế bào *cho* (donor) sang tế bào *nhận* (recipient).
- Sự tạo thành *hợp tử từng phần* (merozygote). Tế bào *cho* (donor) chỉ chuyển một đoạn của bộ gen sang tế bào *nhận* (recipient) nên chỉ lưỡng bội ở một phần, các phần khác đơn bội.
- Bộ gen thường chỉ là một *ADN trần* nên chỉ có một nhóm liên kết gen và tái tổ hợp thực chất là *giữa hai phân tử ADN*.

20.6.1- Một vài đặc điểm của vi khuẩn

20.6.1.1- Kiểu hình và kiểu gen của vi khuẩn

Các đột biến có thể tác động đến 5 loại kiểu hình:

- Biến đổi từ *nguyên dưỡng* (prototrophy) sang *khuyết dưỡng* (auxotrophy) và ngược lại. Ví dụ: mất khả năng tổng hợp một chất trao đổi của chu trình và hồi biến để lại có khả năng tổng hợp chất đó.
- Sự mất hay có được khả năng sử dụng chất dinh dưỡng khác. Ví dụ: đột biến làm mất khả năng sử dụng đường lactoz.
- *Tính nhạy cảm* hay *đề kháng thuốc* như nhạy cảm streptomycin đột biến thành kháng streptomycin.
- *Nhạy cảm* với phage thành *kháng phage* hoặc ngược lại. Ví dụ: đột biến trên thụ thể ở bề mặt tế bào làm đề kháng với sự nhiễm phage.

– Sự mất đi hoặc có lại các thành phần cấu trúc của bề mặt tế bào. Ví dụ, một loại *Pneumococcus* có vỏ bao *polyxacarit* (polyxacarit capsule), trong khi đó dòng khác không có vỏ bao.

Các kí hiệu dùng biểu hiện kiểu hình và kiểu gen được thống nhất theo nguyên tắc:

– *Kí hiệu kiểu hình* gồm 3 chữ thường (chữ đầu viết hoa) với dấu phía trên góc “+” hay “-” nhằm chỉ sự hiện diện hay thiếu tình trạng tương ứng, và “s” hay “r” tương ứng chỉ tính nhạy cảm (sensitive) hay đề kháng (resistance).

– *Kí hiệu kiểu gen* được viết chữ nghiêng, chữ đầu không viết hoa.

Ví dụ 1: Tế bào hoang dại tự tổng hợp được leuxin thì kiểu hình được viết Leu^+ . Đột biến khuyết dưỡng mất khả năng tổng hợp leuxin được kí hiệu kiểu hình Leu^- . Tương ứng với hai kiểu hình trên kí hiệu kiểu gen là leu^+ hay leu và leu^- .

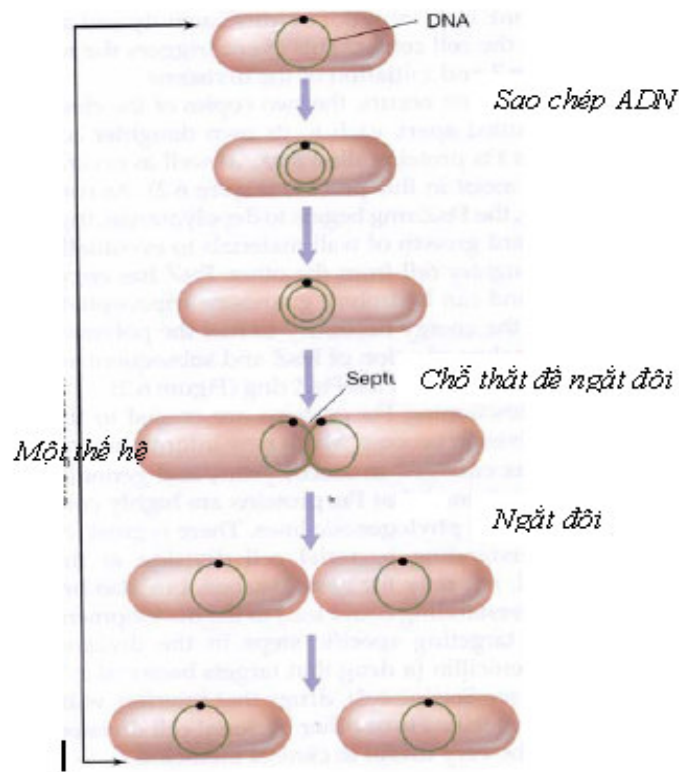
Nếu cần nhiều hơn một gen để tạo ra một chất nhất định, sau 3 chữ nghiêng kí hiệu gen có thêm chữ nghiêng hoa. Ví dụ: $leuA$, $leuB$... là các gen cần thiết cho tổng hợp leuxin khác nhau.

Ví dụ 2: Kiểu hình kháng hoặc nhạy cảm với penixilin được viết là Pen^r và Pen^s . Kiểu gen tương ứng là pen^r và pen^s .

Nếu lưỡng bội ở một phần thì viết thêm gạch nghiêng. Ví dụ, leu^+/leu^- .

20.6.1.2- Vài nét về sinh sản ở vi khuẩn

Tế bào vi khuẩn phân chia theo lối *trực phân*. Phân tử ADN gắn trực tiếp vào màng sinh chất. Sự sao chép ADN tạo ra hai bản sao gắn chung nhau trên màng sinh chất. Khi tế bào kéo dài ra, các bản sao ADN tách xa nhau do phần màng giữ chúng lớn dần ra. Kiểu sinh sản vô tính này được gọi là “*phân đôi*” hay “*ngắt đôi*” (“binary fission”) (hình 20.11). Tế bào vi khuẩn chia nhanh (20 phút trong điều kiện tốt) hơn rất nhiều so với tế bào Eukaryota (24-48 giờ).



Hình 20.11- Trục phân ngắt đôi ở vi khuẩn kèm theo tách 2 ADN con về 2 tế bào

Quá trình sao chép ADN được bắt đầu từ *điểm xuất phát oriC* kéo dài về hai phía song song với quá trình sao chép màng sinh chất, nơi có điểm gắn vào của ADN bộ gen, mọc dài tách 2 phân tử ADN về 2 tế bào con.

ADN của *E.coli* cần 40 phút cho 1 vòng sao chép tương ứng với tốc độ 50.000 cặp bazơ/phút. Phụ thuộc vào tốc độ tăng trưởng, thời gian phân chia tế bào trong khoảng từ 18 đến 60 phút. Như vậy ở các tế bào tăng trưởng nhanh, vòng sao chép mới phải được bắt đầu sớm hơn sự phân bào trước đó như tế bào con đầu tiên.

20.6.2- Vi khuẩn *E.coli* là đối tượng mô hình tốt nhất

Escherichia coli (*E.coli*) là vi khuẩn được nghiên cứu kỹ nhất, rất nhiều chủng khác nhau đã được phân lập. Ba dòng thường gặp trong các phòng thí nghiệm di truyền là *E.coli B* (tế bào chủ cho các phage dây T), *E.coli C* (tế bào chủ cho phage một mạch như ϕ X 174) và *E.coli K12* (tế bào chủ của phage λ). Do những thuận tiện trong nuôi cấy, nhân giống, thu nhận các đột biến và dễ phân tích các sự kiện di truyền hiếm hoi. Đến nay, nó được coi là *đối tượng mô hình số một của Sinh học phân tử và công nghệ gen*.

20.6.2.1. Các dữ liệu di truyền học của *E. coli*

- Kích thước bộ gen (Genome size): 4,6 Mb
- Nhiễm sắc thể: 1 phân tử ADN vòng tròn
- Số lượng gen: 4.000
- Phần trăm gen tương đồng với người: 8%
- Kích thước trung bình của gen: 1 kb, không có intron
- Các transposon: tùy chủng, ~ 60 bản sao/bộ gen

Kết thúc giải ký tự chuỗi: 1997

20.6.2.2- Các phương pháp phân tích di truyền

Ngoài các phương pháp lai để phân tích tái tổ hợp (recombination) và bổ trợ (complementation), có *nhiều kỹ thuật biến đổi di truyền* (Techniques of Genetic Modification):

- **Gây đột biến** (Mutagenesis):
 - ❖ Hóa chất và chiếu xạ: đột biến xoma ngẫu nhiên.
 - ❖ Dùng transposon: xen đoạn (Insertions) xoma ngẫu nhiên.
- **Chuyển gen** (Transgenesis):
 - ❖ Trên vector plasmid: tự do hay chèn vào (integratd).
 - ❖ Trên vector phage: tự do hay chèn vào (integratd).
 - ❖ Biến nạp: chèn vào.
- **Làm im lặng gen mục tiêu** (Targeted gen knockout):
 - ❖ Alen không (Null alen) trên vector: thay gen bằng tái tổ hợp.

- ❖ Alen được thiết kế (Engineered alen) trên vector: đột biến điểm định hướng (Site-directed mutagenesis) bằng thay gen.

20.6.2.3- *E.coli* là tế bào chủ căn bản của kỹ thuật di truyền

Các nghiên cứu trên *E. coli* đã làm cơ sở cho sự ra đời của kỹ thuật di truyền. *E. coli* đóng vai trò chủ yếu trong chuyển gen đến các sinh vật khác. Nó là sinh vật chuẩn để tạo dòng gen (cloning gens) của bất kỳ sinh vật nào. *E. coli* được coi là tế bào vật chủ đơn giản nhất trong công nghệ gen. Vi khuẩn *E. coli* dễ dàng chấp nhận nhiều loại vector chuyển gen như plasmid hay phage qua biến nạp hay tải nạp.

Những protein tái tổ hợp đầu tiên như insulin, xomatostatin và đến nay hàng trăm protein khác được tạo dòng ở *E. coli* đã đi vào sản xuất công nghiệp với thị trường hàng chục tỷ USD/năm.

20.6.2.4. Các đóng góp chủ yếu của *E.coli*

– **Đối tượng chủ yếu cho các nghiên cứu:**

- ❖ Sao chép, phiên mã, dịch mã và tái tổ hợp.
- ❖ Đột biến
- ❖ Điều hòa biểu hiện gen (Gen regulation).
- ❖ Kỹ thuật ADN tái tổ hợp (recombinant ADN technology).

– **Đóng góp cho nghiên cứu các lĩnh vực khác:** Trao đổi chất của tế bào (Cell metabolism), gen ức chế vô nghĩa (Nonsense suppressors), sự tuyến tính (Colinearity) giữa gen và polypeptit, các Operon, sự đề kháng thuốc dựa vào plasmid (Plasmid-bazod drug resistance) và sự vận chuyển tích cực (Active transport).

20.6.2.5- Các enzym và protein tham gia tổng hợp và cắt nucleic axit

Sao chép ADN được nghiên cứu rất chi tiết ở *E. coli*, mà phần chủ yếu đã nêu ở chương II. Ở đây, một số chi tiết được bổ sung, cụ thể là các phức hợp enzym tách mạch ADN mẹ và tổng hợp các mạch con (bảng 20.4). Hàng loạt các enzym và protein, mà phần lớn là các phức hợp protein đa phân, tham gia tổng hợp ADN, phiên mã tạo ARN. Cả tế bào nhân sơ lẫn nhân chuẩn đều có hoạt tính ADN polymeaz đa năng.

Một số *ADN polymeaz* hoạt động như những enzym độc lập, nhưng số khác (chủ yếu là *replicaz*) kết nhau thành phức hợp lớn nhiều protein. Tiểu phần (subunit) *tổng hợp* chỉ là một trong nhiều chức năng khác nhau của *replicaz* như tháo xoắn (unwinding), khởi sự tổng hợp mạch mới, ...

Bảng 20.4. Các enzym tham gia sao chép ADN ở vi khuẩn E. coli.

Enzym	Gen mã hoá	Chức năng
1. ADN polymeaz III	<i>polC</i> ; <i>ADNE, Q, N, X</i> ;	Enzym polyme hoá chủ yếu
2. ADN polymeaz I	<i>polA-E</i> ; <i>mutD</i> . <i>polA</i>	Cắt mỗi ARN, lấp chỗ trống
3. Helicaz	<i>ADNB</i>	Tháo xoắn ở chỗ ba sao chép
4. Primaz	<i>ADNG</i>	Tạo mỗi mạch ADN mới
5. Protein gắn điểm khởi sự (Origin-binding protein).	<i>ADNA</i>	Gắn điểm khởi sự sao chép (Ori); tạo thuận lợi cho mở tách mạch.
6. Protein căng mạch <i>SSB</i> (Single-strand binding protein)	<i>ssb</i>	Ngăn các mạch đơn đã tách không chập lại.
7. ADN ligaz	<i>ligA, ligB</i>	Nối các đầu hở trên ADN

Bảng 20.5- Các enzym ADN polymeaz ở vi khuẩn E. coli.

Enzym	Gen mã hoá	Chức năng
1. ADN polymeaz I	<i>polA</i> ; <i>ADNE, Q, N, X</i>	Enzym phục hồi chủ yếu. Cắt mỗi ARN và lấp kín khoảng trống

2. ADN polymeaz II	<i>holA-E; mutD.</i>	Enzym phục hồi phụ (minor).
3. ADN polymeaz III	<i>polB</i>	Replicaz, polyme hoá chủ yếu.
4. ADN polymeaz IV	<i>polC</i>	Phục hồi cấp cứu (SOS repair).
5. ADN polymeaz V	<i>ADNB</i> <i>umuD'₂C</i>	Phục hồi cấp cứu (SOS repair).

Ở *E. coli* đã tìm ra và biết chức năng của 5 loại ADN polymeaz (bảng 20.5).

Sự phân hủy nucleic axit cũng đòi hỏi enzym đặc hiệu:

– *Deoxyribonucleaz (ADNaz)* là enzym cắt các liên kết trong phân tử ADN. Nó có thể cắt mạch đơn hay kép. *Gyraz* là một loại enzym topoixomraz cắt ADN làm tháo xoắn.

– *Ribonucleaz (ARNaz)* là các enzym cắt ARN, có thể đặc hiệu đối với ARN mạch đơn hay mạch kép.

Các nucleaz chia thành 2 nhóm:

– *Exonucleaz* cắt từng nucleotit một từ đầu mút của mạch polynucleotit; chúng có thể đặc hiệu đối với đầu mút 5' hay 3' của ADN hay ARN.

– *Endonucleaz* cắt các liên kết bên trong mạch ADN; chúng có thể đặc hiệu đối với ARN hay ADN mạch đơn hoặc mạch kép.

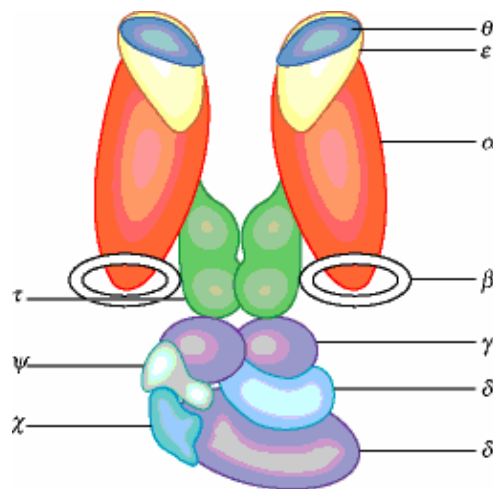
Cấu trúc và chức năng các tiểu phần của ADN polymeaz III:

Tất cả các *ADN polymeaz* cùng có những tính chất cấu trúc chung giống nhau. *Replicaz ADN pol III* là một holoenzym 900 kD (kilodalton), một phức hợp gồm hơn 10 phân tử protein (hình 6.12). Đặc biệt là protein

vòng β (β -ring) làm móc (clamp) bao ADN ở giữa để trượt về trước mà mạch đơn này không bị bong ra khi được chép.

Ngoài ra, ADN polymeaz phải có khả năng nhận biết 4 loại N như chất phản ứng phụ thuộc vào chỗ được "đọc" trên mạch khuôn.

Sao chép ADN ở *E. coli* diễn ra với tốc độ rất nhanh, có thể đạt đến 50.000 nucleotit/phút. Thật khó hình dung một quá trình phức tạp, được thực hiện chính xác, mà diễn ra với tốc độ nhanh như vậy, chưa kể đến việc làm sao các N tập trung với nồng độ cao đáp ứng kịp thời cho nhu cầu.



Hình 20.12-. Replicaz ADN pol III là một phức hợp gồm hơn 10 protein

20.6.3-Biến nạp (Transformation)

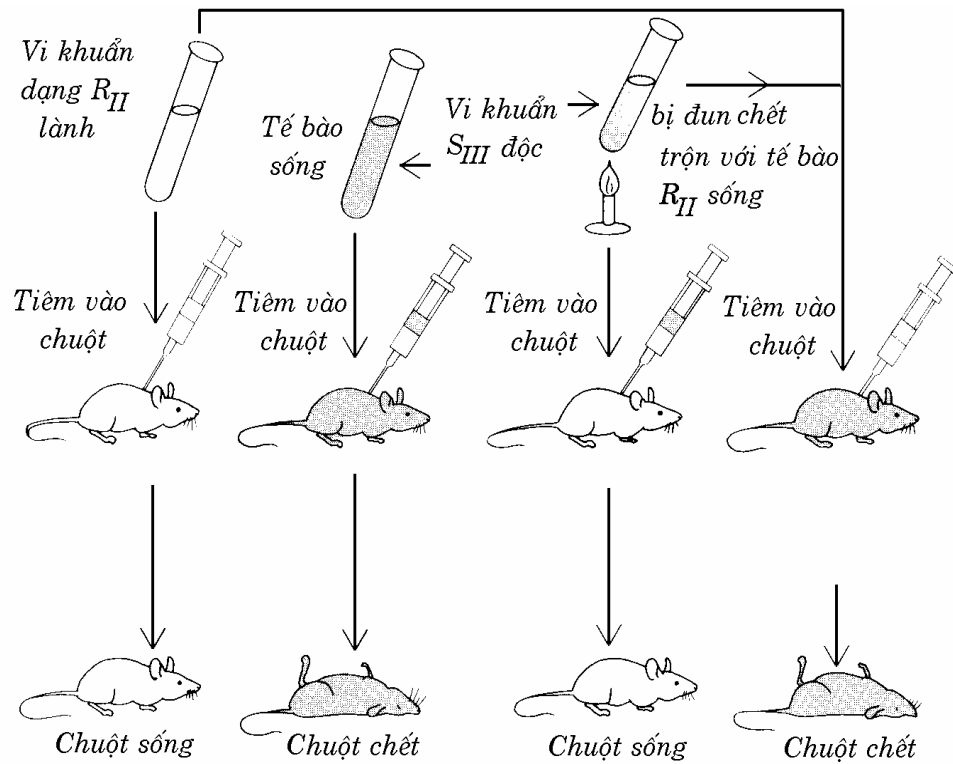
20.6.3.1- Hiện tượng và điều kiện

Hiện tượng **biến nạp** được Griffith phát hiện ở vi khuẩn *Diplococcus pneumoniae* (nay gọi là *Streptococcus pneumoniae* - phế cầu khuẩn gây sưng phổi ở động vật có vú) vào năm 1928. Phát hiện này và các nghiên cứu về cơ chế biến nạp có ý nghĩa lịch sử cho sự ra đời của Sinh học phân tử.

Vi khuẩn này có 2 dạng khác nhau:

- Dạng **S_{III}**, gây bệnh có vỏ bao tế bào (capsule) bằng polysaccharid cản trở bạch cầu phá vỡ tế bào. Dạng này tạo đốm mọc (khuẩn lạc) láng (Smooth-láng) trên môi trường agar.
- Dạng **R_{II}**, không gây bệnh, không có vỏ bao, tạo đốm mọc nhăn (Rough-nhăn).

Thí nghiệm tiến hành như mô tả trên hình 20.13.



Hình 20.13. Hiện tượng biến nạp.

- Tiêm vi khuẩn S sống gây bệnh cho chuột - chuột chết.
- Tiêm vi khuẩn R sống không gây bệnh - chuột sống.
- Tiêm vi khuẩn S bị đun chết cho chuột - chuột sống.
- Hỗn hợp vi khuẩn S bị đun chết trộn với vi khuẩn R sống đem tiêm cho chuột - chuột chết. Trong xác chuột chết có vi khuẩn S và R .

Hiện tượng trên cho thấy vi khuẩn S không thể tự sống lại được sau khi bị đun chết, nhưng các tế bào chết này đã *truyền tính gây bệnh* cho tế bào R. Nó được gọi là *biến nạp* (transformation). Năm 1944, T.Avery, McLeod và McCarty đã tiến hành thí nghiệm xác định rõ tác nhân gây biến nạp. Nếu các tế bào S bị xử lý bằng *protease* (enzym phân hủy protein) hoặc *ARN-az* (enzym phân hủy ARN) *hoạt tính biến nạp vẫn còn*, chứng tỏ protein và ARN không phải là tác nhân gây biến nạp. Nhưng nếu tế bào S chết bị xử lý bằng *ADN-az* (enzym chỉ phân hủy đặc hiệu ADN) thì *hoạt tính biến nạp không còn nữa*, chứng tỏ *ADN là nhân tố biến nạp*. Kết quả thí nghiệm có thể tóm tắt như sau:

ADN của S + các tế bào R sống → chuột → chết (có R + S)

Hiện tượng biến nạp là một chứng minh sinh hóa xác nhận rằng ADN mang tín hiệu di truyền.

Như vậy, biến nạp là hiện tượng truyền thông tin di truyền bằng ADN. Trong biến nạp, ADN trần từ một tế bào vi khuẩn (thể cho) này được truyền sang tế bào vi khuẩn khác (thể nhận). Biến nạp xảy ra khi vi khuẩn nhận ADN ngoại lai và hấp thu vào trong tế bào. Khi tế bào vi khuẩn bị vỡ do bị tan (lysis), ADN vòng tròn của chúng thoát ra môi trường thành các đoạn thẳng với chiều dài khác nhau, có khả năng gây biến nạp cho các tế bào nhận khác.

Biến nạp được nghiên cứu kỹ nhất ở các vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae* và ở một số nhóm vi khuẩn khác.

Hiệu quả của biến nạp phụ thuộc vào 3 yếu tố:

- Tính dung nạp của tế bào nhận.
- Kích thước của đoạn ADN ngoại lai.
- Nồng độ của ADN

20.6.3.2- Tính dung nạp của tế bào nhận

Một điều quan trọng của biến nạp là tế bào nhận phải có trạng thái sinh lý đặc biệt được gọi là *khả năng dung nạp hay khả năng (competence)*. Tế bào có khả năng hấp thu ADN ngoại lai và được biến nạp (transformable) gọi là *khả năng (competent)* và đây là tính trạng di truyền. Thậm chí trong các chi (genra) biến nạp, chỉ một số chủng (strains) hay loài là được biến nạp. Tính

khả nạp trong phần lớn các vi khuẩn biến nạp tự nhiên (naturally transformable) được kiểm soát (regulated) và các protein đặc hiệu tham gia vào hấp thu và tác động đến ADN. Các protein đặc hiệu khả nạp đó gồm *protein gắn ADN liên kết màng* (membrane-associated ADN-binding protein), *autolysin* vách tế bào và các *nucleaz* khác nhau. Ở loài *Bacillus subtilis* dễ biến nạp, các tế bào sản sinh và tiết ra một peptit nhỏ trong quá trình tăng trưởng và sự tích lũy nồng độ cao của peptit này biến tế bào thành khả nạp. Ở *Bacillus*, chỉ 20% tế bào biến thành khả nạp và ở trạng thái này trong vài giờ. Trong khi đó, ở *Streptomyces*, 100% tế bào có thể thành khả nạp, nhưng chỉ trong một thời kỳ ngắn của chu trình tế bào.

Biến nạp tự nhiên hiệu quả cao được phát hiện chỉ ở một ít loài vi khuẩn như *Acinobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria* và *Thermus*. Ngược lại, *E. coli* và nhiều loài vi khuẩn khó biến nạp trong điều kiện tự nhiên.

Tuy nhiên, có thể gây ra sự dung nạp bằng xử lý hóa chất hay tạo những điều kiện nhất định cho sự tăng trưởng của tế bào. Khi xử lý tế bào *E. coli* với ion canxi nồng độ cao, chúng trở thành khả nạp và biến nạp các plasmid thực hiện có hiệu quả.

Những tế bào dung nạp trên bề mặt có các *nhân tố dung nạp* (competence factor). Chúng đã được tinh sạch một phần và nghiên cứu ở nhiều loại vi khuẩn. Ở *Streptococcus* (trước đây gọi là *Diplococcus*) *pneumoniae* đã trở thành dung nạp có 30 đến 80 điểm nhận trên tế bào có khả năng gắn với ADN mạch kép hầu như của bất kì nguồn nào. Mặt khác, *Haemophilus influenzae* có một số lượng hạn chế từ 4 đến 8 điểm nhận (receptors), mà những điểm nhận này trước tiên nhận biết ADN mạch kép có các cặp bazơ trình tự như sau: 5'AAGTGCGGTCA-3' được gọi là “*điểm hấp thụ*” (uptake site). Sự kiện là các điểm hấp thụ này đặc biệt chung ở ADN của *Haemophilus* (trên bộ gen có khoảng 600 điểm như vậy) và tương đối hiếm ở ADN của các loài khác đã giải thích vì sao *Haemophilus* chỉ biến nạp giới hạn với các vi khuẩn trong loài.

Phần lớn các vi khuẩn chỉ dung nạp trong một giai đoạn giới hạn của chu trình sống. Trong giai đoạn dung nạp, tế bào tổng hợp một hay nhiều protein được gọi là “*các nhân tố dung nạp*”, chúng biến đổi màng tế bào để

có thể gắn với đoạn ADN ngoại lai. Như vậy, các điểm thụ thể chỉ hiện diện trong giai đoạn *dung hợp*.

20.6.3.3- Sự hấp thu ADN

Trong biến nạp, vi khuẩn khả nạp gắn thuận nghịch với ADN. Các tế bào khả nạp có thể gắn ADN nhiều hơn cả 1000 lần so với tế bào không khả nạp.

Điều kiện quan trọng thứ hai để thực hiện được biến nạp là ADN phải có *mạch kép* và đoạn biến nạp phải có trọng lượng phân tử tối thiểu là 400.000 dalton (lớn khoảng 1/200 bộ gen của vi khuẩn), dĩ nhiên đây không phải là giới hạn cao nhất. Số lượng tế bào được biến nạp (transformants - thể biến nạp) tăng tỉ lệ thuận với nồng độ của ADN cho đến lúc mà các *điểm thụ thể* (receptor sites) bão hòa do các đoạn ADN gắn vào (thường khoảng 10 đoạn/tế bào). Ở *Streptococcus pneumoniae* mỗi tế bào có thể gắn khoảng 10 phân tử ADN mạch kép dài 10 – 15 kbp (kilobazơ pairs)/phân tử. ADN được hấp thụ vào tế bào và bị enzym cắt làm giảm trọng lượng phân tử còn khoảng 8 kbp/phân tử và mạch đơn.

Mật độ ADN tối thiểu để có thể phát hiện biến nạp là 0,01 ng/ml, một con số thấp đến nỗi không thể phát hiện bằng phương pháp hóa học.

Điều thú vị là trong biến nạp ở *Haemophilus influenzae*, đoạn ADN phải có chuỗi ký tự 11 bp chuyên biệt để xảy ra quá trình gắn không đảo ngược và thu nhận ADN. Chuỗi này được tìm thấy với tần suất cao bất thường ở bộ gen của *Haemophilus*, bộ gen đã được giải ký tự chuỗi hoàn toàn. Bằng chứng này và việc một số vi khuẩn nào đó có thể biến nạp trong môi trường tự nhiên làm cơ sở cho giả thiết là *biến nạp* không chỉ xảy ra trong phòng thí nghiệm mà còn đóng vai trò quan trọng trong việc truyền gen cho thế hệ sau trong *tự nhiên*. Bằng cách tăng cường trao đổi gen, những vi khuẩn *khả biến tự nhiên* tăng *tính đa dạng* và *tính thích ứng*.

20.6.3.4- Đoạn ngoại lai và đoạn nội tại

Khi ADN mạch kép xâm nhập vào tế bào, một mạch bị phân hủy. Bất kì đoạn ADN nào từ tế bào cho xâm nhập tế bào nhận, được gọi là *đoạn ngoại lai* (exogenote), ADN nguyên vẹn của tế bào nhận gọi là *đoạn nội tại* (endogenote). Tế bào vi khuẩn nhận đoạn ngoại lai sẽ lưỡng bội ở một phần

bộ gen, được gọi là *hợp tử từng phần* (merozygote). Tuy nhiên, đoạn ngoại lai mạch đơn không bền vững và bị phân hủy nếu không được gắn vào bộ gen thể nhận. Quá trình trao đổi thông tin di truyền bằng chuyển chỉ một phần vật liệu di truyền từ tế bào này sang tế bào khác được gọi là sự *giao nạp từng phần* (meromixis). Có người cho rằng đoạn ngoại lai đơn mạch được gắn với protein (như protein Rec-A ở *E. coli*), protein này hỗ trợ tìm vùng bổ sung trên đoạn nội tại, làm đứt mạch và gắn đoạn ngoại lai. Các enzym sẽ cắt các đầu tự do (của cả thể cho và thể nhận) và ligaz hàn kín lõm trống. Khi đoạn ngoại lai đã gắn vào đoạn nội tại thì tế bào không còn là hợp tử từng phần nữa.

Nếu đoạn ngoại lai chứa một alen với đoạn nội tại, thì mạch kép tái tổ hợp sẽ có một hay nhiều chỗ *bất cặp sai* (mismatch bazơ pairs) và đoạn ADN này được gọi là *heteroduplex*. Nếu các tế bào con nhận alen mới, sửa sai (mismatch repair) được thực hiện bằng cách cắt đoạn nội tại và dùng mạch ngoại lai làm khuôn để thay thế. Sự gắn đoạn ngoại lai vào ADN tế bào nhận được thực hiện nhờ *tái tổ hợp tương đồng* (xem sau).

Hai hoặc nhiều hơn các gen liên kết chặt có thể nằm trong đoạn ADN biến nạp. Nếu sự xâm nhập của hai hay nhiều gen vào đoạn nội tại, thì tế bào nhận sẽ được *đồng biến nạp* (cotransformed). Tần số của đồng biến nạp tỉ lệ nghịch tương ứng với khoảng cách giữa các gen cùng biến nạp.

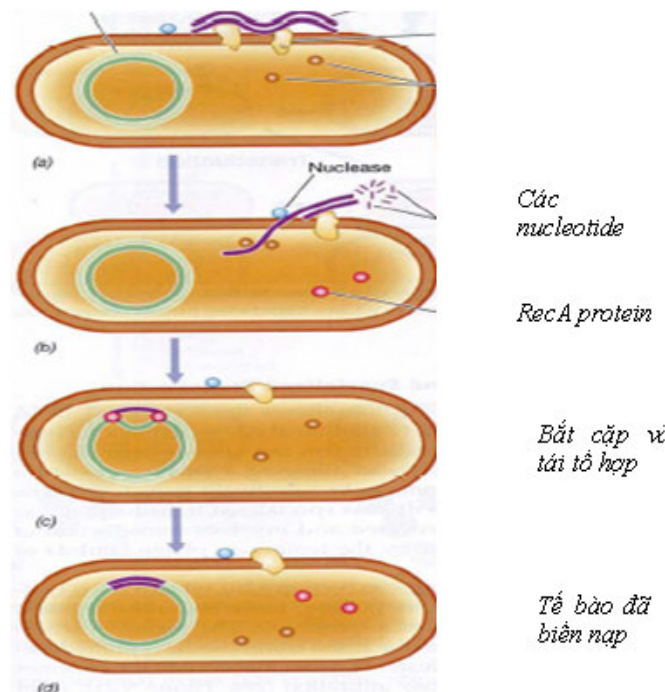
20.6.3.5- Cơ chế phân tử

Diễn biến của quá trình biến nạp ở cấp độ phân tử được tóm tắt trên sơ đồ hình 20.14. Để dễ hiểu, các giải thích dựa theo ADN của các dòng vi khuẩn S và R trong thí nghiệm của Griffith. Quá trình gồm các giai đoạn chủ yếu:

- **Sự phân hủy ADN tế bào cho:** ADN tế bào cho có thể là của tế bào tự nhiên bị phân hủy hoặc trong thí nghiệm bị gây chế bằng nhiệt độ cao hay tác nhân phá vỡ tế bào.
- **ADN bám vào bề mặt tế bào:** Protein gắn vào ADN.

– **Thâm nhập của ADN:** Sợi ADN mạch kép của dòng vi khuẩn S sau khi chui qua màng tế bào của dòng R thì một mạch S sẽ bị **nucleaz** của tế bào cắt, còn lại một mạch nguyên.

– **Bắt cặp (Synapsis) và tái tổ hợp:** Nhờ sự hỗ trợ của *protein RecA* ADN của thể nhận R sẽ biến tính tách rời 2 mạch ở 1 đoạn để bắt cặp với đoạn ADN thể cho S vừa chui vào.



Hình 20.14-. Sơ đồ diễn biến của quá trình biến nạp ở cấp độ phân tử

a. ADN bám vào. b. Thâm nhập. c. Bắt cặp và tái tổ hợp. d. – Tế bào biến nạp

Sao chép: Sau khi bắt cặp tạo đoạn lai R - S, phân tử ADN sao chép tạo ra 2 sợi, một sợi kép R-R và sợi kép khác có mang đoạn ADN thể nhận S-S. Kết quả cuối cùng là đoạn gen của SIII chèn vào bộ gen tế bào nhận. Sau phân bào thì một dòng tế bào nhận được ADN ngoại lai vào bộ gen - tế bào được biến nạp. Tế bào đã được biến nạp sinh sản tạo dòng nhận RII mới.

20.6.4-Tải nạp (Transduction)

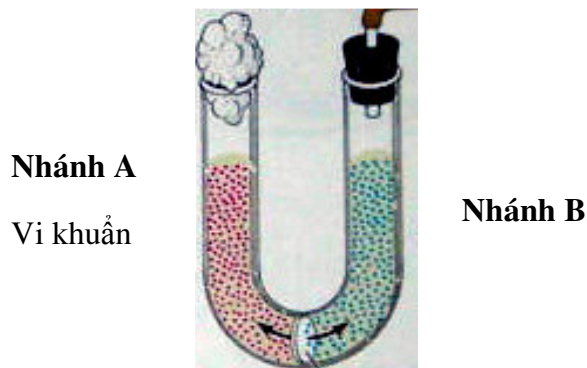
Việc tìm ra biến nạp đã thúc đẩy nghiên cứu dẫn đến phát minh ra tải nạp, là hiện tượng truyền ADN qua **trung gian virus** từ tế bào cho đến tế bào nhận. Có hai kiểu tải nạp: chung và chuyên biệt.

Trong tải nạp (*transduction*), các virus mang các gen từ tế bào này sang tế bào khác. Ở chu trình tan (*lytic cycle*), một số bacteriophage gói nhầm ADN vi khuẩn chủ vào capsid. Tế bào bị nhiễm bởi các virus như vậy nhận đoạn ADN của vi khuẩn A khác, chứ không phải ADN của virus. Do vậy, ADN vi khuẩn A tái tổ hợp với ADN nhiễm sắc thể của tế bào chủ B và biến đổi thành phần di truyền (*genetic composition*).

20.6.4.1- Phage là nhân tố chuyển gen

Thí nghiệm được tiến hành trong ống hình chữ U, ở đáy ống được ngăn cách bằng màng lọc vi khuẩn. Màng có lỗ nhỏ vi khuẩn không qua được, nhưng phage qua được (hình 20.15). Nhánh A của ống chứa vi khuẩn có khả năng tổng hợp tryptophan (trp^+), còn nhánh B nuôi các vi khuẩn mất khả năng tổng hợp tryptophan (trp^-). Sau một thời gian nuôi bên nhánh B xuất hiện vi khuẩn có khả năng tổng hợp tryptophan (trp^+). Qua nhiều lần thí nghiệm việc phage tải gen trp^+ từ nhánh A sang nhánh B được chứng minh.

Màng lọc vi khuẩn



Hình 20.15-. Thí nghiệm chứng minh có tải nạp do virus

20.6.4.2- Tải nạp chung (Genral transduction)

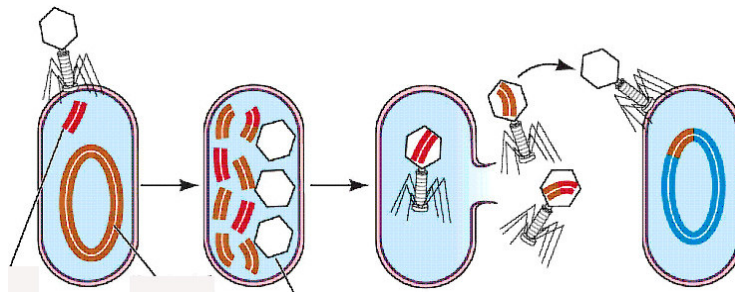
Tải nạp chung xảy ra khi phage mang *bất kì gen nào* của vi khuẩn A chuyển sang vi khuẩn B.

Tải nạp chung (genralized transduction) có các đặc điểm:

- Thường do *phage kiểu P1* thực hiện.
- *Bất kì gen nào* của vi khuẩn cũng đều được tải nạp.
- Tải nạp có được do *gói nhậm ADN* của tế bào chủ khi phage trưởng thành.
- Các *thể tái tổ hợp đơn bội* được tạo ra.

Do không có sự tương đồng giữa trình tự ADN trên các phage này với trình tự ở tế bào chủ, nên không có điểm gắn vào đặc hiệu cho prophage. Bất kì gen nào cũng được tải nạp vì đầu của phage có thể *gói nhậm* vào một đoạn ADN của tế bào chủ. Sự *đồng tải nạp* (cotransduction) là quá trình tải nạp đồng thời 2 gen.

Quá trình phage xâm nhập vào vi khuẩn và sinh sản được mô tả trên hình 20-16. Đầu tiên phage bám trên bề mặt của vi khuẩn, sau 4 phút bơm ADN của nó vào tế bào, sau đó chúng sinh sản và độ nửa giờ sau thì *làm tan* vi khuẩn và giải phóng các phage con mới.



ADN phage Nhiễm sắc thể vi khuẩn A Capsid Phage mới phá vỡ tế bào, nhiễm VK
B

Hình 20.16-. *Quá trình xâm nhập của phage và làm tan vi khuẩn*

Khi ADN của phage xâm nhập tế bào vi khuẩn A, chúng *cắt ADN của vi khuẩn A* thành nhiều đoạn, đồng thời ADN của phage được *sao chép* thành nhiều phân tử con và các vỏ capsid của phage cũng được tạo thành. Sau đó các *vỏ capsid được lắp ruột ADN* vào, phá vỡ tế bào vi khuẩn ra ngoài và tiếp tục xâm nhập các vi khuẩn mới. Trong quá trình lắp ráp khoảng *1-2% phage*

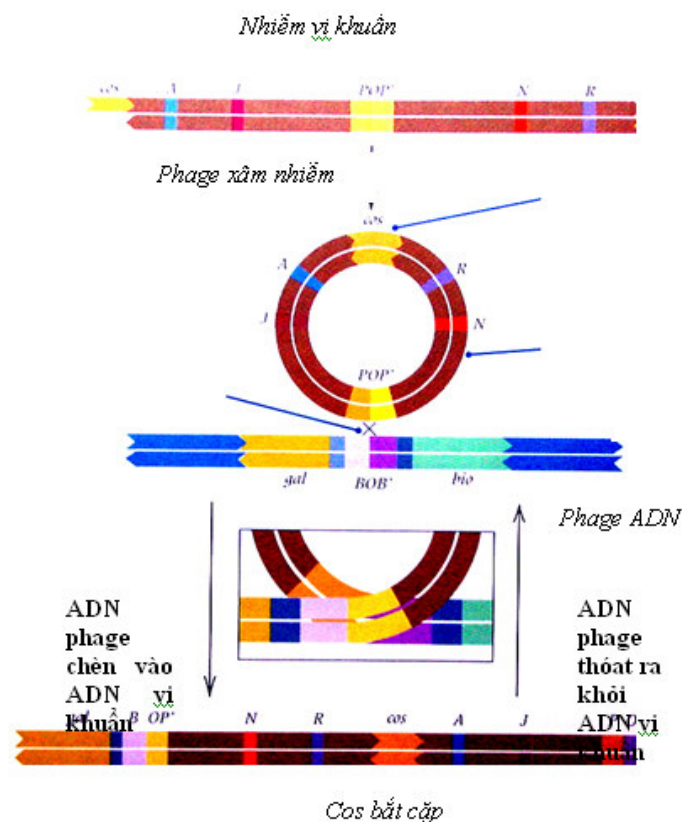
vô tình mang đoạn ADN của vi khuẩn có chứa gen. Phage mang gen của vi khuẩn A xâm nhập vi khuẩn B, quá trình tái tổ hợp xảy ra làm gen A gắn vào bộ gen B.

20.6.4.3- Tải nạp chuyên biệt (*Special transduction*)

Tải nạp chuyên biệt hay *hạn chế* (restricted transduction) là trường hợp chỉ mang một vài gen nhất định, nó có 4 đặc điểm:

- Những gen được chuyển nằm sát chỗ *prophage* gắn vào.
- Chỉ *prophage* kiểu λ thực hiện.
- Do kết quả sự cắt sai của *prophage* khi tách khỏi nhiễm sắc thể của tế bào chủ.
- Các vi khuẩn tái tổ hợp có thể lưỡng bội một phần.

Ví dụ: Phage λ chỉ mang gen *gal* (đồng hóa đường galactoz) từ vi khuẩn này chuyển sang vi khuẩn khác.



Hình 20.17: Điểm gắn của phage λ vào bộ gen vi khuẩn

Điểm gắn của phage λ vào bộ gen của vi khuẩn nằm giữa 2 gen *gal* (galactoz) và *bio* (tổng hợp biotin), tiếp theo xảy ra quá trình *tái tổ hợp ở điểm chuyên biệt* (site-specific recombination) chèn ADN của phage vào Nhiễm sắc thể vi khuẩn (hình 20.17). Đầu của phage chỉ có thể chứa một lượng ADN giới hạn, nó chỉ tải nạp được gen *gal* hoặc *bio*. Phage λ tải nạp các gen galactoz được gọi là λgal hay λdg (d = defective: khuyết, g = galactoz). Nếu tế bào gal^- được nhiễm bởi λdg (mang gen gal^+), sự ráp phage biến dạng vào tế bào chủ sẽ tạo *lượng bội một phần*. Sự *cắt sai* của phage λ rất hiếm nên tải nạp hạn chế có *tần số thấp*.

Tuy nhiên, tải nạp tần số cao có thể nhận được trong điều kiện thí nghiệm. Nếu tế bào vi khuẩn được gây nhiễm kép với phage λ hoang dại và phage λdg , phage hoang dại có thể hỗ trợ chức năng sai sót ở phage biến dạng, và thế hệ con sẽ có cả 2 kiểu với số lượng bằng nhau. Khi dịch tan được dùng tải nạp, quá trình được gọi là *tải nạp tần số cao*.

Trong nhiều trường hợp, do bộ gen biến dạng λdg không gắn được vào bộ gen của tế bào chủ (nên không sao chép được). Sau mỗi lần phân bào, chỉ một trong 2 tế bào có bộ gen của phage biến dạng; quá trình này được gọi là *tải nạp sảy* (abortive transduction).

20.6.5- Giao nạp (Conjugation)

Vào năm 1946, J. Lederberg và E. Tatum chứng minh có trao đổi vật chất di truyền giữa các vi khuẩn sống. Sự trao đổi này gọi là giao nạp hay tiếp hợp (conjugation). Giao nạp ở vi khuẩn là sự kết hợp nhất thời của hai tế bào có kiểu bắt cặp đối nhau, được tiếp nối bằng sự chuyển một phần vật chất di truyền từ tế bào cho sang tế bào nhận qua cầu tế bào chất, và sau đó các tế bào tách nhau ra (exconjugants). Giao nạp đòi hỏi sự tiếp xúc trực tiếp giữa 2 loại tế bào được khởi sự bằng ống giao nạp hay tính mao (pilus), một sợi ống nhỏ rất dài do tế bào cho (donor cell) tạo ra (hình 20.18).



Hình 20.18-. Hai tế bào vi khuẩn giao nạp qua cầu tế bào chất pilus

ADN được truyền qua một cầu tế bào chất mỏng (a thin cytoplasmic bridge) gọi là ống giao nạp (conjugation tube). Kiểu sao chép sigma (σ) được tế bào vi khuẩn sử dụng trong giao nạp để truyền phân tử ADN dạng thẳng sang tế bào khác. Khi đoạn ADN vào bên trong tế bào nhận (recipient cell), nó thực hiện tái tổ hợp với các gen tương đồng (homologous gens).

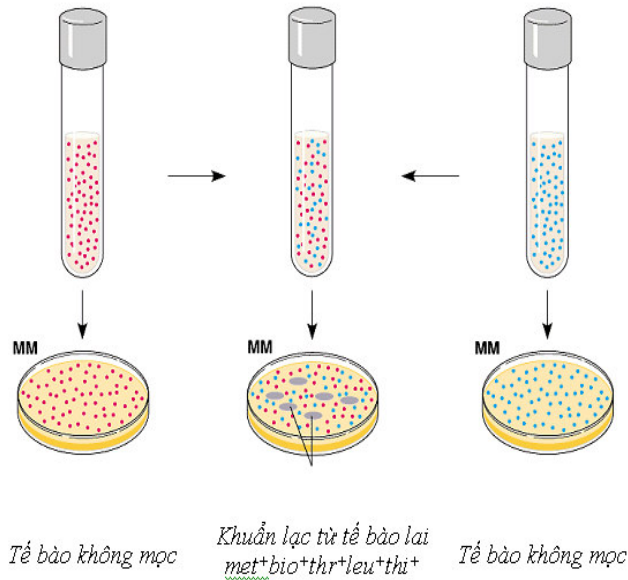
Về thuật ngữ, nhiều tác giả dùng “tiếp hợp” để chỉ quá trình này, theo chúng tôi, dùng “giao nạp” tốt hơn, vì phản ánh được bản chất của quá trình, nhất quán với biến nạp, tải nạp ở vi khuẩn và khỏi nhầm lẫn với tiếp hợp của nhiễm sắc thể.

20.6.5.1- Chứng minh có hiện tượng lai ở vi khuẩn

Vào năm 1946, J.Lederberg và E.Tatum đã sử dụng các dòng đột biến khuyết dưỡng khác nhau ở *E.coli* để chứng minh có tái tổ hợp giữa các dòng vi khuẩn khác nhau. Cụ thể dòng A có kiểu gen $met^- bio^- thr^+ leu^+ thi^+$ (có khả năng tổng hợp threonin, leuxin và vitamin B₁ (thiamin) và không tổng hợp được metionin và biotin), còn ở dạng B thì ngược lại có khả năng tổng hợp metionin và biotin với kiểu gen $met^+ bio^+ thr^- leu^- thi^-$. Trộn A và B trong ống nghiệm, sau đó cấy lên một môi trường tối thiểu (Minimal medium - MM). Các khuẩn lạc mọc trên môi trường tối thiểu chứng tỏ có các dạng lai, chúng chỉ mọc lên được nhờ sự bù đắp cho nhau các nhu cầu dinh dưỡng. Dạng lai có kiểu gen $met^+ bio^+ thr^+ leu^+ thi^+$ mọc được trên môi trường tối thiểu. Trong khi đó từng dạng A hoặc B riêng lẻ không mọc được trên MT tối thiểu (hình 20.19).

Dòng A = $met^- bio^- thr^+ leu^+ thi^+$ × dòng B = $met^+ bio^+ thr^- leu^- thi^-$

Dạng lai $met^+bio^+thr^+leu^+thi^+$ mọc thành khuẩn lạc, mỗi dạng riêng lẻ không mọc thành khuẩn lạc.



Hình 20.19-. Sơ đồ lai vi khuẩn (MM: môi trường tối thiểu)

20.6.5.2- Sự phân hóa giới tính ở vi khuẩn

Năm 1953, Hayes đã phát hiện ở vi khuẩn có các dạng khác nhau tương tự giống “đực” và “cái” ở sinh vật bậc cao. Các dạng đó được kí hiệu F^+ và F^- (từ chữ Fertility - hữu thụ). F^+ tương tự giống đực có ở sinh vật bậc cao, nó truyền gen sang F^- . Tần số lai $F^+ \times F^-$ khoảng 10^{-6} tức là 1 triệu tế bào sẽ có 1 tế bào lai.

a) Epixom và plasmid

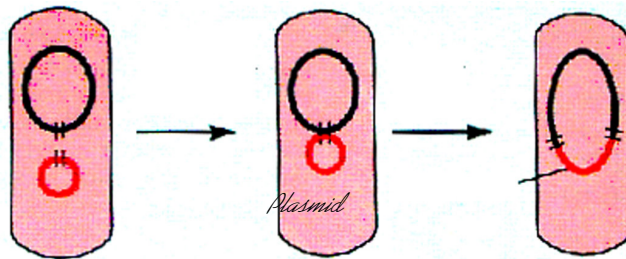
Khi tiếp xúc với F^+ một thời gian tế bào F^- trở thành F^+ . Về sau dạng *Hfr* (High frequency of recombination) được phát hiện, dạng này có tần số lai với F^- cao hơn F^+ có thể đến 10^4 lần.

Khi F^+ tiếp xúc với F^- một thời gian, F^- biến thành F^+ do nó nhận được một phần tử di truyền gọi là *epixom*. *Epixom* F^+ là phần tử di truyền ngoài nhiễm sắc thể, có thể tồn tại hoặc ở dạng phân tử ADN vòng tròn tự sao chép hoặc gắn vào phân tử ADN của tế bào chủ (ví dụ như *phage* λ). *Epixom* F^+ được gọi là *nhân tố giới tính* (sex-factor).

Plasmid lúc đầu được định nghĩa là phân tử ADN vòng tròn nhỏ có khả năng sao chép độc lập với nhiễm sắc thể tế bào chủ và không có khả năng gắn

vào nhiễm sắc thể tế bào chủ. Plasmid có thể mang một số gen khác nhau như đề kháng thuốc (ví dụ, *plasmid R* đề kháng nhiều thuốc kháng sinh),... Hiện nay “*plasmid*” được dùng cho cả hai nghĩa là *epixom* lẫn *plasmid*. Các plasmid có thể tồn tại độc lập hoặc gắn vào bộ gen vi khuẩn. Về sau người ta phát hiện ở vi khuẩn còn có nhiều plasmid khác. Bản chất di truyền của các dòng F^- , F^+ và Hfr được xác định do các plasmid như sau:

- F^- không chứa plasmid.
- F^+ chứa plasmid ở dạng tự do không gắn vào bộ gen vi khuẩn.
- Hfr - plasmid được gắn vào bộ gen vi khuẩn (hình 20.20).



Tế bào F^+ Plasmid gắn với Nhiễm sắc thể Tế bào Hfr

Hình 20.20-. Quá trình chèn ADN plasmid vào ADN Nhiễm sắc thể tế bào vi khuẩn

b) Các nhân tố F' và tính nạp (*sexduction*)

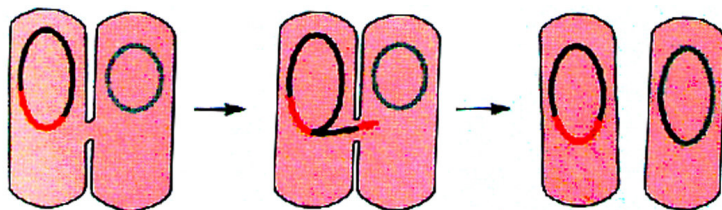
Sự cắt rời nhân tố F từ nhiễm sắc thể của dòng Hfr nhiều khi không chính xác và lúc đó một đoạn bộ gen của vi khuẩn thay thế một phần của F. Trong trường hợp này, *nhân tố F'* được tạo thành và nó có khả năng chuyển gen của vi khuẩn một cách độc lập, nhưng với các tính trạng của tế bào cho. Hiện tượng này được gọi là *tính nạp* (*sexduction*), có nghĩa là sự chuyển gen kèm theo nhân tố giới tính. Nhờ tính nạp có thể nhận được các thể *lưỡng bội từng phần* (*merodiploid*) theo các gen được gắn vào F^+ . Do vậy, có thể nghiên cứu mối *trương quan alen* và các hiệu quả do sự gia tăng *liều lượng gen* ở vi khuẩn.

20.6.5.3- Tái tổ hợp

Muốn xảy ra tái tổ hợp thì 2 dòng vi khuẩn phải tiếp xúc với nhau ($F^+ \times F^-$) hoặc ($Hfr \times F^-$). Dòng tế bào mang nhân tố F^+ được coi là tế bào “*đực*” và

có khả năng tạo protein *pilin*, từ protein này tạo ống giao nạp là *pilus*. Sự co lại của pilus đang nối hai tế bào làm chúng tiếp xúc kề nhau. Tế bào F^- được coi là cái (female). Sau khi giao nạp tế bào F^- trở thành F^+ .

Việc chuyển gen chỉ thực hiện khi *plasmid* gắn vào bộ gen của vi khuẩn. Trong quá trình chuyển vật chất di truyền sang F^- thì ADN của tế bào chủ sao chép và mạch mới có *ori* đi đầu và F ở cuối (hình 20.21). Quá trình chuyển ADN từ F^+ sang F^- có thể bị ngắt quãng.



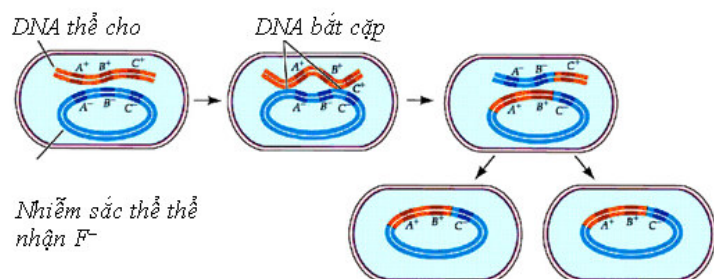
Hfr X F⁻ Sao chép ADN truyền cho F⁻ Hfr F⁻ tái tổ hợp

Hình 20-21. Sự truyền ADN từ thể cho sang thể nhận

Các gen A, B, C được chuyển một chiều từ Hfr sang F^- . Đoạn gen thể cho bắt cặp với các gen tương đồng của ADN tế bào F^- và diễn ra trao đổi chéo tạo tế bào F^- tái tổ hợp (hình 20.22).

Dòng Hfr có tần số lai cao hơn nhiều vì plasmid đã nằm sẵn trong bộ gen. Còn F^+ phải qua giai đoạn plasmid gắn vào bộ gen rồi mới chuyển gen.

Trong điều kiện thí nghiệm ở 37°C , nguyên bộ gen của tế bào *E. coli* được chuyển sang tế bào nhận trong vòng 90 phút. Thường sự giao nạp bị ngắt giữa chừng do các *pilus* bị gãy, nên ít khi bộ gen được chuyển nguyên vẹn vào tế bào nhận. Lúc đó tế bào F^- vẫn là F^- . Bằng cách ngắt quãng giao nạp bản đồ di truyền của *E.coli* được xây dựng và có dạng 1 vòng tròn.



Hình 20.22- Đoạn ADN từ thể cho trao đổi chéo với ADN thể nhận tạo F⁻ tái tổ hợp

20.6.6- Lập bản đồ di truyền nhiễm sắc thể của vi khuẩn

20.6.6.1- Giao nạp ngắt quãng (*Interrupted conjugation*)

Khi trộn dịch tế bào Hfr với F^- , sự tiếp hợp có thể bị ngắt quãng vào thời điểm tùy ý bằng rung lắc mạnh. Mẫu được pha loãng nhanh và cấy lên môi trường chọn lọc. Ngoài ra, dòng Hfr phải có gen đánh dấu hay khuyết dưỡng để chúng không mọc được trên môi trường chọn lọc và chỉ có các dạng tái tổ hợp mọc lên. Sự truyền ADN của Hfr sang F^- có tính phân cực, các gen ở đầu sang trước và lần lượt các gen khác theo sau. Nhờ ngắt quãng có thể xác định được thời gian mà một gen được truyền sang F^- và khoảng cách giữa chúng.

Ví dụ, dòng Hfr có mang các *gen nguyên dưỡng* (prototrophic) đánh dấu a^+ , b^+ , c^+ được trộn với dòng F^- mang các *alen khuyết dưỡng* a, b, c . Sự tiếp hợp được ngắt quãng với khoảng cách 5 phút và pha loãng cấy lên môi trường chọn lọc (ví dụ, môi trường tối thiểu). Kết quả như sau:

Thời gian (phút)	Các thể tái tổ hợp
5	$a^+ b^+ c$
10	$a^+ b^+ c^+$
15	$a^+ b^+ c^+$

Trình tự gen ở dòng Hfr là $b^+ - c^+ - a^+$; b cách đầu mót truyền sang ít hơn 5 phút; c ít hơn 10 phút; a ít hơn 15 phút. Ở đây đơn vị thời gian là phút.

20.6.6.2- Giao nạp không ngắt quãng (*Uninterrupted conjugation*)

Nếu không rung mạnh để ngắt quãng nhân tạo, cầu tế bào chất giữa hai gen càng gần ori (ở đầu của ADN thể cho), xác suất được chuyển sang tế bào nhận càng lớn. Tần số của các gen xuất hiện ở dạng tái tổ hợp trong thể nhận, được phát hiện trên môi trường chọn lọc, tỉ lệ nghịch với khoảng cách so với gen đánh dấu ở đầu. Các gen có nhiều dạng tái tổ hợp xuất hiện thì càng nằm gần phía đầu được chuyển sang tế bào nhận.

Khoảng cách giữa các gen có thể tính bằng 3 loại đơn vị: đơn vị thời gian, đơn vị tái tổ hợp và đơn vị cặp bazơ.

Ví dụ: Nếu một phút giao nạp tương đương 20 đơn vị tái tổ hợp ở E.coli, và nguyên nhiễm sắc thể(ADN) được chuyển sang trong 100 phút, thì tổng chiều dài là 2000 đơn vị tái tổ hợp. Nếu ADN có 10^7 cặp nucleotit, thì 1 đơn vị tái tổ hợp bằng $10^7/2000 = 5000$ bp.

20.6.6.3- Lập bản đồ bằng tái tổ hợp

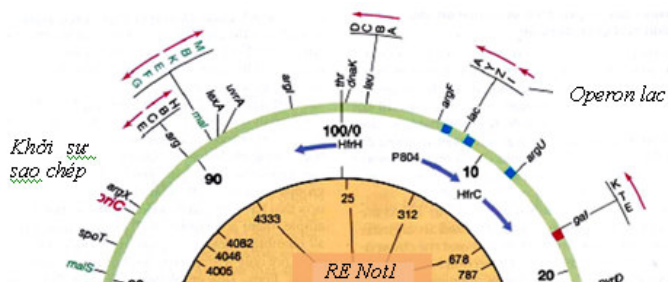
Đặc điểm của tái tổ hợp ở vi khuẩn là chỉ một phần bộ gen được chuyển sang tế bào nhận. Một hay nhiều gen có thể được gắn vào nhiễm sắc thể tế bào nhận nhờ giao nạp và phụ thuộc độ dài đoạn truyền sang. Exogenote phải được gắn vào nhiễm sắc thể nhận thì mới được sao chép và chia về các tế bào trong dòng. Chỉ một đoạn ngắn ADN thường được gắn nhờ biến nạp và tải nạp. Như vậy, nếu hai gen cùng biến nạp (cotransformation) thì hai locus phải liên kết chặt. Tương tự như vậy, hai gen cùng được tải nạp vào phage sẽ ở gần nhau. Mức độ liên kết giữa các gen có chức năng khác nhau (intercistronic) hay giữa các đột biến bên trong gen chức năng (intracistronic) có thể đánh giá từ các kết quả lai chuyên biệt.

Ở hệ thống *hợp tử một phần* (merozygote), exogenote muốn gắn vào endogenote phải xảy ra 2 trao đổi chéo ở hai đầu vì nếu chỉ có 1 trao đổi chéo thì cả hai sản phẩm nhận được đều mất cân bằng.

Trong các hệ thống này, tổng cá thể tham gia tái tổ hợp không biết được, nên tần số tái tổ hợp không thể tính như ở ruồi giấm (trên tổng số cá thể). Do đó, tần số tái tổ hợp được trình bày tương đối theo một số tiêu chuẩn chung cho tất cả các tổ hợp lai. Ví dụ, số lượng các cá thể tái tổ hợp nguyên dưỡng được tạo ra khi lai hai dòng đột biến có so sánh với kết quả khi lai dạng hoang dại với mỗi loại đột biến. Tuy nhiên có nhiều sai lệch và cần chỉnh lí.

Xác định trình tự gen ở vi sinh vật thường phức tạp vì có thể xảy ra hiện tượng nhiễu âm cục bộ (localized negative interference). Phương pháp xác định trình tự gen thường dùng là lai 3 điểm hoán đổi (three - factor reciprocal crosses).

20.6.6.4- Bản đồ di truyền của *Escherichia coli*



Hình 20.23-. Bản đồ di truyền *E. coli* dòng K12 (theo Brock Microbiology 11, 2006)

OriC - điểm khởi sự sao chép; *RE* – restriction endonucleaz *Nost1*.(xem thêm giải thích phía trên

Sau đây là bản đồ di truyền liên kết gen vòng tròn của nhiễm sắc thể ở *E. coli* dòng K12 (hình 20.23). Bộ gen của *E. coli* đã được giải ký tự chuỗi (sequencing) năm 1997, nó gồm 4.639.221 bp (cặp bazơ) với khoảng 4288 ORF (khung đọc mở). Vòng ngoài cùng ghi ký hiệu một số gen, mà mặt trong các số từ 0 đến 100 chỉ vị trí tính theo số phút gen được chuyển qua. Các số ở vòng trong cùng chỉ số kilo cặp bazơ (kbp) tại các điểm nhận biết (recognition sites) của enzym cắt hạn chế (*RE* – restriction endonucleaz) có tên *Not 1*. Các mũi tên chỉ điểm khởi sự của các dòng Hfr.

20.6.7-Plasmid

Trong phần nói về quá trình *giao nạp* (conjugation) hay *tiếp hợp* ở trên đã đề cập đến plasmid, là những ADN vòng tròn nhỏ hiện diện ở nhiều vi khuẩn. Plasmid là nhân tố di truyền sao chép độc lập với nhiễm sắc thể (Nhiễm sắc thể) của tế bào chủ. Không giống virus, plasmid *không có dạng ngoại bào* (extracellular form) và tồn tại trong tế bào đơn giản là ADN tự do và điển hình là dạng vòng tròn. Plasmid và ADN Nhiễm sắc thể của tế bào có vài điểm khác nhau cơ bản: plasmid chỉ mang những gen không thiết yếu (nhưng thường rất có ích), còn những gen thiết yếu nằm trên Nhiễm sắc thể.

Plasmid di chuyển giữa các tế bào trong quá trình giao nạp (conjugation), tức sự tiếp xúc giữa hai loại tế bào.

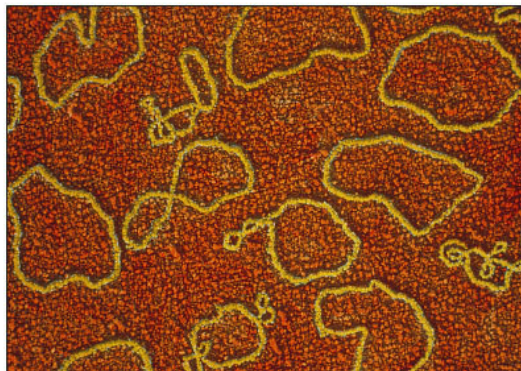
Các kiểu plasmid khác nhau được phân loại dựa vào các gen mà chúng mang. Một số plasmid, các nhân tố trao đổi chất (metabolic factors) mang các gen mã hóa cho các chức năng trao đổi chất khác thường (unusual metabolic functions) như phân hủy dầu mỏ do tràn dầu.

Đến nay đã biết hàng ngàn plasmid khác nhau. Trên thực tế, người ta đã phân lập hơn 300 plasmid khác nhau trong tự nhiên chỉ từ dòng *E. coli* duy nhất. Nhiều plasmid được sử dụng làm công cụ chuyển gen trong kỹ thuật di truyền.

20.6.7.1-Tính chất vật lý và sự sao chép plasmid

Hầu hết các plasmid đã biết đều có ADN mạch kép, mạch vòng. Tuy nhiên vẫn có nhiều plasmid mạch thẳng. Các plasmid tự nhiên có kích thước rất khác nhau, từ 1 kbp đến 1 megabp. Plasmid điển hình là một phân tử ADN vòng tròn, mạch kép nhỏ chưa đến 5 % kích thước Nhiễm sắc thể (hình 20.24). Phần lớn những plasmid ADN được phân lập từ tế bào có dạng siêu xoắn, dạng nhỏ gọn nhất có thể tồn tại trong tế bào.

Enzym liên quan đến việc sao chép plasmid trên thực tế là những enzym bình thường trong tế bào. Vì thế những gen của plasmid chủ yếu liên quan đến sự *kiểm soát* quá trình khởi sự sao chép và với sự phân bố những plasmid được sao chép vào các tế bào con.



Hình 20.24-. Hình hiển vi điện tử các plasmid vòng tròn

Tương tự, những plasmid khác nhau hiện diện trong tế bào với số lượng khác nhau, gọi là *số bản sao* (copy number). Một số plasmid chỉ có 1-3 bản sao trong tế bào, trong khi những plasmid khác lại có đến 100 bản sao. Số lượng bản sao được kiểm soát bởi những *gen trên plasmid* và bởi sự *tương tác gen* giữa tế bào chủ và plasmid. Phần lớn các plasmid ở vi khuẩn Gram âm sao chép tương tự như Nhiễm sắc thể vi khuẩn. Việc này thực hiện từ điểm khởi sự sao chép (Ori) và chép theo hai hướng quanh vòng plasmid, tạo ra dạng trung gian *theta* (θ). Tuy nhiên một số plasmid không sao chép theo hai hướng. Do kích thích nhỏ của ADN plasmid, toàn bộ quá trình sao chép xảy ra rất nhanh, có lẽ bằng 1/10 tổng thời gian diễn ra chu kì phân bào.

Hầu hết plasmid của vi khuẩn Gr^+ sao chép theo cơ chế vòng xoay tương tự như phage $\phi x174$. Cơ chế này sẽ tạo ra mạch đơn trung gian, và do đó những plasmid này thỉnh thoảng được xem như *plasmid ADN mạch đơn*. Phần lớn ADN mạch thẳng sao chép dùng cơ chế liên quan đến một protein gắn với đầu 5' của mỗi mạch mà được dùng trong tổng hợp mới ADN.

20.6.7.2- Tính không tương hợp (Incompatibility) và chỉnh sửa (curing)

Một số vi khuẩn có thể chứa vài dạng plasmid khác nhau. Ví dụ, *Borrelia burgdorferi* (nhân tố gây bệnh Lyme) chứa 17 plasmid mạch thẳng và vòng. Khả năng hai plasmid khác nhau, mà mỗi một sao chép trong cùng một tế bào, được kiểm soát bởi gen của các plasmid tham gia điều hòa sao chép ADN. Khi một plasmid được chuyển vào trong tế bào đã có sẵn một plasmid khác, thường thì plasmid thứ hai có thể không tồn tại được và mất đi trong quá trình sao chép tế bào sau đó. Nếu điều này xảy ra, hai plasmid trên được gọi là *không tương hợp* (incompatible). Một số nhóm không tương hợp (Incompatibility - *Inc*) đã được ghi nhận. Các plasmid thuộc cùng một nhóm không tương hợp sẽ loại trừ nhau khi sao chép trong cùng tế bào nhưng có thể cùng tồn tại với plasmid của nhóm khác. Plasmid cùng nhóm không tương hợp có chung cơ chế điều hòa sao chép, do đó chúng có họ hàng với nhau. Vì vậy, dù tế bào vi khuẩn có thể chứa nhiều loại plasmid khác nhau, thì mỗi loại vẫn khác biệt nhau về mặt di truyền.

Một số plasmid, gọi là *epixom*, có thể chèn vào nhiễm sắc thể, và sự sao chép của chúng chịu sự kiểm soát của Nhiễm sắc thể. Trường hợp này rất giống với virus mà bộ gen của chúng có thể chèn vào bộ gen của tế bào chủ.

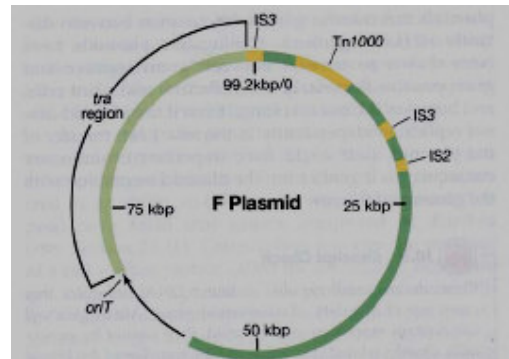
Plasmid thỉnh thoảng có thể bị loại bỏ khỏi tế bào chủ bằng nhiều xử lý khác nhau. Việc loại bỏ này, gọi là *chỉnh sửa* (curing), là kết quả của ức chế sao chép plasmid mà không có sự ức chế song song đối với Nhiễm sắc thể của tế bào chủ. Trong phân bào, plasmid bị loại bỏ mất. Sự chỉnh sửa có thể xảy ra tự phát, nhưng có thể tăng nhanh đáng kể bằng nhiều cách xử lý khác nhau.

20.6.7.3- Sự chuyển plasmid từ tế bào này sang tế bào khác

Cơ chế chính của việc chuyển plasmid từ tế bào này sang tế bào khác là *giao nạp*, mà chức năng thực hiện được mã hóa bởi chính một số plasmid. *Giao nạp* là một quá trình sao chép ADN và plasmid của tế bào cho và truyền bản sao của Nhiễm sắc thể cùng bản sao plasmid sang tế bào nhận.

Hình 20.25 cho thấy bản đồ gen của plasmid F, một plasmid đã được nghiên cứu rất kỹ của *Escherichia coli*. Khoảng 25 gen trên F plasmid, bao gồm các gen sao chép ADN, các yếu tố thực hiện chức năng của một epixom

và cuối cùng là một vòng cung ADN lớn, gọi là vùng tra, chứa những gen giúp nó tự di chuyển từ tế bào này sang tế bào khác.



Hình 20.25-. Sơ đồ gen của plasmid F của *E. coli*.

Con số bên trong cho biết kích thước của plasmid (chính xác là 99.159 bp). Vùng màu xanh sẫm ở dưới chứa những gen chịu trách nhiệm chính để sao chép và tách plasmid F trong tế bào phát triển bình thường. Vùng xanh sáng, vùng tra, chứa những gen chịu trách nhiệm chuyển gen. Chuỗi ori T là điểm khởi đầu của quá trình chuyển plasmid trong tiếp hợp. Mũi tên cho biết hướng chuyển. (vùng tra sẽ được chuyển qua cuối cùng). Những vùng màu vàng là những yếu tố có thể hoán đổi vị trí, nơi mà có thể xảy ra sự hợp nhất vào những yếu tố tương đồng trên nhiễm sắc thể vi khuẩn và dẫn đến sự hình thành dòng Hfr.

(Theo Brock Microbiology 11, 2006)

Plasmid điều khiển sự truyền gen của chính nó bởi sự tiếp xúc của hai tế bào gọi là *có khả năng giao nạp*. Không phải tất cả plasmid đều có khả năng tiếp hợp. Khả năng truyền trong tiếp hợp được kiểm soát bởi những gen trong plasmid gọi là vùng tra. Vùng tra chứa những gen mã hóa protein thực hiện chức năng bắt cặp. Sự hiện diện của vùng tra ở plasmid có thể dẫn đến kết quả quan trọng khác nếu plasmid chèn vào nhiễm sắc thể. Trong trường hợp này, plasmid có thể huy động sự chuyển ADN nhiễm sắc thể từ tế bào này sang tế bào khác.

Một vài plasmid tiếp hợp từ *Pseudomonas* có biên độ tế bào chủ lớn. Điều này có nghĩa là chúng có thể được truyền sang rất nhiều vi khuẩn Gr⁺ khác. Những plasmid như thế có thể chuyển thông tin di truyền giữa những

sinh vật ở gần nhau. Những plasmid tiếp hợp có thể chuyển giữa vi khuẩn Gr^- và Gr^+ , giữa vi khuẩn và tế bào thực vật và giữa vi khuẩn và nấm. Thậm chí nếu plasmid không thể sao chép độc lập trong vật chủ mới, sự chuyển plasmid tự nó có thể có ý nghĩa tiến hóa quan trọng nếu gen từ plasmid nối lại với bộ gen của vật chủ mới.

20.6.7.4 - Vài loại plasmid khác và ý nghĩa sinh học của chúng

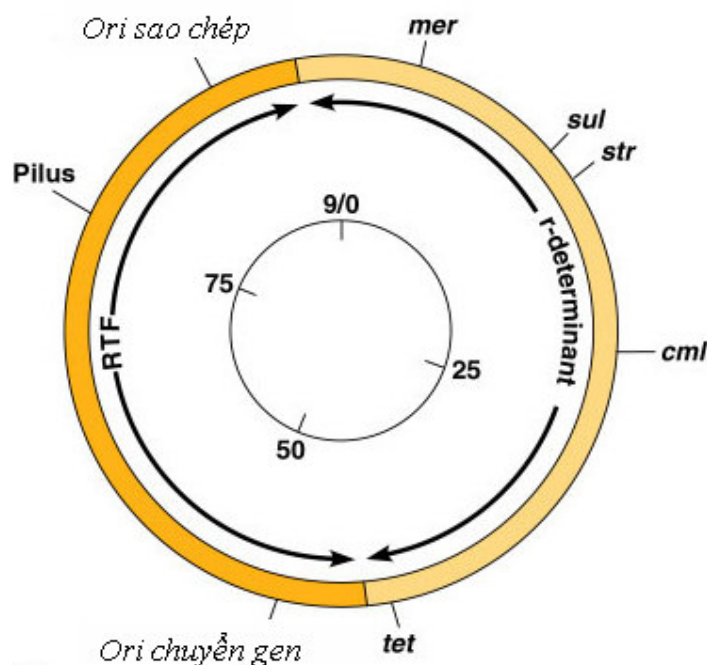
Mặc dù plasmid không mang những gen thiết yếu đối với vật chủ, nhưng nó có thể ảnh hưởng đáng kể đến kiểu hình của tế bào. Chẳng hạn, khả năng của *Rhizobium* tương tác với thực vật và hình thành nốt sần ở rễ cố định đạm là nhờ những plasmid thực hiện. Những plasmid khác mang lại đặc điểm biến dưỡng đặc biệt ở tế bào, như sự phân hủy chất gây ô nhiễm độc hại. Thực ra, plasmid dường như là một bộ máy chính để tạo ra những tính chất riêng biệt của vi khuẩn, và trong nhiều trường hợp, còn “xuất khẩu” (export) những đặc tính này bởi sự chuyển gen theo chiều ngang. Hạn chế duy nhất đối với những kiểu gen này có trong plasmid là chúng không can thiệp vào sự sao chép của chính mình hoặc vào sự tồn tại của vật chủ.

a) Plasmid đề kháng

Trong số những nhóm plasmid phổ biến nhất và được nghiên cứu kỹ nhất là các *plasmid R*, có khả năng kháng kháng sinh và nhiều chất ức chế sinh trưởng khác. Plasmid R lần đầu tiên được phát hiện tại Nhật ở dòng vi khuẩn ruột; đó là những vi khuẩn có tính đề kháng đối với nhiều loại kháng sinh (đa kháng) và kể từ đó, chúng được phát hiện trên khắp thế giới. Bản chất gây nhiễm của plasmid tiếp hợp R cho phép chúng lan rộng nhanh chóng trong quần thể tế bào gây ra một vấn nạn lớn trong y học lâm sàng là sự xuất hiện nhanh các vi khuẩn đề kháng thuốc.

Một plasmid R có thể mang nhiều gen đề kháng. Chẳng hạn, plasmid R100 có 94,3 kbp (hình 20.25), mang những gen mã hóa cho sự kháng sulfonamid, streptomycin và spectinomycin, fusidic acid, chloramphenicol, tetracyclin và có thể một số gen kháng thủy ngân (mercury). Plasmid R100 có thể được chuyển giữa các vi khuẩn đường ruột thuộc chi (Genra) *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* và *Shigella*, có thể chuyển vào vi khuẩn

Gram âm *Pseudomonas*. Những plasmid R khác có gen kháng kháng sinh cũng được ghi nhận.



Hình 20.26- Plasmid R100: RTF là vùng các gen tra chuyển gen ; r-determinant là vùng các gen đề kháng (mer - thủy ngân, sul - sulfamid, str - streptomycin, cml - chloramphenicol, tet – tetracyclin). (Theo Brock Microbiology 11, 2006)

b) Plasmid mã hóa chất độc và những độc tính khác

Ở một số vi khuẩn gây bệnh, một số tính chất này được mang trên plasmid. Thí dụ, dòng *E. coli* gây bệnh đường ruột có tính chất này bởi khả năng sinh sản thành tập đoàn trong ruột non và sản xuất một chất độc gây các triệu chứng của bệnh tiêu chảy. Sự hình thành tập đoàn đòi hỏi sự hiện diện của một protein bề mặt tế bào gọi là *yếu tố kháng nguyên* tạo quần thể (yếu tố kháng nguyên hình thành tập đoàn), được mã hóa bởi một plasmid. Protein này giúp tế bào có khả năng gắn với tế bào biểu mô của ruột. Ít nhất hai chất độc ở *E. coli* gây bệnh đường ruột được mã hóa bởi một plasmid: *hemolysin* làm tan tế bào hồng cầu và *enterotoxin* gây tiết quá nhiều nước và muối vào ruột và do vậy là chất độc gây tiêu chảy.

c) Bacteriocin

Nhiều vi khuẩn sản xuất *protein ức chế* hoặc *giết chết* tế bào các loài họ hàng gần, thậm chí ngay cả những dòng khác nhau của cùng một loài. Những tác nhân này, được gọi là *bacteriocin* để phân biệt với chất kháng

sinh, có phổ tác động hẹp hơn kháng sinh. Các gen mã hóa bacteriocin và những protein chế biến (processing) và vận chuyển chúng (tạo tính miễn dịch cho sinh vật sản sinh ra nó) thường nằm trên plasmid hay transposon. Bacteriocin được đặt tên theo loài tạo ra nó như ở *E. coli* có *colicin*, mã hóa bởi *Colplasmid*; *Bacillus subtilis* tạo ra *subtilisin*,...

Plasmid Col của *E. coli* mã hóa nhiều colicin khác nhau. *Colicin* được giải phóng từ một tế bào gắn với những thụ thể (receptors) đặc hiệu trên màng tế bào dễ cảm nhiễm (susceptible). Colicin giết tế bào bằng cách ngăn cản chức năng quan trọng nào đó của tế bào.

Bacteriocin hoặc tác nhân tương tự bacteriocin của vi khuẩn Gram dương thì hơi khác colicin những cũng thường được mã hóa bởi plasmid, một số thậm chí còn có giá trị thương mại. Chẳng hạn, vi khuẩn lactic tạo ra bacteriocin Nisin A ức chế mạnh sự tăng trưởng của một loạt vi khuẩn Gr^+ và được dùng làm chất bảo quản trong công nghệ thực phẩm.

20.6.8- Sự chuyển vị (Transposition)

Các *phần tử chuyển vị* (transposable elements) hay *phần tử di động* (mobile elements) là những trình tự ADN có khả năng di chuyển từ vị trí này đến vị trí khác (mục tiêu) của bộ gen (cùng bộ gen hay khác). Sự di chuyển ADN này được gọi là *transposition* (sự chuyển vị).

Tái tổ hợp (Recombination) trong *chuyển vị* (transposition) là sự kết nối (junction) giữa các *đầu mút* của phần tử chuyển vị với các đầu mút bị cắt hở của ADN mục tiêu (target site). Khác với tái tổ hợp tương đồng (homologous recombination), *transposition* không đòi hỏi sự tương đồng (homologous sequence) giữa các phần tử di động và ADN mục tiêu, và nó độc lập với chức năng được mã hóa bởi *recA*, vì nó sử dụng *enzym đặc hiệu* là *Transposaz*.

Đây là hiện tượng rất phổ biến trong thiên nhiên, các transposon được tìm thấy ở vi khuẩn, nấm, thực vật và động vật (bảng 20.6).

Bảng 20.6- Các phần tử chuyển vị có ở Prokaryotae và Eukaryota

Prokaryota	Eukaryota
– Trình tự xen đoạn: <i>IS</i> – Transposon: Tn như <i>Tn3</i>, <i>Tn5</i>, <i>Tn10</i>,... – Virut: <i>Mu</i>	– Retrotransposon: - Nấm men (Yeast): <i>Ty</i> - Ruồi giấm: <i>copia</i>, <i>P</i> – Transposon (ADN): - Ngô: hệ thống <i>Ac-Ds</i> – SINE: ở người (họ <i>Alu</i>) – Retrovirut: <i>Rous sarcoma</i>, <i>HIV</i>

Chúng có chức năng như các vector quan trọng thực hiện biến đổi di truyền. Các xen đoạn, mất đoạn và cấu trúc lại bộ gen thường kèm theo sự di chuyển của các transposon. Sự di chuyển này làm sai hỏng chức năng bình thường của gen. Chúng *hoạt hóa* hay *làm bất hoạt* các gen bằng cách xen đoạn vào kề bên hay vào giữa đoạn gen. Các transposon IS, là các *phần tử lặp đoạn* (repetitive elements), còn tạo các vùng tương đồng rải trong bộ gen, nhờ đó các hệ thống *tái tổ hợp tương đồng* có thể tác động.

Transposition gồm các kiểu chính:

- *IS: trình tự xen đoạn* (insertion sequence) là các *transposon ngắn*.
- *Transposon* (kí hiệu *Tn*): Các *phần tử di động dài* (khoảng 5000 bp) có chứa một hoặc vài gen. Nó thực hiện:
 - + *Transposition không sao chép* (nonreplicative): Phần tử chuyển vị được cắt khỏi ADN cho (donor) và được gắn vào phân tử ADN mục tiêu. Thuộc loại này có *Tn10*, *Tn5*, *Tn7*.
 - + *Transposition sao chép* (replicative): ADN được nhân đôi và bản sao được xen vào vị trí mới tạo *cointergrat* (cộng gán) và có *Tn3*, *Mu*.
- *Retrotransposition*: Sự di chuyển qua *trung gian ARN*, nhờ reverse transcriptaz tạo thành cADN, và sự *xen đoạn cADN* vào vị trí mới.

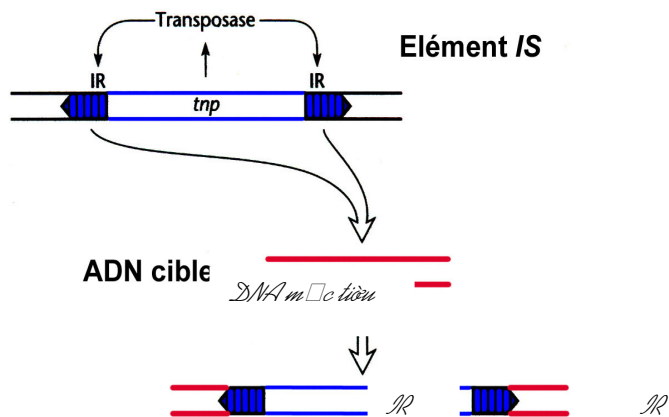
20.6.8.1- Các trình tự xen đoạn IS

Các *transposon đơn giản nhất* là các *trình tự xen đoạn* (insertion sequence) và được kí hiệu bởi tiếp đầu ngữ IS kèm số thứ tự như IS₄.

Các phần tử IS là các cấu phần bình thường của ADN vi khuẩn và plasmid. Dòng *E.coli* chuẩn thường chứa vài bản sao (<10) của bất kì một trong các IS chung thường gặp. Để mô tả sự xen đoạn vào điểm đặc biệt, kí hiệu 2 chấm kép được sử dụng như λ : IS₁ chỉ IS₁ xen vào phage λ .

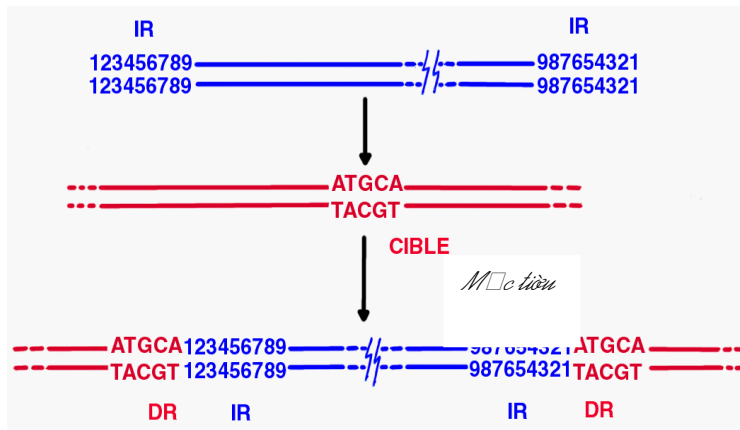
Các IS là những đơn vị tự trị, mỗi một trong chúng mã hóa cho chỉ một protein cần thiết cho sự chuyển vị bản thân chúng. Trình tự của mỗi loại IS có khác nhau, nhưng trong tổ chức cấu tạo có nhiều tính chất chung. Ở giữa có gen *transposaz tnp*, hai đầu có *lặp đoạn đảo ngược* (IR – Inverted repeats). Sự xen đoạn của IS ở *tiêu điểm* (target) được minh họa trên hình 20.27. Cấu trúc transposon và sự chèn vào ADN mục tiêu nêu trên hình 20.28.

Các đầu mút của transposon có *trình tự lặp lại đảo ngược* (inverted repeat - IR). Trong ví dụ này, tiêu điểm có 5 bp. Các đầu mút của transposon gồm các lặp đoạn đảo ngược 9 bp được đánh số từ 1 đến 9.



Hình 20.27. Cấu trúc IS và sự chèn vào ADN mục tiêu.

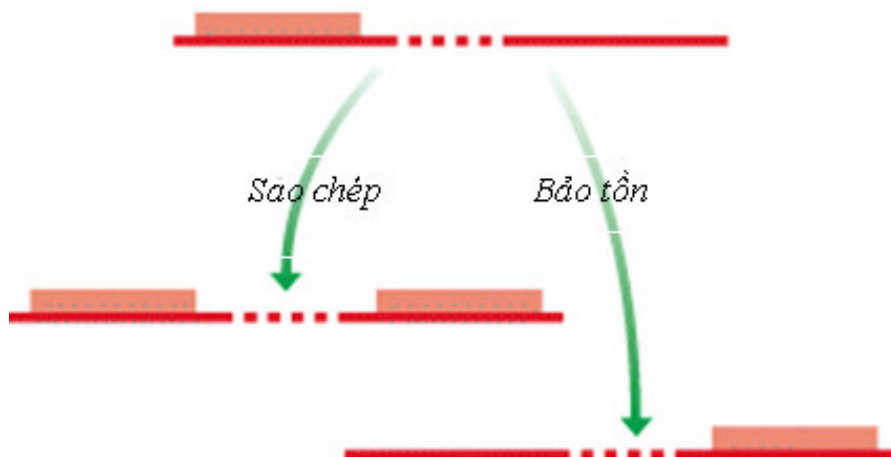
Ở hai đầu của IS luôn có hai *trình tự lặp đoạn trực tiếp* (direct repeat) ngắn. Các trình tự này dao động tùy transposon, nhưng cố định đối với mỗi loại IS. Chiều dài của phần lớn lặp đoạn trực tiếp là 9, chúng xác định các đầu mút của transposon.



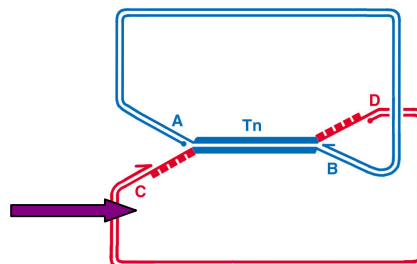
Hình 20.28- Sơ đồ cấu trúc của transposon có các IS, các lặp đoạn đảo ngược IR (inverted repeat) và tạo lặp đoạn trực tiếp ở hai đầu ADN điểm mục tiêu

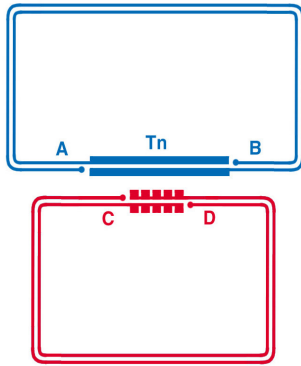
20.6.8.2- Transposon không sao chép và sao chép

Sự chuyển vị ADN theo 2 kiểu khác nhau (sao chép và không sao chép hay bảo tồn (conservative)) và có những tính chất chung (hình 20.29). Sơ đồ diễn biến *transposition sao chép* (transposon Tn3) được nêu trên các hình sau: cắt và nối (hình 20.30), sự cộng gắn và phân tách.



Hình 20.29- Sơ đồ về transposition sao chép và không sao chép ADN cho



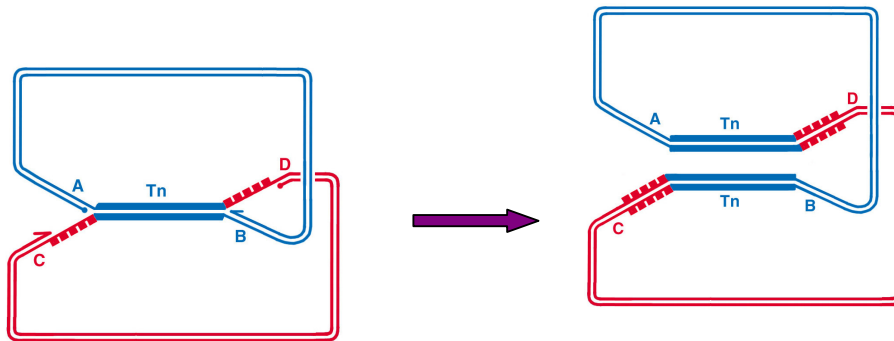


*Sự nối giữa Tn và
trình tự mục tiêu
(ligation)*

ADN nhận

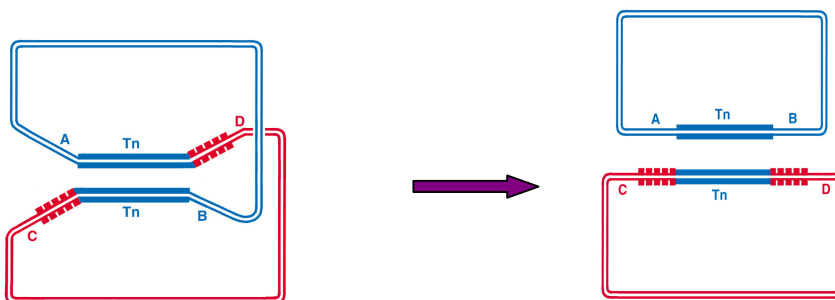
Hình 20.30. Sơ đồ transposition sao chép (Tn3)

Tiếp theo là *sự cộng gắn* (Cointegrat Formation) 2 loại ADN (hình 20.31).



Hình 20.31. Sự cộng gắn (Cointegrat) của 2 loại ADN

Cuối cùng là *sự phân tách* (Resolution) ra 2 loại ADN (hình 20.32).



Hình 20.32. Sự phân tách ra 2 loại ADN

Quá trình transposition có những đặc điểm sau đây:

- Cả hai đầu của phân tử mang gần như một trình tự có định hướng *đảo ngược* nhau.
- Các transposon mã hóa ít nhất một protein là *transposaz*. Transposaz gắn đặc hiệu và cắt các trình tự ở cuối để thực hiện chuyển vị.
- Các transposon tạo bản sao ngắn ($\leq 12\text{bp}$) của ADN ở điểm mục tiêu trong transposition. Chiều dài của trình tự này đặc trưng và không đổi đối với một phân tử nhất định và được tạo ra nhờ sự *cắt so le* (staggered cleavage) của ADN mục tiêu nhờ transposaz.

Cơ chế transposition được nghiên cứu chi tiết ở *phage Mu* và có thể tóm tắt như sau:

- Sự nhận biết và bắt cặp 2 đầu mút của transposon nhờ transposaz để hình thành cấu trúc chuyên biệt *protein - ADN*. Sự hình thành phức hợp được kích thích bởi các *protein HU* và *IHF* là các nhân tố tham gia tái tổ hợp điểm chuyên biệt *Mu transposaz*, giống như *Int protein*, có 2 vùng gắn độc lập.
- Sự *cắt khắc* (nicking) do transposaz tạo ra 3'-OH ở mỗi đầu của Mu.
- *Cắt tiêu điểm* nhờ transposaz tạo đầu mút so le 5' - P dài 5 bp.
- Sự *nối đầu* 5' - P của tiêu điểm với 3'-OH của transposon tạo *cấu trúc trung gian chuyển mạch* (strand - transfer intermediate).

Tn10 có lẽ sử dụng cơ chế tương tự để thực hiện transposition *không sao chép* hay *bảo tồn* (conservative transposition) (hình 20.33 a, b, c và d).

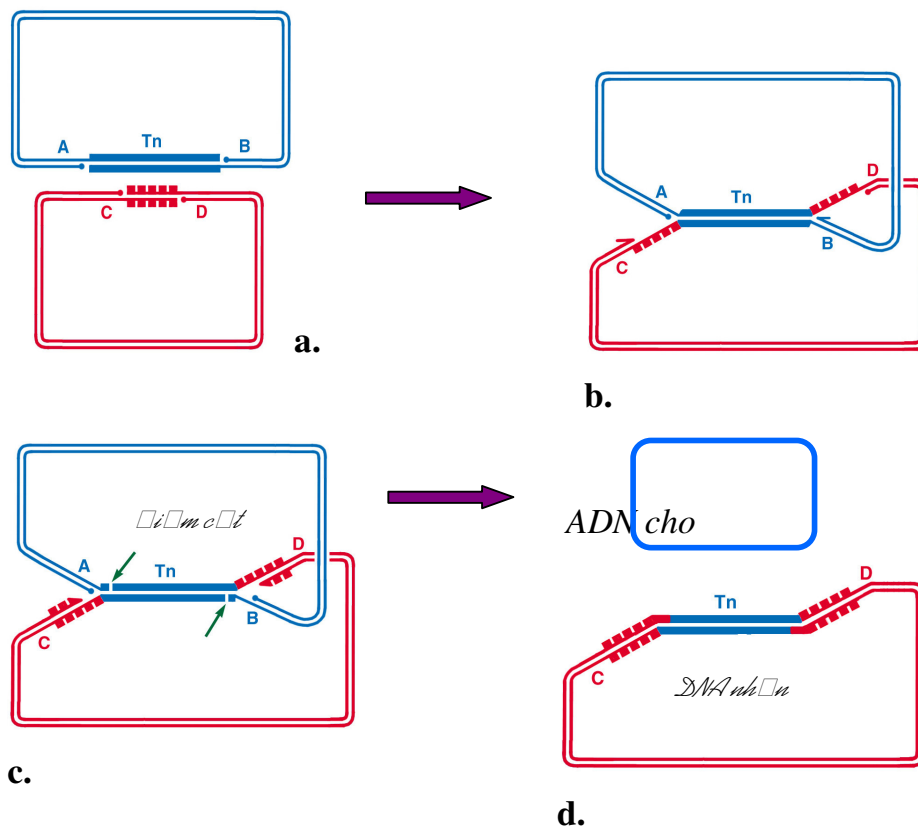
20.6.8.3- Sự chuyển vị ngược (Retrotransposition)

Nhóm các transposon, được phát hiện ở nấm men (Ty) và *Drosophila* (*copia*) và có liên quan đến retrovirus, di chuyển đến vị trí mới qua trung gian ARN. Transposon của nấm men Ty, giống với retrovirus, có *lặp đoạn cuối dài* (long terminal repeat) được gọi là trình tự δ nằm ở 2 phía đoạn mã hóa. Các protein được mã hóa, có trình tự tương đồng với *integraz* của retrovirus và *reverse transcriptaz*, rất cần thiết cho transposition.

Phương thức *phiên mã ngược* của các phân tử di động tương tự như của retrovirus. Có sự tương tự về cấu trúc giữa retrovirus và các retrotransposon ở nấm men (Ty) và *Drosophila* (*copia*).

Sự chuyển vị ngược tạo bản sao của phần tử ở vị trí mới, trong khi phân tử cho ban đầu vẫn giữ nguyên cấu trúc không biến đổi. Do vậy, retrotransposition tạo nên một ít đứt đoạn và các tái cấu trúc (rearrangement) của bộ gen tế bào chủ. Những biến đổi của bộ gen liên quan với retrotransposition sẽ dẫn đến việc làm *ngừng* hay *hoạt hóa* các gen, mà một số có thể gây ung thư.

Các transposon đã góp phần vào sự tiến hóa của plasmid, và vài chứng cứ cho thấy các plasmid R có được tính đề kháng kháng sinh thông qua các transposon.



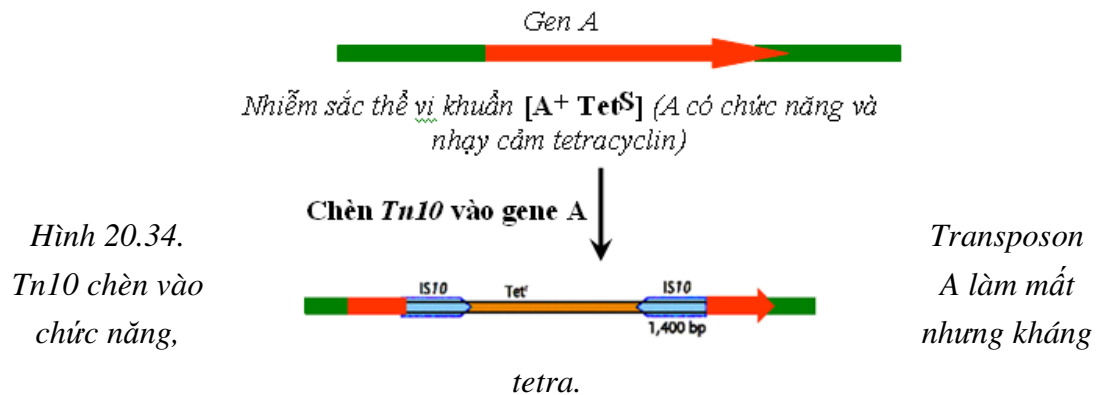
Hình 20.33. Transposition không sao chép hay bảo tồn (conservative transposition)

Mũi tên chỉ các điểm cắt và sau đó nối lại theo trật tự mới.

20.6.8.4-Gây đột biến bằng transposon

Các ứng dụng của transposon bao gồm:

- Gây đột biến (mutagenesis) bằng transposition.



- Công cụ cho kỹ thuật di truyền *in vivo* (*in vivo* Genetic Engineering).
- Nhân tố trung gian đề kháng kháng sinh (mediator of antibiotic resistance)

Ở đây đề cập chủ yếu đến gây đột biến nhờ transposon (Transposon Mutagenesis). Sự chèn transposon vào giữa gen sẽ dẫn đến đột biến làm mất chức năng bình thường của gen (hình 20.34). Transposon cung cấp một phương tiện dễ dàng để tạo các đột biến trên Nhiễm sắc thể. Một thuận lợi cho gây đột biến bằng transposon là nó có chứa 1 gen kháng kháng sinh, mà gen này dùng làm marker (dấu chuẩn) để nhận biết transposon được chèn vào. Trước tiên các dòng mang gen kháng kháng sinh được phân lập từ môi trường giàu dinh dưỡng, nơi các đột biến khuyết dưỡng tăng trưởng tạo khuẩn lạc. Sau đó chúng có thể được sàng lọc trên môi trường giới hạn được cung cấp các chất tăng trưởng nào đó để xác định chất nào cần thiết cho đột biến.

Các transposon cũng hữu ích cho sự chèn 1 marker gen khuyết dưỡng (auxotrophic) vào trong dòng sinh vật hoang dại. Thường thì các đột biến khuyết dưỡng khó phân lập trực tiếp. Nhưng nếu marker khuyết dưỡng được đưa vào cùng transposon với marker kháng kháng sinh, thì có thể qua chọn dòng đề kháng kháng sinh mà xác định marker khuyết dưỡng. Hai transposon thường được sử dụng trong gây đột biến là *Tn5* (kháng neomycin và kanamycin) và *Tn10* (chứa 1 marker kháng tetracycline).

Integron là các transposon có thể thu nhận và biểu hiện các gen từ nhiều nguồn khác nhau. Tuy nhiên, khác với các transposon được chèn vào một cách ngẫu nhiên, các integron chèn vào có tính chọn lọc cao (high selective) trong các điểm xen đoạn (insertion site) của chúng, thường thì được chèn vào trong plasmid.

Integron chứa gen mã hóa cho protein được gọi là *integraz*, cần thiết cho sự *tái tổ hợp ở điểm chuyên biệt* (site-specific recombination). Bộ gen của phage λ (lambda) chèn vào Nhiễm sắc thể của *E. coli* ở một vị trí đặc biệt nhờ hoạt tính của *enzym integras* λ . Integron cũng chứa trình tự ADN đặc biệt cho phép *integraz* chèn các nhóm gen gọi là *cassette* vào Nhiễm sắc thể, mà trên đó có promoter cho phép các *gen cassette* mới được biểu hiện.

20.7. DI TRUYỀN HỌC VIRUT

Virut có **cấu tạo đơn giản** và **rất nhỏ** nên được phát hiện muộn hơn. Việc các nhà vật lý học khi chuyển sang lĩnh vực sinh học đã sử dụng các virut vào nghiên cứu di truyền học cho thấy rõ tầm quan trọng của các đối tượng này. Di truyền học virut đã góp phần đáng kể cho **sự phát triển** của sinh học phân tử. Sự hiểu biết chi tiết về các virut không những giúp con người biết rõ các cơ nguyên gây nhiều bệnh hiểm nghèo (ung thư, AIDS,...), mà còn có thể biến chúng thành các công cụ chuyển gen có lợi cho con người

20.7.1. Sinh học của virut

Virut được phát hiện vào năm 1892, khi nhà khoa học Nga Ivanovski (hình 4.1) nhận thấy *virut đốm thuốc lá* (tabacco mosaic virut - TMV) qua được màng lọc ngăn vi khuẩn. Năm 1935, W.M Stanley phát hiện các virut có thể tạo thành tinh thể. Còn các sinh vật khác, tế bào dù đơn giản nhất cũng không thể tạo thành tinh thể được. Đã có những bàn cãi rằng virut có được coi là sinh vật hay không. Đến nay, chúng được coi là những *thực thể sống chưa có cấu tạo tế bào*. Các virut hay các virion là những dạng sinh vật có cấu tạo đơn giản nhất. Xét từ góc độ phân loại học, sinh giới có thể chia thành hai nhóm lớn: các *sinh vật có cấu tạo tế bào* và *virut*.

20.7.1.1. Đặc điểm chung của virut

Vào những năm 1950, sự quan sát trực tiếp bằng kính hiển vi điện tử cho thấy virut có rất nhiều điểm khác vi khuẩn. Trước tiên cần kể đến đặc

tính *rất nhỏ bé*, cấu tạo đơn giản của virut. Virut nhỏ nhất có đường kính chỉ 20 nm, nhỏ hơn cả riboxom.

Ngoài ra, virut khác với các *sinh vật có cấu tạo tế bào* ở nhiều điểm:

- Virut là các thể *nội kí sinh bắt buộc*, không có cấu tạo tế bào. Chúng phát triển và sinh sản chỉ trong các tế bào sống của vật chủ chuyên biệt.
- Virut sử dụng bộ máy sinh tổng hợp của tế bào chủ để sinh sản và thường phá hủy tế bào chủ để phóng thích thể hệ virut con tiếp tục gây nhiễm các vật chủ mới.
- Virut có bộ gen chỉ gồm *một loại nucleic axit* (ADN hoặc ARN), trong khi đó các tế bào có cả hai loại, được bao trong vỏ protein. Phần lớn virut gồm 1 loại nucleic axit và một ít loại protein.
- Chúng không có hệ thống sinh tổng hợp protein riêng (*không có riboxom*); không có hệ thống trao đổi chất riêng nên không biến dưỡng năng lượng (không phân hủy thức ăn để tạo ATP), không thực hiện sự lên men, hô hấp và quang hợp.
- Virut *không tạo màng lipit riêng*, mặc dù một số virut có *màng bao* (enveloppe) được tạo ra bằng biến đổi màng của tế bào chủ trước khi thoát ra khỏi tế bào chủ.
- Virut không bị tác động bởi các thuốc kháng sinh vì không có cấu trúc vách tế bào và bộ máy sinh hóa riboxom như tế bào vi khuẩn.
- Virut không có *khung sườn tế bào* (cytoskeleton) hoặc phương tiện di động ngoài sự khuếch tán.
- Virut *không “tăng trưởng”* theo nghĩa là tăng khối lượng, khi virut đã hình thành nó không tăng kích thước. Hình dạng đặc trưng của virut được xác định bởi vỏ protein.

Virut đã hình thành trọn vẹn được gọi là *virion*, bộ gen của nó được gói trong vỏ protein và bên ngoài có thể có màng bao.

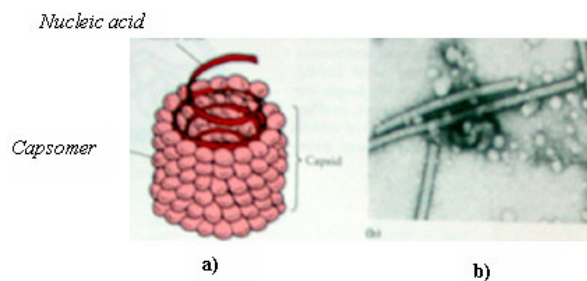
20.7.1.2. Cấu tạo virus

Virus có bộ gen rất đa dạng. Bộ gen (Genome) của virus có thể là ADN mạch kép (double strand - dsADN), ADN mạch đơn (single strand - ssADN), ARN mạch kép (double strand - dsARN), hay ARN mạch đơn (single strand - ssARN). Các virus có ADN hoặc ARN mạch đơn còn phân biệt thành 2 dạng dương hay cộng (+) và âm hay trừ (-):

- Virus mạch dương (*Plus (positive)-strand virus*): virus với bộ gen ARN hay ADN mà bộ gen có cùng trình tự nucleotit như mRNA của virus.
- Virus mạch âm (*Minus (negative)-strand virus*): virus với bộ gen ARN mà mạch ARN này có trình tự nucleotit ngược chiều (bổ sung với) với mRNA của virus.

Bộ gen virus thường là một phân tử nucleic axit ở dạng vòng tròn hay thẳng. Virus nhỏ nhất có chừng 4 gen, virus lớn nhất có chừng vài trăm gen.

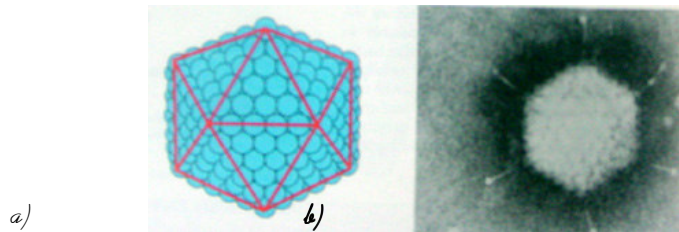
Vỏ protein bọc bộ gen được gọi là *capsid* thường có thể ở dạng hình que, hình ống xoắn, hình đa diện hay phức tạp. *Nucleocapsid* là phức hợp nucleic axit và các protein của một virus. Các capsid thường được tạo nên bởi một số lớn tổ hợp các phân tử protein gồm ít loại, được gọi là *capxome*. Ví dụ, virus đốm thuốc lá có một capsid hình que dài cứng được tạo ra từ hơn 1000 capxome (hình 20.36).



Hình 20.36. Virus đốm thuốc lá

a) Sơ đồ cấu trúc ; b) Ảnh hiển vi điện tử.

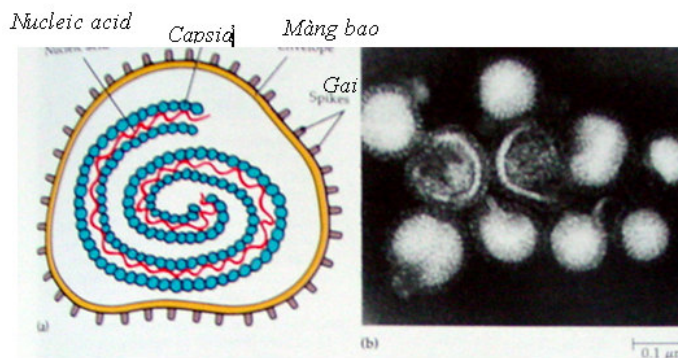
Các *Adenovirut*, thường gây nhiễm đường hô hấp của động vật, có 252 phân tử protein tương tự nhau xếp lại tạo *capsid* hình đa diện với 20 mặt (hình 20.37).



Hình 20.37. Adenovirut có capsid đầu đa diện

a) Sơ đồ cấu trúc ; b) Ảnh hiển vi điện tử

Một vài virus có cấu trúc phụ hỗ trợ để chúng nhiễm vào tế bào chủ. Virus *Flu* và nhiều virus động vật có *màng bao* (envelope) phía ngoài capsid (hình 20.38). Bao này bắt nguồn từ màng của tế bào chủ, nhưng ngoài photpholipit và protein của tế bào chủ, chúng còn có thêm các protein và *glycoprotein* nguồn gốc virus.



Hình 20.38. Sơ đồ cấu trúc của virus có màng bao (envelope) với các gai

a) Sơ đồ cấu trúc ; b) Ảnh hiển vi điện tử

Các virus nhiễm vi khuẩn có capsid phức tạp nhất. Các virus của vi khuẩn được gọi là ***bacteriophage*** (thực khuẩn thể - ăn vi khuẩn) hay gọi ngắn là ***phage***. Bầy phage đầu tiên gây nhiễm *E.coli* được nghiên cứu mang tên T₁, T₂, T₃...T₇ (T từ chữ typ). Các *phage T* chẵn (T₂, T₄, T₆) có cấu trúc rất giống nhau. Capsid của chúng gồm một *đầu đa diện* (20 mặt) bọc chất di truyền. Phần thứ hai là *bao đuôi* bằng protein thành ống dài và phần thứ ba là *sợi đuôi* dài bám vào tế bào vi khuẩn khi gây nhiễm.

Tóm lại, virus được mô tả theo 4 tiêu chuẩn căn bản khác nhau:

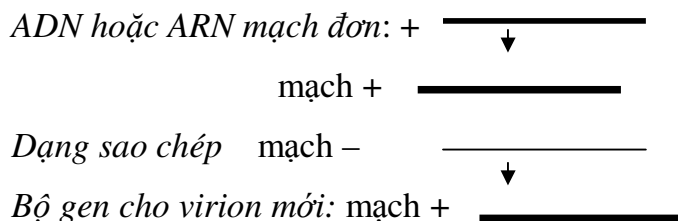
- Bộ gen (Genome) chỉ gồm một loại phân tử là ADN hay ARN.
- Nucleic axit bộ gen là mạch đơn (single strand - ss) hay mạch kép (double strand - ds)
- Hình dạng (shape) của virion đơn giản hay phức tạp.
- Virion có hay không màng bao (membrane hay envelop)

20.7.1.3. Sao chép của các virut

Các hạt virut (virut particle) hay *virion* là những vật kí sinh nội bào bắt buộc (obligate intracellular parasite). Chúng chỉ biểu hiện các gen của chúng và sinh sản bên trong 1 tế bào sống khác. Phụ thuộc vào loại tế bào chủ mà virut kí sinh, người ta gọi tên loại virut, ví dụ: *virut thực vật* kí sinh tế bào thực vật, *virut động vật* kí sinh tế bào động vật. Do đặc điểm này, sự sinh sản của virut khác hẳn với sự sinh sản của tế bào. Điểm nổi bật là virut tạo ra hàng trăm hay hàng ngàn virion trong mỗi thể hệ.

Do có sự đa dạng như nêu trên, các bộ gen của virut được sao chép theo nhiều con đường khác nhau:

- Các ADN mạch kép → ADN mạch kép: *kiểu bán bảo tồn*.
- Các ARN mạch kép → ARN mạch kép: *kiểu bán bảo tồn nhờ ARN replicaz do gen tạo enzym sao chép này được mã hóa trong bộ gen của virut ARN*.
- Các ADN hoặc ARN mạch đơn → chúng làm khuôn (mạch +) để tổng hợp mạch bổ sung (mạch –) thành dạng mạch kép trung gian (+/–), gọi là *dạng sao chép* (replicative form), mà từ nó lấy mạch – làm khuôn tạo ra mạch đơn + giống bộ gen ban đầu của virut (hình 20.39).

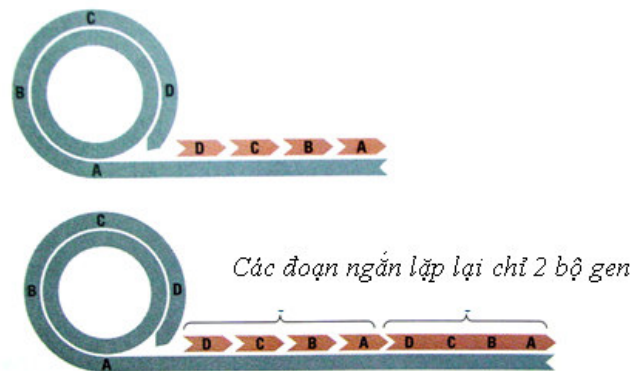


Hình 20.39. Sao chép của ADN hoặc ARN mạch đơn qua trung gian mạch kép

– Ở *Retrovirut* ARN → nhờ enzym *reverse transcriptaz* tổng hợp *c-ADN* mạch đơn từ khuôn ARN virut → *c-ADN* kép → Chèn vào bộ gen tế bào chủ → tạo ra bộ gen ARN virut mới và mARN.

Phụ thuộc vào bộ gen ADN hay ARN mạch kép hay đơn, mạch dương (+) hay âm (–), kiểu sao chép bộ gen và tổng hợp mARN, các virut được chia thành 7 lớp (classes).

Một cách sao chép đặc biệt được tế bào vi khuẩn sử dụng trong tiếp hợp để truyền phân tử ADN dạng thẳng sang tế bào khác hoặc được các virut sử dụng để tạo các bộ gen của chúng, mặt khác làm đứt mạch của vòng tròn xoắn kép, tạo đầu hở 3'–OH và 5'–P kết thúc. Helicaz và SSB protein chen vào tạo chẽ 3 sao chép. Sự sao chép được thực hiện không cần mồi (primer) vì mạch 3'–OH sẵn sàng cho việc nối dài như mạch trước (leading strand) nhờ ADN polymeaz I. Đồng thời với sao chép mạch trước, mạch khuôn sau dịch chuyển. Sự dịch chuyển của mạch sau gián đoạn để tổng hợp các đoạn ngắn *Okazaki* như bình thường và đầu 5' mạch khuôn duỗi thẳng ra (hình 20.40). Sự sao chép có hình giống chữ sigma (σ) của Hi Lạp, nên được gọi là *sao chép sigma* (σ replication). Kiểu sao chép σ này còn được gọi là *vòng tròn quay* (rolling-circle replication), vì mạch khuôn tròn ở giữa không bị đứt và quay tròn làm khuôn cho mạch trước. Sự sao chép kiểu này có thể lặp lại vài lần tạo ra sợi ADN dài, lặp lại nhiều lần bộ gen thẳng của virut, được gọi là *concatemer*. Enzym *endonucleaz* cắt ở những điểm khác nhau trên mỗi mạch của ADN tạo ra các đoạn cỡ bộ gen với hai đầu “dính”. Bộ gen thẳng này sẽ tạo thành vòng nhờ bắt cặp bổ sung các đầu “dính”.



Hình 20.40. Sao chép σ (sigma) hay vòng tròn xoay

(Đường đậm dưới chỉ mạch khuôn cũ, các đoạn ngắn chỉ mạch mới được tổng hợp.
Phía trên tổng hợp xong 1 bộ gen, phía dưới được 2 bộ gen của virut)

20.7.1.4. Sự tự ráp (Self-assembly) của các virion

Các gen của virut sử dụng các enzym, chất dinh dưỡng, riboxom và các nguồn khác của tế bào chủ để tạo ra nhiều bản sao của bộ gen và các protein của các cấu phần khác (capsid, cổ, bao đuôi...). Khi các sản phẩm riêng lẻ đã tích đủ, chúng tự ráp (self-assembly) nhau thành số lượng lớn các virion rồi phá vỡ tế bào tìm các tế bào chủ mới.

Sự ráp nucleic axit của virut với các protein của capsid để hình thành virion mới diễn ra tự động tương tự các mạch polypeptit tự gắn với nhau để tạo nên các protein có cấu trúc bậc bốn. Các cấu phần được gắn với nhau bằng liên kết yếu nên không cần enzym.

20.7.1. 5. Tính đặc hiệu với tế bào chủ

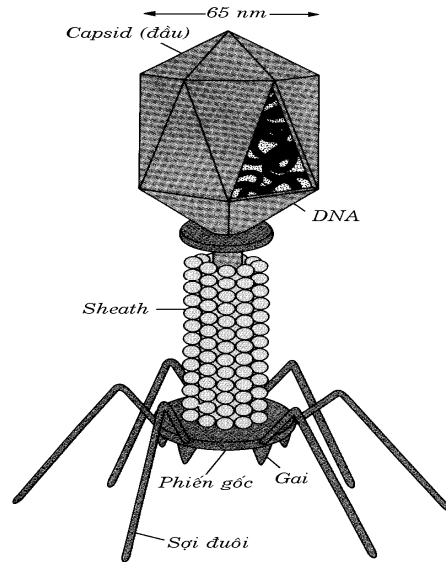
Mỗi kiểu virut có thể nhiễm và kí sinh chỉ ở một biên độ giới hạn của tế bào được gọi là *biên độ chủ* (host range). Các virut nhận biết tế bào chủ theo nguyên tắc "ổng khóa và chìa khóa" các protein bên ngoài của virion lắp vừa các *điểm nhận* (receptor site) trên bề mặt tế bào. Một số virut có biên độ chủ rộng đủ để xâm nhập vào vài loài. Các virut bệnh dại có thể nhiễm nhiều loài có vú gồm gặm nhấm, chó và người. Biên độ có thể rất hẹp như nhiều phage chỉ nhiễm vi khuẩn *E.coli*.

20.7.2. Bacteriophage – Virut của vi khuẩn

Các *phage* là virut của vi khuẩn được phát hiện từ năm 1915. Vào những năm 40, chúng được sử dụng cho các nghiên cứu sinh học phân tử. Chúng là những virut được nghiên cứu kĩ nhất, mặc dù một số ít chúng có cấu tạo phức tạp.

Bảy phage đầu tiên gây nhiễm *E.coli* được nghiên cứu mang tên T_1 , T_2 , T_3 ... T_7 (T từ chữ typ). Các *phage T* *chấn* (T_2 , T_4 , T_6) có cấu trúc rất giống nhau (hình 20.41). Capsid của chúng gồm một *đầu đa diện* (20 mặt) bọc chất di truyền. Phần thứ hai là *bao đuôi* bằng protein thành ống dài và phần thứ ba là *sợi đuôi* dài bám vào tế bào vi khuẩn khi gây nhiễm.

Phage nhận biết tế bào chủ thông qua sự gắn kết đặc hiệu giữa các protein capsid và các protein thụ thể trên tế bào chủ. Khi xâm nhiễm, các sợi đuôi bám lên bề mặt và bao đuôi co ngắn lại bơm bộ gen virus vào bên trong tế bào. Các virus có thể sinh sản trực tiếp và giết chết tế bào chủ, hoặc sinh sản chậm hơn bằng chèn nucleic axit của chúng vào bộ gen tế bào chủ.



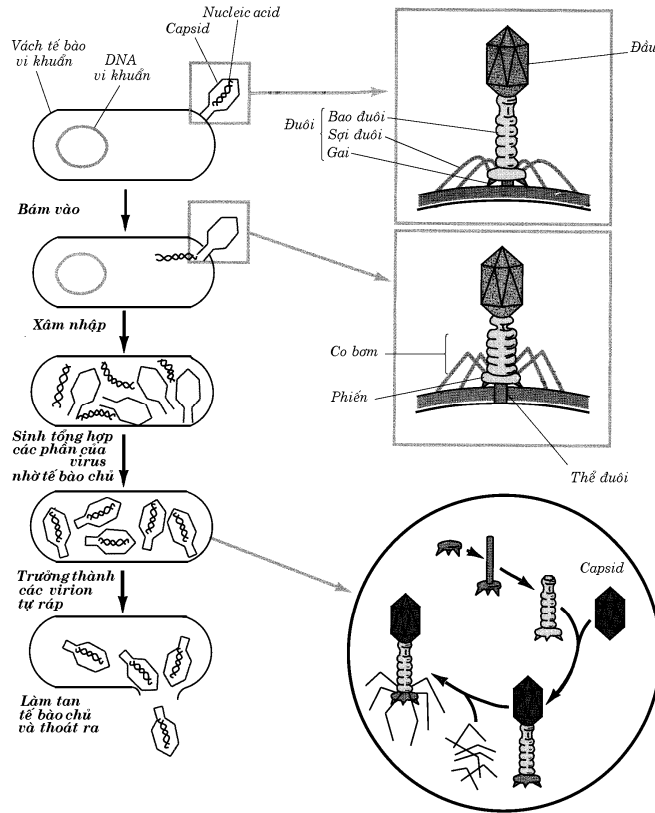
Hình 20.41. Bacteriophage T4 chẵn

Các nghiên cứu phage kí sinh ở tế bào *E.coli* phát hiện rằng chúng có 2 cơ chế sinh sản: chu trình tan (lytic cycle) và chu trình tiềm tan (lysogenic cycle).

20.7.2.1 Chu trình tan (Lytic cycle)

Trong chu trình tan, tế bào nhiễm virus bị tan phóng thích thế hệ phage con. Bộ gen nucleic axit của phage chỉ phối bộ máy sinh tổng hợp của tế bào chủ qua 2 giai đoạn: sớm và muộn. Bộ gen virus chứa trình tự promoter mạnh thu hút ARN polymeaz của tế bào chủ.

Trong giai đoạn sớm, các gen phage kế cận promoter được phiên mã. Các sản phẩm của gen sớm thường gồm các protein làm dừng phiên mã của tế bào chủ và kích thích sao chép bộ gen (genome) của phage.



Hình 20.42. Chu trình tan của phage T4

a) Bám vào ; b) Xâm nhập ; c) Sinh tổng hợp các cấu phần nhờ tế bào chủ ; d) Trưởng thành: các virion được tự ráp ; e) Làm tan tế bào, các virion thoát ra

Ở giai đoạn muộn, các gen muộn của phage mã hóa cho protein vỏ và enzym gây tan tế bào chủ dẫn đến phóng thích các virion con.

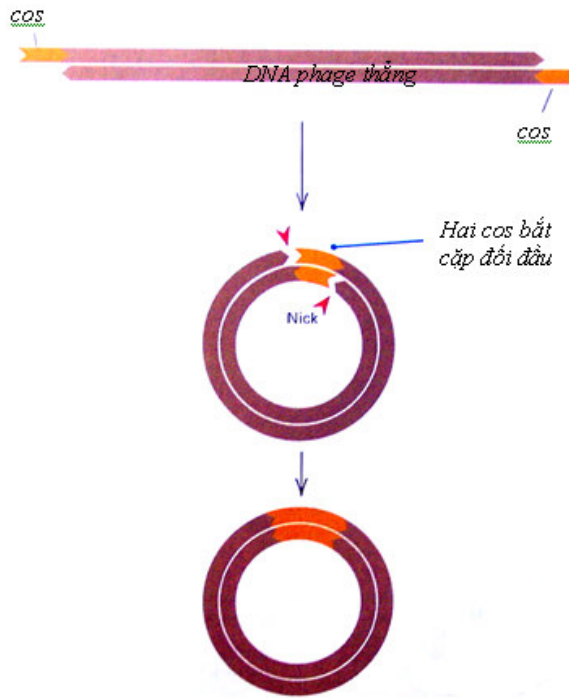
Các bacteriophage làm chết tế bào chủ gọi là *độc* (virulent) và chúng sinh sản theo *chu trình tan* (hình 20.42). Chu trình bắt đầu khi *sợi đuôi* của phage T4 gắn vào các *điểm nhận* (receptor sites) trên bề ngoài của tế bào *E.coli*. Ống đuôi co lại tạo lỗ thủng xuyên vách tế bào và bơm ADN vào trong tế bào tương tự như dùng ống tiêm (syringe) bơm thuốc. Capsid rỗng của phage còn lại bên ngoài tế bào.

Khi ADN trần đã xâm nhập vào trong tế bào, các phage khác nhau có thể sử dụng các cách khác nhau để sản sinh ra thế hệ con. Sau khi bị nhiễm, tế bào *E.coli* nhanh chóng bắt đầu *phiên mã* và *dịch mã* các gen của virut. Phage T₄ có khoảng 100 gen và phần lớn đã được biết rõ. Một trong những enzym được tạo ra đầu tiên *cắt ADN* của tế bào chủ.

Nói chung, ADN của phage được phiên mã đầu tiên nhờ ADN polymeaz của tế bào chủ tạo ra “*mARN sớm*”. Các mARN muộn hơn có thể được tổng hợp bởi ARN polymeaz của phage hoặc ARN polymeaz của vi khuẩn bị biến đổi để phiên mã các gen của phage. Các *mARN muộn* được dịch mã tạo các loại protein enzym điều hòa và cấu trúc. Các *protein điều hòa* của phage kiểm soát sự phiên mã nối tiếp của các gen (kiểu điều hòa nối tiếp).

Khi ADN của tế bào chủ bị phân hủy, bộ gen của phage kiểm soát toàn bộ hoạt động của tế bào để tạo các cấu phần của nó. Các nucleotit được dùng để *sao chép ADN của phage* ra hàng trăm bản sao. Các protein của capsid được tổng hợp thành 3 phần riêng: đầu đa diện, ống đuôi và các sợi đuôi; rồi chúng tự ráp lại với nhau thành virion con (hình 20.42 - vòng tròn phía dưới góc phải). Phage hoàn tất chu trình khi enzym **Lysozym** được tạo ra để tiêu hóa vách tế bào. Tế bào vi khuẩn bị vỡ, 100 đến 200 virion thoát ra và chúng có thể lặp lại chu trình mới.

Toàn bộ chu trình từ lúc phage tiếp xúc bề mặt tế bào đến tan diễn ra trong khoảng 20 - 30 phút ở 37°C. Trong thời gian đó số lượng phage T₄ tăng hơn cả trăm lần, cũng khoảng thời gian đó số lượng tế bào *E.coli* mọc nhanh nhất cũng chỉ tăng gấp đôi. Nếu nhỏ một hạt T₄ lên thảm tế bào *E.coli* mọc trên môi trường rắn trong hộp petri thì sau đó xuất hiện *vết tan* (plaque) do các tế bào vi khuẩn bị phá vỡ. Trên thực tế, có thể đo được các hạt phage trong dung dịch bằng cách pha loãng dịch rồi trộn với dịch tế bào vi khuẩn và cùng cấy lên môi trường rắn trong hộp petri và sau đó tính số vết tan suy ra mật độ phage.



Hình 20.43. DNA của phage lamda dạng thẳng hoặc vòng tròn

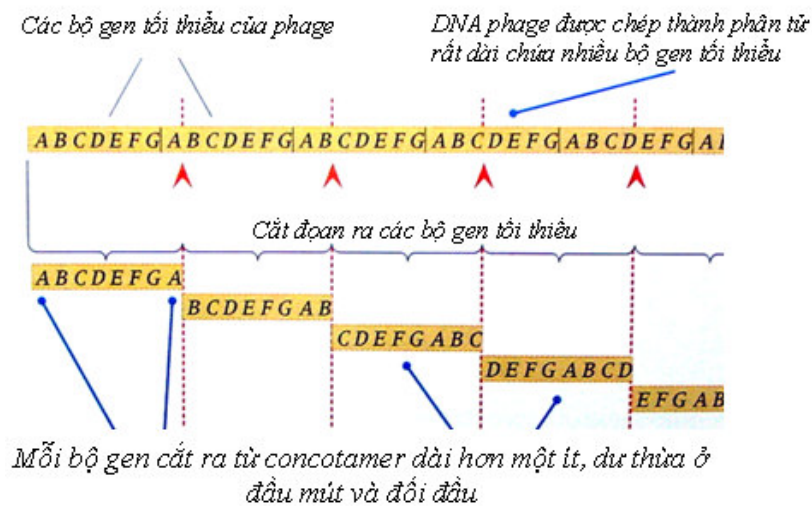
Phage dạng sợi (filamentous phage) như *M.13* có khả năng xâm nhập vách tế bào và lúc đó enzym của tế bào chủ tiêu hủy vỏ protein làm nucleic axit thoát ra.

Ở phage *lamda* (λ), sự sao chép *theta* (θ) hay sao chép “mắt” xảy ra rất sớm trong chu trình tan làm tăng nhanh các khuôn cho phiên mã và sao chép tiếp. Về sau, sao chép vòng tròn xoay đảm bảo các bộ gen để gói vào đầu của phage thế hệ con. Các bộ gen của phage λ cũng được cắt ra từ concatemer, nhưng khác với phage T4, sự cắt được thực hiện ở một trình tự chuyên biệt dài 12N gọi là điểm *cos* (từ chữ cohesive site - điểm cố kết) do *terminaz* hay hệ thống *Ter* (*Ter* system - nhận biết trình tự đặc hiệu). Sự cắt bởi *Ter* đòi hỏi hai điểm *cos* hoặc một điểm *cos* và đầu mút cô kết tự do ($1/2$ *cos*) hiện diện trên phân tử ADN của concatemer. Nhờ trình tự *cos* ở 2 đầu mút mà ADN bộ gen của phage λ có thể ở dạng thẳng hoặc vòng tròn và có thể chuyển đổi qua lại (hình 20.43).

Bộ gen của phage λ được biến đổi có chiều dài trong khoảng 79-106% của bộ gen phage λ bình thường khi bị cắt bởi hệ thống *Ter* và được ráp vào

đầu của phage. Đây là tính chất quan trọng của phage λ được sử dụng trong kỹ thuật tái tổ hợp ADN (chương VII).

Có một số cơ chế khác nhau gói ADN vào vỏ. Ở phage T4 của *E.coli*, sự sao chép vòng tròn xoay của mạch ADN kép tạo ra một sợi ADN mạch kép dài gồm một dãy các concatemer nối tiếp nhau. Các concatemer bị cắt ở những điểm không chuyên biệt. Vì khả năng chứa ADN của đầu lớn hơn chiều dài 1 bộ gen của phage, nên mỗi đoạn thẳng được cắt ra thành từng concatemer với trình tự gen khác nhau.



Hình 20.44. Concatemer bị cắt thành nhiều bộ gen virus với đủ số gen hoặc dài hơn một ít, nhưng có thứ tự gen khác nhau và khi cuộn lại có thể đổi đầu.

Các đoạn cuối thường có đoạn lặp lại nên được gọi là sự dư thừa cuối (terminal redundance). Vì mỗi đoạn của concatemer được cắt ở những điểm khác nhau nên chúng tạo thành các bộ gen có thứ tự không giống nhau và có thể tạo vòng tròn đổi đầu (cyclically permuted) (hình 20.44).

Sau khi phage tự ráp các cấu phần xong, protein phân hủy gọi là Lysozym được sản sinh ra làm tan tế bào và giải phóng các phage con. Phần lớn các phage độc theo chu trình tan vừa nêu trên. Tuy nhiên, có một số ngoại lệ, như phage sợi (filamentous) M13 của *E.coli* hầu như không bao giờ làm chết hoặc làm tan tế bào.

Các tế bào vi khuẩn chủ và các phage kí sinh có sự đồng tiến hóa (coevolution). Các tế bào vi khuẩn có các cơ chế bảo vệ như biến đổi màng tế bào để phage không bám vào được hoặc các enzym restriction endonucleaz

cắt các ADN của phage. Phage cũng biến đổi để xâm nhập được vào tế bào vi khuẩn. Có trường hợp cả hai cùng tồn tại trong chu trình tiềm tan.

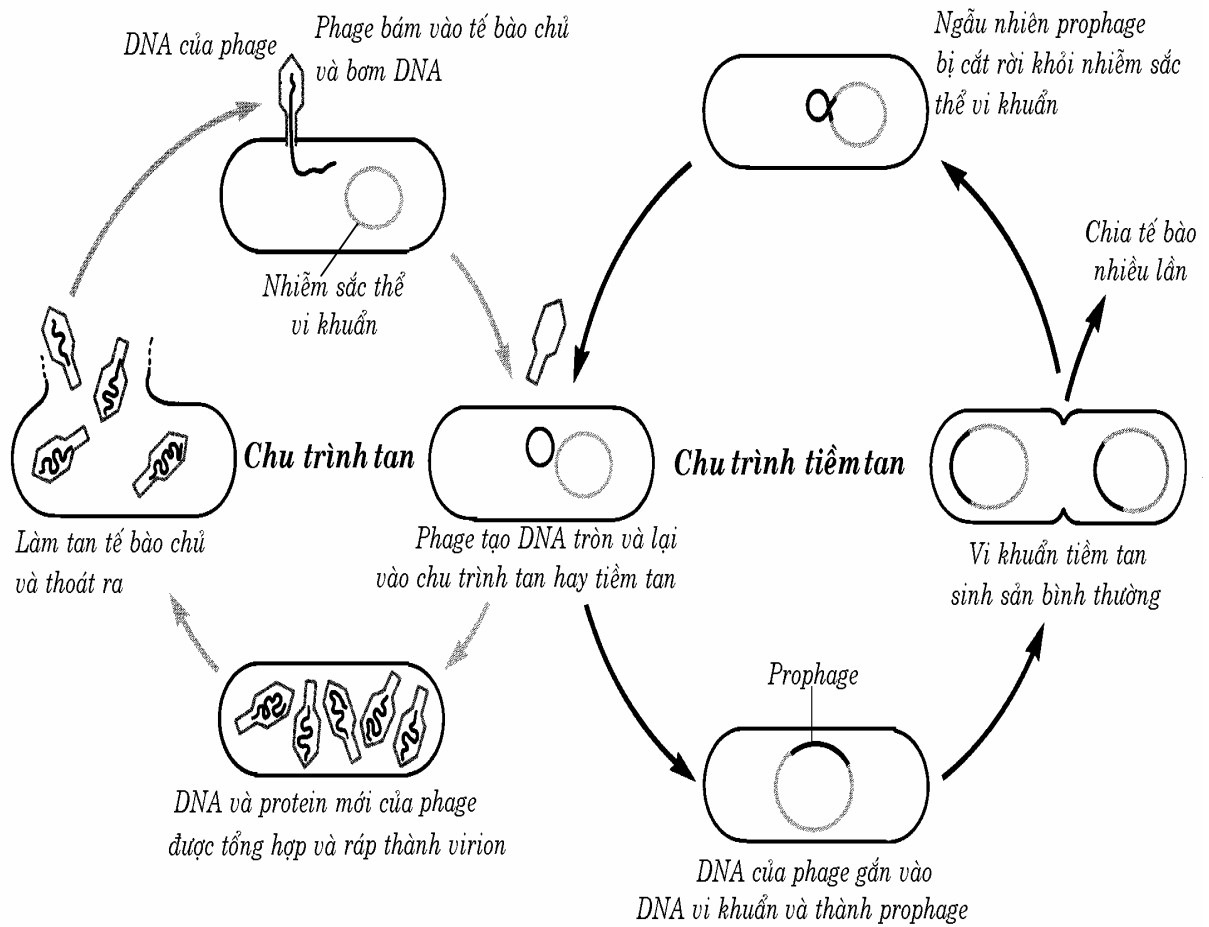
Phage độc phá vỡ tế bào vi khuẩn chủ, nên có thể dùng chúng trị bệnh do vi khuẩn gây ra. Khả năng này được chứng minh rất sớm, nhưng chưa được ứng dụng do sự gia tăng thuốc kháng sinh. Nhưng hiện nay do sự gia tăng các vi khuẩn lờn thuốc kháng sinh, nó được quan tâm trở lại.

20.7.2. 2. Chu trình tiềm tan (*Lysogenic cycle*)

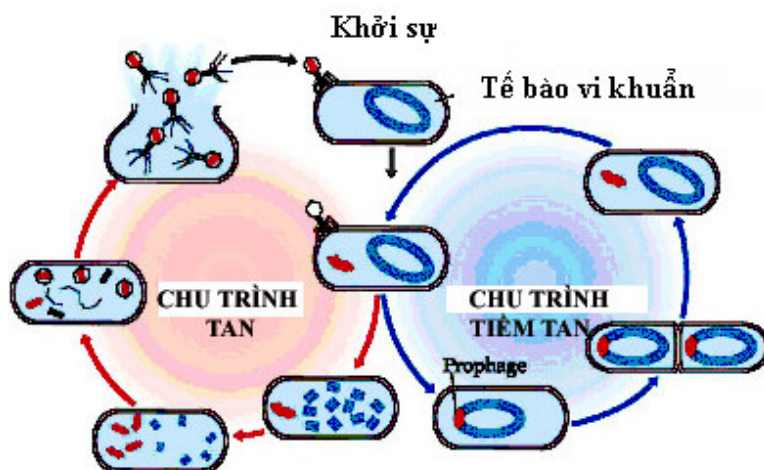
Trong chu trình tiềm tan, phage không làm chết tế bào chủ, mà bộ gen virut gắn vào bộ gen tế bào chủ và cùng tồn tại nhiều thế hệ. Vi khuẩn bị phage xâm nhiễm mà không tan gọi là *vi khuẩn tiềm tan* (lysogenic bacteria). Các virut có thể sinh sản mà không làm chết tế bào chủ được gọi là *phage ôn hòa* (temperat virut). Vi khuẩn tiềm tan chứa phân tử ADN của phage không làm tan, gọi là *prophage*, chèn vào nhiễm sắc thể của nó. Vi khuẩn tiềm tan này có khả năng “*miễn dịch*” chống sự xâm nhiễm của phage mới từ ngoài, tuy cơ chế này không đồng nghĩa với miễn dịch tế bào. Trong một số điều kiện, prophage cũng được sao chép theo chu trình sinh sản bình thường của vi khuẩn chủ mà không gây hại cho vi khuẩn. Một số điều kiện khác sẽ hoạt hóa prophage, làm nó khởi sự chu trình tan dẫn đến phóng thích số lớn phage tự do.

Chi tiết chu trình tan và tiềm tan được nghiên cứu ở phage λ (hình 20.45).

Có hai kiểu chu trình tiềm tan. Trong kiểu chung cho đa số như phage λ , ADN của phage gắn vào nhiễm sắc thể tế bào chủ. Ở kiểu khác mà đại diện là phage P₁, ADN của phage không gắn vào nhiễm sắc thể tế bào chủ, mà bằng cách nào đó sao chép đồng thời như plasmid. Cả hai dạng đều được gọi chung là *prophage*.



Hình 20.45. Chu trình tan và tiềm tan ở phage λ



Hình 20.46: Chu trình tan và tiềm tan ở phage λ

Chu trình sống bắt đầu khi phage gắn vào bề mặt tế bào *E.coli* và bơm ADN vào trong gây nhiễm. ADN của phage sau khi được bơm vào tế bào tạo vòng tròn và sẽ tham gia vào một trong 2 chu trình. ADN của phage có thể hoặc tham gia vào chu trình tiềm tan của phage T_4 hoặc gắn vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn nhờ tái tổ hợp ở *điểm chuyên biệt* (specific site) để bước vào *chu trình tiềm tan*. Ở prophage phần lớn các gen không có hoạt tính. Tuy nhiên có ít nhất 1 gen của prophage luôn hoạt động: gen *cI* mã hóa cho *protein kìm hãm* (repressor protein) giữ cho phần lớn các gen của phage im lặng. Trong quá trình sinh sản của tế bào, ADN của prophage cũng được sao chép và chia đều về các tế bào con như ADN của tế bào. Một tế bào bị nhiễm có thể nhanh chóng sinh ra nhiều tế bào vi khuẩn chứa prophage.

Quá trình gắn ADN của phage thực hiện qua 4 bước:

- ADN mạch thẳng được bơm vào tế bào; ADN của phage ở dạng vòng tròn nhờ sự bắt cặp các đoạn đuôi dư thừa.
- Một số *gen sớm* của phage phiên mã và tổng hợp một số phân tử *protein ức chế* (repressor) và enzym *integraz* (enzym xúc tác việc gắn vào bộ gen tế bào chủ). Repressor ức chế sự phiên mã các gen của phage.
- ADN của phage thường được gắn vào ở điểm chuyên biệt trên nhiễm sắc thể thành prophage nhờ enzym *integraz*.
- Vi khuẩn sống và sinh sản; prophage được sao chép cùng với nhiễm sắc thể của tế bào chủ.

Đôi khi prophage có thể tách khỏi ADN của vi khuẩn một cách ngẫu nhiên hoặc có thể tách khỏi do tác động của các nhân tố môi trường như phóng xạ hay hóa chất. Quá trình tách diễn ra ngược lại với gắn vào. Prophage được tách rời ra độc lập trở thành phage tự do và bắt đầu *chu trình tan*.

Nếu *vi khuẩn tiềm tan* bị tác động phá hủy ADN, prophage sẽ có lợi nếu tách khỏi nhiễm sắc thể, chuyển sang chu trình tan tạo ra các phage mới thoát khỏi tế bào. Khi ADN của vi khuẩn *bị thương tổn*, *proteaz* (recA protein) của hệ thống sửa sai SOS được hoạt hóa. ADN của prophage bị ức chế, *excisionaz* (enzym cắt rời) được tổng hợp và prophage tách khỏi nhiễm sắc thể. Quá trình đó được gọi là *cảm ứng* của prophage (prophage induction). Nếu tia UV phá hủy ADN của tế bào chủ làm cảm ứng prophage thì được gọi là *cảm ứng do UV*. Khi tế bào vi khuẩn F^- không tiềm tan giao hợp với tế bào Hfr tiềm tan, tế bào nhận bị chết do chu trình tan của phage. Dạng cảm ứng phage này được gọi là *cảm ứng hợp tử* (zygotie induction).

Vì tế bào chủ mang prophage trên nhiễm sắc thể của mình sẽ có khả năng bị tan nếu prophage tách ra nên được gọi *tế bào tiềm tan*. Đôi khi một ít gen của prophage biểu hiện ở tế bào tiềm tan gây biến đổi kiểu hình ở vi khuẩn, quá trình được gọi là *chuyển hóa tiềm tan* (lysogenic conversion). Một số prophage có thể tạo độc tố

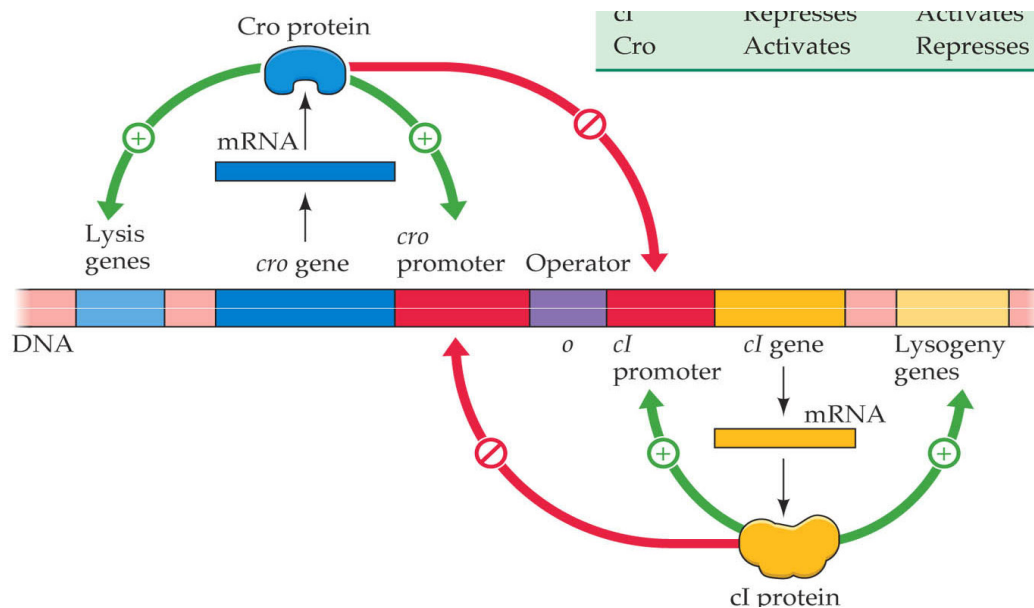
20.7.2.3. Kiểm soát sự phiên mã ở phage

Các virut có chiến lược điều hòa sự phiên mã rất phức tạp, mà ở đây chỉ nêu tóm tắt cơ chế đó. Bacteriophage λ là phage trung hòa (temperat), có nghĩa là nó có thể đi vào chu trình tan hoặc tiềm tan.

Khi tế bào chủ tăng trưởng trên môi trường giàu, prophage vẫn duy trì tính tiềm tan (lysogenic); nhưng khi tế bào chủ suy yếu, prophage trở thành sinh tan (lytic). Ở đây có một ‘công tắc di truyền’ (“gentic switch”) xác định hành vi của prophage.

Có 2 protein điều hòa, cI and Cro, cạnh tranh nhau ở 2 vị trí operator/promoter trên ADN của phage. Một operator kiểm soát hoạt tính các gen sinh tan; cái kia thuộc chu trình tiềm tan. Hai protein điều hòa này có tác động ngược nhau trên 2 operator. cI ức chế operator/promoter sinh tan và

hoạt hóa operator/promoter tiềm tan. Cro hoạt hóa operator/promoter sinh tan và ức chế operator/promoter tiềm tan. Các nồng độ tương đối của cI và Cro xác định đầu ra (hình 20.47).



Hình 20.47. Cơ chế điều hòa ở phage lamda:

protein Cro hoạt hóa sinh tan, ức chế tiềm tan; protein cI hoạt hóa tiềm tan, ức chế sinh tan.

(Lytic gens: các gen tan; Lysogeny gens: các gen tiềm tan)

Khi ADN của phage đi vào tế bào kí chủ mới, con đường sinh tan và tiềm tan bắt đầu với cùng một cách. Cả hai con đường này đều cần cho sự biểu hiện của những gen rất sớm và những gen sớm. Nhưng sau đó chúng tách ra: theo con đường sinh tan nếu những gen muộn được biểu hiện, hiện tượng tiềm tan xảy ra nếu có sự tổng hợp chất kiềm hãm

Lambda chỉ có hai gen rất sớm được phiên mã độc lập nhờ ARN polymeaz của kí chủ:

- Gen N mã hóa cho một nhân tố chống kết thúc và hoạt động của nhân tố này tại những vị trí *nut* cho phép sự phiên mã tiến hành trong những gen sớm.

- Gen *cro* có hai chức năng: làm ngăn cản sự tổng hợp các chất kiềm hãm (hoạt động chủ yếu nếu chu trình sinh tan được tiến hành) và làm tắt sự

biểu hiện của những gen rất sớm (những gen không cần về sau trong chu trình sinh tan).

Các gen sớm gồm 2 gen sao chép (cần cho sự gây nhiễm sinh tan), 7 gen tái tổ hợp (một vài gen liên quan đến sự tái tổ hợp trong suốt quá trình gây nhiễm sinh tan, 2 gen cần thiết cho việc gắn ADN của phage lambda vào nhiễm sắc thể vi khuẩn trong hiện tượng tiềm tan) và 3 gen điều hòa.

Vì thế những gen sớm đáp ứng hai vấn đề quan trọng: một số gen cần cho phage đi vào hiện tượng tiềm tan, những gen còn lại liên quan tới những kiểm soát khác của chu trình sinh tan.

Trạng thái tự nhiên của *chuỗi kiểm soát* này giải thích những nét đặc trưng sinh học của sự tồn tại *thể tiềm tan*. Hiện tượng tiềm tan được ổn định vì chuỗi kiểm soát đảm bảo khi mức chất kìm hãm thích hợp, có sự biểu hiện liên tục của gen *cI*. Kết quả là O_L (Operator left – trái) và O_R (Operator right – phải) vẫn còn bị chiếm giữ vô thời hạn. Bằng cách biểu hiện toàn bộ chu trình sinh tan hoạt động này duy trì prophage ở dạng không hoạt động.

Những vùng kiểm soát phiên mã cung cấp một điểm áp lực, tại điểm này việc đi vào chu trình toàn vẹn có thể được kiểm soát. Bằng cách không cho ARN polymeaz đến gần những promoter này, một protein kìm hãm ngăn cản bộ gen của phage đi vào chu trình sinh tan..

Protein kìm hãm được mã hóa bởi gen *cI*. Đột biến ở gen này không thể duy trì hiện tượng tiềm tan nhưng nó luôn luôn đi vào chu trình sinh tan. Tiến hành tách sơ khởi các protein kìm hãm, mô tả đặc điểm, người ta đã biết tại sao protein kìm hãm có thể duy trì cả trạng thái tiềm tan và tạo khả năng miễn dịch cho thể tiềm tan kháng lại sự bội nhiễm bởi những bộ gen của phage lambda mới.

Lambda có sự lựa chọn giữa hai cách: hoặc đi vào hiện tượng tiềm tan hoặc bắt đầu sự lây nhiễm sinh tan. Hiện tượng tiềm tan được bắt đầu bằng sự hình thành chuỗi duy trì tự sinh làm ngăn cản toàn bộ chu trình sinh tan (lytic cascade) qua việc sử dụng áp lực tại hai điểm. Chương trình cho sự hình thành hiện tượng tiềm tan tiến hành qua một vài sự kiện tương tự nhau mà những sự kiện này cần cho chu trình sinh tan (lytic cascade) (sự biểu hiện của

gen sớm qua sự biểu hiện của N là cần thiết). Làm thế nào để phage đi vào chu trình sinh tan?

Gen *cro* có vai trò quan trọng ảnh hưởng lên chu trình sinh tan (gen *cro* mã hóa cho một chất kìm hãm khác). Gen *cro* chịu trách nhiệm *ngăn cản* sự tổng hợp *protein kìm hãm*, hoạt động này làm ngừng khả năng hình thành hiện tượng tiềm tan. Những đột biến *cro* thường hình thành hiện tượng tiềm tan hơn là đi vào con đường sinh tan. *Cro* có dạng một dimer nhỏ hoạt động trong vùng miễn dịch. Cro có hai tác dụng là ngăn cản sự tổng hợp chất kìm hãm và giảm bớt sự biểu hiện của những gen sớm.

20.7.2.4. Tái tổ hợp ở phage

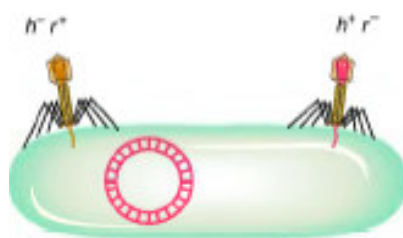
Các phage tuy có kích thước nhỏ bé phải nhìn dưới kính hiển vi điện tử mới thấy được. Nhưng các tính trạng của phage được quan sát dựa theo các vết tan (Plaque) hoặc *biên độ chủ*. Vết tan (Plaque) là vùng tan hay sự ức chế tế bào gây ra bởi sự nhiễm virut của các tế bào nhạy cảm. Phage T_2 có dòng hoang dại r^+ tạo vết tan bình thường, còn dòng đột biến r (rapid hoặc ký hiệu r^-) làm tan nhanh nên vết tan to.

Lai: $T_2 h^+ r \times T_2 hr^+$

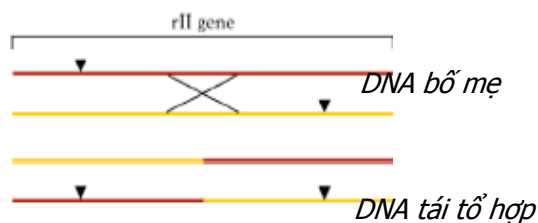
↓

$T_2 hr^+, T_2 h^+ r$ $T_2 h^+ r^+, T_2 hr$

Thế hệ phage con: Các dạng cha mẹ Các dạng tái tổ hợp



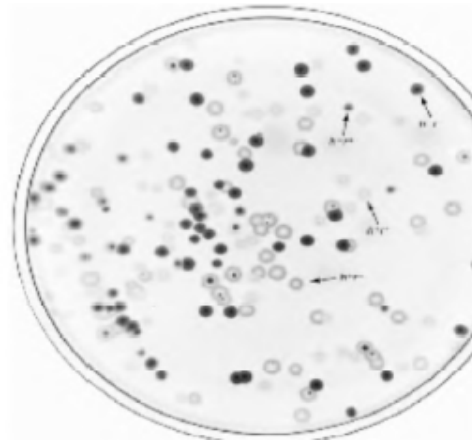
Hình 20.48. Sự nhiễm kép hai phage



Hình 20.49. Cơ chế tái tổ hợp gen

Về biên độ chủ có dòng hoang dại h^+ (host) chỉ làm tan vi khuẩn *E.coli* dòng B nhưng không làm tan dòng B_2 , đột biến h (hoặc ký hiệu h^-) làm tan các vi khuẩn *E.coli* cả 2 dòng B và B_2 . Dòng phage $T_2 h^+ r$ làm tan cả B và B_2 với vết tan nhỏ được lai với dòng $T_2 hr^+$ làm tan chỉ B nhưng vết tan to.

Sự nhiễm phage (hình 20.48), cơ chế trao đổi các đoạn ADN (hình 20.49) và sự biểu hiện các vết tan thể hiện trên hình 20.50.



Hình 20.50. Các vết tan thể hiện tái tổ hợp ở bacteriophage

Sự xuất hiện các dạng tái tổ hợp $T_2 h^+r^+$ và $T_2 hr$ chứng tỏ 2 dòng phage T_2 đã lai với nhau.

Tái tổ hợp ở virus có các đặc điểm:

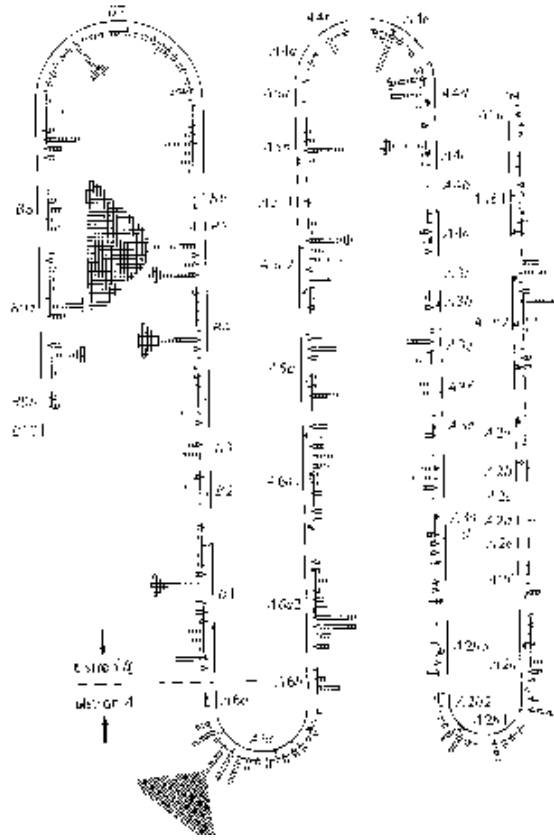
- Trong quá trình lai ở virus có sự tham gia của **cả bộ gen** như Eukaryota chứ không từng phần như ở vi khuẩn.

- Quá trình tái tổ hợp có **tính quần thể**. ADN của 2 dòng phage xâm nhập vào tế bào vi khuẩn, chúng sao chép ra hàng trăm bản sao và giữa hàng trăm ADN bộ gen của phage đã xảy ra tái tổ hợp. Do điều này, ở phage thường thấy hiện tượng **nhĩu âm** (negative interference) trong tái tổ hợp: tần số **tái tổ hợp đôi** giữa 2 locus đáng lẽ phải giảm thì lại tăng cao hơn mức bình thường.

20.7.2.5. Locus *rII* của phage T_4

Các nghiên cứu chi tiết về các đột biến *rII* của Phage T_4 làm sáng tỏ hơn về cấu trúc gen. Phage T_4 ở dạng hoang dại r^+ có khả năng nhiễm đồng thời hai nòi *E. coli* B và K. Các đột biến *rII* chỉ nhiễm nòi B nhưng không nhiễm nòi K. S.Benzer (1955) đã nhận được vài nghìn đột biến *rII* có nguồn gốc độc lập với nhau. Ông đã cho lai các đột biến với nhau và căn cứ vào sự xuất hiện các dạng tái tổ hợp hoang dại r^+ mà lập bản đồ các **điểm đột biến** (mutation sites) (hình 20.51).

Trước thí nghiệm của ông, *rII* được coi là một locus. Thí nghiệm cho thấy các đột biến xếp thành hai nhóm *rIIA* và *rIIB*. Lai các đột biến *rIIA* X *rIIB* sẽ có r^+ , nhưng lai *rIIA* X *rIIA* và *rIIB* X *rIIB* thì kiểu hình đột biến *r*.



Hình 20.51 Bản đồ các đột biến ở locus *rII*.

(Các hình tam giác đậm là các “điểm nóng”- hot spot)

Kết quả thí nghiệm cho thấy, gen có thể *phân chia nhỏ về mặt đột biến*. Các đoạn *rIIA* và *rIIB* được gọi là **cistron**, đơn vị chức năng nhỏ nhất đảm bảo khả năng xâm nhập nòi K. Thuật ngữ *cistron thực chất là gen*, ngày nay nó chỉ có tính chất lịch sử, ít được dùng. Theo quan niệm hiện nay, *rIIA* và *rIIB* là hai locus. Hai khái niệm mới được nêu ra là **muton** - đơn vị đột biến và **recon** - đơn vị tái tổ hợp.

Đoạn gen nghiên cứu tìm thấy có 2000 điểm đột biến, chúng phân bố không đều nhau, có những điểm “nóng” (hot spot) tập trung nhiều đột biến hơn (hình 4.16).

20.7.3. Các virus Eukaryota

20.7.3.1. Các virus thực vật

Các virus thực vật là một tai họa lớn cho trồng trọt vì nó làm giảm đáng kể năng suất cây trồng. Các virus thực vật có thể được truyền theo 2 đường:

- Theo chiều ngang (Horizontal transmission) là sự lây truyền từ cây này sang cây khác.

- Theo chiều dọc (Vertical transmission) qua đường sinh sản các virus từ cây mẹ đến thế hệ con.

Để xâm nhiễm tế bào thực vật, virus phải xâm nhập vách tế bào và màng sinh chất của thực vật.

Các côn trùng có thể là tác nhân truyền virus, khi chúng phá vỡ vách tế bào thực vật và đưa virus vào. Một cách lây nhiễm virus khác là sự tiếp xúc giữa mô bị thương tổn của cây bị nhiễm với cây không nhiễm.

Sự truyền theo chiều dọc có thể thông qua sinh sản vô tính hay hữu tính. Khi đã vào trong tế bào thực vật, các virus có thể phát tán bằng cách di chuyển theo *cầu chất liên bào* (plasmodesmata), các chỗ nối tế bào chất giữa các tế bào. Các virus gắn với các protein đặc hiệu giúp chúng bằng cách nào đó đi xuyên qua các lỗ hẹp của plasmodesmata.

a) Các virus ARN

Phần lớn các virus thực vật phát hiện cho đến nay, đa số có *bộ gen ARN mạch đơn kiểu (+)* và nhiều dạng có *capsid hình que*, kể cả virus đốm thuốc lá (hình 20.36 phía trên). Các protein *capxomr* xếp hình xoắn.

b) Các virus ADN

Các virus thực vật có bộ gen là ADN rất hiếm và chỉ gồm 2 nhóm:

- Nhóm thứ nhất là các *cauliflower mosaic virus*. Chúng có bộ gen là *ADN mạch kép* nằm trong vỏ (capsule) *đa diện* (polyhedral).

- Nhóm thứ hai là các *geminivirus* (gemini có nghĩa *sinh đôi*). Chúng có đặc tính là các *capsid dính thành đôi*, mỗi cái chứa một phân tử *ADN mạch đơn vòng tròn* với khoảng 2500 nucleotit. Các bộ gen bắt cặp có thể tương tự nhau ở một số virus và khác nhau đáng kể ở số khác.

c) Các viroid

Các viroid là một nhóm tác nhân gây bệnh ở thực vật, có kích thước nhỏ và cấu trúc đơn giản như virus. Chúng là những *ARN mạch đơn, trần, nhỏ bé*

có chiều dài chỉ vài trăm (240 - 350) nucleotit. Có sự bắt cặp mạnh giữa các bên trong phân tử ARN tạo cấu trúc kép. Các viroid không được bao trong vỏ protein, không gắn vào bộ gen tế bào chủ và sao chép không qua trung gian ADN. Một số tế bào thực vật có enzym sao chép ARN.

Các phân tử ARN của viroid bằng cách nào đó ngăn trở trao đổi chất của tế bào và làm ngừng tăng trưởng của cả thực vật. Một bệnh viroid khác làm hại đáng kể đến sản xuất hoa cúc ở Mỹ. Các viroid cũng tác hại đến khoai tây và cà chua.

Gần đây phát hiện rằng trình tự nucleotit của viroid giống với trình tự của intron của các gen Eukaryota. Người ta cho rằng có lẽ các viroid bằng cách nào đó tác động lên các hệ thống điều hòa kiểm soát các gen của tế bào.

20.7.3.2. Các virus động vật

Chính xác các virus động vật thể hiện đầy đủ **sự đa dạng** của các bộ gen ở virus. Một số virus động chứa ADN, và một số ARN, mạch đơn hay kép nhưng bộ gen của chúng rất nhỏ bé. Các virus động vật gây nhiều bệnh ở động vật và người, một số virus liên quan đến cả các bệnh ung thư, AIDS... *Arbovirus* xâm nhiễm cả côn trùng và động vật có xương. Các virus truyền từ các loài chân khớp (arthropod), vector trung gian, đến động vật có xương (vertebrat) qua vết đốt của côn trùng.

Các virus động vật xâm nhập thể bào theo 3 con đường khác nhau:

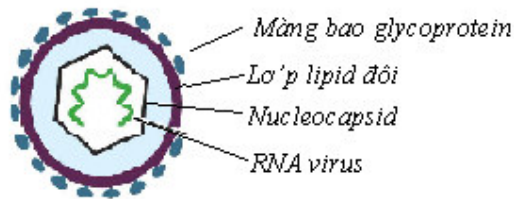
- Sự nội nhập bào (Endocytosis) của virion trần.
- Sự nội nhập bào (Endocytosis) của virus có màng bao (a membrane-encased virus)
- Sự dung hợp (Fusion) virus có màng bao với màng tế bào.

a) Các nhóm virus động vật

Sự đa dạng rất lớn của các virus động vật thể hiện ở 15 - 20 họ khác nhau, căn cứ theo các đặc tính như: kiểu và cấu trúc của nucleic acid, hình thái virion và cách xác định thể kháng nguyên chung. Do sự phụ thuộc của các bộ gen virus vào mARN của chúng, các virus động vật được chia thành 7 nhóm.

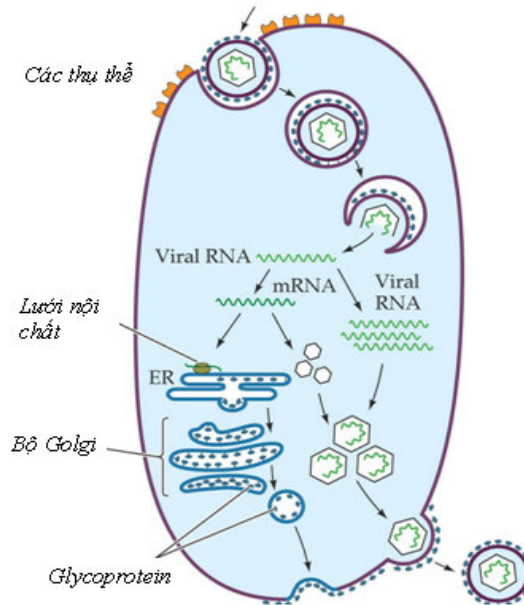
b) Các chu trình sao chép của virus động vật

Các chu trình sao chép của virus động vật có nhiều điểm tương tự với các virus khác với nhiều biến dạng đáng kể. Ví dụ trường hợp của *cúm* (influenza virus) hay của *Paramyxovirus* gồm các virus gây bệnh sởi và quai bị. Các virus cúm và *Paramyxovirus* có bộ gen là **ARN một mạch** được gói trong capsid xoắn dẻo. Phía bên ngoài capsid có màng bao là tính chất chung của nhiều nhóm virus động vật và phage (hình 20.52).



Hình 20.52. Virus cúm

Bao màng giúp virus xâm nhập tế bào chủ. Khi virus tiếp xúc với tế bào, các glycoprotein thò ra ở màng bao gắn vào các thụ thể (receptor) trên màng sinh chất (hình 20.52). Quá trình này chuyển capsid có chứa ARN vào tế bào chất và ở đó capsid bị mất (*bóc vỏ*). Các enzym của virus tham gia sao chép ARN của bộ gen và tạo mARN, nhưng bộ máy của tế bào được sử dụng để tổng hợp protein của virus. Các capsid mới được lắp ráp bao các bộ gen của virus và chúng đội màng sinh chất của tế bào mọc chồi rồi thoát ra khỏi tế bào. Bằng cách này các capsid có màng bao chính là màng sinh chất của tế bào chủ cũ và các virion mới có thể sử dụng các bao màng này để hòa nhập với màng của tế bào chủ mới. Toàn bộ chu trình này được gọi là **chu trình sinh sản** (reproductive cycle), chứ không phải chu trình tan vì các virus có thể thoát ra bằng mọc chồi mà không phải phá vỡ tế bào chủ. Đáng chú ý là chu trình sinh sản của các virus loại này diễn ra ở tế bào chất của tế bào và không tác động đến nhân tế bào.



Hình 20.53. Chu trình sinh sản của virus cúm (*Influenza virus*)

Không phải tất cả các màng của virus đều bắt nguồn từ màng sinh chất. Ví dụ, bao màng của *herpesvirus* từ màng nhân của tế bào chủ. Các bộ gen của *herpesvirus* là ADN mạch kép, chúng sinh sản bên trong nhân tế bào, sử dụng phối hợp cả enzym của virus và tế bào để sao chép ADN và phiên mã.

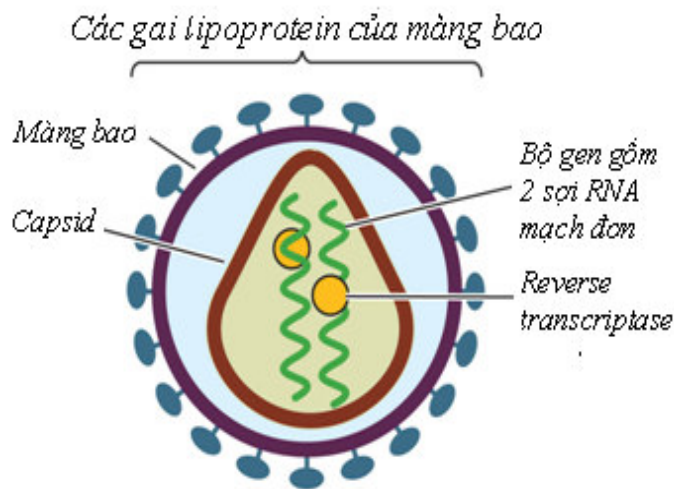
Khi ở trong nhân của tế bào, ADN của *herpesvirus* (tiền virus) tương tự prophage ở vi khuẩn. Provirus ở dạng tiềm ẩn có thể gây một số triệu chứng bệnh ở người. Đôi khi các stress vật lý (như tác động ánh sáng mặt trời mạnh) hay tình cảm có thể làm cho *provirus herpes* bắt đầu chu trình sinh sản tạo các triệu chứng khó chịu cho con người.

c) Các retrovirus

Các nhà khoa học đã nhận thấy rằng một số virus có thể gây ung thư ở động vật và cả ở người. Các virus gây ung thư gồm: retrovirus, papovavirus, adenovirus và nhóm herpesvirus.

Có lẽ các virus gây ung thư quan trọng nhất là *retrovirus*, các virus có bộ gen ARN sinh sản qua trung gian ADN. Retrovirus HTLV-I gây bệnh bạch cầu tế bào T (T-cell leukemia) và retrovirus HIV gây bệnh AIDS làm suy yếu hệ thống miễn dịch (hình 20.54). Nói chung, retrovirus liên quan đến những bệnh nguy hiểm, khó chữa trị nhất hiện nay của nhân loại, kể cả ung thư.

Tất cả các virus biến đổi tế bào qua việc *gắn nucleic axit của virus vào ADN của tế bào chủ*. Sự gắn này được ổn định (các provirus không bao giờ bị cắt rời ra như prophage). Đối với các virus gây bệnh ung thư là ADN, sự gắn vào là quá trình trực tiếp. Các retrovirus thì khác, trước hết chúng sử dụng ***reverse transcriptase*** để từ khuôn ARN tạo ra ADN. Sau đó ADN của virus có thể được gắn vào ADN bộ gen của tế bào chủ và chúng cũng sao chép với bộ gen này trong mỗi thế hệ.

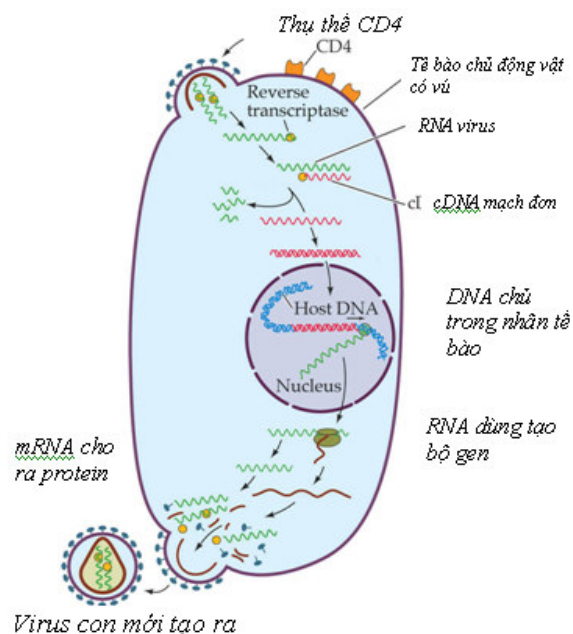


Hình 20.54. Cấu trúc của virus HIV (retrovirus).

Hình 20.55 mô tả và giải thích chu trình sinh sản retrovirus trong tế bào.

Hiện nay, nhiều người cho rằng các virus có thể tác động đến sự biểu hiện của các gen ung thư. Thường các virus gây ung thư phối hợp với những tác nhân khác trong gây bệnh.

Về nguồn gốc của các virus thì nhiều người cho rằng chúng bắt nguồn từ các đoạn nucleic axit được gói lại một cách chuyên biệt. Một số virus ở Eukaryota giống về cấu trúc và chức năng so với một số gen của tế bào chủ hơn virus của vi khuẩn. Bộ gen của một số virus giống các phân tử di truyền của tế bào như plasmid hay transposon.



Hình 20.55. Chu trình sinh sản của retrovirut HIV gây bệnh AIDS

20.7.4. Các Prion

Hai bệnh thoái hóa não ở người là bệnh kuru và Creutzfeldt-Jacob (bệnh tương tự ở cừu) có thể gây nên do các **phần tử protein gây nhiễm** được gọi là **prion** (proteinaceous infectious particle). Cho đến nay, sự hiểu biết về chúng còn rất ít. Gần đây, khi xuất hiện dịch bò điên ở Anh, chúng được nhắc tới nhiều vì không phát hiện thấy các virut.

20.7.4.1. Lược sử

Vào những năm 1960, T. Alper và J.S. Griffith nêu giả thuyết rằng một số bệnh não nhũn (spongiform encephalopathies) lây truyền do các tác nhân gây nhiễm chỉ gồm các protein. Thuyết này giải thích việc phát hiện tác nhân bí ẩn gây bệnh gãi và Creutzfeldt-Jakob (scrapie and Creutzfeldt-Jakob diseases) đề kháng tia tử ngoại UV.

Francis Crick, người đã nêu “Học thuyết trung tâm” (“Central dogma of molecular biology”) đặc biệt quan tâm đến giả thuyết của Griffith vì nó mâu thuẫn với học thuyết của ông.

Vào năm 1982, S.B. Prusiner (Đại học California) thông báo đã tinh sạch tác nhân gây bệnh giả định và nó chỉ gồm protein đặc hiệu. Prusiner

dùng thuật ngữ **prion** chỉ tác nhân gây bệnh, là sự kết hợp 2 chữ đầu của các từ *proteinaceous* (phần tử protein) và *infectious* (gây nhiễm), còn đuôi **-on** thì tương tự virion. Protein đặc hiệu mà prion tạo ra gọi là *PrP* (viết tắt của cụm từ "protease resistant protein" – protein kháng proteaz). Prusiner đã nhận giải Nobel Sinh lý hay Y học (Nobel Prize in Physiology or Medicine) vào năm 1997 do công trình nghiên cứu các prion.

20.7.4.2. Cấu trúc

– **Sự tồn tại các đồng dạng (Isoform).** Protein mà các prion tạo ra được thấy ở khắp cơ thể, thậm chí ở cả người và động vật khỏe mạnh. Tuy nhiên, protein của prion trong vật liệu nhiễm có đặc tính gập cuộn khác (different folding pattern) và kháng với proteaz, enzym mà trong cơ thể có thể phân hủy các protein một cách bình thường. Dạng protein bình thường gọi là PrP^C , dạng gây nhiễm là PrP^{Sc} (*C* bắt nguồn từ chữ 'cellular' (của tế bào) hay gọi chung ('common') là *PrP*, còn *Sc* từ chữ 'scrapie', là bệnh prion ở cừu. Trong khi PrP^C được xác định cấu trúc tốt (structurally well-defined), thì PrP^{Sc} phân tán rộng và khó xác định. *PrP* có thể được gây cảm ứng gập cuộn (induced to fold) thành các isoform xác định tốt (well-defined isoforms) *in vitro*, và mối quan hệ với dạng gây bệnh (pathogenic) *in vivo* còn chưa rõ.

– PrP^C : PrP^C là protein bình thường trên màng tế bào. Nó có 209 axit amin s (ở người), một cầu disulfite, 35-36kDa và chủ yếu là cấu trúc xoắn alpha. PrP^C dễ dàng bị phân hủy bởi proteinase K và có thể phóng thích khỏi bề mặt tế bào *in vitro* bởi enzym phosphoinositide phospholipase C (PI-PLC).

– PrP^{Sc} : Dạng đồng hình gây nhiễm (infectious isoform) của PrP^C là PrP^{Sc} có khả năng chuyển đổi PrP^C protein bình thường thành isoform gây nhiễm bằng cách thay đổi cấu hình (conformation) của nó. Mặc dù cấu trúc 3 chiều (3D structure) của PrP^{Sc} chưa biết, ở đây có sự gia tăng lượng phiến beta (β -sheet content) ở dạng đã nhiễm bệnh của phân tử thay thế các vùng bình thường của xoắn alpha (α -helix). Các tổ hợp (aggregations) của những isoform bất thường đó có thể hình thành các sợi có cấu trúc giàu amyloid (highly structured amyloid fibers). Phần cuối của sợi tác động như là khuôn cho các phân tử protein tự do, nó làm cho sợi mọc ra. Có những khác biệt nhỏ trong trình tự axit amin của vùng hình thành prion (prion-forming regions) dẫn đến những tính chất cấu trúc khác biệt trên bề mặt của các sợi prion. Do

vậy, chỉ các phân tử protein tự do tương tự trong trình tự axit amin với protein prion có thể được tham gia vào sợi đang mọc ra (growing fiber).

20.7.4.3. Chức năng

Hiện nay đã chứng minh được rằng vai trò tế bào bình thường của các protein prion là chất oxy hóa (antioxidant) phụ thuộc Cu.

– PrP và ghi nhớ dài hạn (long-term memory). *Có chứng minh cho thấy PrP có thể có chức năng bình thường khi duy trì sự ghi nhớ dài hạn.*

Đã cho thấy chuột thiếu các gen cho protein PrP bình thường của tế bào đã có hippocampal LTP biến đổi.

– PrP và sự tái sinh tế bào gốc (*stem cell renewal*). *Bài báo năm 2006 cho thấy rằng sự biểu hiện PrP ở tế bào gốc là cần thiết cho sự tự tái sinh tủy xương của sinh vật (organism's self-renewal of bone marrow). Công trình này cũng chỉ ra rằng tất cả các tế bào gốc tạo máu dài hạn (all long-term hematopoietic stem cells) biểu hiện PrP trên bề mặt tế bào của chúng và các mô tạo máu (hematopoietic tissues) với các tế bào gốc không PrP (PrP-null stem cells) thể hiện sự nhạy cảm gia tăng đối với sự suy kiệt tế bào.*

20.7.4.4. Bệnh Prion

Tất cả các bệnh theo giả thuyết do *prion* đều tác động lên cấu trúc của não hay các mô thần kinh khác và cho đến nay tất cả bệnh đều không chữa trị được và luôn gây chết. Nói chung, *prion* có thể liên quan cả hai là đơn vị nhiễm bệnh lý thuyết (theoretical unit of infection) hay protein đặc hiệu (ví dụ, PrP) biến thành tác nhân gây nhiễm (infective agent), dù có hay không ở trạng thái nhiễm bệnh (infective state).

Các prion được giả định là gây nhiễm và phát tán bằng cách *tái gấp cuộn* (refolding) bất thường thành *cấu trúc* có khả năng chuyển đổi (convert) các phân tử bình thường (normal molecules) của protein thành dạng *cấu trúc bất thường*. Tất cả các prion biết được gây ra sự hình thành *gấp cuộn amyloid* (amyloid fold), mà trong đó protein polyme hóa thành *phức hợp* (aggregate) gồm các *phiến beta* (beta sheets) gói chặt nhau. Cấu trúc biến dạng này rất ổn định và tích lũy trong mô nhiễm làm phá hủy và gây chết tế bào. Sự ổn định đó có nghĩa là các prion đề kháng các tác nhân vật lý và hóa học *gây biến tính*

(denaturation) làm cho việc loại bỏ và ngăn chặn các phần tử này rất khó khăn.

Các protein của prion (PrP) rất giống nhau ở tất cả các động vật có vú. Do những khác nhau nhỏ này trong PrP giữa các loài khác nhau, nên bệnh do prion được truyền từ loài này sang loài khác một cách không bình thường. Tuy nhiên, bệnh prion ở người *biến dạng bệnh Creutzfeldt-Jakob* được cho rằng gây nên bởi prion gây nhiễm điển hình ở bò và được truyền qua thịt bị nhiễm (infected meat). Ngoài những bệnh đã kể trên, còn một số bệnh khác ở động vật và người do prion.

Mặc dù đã xác định và biết rõ các tính chất chung của prion, nhưng cơ chế của sự gây nhiễm và phát tán prion vẫn còn trong bí ẩn.

20.7.4.5. Các giả thuyết về prion

Cho đến nay có nhiều bàn cãi về bản chất của prion. Các giả thuyết chủ yếu được tóm tắt như sau:

- Giả thuyết *chỉ protein* (Protein-only hypothesis). Theo giả thuyết này, protein có thể sao chép không dùng nucleic axit.
- Giả thuyết *đa cấu phần* (Multi-component hypothesis): các prion gây nhiễm có thể gồm nhiều cấu phần của tế bào chủ như PrP, lipid, và các phân tử polyanionic, hơn là chỉ có PrP^{Sc}.
- Giả thuyết *virut* (Viral hypothesis): tháng 1/2007 đã công bố bài báo cho thấy 10% hoặc ít hơn các tế bào nuôi cấy bị nhiễm prion có virut và cho rằng bệnh do *phân tử thông tin có khả năng sao chép* (a replicable informational molecule) tương tự nucleic axit gắn vào PrP.
- Giả thuyết *nhiễm độc kim loại nặng* (Heavy metal poisoning hypothesis): số lượng bất thường của đồng (Cu) và manganese (Mg) trong môi trường và thức ăn chăn nuôi có thể gây ra bệnh.

20.7.4. 6. Di truyền học (Genetics)

Nhiều vấn đề còn chưa sáng tỏ. Gen cho protein bình thường đã được phân lập: *PRNP* gen. Một số bệnh prion có thể được di truyền và trong mọi trường hợp liên quan đến các đột biến ở gen *PRNP* này. Nhiều đột biến khác nhau của *PRNP* đã được xác định và cho rằng các đột biến bằng cách nào đó làm cho PrP^C ngẫu biến (spontaneously change) thành dạng PrP^{Sc} bất thường.

20.7.4. 7. Các prion ở nấm men và nấm khác

Protein của prion đã được phát hiện ở nấm men *Saccharomyces cerevisiae* từ đầu những năm 1990. Sau đó, prion cũng được tìm thấy ở *Podospora anserina*. Các phát hiện protein có *biểu hiện kiểu prion* (prion-typ behavior) này ở một số *nấm* (fungi) có ý nghĩa hết sức quan trọng giúp cho sự hiểu biết về các prion ở động vật có vú. Tuy nhiên, các prion nấm không gây bệnh trong tế bào chủ và thậm chí còn có *ưu thế tiến hóa* (evolutionary advantage) thông qua dạng *di truyền dựa vào protein* (form of protein-based inheritance).

Sinh học hiện đại đã phát hiện hai dạng có biểu hiện sống đặc biệt: **viroid** có nucleic axit, không có protein và **prion** có protein, không có nucleic axit.

20.8-DI TRUYỀN HỌC VI NẤM VÀ VI TẢO

Các vi sinh vật nhân thực Eukaryota như vi nấm, vi tảo có **chu trình sống đa dạng** và ở nhiều điểm giống với các Eukaryota bậc cao. **Cấu tạo đơn bào** giúp cho việc sử dụng có hiệu quả các phương pháp phân tích di truyền ở vi sinh vật. **Phân tích bộ bốn** giúp nghiên cứu được chi tiết từng sản phẩm của giảm phân. Các nghiên cứu di truyền vi nấm tập trung ở 4 vấn đề căn bản: **tính không phối hợp, phân tích bộ bốn, tái tổ hợp nguyên phân** và **sự đơn bội hóa**. *Neurospora crassa* và *Saccharomyces cerevisiae* là những đối tượng nghiên cứu quan trọng của di truyền. Ở vi tảo *Chlamydomonas reinhardtii* được nghiên cứu chi tiết hơn cả trong số các vi tảo. Các nghiên cứu ở vi tảo làm sáng tỏ nhiều vấn đề của *di truyền quang hợp* và sự xác định các sắc tố.

Trong số gần 50.000 loài vi nấm, đến nay đã nghiên cứu về di truyền học được khoảng 30 loài. Những vi sinh vật đầu tiên được sử dụng vào nghiên cứu Di truyền học từ những năm 30 của thế kỷ trước chính là các vi nấm. Đó là *Neurospora* và các loài khác nhau của chi *Saccharomyces*. *Saccharomyces cerevisiae* là Sinh vật nhân thực (Eukaryota) đơn bào, cho nên là mô hình rất tốt cho nghiên cứu di truyền của Sinh vật nhân thực và vì thế cho nên được hiểu biết chi tiết hơn cả.

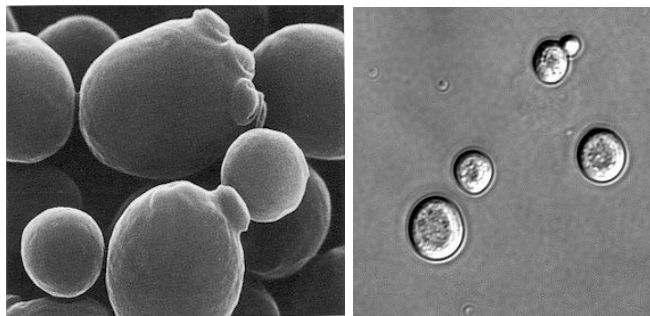
Các vi tảo (Microalgae) cũng có số lượng loài rất lớn (gần cả 100.000) và giữ vai trò rất quan trọng trong sinh quyển, là nguồn cung cấp oxy chủ yếu

trong nước. Tuy nhiên chỉ một số ít tảo lục đơn bào được dùng làm đối tượng nghiên cứu của di truyền học, đặc biệt là *Chlamydomonas reinhardtii*.

Hai đối tượng tiêu biểu cho nghiên cứu di truyền học là nấm men *Saccharomyces cerevisiae* và nấm sợi *Neurospora crassa*. Chúng có các đặc tính ưu việt vì vừa là vi sinh vật, mà tế bào có nhân thuộc Sinh vật nhân thực Eukaryota.

20.8.1-Nấm men *Saccharomyces cerevisiae*

Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (hình 20.56) là một loài thuộc lớp Nấm Túi (*Ascomycetes*), còn gọi là “men bánh mì” (baker yeast) hay “men rượu”. Đó là loài nấm men chủ yếu được dùng trong các quá trình lên men rượu. Vì là Eukaryota đơn bào (kích thước khoảng 5 – 10μm , được biết rất chi tiết về di truyền học và sinh lí học, cho nên là *đối tượng mô hình* nghiên cứu di truyền các sinh vật nhân thực.



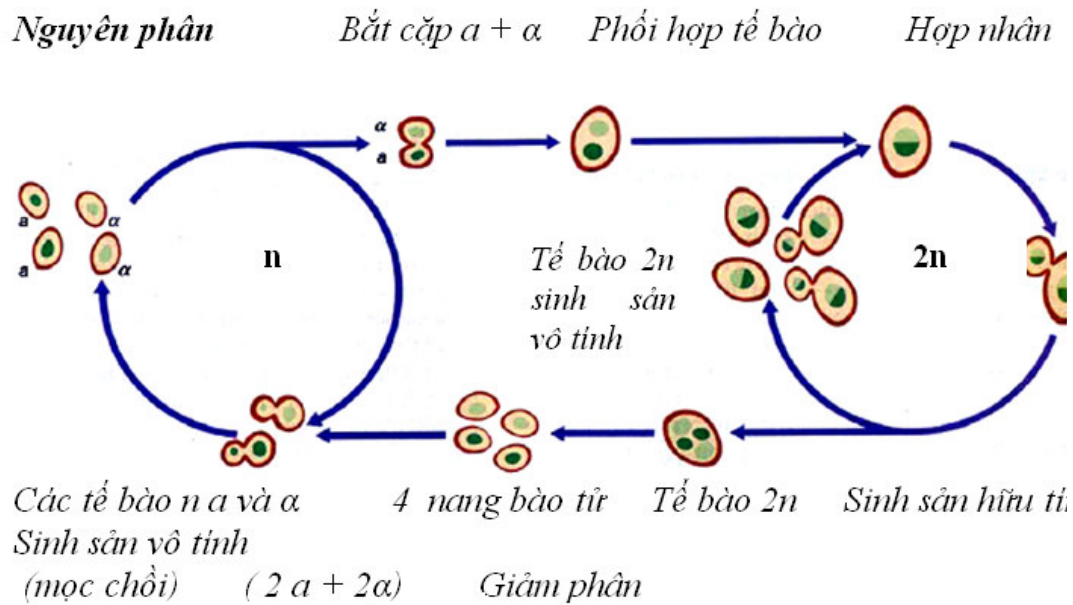
Hình 20.56- Nấm men *S.cerevisiae* dưới kính hiển vi điện tử và kính hiển vi quang học

a) Các đặc tính sinh học

Các nghiên cứu di truyền học được tiến hành ở *S. Cerevisiae* đã từ hơn 70 năm nay. Đối tượng này kết hợp trong nó 2 tính chất tuyệt vời: là đơn bào nên có thể tiến hành thí nghiệm như vi khuẩn, đồng thời có những đặc tính chủ yếu điển hình của Eukaryota và có ty thể với bộ gen ADN nhỏ. Giống với vi khuẩn, nó có thể nuôi trên môi trường dịch thể hay đặc và tạo khuẩn lạc trên môi trường thạch. Có thể nuôi tế bào nấm men quy mô lớn trong các nồi lên men và dễ dàng thu nhận sinh khối tế bào.

Chu trình sống của nấm men được nêu lên trên hình 20.57

Nấm men có 2 dạng tế bào đơn bội (n) là a và α có thể tồn tại độc lập nhờ sinh sản vô tính qua nguyên phân (mitosis). Khi 2 dạng a và α gặp nhau bắt cặp, rồi phối hợp tế bào và hợp nhân tạo 1 tế bào lưỡng bội ($2n$). Tế bào lưỡng bội có thể sinh sản vô tính vô hạn và đây là dạng thường sử dụng trong sản xuất. Trong những điều kiện nhất định, tế bào $2n$ sinh sản hữu tính qua giảm phân tạo nang có 4 bào tử (2 a và 2 α), mà sự kết hợp a và α tạo tế bào $2n$, lặp lại chu trình.



Hình 20.57- Chu trình sinh sản của nấm men *S. cerevisiae*

b) Các dữ liệu di truyền học của *S. cerevisiae*:

- Kích thước bộ gen (Genome size): 12 Mb
- Nhiễm sắc thể: $n = 16$
- Số lượng gen: 6.000
- Phần trăm gen tương đồng với người: 25%
- Kích thước trung bình của gen: 1,5 kb, 0,03 intron/gen
- Các transposon: một tỷ lệ nhỏ của ADN
- Kết thúc giải ký tự chuỗi: 1996

c) Phân tích di truyền

Nấm men có thể tồn tại ở dạng đơn bội với 2 kiểu bắt cặp (mating typ) là a và α . Ngoài các phương pháp lai để phân tích tái tổ hợp (recombination) và bổ trợ (complementation), có *nhiều kỹ thuật biến đổi di truyền* (Techniques of Genetic Modification):

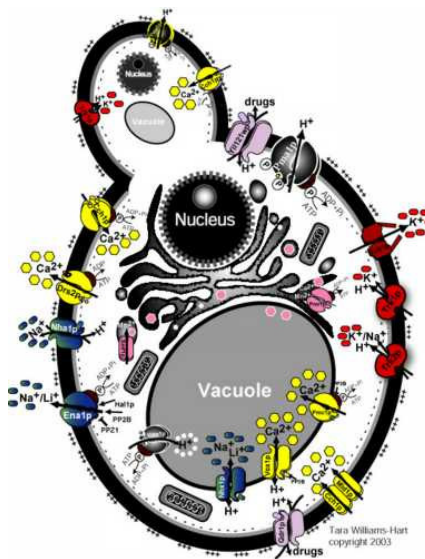
❖ **Gây đột biến** (Mutagenesis):

- Hóa chất và chiếu xạ: đột biến xoma ngẫu nhiên.
- Dùng transposon: xen đoạn (Insertions) xoma ngẫu nhiên.

❖ **Chuyển gen** (Transgenesis):

- *Plasmid tích hợp* (integrative): xen đoạn (Inserts) nhờ tái tổ hợp tương đồng (homologous recombination).
- *Plasmid sao chép* (replicative): Có thể sao chép tự lập (autonomously) (Ori sao chép của plasmid 2μ hay ARS).
- *Nhiễm sắc thể nhân tạo* của nấm men: sao chép và phân ly như một nhiễm sắc thể.
- *Vector con thoi* (Shuttle vector): Có thể sao chép trong tế bào nấm men hay *E. coli*.
- *Làm im lặng gen mục tiêu* (Targeted gen knockout): Thay thế gen (Gen replacement): tái tổ hợp tương đồng thay alen hoang dại bằng alen không (null alen).

d) *Kỹ thuật di truyền*



Hình 20.58- Cấu trúc tế bào nấm men *S.cerevisiae* với các đặc điểm của tế bào nhân thực

Các thao tác gen (Gen manipulation) thực hiện trên *S. cerevisiae* dễ dàng hơn bất kỳ sinh vật Eukaryota nào khác. Đặc biệt nó có nhiễm sắc thể nhân tạo (Yeast artificial chromoxom - YAC) có trình tự sao chép ARS (Autonomously replicative sequence), tâm động (centromere) và 2 telomere (trình tự đầu mút nhiễm sắc thể). YAC tồn tại độc lập trong tế bào nấm men như một nhiễm sắc thể và các gen được chèn vào nó được di truyền như nhiễm sắc thể Mendel. YAC có khả năng mang đoạn gADN ngoại lai dài 1 – 2 Mb, nên thuận tiện cho tạo dòng và giải ký tự chuỗi (sequencing) những bộ gen lớn như bộ gen người. Nấm men *S. cerevisiae* được sử dụng rộng rãi làm tế bào chủ trong KTDT.

Ngoài ra, một số protein tái tổ hợp (gốc động vật) như interferon khi biểu hiện trong tế bào Prokaryotae như *E. coli* thì không có hoạt tính do thiếu biến đổi sau dịch mã, nhưng khi cho biểu hiện trong tế bào nấm men thì sản phẩm có hoạt tính.

e) Các đóng góp

Vai trò chủ yếu cho các nghiên cứu:

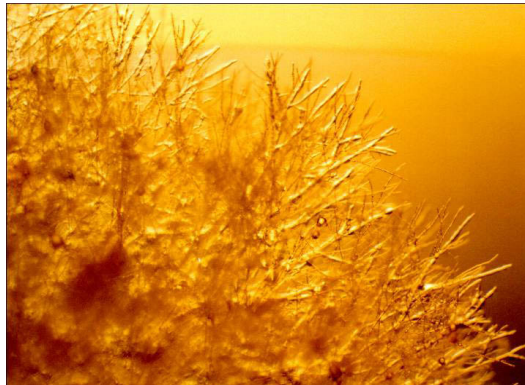
- *Chu trình tế bào (Cell cycle)*: Sự xác định các gen kiểm soát phân bào nhờ các đột biến nhạy cảm nhiệt (temperature-sensible mutants (*cdc* mutants)) dẫn đến mô hình rất tốt cho nghiên cứu sự phân bào.
- *Tương tác gen (Gen interaction)*: nghiên cứu sự ức chế gen (suppression). Hệ thống plasmid lai kép (two-hybrid plasmid system) giúp tìm các tương tác giữa các protein ở nấm men đã dẫn đến các bản đồ tương tác phức tạp, mà là khởi đầu cho sinh học các hệ thống (systems biology).
- *Di truyền học ty thể*: nhờ các đột biến “petite” mất khả năng hô hấp mà phát hiện các gen của ty thể. Nhờ chúng và các đột biến khác của ty thể mà phân tích chi tiết cấu trúc và chức năng bộ gen ty thể.
- *Di truyền học kiểu bắt cặp (Genetics of mating typ)*: Các alen *MAT* ở nấm men là các gen kiểu bắt cặp đầu tiên được xác định các đặc tính ở mức phân tử.

– *Đóng góp khác*: Sự di truyền của khóa đóng mở (switching) giữa sự tăng trưởng kiểu nấm men (yeast-like) và sợi (filamentous); di truyền học sự thoái hóa (senescence).

20.8.2- Nấm sợi *Neurospora crassa*

a) Các đặc tính sinh học

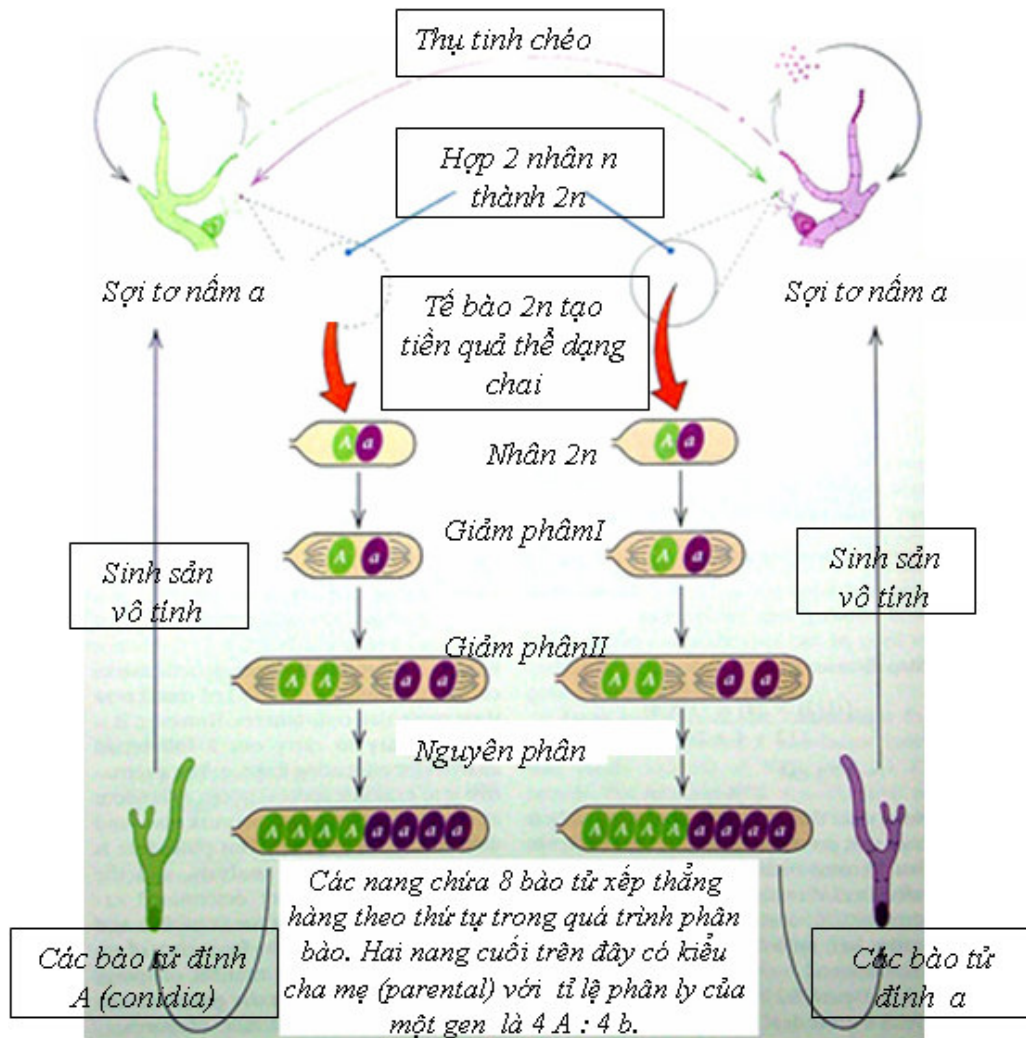
Giống với vi khuẩn và nấm men, nấm sợi này có thể nuôi trên môi trường dịch thể hay đặc và tạo khuẩn lạc trên môi trường thạch. Nó thể hiện các tính chất điển hình của Eukaryota giống như nấm men: bộ gen gồm nhiều nhiễm sắc thể, bào tử túi có trạng thái đơn bội (n) và hợp tử lưỡng bội ($2n$), sinh sản vô tính qua chu trình nguyên phân (mitotic cycle), sinh sản hữu tính qua giảm phân và có ty thể với bộ gen ADN nhỏ. Nấm thường mọc trên bánh mỳ cũ và có màu vàng tươi (hình 20.59):



Hình 20.59- Nấm sợi *Neurospora crassa* dưới kính hiển vi quang học

Sợi nấm phân đoạn có chứa nhiều *nhân đơn bội*. Có hai kiểu giới tính được điều khiển bởi một cặp alen A và a . Sinh sản hữu tính chỉ thực hiện khi có sự kết hợp của các tế bào khác alen (hình 20.60). Như hình vẽ mô tả khi *bào tử đực a* rơi trên *tiền quả thể dạng chai* (protoperithecium). Các cơ quan sinh dục cái hay A rơi lên *tiền quả thể a* thì sự thụ tinh sẽ được xảy ra. Lúc đầu hai nhân đơn bội A và a tồn tại song song và chia đồng thời. Sau đó xảy ra *sự hợp nhân* và *tiền quả thể dạng chai* biến thành *quả thể dạng chai* (perithecium). Mỗi *hợp tử lưỡng bội $2n$* tạo thành một tế bào kéo dài gọi là *nang* hay *túi* (ascus) và lập tức chia *giảm nhiễm* được 4 nhân, mà 4 nhân này

lại chia nguyên nhiễm một lần nữa tạo thành 8 nhân của 8 bào tử nang hay bào tử túi (ascospores).



Hình 20.60. Chu trình sống của nấm sợi *Neurospora crassa*

Một đặc điểm độc đáo của *Neurospora crassa* là các sản phẩm của giảm phân, 8 nang bào tử xếp thẳng hàng trong nang. Nhờ vậy, qua phân tích bộ bốn (tetrad analysis) nghiên cứu hàng loạt các cơ chế di truyền như trao đổi chéo, gen chuyển biến (conversion), tái cấu trúc nhiễm sắc thể (chromosome rearrangement), sự không chia ly trong giảm phân (meiotic nondisjunction) và sự kiểm soát di truyền đối với giảm phân. Các Nhiễm sắc thể tuy nhỏ, nhưng có thể nhìn thấy dễ dàng.

N. crassa đạt kỷ lục về tốc độ tăng trưởng trong các loài nấm: mỗi sợi nấm (hypha) mọc dài ra hơn 10 cm/ngày. Sự tăng trưởng nhanh đó kết hợp với chu trình đơn bội và khả năng mọc trên các môi trường nuôi cấy có thành phần xác định làm cho nó thành một đối tượng rất thuận tiện cho nghiên cứu *di truyền hóa sinh* (biochemical genetics). Trên thực tế, nó nổi tiếng với sự ra đời *giả thuyết một gen - một enzym*.

b) Các dữ liệu di truyền học của Neurospora crassa:

- Kích thước bộ gen (Genome size): 43 Mb
- Nhiễm sắc thể: 7 Nhiễm sắc thể thường ($n = 7$)
- Số lượng gen: 10.000
- Phần trăm gen tương đồng với người: 6 %
- Kích thước trung bình của gen: 1,7 kb, 1, 7 intron/gen
- Các transposon: rất hiếm
- Kết thúc giải ký tự chuỗi: 2003

c) Phân tích di truyền

Khi nuôi chung 2 loại sợi tơ nấm có kiểu bắt cặp đối ngược nhau là *A* và *a* dễ dàng nhận được các nang bào tử lai. Mặc dù ở *Neurospora crassa* không nhận được các sợi tơ lưỡng bội điển hình (nhân $2n$), nhưng sự phối hợp 2 loại tơ tạo ra *thể dị nhân* (heterokaryon), mà trong đó 2 nhân đơn bội khác nhau cùng tồn tại song song trong tế bào chất. Nhờ vậy có thể tiến hành phân tích tái tổ hợp và bổ trợ. Ngoài ra, có các *kỹ thuật biến đổi di truyền* sau:

❖ **Gây đột biến** (Mutagenesis):

- Hóa chất và chiếu xạ: đột biến xoma ngẫu nhiên.
- Dùng transposon: không.

❖ **Chuyển gen** (Transgenesis):

- Biến nạp qua trung gian plasmid (Plasmid-mediated transformation): xen đoạn ngẫu nhiên (Random insertion).

❖ **Làm im lặng gen mục tiêu** (Targeted gene knockout):

- RIP: các đột biến GC → AT trong các đoạn tăng đôi chuyển gen trước khi lai.

– Ức chế (Quelling): bất hoạt xoma sau phiên mã các gen được chuyển vào (Xomatic posttranscriptional inactivation of transgens).

d) Kỹ thuật di truyền:

Biến nạp đầu tiên trên Eukaryota đã được thực hiện ở *Neurospora crassa*. Ngày nay, nó dễ dàng chấp nhận nhiều vector plasmid mang các gen mong muốn. Không có plasmid nào tái bản trong *Neurospora*, và như vậy các gen chuyển vào phải được chèn vào nhiễm sắc thể mới có sự di truyền ổn định.

e) Các đóng góp

– Di truyền sinh hóa và trao. đổi chất.

– Di truyền học của giảm phân.

– Di truyền ty thể.

– *Đóng góp khác*: sự đa dạng các loài nấm và thích nghi (adaptation), di truyền tế bào (cytogenetics), các gen kiểu bất cặp, các gen phối hợp thể dị nhân (heterokaryon-compatibility gens).

20.8.3- Các đặc điểm di truyền của vi nấm

Chu trình sống của các loài nấm khác nhau rất đa dạng, nhưng có thể xếp vào 5 kiểu căn bản khác nhau như: 1. Sinh sản vô tính; 2. Thể đơn bội; 3. Thể đơn bội với giai đoạn dị nhân; 4. Đơn bội - Lưỡng bội ; 5. Lưỡng bội.

Ngay trong các nấm sinh sản hữu tính cũng có sự dao động từ hoàn toàn đơn bội như *Neurospora* đến hoàn toàn lưỡng bội như ở *Saccharomyces cerevisiae*

Đối với phần lớn nấm sợi, điểm đặc trưng là nhiều nhân cùng hiện diện trong một tế bào. Các nhân này có thể có kiểu gen khác nhau. Trong trường hợp này được gọi là *thể dị nhân* (heterokaryon) tương tự *dị hợp tử*.

Ở các vi sinh vật nói chung, các tính trạng *hình thái* thường không nhiều, nhưng có sự đa dạng lớn về *nhiều loại phản ứng hóa học* khác nhau. Sự ra đời của giả thuyết nổi tiếng 1 gen - 1 enzym đã dựa trên các *đột biến sinh hóa* ở *N. crassa*. Các môi trường chọn lọc được sử dụng để thu thập các dạng lai hiếm hoi giữa các dòng cha mẹ đơn bội mang các đột biến khuyết dưỡng lặn, khi sai hỏng trong chuỗi phản ứng sinh hóa của chúng bổ sung

cho nhau. Ngoài ra *tính đề kháng* với các tác nhân bất lợi được sử dụng rộng rãi làm tính trạng đánh dấu trong các nghiên cứu di truyền ở nấm.

Nói chung, các vi sinh vật nhân thực có ưu thế đặc biệt là sự kết hợp giữa cấu tạo tế bào và chu trình sống như sinh vật bậc cao với cơ thể đơn bào của vi sinh vật. Nếu như trong những năm 70 của thế kỷ trước, các đối tượng căn bản của di truyền học phân tử là phage và vi khuẩn, thì những từ năm 80 cho đến nay các Eukaryota đơn bào đã thay thế dần.

Bốn vấn đề căn bản được chú ý trong nghiên cứu di truyền ở nấm là: *tính không phối hợp* (incompatibility), *phân tích bộ bốn* (tetrad analysis), *tái tổ hợp nguyên phân* (mitotic recombination), và *sự đơn bội hóa* (haploidisation).

Nhiều nấm sợi có quả thể nhìn thấy được không phải là vi nấm, nhưng có thể sử dụng các phương pháp dùng cho vi nấm để nghiên cứu.

20.8.3.1- Tính không phối hợp ở nấm

Khái niệm tính *không phối hợp* (incompatibility) ở nấm được dùng để chỉ khả năng kết hợp với nhau giữa các dòng nấm trong sinh sản hữu tính. Cho đến nay, gần 450 loài nấm đã được nghiên cứu về các kiểu không phối hợp. Sự không phối hợp được xác định về mặt di truyền. Theo kiểu phối hợp thì nấm được phân làm 2 loại:

- *Đồng tản* (Homothallic) là khi có sự kết hợp với nhau giữa các tế bào (hay hệ sợi tơ–mycelium) giống nhau trong sinh sản hữu tính. Ví dụ, tế bào a kết hợp với tế bào a hay α với α tạo dạng *lưỡng bội* ($2n$) tương ứng aa hay $\alpha\alpha$.
- *Dị tản* (Heterothallic) là kiểu khi có sự lai nhau giữa 2 loại tế bào khác nhau như a với α tạo dạng dị hợp tử lưỡng bội $a\alpha$ như ở nấm men. Các nấm dị tản có thể chia thành: *lưỡng cực* (bipolar) và *tứ cực* (tetrapolar).

Đại diện điển hình của nấm *dị tản lưỡng cực* (bipolar heterothallic) là nấm men *S. cerevisiae* (hình 20.56). Ở nấm men này, sự *hợp bào* (cytogamy) và *hợp nhân* (karyogamy) chỉ xảy ra giữa các tế bào (hay nang bào tử–ascospore) có *kiểu bất cặp* (mating typ) khác nhau như a và α , và các alen khác nhau của locus *MAT*. Do có sự tham gia của 2 alen, nên gọi là *lưỡng cực*. Nấm *Neurospora crassa* cũng thuộc kiểu không phối hợp này (hình

20.59). Nấm rom (*Volvariella volvacea*) và nấm mỡ (*Thachicus bisporus*) cũng thuộc loại này.

Kiểu *dị tản tứ cực* (tetrapolar heteropolic) đặc trưng cho nhiều loại nấm đảm *Basidiomycetes*, mà đại diện là *Schizophyllum commune*. Nấm bào ngư (*Pleurotus*) và nấm hương (*Lentinula edodes*) thuộc kiểu không phối hợp này. Sự xác định di truyền không phối hợp ở các loài nấm này do 2 gen A và B. Mỗi gen có 2 alen hoặc nhiều hơn; thường là A₁, A₂ và B₁, B₂. Sự kết hợp giữa các dòng đơn bội chỉ tạo dạng hữu thụ có kiểu gen A₁A₂B₁B₂ tức *bốn nhân tố* khác nhau (nên gọi là *tứ cực*) như trên bảng 20.7.

Bảng 20.7. Sự kết hợp giữa các dòng đơn bội có các kiểu không phối hợp khác nhau ở nấm dị tản tứ cực

	A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂
A ₁ B ₁	—	—	—	+
A ₁ B ₂	—	—	+	—
A ₂ B ₁	—	+	—	—
A ₂ B ₂	+	—	—	—

Dấu + chỉ các tổ hợp lai được với nhau.

Ở *Podospora anserina*, trong các giới hạn của mỗi chủng địa lí có 2 kiểu bắt cặp “+” và “—”. Quá trình sinh sản hữu tính bình thường chỉ có được khi lai dòng “+” và dòng “—” giống nhau theo alen của gen *t*. Trường hợp này có thể gọi là *đồng tản khác alen*.

Sự đa dạng của các chu trình sống và các kiểu không phối hợp ở nấm có ảnh hưởng đến các phương pháp phân tích di truyền (genetic analysis). Ở một số nấm sinh sản hữu tính thực hiện trên cơ sở *dị hợp bào* (heterogamy) như ở *Neurospora crassa*. Ở những loài khác trên cơ sở *đồng hợp bào* (isogamy). Song song với sinh sản hữu tính còn có *chu trình cận hữu tính hoàn toàn* hay *không hoàn toàn* phụ thuộc vào loại nấm. Chu trình cận hữu tính (parazxual cycle) là quá trình kết hợp và tái tổ hợp gen diễn ra trong nguyên phân chứ không phải giảm phân, không có sự thụ tinh như sinh sản hữu tính.

20.8.3.3- Phân tích bộ bốn ở nang khuẩn (Nấm túi)

Lớp *Nang khuẩn* hay *Nấm túi* (*Ascomycetes*) có đặc điểm là khi các tế bào lưỡng bội chia giảm nhiễm sẽ tạo ra các bào tử nằm trong một *nang*. Nấm men bánh mì, men rượu *S. cerevisiae* và nấm sợi *N. crassa* là những *nang khuẩn* được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu di truyền học.

Điểm đặc biệt của nấm sợi *N. crassa* là các *nang bào tử xếp thẳng hàng* trong nang như lúc các *nhiễm sắc thể xếp trên mặt phẳng xích đạo* của kì giữa. Chúng xếp theo một *trình tự* nhất định phản ánh được tiến trình giảm phân I và II (hình 20.61).

Ở nấm men, bốn nang bào tử đại diện cho 4 nhiễm sắc thể của giảm phân (xét một cặp nhiễm sắc thể tương đồng) xếp theo một thứ tự nào đó, khó biết trình tự. Sử dụng *máy vi thao tác* (micromanipulator), người ta có thể tách rời từng nang bào tử một của một nang để nghiên cứu. Phương pháp nghiên cứu trực tiếp các sản phẩm của mỗi lần giảm phân được gọi là *phân tích bộ bốn* (tetrad analysis).

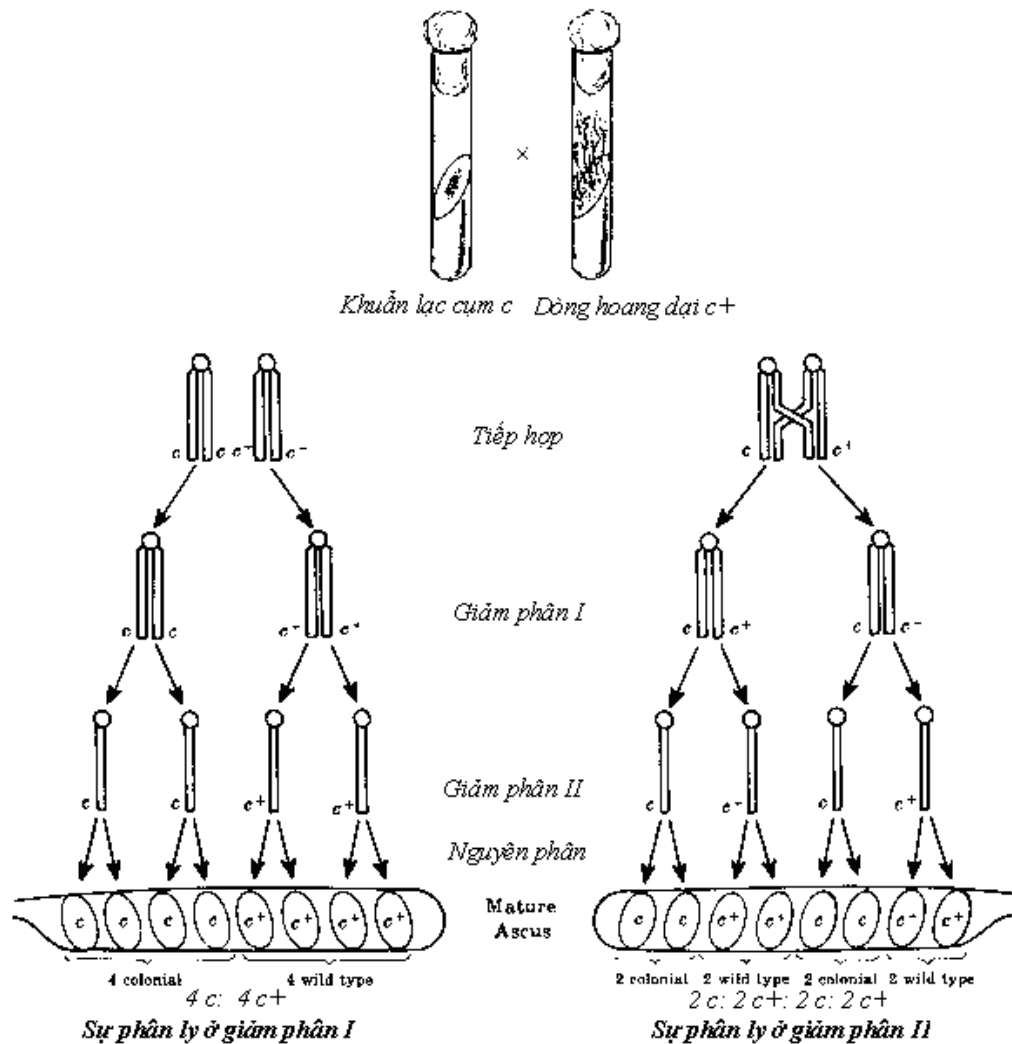
Khi có sự phân li của một cặp alen thì trong mỗi nang của *Neurospora* sẽ có sự phân bố nang bào tử 4: 4 nếu sự phân li xảy ra ở giảm phân I hoặc sự phân bố 2: 2: 2: 2 nếu sự phân li xảy ra ở giảm phân II.

a) Sự phân li ở giảm phân I

Hình 20.61 mô tả quá trình lai một dòng *N. crassa* hoang dại (c^+) với một dòng đột biến (c) có *khuẩn lạc cụm* (colonial). Nếu tách các nang bào tử theo thứ tự trong nang và để chúng mọc lên thành dòng thì sẽ có thứ tự $4c:4c^+$. Sự phân bố 4:4 cho thấy không có trao đổi chéo xảy ra giữa gen và tâm động (centromere). Gen càng cách xa tâm động xác suất xảy ra trao đổi chéo giữa gen và tâm động càng lớn. Do đó nếu số phần trăm nang $4c:4c^+$ càng lớn, tức trao đổi chéo ít xảy ra thì gen c càng gần tâm động.

b) Sự phân li ở giảm phân II

Trường hợp b (hình 20.61), khi có trao đổi chéo xảy ra giữa gen và tâm động. Sau lần chia thứ nhất hai nhiễm sắc thể chị và em vẫn còn giống nhau. Đến lần chia thứ hai mới có sự khác nhau thể hiện ở sự phân li và tỉ lệ $2c: 2c^+ : 2c: 2c^+$ phản ánh điều đó. Kết quả này chứng minh rằng trao đổi chéo xảy ra giữa 4 nhiễm sắc thể.

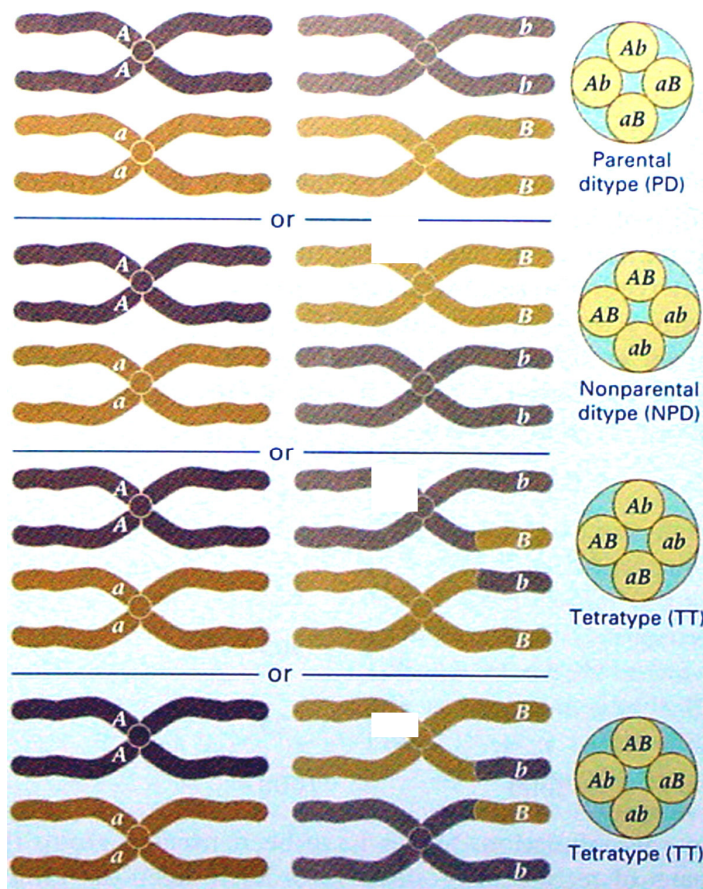


Hình 20.61- Phương thức tạo bào tử ở nấm sợi *Neurospora crassa*.

c) Lập bản đồ di truyền bằng phân tích bộ bốn

Đối với trường hợp *bộ bốn sắp theo thứ tự* như ở *Neurospora*, số phần trăm các nang tái tổ hợp phản ánh khoảng cách giữa gen và tâm động. Cần nhớ rằng trao đổi chéo chỉ liên quan đến hai nhiễm sắc thể, nên chỉ có hai sản phẩm của giảm phân chứa nhiễm sắc thể tái tổ hợp. Do đó để tính phần trăm các nhiễm sắc thể tái tổ hợp, lấy phần trăm nang tái tổ hợp chia đôi.

Trường hợp *bộ bốn không theo thứ tự* như ở nấm men thì việc tính tần số tái tổ hợp có phức tạp.



Hình 20.62 Các kiểu bộ bốn khác nhau:

– Kiểu PD parental dityp (không trao đổi chéo) – Kiểu RD recombination dityp hay NPD nonparental dityp (có trao đổi chéo) – Kiểu TT tetratyp (có trao đổi chéo).

Ví dụ: Phân tích bộ bốn từ tổ hợp lai hai gen AB x ab. Sự thụ tinh cho nhân lưỡng bội (AB/ab) và nó chia giảm nhiễm ngay. Nếu không có trao đổi chéo xảy ra hoặc trao đổi chéo đôi xảy ra trên cùng hai nhiễm sắc thể thì sẽ có các bộ bốn kiểu cha mẹ 2AB: 2ab được gọi kiểu đôi cha mẹ (parental dityp) (PD) (hình 20.62).

Nếu trao đổi chéo xảy ra giữa nhiễm sắc thể 2 với 3 và 1 với 4, sẽ có 2Ab:2aB. Kiểu này được gọi kiểu đôi tái tổ hợp (Recombinational Dityp - RD) hay kiểu đôi không cha mẹ (Nonparental Dityp - NPD). Kiểu này ít nhất trong các bộ bốn có tái tổ hợp.

Các trường hợp tạo ra mỗi nang bốn loại bào tử có kiểu gen khác nhau 1AB: 1Ab: 1aB: 1ab, được gọi kiểu bốn (tetratyp - TT).

d) Hiện tượng chuyển biến (conversion)

Chuyển biến (conversion) là hiện tượng *lệch* khỏi sự phân li bình thường 2: 2 của các bộ bốn, khi có sự di truyền của 1 gen, được Lindegren phát hiện năm 1949.

Ví dụ: Dị hợp tử của nấm men $a+/+b$ tạo các bộ bốn bất thường như: $(a +) (a +) (a b) (+ b)$ và $(a +) (+ +) (+ b) (+ b)$ hoặc $(a +) (a b) (+ b) (+ b)$ và $(a +) (a +) (+ +) (+ b)$. Sự phân li bất thường có thể liên quan đến cả 2 gen như: $(a +) (a +) (a +) (+ b)$ hay $(a +) (+ b) (+ b) (+ b)$.

Các nghiên cứu tiếp theo cho thấy chuyển biến (conversion) là hiện tượng bình thường ở các gen khác nhau của nấm men với tần số 1%. Hiện tượng này cũng được mô tả ở các loài nấm khác như *Neurospora crassa*, *Sordaria fimicola* và nó có ý nghĩa quan trọng trong giải thích cơ chế tái tổ hợp.

20.8.3.4- Phân tích di truyền trong chu trình cận hữu tính

Nhiều loại nấm có sợi dinh dưỡng (vegetative hyphae) kết hợp với nhau, làm cho các nhân đơn bội từ các dòng cùng ở chung trong tế bào chất. Các *thể dị nhân* (heterocaryon) được tạo nên có thể tồn tại lâu dài như ở *N. crassa*. Sự tạo thành các thể dị nhân được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu sự tương tác giữa các gen, giữa các alen và giữa các gen của nhân với tế bào chất. Trong một số trường hợp, sự so sánh các dị hợp tử và dị nhân cho thấy sự khác nhau trong tương tác giữa các alen, có lẽ do:

- Tỷ lệ số lượng nhân và tương ứng các alen trong thể dị nhân có thể khác nhau.
- Các alen của các gen ở một nhân không được ngăn cách như ở giữa các thể dị nhân.

Các nhân ở thể dị nhân đôi khi hợp nhau tạo nên *đoạn lưỡng bội*. Hơn nữa, trong quá trình chia nguyên phân tiếp theo, nhân lưỡng bội có thể chịu tác động của 2 quá trình: đơn bội hóa hoặc tái tổ hợp nguyên phân.

a) Sự đơn bội hóa

Sự đơn bội hóa (Haploidisation) diễn ra ngẫu nhiên. Nó có thể được gây tạo có hiệu quả bởi chất n-fluorophenylalanin.

Nếu như các nhân trong nhiều nguyên phân bị mất 1 nhiễm sắc thể ($2n-1$), thì nhân lệch bội vừa xuất hiện trở nên không ổn định và tiếp tục mất các nhiễm

sắc thể khác của một bộ đơn bội, cho đến khi trở thành nhân đơn bội (n) ổn định. Trong quá trình đó nhiễm sắc thể bị mất độc lập nhau, các gen của cùng một nhiễm sắc thể có sự *liên kết hoàn toàn*. Dựa vào đặc điểm này có thể xác lập sự liên kết gen dựa vào gen đánh dấu trên mỗi nhiễm sắc thể. Ví dụ, nếu có lưỡng bội dị hợp tử (AB/ab N/n) khi đơn bội hóa sẽ có các kiểu gen: (ABN), ABn, (abN) và (abn).

b) Tái tổ hợp trong nguyên phân

Tái tổ hợp nguyên phân (Mitotic recombination) là hiện tượng thường gặp ở nhiều sinh vật, khi xảy ra trao đổi chéo giữa các nhiễm sắc thể tương đồng trong nguyên phân (hình 20.63).

Trong trường hợp này, khoảng cách của gen đánh dấu xa tâm động nhất, sự đồng hợp tử hóa thường xảy ra hơn cả (được coi là 100%) và sự phân bố các gen được tính theo công thức:

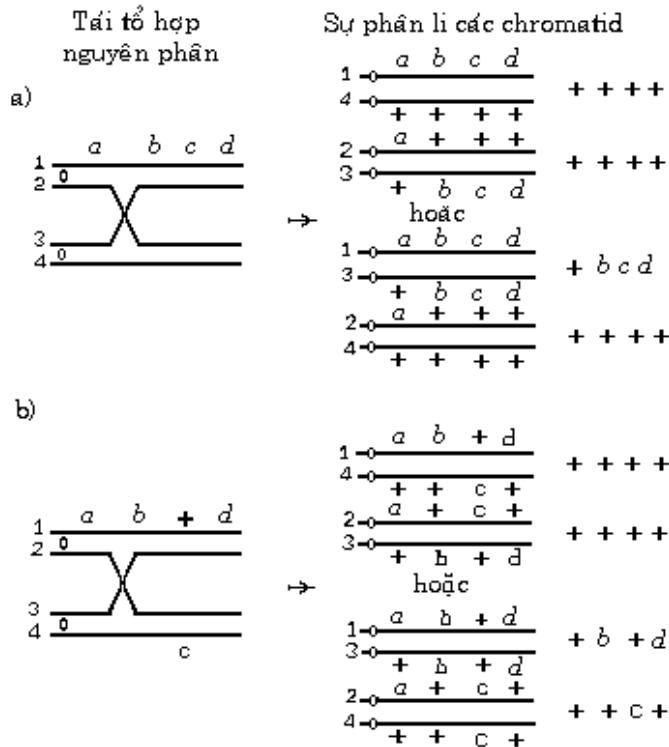
$$D = \frac{N_{ab}}{N_b} \cdot 100\%$$

D biểu thị khoảng cách của gen đến tâm động.

N_b - tổng số các dạng phân li, đồng hợp tử theo b.

N_{ab} - số các dạng phân li đồng hợp cả a và b, nếu như b là gen đánh dấu xa tâm động nhất.

Bản đồ liên kết gen được xây dựng bằng tái tổ hợp giảm phân và tái tổ hợp nguyên phân (trong chu trình cận hữu tính) có thứ tự gen xếp giống nhau ở *Aspergillus nidulans*.



Hình 20.63. Trao đổi chéo nguyên phân (Mitotic crossing-over) ở đoạn a-b.

a) Trong tứ dị hợp tử theo các gen liên kết, khi alen lặn c (cần được xác định vị trí) nằm trên đoạn tương đồng được đánh dấu.

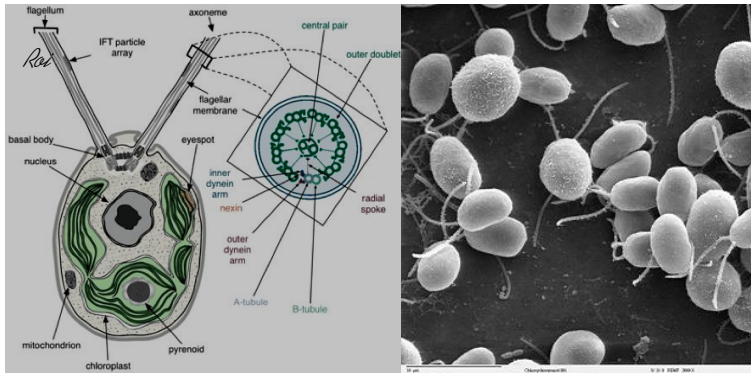
b) Trong đoạn tương đồng không đánh dấu, trao đổi chéo ở đoạn giữa gen và tâm động đưa đến sự đồng hợp tử của các gen xa điểm trao đổi ở một nửa số nhân của tế bào (thế hệ con của nhân tái tổ hợp). Nhờ đó, có thể sử dụng trao đổi chéo nguyên phân để xác định vị trí gen ở một vai của nhiễm sắc thể so với tâm động.

20.8.4- Di truyền ở các Tảo lục đơn bào

Các tảo đơn bào (Microalgae) cũng được dùng làm đối tượng nghiên cứu của Di truyền học, đặc biệt là di truyền quang hợp và di truyền của bào quan lục lạp. So với nấm, các vi tảo và nói chung là tất cả thực vật, các đột biến khuyết dưỡng ở tảo lục đơn bào chỉ hạn chế trong một phạm vi hẹp như mất khả năng tổng hợp *arginin* (*arg⁻*) và một số vitamin. Nguyên nhân của hiện tượng này đến nay chưa rõ.

20.8.4.1. Vi tảo *Chlamydomonas reinhardtii*

Loài vi tảo được sử dụng sớm nhất và nghiên cứu di truyền chi tiết hơn cả là *Chlamydomonas reinhardtii* (hình 20.43), nó có chu trình sinh sản hữu tính. Ưu thế của đối tượng này là có thể tiến hành *lai* và *phân tích bộ bốn* không xếp theo thứ tự.



Hình 20.64- Cấu trúc và hình thái *Chlamydomonas*

a) Đặc điểm sinh học

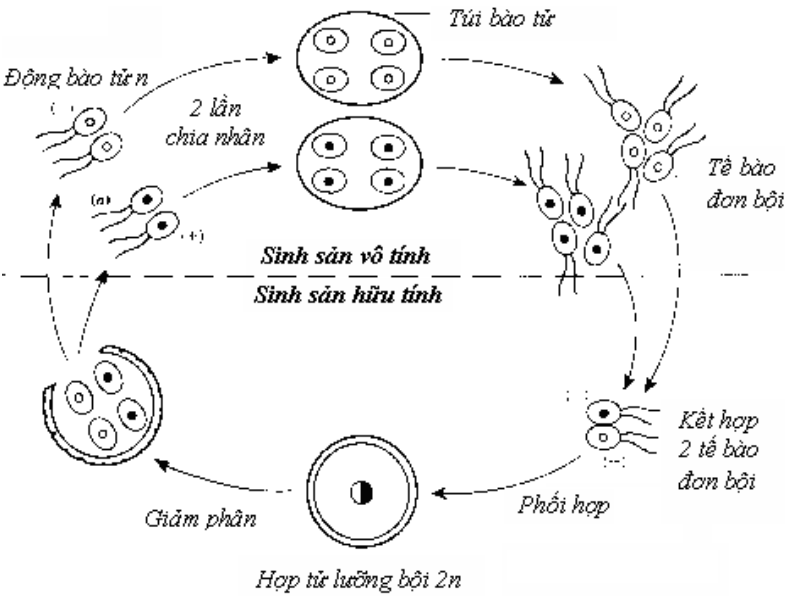
Vi tảo *Chl. reinhardtii* có thể nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng dịch thể hay môi trường thạch đặc như các vi sinh vật khác. Các tế bào mọc thành khuẩn lạc trên môi trường thạch. Vi tảo có thể nuôi ngoài sáng (ánh sáng mặt trời hay đèn huỳnh quang thông dụng) hoặc trong tối (phải bổ sung axetat natri hoặc glucos).. Trong điều kiện thí nghiệm, có thể nuôi các tế bào *Chl. reinhardtii* để nhận các *tế bào đồng nhất* (synchronous culture), khi thay đổi chu kỳ 12 giờ sáng 12 giờ tối đều đặn. Theo dõi tổng hợp ADN cho thấy *ADN của lục lạp* tổng hợp vào giờ thứ 5-6 ngoài sáng, còn ADN của nhân tổng hợp khoảng giờ thứ 16 - 18, sau đó chia tế bào đồng loạt.

Chu trình sống của *Chl. reinhardtii* được nêu trên hình 20.65. Bình thường các tế bào dinh dưỡng tồn tại lâu dài ở trạng thái *đơn bội n* với 2 kiểu bắt cặp khác nhau mt^+ (mating typ) và mt^- tương đương với 2 giới tính, mà về hình thái thì rất giống nhau. Các tế bào dinh dưỡng nay có thể tạo *nang bào tử kín* hay *túi bào tử* (sporangia) và sinh sản vô tính tạo ra các tế bào con đơn bội.

Khi được kích thích, như nuôi trên môi trường dinh dưỡng thiếu nitơ, các tế bào dinh dưỡng chuyển thành các *động bào tử* (zoospores) mt^+ và mt^- . Sự kết hợp và phối hợp 2 loại tế bào khác kiểu bắt cặp mt^+ và mt^- sẽ tạo ra *hợp tử lưỡng bội 2n*. Hợp tử này gặp điều kiện thuận lợi sẽ thực hiện giảm

phân tạo ra 4 tế bào đơn bội n, mà chúng sinh sản vô tính tạo ra số lượng lớn tế bào dinh dưỡng.

Ở *Chl. reinhardii* có thể nhận được nhiều đột biến khác nhau, đặc biệt là các *đột biến sắc tố* khác với màu khuẩn lạc xanh lục của dạng hoang dại như màu cam, vàng, trắng kem, xanh lơ,...thuận lợi cho nghiên cứu *di truyền lục lạp* và *quang hợp*.



Hình 20.65- Chu trình sống của vi tảo *Chlamydomonas reinhardii*

b) Các gen của lục lạp ở *Chlamydomonas reinhardii*

Sự di truyền của lục lạp được nghiên cứu chi tiết hơn cả ở vi tảo *Chlamydomonas reinhardii*. Tế bào của vi tảo này có một lục lạp lớn với đường kính trung bình 5 micrometer chứa 50 đến 80 bản sao của phân tử ADN vòng tròn dài 196 kb.

Bảng 20.8- Các đột biến trong nhóm liên kết gen của lục lạp

Các gen	Kiểu hình đột biến
<i>l.ac₁-ac₄</i>	1.Mất khả năng quang hợp, cần bổ sung axetat.

2. <i>tm</i> ₁ - <i>tm</i> ₃ – <i>tm</i> ₉	2.Không mọc được ở 35 ⁰ C.
3. <i>tm</i> ₂	3.Mọc ở 35 ⁰ C khi có streptomycin.
4. <i>til</i> ₁ – <i>til</i> ₅	4.Hình thành khuẩn lạc nhỏ ở tất cả các loại MT.
5. <i>ery</i> ₁	5.Kháng erytromycin ở nồng độ 50 μ g/ml.
6. <i>kan</i> ₁	6.Kháng kanamycin ở 50μ g/ml.
7. <i>spc</i> ₁	7.Kháng spectinomycin ở 50μ g/ml.
8. <i>spi</i> ₁ - <i>spi</i> ₅	8.Kháng spiramycin ở 50μ g/ml.
9. <i>ole</i> ₁ - <i>ole</i> ₃	9.Kháng oleodomycin ở 50μ g/ml.
10. <i>car</i> -1	10.Kháng carbamycin ở 50μ g/ml.
11. <i>elé</i> ₁	11.Kháng eleosin ở 50μ g/ml.
12. <i>ery</i> ₃ - <i>ery</i> ₁	12.Kháng erythromycin, carbamycin, oleandomycin spiramycin ở nồng độ tùy các chất nêu trên.
13. <i>sm</i> ₂ - <i>sm</i> ₅	13.Kháng streptomycin ở nồng độ 500μ g/ml.
14. <i>sm</i> ₃	14.Kháng streptomycin ở nồng độ 50μ g/ml.
15. <i>sm</i> ₄	15.Phụ thuộc streptomycin. (phải có streptomycin mới mọc được).

Một số đột biến kháng streptomycine đã được thu nhận và nhận thấy ở một số có sự di truyền trong nhân, số khác có sự di truyền ngoài nhân.

Theo Sager (1975), ở *Chlamydomonas reinhardtii* có các đột biến trong nhóm liên kết gen của lục lạp như sau (bảng 20.8):

Các đột biến có biểu hiện kiểu hình như sau:

– *Mất khả năng quang hợp*; để mọc được ngoài ánh sáng và trong tối cần bổ sung đường khử là axetat.

– *Nhạy cảm với nhiệt độ* cao hoặc thấp.

– *Tính đề kháng* với thuốc kháng sinh hoặc có nhu cầu được cung cấp thuốc kháng sinh.

Tất cả các đột biến trên có ***sự di truyền theo một cha mẹ*** (uniparental inheritance), có kiểu bắt cặp mt^+ (có thể coi là dòng mẹ). Điều này liên quan đến sự hình thành lục lạp trong hợp tử, bằng cách nào đó chỉ nhận ADN từ lục lạp mt^+ .

Năm 1954, R.Sager đã nghiên cứu các đột biến kháng streptomycin ở *Chlamydomonas reinhardtii* từ dạng hoang dại nhạy cảm $sm-s$. Một số đột biến $sm-r$ có sự di truyền nhiễm sắc thể với sự phân li 1:1. Tuy nhiên, một số đột biến có sự di truyền khác thường như sau:

$sm-r\ mt^+ \times sm-s\ mt^- \rightarrow$ tất cả thế hệ con đều $sm-r$ với tỉ lệ $1mt^+ : 1mt^-$

$sm-s\ mt^+ \times sm-r\ mt^- \rightarrow$ tất cả thế hệ con đều $sm-s$ với tỉ lệ $1mt^+ : 1mt^-$

Như vậy, ở đây khi có sự hoán đổi cha mẹ trong lai, thế hệ con đều có kiểu hình streptomycin của mt^+ . Sự truyền thụ tính trạng này được gọi là ***sự di truyền theo một cha mẹ*** (uniparental inheritance). Sager coi mt^+ như dòng mẹ và trường hợp trên giống như di truyền theo dòng mẹ. Các gen kiểu bắt cặp mt có tỉ lệ phân li của gen trong nhân là 1: 1.

Ở *C. reinhardtii*, streptomycin có tác động gây đột biến. Các đột biến nhận được do tác động bởi streptomycin đều có sự di truyền theo một cha mẹ (bảng 20.9).

Đặc biệt đột biến $smt4$ còn gọi là smd (streptomycin – dependent) chỉ mọc khi trong môi trường nuôi có streptomycin.

Sager đã tiến hành thí nghiệm chứng minh sự di truyền của các gen nêu trên liên quan đến *cpADN của lục lạp*. Các kĩ thuật dùng đồng vị phóng xạ đánh dấu N^{15} và li tâm trên thang nồng độ CsCl được sử dụng. CpADN của hai cha mẹ đem lai được đánh dấu khác nhau: một dạng mang N^{14} nhẹ, dạng kia mang N^{15} nặng. Tỉ trọng của cpADN từ các tế bào cha mẹ như vậy tương ứng với 1,69 và 1,70. Nhờ li tâm trên thang nồng độ CsCl có độ nhạy cao nên có thể ghi nhận sự khác nhau giữa các dòng cha mẹ và dòng lai (bảng 20.9).

Bảng 20.9- Tỷ trọng của cpADN ở thế hệ con từ các tổ hợp lai *Chlamydomonas*

Tổ hợp lai	Tỉ trọng của cpADN của hợp tử (g/cm^3)
$\text{N}^{14} \text{mt}^+ \times \text{N}^{14} \text{mt}^-$	1,69
$\text{N}^{15} \text{mt}^+ \times \text{N}^{15} \text{mt}^-$	1,70
$\text{N}^{15} \text{mt}^+ \times \text{N}^{14} \text{mt}^-$	1,70
$\text{N}^{14} \text{mt}^+ \times \text{N}^{15} \text{mt}^-$	1,69

Trên thực tế, các kết quả này cho thấy cpADN của cha mẹ mt^- bị mất hoặc bị phân hủy như thế nào đó. Sự mất đó kèm theo mất các đột biến (ví dụ: *sm*) trên cha mẹ mt^- .

Các thí nghiệm khác theo nguyên tắc tương tự được tiến hành với việc sử dụng các đoạn RFLP. Mỗi dòng cha mẹ có cpADN với RFLP khác nhau. Kết quả cũng cho thấy cpADN ở thế hệ con nhận được từ dòng mt^+ .

Như vậy, có thể kết luận rằng cpADN của *Chlamydomonas* được truyền thụ từ một dòng cha mẹ (uniparental) và các gen của nó cũng có sự truyền thụ tương tự.

c) Lập bản đồ các gen của *Chlamydomonas*

Trong tổ hợp lai $\text{mt}^+ \text{sm}-r \times \text{mt}^- \text{sm}-s$ có khoảng 0,1% thế hệ hợp tử con mang cả *sm-r* và *sm-s*. Các hợp tử như vậy là **hợp tử hai cha mẹ** (biparental zygote) và được gọi là **cytohet** (cytoplasmically heterozygote).

Tần số các **cytohet** có thể tăng lên 40–100% ở thế hệ hợp tử con nếu mt^+ được chiếu tia tử ngoại trước khi lai.

Ở *Chlamydomonas*, các cytohet hay hợp tử hai cha mẹ được dùng làm điểm xuất phát cho tất cả các nghiên cứu về sự phân li và tái tổ hợp của các gen lục lạp. Trên cơ sở nhiều tổ hợp lai, R.Sager đã nêu ra bản đồ vòng tròn của cpADN với các gen tương ứng.

20.8.4.2- Các vi tảo sinh sản vô tính

Các thí nghiệm di truyền được tiến hành ở các vi tảo sinh sản vô tính như: *Clolla*, *Euglena*, *Scenedesmus*. Do không tiến hành lai được nên phân tích di truyền chỉ giới hạn ở *thu nhận các đột biến*. Các *đột biến sắc tố* ở *Clolla* góp phần hiểu sâu về cơ chế di truyền quang hợp.

Các *nguyên sinh động vật (Protozoa)* là một nhóm lớn gồm hơn 65.000 loài, trong đó có khoảng 10.000 loài kí sinh. Di truyền học của nhóm này hầu như chưa được nghiên cứu.