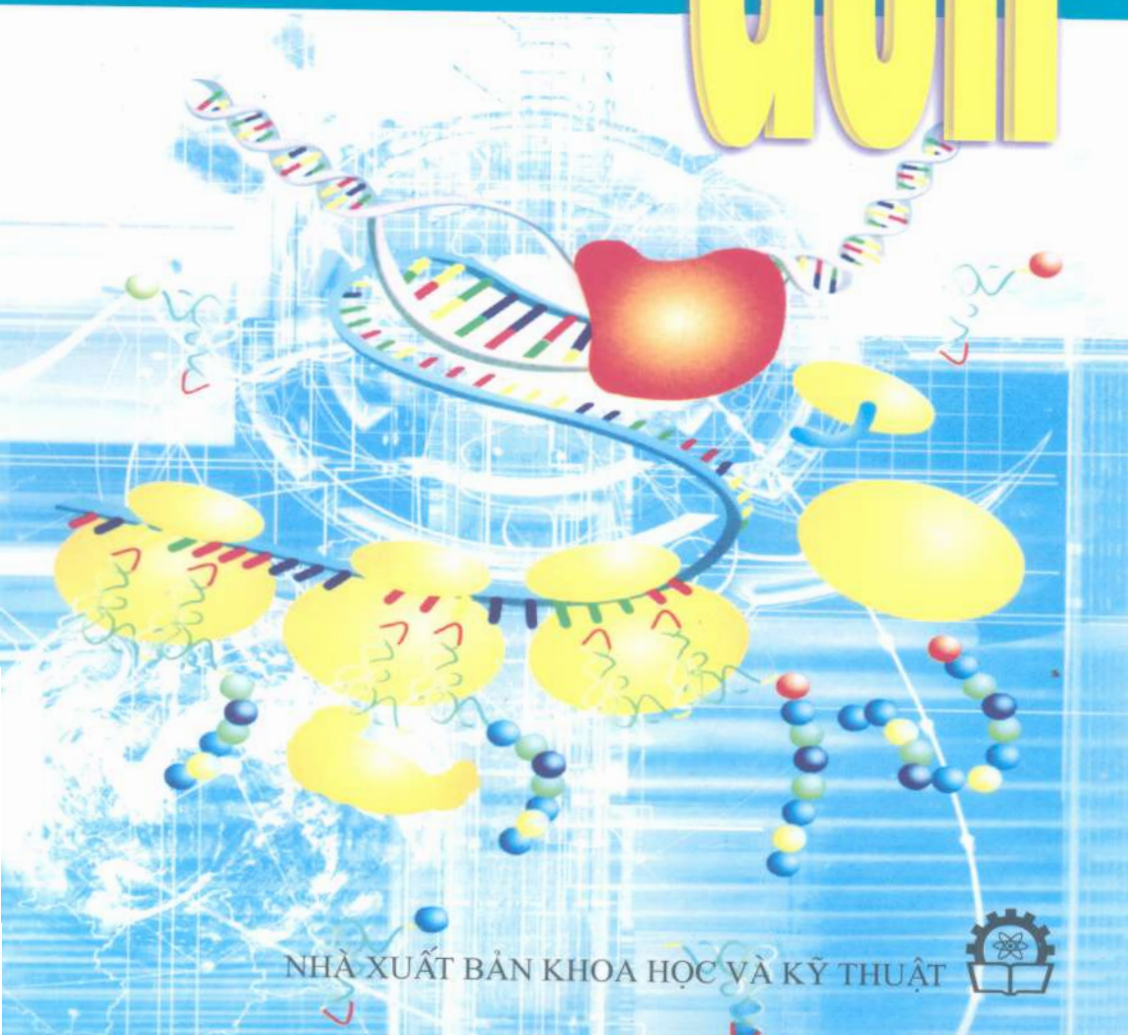
GS. TSKH. ĐÀI DUY BAN

Công nghệ Gen



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

GS.TSKH ĐÁI DUY BAN

CÔNG NGHỆ GEN

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
HÀ NỘI - 2006

LỜI GIỚI THIỆU

Di truyền học phân tử *nghiên cứu cấu trúc các gen và sự vận hành các sản phẩm của chúng trong một tế bào. Lãnh vực này không ngừng được phát triển là nhờ kỹ thuật liên quan đến sự thao tác ADN, ARN và protein thay đổi mau lẹ và mạnh mẽ mà các kỹ thuật đó ngày nay được gọi là* ***công nghệ gen****.*

Công nghệ gen ra đời đã dẫn tới những tiến bộ phi thường trong thực tiễn y khoa và trong nông nghiệp. Công nghệ gen là sợi chỉ đỏ của Công nghệ sinh học. Nhờ công nghệ gen người ta đã và đang tạo ra các loại cây trồng, vật nuôi biến đổi gen nhằm cung cấp lương thực thực phẩm một cách dồi dào và đa dạng; tạo ra các loại thuốc, các sinh phẩm quý giá đắt tiền để chữa bệnh; sản xuất ra các bộ kít chẩn đoán sớm và chính xác các bệnh; tạo ra các vaccine (vacxin) phân tử tái tổ hợp để phòng các bệnh virus (virut) và nhiễm khuẩn.

Đặc biệt liệu pháp gen – là phương pháp chữa bệnh bằng gen và thuốc gen đang được thịnh hành, đã góp phần điều trị và chữa khỏi một số một số bệnh nan y như: xơ nang, thiếu máu hồng cầu liềm, bệnh máu khó đông, ung thư v.v...Như vậy, rõ ràng công nghệ gen đóng vai trò chủ đạo. Gần đây vấn đề sản xuất tế bào phôi gốc (tế bào mầm phôi) để phục vụ nghiên cứu và điều trị cũng đang được bàn cãi và phát triển rầm rộ thì công nghệ gen cũng góp phần quan trọng, vai trò của cừu Dolly và kỹ thuật tế bào gốc phôi đã đẩy việc điều trị y học lên một tầm cao hơn nữa.

Tế bào gốc phôi tạo từ phôi nhân bản với tế bào sinh dưỡng của người bệnh có các lợi thế như:

+ Không bị hàng rào miễn dịch cản trở khi ghép vào cơ thể.

+ Có thể nhân nhanh và biệt hoá tất cả các tế bào và cơ quan để thay thế.

Dùng tế bào gốc có thể điều trị các bệnh hiểm nghèo và xã hội như: bệnh tiểu đường, bệnh Parkinson, bệnh ung thư máu các loại v.v...

Công nghệ gen là gì? Các nguyên lý cơ bản của công nghệ gen và ứng dụng công nghệ gen trong các lĩnh vực kinh tế quốc dân như thế nào?

Trong những năm qua, chúng tôi đã có một số công trình nghiên cứu cấp Bộ và cấp Nhà nước về chẩn đoán sớm ung thư gan, ung thư vòm họng, ung thư vú và một số bệnh virus nên có điều kiện tiến hành các kỹ thuật về công nghệ gen. Do đó để góp phần làm sáng tỏ những vấn đề trên đồng thời để đáp ứng được nhu cầu của các sinh viên đại học, các học viên cao học, các nghiên cứu sinh và nhu cầu tham khảo của các cán bộ giảng dạy, cán bộ nghiên cứu trong các ngành công nghệ sinh học, y dược, nông lâm thuỷ sản; chúng tôi biên soạn cuốn sách "Công nghệ gen".

Nội dung cuốn sách gồm 16 chương được sắp xếp theo thứ tự logic từ nguyên lý cơ bản đến kỹ thuật, từ đơn giản đến phức tạp của một ngành khoa học hiện đại. Riêng phần ứng dụng chỉ đề cập rất ngắn gọn, vì nhiều bài báo nhiều sách khác liên quan đều đã đề cập đến. Trong quá trình biên soạn chắc không tránh khỏi những thiếu sót. Chúng tôi xin cảm ơn sự đóng góp của các bạn đọc.

Chúng tôi xin cảm ơn sự đóng góp của GS. Lê Đình Lương, GS Nguyễn Đình Huyên, TS Hồ Huỳnh Thuỳ Dương, PGS Hoàng Thị Bích Ngọc và nhiều tác giả khác đã ghi trong phần "tài liệu tham khảo" đã cung cấp cho chúng tôi nhiều tài liệu bổ ích để cuốn sách hoàn chỉnh hơn.

Chúng tôi cũng chân thành cảm ơn Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật và Biên tập viên đã biên tập và cho xuất bản để cuốn sách được sớm đến bạn đọc xa gần trong cả nước.

MỞ ĐẦU

CÔNG NGHỆ HƯỚNG TỚI TƯƠNG LAI

Thế kỷ XXI là thế kỷ của công nghệ cao, mười công nghệ mới sẽ dẫn chúng ta vào thế kỷ này, theo như VS.News, TS. Dương Huyền tổng hợp từ báo chí.

Loài người đang đặt chân vào thế kỷ XXI có lẽ tương lai còn nhiều điều kỳ diệu mà thậm chí đến các nhà tiên tri, các nhà tiên đoán tài tính nhất cũng không hình dung ra được. Thế kỷ XXI là kỷ nguyên của ***công nghệ gen, kỹ thuật vật liệu siêu dẫn, bionics, siêu vi điện tử, công nghệ siêu nhỏ...*** và còn biết bao nhiêu những tiến bộ khác của khoa học và công nghệ. Sự kết hợp của khoa học kỹ thuật với các ý tưởng của những cái đầu vĩ đại. Khả năng vô hạn của loài người và các nhu cầu phát triển đã đẩy cuộc cách mạng khoa học công nghệ lên đến đỉnh cao mới.

Mới hôm nay thôi nó còn là ý tưởng của một ai đó thì ngày mai nó đã có thể là một công nghệ được đưa vào cuộc sống. Mười công nghệ được coi là có triển vọng nhất trong thập niên sắp tới của thế kỷ XXI là:

1. Công nghệ gen,
2. Công nghệ nano hay còn gọi là công nghệ siêu nhỏ,
3. Sinh học điện tử hay còn gọi là Tin sinh học (bioinformatics),
4. Điện tử quang học,
5. Xe hơi hyđro,
6. Kỹ thuật mô phỏng siêu thực,
7. Siêu dẫn nhiệt độ cao,
8. Công nghệ tái sinh thế giới động vật cổ đại,
9. Máy tính thông minh,
10. Những vật liệu mới.

Với nội dung của cuốn sách này, tác giả chỉ tập trung trình bày về các

khái niệm, những nguyên lý cơ bản của ***gen và công nghệ gen*** một trong mười hướng của công nghệ cao:

- Sinh học phân tử của gen và công nghệ gen
- Các khái niệm và nguyên lý cơ bản của công nghệ gen
- Công nghệ gen trong ngành y và dược học cũng như ngành nông nghiệp hiện đại.

MỤC LỤC

Công nghệ gen
Lời giới thiệu 3
Mở đầu 5
PHẦN A – **KHÁI NIỆM VỀ GEN VÀ CÔNG NGHỆ GEN** **11**
Chương I. KHÁI NIỆM VỀ GEN VÀ CÔNG NGHỆ GEN 12
Chương II. SỰ SAO CHÉP –SINH TỔNG HỢP ADN 17
I. Sinh tổng hợp ADN ở các tế bào sinh vật nhân sơ 17
1. Nguyên lý của sự sao chép ADN 17
2. Các enzym tham gia trong các quá trình sao chép ADN 20
3. Các giai đoạn sao chép ADN 22
II. Sinh tổng hợp ADN ở các tế bào sinh vật nhân chuẩn 24
1. Giai đoạn G1 25
2. Giai đoạn S 25
3. Giai đoạn G2 28
4. Giai đoạn nguyên phân 28
III. Sự sửa chữa sai sót trong quá trình sao chép sinh tổng hợp ADN 28
1. Các tác nhân sinh, lý, hoá gây thương tổn ADN 29
2. Các hệ thống sửa chữa thương tổn và cơ chế sửa chữa 30
Chương III. SỰ PHIÊN MÃ- SINH TỔNG HỢP ARN 33
I. Sinh tổng hợp ARN ở sinh vật nhân sơ 34
1. Một số đặc điểm về enzym ARN polymeraza 34
2. Sự mở đầu, kéo dài và kết thúc sự sao các chuỗi polyribonucleotid 38

II. Sinh tổng hợp ARN ở sinh vật nhân chuẩn 40
1. Một số đặc điểm cần phân biệt 40
2. Các giai đoạn mở đầu, kéo dài và kết thúc sự phiên mã 42
3. Các chất ức chế sự tổng hợp ARN 43
4. Sự hoàn thiện ARN ribosom 44
5. Sự hoàn thiện ARN thông tin 45
Chương IV. MẬT MÃ DI TRUYỀN, SỰ DỊCH MÃ – SINH TỔNG HỢP PROTEIN 48
I. Mật mã di truyền 48
1. Các phân tử bảo quản và vận chuyển thông tin di truyền 48
2. Cách bảo quản và vận chuyển thông tin di truyền trong ADN và mARN, các bằng chứng về mã bộ ba 48
3. Giải mã di truyền 51
4. Các đặc điểm của mã di truyền 52
II. Sự dịch mã- sinh tổng hợp protein 55
1. Các chất tham gia tổng hợp protein 55
2. Vai trò của một số yếu tố quan trọng tham gia quá trình sinh tổng hợp protein 57
3. Các giai đoạn của quá trình sinh tổng hợp protein 64
Chương V. ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG BIỂU HIỆN GEN 68
I. Mô hình điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở tế bào nhân sơ 69
II. Mô hình điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở tế bào nhân chuẩn 72
III. Mô hình điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở ở cơ thể đa bào bậc cao 80
IV. Mô hình điều hoà hoạt động biểu hiện gen thông qua màng tế bào trong sự phân chia tế bào 86
PHẦN B – **CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH GEN VÀ CÔNG NGHỆ BIỂU HIỆN GEN** **93**
Chương VI. CÁC ENZYM CẮT, BIẾN ĐỔI VÀ NỐI ADN 94

I. Các enzym hạn chế 95

II. Những enzym khác liên quan đến các thao tác trên ADN 98

Chương VII. PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT AXIT NUCLEIC 109

I. Sự chuẩn bị ADN của toàn bộ tế bào 110

II. Sự chuẩn bị ADN của plasmid 112

III. Sự chuẩn bị ADN của thực khuẩn thể 114

IV. Các phương pháp tách chiết axit nucleic cụ thể 116

Chương VIII. PHƯƠNG PHÁP LAI PHÂN TỬ VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH DẤU PHÂN TỬ 124

I. Phương pháp lai axit nucleic 124

II. Phương pháp đánh dấu axit nucleic 126

Chương IX. CÁC LOẠI VẬT CHỦ THU NHẬN VÀ CÁC LOẠI VECTƠ CHỌN DÒNG 129

I. Các loại vật chủ thu nhận 129

1. Vật chủ là *E.coli* và các vi khuẩn khác 129

2. Vật chủ là nấm men và nấm mốc 129

3. Vật chủ là thực vật bậc cao 130

4. Vật chủ là các tế bào động vật có vú 131

II. Các vectơ chọn dòng 131

Chương X. CÁC LOẠI VECTƠ TRONG TẠO DÒNG 141

I. Những vấn đề chung 141

II. Các loại vectơ 143

Chương XI. SỰ TẠO DÒNG GEN VÀ PHÁT HIỆN DÒNG CẦN TÌM 149

I. Các bước của tạo phương pháp dòng 149

II. Sự phát hiện dòng gen cần tìm 151

Chương XII. PHƯƠNG PHÁP PCR DÙNG TRONG TẠO DÒNG INVITRO 153

I. Phản ứng chuỗi polymeraza 153

II. Các chỉ tiêu ảnh hưởng đến phản ứng PCR 160
III. Các ứng dụng chủ yếu của phương pháp PCR 161
Chương XIII. KỸ THUẬT BIẾN NẠP VÀ KỸ THUẬT LÂY NHIỄM 163
I. Kỹ thuật biến nạp-đưa các ADN của plasmid vào tế bào vi khuẩn 164
II. Sự chọn lựa đối với các tế bào tái tổ hợp 165
III. Kỹ thuật lây nhiễm-đưa các ADN của phage vào các tế bào vi khuẩn 166
IV. Kỹ thuật biến nạp vào các tế bào không phải của vi khuẩn 168
Chương XIV. CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ CỦA AXIT NUCLEIC 171
I. Phương pháp Maxam và Gilbert 171
II. Phương pháp Sanger 173
Chương XV. CÔNG NGHỆ BIỂU HIỆN GEN 176
I. Những vấn đề chung của công nghệ 176
II. Công nghệ biểu hiện gen trong E.coli 178
III. Công nghệ biểu hiện gen trong nấm men 181
PHẦN C – **ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ GEN** **183**
Chương XVI. KHÁI QUÁT VỀ ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ GEN 184
I. Khái quát về ứng dụng của công nghệ gen 184
II. Điều trị gen 185
III. Chẩn đoán gen 195

PHẦN A

KHÁI NIỆM VỀ GEN VÀ CÔNG NGHỆ GEN

CHƯƠNG 1

KHÁI NIỆM VỀ GEN VÀ CÔNG NGHỆ GEN

Cơ sở sinh học phân tử của gen chính là acid nucleic (axit nucleic). Nó gồm có acid deoxyribonucleic (ADN) và acid ribonucleic (ARN). Acid nucleic đóng vai trò quan trọng trong việc bảo tồn nòi giống và truyền thông tin di truyền cho thế hệ sau. Trong tế bào, acid nucleic có thể kết hợp với protein thành nucleoprotein. Trước kia người ta cho rằng, acid nucleic chỉ có trong nhân tế bào nhưng bây giờ chúng phổ biến ở cả ngoài nhân.

Cả ADN và ARN đều là những phân tử polyme dài gồm nhiều monome nối với nhau. Trong ADN, monome đó có tên là ***deoxy-ribonucleotid***, còn ở ARN, monome đó có tên là ***ribonucleotid***. Mỗi nucleotid có một bazơ nitơ (dẫn xuất purin hay pyrimidin) một đường pentoza và một nhóm photphat.

Bạn đọc có thể tìm thấy công thức của các nucleotid và cấu trúc ADN, ARN ở bất kỳ một cuốn sách hoá sinh học hoặc sách di truyền học cũng như các sách sinh học phân tử nào đó nên ở đây chúng tôi thiết nghĩ không cần phải nhắc lại. Đứng về phương diện phân tử mà xét thì các acid nucleic nói trên đáp ứng đầy đủ các tiêu chuẩn của vật chất di truyền.

1. Vì nó chứa đựng thông tin ở dạng bền vững, có thể sao chép một cách chính xác để di truyền cho các thế hệ sau.

2. Chúng có thể tạo thành những phân tử khác một cách có cơ sở để cần cho cấu trúc và hoạt động của tế bào.

3. Đồng thời các acid nucleic cũng có khả năng biến đổi- mà di truyền và biến đổi là hai mặt của di truyền học hiện đại.

Ngày nay, người ta chứng minh được rằng ADN là vật chất di truyền của hầu hết sinh vật, còn ARN và vật chất di truyền của một số virus (virut).

Các vật chất di truyền của tế bào nằm trong các nhiễm sắc thể, có thể

phân biệt được ba loại nhiễm sắc thể dưới đây:

1. ***Với các phage***, nhiễm sắc thể của chúng là những ADN trần, chuỗi kép (sợi kép), mạch vòng không có protein (đó là phage).

2. ***Với vi khuẩn***, nhiễm sắc thể cũng là những phân tử ADN trần chuỗi kép, mạch vòng siêu xoắn và tập trung ở một vùng gọi là vùng nhân không có màng bao bọc. Bên cạnh đó vi khuẩn còn có một loại ADN khác dạng vòng kép nhỏ, đó là các plasmid – mà chúng ta sẽ được đọc nhiều ở phần nói về các vectơ plasmid ở công nghệ gen.

3. ***Với các sinh vật nhân chuẩn*** (eukaryote) như nấm men, cơ thể đa bào thì nhiễm sắc thể là những phân tử ADN sợi kép nằm trong nhân có màng bao bọc hẳn hoi. Ngoài ADN trong nhân, những loài sinh vật nhân chuẩn khác nhau có kiểu nhân khác nhau cả về số lượng và hình dáng và tập hợp thành bộ nhiễm sắc thể. Ở động vật, ngoài nhiễm sắc thể thường còn có nhiễm sắc thể giới tính đực và giới tính cái (Y và X).

Tất cả nhiễm sắc thể đó bó chặt giữa ADN và *năm protein histon* các loại cũng như gần *100 protein không histon* tạo ra thể nhân (nucleosom). Lượng histon gần bằng lượng ADN trong nhiễm sắc thể. Protein histon hiện nay giữ vai trò quan trọng trong sự điều hoà hoạt động gen và biệt hoá tế bào. Còn protein không phải histon thì gồm các enzym cần cho quá trình sao chép, phiên mã, dịch mã, các polymeraza ADN, ARN nên luôn luôn biến động trong suốt chu trình của tế bào và rất khác nhau ở các tế bào đã được biệt hoá. Các nhiễm sắc thể thường ở các sinh vật cùng loài thì giống nhau. Ở người, nam giới có 44 nhiễm sắc thể thường và hai nhiễm sắc thể giới tính là X, Y và ở nữ giới cũng có 44 nhiễm sắc thể thường và hai nhiễm sắc thể giới tính là X, X.

Trong tế bào của sinh vật nhân chuẩn, ngoài ADN nhiễm sắc thể nhân người ta còn thấy có một số ADN ở ty thể và lạp thể ở dạng ADN trần, mạch kép và đóng vòng nằm ở ngoài nhân. Hiện nay người ta cũng chú ý khai thác các ADN này nhất là của ty thể trong phân biệt chủng loại giun sán, trong phân biệt hài cốt, mồ mả và cả trong chẩn đoán ung thư.

Chúng ta biết rằng, trong nucleosom và ADN trong nhiễm sắc thể dài hơn nhiều so với nhiễm sắc thể nó đã được thu gọn ít nhất gần 100 lần và gắn với histon tạo nhiễm sắc thể có kích thước 100 nm và 300 nm ở pha nghỉ hay lớn hơn nữa ở pha giữa.

Ở pha nghỉ, khi nhuộm người ta thấy chất nhiễm sắc chia thành hai

loại rõ rệt: một loại được nhuộm màu rất nhạt gọi là *chất nguyên nhiễm sắc*, còn loại kia được nhuộm màu rất đậm gọi là *chất dị nhiễm sắc*. Chất nguyên nhiễm sắc là chất chứa ADN ở *trạng thái hoạt động – phiên mã*. Chất dị nhiễm sắc là chất chứa ADN ở *trạng thái không phiên mã* được và nó sẽ sao chép muộn trong chu kỳ sinh sản của tế bào.

Cần phân biệt ở đây nhiễm sắc thể vi khuẩn chỉ mang một trình tự ADN duy nhất, trong khi đó nhiễm sắc thể ở cơ thể đa bào (nhân chuẩn) lại có nhiều đoạn lặp lại. Các sinh vật khác nhau có số ADN lặp lại khác nhau. Có đoạn từ vài cặp đến vài trăm cặp bazơ lặp lại hàng triệu lần trong gen và thường nằm gần tâm động hoặc ở hai đầu của nhiễm sắc thể, chúng được sao chép muộn và không được phiên mã. Còn các đoạn lặp lại hàng chục đến vài ngàn lần thì được phiên mã và cũng thường là ARN ribosom, ARN vận chuyển và histon.

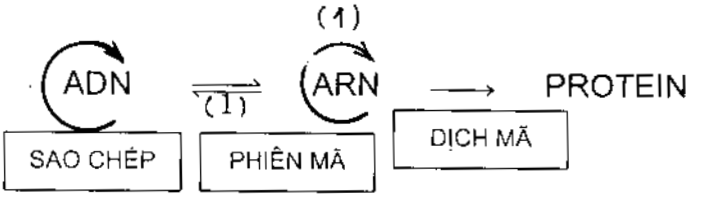
Một điểm nữa là ở cơ thể sinh vật nhân chuẩn, đa bào có các đoạn không mã hoá acid amin được gọi là *intron* và đoạn được mã hoá gọi là *exon*. Cả hai đoạn đều phiên mã ra phân tử tiền chất của mARN, nhưng sau đó tiền chất mARN của intron bị cắt đi còn lại tiền chất mARN của exon được nối lại với nhau thành phân tử mARN để đi vào ribosom dịch mã thành protein.

Hiện nay, người ta xác định được *intron có một vai trò trong quá trình biệt hoá* của sinh vật đa bào, chứ không phải những đoạn ADN dư thừa như đã nghĩ sai về nó như những năm trước đây.

Trên nhiễm sắc thể của các sinh vật nhân sơ (prokaryote) cũng như sinh vật nhân chuẩn người ta còn thấy một hiện tượng như sau: ngoài các gen chiếm vị trí cố định trên nhiễm sắc thể thì còn có những gen lưu động từ vị trí này đến vị trí khác của bộ gen, người ta gọi đó là những *"yếu tố di truyền vận động" hay còn gọi là "gen nhảy"*. Đó là những đoạn ADN có khả năng xen vào một số vị trí trong bộ gen và cũng có thể tách rời khỏi bộ gen. Khi chúng xen vào bộ gen thì làm biến đổi di truyền còn khi tách khỏi bộ gen thì những biến đổi không còn nữa.

Ngày nay, người ta xác nhận những gen nhảy đó tồn tại một cách phổ biến ở tất cả mọi sinh vật làm thay đổi cấu trúc của hệ gen, do đó ảnh hưởng đến hoạt động gen.

Dòng thông tin di truyền chảy theo một chiều như sơ đồ hình 1.1



Hình 1.1. **Sơ đồ lý thuyết trung tâm của Crick về vận chuyển thông tin di truyền. (1) Những mũi tên được Crick bổ sung thêm vào năm 1970.**

Quá trình phiên mã (transcription) và dịch mã (translation) và sao chép ADN (replication) tuân theo quy luật này. *Ở một số virus loại ARN* thì có quá trình phiên mã ngược (revertranscription) tạo ra bản sao ADN từ ARN hệ gen của chúng.

Gen là đơn vị cơ sở của thông tin di truyền, mà cụ thể là một đoạn ADN của thông tin di truyền được phiên mã sang phân tử mARN, rồi sau đó dịch mã thành một protein nhất định. Các gen nằm trên các nhiễm sắc thể và gen nào định vị ở đâu thì đó gọi là locut của gen đó. Ở các sinh vật lưỡng bội, các nhiễm sắc thể sắp xếp thành các cặp tượng đồng. Trên nhiễm sắc thể tương đồng, tại các vị trí tương ứng tồn tại các dạng khác nhau của cùng một gen gọi là alen.

Nói đến cấu trúc của một gen, tức là nói đến đơn vị phiên mã tạo ra mARN nằm giữa điểm khởi đầu và điểm kết thúc phiên mã. Bên trong đơn vị phiên mã là một đoạn trình tự mã hoá còn hai đầu của đơn vị phiên mã còn có vùng điều hoà ngược hoặc điều hoà xuôi chứa yếu tố tăng cường (enhance) hoặc điểm chỉ huy cùng với promotơ phát động và điểm bám của enzym polymeraza ARN.

Cấu trúc gen của sinh vật nhân sơ như vi khuẩn, các gen thường sắp xếp thành nhóm trong operon. Trong các operon có ba loại nhóm gen: các gen cấu trúc (S), gen phát động (P) và gen chỉ huy (O) đi liền nhau.

Nằm ngoài operon còn có gen ức chế mã hoá protein ức chế để tác động lên gen chỉ huy. Kiểm soát âm tính đối với operon, qua ngăn chặn không cho enzym polymereza ARN bám vào.

Trong các gen cấu trúc của vi khuẩn thường bố trí theo nhóm nên sản phẩm phiên mã mARN thường mang thông tin dùng cho nhiều protein, đó gọi là đa cistron. Các phân tử được tổng hợp cùng một lúc phù hợp với nhu

cầu của tế bào trong mỗi thời điểm xác định và đáp ứng được nhanh chóng với điều kiện môi trường luôn biến đổi. Operon *lac* là ví dụ điển hình về cách bố trí cấu trúc hoạt động của gen vi khuẩn (sẽ nói ở phần điều hoà hoạt động gen).

Còn cấu trúc gen của sinh vật nhân chuẩn thì phức tạp hơn nhiều và nhân chuẩn có màng nhân bao bọc, nên ADN nằm cách biệt khỏi điểm dịch mã ở bào tương. Việc phát hiện ở nhân chuẩn có các đoạn intron và exon làm việc hoạt động gen của chúng lại càng phức tạp. Việc tạo ra tiền mARN phải qua xử lý gọi là *quá trình xử lý ARN* (ARN procesing) mới tạo ra được sản phẩm mARN có hoạt tính chức năng để chui ra khỏi nhân tham gia vào quá trình dịch mã.

Công nghệ gen [1] liên quan chặt chẽ đến quá trình biểu hiện gen tức là quá trình phiên mã và dịch mã của gen. Phiên mã gồm một số giai đoạn, đó là bắt đầu enzym polymeraza ARN bám vào ADN, sau đó bước đầu tổng hợp kéo dài và kết thúc chuỗi, cuối cùng giải phóng ARN ra. Khi ARN giải phóng ra thì được sử dụng ngay vào quá trình dịch mã để tạo ra polypeptid. ARN có ba loại: ARN thông tin (mARN), loại ARN vận chuyển (tARN) có gắn acid amin và loại ARN ribosom (rARN). Ribosom là nơi diễn ra quá tổng hợp protein . Nó là chỗ để cho codon của mARN gặp anticodon của tARN acid amin và như vậy acid amin tương ứng được tham gia vào chuỗi polypeptid đang được tổng hợp. Quá trình dịch mã cũng trải qua một số giai đoạn như giai đoạn tARN được hoạt hoá gắn acid amin, giai đoạn mở đầu, kéo dài và kết thúc tổng hợp protein.

Công nghệ gen còn liên quan đến quá trình tách gen, phóng đại gen, tái tổ hợp gen, dòng hoá gen, phân tích gen và gá lắp gen mà các nguyên lý sẽ lần lượt được làm sáng tỏ ở tất cả các chương sau.

---

(1) Hiện nay, trên toàn thế giới có một số thuật ngữ khác (tổng số là 12 thuật ngữ khác nhau) cũng được dùng để chỉ khái niệm này.

Tham khảo tên các thuật ngữ này ở cuốn "Nguyên lý kỹ thuật di truyền do Nxb. KH&KT xuất bản năm 2001, tr 5. *BTV*.

CHƯƠNG II

SỰ SAO CHÉP - SINH TỔNG HỢP ADN

Phần tổng hợp gen tức là tổng hợp acid nucleic thì cuốn sách hoá sinh nào cũng giới thiệu, ở đây chỉ trình bày một số vấn đề khác biệt về tổng hợp gen ở các tế bào sinh vật nhân sơ và tế bào sinh vật nhân chuẩn.

1. Tổng hợp gen ở các tế bào của sinh vật nhân sơ (prokaryote)

2. Tổng hợp gen ở các tế bào của sinh vật nhân chuẩn (eukaryote)

3. Sự sửa chữa sai sót trong quá trình sao chép tổng hợp gen, sinh tổng hợp ADN

I. SINH TỔNG HỢP ADN Ở CÁC TẾ BÀO CỦA SINH VẬT NHÂN SƠ

1. Nguyên lý của sự sao chép ADN

Gen là thông tin di truyền của mọi sinh vật mà cơ sở phân tử của nó là ADN. Thông tin này được bảo tồn trong quá trình phân chia tế bào, do vậy sự phân chia tế bào được tiến hành sau quá trình tổng hợp ADN.

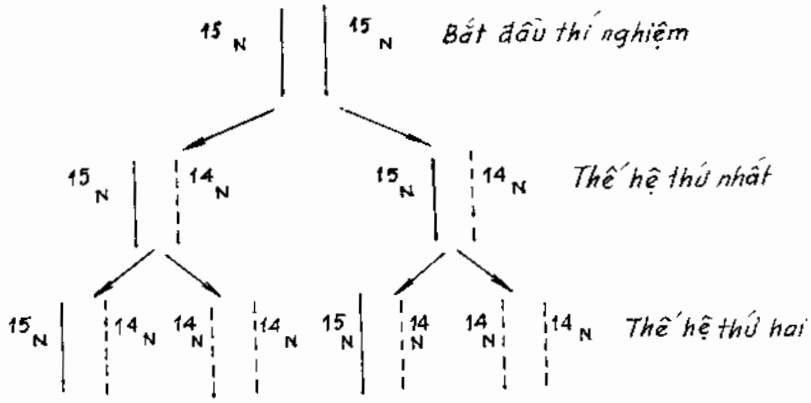
Sự tổng hợp ADN hay còn gọi là ***sự sao chép*** (replication) cần cho sự bảo tồn thông tin di truyền từ ADN sang ADN.

Dựa trên mô hình cấu trúc của ADN, Watson và Crick cho rằng mỗi sợi của ADN xoắn kép được dùng làm khuôn mẫu để tổng hợp một sợi bổ sung theo quy luật đôi base. Như vậy từ một phân tử ADN sẽ tạo ra hai phân tử ADN giống hệt nó. Đó là sự sao chép ADN theo kiểu bán bảo tồn (semi-conservation).

Thí nghiệm cổ điển của Meselson và Stahl (1957-1958) đã chứng minh giả thiết trên *E.coli* được nuôi cấy qua nhiều thế hệ, trong môi trường chỉ chứa $^{15}NH_4Cl$ (^{15}N là đồng vị nặng của nitrogen) làm nguồn nitrogen duy

nhất. Như vậy những ADN được tổng hợp trong các thế hệ thí nghiệm chứa ^{15}N. Sau đó thay đổi môi trường nuôi cấy, dùng (^{14}N) là $^{14}NH_4Cl$, vi khuẩn được phát triển trên môi trường này qua vài thế hệ. Như vậy những phân tử ADN được tổng hợp trong các thế hệ có thể chứa ^{14}N. ADN được chiết xuất và tinh chế. Tỷ trọng ADN được xác định bằng siêu ly tâm và người ta đã phân biệt được ADN nặng chứa ^{15}N, ADN thường chứa ^{14}N, ADN trung gian chứa ^{14}N và ^{15}N.

Các thí nghiệm ở trên cho thấy đầu tiên ADN đều thuộc loại ADN nặng $^{15}N/^{15}N$; ở thế hệ thứ nhất (nuôi trong $^{14}NH_4Cl$) ADN thuộc loại trung gian $^{15}N/^{14}N$; ở thế hệ thứ hai, một nửa ADN thuộc loại trung gian $^{15}N/^{14}N$ và một nửa ADN thuộc loại bình thường $^{14}N/^{14}N$ (hình 2.1).



Hình 2.1. **Thí nghiệm của Meselson và Stahl (1957-1958).**

Thí nghiệm đã chứng tỏ rằng, ADN được dùng làm khuôn mẫu cho sự tổng hợp ADN mới và người ta không thấy sự khác nhau giữa ADN tổng hợp được và ADN tự nhiên làm mồi vì các tính chất lý hoá: độ lắng trầm, độ nhớt, trọng lượng phân tử, thành phần các base. Ở trong các mô cũng vậy, sự tổng hợp ADN mới xảy ra trên cơ sở những phân tử ADN có sẵn với sự xúc tác của ADN polymerase. Trước tiên hai sợi của phân tử ADN bị tách ra từ một đầu mút, rồi mỗi đoạn của những sợi đã tách ra được dùng làm khuôn mẫu cho sự tổng hợp một sợi nucleotid bổ sung với đoạn ADN tương ứng: nguyên liệu được sử dụng là các nucleotid triphotphat, enzym xúc tác là ADN polymerase, cơ chế tổng hợp là nguyên lý bổ sung đôi base (A-T, G-C). Như vậy từ một phân tử ADN cũ (ADN mẹ) xuất hiện hai phân tử ADN

mới (ADN con). Trong mỗi phân tử ADN con, một sợi là của ADN mẹ và một sợi do tổng hợp (hình 2.2).

d ATP

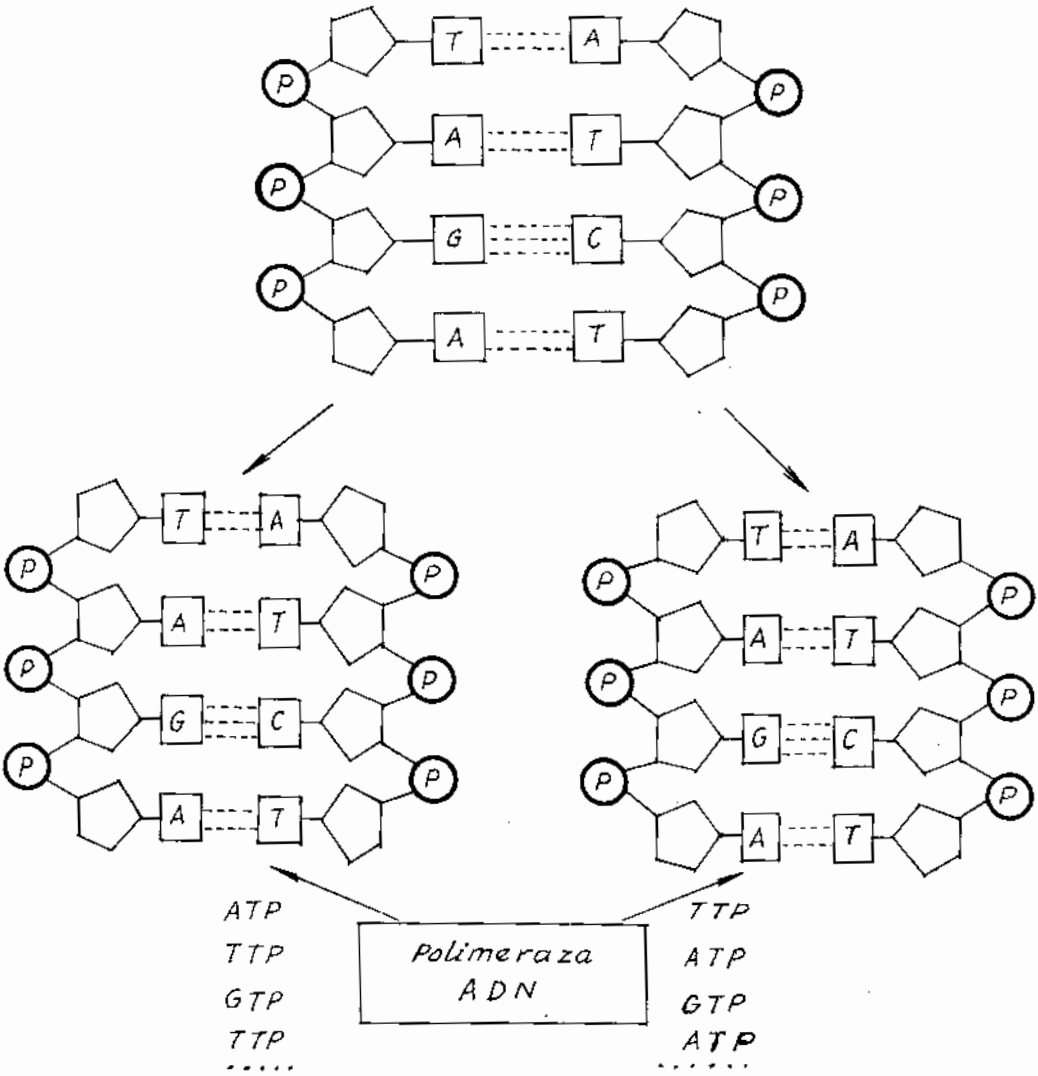
d GTP

d CTP

d PTP

$$\xrightarrow[\text{ADN polimeraza}]{\text{ADN một chuỗi làm khuôn}} \text{ADN} + \text{PP}$$

Trình bày sơ đồ sao chép ADN theo cơ chế bán bảo tồn.



Hình 2.2. **Sơ đồ trình bày cơ chế sao chép - sinh tổng hợp ADN theo Kornberg.**

Do nguyên lý bổ sung đôi base, *phân tử ADN con* có cấu trúc hoàn toàn giống *ADN mẹ*. Việc tái sinh chính xác cấu trúc của ADN trong quá trình tổng hợp có ý nghĩa sinh học rất lớn trong việc giữ gìn tính đặc hiệu và tính chất di truyền của mỗi loài động vật từ tế bào này sang tế bào khác, từ thế hệ này sang thế hệ khác.

2. Các enzym tham gia trong quá trình sao chép ADN

2.1. ADN polymeraza

Ở *E.coli* có ba loại ADN polymeraza tham gia vào tổng hợp ADN theo chiều 5'- 3' gọi là *Pol I*, *Pol II* và *Pol III* và được mã hóa trong các gen tương ứng là *Pol A*, *PolB*, *Pol C*. Cả ba enzym đều có hoạt tính exonucleaza 3' – 5' nên chúng có thể cắt bỏ những chuỗi polynucleotid mới được tổng hợp và hoạt động như một cái máy sửa sai để giúp cho sao chép được chính xác. Hiện tượng đó gọi là hiện tượng đọc sửa (proofreading) .

Pol I do Kernberg chiết xuất từ *E.coli* xúc tác tổng hợp ADN từ các deoxyribonucleotid triphotphat với sự có mặt của ADN làm mồi, đủ cả bốn deoxyribonucleotid triphotphat và ion Mg++

(dNMP)n + dNTP ----> (dNMP)n+1 + PPi

cụ thể là:

1 sợi ADN khuôn + 4 dNTP -----> ADN sợi mới

theo hướng 5'-3' được kéo dài

Pol I có tác dụng cả hai chiều, chiều 5'-3' và chiều 3'-5'. Chiều 3'-5' có tác dụng đọc và sửa chữa những nucleotid sai, chiều 5'-3' còn có tác dụng tách primer.

Pol II chưa rõ vai trò nhưng hình như tham gia trong sửa chữa.

Pol III có vai trò chủ yếu trong kéo dài chuỗi ADN mới theo chiều 5'-3' ở *E.coli*, cần có ADN khuôn và mồi và không có tác dụng khởi đầu cho sự tổng hợp.

2.2. ADN helicaza

Cấu trúc của ADN helicaza gồm ba protein có chức năng mở xoắn kép ADN là: DnaA, DnaB, DnaC với các nhiệm vụ khác nhau:

DnaA: nhận biết vị trí đặc biệt ở điểm mở đầu.

DnaB: mở xoắn kép

DnaC: cần thiết để Dna B gắn vào điểm mở đầu.

Xoắn kép mất đi khi ADN helicaza di chuyển theo chiều dài của một sợi đơn ADN

2.3. Toposomeraza

Chức năng của toposomeraza là ngăn không cho ADN xoắn kép trở lại. Có hai loại topoisomeraza:

Topoisomeraza loại I tháo dạng siêu xoắn. Chúng gắn vào phân tử ADN và cắt một trong hai mạch để tháo xoắn. Sau tháo xoắn, enzym này lại nối lại chỗ đứt.

Topoisomeraza loại II có khả năng tháo các nút nảy sinh do các biến đổi cấu trúc của xoắn kép và cắt cả hai mạch. Nó chính là ADN lygaza trong *E.coli* giúp cho helicaza tháo vòng dễ dàng với tốc độ 4500 vòng/phút.

2.4. ARN primaza

ARN primaza có chức năng tổng hợp những sợi ARN mồi còn lại là DnaG protein là enzym xúc tác tổng hợp những sợi ARN mồi ngắn khoảng từ 10-60 nucleotid trên chuỗi chậm.

Primaza phối hợp với sáu protein khác tạo thành cấu trúc khác gọi là primosom và có chức năng tổng hợp ARN mồi nhờ năng lượng của sự thuỷ phân ATP. Thành phần các protein trong primosom có DnaT protein, protein n, protein n', protein n'', DnaC protein và Dna B protein (helicaza tháo xoắn ADN). DnaG protein là primaza nó tổng hợp ARN mồi.

Ở đây cần nhấn mạnh một điểm là không có một enzym Pol nào trong số ba enzym Pol nói trên có thể khởi đầu cho việc tổng hợp các sợi ADN mới nên đòi hỏi phải có một đoạn mồi ngắn để các deoxyribonucleotid đính vào và trên cơ sở đó các enzym Pol mới hoạt động được. Đoạn mồi ngắn đó ở *E.coli* chính là một đoạn ARN được sinh ra bởi enzym primaza. Trình tự các bazơ trong đoạn mồi được định ra bởi các nucleotid của sợi khuôn ADN.

2.5. ADN ligaza

ADN ligaza là enzim nối các mẫu ADN kép, xúc tác việc nối các mẫu ADN kép, tạo thành liên kết phosphodieste giữa đầu tận 3'OH của mẫu ADN

kép này với 5'P của mẫu ADN kép khác. ADN ligaza không nối được hai sợi đơn.

ADN ligaza có thể tham gia sửa chữa nhánh ADN bị đứt, nối kín các ADN kép vòng.

2.6. Protein đính với sợi đơn ADN

Protein đính với sợi đơn ADN (SSB = Single strand ADN binding protein) này có tác dụng:

- Protein đính với sợi đơn để ổn định cấu trúc sợi đơn, không bị gấp khúc

- Protein này đính với sợi đơn, nhưng không phủ lên các bazơ để các bazơ sẵn sàng làm nhiệm vụ khuôn.

3. Các giai đoạn sao chép ADN

Có ba giai đoạn là: giai đoạn mở đầu, giai đoạn kéo dài và giai đoạn kết thúc sao chép ADN

3.1. Giai đoạn mở đầu

Đó là giai đoạn nhận diện điểm mở đầu. Các protein tham gia vào giai đoạn này gọi là những protein mở đầu và giúp cho việc gắn enzim primaza vào khuôn ADN.

- Các protein mở đầu gồm:

* *Đoạn ori C* chứa 245 cặp bazơ trong đó có đoạn chìa khoá gắn ADN tạo phức hợp mở đầu.

* *Protein HU* giống histon tạo phức hợp mở.

* *Dna B và Dna C* tạo phức hợp mồi.

- Như vậy hàng nghìn cặp bazơ được tháo xoắn dưới tác dụng của các protein nói trên thuộc helicaza và gyraza. Đồng thời tháo xoắn có protein đính sợi đơn SSB liên kết trên đó để ổn định cấu trúc không bị xoắn trở lại và có sự tham gia của năng lượng tháo xoắn qua thuỷ phân ATP.

- ARN primaza (ADN G protein) gắn vào phức hợp trên tạo thành primosom và bắt đầu tổng hợp ARN mồi khoảng từ 10 - 60 mononucletid.

Các mẫu ARN mồi này cũng rất cần xúc tác sự tổng hợp các đoạn Okazaki.

3.2. Giai đoạn kéo dài

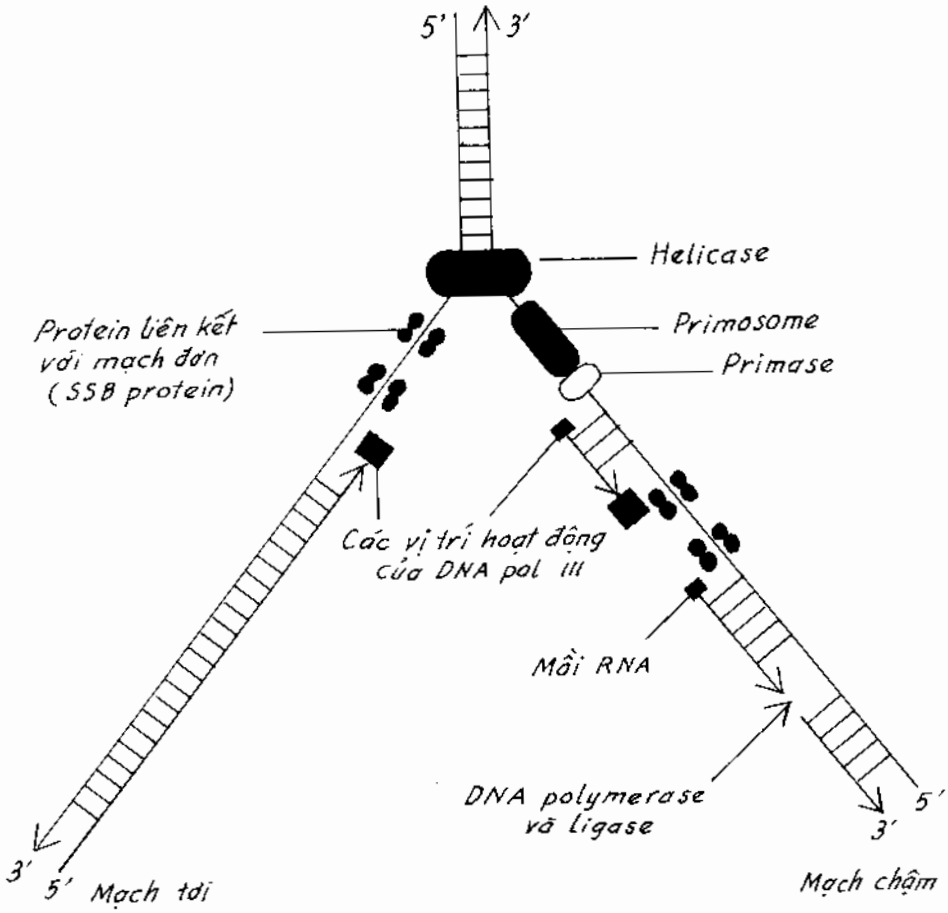
- Enzym Pol III tổng hợp đoạn Okazaki nối tiếp ARN mồi, đoạn này kéo dài đến đoạn ARN mồi tiếp theo.

- ARN mới đầu được tách ra do tác dụng exonucleaza của Pol I. Cũng chính Pol I xúc tác kéo dài ADN thế chỗ cho ARN mồi.

- Enzym ADN ligaza nối các đoạn Okazaki lại với nhau bằng liên kết phosphodieste.

3.3. Giai đoạn kết thúc

- Giai đoạn này *còn nhiều vấn đề chưa được sáng tỏ*, đó là:



Hình 2.3. Sơ đồ sao chép sinh tổng hợp ADN ở *E. coli*. Kornberg, 1988.

* Sự sao chép kết thúc ra sao?

* Tại sao sự sao chép không tiếp tục nữa?

* Sợi ADN được tổng hợp tách ra như thế nào?

- Chỉ biết khi sao chép kết thúc, các ARN mồi bị enzym RNA phân hủy. Các chỗ hổng do enzym này gây ra trên mạch mới sẽ lấp lại nhờ hoạt động của enzym ADN polymeraza I. Còn các chỗ gián đoạn trên các mạch mới thì được enzim ligaza nối lại. Toàn bộ các giai đoạn nói trên là đối với tổng hợp chuỗi chậm, còn chuỗi nhanh tức là tốc độ tổng hợp nhanh hơn thì có lẽ nó được tổng hợp một cách liên tục dưới sự xúc tác của Pol III (hình 2.3).

Bảng 2.1. **Tóm tắt các enzym và protein tham gia trong các giai đoạn sao chép - sinh tổng hợp ADN**

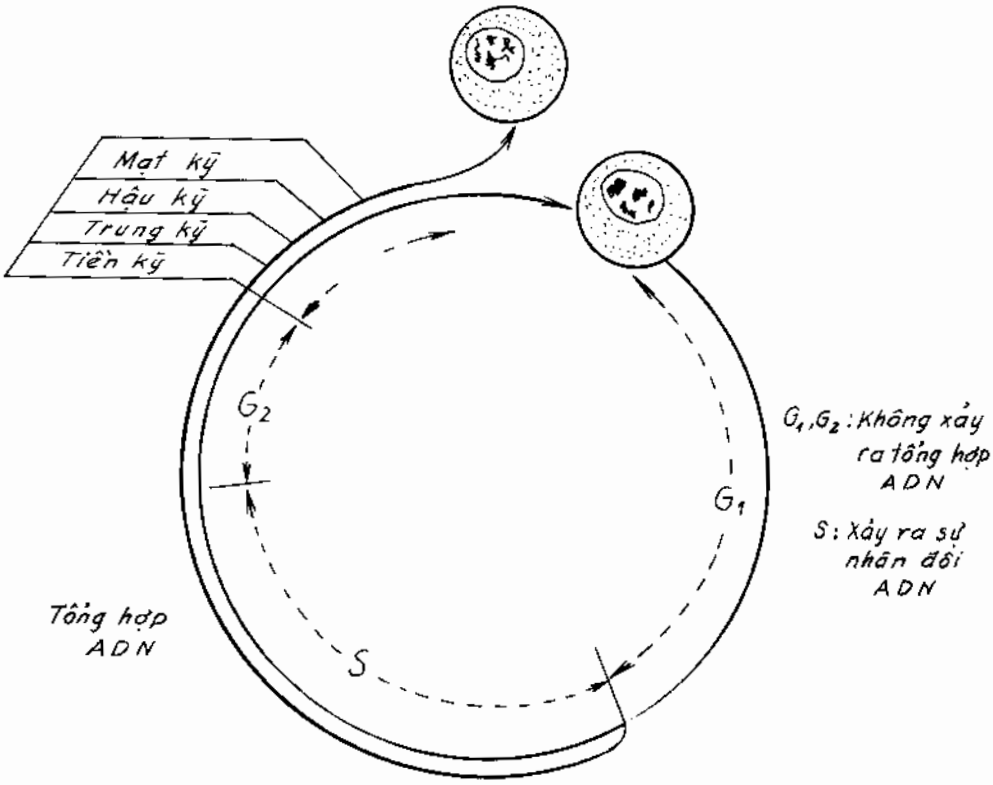
Giai đoạn mở đầu	Giai đoạn kéo dài	Giai đoạn kết thúc
ADN helicaza (Dna A, B, C) ADN gyraza (topoisomeraza) ARN primaza (ADN G) Protein dính sợi đơn (SSB) - Các enzym và protein này làm nhiệm vụ cởi xoắn kép, ổn định cấu trúc sợi đơn tách ra và gắn được ARN primaza vào sợi khuôn ADN để tổng hợp đoạn ngắn ARN mồi.	- Pol III tổng hợp đoạn Okazaki nối tiếp ARN mồi. - Pol I với tác dụng exonucleaza tách ARN mồi và xúc tác tổng hợp ADN thế vào chỗ ARN mồi bị tách ra.	Chưa biết rõ chi tiết: - Sao chép kết thúc - Tại sao không tiếp tục sao chép nữa - ADN được tách ra như thế nào? - ARNaza phân hủy ARN mồi - Pol I có tác dụng lấp đầy các chỗ hổng do ARNaza gây ra. - ADN ligaza nối các đoạn Osaki trên mạch mồi tổng hợp

II. SINH TỔNG HỢP ADN Ở CÁC TẾ BÀO CỦA SINH VẬT NHÂN CHUẨN

Trong các sinh vật nhân chuẩn (eukaryote), sự sinh sản của tế bào là cả một quá trình sinh trưởng, phân chia theo một chu kỳ tế bào. Ở các tế bào soma (tế bào thân) chu kỳ tế bào gồm bốn giai đoạn (hình 2.4).

G, S, G_2, M ba giai đoạn đầu là giai đoạn nghỉ hay còn gọi là gian kỳ. Tiếp theo G_2 là giai đoạn M (mitosis) tế bào phân chia nguyên phân cho hai tế bào con. Sau đó các tế bào con lại bắt đầu sinh sản theo một chu kỳ tế bào

mới. Về thời gian đối với mỗi sinh vật khác nhau thì các giai đoạn và chu kỳ tế bào có khác nhau. Chu kỳ tế bào ở sinh vật nhân chuẩn điển hình thay đổi trong phạm vi: giai đoạn G_1 từ 6 - 20 giờ, giai đoạn S từ 6 - 10 giờ, giai đoạn G_2 khoảng 4 giờ và giai đoạn M khoảng 1 giờ.



Hình 2.4. **Sơ đồ vòng sinh tổng hợp ADN trong sự phân chia tế bào.**

1. Giai đoạn G_1

Các nhiễm sắc thể ít xoắn vặn hơn diễn ra hoạt động sao chép. Hoạt động này giúp cho việc tổng hợp hàng loạt các enzym và protein khác khởi đầu cho việc tổng hợp ADN để cần thiết cho việc nhân đôi nhiễm sắc thể.

2. Giai đoạn S

Giai đoạn S là giai đoạn tổng hợp ADN

- Sự sao chép - sinh tổng hợp ADN ở sinh vật nhân chuẩn cũng diễn ra như ở sinh vật nhân sơ (prokaryote) là theo kiểu nửa gián đoạn (bán bảo tồn), tạo thành từng đoạn Okazaki ngắn khoảng 100 nucleotid. Sau đó chúng nối lại với nhau thành chuỗi dài.

2.1. Các enzym và protein tham gia sao chép ADN ở giai đoạn S

a. Các enzym tham gia sao chép ADN

Các enzym ADN polymerase tham gia trong giai đoạn này gồm các loại ADN polymerase α, β, γ, δ. Chúng khác nhau nhiều về các đặc tính lý, hoá, khả năng sao chép trên những khuôn khác nhau và số lượng thay đổi tuỳ theo từng loại sinh vật (bảng 2.2).

***Bảng 2.2.* Các enzym ADN polymeraza**

Các ADN polymeraza	Chức năng
ADN polymeraza α	Tổng hợp ARN mồi (giống enzym primaza ở sinh vật nhân sơ)
ADN polymeraza β	Tổng hợp ADN, sửa chữa sai và hoàn chỉnh mạch mới sau khi các mồi ARN tách ra (giống ADN polymerase I ở sinh vật nhân sơ)
ADN polymeraza δ	Tổng hợp đoạn Okazaki nối tiếp ARN mồi (giống ADN polymerase III ở sinh vật nhân sơ)
ADN polymeraza γ	Sao chép hệ gen ở ty thể

Người ta có quan niệm chung cho rằng, polymeraza α được sử dụng để tổng hợp ARN mồi; polymeraza β là enzym sửa chữa sai sót trong quá trình sao chép, polymeraza δ tổng hợp đoạn ***Okazaki***; còn polymeraza γ thì sử dụng sao chép hệ gen ở ty thể. Ở sinh vật nhân chuẩn bậc thấp như nấm men thì các ADN polymeraza ở trong nhân giống như enzym này ở trong vi khuẩn và có đặc tính đọc sửa (proof reading)

b. Các protein tham gia sao chép ADN

Trong hệ thống sao chép ADN ở sinh vật nhân chuẩn còn có sự tham gia của nhiều protein khác nhau bên cạnh các polymeraza kể trên đó là:

- Protein kháng nguyên nhân tế bào đang phân chia (PCNA-proliferating cell nuclear antigen) có chức năng hoạt hoá polymeraza δ.

- Các nhân tố sao chép A (replication factor A-RFA) và C (RFC) có chức năng cần cho hoạt động của polymeraza α và δ.

2.2. Các giai đoạn sao chép ADN

a. Giai đoạn đầu

ADN được tháo xoắn nhờ topoisomeraza và nhân tố sao chép RFA.

b. Giai đoạn hai

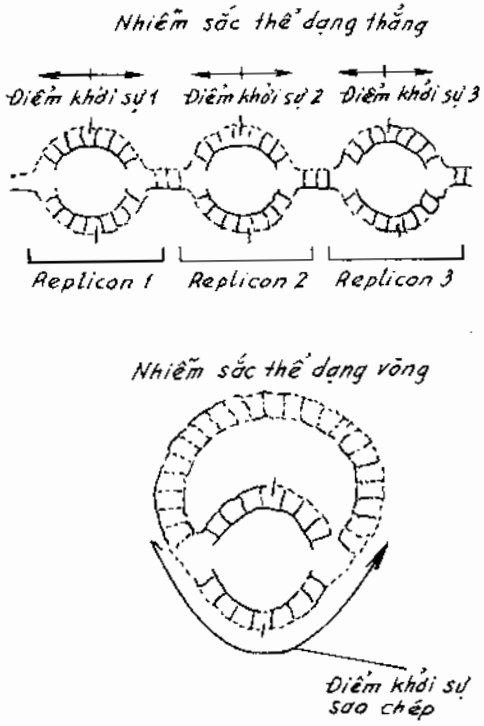
ARN mồi (độ 10 nucleotid) được tổng hợp nhờ polymeraza α và RFA. Sau đó nối dài thêm 20 nucleotid nhờ RFC.

c. Giai đoạn ba

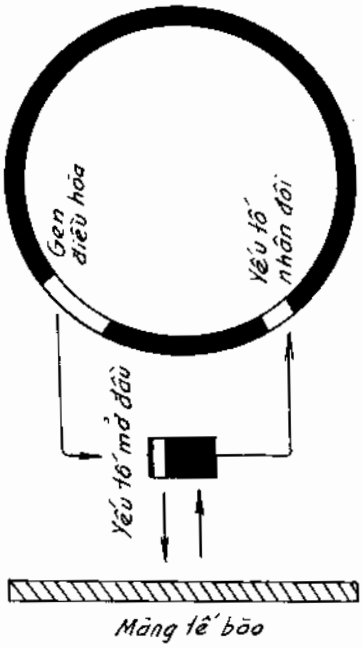
PCNA- ATP chặn polymeraza α lại và thúc đẩy polymeraza δ gắn vào tổng hợp đoạn ***Okazaki***. Polymeraza α được giải phóng sang mạch đối diện tổng hợp liên tục mạch mới.

2.3. Các replicon

Ở nhiễm sắc thể của tế bào sinh vật nhân chuẩn, quá trình sao chép



Hình 2.5a. **Sự sao chép ADN ở sinh vật nhân chuẩn và sinh vật nhân sơ**



Hình 2.5b. **Replicon của vi khuẩn**

ADN xảy ra trên nhiều đơn vị sao chép gọi là replicon. (hình 2.5a). Mỗi replicon có một điểm khởi đầu và hai điểm kết thúc và chứa khoảng 100-200kb ở người. Đối với sinh vật nhân chuẩn nhiễm sắc thể chứa nhiều đơn vị sao chép như vậy là cần thiết để kịp thời nhân đôi một số lượng khổng lồ ADN trước lúc phân chia trong khi đó ở *E.coli* chỉ có một điểm khởi đầu sao chép duy nhất trên nhiễm sắc thể và sao chép diễn ra hai chiều ngược nhau xuất phát từ điểm đó (hình 2.5b).

Ở người có từ 20 đến 30.000 điểm khởi đầu sao chép. Tế bào Hela có tới 100 đơn vị sao chép. Tốc độ sao chép khoảng 1.000 đến 15.000 nucleotid trong một phút. Đoạn ADN giàu các bazơ GC được sao chép trước, còn ADN giàu AT được sao chép sau trong giai đoạn S.

- Phân tử ADN sau khi được sao chép thì chỉ vài phút sau được tổ chức thành nucleosom trong đó có mặt các loại histon cũng vừa mới được tổng hợp ra. Và sau đó khó phân biệt giữa thể nhiễm sắc vừa sao chép với thể nhiễm sắc chưa sao chép.

3. Ở giai đoạn G_2

Giai đoạn G_2 là giai đoạn kết đặc nhiễm sắc thể. Kết đặc là quá trình cuộn xoắn nhiễm sắc thể ở mức độ cao hơn để chuẩn bị cho nguyên phân. Đồng thời ở giai đoạn này cũng tổng hợp ra nhiều tubulin. Các tubulin được trùng hợp hoá để tạo ra vi ống của bộ các thoi phân nhiễm.

4. Ở giai đoạn nguyên phân

Giai đoạn nguyên phân (M = mitosis) là giai đoạn phân chia tế bào thành hai tế bào con giống hệt nhau về mặt di truyền. Khi nguyên phân bắt đầu thì sự tổng hợp giảm đi sau đó dừng lại ở kỳ giữa và rồi lại tiếp tục ở kỳ cuối. Sở dĩ có hiện tượng trên vì lúc đầu do kết đặc cao nên thiếu những điểm khởi đầu sao chép, rồi màng nhân, hạch nhân cũng bị vỡ.

III. SỰ SỬA CHỮA SAI SÓT TRONG QUÁ TRÌNH SAO CHÉP - SINH TỔNG HỢP ADN

Sự sửa chữa trong quá trình sao chép ADN là để đảm bảo tính ổn định của ADN. Tính ổn định của ADN là kết quả của hai quá trình sao chép và sửa sai.

- Người ta thấy rằng quá trình sao chép ADN ở *E. coli* sai lầm chỉ ở 10^{-9} - 10^{-10} nucleotid, mà ở *E. coli* có $4,5.10^6$ cặp base, nên sự sao chép ADN xảy ra ở 10.000 tế bào, mới có sai sót một nucleotid.

- Một thông tin khác trong quá trình sinh tổng hợp ADN cho biết trên các mạch tổng hợp mới, tỷ lệ sai sót chỉ khoảng 10^{-8} - 10^{-9}. Lúc đầu người ta tưởng sự chính xác đó là do sự kẹp đôi chính xác của các bazơ khi sao chép. Nhưng thực chất sự kẹp đôi, chính xác đó cũng chỉ ở mức sai sót 10^{-5} - 10^{-6}.

- Mặt khác người ta biết ADN polymeraza III có tỷ lệ sai sót là 10^{-4}

Từ những thông tin trên sở dĩ có sự sai khác nói trên là do ADN polymeraza có khả năng nhận biết các sai sót của mình và lập tức sửa sai nên mới có sự sai sót xảy ra ở mức độ rất thấp; enzym ADN polymeraza vừa có hoạt tính tổng hợp (từ đầu 5') vừa có hoạt tính phân hủy (từ đầu 3'). Nhờ hoạt tính phân hủy (tức là hoạt tính exonucleaza), nó loại bỏ ngay nucleotid bị gắn nhầm và nhờ hoạt tính tổng hợp (tức là hoạt tính polymeraza) nó gắn ngay vào bằng nucleotid đúng của nó. Đó là sự sửa chữa tức thời các sai sót nêu trên.

1. Các tác nhân sinh, lý, hoá gây thương tổn ADN

Có nhiều tác nhân gây thương tổn ADN.

- Thương tổn do bổ sung đôi bazơ nhầm trong quá trình sao chép như đã nói ở trên. Ở *E. coli* sự kẹp đôi chính xác cũng như ở mức độ sai sót khoảng 10^{-5}-10^{-6}.

- Thương tổn do nhiệt độ làm gãy liên kết N - glycosyl deoxyriboza do đó phân tử purin tách khỏi ADN. Người ta tính mỗi ngày trên mỗi tế bào người có tới 5.000 bazơ purin bị tách ra theo kiểu thương tổn này.

- Thương tổn do tia tử ngoại khử amin của các bazơ như biến cytosin thành Uracil, adenin thành hypoxantin, guamin thành xantin. Sự khử amin của cytosin thành uracil xảy ra với tỷ lệ khoảng 100 bazơ / 1 gen/ 1 ngày. Tia tử ngoại của ánh sáng mặt trời còn gây ra sự dime hoá hai thymin cạnh nhau: C_5 - C_5 và C_6 - C_5 tạo thành hai liên kết đồng hoá trị. Điều này làm thymin mất khả năng tham gia liên kết với các adenin của mạch bổ sung. Ngoài T = T ra ánh sáng mặt trời còn gây ra liên kết dime T = C, C = C nữa.

- Thương tổn do các tia vũ trụ và phóng xạ có năng lượng cao gây trực tiếp cắt đứt các mạch làm biến đổi các bazơ hoặc gây gián tiếp bằng cách tạo

ra các ion superoxide O^- có hoạt tính rất cao. Chính các ion này mới đi vào bắn phá các gen.

- Thương tổn do các tác nhân hoá học thì rất đa dạng.

• Chẳng hạn như acid nitơ (HNO_2) và các tiền chất của nó như $NaNO_3$, $NaNO_2$, Nitrosamin gây sự khử amin của các bazơ có amin như adenin, guanin, cytosin để thành hypoxantin, xantin, uracil tương ứng.

• Sản phẩm chuyển hoá của tế bào ví dụ như ion H^+ và chuyển động nhiệt có thể loại ra đến 10.000 bazơ purin/ 1 tế bào / 1 ngày/ 1 người.

• Những chất alkyl hoá như dimethyl sulfat có thể methyl hoá guanin thành 6 - oxymethyl guanin.

• Các chất tương tự bazơ như 5 - bromouracyl, 2-aminopurin... dễ gây sự nhầm lẫn cho ADN polymeraza cặp nhầm trong quá trình tổng hợp.

• Thương tổn cồng kềnh do xuất hiện các mạch cácbon dài như benzopyren làm méo mó, biến dạng sự xoắn kép trên phân tử ADN.

• Thương tổn ADN có thể do hoá chất có khả năng gắn vào giữa các bazơ của phân tử ADN hay trực tiếp tạo các liên kết cộng hoá trị giữa hai mạch đơn *v.v...*

2. Các hệ thống sửa chữa thương tổn và cơ chế sửa chữa

2.1. Hệ thống phòng ngừa các tác hại vào gen

• Enzym superoxyt dismutaza phân hủy các ion superoxyd (O^-)

• Hệ thống điều hòa cân bằng acid - bazơ thì phân hủy các ion H^+

• Hệ thống khử như $NADPH_2$, glutathion, sinh tố E, A, C thì sẽ phá bỏ các phản ứng oxy hoá có hại.

• Hệ thống gan thận thì tham gia khử được và loại bỏ nhiều hoá chất gây độc.

2.2. Hệ thống sửa chữa các thương tổn trong ADN

Để sửa chữa các thương tổn trong ADN, tế bào có hàng loạt các enzym, protein tham gia. Ở *E. coli* người ta biết có bốn hệ thống sửa chữa, đó là:

a. Hệ thống sửa chữa 1

Sửa chữa bổ sung đôi bazơ không đúng trong quá trình sao chép. Hệ

này gồm 9 enzym và protein như: dime methylaza, ADN helicaza II, ADN polymeraza III, exonucleaza I, ADN ligaza, protein Mut-H, protein Mut L, protein Mut S, protein SSB.

b. Hệ thống sửa chữa 2

Sửa chữa từng bazơ bất thường có nghĩa là khi thiếu một bazơ (như purin bị khử chính tác dụng của nhiệt chẳng hạn) hoặc xuất hiện các bazơ không bình thường xanthin, hypoxanthin, sự alkyl hoá các bazơ, sự tạo thành dime pyridin do tác dụng tử ngoại. Tham gia sửa chữa hệ thống này có bốn enzym: ADN glycosylaza, AP endonuclaza, ADN polymeraza I, ADN ligaza.

c. Hệ thống sửa chữa 3

Sửa chữa cả một đoạn cấu trúc của ADN. Tham gia sửa chữa hệ thống này có ba enzym chính ABC exonucleaza, ADN polymeraza I, ADN ligaza.

d. Hệ thống sửa chữa 4

Sửa chữa trực tiếp đối với thương tổn dime thymidin do tác động tia tử ngoại và thương tổn guanin bị biến đổi tạo thành G- O - methyl guamin do đột biến bởi hoá chất. Đột biến này hay xảy ra nhất.

Tham gia sửa chữa hệ thống này có các enzym ADN photolyaza, enzym G - O - methylguanin - ADN methyltransferaza.

* Enzym photolyaza, trọng lượng phân tử 54.000 dùng năng lượng nhận được từ hấp thụ ánh sáng, có hai cofacteur là 5,10 - methyltetrahydrofolat và $FADH_2$. Dạng kích thích của $FADH_2$ sẽ chuyển một điện tử đến thymidin dime và liên kết.

* Còn enzym methyltransferaza thì xúc tác sự vận chuyển nhóm methyl của G - O - methylguanin đến nhóm cystein của một phân tử protein. Do đó làm mất nhóm methyl của guanin.

2.3. Chú ý

1. Ngoài ra tế bào còn có một cơ chế đối phó đối với các thương tổn ào ạt trước sự tấn công của môi trường. Cơ chế này gọi là cơ chế sửa chữa khẩn cấp SOS. Nghiên cứu sự trả lời khẩn cấp SOS ở *E. coli* người ta thấy các dấu hiệu tăng sao chép hơn 15 gen khác nhau có chứa các thông tin sửa chữa ADN. Sản phẩm protein của các gen này là RecA, RecB, RecC, RecF, RecJ, RecK...

2. Sự hiểu biết về các hệ thống sửa chữa ở sinh vật nhân chuẩn còn hạn chế. Song biết chắc cũng có những điểm tương đồng với hệ thống sửa chữa ở *E. coli*.

3. Mặc dù hệ thống sửa chữa sai sót hoạt động rất hiệu quả nhưng đôi khi ADN cũng chịu nhiều biến động vượt ra ngoài tầm kiểm soát của hệ thống sửa chữa sai sót làm cho hệ thống bất lực để xảy ra đột biến như trong trường hợp 5 - methyl cytosin desamin, người ta biết không có một glycosylaza nào có khả năng nhận biết sai sót để loại bỏ và khi sao chép bazơ này nó nhận biết như một thymin.

Mặt khác hiện tượng tái tổ hợp và sự tồn tại các gen nhảy cũng đều làm cho ADN mất ổn định, thông tin di truyền thay đổi. Sự biến đổi của ADN này có thể xảy ra ở cả tế bào sinh dưỡng lẫn tế bào sinh dục. Nếu biến đổi xảy ra ở tế bào sinh dục thì lại được di truyền lại cho thế hệ sau.

CHƯƠNG III

SỰ PHIÊN MÃ-SINH TỔNG HỢP ARN

Sự phiên mã - sinh tổng hợp ARN là những quá trình chuyển thông tin di truyền từ phân tử ADN sang phân tử ARN. Bản chất hoá học của quá trình này và quá trình sinh tổng hợp ADN rất giống nhau nhưng chúng lại mang một ý nghĩa sinh học khác biệt.

- Sự giống nhau giữa sinh tổng hợp ARN với sinh tổng hợp ADN là:

+ Chiều của tổng hợp là 5'-3'

+ Năng lượng tổng hợp nhờ thuỷ phân ATP.

- Sự khác nhau giữa hai quá trình sinh tổng hợp đó lại là:

+ Khuôn ADN được bảo tồn trong quá trình tổng hợp ARN.

+ ARN polymeraza không có hoạt động của nucleaza.

+ Quá trình sinh tổng hợp ARN không có sự có mặt của chất mồi.

+ Quá trình sinh tổng hợp ADN có tính ổn định cao, đảm bảo việc truyền đạt nguyên vẹn bộ gen, trong khi đó sự sinh tổng hợp ARN lại liên quan đến tính đa dạng và biến động trong sự biểu hiện các tính trạng di truyền.

Giữa tế bào ở sinh vật nhân sơ và tế bào ở sinh vật nhân chuẩn, quá trình tổng hợp ARN cũng có khác nhau. Tuy đều gồm ba giai đoạn: khởi động, kéo dài và kết thúc, nhưng sự khác nhau lại là:

- Bộ gen tế bào ở sinh vật nhân sơ nằm tự do trong tế bào chất, còn bộ gen tế bào ở sinh vật nhân chuẩn thì nằm trong nhân được bao bọc bởi màng nhân.

- Các yếu tố tham gia vào quá trình khởi động, kéo dài và kết thúc ở các tế bào khác nhau.

- Enzym tổng hợp tế bào ở sinh vật nhân sơ chỉ có một loại enzym là ARN polymeraza, còn ở sinh vật nhân chuẩn có tới ba enzym.

- Ở sinh vật nhân chuẩn mARN tạo ra không hoạt động ngay như là mARN ở sinh vật nhân sơ - mà phải qua một loạt biến đổi mới thể hiện chức năng hoạt động của mình.

- mARN của sinh vật nhân chuẩn chỉ mã hoá cho một protein còn mARN của sinh vật nhân sơ có nhiều đoạn trình tự và mỗi đoạn trình tự lại mã hoá cho một protein.

Dưới đây là chi tiết của quá trình sinh tổng hợp ARN ở mỗi loại tế bào của sinh vật nhân sơ và tế bào của sinh vật nhân chuẩn[1].

I. SINH TỔNG HỢP ARN Ở SINH VẬT NHÂN SƠ

1. Một số đặc điểm về enzym ARN polymeraza

1. ARN được tổng hợp trên một mạch đơn của ADN cởi xoắn theo nguyên tắc bổ sung đôi bazơ. enym ARN polymeraza tham gia quyết định việc tổng hợp ra ARN trên khuôn ADN.

2. ARN được tổng hợp ra chỉ trên một trong hai mạch ADN dùng làm khuôn. Đầu tiên là gắn một trình tự đặc biệt trên mạch chọn làm khuôn, trình tự đó gọi là promotơ.

Sự phiên mã diễn ra theo chiều xác định (5'-3'). Chiều di chuyển của ARN polymeraza sẽ quyết định mạch đơn nào sử dụng để phiên mã.

Như vật chuỗi thứ hai đóng vai trò gì trong chuỗi thứ nhất đang bị sao chép. Chúng ta không thể nói rằng, chuỗi thứ hai đó không hoạt động. Người ta đã chúng minh rằng, ARN được tổng hợp nhờ enzym ARN polymeraza dưới sự hướng dẫn của ARN tự nhiên có thể nhanh chóng tổng hợp protein trong hệ thống vô bào. Nhưng ngược lại, ARN thu được khi sử dụng ADN biến tính hoặc ADN một chuỗi làm khuôn thì nói chung hoạt động rất yếu trong quá trình tổng hợp protein. Như vậy chuỗi thứ hai của phân tử ADN tuy không bị sao chép nhưng sự có mặt của nó trong chuỗi có tác dụng là cái khung để giữ cho chuỗi kia được sao chép tạo ra ARN hoạt động. Như vậy

---

[1] Từ đây trở đi, các thuật ngữ sinh vật nhân sơ (prokaryote) và sinh vật nhân chuẩn (eukaryote) tác giả gọi tắt là nhân sơ và nhân chuẩn – *BTV*.

cấu trúc phân tử ARN vẫn tồn tại dạng hai chuỗi nhưng chuỗi ra là quan trọng đối với việc tạo ra ARN có hoạt tính sinh học. Hình 3.2 và 3.3 trình bày sơ đồ cơ chế tổng hợp ARN trên khuôn một chuỗi của ADN xoắn kép trong tế bào và chỉ ra chỗ mở đầu trong chuỗi ADN được sao chép.

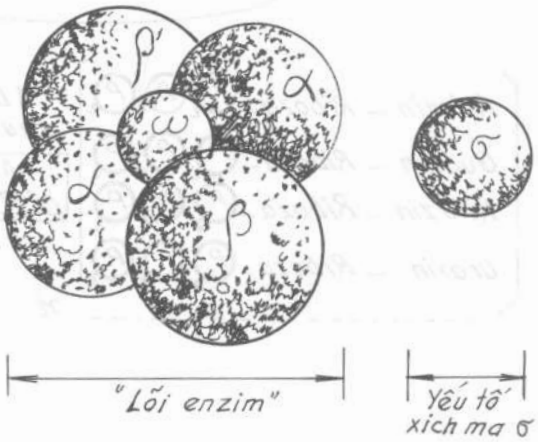
3. Sự phiên mã tuy có mang tính chất chính xác cao song ARN polymeraza không có cơ chế sửa sai đi kèm nên độ chính xác vẫn kém xa so với quá trình sao chép. Cũng may mắn là ARN được phiên mã không bao giờ sao chép lại nên có sai sót cũng không thể ảnh hưởng đến thế hệ sau.

4. Enzym ARN polymeraza ở đây còn gọi là ARNpolymeraza phụ thuộc ADN (vì có phiên mã trên khuôn ADN). Enym này tổng hợp cả ba loại ARN (mARN, tARN, và rARN).

5. Cấu trúc của phân tử ARN polymeraza có cấu trúc bậc bốn cực kỳ phức tạp, hằng số lắng 15S và gồm năm chuỗi polypeptit. Đó là:

Chuỗi β' (beta phẩy)	trọng lượng phân tử	160.000
Chuỗi β (beta)	trọng lượng phân tử	150.000
Chuỗi α (alpha)	trọng lượng phân tử	40.000
Chuỗi ω (ômega)	trọng lượng phân tử	10.000
Chuỗi σ (xích ma)	trọng lượng phân tử	90.000

Các chuỗi này hợp nhất lại với nhau bằng các liên kết năng lượng yếu như liên kết hydro, liên kết ion, liên kết Van der Van (Van der Waals). Trong phân tử enzym ARN polymeraza có hai chuỗi (α) và công thức cấu tạo tắt là: (β', β, ω, α_2, σ) trọng lượng phân tử vào khoảng 500.000 dalton. Chuỗi σ dễ dàng tách khỏi phức hợp trên. Nhóm đặc hiệu của enzym là (β', β, ω, α_2) gọi là "lõi enzym", làm nhiệm vụ xúc tác tạo thành liên kết photphođieste giữ các nucleotid

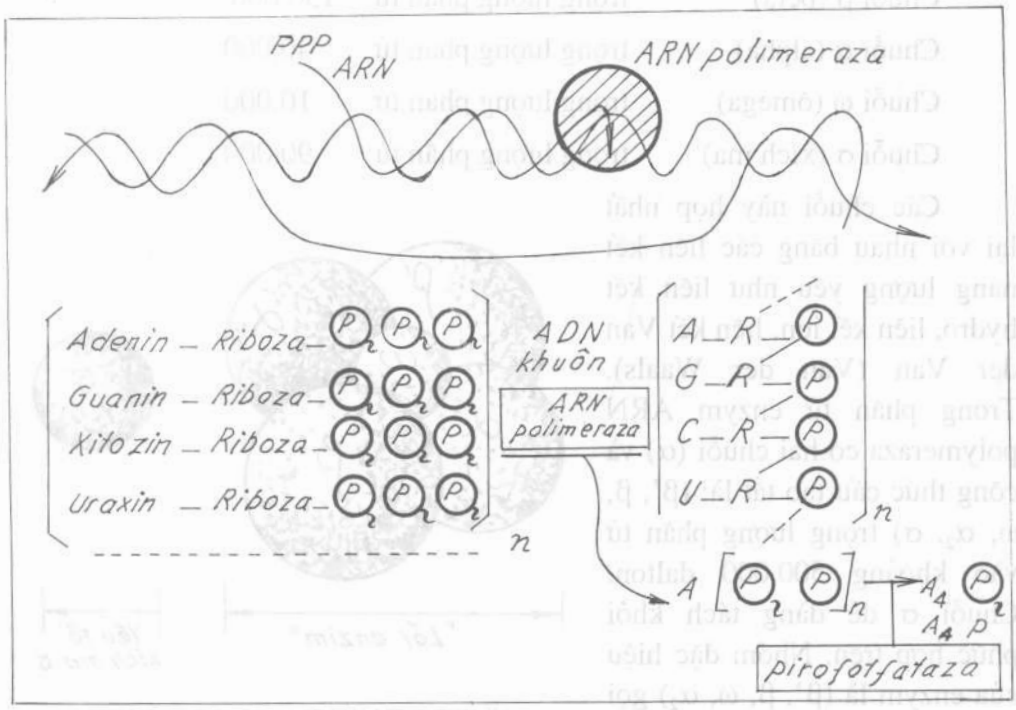


Hình 3.1. **Trình bày một phân tử ARN polymeraza gồm năm đơn vị nhỏ tạo nên lõi enzym và yếu tố xích ma tham gia trong mở đầu các chuỗi của quá trình phiên mã.**

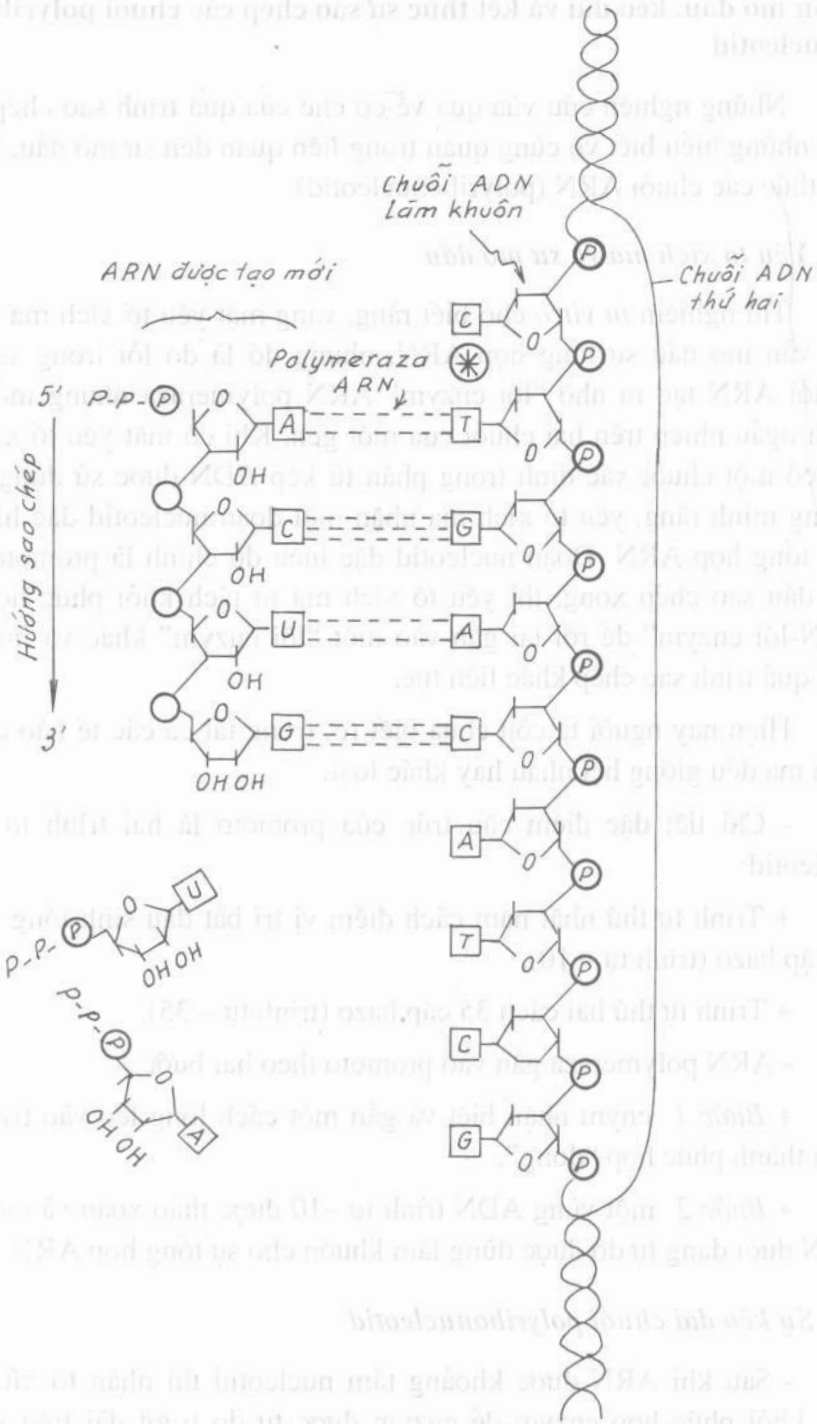
ngay cả khi vắng mặt yếu tố xích ma (σ). Phân tích chi tiết hơn nữa, người ta thấy rằng enzym này làm được nhiệm vụ xúc tác tối thiểu chỉ cần hai loại chuỗi chủ yếu là α và β (hình 3.1).

Một cấu trúc khác có bản chất hoá học là protein, gọi là yếu tố rô (ρ). Nó hình như không liên kết với ARN polymeraza và tham gia trong mở đầu các chuỗi của quá trình kết thúc các chuỗi polynucleotid đã được chiết ra từ dịch chiết *E.coli*.

6. Sơ đồ tổng hợp ARN trên khuôn ADN nhờ ARN polymeraza: tất cả các ARN tế bào, bất cứ có chức phận gì đều là sản phẩm của sự sao chép di truyền. Cơ chế của quá trình đó rất phổ biến: một enzym là ARN polymeraza có mặt ở tất cả các cơ thể có tế bào, xúc tác bốn triphotphat nucleotid thành ARN, nhưng cấu trúc ARN đó thì in hình trên một trong hai chuỗi của ADN (hình 3.2 và 3.3).



Hình 3.2. **Sơ đồ tổng hợp ARN trên khuôn ADN nhờ enzym ARN polimeraza.**



Hình 3.3. **Sơ đồ trình bày cơ chế tổng hợp ARN trên khuôn một chuỗi của ADN xoắn kép trong tế bào. Vị trí hoa thị (*) chỉ nơi mở đầu trong chuỗi ADN được sao chép.**

2. Sự mở đầu, kéo dài và kết thúc sự sao chép các chuỗi polyribonucleotid

Những nghiên cứu vừa qua về cơ chế của quá trình sao chép đã mang đến những hiểu biết vô cùng quan trọng liên quan đến sự mở đầu, kéo dài và kết thúc các chuỗi ARN (polyribonucleotid)

2.1. Yếu tố xích ma và sự mở đầu

Thí nghiệm *in vitro* cho biết rằng, vắng mặt yếu tố xích ma có thể đôi khi vẫn mở đầu sự tổng hợp ARN, nhưng đó là do lỗi trong sự mở đầu. Chuỗi ARN tạo ra nhờ "lõi enzym" ARN polymeraza nhưng mở đầu một cách ngẫu nhiên trên hai chuỗi của một gen. Khi có mặt yếu tố xích ma thì chỉ có một chuỗi xác định trong phân tử kép ADN được sử dụng. Điều đó chứng minh rằng, yếu tố xích ma nhận một đoạn nucleotid đặc hiệu để mở đầu tổng hợp ARN. Đoạn nucleotid đặc hiệu đó chính là promotơ. Sau khi mở đầu sao chép xong, thì yếu tố xích ma tự tách khỏi phức hợp "ADN-ARN-lõi enzym" để rồi lại gắn vào một "lõi enzym" khác và mở đầu cho một quá trình sao chép khác liên tục.

Hiện nay người ta còn chưa biết rõ, trong tất cả các tế bào các yếu tố xích ma đều giống hệt nhau hay khác loại.

- Chi tiết đặc điểm cấu trúc của promotơ là hai trình tự gồm sáu nucleotid:

+ Trình tự thứ nhất nằm cách điểm vị trí bắt đầu sinh tổng hợp ARN 10 cặp bazơ (trình tự – 10).

+ Trình tự thứ hai cách 35 cặp bazơ (trình tự – 35).

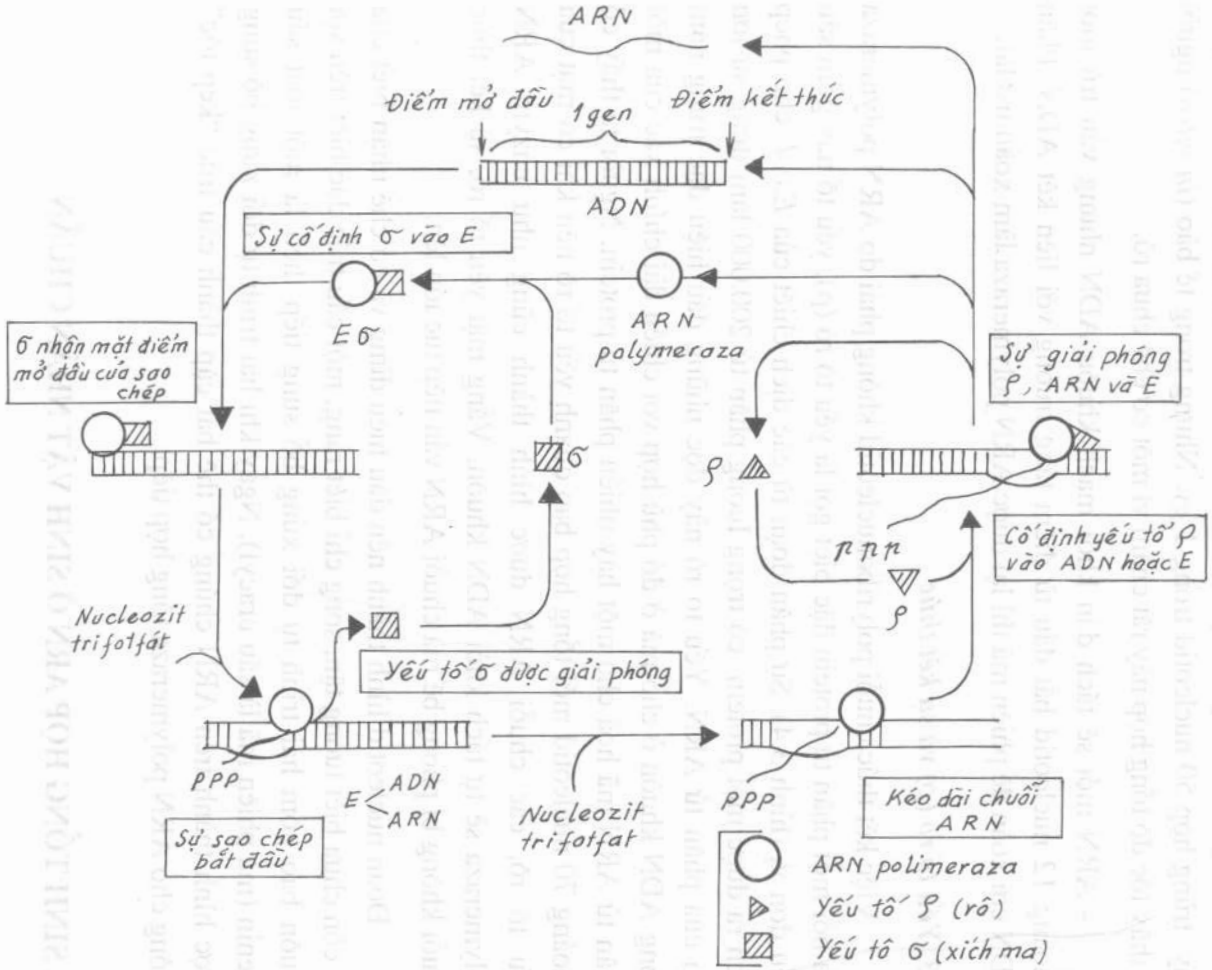
- ARN polymeraza gắn vào promotơ theo hai bước:

+ *Bước 1:* enym nhận biết và gắn một cách lỏng lẻo vào trình tự –35 hình thành phức hợp "đóng".

+ *Bước 2:* một vùng ADN trình tự –10 được tháo xoắn và một sợi đơn ADN dưới dạng tự do được dùng làm khuôn cho sự tổng hợp ARN.

2.2. Sự kéo dài chuỗi polyribonucleotid

- Sau khi ARN được khoảng tám nucleotid thì nhân tố xích ma (σ) tách khỏi phức hợp enzym để enzym được tự do trượt dài trên sợi khuôn ADN với nhân tố kéo dài (EF) tham gia.



Hình 3.4. **Sơ đồ tổng hợp ARN nhờ enzym ARN polimeraza và các yếu tố xích ma và rô.**

- Giai đoạn này, tiếp sau giai đoạn mở đầu làm cho chuỗi ARN lớn lên theo hướng 5'-3' thì được đảm bảo bởi "lõi enzym" ARN polymeraza. Người ta đã chứng minh rằng, trong điều kiện tối đa một phân tử của "lõi enzym" này trùng hợp 50 nucleotid trong 1 *gy*. Nhưng trong tế bào (*in vitro*) người ta thấy tốc độ tổng hợp này rất chậm vì một cơ chế chưa rõ.

- ARN mới sẽ tách dần khỏi mạch khuôn ADN nhưng vẫn trừ một khoảng 12 nucleotid bắt đầu từ điểm tăng trưởng với liên kết ADN. Phần ADN cởi xoắn để phiên mã thì lại được ARN polymeraza làm xoắn trở lại.

2.3. Yếu tố rô (ρ) và sự kết thúc

Việc kết thúc chuỗi polyribonucleotid không phải do ARN polymeraza mà bởi một phân tử protein đặc biệt gọi là yếu tố rô (ρ), yếu tố này gồm sáu tiểu đơn vị (hình 3.4). Sự phân đoạn từ các dịch chiết của *E.coli* cho phép tách ra được một protein có trọng lượng phân tử 200.000 làm dừng sự lớn lên của phân tử ARN. Yếu tố rô này đọc những dấu hiệu đặc trưng nằm trong ADN khuôn ở chỗ mà ở đó phù hợp với chiều dài chính xác của một phân tử ARN mã hoá cho một hay nhiều phân tử protein. Người ta thấy có khoảng 70 nucleotid mới tổng hợp bao quanh yếu tố rô nên khi có mặt của yếu tố rô, các chuỗi ARN được hình thành cũng như enzym ARN polymeraza sẽ tự tách khỏi ADN khuôn. Vắng mặt yếu tố rô, sự kết thúc chuỗi không bị phong bế mà chuỗi ARN vẫn tiếp tục lớn lên.

Đoạn nucleotid hình thành nên dấu hiệu dừng và cơ chế nhận biết của nó còn chưa biết tường tận, song chỉ biết rằng, một cấu trúc đặc biệt trên sợi khuôn bao gồm hai trình tự đối xứng bổ sung tiếp theo là một loạt sáu adenin (mà phiên mã là sáu uracyl). Ngay khi hai trình tự đối xứng bổ sung được hình thành trên ARN chúng có thể bắt cặp thành cấu trúc "kẹp tóc" không cho ARN polymeraza tổng hợp tiếp.

II. SINH TỔNG HỢP ARN Ở SINH VẬT NHÂN CHUẨN

1. Một số đặc điểm cần phân biệt

1.1. Phân biệt một số đặc điểm phiên mã giữa nhân sơ và nhân chuẩn

Bảng 3.1. **Một số đặc điểm phiên mã**

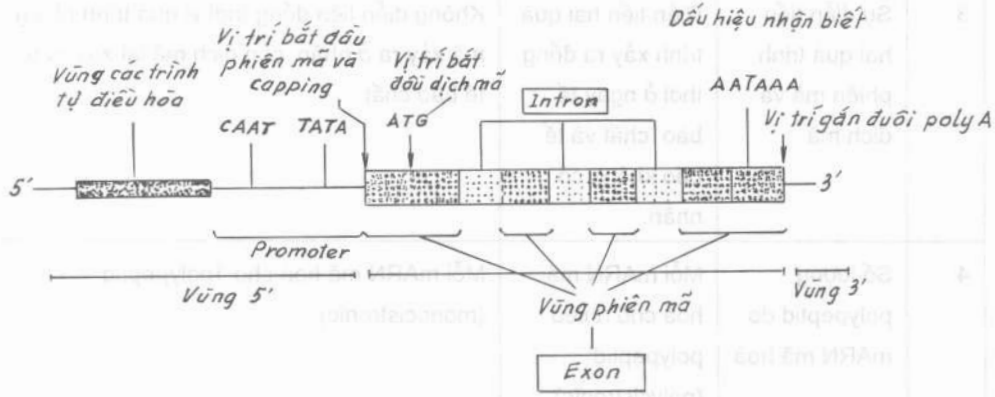
STT	Các đặc điểm	Nhân sơ	Nhân chuẩn
1	Enym tổng hợp ARN, ARN polymeraza (ARN pol)	Chỉ có một loại ARN polymeraza phiên mã cho cả ba loại gen rARN, mARN và tARN	Có ba loại ARN polymeraza phiên mã cho cả ba loại gen khác nhau: -ARN *pol I* cho các gen rARN -ARN *pol II* cho các gen mARN -ARN *pol III* cho các gen tARN và 5S ARN
2	Các mARN và rARN	Các mARN, rARN vừa phiên mã ra là được tham gia vào dịch mã	Các mARN, rARN hình thành trong nhân dưới dạng tiền thân. Sau đó cần có một số biến đổi hoá học để hoàn thiện rồi mới chuyển ra tế bào chất để tham gia vào dịch mã
3	Sự diễn tiến hai quá trình phiên mã và dịch mã	Diễn tiến hai quá trình xảy ra đồng thời ở ngay tế bào chất và tế bào không có nhân.	Không diễn tiến đồng thời vì quá trình phiên mã xảy ra ở nhân, còn dịch mã lại xảy ra ở tế bào chất .
4	Số lượng polypeptid do mARN mã hoá	Mỗi mARN mã hoá cho nhiều polypeptid (polycistronic)	Mỗi mARN mã hoá cho 1polypeptid (monocistronic)
5	Tính đáp ứng của sự phiên mã	Đáp ứng ngay	Không đáp ứng ngay tức thời với điều kiện ngoại cảnh do cấu trúc phức hợp histon protein quá bền chặt, buộc phải trải qua quá trình biến đổi dài mới lỏng lẻo để hoạt động được.

1.2. Phân biệt chức năng các vùng của gen phiên mã

Gen thường gặp nhất mã hoá cho một protein gồm ba vùng là vùng 5', vùng được phiên mã và vùng 3' được phân biệt các chức năng như sau (hình 3.5).

Bảng 3.2. Chức phận ba vùng gen

STT	Vùng gen	Chức năng
1	Vùng 5'	Có đoạn điều hoà hoạt động gen và đoạn hoạt hoá sự phiên mã (vùng promotơ có hộp TATA)
2	Vùng được phiên mã	Có các intron và exon: - *intron* được phiên mã nhưng bị loại bỏ trong quá trình hoàn thiện sợi mARN - *exon* được phiên mã và tạo thành mARN ở tế bào chấtđể dịch thành protein.
3	Vùng 3'	Chưa rõ chức năng, có một gen vùng này mang tính điều hoà chuyên biệt



Hình 3.5. Sơ đồ một gen mã hoá một protein

*** Capping: phản ứng gắn một 7-metyl guanin vào nucleotide đầu tiên của mọi mRNA.**

2. Các giai đoạn mở đầu, kéo dài và kết thúc phiên mã

2.1. Giai đoạn mở đầu

ARN polymeraza II muốn hoạt động phiên mã được phải gắn với nhiều yếu tố phiên mã (transcription factor - TF) có bản chất protein đó là:

* Đầu tiên là $TF_{II}IID$ nhận biết và gắn vào trình tự hộp TATA- mà hộp này nằm trước vị trí bắt đầu phiên mã độ 25-35 nucleotid (ở một số gen hộp này được thay thế bằng trị giàu GC) rồi lại gắn tiếp TF-IIA

* Lúc đó enzym ARN polymeraza II lại liên kết với TF-IIB để gắn vào được phức hợp trên- phức hợp TFIID- TFIIA.

* ADN được tách thành hai mạch nhờ năng lượng từ ATP phân giải ra.

* Cuối cùng nhân tố TFIIE cho phép enzym khởi động sự phiên mã.

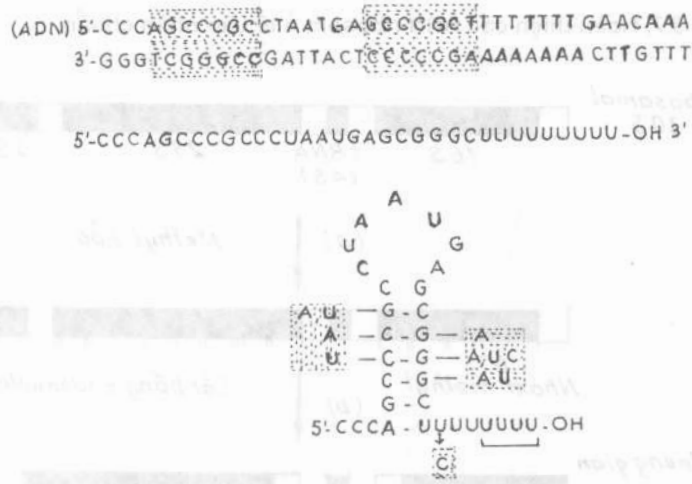
2.2. Giai đoạn kéo dài

Enzym ARN polymeraza II di chuyển trên mạch khuôn ADN nhờ nhân tố TFIIS để tổng hợp phân tử ARN.

2.3. Giai đoạn kết thúc

- Sự phiên mã kết thúc trước điểm gắn đuôi polyA còn xa.

Hình như kết thúc có liên quan đến những cấu trúc dạng "kẹp tóc" tiếp sau trình tự giàu GC (hình 3.6).



Hình 3.6. **Trình tự trên là một trình tự kết thúc trên phân tử ADN. Trình tự giữa là ARN, sản phẩm phiên mã của trình tự trên. Cấu trúc dưới là sự cuộn gấp của trình tự ARN trên tạo thành dạng "kẹp tóc".**

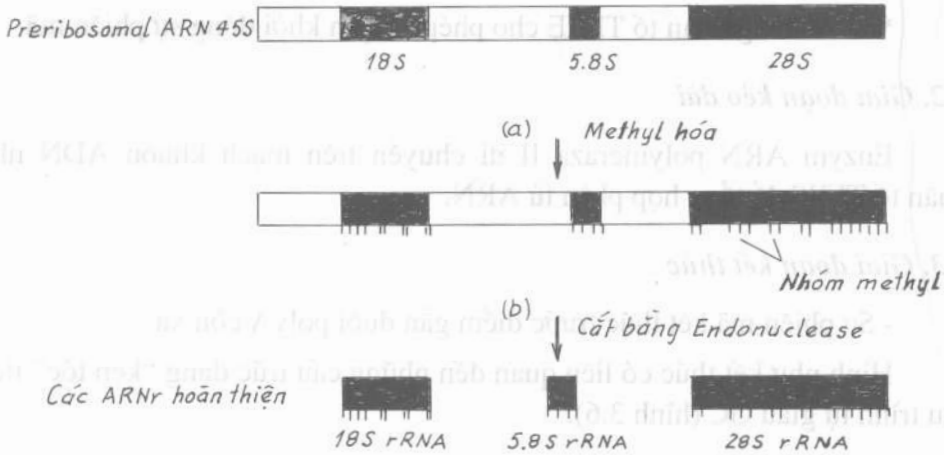
3. Các chất ức chế sự tổng hợp ARN

- α Manitin ức chế ARN polymeraza các loại- còn ở tế bào nhân sơ thì

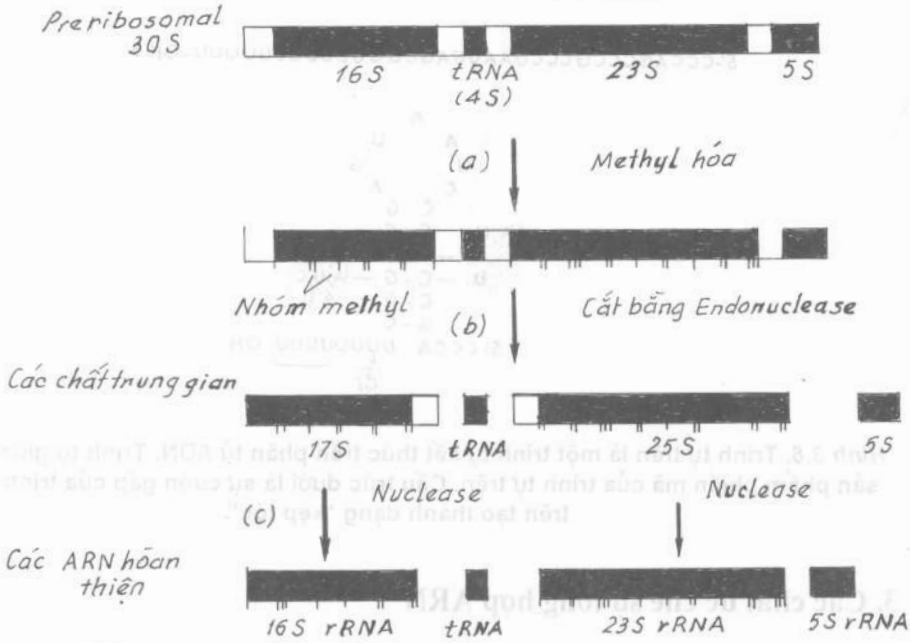
tác nhân ức chế là rifampicin.

- Actomycine D chứa nhân phenoxazon chêm vào hai bazơ guanin và cytosin gây biến dạng khuôn, làm ngăn trở tổng hợp ARN.

4. Sự hoàn thiện ARN ribosom



Hình 3.7. **Hoàn thiện các ARN ribosom ở tế bào nhân chuẩn**



Hình 3.8. **Hoàn thiện các ARN ribosom và ARNt ở tế bào nhân sơ**

Ở tế bào nhân chuẩn sau phiên mã tạo thành preribosom ARN 45S. Phân tử này được methyl hoá tới hơn 100 nhóm tạo ra các rARN 18S, 58S và 28S. Các rARN này sẽ ghép lại với nhau tạo nên cấu trúc bậc bốn phức tạp. Phần các nucleotid không được methyl hoá sẽ bị phân huỷ. Ở tế bào nhân sơ preribosom là rARN 30S. Phân tử này cũng được methyl hoá một số bazơ và tạo nên rARN 16S, 23S, 5S và tARN, phần không methyl hoá cũng bị thuỷ phân để loại bỏ (hình 3.7 và 3.8).

5. Sự hoàn thiện ARN thông tin

Kết thúc sự phiên mã lập tức các tiền mARN trải qua một quá trình biến đổi ngay trong nhân để thành mARN hoạt động. Quá trình này gồm tạo mũ chụp 7-methylguanin vào đầu 5' gắn đuôi polyA vào đầu 3' và cắt bỏ các intron nối lại cac exon.

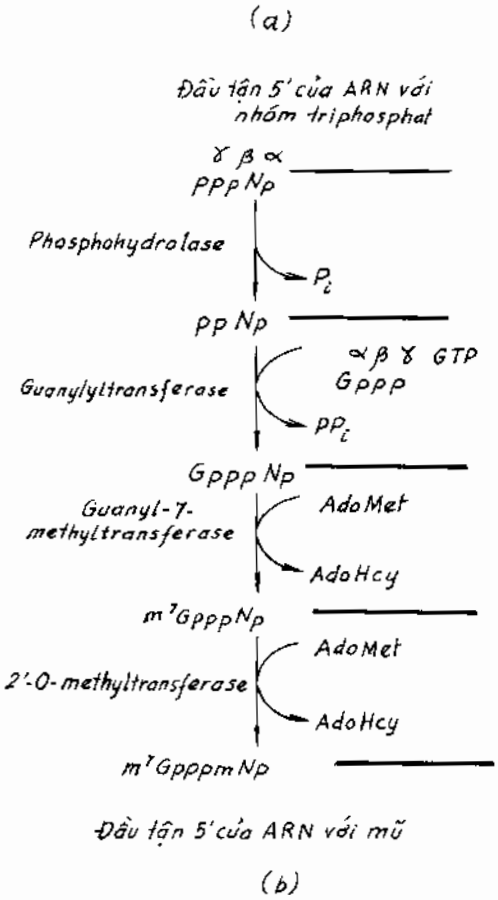
5.1. Gắn mũ chụp 7-methylguanin

- Đầu 5' của chuỗi tiền mARN là nucleotid triphotphat chịu tác động của enzym photphohydrolaza tách acid phosphoric còn lại nhóm diphotphat.

- Dưới tác động của enzym guanosyl transferaza GTP được gắn vào và giải phóng pyrophotphat.

- Sau đó enzym guanosyl -7 –transferaza gắn nhóm methyl vào vị trí 7 của guanin ở đầu 5' của mARN

Mũ chụp này là tối cần thiết cho quá trình dịch mã sau này (hình 3.9).



Hình 3.9. **Tạo thành mũ 7 - methylguanosin**

5.2. Gắn đuôi poly A

- Tiền mARN sẽ bị cắt bỏ khoảng 20 nucleotid nằm trước một trình tự AAUAAA nhận biết phản ứng cắt.

- Rồi enzym polyA- polynmeraza có sẵn trong nhân sẽ gắn khoảng 100 adenin ở tế bào nhân chuẩn bậc thấp, hoặc khoảng 250 adenin ở động vật có vú vào đầu 3' của mARN (riêng mARN của histon thì không gắn đuôi polyA).

- Một protein gọi là protein liên kết với polyA (polyA binding protein - PABP) sẽ gắn tiếp vào đuôi polyA. Đuôi polyA kết hợp với PABP làm cho mARN trong thể ổn định và khởi sự dễ dàng cho việc dịch mã.

5.3. Cắt bỏ các intron và nối lại các exon với nhau

- Quá trình này nhờ ba trình tự nằm trong intron đóng vai trò quan trọng:

+ Trình tự "cho" GU ở đầu 5' của intron.

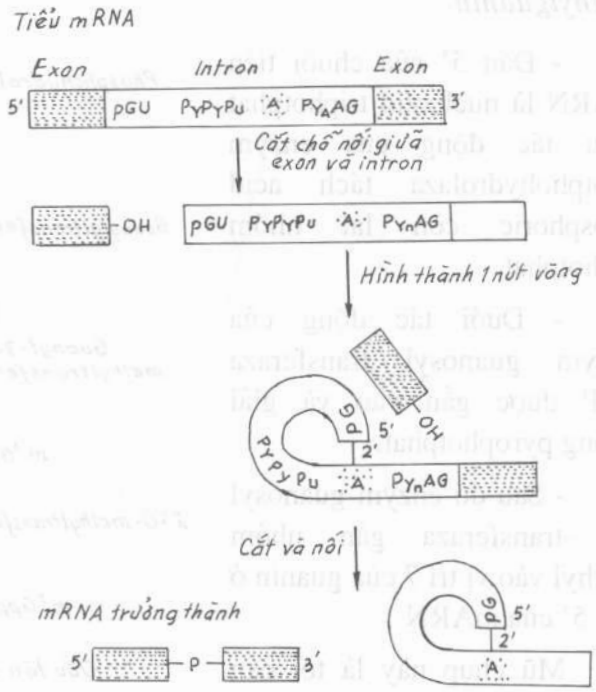
+ Trình tự giàu các bazơ pyrimidin bao quanh 1 A ở gần đầu 3'.

+ Trình tự "nhận" AG ở đầu 3'.

- Quá trình cắt nối lần lượt xảy ra như sau: (hình 3.10).

+ Đầu tiên mARN được cắt ngay điểm nối giữa exon 1và đầu 5' của intron.

+ Sau đó guanylat ở đầu 5' của intron nối với adenylat nằm gần 3' của intron tạo ra "nút



Hình 3.10. **Quá trình cắt nối intron và exon của tiền mARN thành mARN hoạt động.**

thòng lọng" của intron.

+ Cuối cùng điểm nối giữa exon 2 và đầu 3' của intron được cắt rời, rồi intron bị loại ra và các exon 1 và 2 nối lại với nhau hình thành mARN hoạt động và qua lỗ nhân ra tế bào chất tham gia quá trình dịch mã. Quá trình cắt nối này có vai trò của sáu phần tử từ U_1 đến U_6 do các ARN nhỏ của nhân (snARN) kết hợp vơí một số protein chuyên biệt trong nhân.

CHƯƠNG IV

MẬT MÃ DI TRUYỀN, SỰ DỊCH MÃ - SINH TỔNG HỢP PROTEIN

I. MẬT MÃ DI TRUYỀN

1. Các phân tử bảo quản và vận chuyển thông tin di truyền

ADN thì chứa chất bảo quản và truyền đạt thông tin di truyền, còn mARN thì vận chuyển thông tin di truyền. Sở dĩ có sự vận chuyển thông tin di truyền vì ADN chứa chất thông tin thì nằm trong nhân, mà tổng hợp protein theo chương trình định sẵn lại nằm ở bào tương, vì vậy phải cần một yếu tố vận chuyển thông tin di truyền từ nhân ra bào tương, ***yếu tố đó chính là mARN***.

2. Cách bảo quản và vận chuyển thông tin di truyền trong ADN và mARN; các bằng chứng về mã bộ ba

Ta biết rằng ADN cũng như mARN chỉ có bốn loại bazơ, trong khi đó protein lại có tới 20 acid amin khác nhau. Vậy bằng cách nào để có bốn bazơ đó dịch được 20 acid amin này.Do đó buộc người ta phải giải quyết hàng loạt những vấn đề lý luận và thực nghiệm như sau:

2.1. Số bazơ biểu thị một acid amin

Bằng toán học người ta thấy:

- Cứ một bazơ biểu thị một acid amin thì bốn bazơ chỉ biểu thị được có bốn acid amin.

- Nếu hai bazơ biểu thị một acid amin thì bốn bazơ sẽ biểu thị là $4^2=16$.

- Nếu ba bazơ biểu thị một acid amin thì bốn bazơ sẽ biểu thị là $4^3=64$.

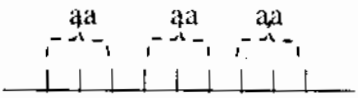
Như vậy, bộ ba (triplet) bazơ đủ và thừa để biểu thị cho tất cả các acid amin trong cơ thể sinh vật.

Về sau, về thực nghiệm người ta càng thừa nhận về mã bộ ba này (sẽ nói sau).

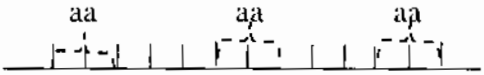
2.2. Cách sắp xếp bộ ba mật mã trên phân tử ADN và mARN

Điều kiện đầu tiên và tất yếu là bộ ba mật mã này phải gần nhau, nhưng có bốn cách sắp xếp:

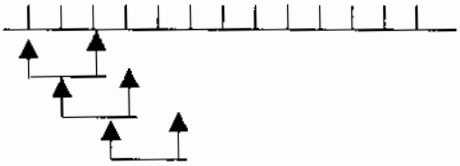
1. Các bộ ba nối tiếp nhau



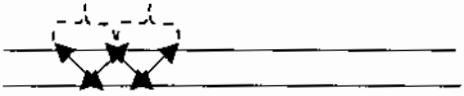
2. Các bộ ba cách nhau bằng một nhóm không có ý nghĩa



3. Trong bộ ba nucleotid, mỗi nucleotid của nó đều có thể tham gia vào ba bộ ba khác nhau.



4. Bộ ba nucleotid nằm trên hai chuỗi khác nhau.



Crick đã dùng riboflavin và các loại acridin khác nhau để có khả năng thêm hoặc bớt một nucleotid trong chuỗi mARN, do đó mà có thể nhận định được cách sắp xếp nào trong bốn cách trên là đúng: để trên một chuỗi ARN thay một nucleotid thì protein tạo thành chỉ có một acid amin thay đổi mà thôi. Như vậy chỉ có cách thứ nhất mà thôi.

Cũng bằng chứng trực tiếp chứng minh mã bộ ba được rút ra từ thí nghiệm rII ở thực khuẩn thể T_4. Trong thí nghiệm này người ta gây tạo những đột biến mất (-) và thêm (+) một cặp bazơ trên ADN.

Ví dụ: ta có đoạn ARN thông tin có thành phần dưới đây và khi đó trên phân tử protein tương ứng sẽ chỉ có một loại acid amin

mARN:	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG
acid amin	1	1	1	1	1	1	1	1

1. Nếu bây giờ xảy ra đột biến (-) làm mất đi C ở vị trí thứ hai trên mạch ARN thông tin thì trình tự các bộ ba sẽ thay đổi và thành phần acid amin thay đổi theo như sau:

		- C						
mARN:	CAG	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC
acid amin	1	2	2	2	2	2	2	2

2. Nếu tiếp theo lại xảy ra đột biến (+) xen G vào giữa bộ ba thứ hai và thứ ba thì mạch ARN thông tin và thành phần acid amin trên protein sẽ thay đổi như sau:

		- C	+ G					
mARN:	CAG	AGC	GAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG
acid amin	1	2	3	1	1	1	1	1

3. Trên thực tế nếu mã di truyền là mã bộ ba thì xảy ra liên tiếp ba đột biến "mất" hoặc ba đột biến "thêm" liền kề nhau ở đầu gen sẽ không làm thay đổi nhiều thành phần acid amin trên protein tương ứng. Thí dụ, trường hợp xảy ra liên tiếp đột biến (+) như sau:

		+A	+C		+C			
mARN kiểu dại	UUC	CUG	AAU	UAU	CGA	GUU	GCC	AAA
acid amin	1	2	3	4	5	6	7	8
	phe	leu	asn	tyr	arg	val	ala	lys

sẽ dẫn đến bốn bộ ba bị biến đổi trên phân tử mARN và gây ra nhưng biến đổi tương ứng trong thành phần acid amin của protein.

mARN	UUC	ACU	GCA	AUU	AUC	CGA	GUU	GCC	AAA
acid amin	1	9	7	10	10	5	6	7	8
	phe	thr	ala	leu	leu	arg	val	ala	lys
		các acid amin sai							

Toàn bộ các số liệu thu được trong thí nghiệm trên gen rII ở thực

khuẩn thể T_4 đã chứng tỏ lập luận trên là đúng. ***Vậy mã di truyền là mã bộ ba với 3 bazơ nối tiếp nhau liên tục không ngắt quãng đọc theo một chiều và bắt đầu từ một điểm xác định.***

3. Giải mã di truyền

Biết được bộ ba nucleotid xác định một acid amin và phải đi liền nhau theo một hướng chưa đủ, mà còn phải biết bộ ba nucleotid nào xác định acid amin nào.

Công việc này hoàn thành được nhờ thành tựu của Ochoa (1955) chiết xuất được enzym polynucleotid phosphorylaza từ vi khuẩn nên đã giúp M.Nirenberg và Mathae (1961) dùng enzym này tổng hợp được mARN toàn poly U trong ống nghiệm. Về sau M.Nirenberg đã sử dụng một hệ thống tổng hợp vô bào (không có cấu trúc tế bào) để giải mã di truyền. Hệ thống đó là dịch chiết tế bào *E.coli* có chứa các ribosom, các ARN vận chuyển, các enzym aminoacyl synthetaza, ARN thông tin, các axit amin và một số phụ gia khác. Trong hệ thống vô bào các axit amin có thể dính lại với nhau để tạo thành protein. Phản ứng này chỉ diễn ra trong vòng vài phút rồi dừng lại, nhưng nếu bổ sung thêm ARN thông tin mới thì việc tổng hợp protein lại tiếp diễn.

Phản ứng này là một phát minh cực kỳ quan trọng, vì sau khi ARN thông tin tự nhiên có sẵn trong dịch vô bào được sử dụng hết thì có thể đưa ARN thông tin nhân tạo có thành phần định trước vào hệ thống vô bào và xác định xem loại protein nào được tổng hợp. Các tác giả thấy rằng, khi đưa ARN thông tin chỉ chứa toàn uraxin (U) vào hệ thống thì protein được tổng hợp chỉ chứa toàn axit phenylalanin. Tương tự như vậy, nếu mARN đưa vào hệ thống chỉ mang toàn adenin (A) thì protein được tổng hợp chỉ chứa toàn lysin, nếu mARN chỉ mang toàn cytosin (C) thì protein tương ứng chỉ có prolin. Vậy UUU là bộ ma mã hoá phenylalanin, AAA là bộ ba mã hoá lysin và CCC là bộ ba mã hoá prolin.

Tiếp sau đó các tác giả đã tổng hợp các mARN có thành phần như UCUCUCUCUCU...., AAGAAGAAGAAG.... và đã tìm ra các bộ ba mã hoá axit amin như: serin là UCU, leucin là CUC, lysin là AAG, arginin là AGA và axit glutamic là GAA. Cứ tiếp tục thí nghiệm theo cách như vậy và kết hợp với một vài kỹ thuật khác, người ta đã tìm ra toàn bộ 61 bộ ba mã hoá các axit amin. Ba bộ ba còn lại (UAA, UAG và UGA) như ngày nay chúng ta đã biết, là những dấu hiệu kết thúc chuỗi, còn gọi là ***bộ ba vô nghĩa***

(nonsense) vì chúng không xác định axit amin nào. Như vậy, *toàn bộ mã di truyền đã được giải, thể hiện ở bảng 4.1.*

Bảng 4.1. **Mã di truyền**

Chữ thứ nhất	Chữ thứ hai: U	C	A	G	Chữ thứ ba
U	UUU, UUC — leu UUA, UUG — phe	UCU, UCC, UCA, UCG — ser	UUU, UCC — tyr UAA KT(*) UAG KT	UGU, UGC — cys UGA KT UGG trp	U C A G
C	CUU, CUC, CUA, CUG — leu	CCU, CCC, CCA, CCG — pro	CAU, CAC — his CAA, CAG — glin	CGU, CGC, CGA, CGG — agr	U C A G
A	AUU, AUC, AUA — leu AUG met	ACU, ACC, ACA, ACG — thr	AAU, AAC — asn AAA, AAG — lys	AGU, AGC — ser AGA, AGG — agr	U C A G
G	GUU, GUC, GUA, GUG — val	GCU, GCC, GCA, GCG — ala	GAU, GAC — asp GAA, GAG — glu	GGU, GGC, GGA, GGG — gly	U C A G

(*) KT cụm mã kết thúc

4. Các đặc điểm của mã di truyền

Phân tích bảng mã di truyền chúng ta thấy có những đặc điểm sau:

4.1. Mỗi axit amin ít nhất có hai mã di truyền (codon), trừ Trp và Met.

- Các codon cùng biểu thị một axit amin thì gọi là codon đồng nghĩa hay codon thoái hoá; còn có tên là codon không đồng nhất.

- Ý nghĩa của nhiều codon cho một axit amin chính là cơ chế bảo vệ thông tin thể hiện sự tài tình.

Ví dụ: GGC khi bị tia UV GGU

gly gly

Codon có thay đổi từ C → U nhưng không ảnh hưởng thông tin di truyền vì vẫn biểu hiện cho glyxin (gly).

- Trong các codon đồng nghĩa chỉ có nucleotit thứ ba khác nhau; như vậy nếu như axit amin nào có tới bốn codon thì khi thay đổi nucleotit thứ ba, bản chất thông tin di truyền không thay đổi.

4.2. Những axit amin nào hay gặp trong phân tử protein thì nhiều codon đồng nghĩa, trừ his và cys, tuy ít gặp nhưng quan trọng vì có nhóm imidazol và nhóm –SH nên mỗi nó đều có hai codon.

4.3. Những axit amin có đặc tính lý hoá gần giống nhau thì codon của chúng cũng gần giống nhau chỉ khác nhau ở nucleotit thứ ba. Ví dụ:

Asp	GAU	GAC
Glu	GAG	GAU

4.4. Trong trường hợp axit amin có hai codon thì nucleotit thứ ba thuộc cùng một nhóm hoặc purin hoặc pyrimidin.

Ví dụ: phe: UUU và UUC, nucleotit thứ ba của hai codon này thuộc nhóm pyrimindin.

Leu: UUA và UUG, nucleotit thứ ba của hai codon này thuộc nhóm purin.

Từ ý nghĩa này nếu ta thay một bazơ trong cùng một nhóm thì gọi là transition, còn nếu thay khác nhóm thì gọi là transvertion.

4.5. Những codon vô nghĩa

Có ba codon là UAA, UAG và UGA không ứng với một axit amin nào cả gọi là codon vô nghĩa nhưng lại đóng vai trò báo hiệu kết thúc tổng hợp chuỗi protein.

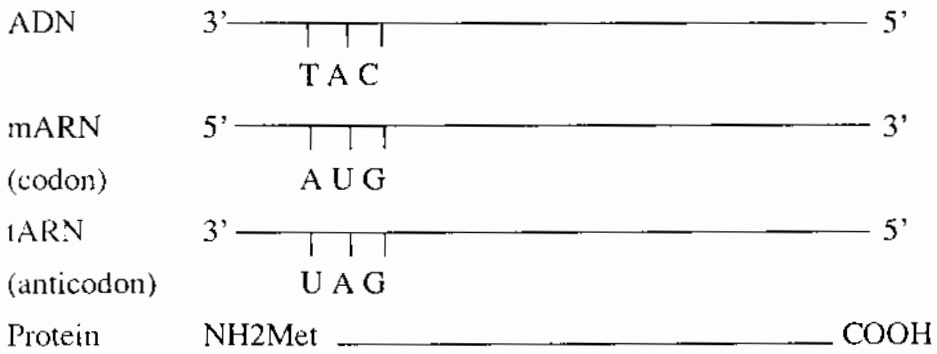
Codon AUG – met báo hiệu mở đầu.

N formyl Met mở đầu cho sự tổng hợp chuỗi protein của vi khuẩn.

4.6. Mã bộ ba mang tính phổ biến

Ở vi khuẩn động vật, thực vật đều cùng có bộ ba mã di truyền giống hệt nhau.

4.7. Sự đọc thông tin di truyền thì tuân theo định luật đôi bazơ bổ sung của bộ ba mật mã giữa ADN và mARN và của bộ ba đối mã của tARN như sau:



4.8. Tính linh hoạt của mã di truyền

- Inosin (I) trong anticodon có thể bổ sung vào U, C, A, G đều được cả (woble hypothesis of Crick 1966). Đó gọi là tính linh hoạt "trong kết cặp".

4.9. Đột biến và mã di truyền

Có một số tác nhân đột biến hoá học gây ra đồng hoán, dị hoán, làm mất hoặc bổ sung thêm bazơ và dẫn đến thay đổi axit amin trên mạch polypeptit.

Có ba kiểu đột biến cơ bản làm sản sinh ra các protein không hoạt động biểu hiện ra kiểu hình:

a. Đột biến nhầm nghĩa

Một cặp bazơ riêng lẻ trên ADN bị biến đổi làm thay đổi cụm mã tương ứng trên mARN, do đó dẫn đến một axit amin khác trên chuỗi polypeptit.

b. Đột biến vô nghĩa

Một cặp bazơ riêng lẻ trên ADN bị biến đổi làm thay đổi cụm mã tương ứng trên mARN vô nghĩa (tức là một tín hiệu kết thúc chuỗi trên mARN), do đó dẫn đến mạch polypeptit ngắn hơn bình thường và không hoạt động theo đúng chức năng cũ.

c. Đột biến dịch khung

Một cặp bazơ riêng lẻ trên ADN bị mất hoặc thêm làm thay đổi một bazơ trên mARN, mà ở đó khung đọc dịch chuyển đi một nucleotit, do đó dẫn đến tạo ra một polypeptit khác thường.

II. SỰ DỊCH MÃ-SINH TỔNG HỢP PROTEIN

1. Các chất tham gia tổng hợp protein

Quá trình dịch mã - sinh tổng hợp protein có hàng loạt các yếu tố tham gia, trước hết kể cả các yếu tố truyền đạt thông tin di truyền, các acid amin rồi đến các enzym, các yếu tố mở đầu, kéo dài và kết thúc, các phân tử cung cấp năng lượng, các ion *v.v*... Dưới đây là bảng liệt kê các chất tham gia và vai trò chức năng của chúng trong sinh tổng hợp protein (bảng 4.2).

Bảng 4.2. **Các chất tham gia và vai trò - chức năng của chúng trong sinh tổng hợp protein**

STT	Các chất	Vai trò – chức năng
1	Các acid amin (gồm 20 acid amin khác nhau)	Nguyên liệu để tổng hợp nên polypeptid, protein
2	ADN	Gen điều hoà, gen khởi động, gen cấu trúc tham gia vào phiên mã, dịch mã.
3	Các ARN (gồm ba loại: mARN, rARN, tARN)	-mARN vận chuyển thông tin từ ADN bằng bộ ba mã di truyền đến chỗ tổng hợp protein. - rARN là nơi tổng hợp protein - tARN vận chuyển acid amin tương ứng đến nơi tổng hợp protein.
4	Các enzym (có ba enzym quan trọng) - AminoaxyltARN syntetaza - Peptidyl syntetaza - Peptidyl transferaza	- Gắn các acid amin với tARN tương ứng. - Gắn acid amin thêm vào peptid. - Vận chuyển peptid
5	Các yếu tố mở đầu (initiation factors: IF) - IF1 - IF3 - IF2	Mở đầu sự tổng hợp chuỗi polypeptid
6	Các yếu tố kéo dài (elongation Factors- EF) - EFT (Tu, Ts) - EFG (G)	Kéo dài sự tổng hợp chuỗi polypeptid

7	Các yếu tố kết thúc còn gọi là yếu tố giải phóng release factors- RF) - RF1 - RF2 - RF3	Kết thúc sự tổng hợp chuỗi polypeptid
8	Các chất cung cấp năng lượng - ATP - GTP	- Cung cấp năng lượng cho quá trình hoạt hoá acid amin. - Cung cấp năng lượng cho sự gắn formyl Met-ARN và các aminoacyl-tARN khác vào ribosom. - Cung cấp năng lượng cho sự chuyển vị trí của peptidyl-tARN từ vị trí A→B
9	Các ion: Mg^{2+}, NH_4^+, K^+	Cần cho sự hoạt động của các enzym

Các loại ARN: ARN gồm ba loại là mARN, tARN, rARN có một số đặc điểm chính được tóm tắt trong bảng 4.3.

***Bảng 4.3.* Các đặc điểm chính của mARN, tARN và rARN**

	mARN	**rARN**	**tARN**
Tỷ lệ %	***5***	***80***	***15***
Thời gian sống trung bình	Nhanh chóng được tổng hợp và thoái hoá (khoảng hai giờ ở đa bào còn 5-10 phút ở vi khuẩn).	Lâu hơn và bền hơn	Lâu và bền
Trọng lượng phân tử	Không đồng nhất tuỳ thuộc vào chuỗi polypeptid mà nó mã hoá	70 S ở vi khuẩn và 80 S ở đa bào	4S (25.000 dalton)
Hình dáng	Một sợi thẳng	Có hai tiểu đơn vị gắn với các protein	Cuộn thành hình lá ba chẽ
Nguồn gốc được tổng hợp	Từ một sợi của ADN ở nhân	Từ một sợi của ADN vắt qua hạch nhân	Từ phần sợi ADN ở ngoài hạch nhân
Vai trò	Bộ ba mã hoá của (codon) mang mã di truyền trong nhân ra bào tương để tổng hợp protein	Nơi diễn ra tổng hợp protein	Mang đối mã (anticodon) và mang acid amin tương ứng đến chỗ tổng hợp protein.

2. Vai trò của một số yếu tố quan trọng tham gia quá trình sinh tổng hợp protein

Có rất nhiều yếu tố tham gia quá trình sinh tổng hợp protein. Riêng về các đại phân tử đã có tới hàng trăm loại khác nhau (các acid, nucleic, enzym, protein đặc hiệu...) tham gia quá trình này.

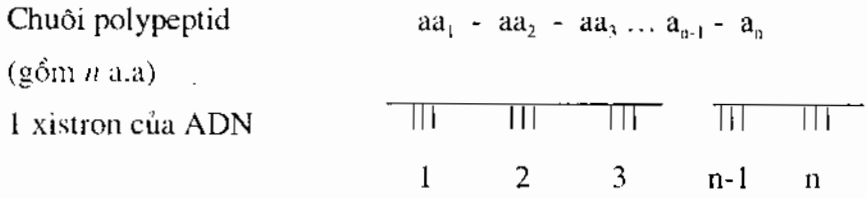
2.1 Vai trò của ADN

Như chúng ta đã biết ADN tập trung chủ yếu ở trong nhân và là thành phần cơ bản của thể nhiễm sắc. Vai trò của ADN trong quá trình tổng hợp protein được xác minh chủ yếu bởi nhưng nghiên cứu về di truyền. Thực nghiệm đầu tiên chứng minh ADN là cơ sở vật chất của di truyền là công trình của Avery, Mac Load và Mac Carthy (1944): đưa ADN chiết xuất từ phế cầu khuẩn độc vào môi trường nuôi cấy chủng phế cầu khuẩn không độc thì chủng không độc biến thành chủng độc. Vậy ADN có liên quan chặt chẽ với tính đặc hiệu của các protein của vi khuẩn (các protein này quyết định tính độc hay không độc của vi khuẩn).

Thí nghiệm Krauss lại chứng minh cụ thể hơn mối liên quan giữa cấu trúc của protein với vai trò của ADN: đưa ADN chiết xuất từ hồng cầu non của người bình thường (hồng cầu này tổng hợp hemoglobin A) vào tuỷ xương bệnh nhân thiếu máu hình liềm (có hemonglobin S) thì hồng cầu non trong tuỷ xương bệnh nhân tổng hợp được hemoglobin A (bình thường). Qua các dữ kiện trên ta có thể kết luận rằng ***ADN quyết định cấu trúc đặc hiệu của protein được tổng hợp.*** Người ta làm thí nghiệm với hệ thống vô bào không có nhân tế bào hoặc ADN thì thấy quá trình tổng hợp protein vẫn xảy ra. Vậy ADN không trực tiếp tham gia quá trình tổng hợp protein.

Ngày nay người ta đã xác nhận được rằng, ADN là chất liệu bảo quản thông tin di truyền, phân tử ADN chứa đựng toàn bộ các "tin tức" về cấu trúc của các protein đặc hiệu của tế bào và các "tin tức" đó được di truyền lại thế hệ sau.

Mỗi protein ứng với một đoạn của phân tử ADN gọi là ***xistron*** hay ***gen cấu trúc***, trong đó mỗi acid amin được mã hoá bằng một bộ ba mononucleotid gọi là bộ ba mật mã, thứ tự của các acid amin trong chuỗi polypeptid (protein) ứng với thứ tự các mononucleotid trong chuỗi ADN (hình 4.1).

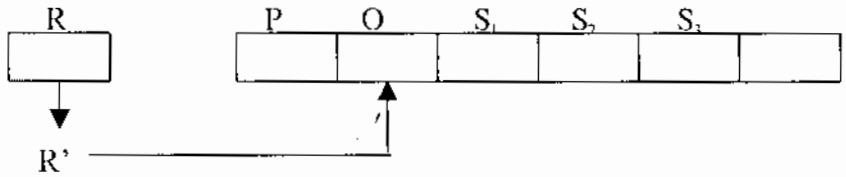


Hình 4.1. **Sự tương ứng giữa chuỗi polypeptid và chuỗi các bộ ba mononucleotid của ADN.**

Ghi chú: a.a: acid amin

1: một mononucleotid

Nhiều protein liên quan đến nhau về mặt hoạt động (thí dụ các enzym xúc tác nhiều phản ứng của một quá trình thoái hoá một chất nào đó) ứng với một khúc phân tử ADN gồm nhiều xistron. Những xistron đó (gen cấu trúc) chịu sự điều khiển của một gen gọi là gen tác động. Trên phân tử ADN còn có gen điều hoà sinh sản ra chất kìm hãm ảnh hưởng tới gen tác động (ức chế hay kích thích trạng thái của chất kìm hãm). Bên cạnh gen tác động còn có gen khởi động là nơi tiếp nhận ARN- polymeraza (enzym xúc tác sự sinh tổng hợp mARN) (hình 4.2).



Hình 4.2. **Các gen của ADN**

R: gen điều hoà R': chất kìm hãm

O: gen tác động P: gen khởi động

S_1, S_2, S_3...: gen cấu trúc

ADN có hai hướng hoạt động

- *Hướng thứ nhất:* là sự sao chép hay nhân đôi ADN xảy ra ở nhân tế bào khi phân chia (xem chương tổng hợp ADN).

- *Hướng thứ hai:* là điều khiển quá trình sinh tổng hợp protein thông qua sự tổng hợp ARN được tổng hợp dựa trên mẫu là một sợi ADN (mang thông tin về cấu trúc protein). Các thông tin từ ADN được chuyển sang ARN và quá trình này gọi là ***sự phiên mã*** (xem chương tổng hợp ARN). Sau đó

mARN được dùng làm khuôn mẫu cho sự tổng hợp protein, các thông tin từ mARN được chuyển sang chuỗi polypeptid, quá trình này gọi là ***sự dịch mã***.

2.2 Vai trò của mARN

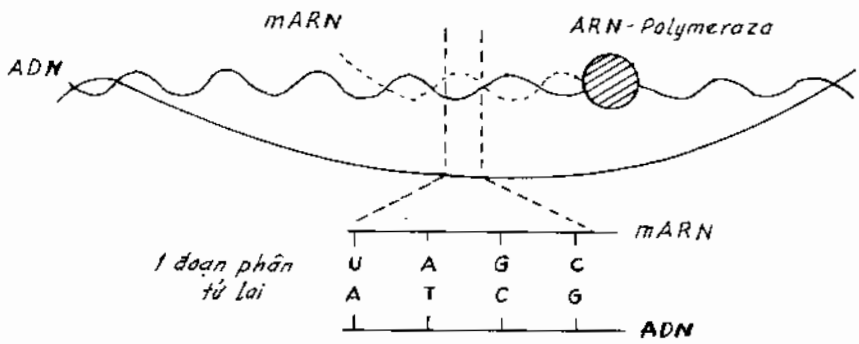
mARN là yếu tố vận chuyển thông tin về cấu trúc protein theo mã di truyền quy định từ một đoạn sợi ADN để đến ribosom tổng hợp protein.

Bắt đầu từ năm 1961, Jacoh và Monod nêu có một loại ARN có đặc điểm: chuyển hoá nhanh chóng và có cấu trúc hoá học tương tự với ADN. ARN này có tác dụng như khuôn mẫu để tổng hợp protein và được gọi là ARN thông tin (mARN). Đời sống của mARN rất ngắn: chỉ 2-3 phút ở vi khuẩn và 2-3 giờ ở động vật. mARN chiếm gần 5% tổng ARN của tế bào.

Vai trò của mARN đã được xác minh bằng thực nghiệm. Khi ủ mARN chiết xuất từ gan chuột với dịch tế bào nguồn gốc động vật khác thì thấy có sự tạo thành protein đặc hiệu của gan chuột. Như vậy mARN trực tiếp tham gia quá trình tổng hợp protein.

Nó chính là chất trung gian truyền thông tin từ ADN sang chuỗi polypeptid. Với nguyên liệu là các mononucleotid tương ứng, enzym xúc tác là ARN polymeraza phụ thuộc ADN (hay transcriptase), mARN được tổng hợp dựa theo khuôn mẫu là một sợi ADN. Sự tổng hợp này tuân theo quy luật đôi bazơ nên phân tử lai mARN-ADN. Quá trình đó được gọi là sự phiên mã (hình 4.3).

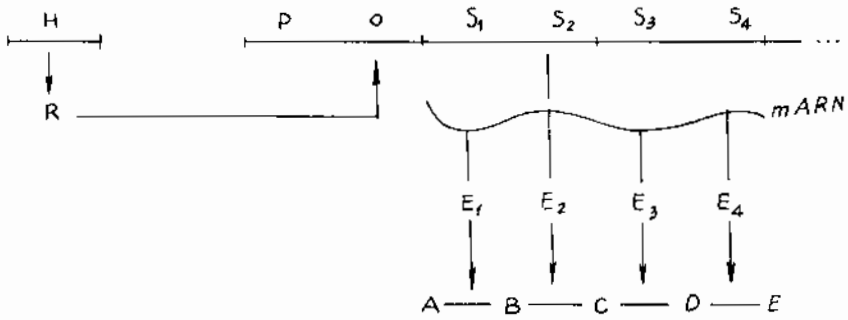
Như vậy các thông tin ở ADN về cấu trúc của protein nhất định đã được chuyển sang mARN và mARN được coi như bản sao của một đoạn



Hình 4.3. **Sự phiên mã**

ADN tương ứng. Sau khi được tổng hợp xong mARN tách khỏi phân tử lai và được chuyển (dưới dạng kết hợp với protein thành phức hợp gọi là informosom) ra bào tương tới ribosom.

Những gen cấu trúc hay xistron điều khiển sự tổng hợp những protein có liên quan với nhau về mặt hoạt động (thí dụ xúc tác một quá trình chuyển hoá gồm nhiều phản ứng liên tiếp) tập hợp lại thành một đơn vị chức năng gọi là đơn vị tác động (operon) dưới sự điều khiển của gen tác động.Sự sao chép thực hiện cho toàn bộ các xistron của đơn vị tác động tạo nên mARN polyxistronic mARN là khuôn mẫu cho sự tổng hợp nhiều chuỗi polypeptid tương ứng (hình 4.4).

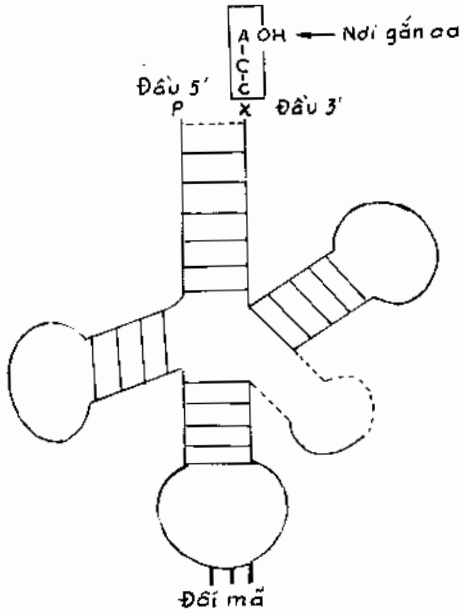


Hình 4.4. **ARNm polyxistronic (E_1, E_2,... các enzym).**

mARN monoxistronic (hiếm hơn) ứng với một gen cấu trúc. Sự sao chép bắt đầu ở gen khởi động (nơi tiếp nhận ARN polymeraza). Sự kéo dài chuỗi mARN đi theo chiều 5'-3' và được thực hiện ở đoạn ADN nằm ngoài phạm vi hạch nhân. Các thông tin ở đoạn ADN ứng với chuỗi polypeptid

nhất định được chuyển sang mARN. Số bộ ba mật mã ở đoạn ADN tương ứng và bằng số acid amin của chuỗi polypeptid.

Kích thước của mARN tuỳ thuộc vào các chuỗi polypeptid mà nó mã hoá. Nó gồm 900 – 12000 mononucleotid có trọng lượng phân tử bằng 3 x 10^5 – 4 x10^6, dài 5-50-10^5A°



Hình 4.5. **Cấu trúc tổng quát của tARN**

2.3. Vai trò của ARN

Hoagland và các cộng sự (1958) làm các thí nghiệm tổng hợp protein với một hệ thống vô bào gồm ribosom (tách từ *E.coli*) acid amin ghi dấu, $MgCl_2$, ATP và ARN chiết xuất từ pha lỏng của tế bào. Họ nhận thấy trước khi được sử dụng để tổng hợp protein, các acid amin kết hợp với ARN hoà tan, còn gọi là ARN vận chuyển, viết tắt là tARN (hình 4.5).

Chức năng tARN được thực hiện nhờ các enzym đặc hiệu là các aminoacyl - tARN synthetaza. Có 20 amino-acyl-tARN synthetaza tương ứng với 20 acid amin.

Các enzym này có khả năng nhận biết các acid amin đặc hiệu và cả tARN tương ứng. Quá trình gắn acid amin vào tARN với sự tham gia của các enzym trải qua hai bước và cần năng lượng kích hoạt:

- Acid amin + enzym + ARP → enzym amynoacyl-AMP + P_1.

- Enzym-aminoacyl-AMP + tARN → tARN-aminoacyl + AMP + enzym.

Như vậy, chức năng của tARN là vận chuyển các acid amin một cách đặc hiệu đến nơi tổng hợp protein. Vì vậy có ít nhất 20 loại tARN, ứng với 20 acid amin.

Ngày nay người ta đã biết khoảng 40 loại tARN và đã xác định được cấu trúc bậc 1, 2, 3 của nhiều loại tARN. Phân tử tARN có khoảng 75-85

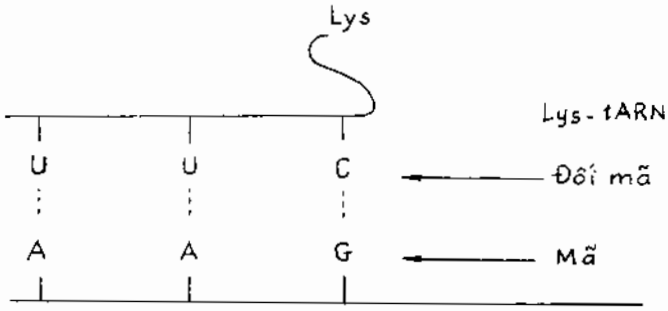
mononucleotit và có trọng lượng phân tử bằng 25000-30000. Cấu trúc tổng quát của tARN như hình 4.5, trong đó chúng ta chú ý hai điểm:

* Đầu 5' thường là p và đầu 3' bao giờ cũng là bộ ba mononucleotit CCA trong đó A (AMP) ở tận cùng và là nơi trực tiếp gắn acid amin (aa).

* Đối mã: là một cuộn gồm bảy mononucleotit, trong đó có bộ ba mononucleotit ứng với acid amin mà ARN có nhiệm vụ vận chuyển một cách đặc hiệu. tARN có năm trung tâm chức năng:

- trung tâm nhận acid amin;
- trung tâm được nhận biết bởi enzym (aminoacyl-tARN aynthetaza);
- trung tâm tương tác với ribosom;
- trung tâm nhận biết bởi các yếu tố EF-G trong quá trình chuyển vị;
- trung tâm đối mã đặc hiệu đối với acid amin được vận chuyển.

Khi tARN nhận acid amin tương ứng thì trở thành aminoacyl-tARNs (aa-tARN). Phức hợp này được đưa tới ribosom và "đối mã" nhận biết mã tương ứng ở tARN theo quy luật đối bazơ, thí dụ: Lys-tARN bổ sung với mã của lysin ở $tARN_m$ (hình 4.6).



Hình 4.6. **Đối mã nhận biết mã tương ứng**

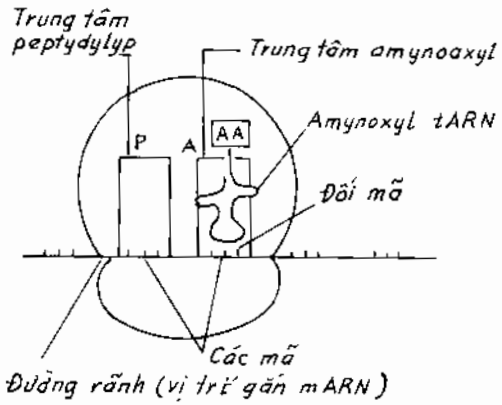
tARN được tổng hợp dựa trên khuôn mẫu là một sợi ADN nằm ngoài phạm vi hạch nhân. Sau đó chúng được chuyển ra ngoài bào tương. Chúng chiếm khoảng 15% tổng ARN của tế bào.

2.4. Vai trò của ARN ribosom

rARN chiếm khoảng 80% tổng ARN của tế bào. Chúng được tổng hợp

ở hạch nhân, dựa theo khuôn mẫu là một sợi ARN. Sau đó chúng được chuyển ra màng lưới nội nguyên sinh và tham gia cấu tạo *ribosom - nơi xảy ra quá trình tổng hợp protein.*

Ribosom là những tiểu phần ribonucleoprotein bám vào mạng lưới nội nguyên sinh. Ribosom gồm hai đơn vị nhỏ có hằng số lắng khác nhau. Bảng 4.4 trình bày một số đặc điểm về thành phần hoá học của ribosom (bảng 4.4).



Hình 4.7. **Các trung tâm của ribosom ở *E.coli***

Bảng 4.4. **Thành phần hoá học của các ribosom ở tế bào nhân sơ và nhân chuẩn**

Các loại ribosom	Đơn vị lớn	Đơn vị nhỏ
Ribosom của tế bào nhân sơ, loại: 70S	50S 34 protein; RNAr: 23 S RNAr: 5S	30S RNAr: 16 S 21protein
Ribosom của tế bào nhân chuẩn, loại: 80S	60S 50 protein RNAr: 28 S RNAr: 5,8S RNAr: 5S	40S 34 protein RNAr: 18 S
Ribosom của ty thể động vật, loại: 55 - 60S	40 - 45S RNAr: 16 S 70 protein	30-34S 100 protein RNAr: 12 S

Ở vi khuẩn (là những tế bào nhân sơ), ribosom là tiểu thể có hằng số lắng là 70S, trọng lượng phân tử khoảng 3.10^6 gồm hai đơn vị nhỏ có hằng số lắng lần lượt 50S và 30S. Hai đơn vị nhỏ này có thể tự do hoặc kết hợp với nhau thành ribosom 70S.

Ribosom 70S = Ribosom 50S + Ribosom 30S

Ở tế bào nhân chuẩn (thí dụ tế bào động vật), ribosom là tiểu thể có

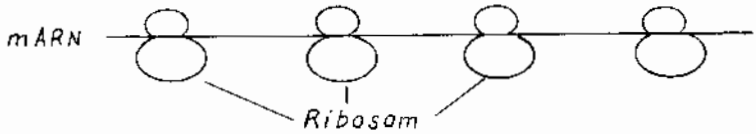
hằng số lãng là 80S, có trọng lượng phân tử bằng khoảng $4,5.10^6$ và gồm hai đơn vị nhỏ 60S và 40S:

Ribosom 80S = Ribosom 60S + Ribosom 40S

- Ribosom 50S có hai vị trí A và P, vị trí A là vị trí nhận acid amin (aminoacyl), vị trí P là vị trí nhận peptid (peptidyl tARN).

- Ribosom 30S gắn mARN.

- Còn polysom là nhiều ribosom gắn vào sợi mARN (hình 4.8).



Hình 4.8. **Polysom**

Như chúng ta biết hiệu suất của quá trình dịch mã có khi đạt tới một triệu liên kết peptid trong một giây. Nhưng nếu để va chạm tự nhiên trong môi trường lỏng của tất cả các thành phần tham gia phản ứng thì xác suất tạo được một liên kết peptid là cực kỳ hiếm hoi. Cho nên trong thực tế các thành phần này, chủ yếu như mARN thông tin mã hoá và aminoacyl-tARN... phải được tiếp xúc với nhau thông qua mối liên kết của các thành phần ribosom (ribo-nucleoprotein) nói trên thì mới đạt được hiệu năng dịch mã cực kỳ như đã trình bày.

3. Các giai đoạn của quá trình sinh tổng hợp protein

Quá trình sinh tổng hợp protein (polypeptid) trải qua ba giai đoạn: giai đoạn mở đầu; giai đoạn kéo dài và giai đoạn kết thúc.

3.1. Giai đoạn mở đầu

- Lần lượt trải qua bốn bước như hình 4.9.

- Ribosom 70S không hoạt động (gồm tiểu đơn vị 50S và tiểu đơn vị 30S).

- Dưới tác dụng của IF3, tiểu phần 30S tách khỏi 50S và rồi IF3 gắn với 30S và làm 30S gắn với mARN. Như vậy trên bề mặt 30S có bộ ba mật mã AUG của mARN sẽ mã hoá cho acid amin là Met.

- Dưới tác dụng của IF1, formyl-Met-tARN và GTP gắn vào 30S.

- Dưới tác dụng của IF2, GTP thuỷ phân thành GDP và P giải phóng năng lượng cần thiết gắn 50S vào 30S và giải phóng ra cả ba yếu tố IF1; IF2 và IF3.

- Kết quả là formyl Met-tARN gắn vào vị trí P trên tiểu phần 50S, tương ứng với bộ ba mở đầu AUG.

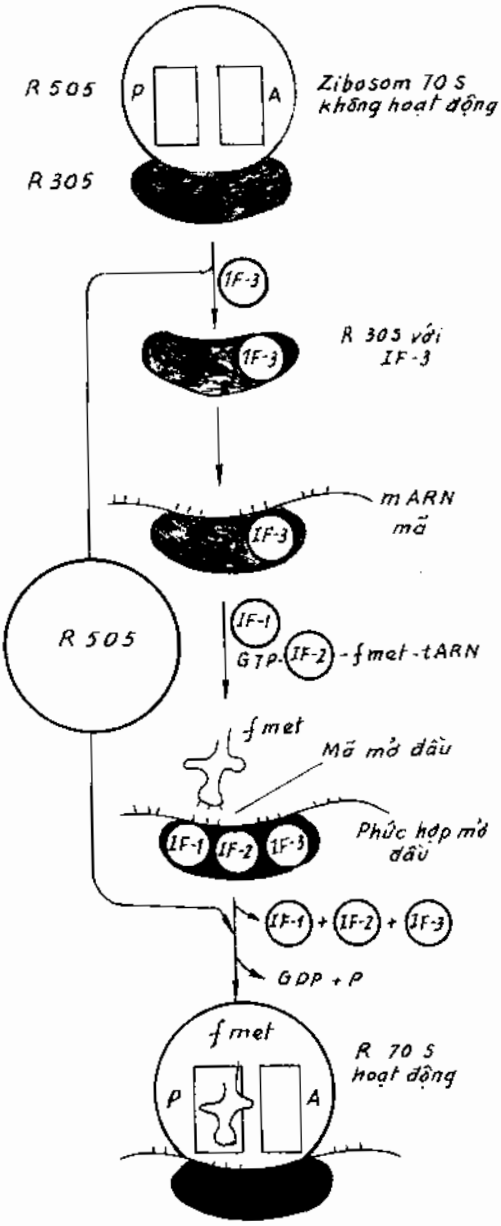
3.2. Giai đoạn kéo dài

Giai đoạn này cũng trải qua bốn bước tiếp theo như hình 4.10.

- Khi fMet-tARN gắn vào vị trí P của tiểu phần 50S thì vị trí A trống nhưng ở đó có một bộ ba mật mã tương ứng với một acid amin nào đó.

- Dưới tác dụng của EFT (Tu, Ts) aminoacyl-tARN (mà nó có bộ ba đối mã trên mARN ở vị trí A của ribosom) sẽ gắn vào ribosom.

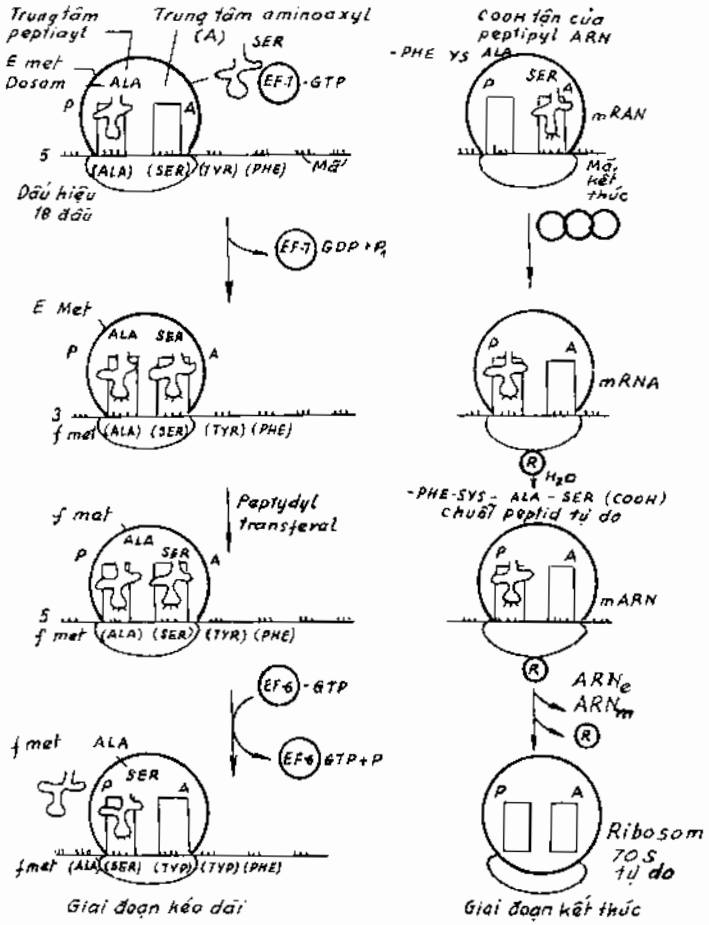
* Năng lượng của liên kết giữa fMet với tARN bị chặt đứt vừa đủ cung cấp cho việc tạo thành liên kết peptid giữa fMet với acid amin vừa tới.



Hình 4.9. Giai đoạn mở đầu

- Dưới tác dụng của EFG (G), GTP bị thuỷ phân giải phóng năng lượng để cung cấp cho sự chuyển vị của peptidyl-tARN (ở đây chính là f-Met-aa mới-tARN) sang khu vị trí P của ribosom.

* Sự chuyển này chính là sự trượt của ribosom trên vị trí A. Mỗi một lần trượt tương đương với độ dài một mã (ba mononucleotid trên mARN).



Hình 4.10. **Các giai đoạn kéo dài và kết thúc chuỗi polypeptid**

- Vị trí A lại trống, bộ ba mật mã ở khu A lai mã hoá tiếp tục với acid amin khác.

Quá trình tiếp theo lại lặp lại như trên, nhờ các yếu tố kéo dài và như vậy chuỗi polypeptid được kéo dài.

3.3. Giai đoạn kết thúc

- Khi xuất hiện bộ ba kết thúc UAA, UAG hoặc UGA các yếu tố kết thúc RF1, RF2, RF3 gắn vào ribosom và gây ra sự chuyển peptidyl-tARN từ

vị trí A sang P.

- Lúc này ở vị trí A chứa bộ ba kết thúc sẽ không có amino-acyl-tARN gắn vào ribosom nữa.

- Liên kết giữa polypeptid và tARN cuối cùng bị thuỷ phân dưới tác dụng của peptidyl transferaza. Như vậy chúng ta có polypeptid, tARN cuối, mARN tách khỏi ribosom.

- Ribosom 70S lại được tự do và trở lại giai đoạn khởi đầu tách thành 30S và 50S.

Tóm tắt bảng các thành phần cần thiết cho sự hoạt hoá acid amin, cho ba giai đoạn trong quá trình tổng hợp protein và sự hoàn thiện cuối cùng (bảng 4.5).

Bảng 4.5. **Tóm tắt các thành phần tham gia tổng hợp protein ở nhân sơ và nhân chuẩn**

Các bước	Các thành phần cần thiết ở tế bào nhân sơ	Các thành phần cần thiết ở tế bào nhân chuẩn
1. Sự hoạt hoá acid amin	20 loại acid amin 20 loại aminoacyl tARN sylthetaza 20 loại hoặc nhiều hơn tARN	20 loại acid amin 20 loại aminoacyl tARN sylthetaza 20 loại hoặc nhiều hơn tARN
2. Giai đoạn mở đầu	mARN Nfomylmethionyl tARN Mã AUG trên mARN ribosom 30S; 50S Các yếu tố mở đầu: IF_1, IF_2; IF_3; GTP, Mg^{++}	Met-mARN Mã AUG trên mARN ribosom 40S; 60S Các yếu tố mở đầu: eIF_2, eIF_4a; eIF_4b; eIF_4c; eIF_3; eIF_5; GTP, Mg^{++}
3. Giai đoạn kéo dài	Ribosom 70S hoạt động (phức hợp mở đầu) Aminoacyl-tARN tương ứng với mã Yếu tố kéo dài: EF.Tu; EF.Ts; EF.G; peptidyl transferaza; GTP, Mg^{++}	Ribosom 80S hoạt động (phức hợp mở đầu) Aminoacyl-tARN tương ứng với mã Yếu tố kéo dài: $eIF_1\alpha$; $eIF_1\beta$; eIF_2; peptidyl transferaza; GTP, Mg^{++}
4. Giai đoạn kết thúc và tách rời	Mã kết thúc trên mARN Các yếu tố tách tời: RF_1, RF_2, RF_3, ATP.	Mã kết thúc trên mARN Các yếu tố tách tời: eRF, peptidyl, transferaza; GTP.
5. Sự gấp khúc và hoàn thiện cuối cùng	Các enzym đặc biệt và các yếu tố cho sự tách rời của đoạn mở đầu.	Các enzym đặc biệt và các yếu tố cho sự tách rời của đoạn mở đầu.

CHƯƠNG V

ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG BIỂU HIỆN GEN

Biểu hiện của gen phải trải qua ba quá trình thiết yếu: ***sao chép, phiên mã*** và ***dịch mã***. Nhưng ba quá trình này diễn ra trong tế bào luôn luôn phải thích ứng với môi trường mà môi trường thì luôn luôn thay đổi. Vậy sự biểu hiện gen phải được điều hoà để phù hợp với biến đổi của môi trường.

Điều hoà hoạt động biểu hiện gen có nhiều điểm khác nhau giữa tế bào nhân sơ và tế bào nhân chuẩn, đó là:

1. *Ở vi khuẩn*, cơ thể chỉ là một tế bào nên điều hoà biểu hiện gen ở vi khuẩn có nghĩa là điều hoà hoạt động gen ở tại tế bào đó và như vậy là để đảm nhiệm mọi chức năng sống còn của vi khuẩn. Nhưng ở cơ thể đa bào, mỗi tế bào chỉ là một bộ phận của cơ thể nên điều hoà hoạt động gen xảy ra với các yếu tố trong bản thân tế bào còn chịu sự điều hoà của toàn bộ cơ thể qua nội tiết và thần kinh. Mặt khác cơ thể đa bào có khả năng biệt hoá - nghĩa là mỗi loại tế bào chỉ đảm nhiệm một số chức năng nhất định, cho nên sự sống còn của cơ thể không phải chỉ do một tế bào quyết định như ở vi khuẩn mà phải do một tập hợp tế bào đảm nhiệm.

2. *Ở cơ thể bậc cao*, ngay bộ gen trong tế bào cũng có hàng loạt những đặc trưng riêng của nó khác với tế bào vi khuẩn. Chẳng hạn, số lượng ADN trong tế bào động vật thì lớn hơn nhiều số lượng ADN trong vi khuẩn và virus. Đồng thời trong ADN của các tế bào động vật phổ biến chứa những đoạn nucleotid được nhắc lại mà không có trong vi khuẩn. Mặt khác, tế bào động vật khác với tế bào vi khuẩn là có khả năng biệt hoá, điều đó chứng tỏ có sự thay đổi của hoạt động gen.

Dựa trên nhiều quan sát về hiện tượng này, người ta thấy có các yếu tố, đặc biệt là các loại ARN khác nhau trong các mô khác nhau, mặc dù rằng các tế bào của những mô này có một bộ gen giống hệt nhau. Người ta quan sát thấy những tế bào động vật có bộ gen bao quanh màng nhân, một phần

đoạn gen của những tế bào đó là cái khuôn đối với loại ARN riêng của mình mà không bị phiên dịch hoặc chỉ có trong vùng nhân. Ngoài ra còn có protein acid và bazơ- đặc biệt là histon khu trú thể nhiễm sắc.

3. *Ở vi khuẩn* do không có màng nhân nên mARN được phiên mã ra tiếp xúc ngay với bộ máy dịch mã để tổng hợp protein. Sự phiên mã, dịch mã xảy ra đồng thời do đó sự điều hoà biểu hiện gen chủ yếu ở giai đoạn phiên mã. Còn ở sinh vật đa bào vì có màng nhân nên phiên mã xảy ra trong nhân, dịch mã xảy ra ngoài nhân. Mặt khác phiên mã và dịch mã không xảy ra đồng thời do đó rõ ràng sự điều hoà biểu hiện gen có những giai đoạn khác nhau và phức tạp hơn nhiều.

Dưới đây là mô hình biểu hiện gen ở tế bào nhân sơ và tế bào nhân chuẩn.

I. MÔ HÌNH ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG BIỂU HIỆN GEN Ở TẾ BÀO NHÂN SƠ

Sự điều hoà biểu hiện gen ở tế bào nhân sơ chủ yếu xảy ra ở giai đoạn phiên mã. Cơ chế điều hoà được thực hiện chủ yếu thông qua các operon (O). Có hai loại operon: operon cảm ứng tổng hợp và operon kìm hãm tổng hợp.

Mối liên quan về mặt phân tử và tính di truyền giữa hiện tượng gây cảm ứng sinh tổng hợp enzym đã được Monod và Jacob sắp xếp thành một hệ thống như sau: trên mã di truyền ADN của nhiễm sắc thể tế bào vi sinh vật *E.coli* hoặc vi khuẩn khác có chứa ba loại gen hoạt động khác nhau.

- *Gen cấu trúc* (S) quyết định cấu trúc thứ tự của chuỗi polypeptid của enzym cần tổng hợp qua mã thông tin di truyền mà nó sẽ chuyển sao chép sang mARN (ARN thông tin).

- *Gen điều hành* (O) khởi động quá trình sao chép mARN theo mẫu gen cấu trúc ADN, vị trí của gen điều hành nằm ngay cạnh phía trước gen cấu trúc.

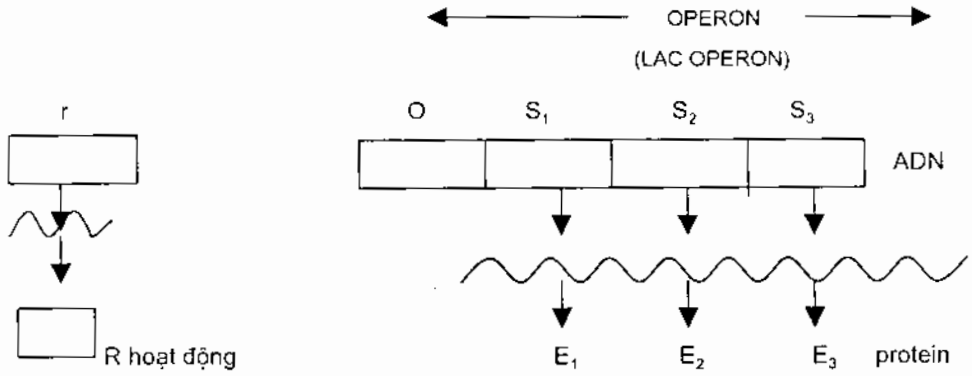
Nhiều gen cấu trúc tập hợp gắn với gen điều hành tạo thành một operon.

- *Gen điều hoà* (r) mã hoá cho sự tổng hợp một protein đặc hiệu gọi là chất kìm hãm R (repressor). Gen điều hoà nằm xa operon chứ không nhất thiết phải nằm ngay bên cạnh.

1. Operon cảm ứng tổng hợp

Chất điều hoà R bình thường ở trạng thái hoạt động, sẽ gắn đặc hiệu lên vị trí của gen điều hành O, kìm hãm sự sao chép của gen cấu trúc. Nếu xuất hiện trong môi trường một chất đặc biệt, ở đây gọi chất gây cảm ứng I, thì chất I sẽ gắn vào phân tử R và R không gắn được với gen điều hành O. Gen điều hành O ở trạng thái tự do sẽ tác động trên quá trình sao chép khởi động sự tổng hợp mARN theo khuôn mẫu ADN của nhiễm sắc thể.

Một ví dụ rất quen thuộc của trường hợp gây cảm ứng tổng hợp enzym là sự tổng hợp cảm ứng β-galactozidaza ở *E.coli* với chất gây cảm ứng là β-D-galactozid (hình 5.1)



Hình 5.1. **LAC OPERON**

Khi I gắn với R sẽ làm cho R mất tác dụng kìm hãm và O được giải phóng sẽ cho phép quá trình sao chép mật mã và quá trình tổng hợp protein theo thông tin di truyền đã ghi lại trên mARN.

Khi ta cho thêm β-D- galactozid (chất I) vào môi trường nuôi cấy tế bào *E.coli*, sẽ có sự tổng hợp không những enzym β-galactozidaza mà cả hai enzym có liên quan là β-galactozid permeaza và β-thiogalactozid axetyl transferaza.

Ba gen cấu trúc S_1, S_2, S_3 tương ứng là z, y, a cộng với gen điều hành O hợp thành một đơn vị operon có tên là *Lac operon*.

Chất kìm hãm của R *Lac operon*, có tác dụng điều hoà quá trình tổng hợp β-galactozidaza cùng hai enzym có liên quan, đã được tinh chế và kết tinh từ năm 1967. Đó là một protein có phân tử lượng 150000 và được cấu

tạo bởi sự kết hợp của bốn đơn vị nhỏ.

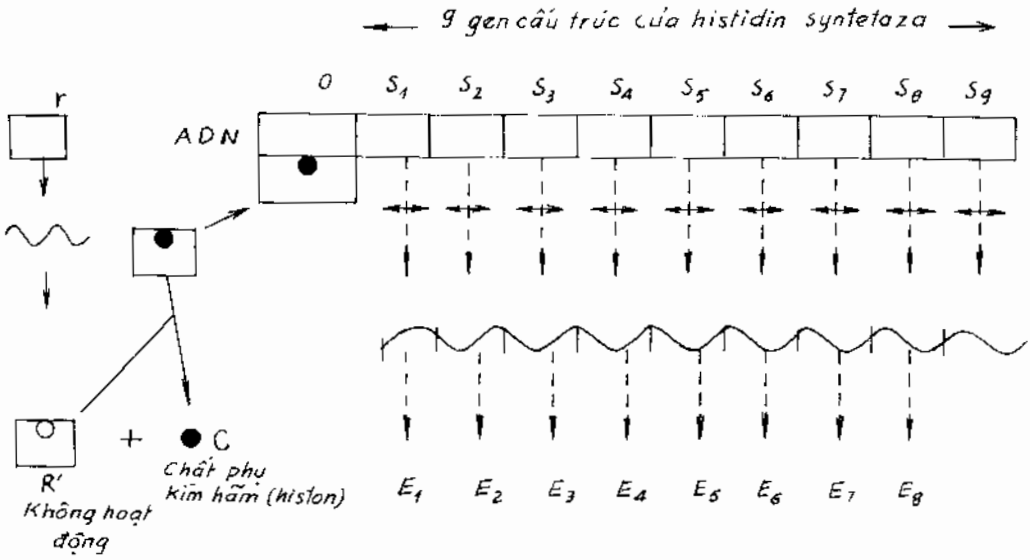
2. Operon kìm hãm tổng hợp

Chất kìm hãm được tạo ra trong trường hợp này mang ký hiệu là R' và bình thường nó không hoạt động vì nó đứng riêng hoàn toàn không có ái lực với operator. Khi nhân tố kìm hãm kết hợp với acid amin đặc trưng của operon sẽ làm thay đổi cấu hình không gian khiến nó có ái lực cao với operator.

Với sự có mặt của một chất gọi là phụ kìm hãm C (corepressor), R' sẽ chuyển sang dạng R hoạt động được. Phức chất này sẽ gắn vào vị trí đặc hiệu của gen điều hành O, chặn tác động của gen điều hành này trên quá trình sao chép gen cấu trúc.

Một ví dụ thường được nêu nên trong trường hợp kìm hãm tổng hợp enzym là sự kìm hãm tổng hợp histidin syntetaza bởi sự có mặt của histidin (histidin là chất phụ kìm hãm C).

Operon sinh tổng hợp histidin đã được tách từ *S.typhimurim*. Nó bao gồm chín gen cấu trúc mã hoá cho cùng một hoạt động xúc tác quá trình



Hình 5.2. **Operon kìm hãm tổng hợp histidin syntetaza bởi histidin**

C: Chất phụ kìm hãm, khi nó gắn vào R' sẽ chuyển thành dạng phức chất R hoạt động.

R: gắn với O và chặn sự sao chép 9 gen cấu trúc của histidin syntetaza không có sự tổng hợp enzym nữa.

sinh tổng hợp histidin. Sự có mặt của histidin trong môi trường nuôi cấy sẽ kìm hãm sự tạo thành tất cả chín enzym cần thiết cho việc tổng hợp histidin.

Một kiểu operon kìm hãm tổng hợp khác là operon tryptophan (hình 5.2).. Khi trong môi trường có tryptophan, repressor kết hợp với tryptophan gắn lên operator. Cac gen cấu trúc của operon không được phiên mã . Khi môi trường thiếu tryptophan, repressor không gắn được vào operator do đó operator thúc đẩy tổng hợp các enzym tạo tryptophan.

II. MÔ HÌNH ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG BIỂU HIỆN GEN Ở TẾ BÀO NHÂN CHUẨN

1. Sự khác biệt về mô hình điều hoà hoạt động biểu hiện gen

Sự điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở tế bào nhân chuẩn khác biệt lớn so với tế bào nhân sơ cả về tín hiệu cũng như cơ chế điều hoà. Bảng 5.1 chỉ ra sự khác biệt đó.

Bảng 5.1. **Sự khác biệt về điều hoà hoạt động biểu hiện gen giữa tế bào nhân sơ và tế bào nhân chuẩn**

Sự điều hoà hoạt động biểu hiện gen	Tế bào nhân sơ	Tế bào nhân chuẩn
Tín hiệu điều hoà	Các yếu tố tín hiệu gồm: - Yếu tố dinh dưỡng và yếu tố vật lý của môi trường.	Các phân tử tín hiệu gồm các hocmon và các nhân tố tăng trưởng được sản sinh ra từ các cơ quan chuyên biệt rồi di chuyển đến cơ quan đích điều chỉnh biểu hiện gen theo chương trình định sẵn cho phù hợp với sự phát triển cơ thể.
Cơ chế điều hoà	Chủ yếu ở giai đoạn phiên mã và cơ chế điều hoà biểu hiện gen thông qua các operon	Điều hoà biểu hiện gen thể hiện trong mọi giai đoạn như: phiên mã, dịch mã, sau dịch mã và cơ chế điều hoà thay đổi theo mọi giai đoạn đó.

2. Cơ chế điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở tế bào nhân chuẩn

Cơ chế điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở tế bào nhân chuẩn thì phức tạp hơn và bao gồm nhiều giai đoạn, đó là:

- Điều hoà bằng cách biến đổi cấu trúc nhiễm sắc chất hay cấu trúc phân tử ADN.

- Điều hoà ở giai đoạn phiên mã: kiểu dạng Cis và kiểu dạng Trans.

- Điều hoà ở giai đoạn dịch mã.

- Điều hoà ở giai đoạn sau dịch mã.

Đặc biệt trong điều hoà ở giai đoạn phiên mã, chúng tôi sẽ giới thiệu một mô hình điều hoà hoạt động gen có ở cơ thể đa bào bậc cao và liên quan tới vấn đề này chúng tôi cũng sẽ giới thiệu mô hình điều hoà biểu hiện gen thông qua màng tế bào.

Dưới đây sẽ trình bày chi tiết các vấn đề mô hình điều hoà hoạt động biểu hiện gen đó:

2.1. Điều hoà hoạt động biểu hiện gen bằng biến đổi cấu trúc

a. Biến đổi cấu trúc nhiễm sắc chất

Nhiễm sắc chất là cấu trúc liên kết của ADN và protein trong thời kỳ hai lần phân chia của tế bào. Khi sự phân chia nhân bắt đầu, người ta thấy nhiễm sắc chất chứa nhiều vùng "nhạy cảm". Các vùng đó chính là tương ứng với các gen hoạt động của tế bào. Khi cần biểu hiện, các gen đó sắp xếp lại trong một cấu trúc nhiễm sắc chất đặc trưng thuận lợi cho quá trình sao chép của phiên mã.

Đó cũng chính là sự điều hoà đầu tiên bằng cách biến đổi cấu trúc. Điển hình của kiểu điều hoà biến đổi này được biết rõ là gia đình các gen α, γ, δ, β của beta -globin. Các gen này được sắp xếp lại liền nhau trong một cấu trúc nhiễm sắc chất đặc trưng. Ở đầu 5' của cấu trúc nhiễm sắc chất có trình tự gọi là LCR (locus control region).

Trình tự này chịu trách nhiệm điều hoà hoạt động biểu hiện của các beta globin. Nó mang bốn vị trí nhạy cảm có khả năng tiếp nhận các protein điều hoà để phát động việc hoạt động phiên mã.

b. Biến đổi phân tử ADN

Đó là sự metyl hoá xảy ra trên gốc cytosin nằm trong cặp CG ở đầu 5' sẽ làm giảm hoạt động phiên mã.

Cũng có một số gen chỉ biểu hiện được khi có sự sắp xếp lại trình tự ADN như các gen của kiểu giới tính ở nấm men.

2.2. Điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở giai đoạn phiên mã

Trong giai đoạn này biểu hiện hai kiểu điều hoà hoạt động biểu hiện gen

1. Điều hoà kiểu dạng *cis*, tức là bản thân các trình tự ADN tham gia vào quá trình biểu hiện gen.

2. Điều hoà kiểu dạng *trans*, tức là các protein điều hoà tương tác vào các trình tự ADN để biểu hiện gen.

a. Điều hoà dạng cis

Các trình tự ADN tham gia vào quá trình biểu hiện gen gồm có: promotơ (promoter), enhanxơ (enhancer) và silenxơ (silencer). Bảng 5.2 phân biệt ba trình tự đó.

Bảng 5.2. **Điều hoà dạng Cis**

Các trình tự Cis	Trình tự promoter	Trình tự enhancer	Trình tự silencer
Vị trí và cấu trúc	- Trình tự nằm ở vùng đầu 5' (vùng không phiên mã của gen) - Cách xa vùng phiên mã có khi hàng ngàn cặp bazơ. - Cấu trúc gồm hai phân tử đối ứng nhau vì chính các trình tự này lại kết hợp với protein điều hoà dạng dime.	- Trình tự ở đầu 5' hoặc 3' hoặc ở giữa hoặc ngay trong intron. - Hướng xuôi hay đảo ngược cũng không làm mất hoạt tính.	Trình tự vị trí cũng giống enhancer
Vai trò	- Điều khiển sự phiên mã của gen (gen nào trong tế bào được biểu hiện thời điểm biểu hiện, và chịu sự tác dụng của nhân tố điều hoà nào).	- Gọi là nhóm trình tự khuếch đại nghĩa là làm tăng biểu hiện của gen lên.	Gọi là nhóm trình tự dập tắt, tức là kìm hãm hay dập tắt sự biểu hiện của gen.

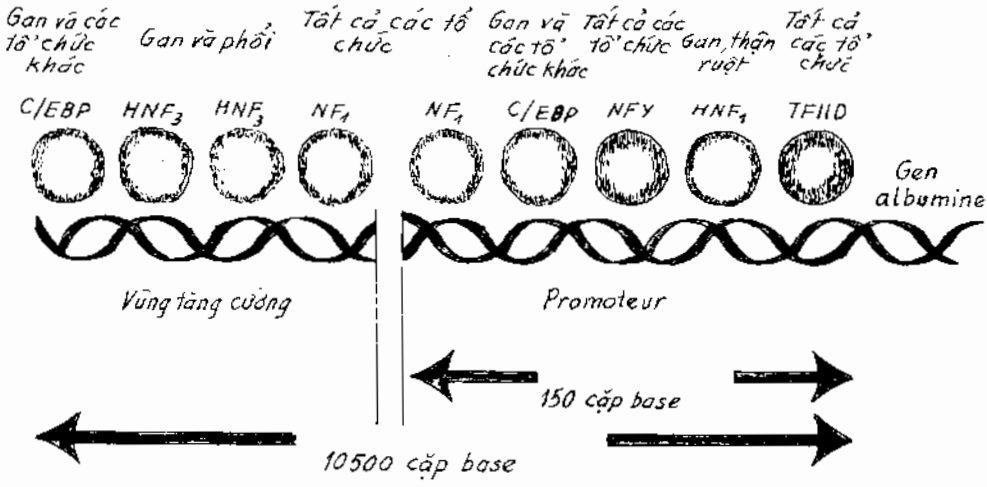
b. Điều hoà dạng trans

Các nhân tố protein tham gia vào quá trình điều hoà hoạt động biểu hiện gen gọi là protein điều hoà hay còn gọi là nhân tố trans. Các nhân tố này có nhiều vùng cấu trúc chức năng độc lập nhau như vùng chịu trách nhiệm gắn nhân tố trans vào trình tự ADN ở gần gen cấu trúc; vùng tác động lên phiên mã bằng cách thay đổi hoạt động của ARN polymeraza; vùng gắn hocmon; vùng gắn các ion để trả lời những tín hiệu xuất phát ở ngoài hoặc

trong tế bào từ đó ảnh hưởng tới hoạt động của gen.

Bộ gen đơn bội ở người có khoảng 30.000 – 40.000 gen. Mỗi một protein được mã hoá trong một gen, tức là một đoạn ADN. Tất cả các gen trong một cơ thể đa bào không cùng được mã hoá, bởi vì như vậy tất cả các tế bào sẽ không khác gì nhau. Điều này thực tế cũng đã không xảy ra. Người ta coi bộ gen đơn bội như một bộ sách lớn, mỗi trang là một gen. Mỗi tế bào là một cuốn sách. Phương thức đọc bộ sách này được giám sát một cách chặt chẽ, đến mức mỗi một loại tế bào chỉ đọc một số trang nào đó. Việc giám sát đó chính là "*protein điều hoà*".

Một protein điều hoà có thể tác động lên nhiều gen và một gen chịu ảnh hưởng của nhiều protein điều hoà. Các protein điều hoà nhận biết chính xác ADN và cố định vào ARN nhờ các dạng cấu trúc đặc biệt của nó tạo thành vùng cố định, tại đó các protein điều hoà sẽ liên kết với các vị trí tương ứng trên ADN bằng những liên kết yếu như liên kết hydro, liên kết Van-der Walls... Trong protein điều hoà còn có vùng tác động, chính vùng này hoạt hoá ARN polymerase nhưng vùng này còn ít được biết đến.



Hình 5.3. **Mỗi một gen chịu sự điều khiển của nhiều protein điều hoà**

Gen albumin được trang bị bởi nhiều đoạn điều hòa ở gần gen hoặc ở cách xa vùng gen gọi là enhancer. Trên mỗi đoạn được cố định một protein điều hòa như HNF_1, NFY... Những protein này chỉ cùng có mặt trong gan, ở đó gen của albumin được bộc lộ và hoạt động.

Thí dụ sự điều hoà tổng hợp albumin ở tế bào gan chịu sự điều khiển của nhiều protein điều hoà (hình 5.3). Gen albumin có nhiều đoạn điều hoà ở gần gen hoặc ở cách xa vùng gen cấu trúc gọi là vùng tăng cường. Trên mỗi đoạn được cố định một protein điều hoà như HNF_1, NFY... những protein này chỉ có mặt trong gan, chỉ ở trong gan có đầy đủ các protein điều hoà gen albumin mới hoạt động tổng hợp ra albumin.

c. Sự tương tác cis –trans

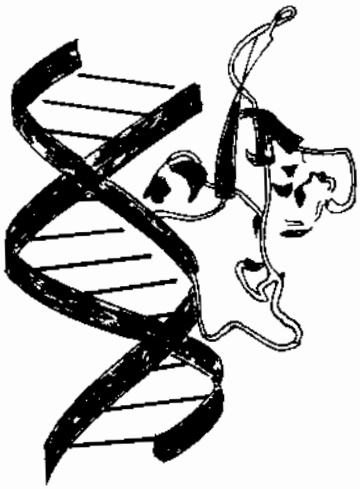
Trình tự cis và nhân tố trans có thể tương tác đặc hiệu do sự tạo thành những liên kết yếu giữa các nucleotit của nhân tố trans và các bazơ của trình tự cis.

Vì phân tử ADN có cấu trúc xoắn kép cố định trong không gian nên các nhân tố trans cũng phải có cấu trúc không gian cố định tương ứng thì mới đạt được sự tương tác bền vững đó là cấu trúc như đã giới thiệu ở trên xoắn - vòng - xoắn (helix - turn - helix), xoắn - nút - xoắn (helix - loop - helix) hoặc ngón tay kẽm (zine - figer) hoặc dây kéo dime (leucine - zipper) v.v... Các cấu trúc này ở dạng dime khi gắn lên trình tự cis (hình 5.4, 5.5, 5.6 và 5.7).

Dưới đây là bảng các dạng protein điều hoà (bảng 5.3)

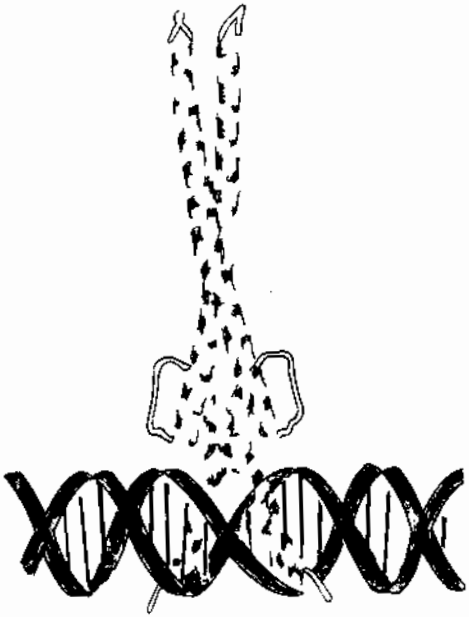
***Bảng 5.3.* Các dạng protein điều hoà**

TT	Đặc điểm / Các dạng protein điều hoà	Đặc điểm cấu trúc	Thí dụ, chức năng
1	Dạng "xoắn-vòng-xoắn" (Helix-turn-helix)	Protein có cấu hình không gian xoắn-vòng-xoắn để vững chãi.	Protein HNF_3 trong hoạt hoá operon ở gan
2	Dạng "xoắn-nút-xoắn" (Helix-loop -helix)	Protein có cấu hình không gian xoắn-nút-xoắn .	Protein MAX kiểm tra sự biệt hoá và tăng sinh tế bào cơ.
3	Dạng "ngón tay kẽm" (Zine-finger)	Protein có chứa nguyên tố Zn bao quanh bởi bốn acid amin.	- Protein $GATA_1$ tham gia biệt hoá globin hồng cầu. - Protein thụ thể của hocmon steroid.
4	Dạng "dây kéo lơxin" (Leucine – zipper)	Protein có chứa lơxin dạng dây kéo fermetur	- Protein GCN_4 tham gia chuyển hoá acid amin ở men bia. - Protein Jun và protein Fos kiểm tra sự tăng sinh tế bào.



Hình 5.4. **Protein điều hòa HNF_3**

có dạng "xoắn – vòng – xoắn" HNF_3, có vai trò trong việc phân hóa chức năng của tế bào gan (tổng hợp albumin).

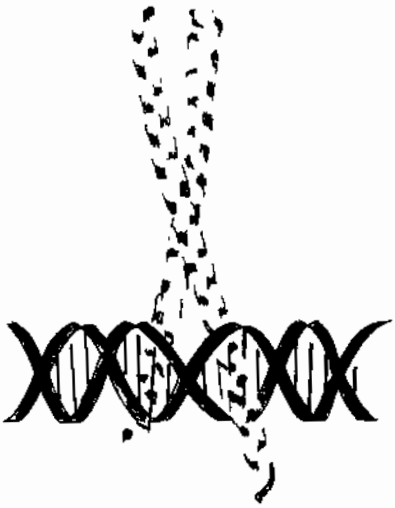


Hình 5.5. **Protein điều hòa MAX**

có dạng "xoắn – nút – xoắn" kiểm tra sự tăng sinh và sự biệt hóa của tế bào.

Hình 5.6. **Protein điều hòa $GATA_1$**

có dạng "Zinc-finger" tham gia vào sự biệt hóa của những globin hồng cầu



Hình 5.7. **Protein điều hòa GCN_4**

có dạng "Fermeture éclai à leucines" tham gia vào sự chuyển hóa các acid amin ở men bia

Hoạt động của hocmon (hormon) trên biểu hiện gen hocmon tuyến giáp, hocmon steroid phải thông qua thụ thể của chúng. Các thụ thể hocmon này gắn vào trình tự cis của gen đích. Khi có hocmon gắn vào vùng tiếp nhận hocmon của thụ thể, sẽ làm thay đổi cấu hình thụ thể dẫn đến hoạt hoá gen đích (đó chính là do thay đổi cấu hình không gian của thụ thể).

- Sự tương tác protein - protein

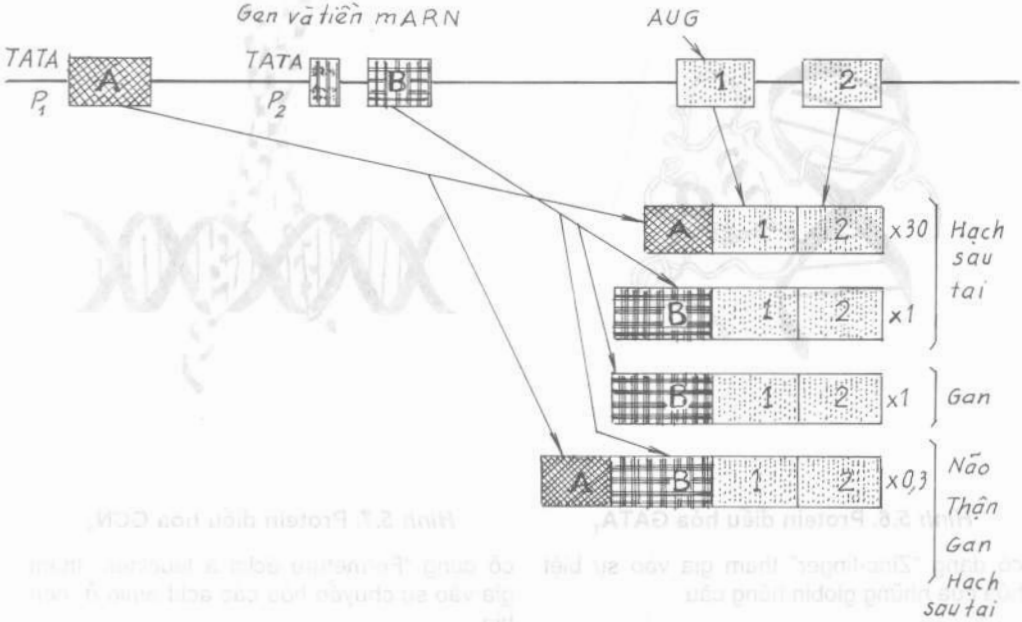
Protein trans một mặt gắn vào trình tự cis ở đầu 5' của gen đích, mặt khác tương tác với những protein điều hoà khác.

Sự tương tác giữa protein trans và các protein điều hoà khác cùng với sự gặp lại của nhiễm sắc chất sẽ tạo ra một cấu trúc thuận lợi cho sự gắn enzym ARN polymeraza vào promotơ của gen đích. Lúc đó sự phiên mã của gen đích bắt đầu.

- Điều hoà hoạt động biểu hiện gen bằng chọn lọc promotơ

Đây cũng là kiểu điều hoà ở tế bào nhân chuẩn dựa vào sự tương tác cis - trans nhưng cơ chế hơi khác là điều hoà bằng chọn lọc promotơ.

Điển hình là gen α - amylaza, gen này có hai promotơ, mỗi promotơ có hoạt tính phiên mã khác nhau và chịu trách nhiệm phiên mã một loại mARN nhất định đặc trưng cho mô (hình 5.8).



Hình 5.8. **Mô hình điều hoà biểu hiện gen α- amylaza**

Còn sự chọn lọc promotơ hoạt động lại tuỳ thuộc các nhân tố trans hiện diện trong từng loại mô ấy. Như vậy chính sự tương tác giữa trình tự cis và nhân tố trans đặc trưng cho mô sẽ quy định loại mARN được phiên mã ở đó.

- Các chất ức chế sự tổng hợp ARN

Người ta biết một số chất ức chế sự sao chép ARN là cơ sở nhân chuẩn giống như rifampicin ức chế ARN polymeraza ở vi khuẩn, đó là:

+ Alpha manitin ức chế ARN polymeraza ở tế bào có nhân, mà chất này có trong nấm độc *Amanita phalloid* ức chế các enzym, ARN polymeraza tổng hợp mARN, rARN, tARN với nồng độ khác nhau.

+ Actinomycine D có nhân phenoxazone. Nếu nó chêm vào giữa hai bazơ guanin và cytosin gây ra sự biến dạng ADN khuôn, ngăn trở sự chuyển dịch của ARN polymeraza trong tổng hợp ARN.

2.3. Điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở giai đoạn sau phiên mã

mARN vừa được phiên mã ra không được dịch mã ngay mà phải trải qua một chặng đường dài để trưởng thành. Ở chặng đường này có nhiều cơ chế để điều hoà về chất cũng như về lượng các mARN sẽ được dịch mã. Đó là:

- Loại bỏ intron và cách nối exon của mARN cũng là một kiểu điều hoà sự ghép nối khác biệt các exon của mARN sơ cấp để dẫn tới mARN có thể đưa đến hình thành các mARN để dịch mã khác nhau và do đó dẫn đến các protein tạo thành có chức năng biểu hiện khác nhau.

- Gắn đuôi poly A làm cho mARN trưởng thành ở thể ổn định.

- Làm tăng khả năng dịch mã nhờ khởi sự dễ dàng.

- Gắn mã chụp 7 - metyl guanin làm cho mARN càng bền vững càng sống lâu thì số lượng protein tương ứng được sản sinh ra càng nhiều. *Điều này có liên quan đến khả năng sinh sản vô tận của tế bào ung thư.*

- Sự dự trữ các mARN trong các tế bào cũng là một phương tiện điều hoà. Có gen phiên mã ra mARN nhưng mARN đó được dự trữ chờ thời cơ có tín hiệu xuất hiện thì mARN ở đó mới được dịch ra.

2.4. Điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở giai đoạn dịch mã

Dịch mã là một dạng tiêu thụ dự trữ mARN. Tăng cường dịch mã để

hình thành nhiều các protein có chức năng hoạt động trong tế bào. Đó cũng là một cách điều hoà hoạt động biểu hiện gen.

Quá trình điều hoà này phụ thuộc nhiều vào các yếu tố mở đầu (IF), yếu tố kéo dài (EF) và yếu tố kết thúc (RF) mà trong phần sinh tổng hợp protein đã giới thiệu.

2.5. Điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở giai đoạn sau dịch mã

Các protein được tạo ra sau dịch mã có thể trải qua nhiều giai đoạn hoàn thiện hoá học như glycosyl hoá, phosphoryl hoá, axetyl hoá... xoắn alpha, xoắn beta, tạo cấu trúc bậc hai, bậc ba, bậc bốn *v.v*... để có chức năng thực sự trong tế bào đòi hỏi phải có sự điều hoà hoạt động rất tinh vi và phức tạp.

Chú ý: Ngoài các loại cơ chế điều hoà hoạt động trên còn có cơ chế làm suy yếu sự sao chép và cơ chế SOS (cơ chế cấp cứu ngừng ngay sự sao chép một cách khẩn cấp).

III. MÔ HÌNH ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG BIỂU HIỆN GEN Ở CƠ THỂ ĐA BÀO BẬC CAO

Các thành phần cis và trans và sự tương tác giữa chúng trong quá trình phiên mã được sắp xếp trong một mô hình điều hoà hoạt động biểu hiện gen ở cơ thể đa bào bậc cao đã được Georger, Britten và Davidson (1969) mô tả trong cuốn sách "*Tế bào và sự phát triển*" xuất bản năm 1981. Ở đây sẽ trình bày vắn tắt, nhấn mạnh một số điểm chính của các mô hình này:

Bộ gen trong tế bào của cơ thể đa bào bậc cao có hàng loạt những đặc trưng riêng của nó khác với tế bào vi khuẩn. Chẳng hạn:

- số lượng gen nhiều gấp bội;
- các gen này đều kết hợp với protein;
- khu trú trong nhân và có màng nhân bao bọc;
- có nhiều đơn vị nhân lên đồng thời (replicons);
- có thể dễ dàng trao đổi những đoạn gen trong thời kỳ phân bào giảm nhiễm.

Ngay tổ chức phân tử của bộ gen tế bào cơ thể bậc cao cũng khác với vi khuẩn.

- chứa nhiều những đoạn ADN nhắc lại (tỷ lệ coi là 1);

- chứa ARN nhân (0,05 - 0,25);

- chứa protein kiềm như histon (tỷ lệ 0,7 - 1);

- chứa các protein acid (tỷ lệ 0,25 - 1).

Những đặc điểm riêng kể trên của tổ chức bộ gen ở tế bào cơ thể bậc cao đưa đến giả thuyết rằng, cơ chế điều hoà hoạt động gen ở những tế bào này thì khác với cơ chế điều hoà hoạt động gen ở vi khuẩn.

Trong những năm gần đây, sự điều hoà hoạt động gen ở cơ thể bậc cao được hướng về vai trò của histon, các ADN nhắc lại, các protein acid và các ARN nhân vì bốn lý do sau đây:

- Chúng là những thành phần phân tử, được sắp xếp cấu tạo nên bộ máy di truyền của tế bào bậc cao.

- Chúng có mặt ở gen thường xuyên.

- Chúng được sản xuất ra bởi gen.

- Chúng có thể tham gia vào các hoạt động của gen theo một cơ chế lý hoá xác định.

Năm 1969, Britten và Davidson đã nêu ra một mô hình giả thuyết về điều hoà hoạt động gen ở cơ thể bậc cao. Trong mô hình này kết cấu hoạt động có hai kiểu:

Kiểu 1, gồm nhiều gen tiếp nhận và một gen hợp nhất nằm trong một hệ thống gen tham gia điều hoà và tổng hợp một loại protein nhất định.

Kiểu 2, ngược lại, tổ chức hệ thống gen là bao gồm một gen tiếp nhận và nhiều gen hợp nhất.

Cả hai kiểu bố trí đó của mô hình đã giải thích rõ sự có mặt của những phân tử ARN nhân và ADN nhắc lại. Một lượng lớn những đoạn nucleotit được nhắc lại đây có thể đóng vai trò của những gen đồng hoá hay tiếp nhận trong mô hình hai kiểu này.

Trong số những khái niệm khác, còn có giả thuyết tổ chức chức phận gen của Georgiev (1969). Trong mô hình này những gen điều hoà liên lạc với gen cấu trúc qua các phần tử protein điều hoà. Điểm giống nhau của mô hình này với mô hình của Britten và Davidson ở chỗ chỉ ra được vai trò những đoạn nucleotit nhắc lại trong bộ gen. Những đoạn đó nằm trong vùng *gen điều hoà*. Điểm khác nhau giữa hai mô hình là chất điều hoà hoạt động

các gen trong mô hình Georgiev là các protein điều hoà, còn ở mô hình Britten và Davidson là những phân tử ARN nhân.

Nhìn chung, mỗi một mô hình tổ chức chức phận gen nói trên đều chú ý đặc biệt đến phân tử ADN nhắc lại. Còn ARN nhân, các protein điều hoà thì có mô hình đề cập chất này, có mô hình đề cập chất kia. Vì vậy, sự thật ra còn rất nhiều sự kiện đòi hỏi phải làm sáng tỏ.

Hiện nay, dựa trên những tài liệu thu thập được từ các lĩnh vực nghiên cứu khác nhau của sinh học phân tử ta có thể hình dung một sự điều hoà hoạt động gen ở cơ thể bậc cao với sự tham gia của các thành phần phân tử ADN nhắc lại, ARN nhân, histon và protein acid. Các phân tử này đã được phân tích kỹ mặt lý học, hoá học và cấu trúc dưới kính hiển vi điện tử. Sự chuyển hoá và vai trò sinh học của chúng cũng được nghiên cứu tỷ mỷ. Dựa vào những thành tựu đó, một mô hình điều hoà chức phận gen có thể được tổ chức hoạt động như sau:

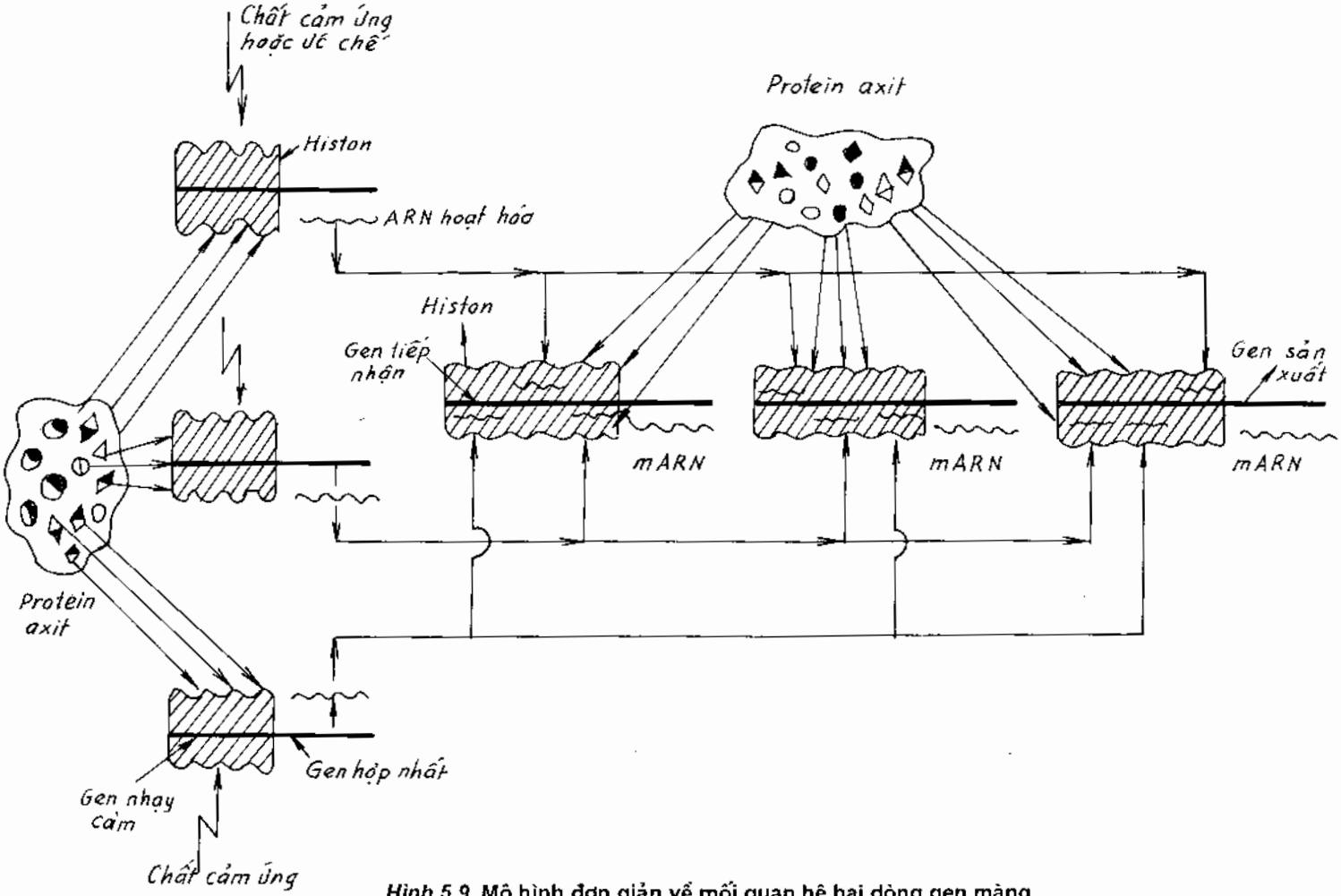
Về phương diện tổ chức hệ thống điều hoà thì mô hình gồm các loại gen khác nhau, các phân tử điều hoà khác nhau, các chất gây cảm ứng và ức chế và các sản phẩm của các hoạt động gen.

Các gen khác nhau được mô tả trong mô hình (hình 5.9) làm người ta nhớ lại một mô hình gồm một gen hợp nhất và nhiều gen tiếp nhận của Britten và Davidson, nghĩa là mô hình gồm bốn loại gen:

- gen nhạy cảm;
- gen hợp nhất;
- gen tiếp nhận;
- gen sản xuất.

Song, trên bản đồ kết cấu hệ thống điều hoà hoạt động gen thì mỗi gen nhạy cảm đi liền với mỗi gen hợp nhất, còn mỗi gen sản xuất lại dính liền với mỗi gen tiếp nhận.

Các phân tử điều hoà bao gồm histon acginin bao phủ theo gen nhạy cảm và gen tiếp nhận, còn phân tử histon giàu lizin thì cắt ngang các gen, duy trì cấu trúc xoắn đôi của ADN. Protein acid và các enzym thì đi vào các gen ở chỗ có mặt của histon. ARN nhân - loại phân tử nhỏ - sản phẩm của gen hợp nhất thì đi vào các gen tiếp nhận.



Hình 5.9. **Mô hình đơn giản về mối quan hệ hai dòng gen màng**

Các chất gây cảm ứng và ức chế là những chất nội tiết, chất cảm ứng bào thai, chất gây phân bào, v.v... đi vào và kích thích phức hợp của histon giàu arginin và gen nhạy cảm.

Còn sản phẩm hoạt động của các gen là các loại ARN. ARN nhân phân tử nhỏ là sản phẩm của gen hợp nhất, ARN nhân phân tử lớn không đồng nhất là sản phẩm của các gen tiếp nhận và ARN thông tin là sản phẩm của gen sản xuất.

1. Nguyên tắc hoạt động của mô hình

Các dấu hiệu từ ngoài vào liên kết với histon acginin ở gen nhạy cảm theo hiệu ứng đị không gian và làm thức tỉnh gen này trong tình trạng đang ngái ngủ. Do đó toàn bộ hệ thống gen trong tình trạng mở. Lúc đó protein acid bao gồm cả ARN polymeraza được tích tụ ở gen hợp nhất. Gen này được kích thích và sản xuất ra SnARN. Sau đó các SnARN đồng thời với protein acid được chuyển tới các gen tiếp nhận, mà ở đấy có histon giàu acginin loại khác (chẳng hạn F2al) sẽ bị biến đổi. Những gen tiếp nhận được giải phóng và SnARN có thể nhận biết được chính gen của mình và do đó HnARN được sản xuất và ARNm càng được tạo ra qua gen sản xuất HnARN có thể là chất tiền thân của SnARN, nhưng cũng có thể đóng vai trò khác là mã hoá những protein điều hoà trong vùng nhân chẳng hạn.

2. Một số nhận xét về mô hình

Mô hình nói trên biểu hiện một cách chặt chẽ hơn trong hoạt động điều hoà gen. Một biểu hiện cụ thể là không có một gen nào trong hệ thống là không được kiểm tra. Có sự điều hoà tại chỗ trong những gen dính kết nhau trên bản đồ gen bởi histon và protein acid, đồng thời cũng có một sự điều hoà chung trong toàn bộ hệ thống và nhiều hệ thống bởi SnARN. Như vậy sự điều hoà tại chỗ phụ thuộc vào sự điều hoà của toàn bộ hệ thống. Cả hai sự điều hoà (tại chỗ của mỗi gen và toàn bộ hệ thống của nhiều gen) thì lại phụ thuộc bởi dấu hiệu của môi trường bên ngoài (phần bào tương). Như vậy mô hình này thiết lập từng bước của sự điều hoà.

Ở cơ thể sinh vật cần phải có một cơ chế điều hoà phức tạp và chặt chẽ nói trên để bảo vệ nói giống và phát triển một cách bình thường trong môi trường mà ở đấy thường xuyên có nhiều những yếu tố thuận lợi hoặc không thuận lợi đối với các gen. Ở đây còn biểu hiện rằng, bên cạnh chức phận điều hoà, histon còn đóng một vai trò làm bền và bảo vệ những gen quan

trọng trong hệ thống di truyền.

Trong mô hình này, sự thật ra gen nhạy cảm và histon giàu acginin thì quan trọng bậc nhất trong hệ thống điều hoà. Những phần còn lại của hệ thống thì chỉ hoạt động với vai trò thụ động. Gen nhạy cảm thì có khả năng phân phối dấu hiệu đơn giản đến một gen sản xuất bởi sử dụng những đường mạch như đã chỉ ra trong mô hình, mà dấu hiệu đó là một phần của chương trình đã được chương trình hoá sẵn từ bào thai. Histon giàu acginin bao phủ lên gen nhạy cảm thì có hiệu ứng dị không gian.

Điểm trung tâm của giả thuyết này là vai trò của bốn phân tử: ADN nhắc lại, ARN nhân, histon và protein acid. Những phân tử này đã thể hiện được vai trò của chúng trong mô hình tổ chức và điều hoà hoạt động gen này.

Mô hình hiện nay cũng nói lên được mối quan hệ chặt chẽ giữa nhân, bào tương và môi trường bên ngoài tế bào tác động qua lại trên hệ thống gen. Bởi vì sự hoạt động được của các gen trong hệ thống điều hoà phải lệ thuộc vào các chất cảm ứng, ức chế từ ngoài, các phân tử protein điều hoà từ bào tương vào nhân, v.v...

Những điều khác nhau của mô hình này với các mô hình trước đây cũng đã được xác định rõ. Mô hình của Britten và Davidson thì chú ý nhiều đến phân tử ADN nhắc lại, ARN nhân và đặc biệt là vai trò của ARN nhân trong điều hoà. Mô hình của Georgiev thì xác định vai trò của ADN nhắc lại và protein acid. Còn mô hình hiện nay đều chú ý đến cả bốn loại phân tử tham gia trong tổ chức hình thái của thể nhiễm sắc.

Trong mô hình hiện nay, mức độ thông tin được phóng đại gấp bội - mà điều đó không tìm thấy trong mô hình của Jacob và Monod. ở đây một dấu hiệu thì được trả lời nhiều hướng. Điều đó có nghĩa là một dấu hiệu có thể kéo theo nhiều hoạt động enzym và một hoạt động enzym thì lại kéo theo nhiều dấu hiệu.

Sự trả lời đa hướng trong đa bào, hình như được biểu hiện ở vai trò của histon acginin vì hiệu ứng dị không gian của nó. Ở đây vai trò của histon acginin rất giống như vai trò của chất áp chế trong mô hình của Jacob và Monod. Như vậy có thể nghĩ rằng chất áp chế trong mô hình Jacob và Monod tuy không phải là histon, nhưng có lẽ giống histon. Thêm vào đó hệ điều hoà này về cơ bản không khác với hệ điều hoà trong vi khuẩn vì nó cũng có hệ gen điều hoà và hệ gen thông tin. Từ những bằng chứng đó có thể

nghĩ rằng: tế bào vi khuẩn là tổ tiên của những tế bào đa bào.

Một điều nữa cũng cần phân biệt ở đây là hệ gen ở vi khuẩn theo Jacob và Monod thì luôn luôn là hệ mở, hệ sẵn sàng hoạt động. Ngược lại ở cơ thể bậc cao thì hệ gen trình bày ở đây lại luôn luôn ở tình trạng đóng, nghĩa là bị ức chế, không hoạt động. Có thể, ta mới dễ dàng hiểu được tình trạng biệt hoá tế bào ở mức độ hoạt động gen. Tất nhiên trong mô hình này còn nhiều điểm đòi hỏi phải có thực nghiệm xác nhận, và còn phải làm sáng tỏ nhiều hơn nữa.

Hiện nay người ta coi những thay đổi tế vi trong phân tử histon - như hiện tượng metyl hoá hay khử metyl axetyl hoá và hiện tượng photphorin hoá hay khử photphat trên protein không phải histon cũng như sự hình thành đơn vị ADP - riboza từ NAD - như được bao gồm trong điều hoà hoạt động gen và các quá trình khác như cơ chế sửa chữa ADN, sự hình thành polyamin, sự giải phóng các enzym ở lysoxom... cũng đều đóng vai trò trong điều hoà hoạt động gen của tế bào - mà thể hiện cụ thể trong quá trình phân chia tế bào.

IV. ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG BIỂU HIỆN GEN THÔNG QUA MÀNG TẾ BÀO TRONG SỰ PHÂN CHIA TẾ BÀO

1. Thành phần hoá học của màng bào tương

Màng bào tương của các tế bào động vật gồm chủ yếu là protein, lipit và một lượng nhỏ chất đường. Ở tế bào hồng cầu, các thành phần hoá học của màng được phân tích như sau: lipit chiếm 35%, protein 55%, và gluxit 10%. Ở tế bào gan lipit chiếm khoảng 40%, protein 60%, còn gluxit thì dưới 1%. Bề mặt bên ngoài của màng bào tương thường chứa gluxit, tích điện âm bởi vì được liên kết với những nhóm cacbocxi, photphat hay acid sialic.

1.1. Lipit. Thành phần chủ yếu của màng bào tương là photpholipit 55% trong đó lexitin chiếm khoảng 20%. Cholesterol chứa nhiều ở màng này hơn các màng khác và đóng vai trò quan trọng trong tình trạng lý, hoá của màng bào.

1.2. Gluxit. Các hexoza, hexozamin, fucoza và acid sialic thì liên kết chủ yếu với protein. Acid sialic thì nhạy cảm với enzym nơraminidaza và gắn với protein bởi gốc N-axetylgalactozamin ở bề mặt bên ngoài của màng. Một lượng nhỏ acid sialic cũng tồn tại trong dạng gangliasid (tức là

glycolipit) trong màng bào tương.

1.3. Protein. Protein bào gồm glycoprotein và các enzym màng bào tương. *Hiện nay người ta biết tới 30 enzym khu trú ở màng này.* Những enzym thường xuyên gặp là năm nucleotitdaza, các loại ATPaza, acid photphataza, ARN-aza, *v.v...* Có một số protein có thành phần acid amin và tính chất giống actin của cơ và của microtubul.

2. Tổ chức phân tử của màng bào tương

Mô hình đầu tiên của cấu trúc màng được đề nghị bởi Darwson và Danielli bao gồm hai lớp lipit với sự buộc vào các phân tử protein ở hai phía ngoài.

Sau đó mô hình đã được thay đổi. Protein không cho buộc vào hai lớp lipit mà còn ngập trong đó. Hiện nay protein liên kết màng được phân thành hai loại: *protein bên ngoài* và *protein xen vào trong*. Protein bên ngoài thì liên kết yếu với màng, ngược lại protein xen vào trong thì lại liên kết chặt chẽ với màng. Loại liên kết chặt vào màng này chiếm khoảng 70-80% toàn bộ protein màng và bao gồm các enzym, protein kháng nguyên, protein vận chuyển, các protein nhận hocmon, thuốc. Một trong những đặc trưng của enzym màng thông thường đòi hỏi lipit để hoạt động.

Hiện nay người ta quan niệm tổ chức phân tử của màng hình thành nên một cấu trúc lỏng, mà cấu trúc này phụ thuộc vào tỷ lệ giữa photpholipit và cholesterol. Người ta thấy rằng cholesterol ảnh hưởng mạnh mẽ đến sự sắp đặt của các phân tử photpholipit. Nếu thêm cholesterol vào photpholipit thì gây ra một tình trạng mới của màng, sẽ trở nên rất đậm đặc khi ở nhiệt độ cao và ngược lại, lại rất lỏng khi ở nhiệt độ thấp. Như vậy, bình thường cholesterol có mặt trong màng gây nên một tình trạng trung bình của tính lỏng màng phù hợp với các hoạt động sinh lý của tế bào.

3. Vai trò của màng bào tương

Màng bào tương của tế bào có những chức phận chính sau đây:

Ngăn cách giữa các tế bào với nhau, giữa tế bào với môi trường bên ngoài.

3.1. Nhập nội và xuất ngoại các chất

Nhập nội tức là lấy các chất từ môi trường bên ngoài vào tế bào. Trong

trường hợp này, người ta phân biệt hai hiện tượng: thực bào và ẩm bào.

Xuất ngoại có nghĩa là bài tiết các chất được sản xuất từ tế bào ra ngoài môi trường.

3.2. Sự thấm các chất

Trong trường hợp thấm các chất của màng, người ta cũng phân biệt ra sự thấm thụ động và thấm chủ động.

3.3. Sự nhận diện tế bào và các chất dính kết

Vấn đề này rất phức tạp, người ta gán cho vai trò của glycocalix nằm ở bề mặt bên ngoài của tế bào đóng vai trò quyết định. Về cơ chế nhận diện thì chưa rõ ràng, song có nhiều giả thuyết.

a. *Giả thuyết của Ehrlich Tylerweiss* với gợi ý bề mặt tế bào mang những thành phần giống kháng nguyên và kháng thể và chúng nhận diện nhau theo kiểu kết hợp kháng nguyên kháng thể đó.

b. *Giả thuyết những yếu tố dính kết đặc biệt* mà những yếu tố đó có thành phần hoá học là glycoprotein. Chất này được tổng hợp trong tế bào và bài tiết ra môi trường ở dạng hoà tan và làm nhiệm vụ dính kết.

c. *Giả thuyết enzym cơ chất* do Roseman nêu ra. Theo giả thuyết này, sự nhận mặt các tế bào và sự dính kết giữa chúng thì được trung gian bởi sự tác dụng tương hỗ giữa cơ chất cacbohydrat và enzym glycosyl transferaza trên bề mặt các tế bào.

d. *Giả thuyết tác dụng tương hỗ* giữa các phân tử proton trong các phân tử oligomer của Naijor qua liên kết hydro giống như kết hợp giữa các chuỗi α và β trong hemoglobin.

e. *Giả thuyết lưới mã hoá màng* của Changeu - Oosowa. Hình ảnh chủ yếu của mô hình này là thông tin đặc hiệu được mã hoá trong sự phân phối địa hình của những codon màng. Ngoài ra còn một số giả thuyết khác nữa.

3.4. Sự di chuyển tế bào

Các tế bào muốn di chuyển được cần phải dẫn truyền những lực sinh ra trong nó với môi trường qua bề mặt tế bào. Do đó màng tế bào đóng vai trò quan trọng trong di chuyển tế bào.

3.5. Sự sinh sản và lớn lên của tế bào

Hiện nay, người ta đề cập nhiều đến vai trò của màng bề mặt tế bào trong sinh sản và lớn lên của tế bào. Một hiện tượng biết rất rõ trong môi trường tế bào là hiện tượng ức chế tiếp xúc. Các tế bào trong nuôi cấy sinh sôi nảy nở đến mức chúng chạm nhau trên lớp bề mặt của môi trường nuôi cấy thì ngừng, do đó sự tiếp xúc gây ra hiện tượng ức chế sinh sản tế bào. Ngoài ra người ta còn thấy những hiện tượng khác thông qua các chất ở bề mặt tế bào để kích thích hoặc ức chế sự phân chia tế bào - mà cơ chế của những hiện tượng đó là sẽ được giới thiệu ở phần dưới đây.

4. Điều hoà của hoạt động màng trong sự phân chia tế bào

Hiện nay, ngoài vai trò chính của gen trong hoạt động phân chia tế bào, người ta còn nói nhiều đến vai trò của màng. Vậy thông qua một số cơ chế còn bàn cãi sau đây, người ta gán cho màng vai trò này.

4.1. Mối liên quan giữa màng với hệ thống Ca^{2+} - cAMP - cGMP

Enzym adeninxyclaza nằm ở màng bào tương và enzym guanilatxyclaza cũng nằm ở đấy, chúng tham gia tạo ra cAMP và cGMP. Những enzym này được hoạt hoá bởi các hocmon và bị ức chế bởi ion Ca^{2+}. Một enzym khác photphodiesteraza nằm ở trong bào tương lại thuỷ phân các cAMP và cGMP và được hoạt hoá bởi ion Ca^{2+}.

Lượng cAMP và cGMP được hình thành nhiều ít qua hoạt động của các enzym màng và nội bào nói trên đóng vai trò quan trọng trong phân chia tế bào như chúng đã biết.

4.2. Mối quan hệ giữa các chất nhận của màng với hệ thống microfilament và microtubule

Trên bề mặt tế bào có chứa các chất nhận có bản chất glycoprotein của nhiều loại - như chất nhận thuốc, chất nhận nội tiết tố, chất nhận các chất kích thích sự phân bào *v.v*... Trong và dưới đó của màng tế bào có chứa các microfilament và microtubule - là tập hợp của các thành phần protein giống actin của cơ, *v.v*... Hệ thống này lại được liên quan đến bộ máy phân bào của tế bào. Do đó khi một biến điệu dẫn ra môi trường bên ngoài có thể ảnh hưởng đến cấu trúc dưới màng qua phân tử nhận glycoprotein. Từ sự thay đổi này dẫn đến ảnh hưởng tổng hợp ADN và phân chia tế bào.

4.3. Tình trạng hoá lỏng của màng

Đó cũng là một yếu tố hoá học, tạo điều kiện cho các chất kích thích phân bào kể cả các tia xạ tăng cường hoạt động bởi sự đi qua màng dễ dàng.

Vận chuyển thức ăn từ môi trường phục vụ cho quá trình phân chia tế bào. Khi có yếu tố phân bào tác dụng lên chất nhận bề mặt tế bào thì sẽ làm hoạt hoá các proton vận chuyển của màng và quá trình tăng cường vận chuyển qua màng được xảy ra. Điều này dễ hiểu, vì quá trình phân chia tế bào đòi hỏi phải có sự cung cấp nguyên liệu và năng lượng đầy đủ. Sự cung cấp này nhờ nguồn thu thức ăn duy nhất ở môi trường bên ngoài. Màng đóng vai trò chủ yếu ở đây là tăng cường vận chuyển các thức ăn đó vào bên trong để tế bào sử dụng.

5. Quan hệ gen - màng trong sự phân chia tế bào

Căn cứ vào những vấn đề đã trình bày ở trên, tác giả trong quyển sách tế bào và phát triển đã đề xuất một mô hình chung về mối quan hệ gen - màng trong phân chia tế bào - mà nó bao gồm những hiểu biết và những kiến thức mới trong lĩnh vực này.

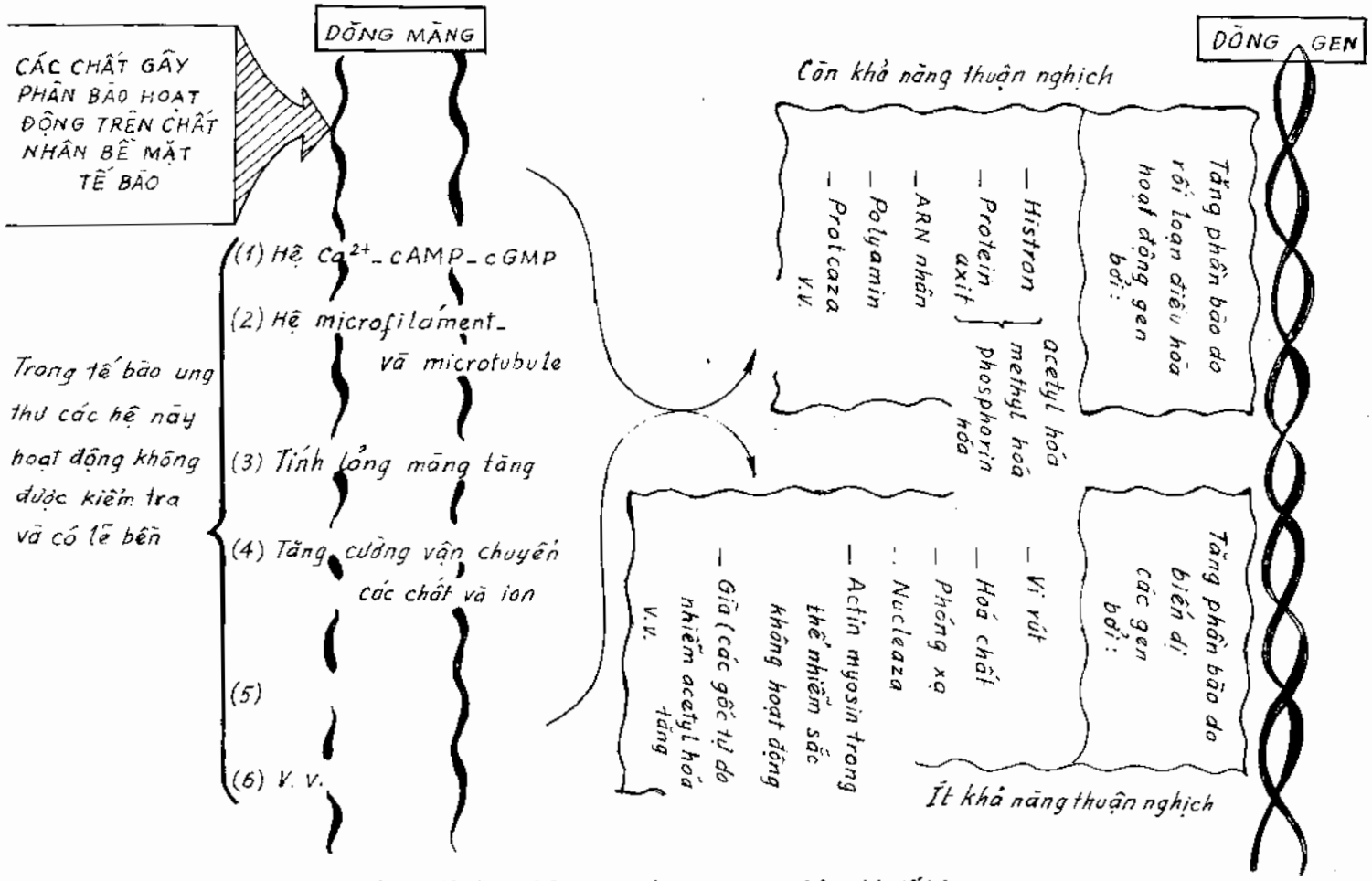
Mô hình trình bày hai dòng trong cơ chế phân bào (hình 5.10).

5.1. Dòng màng

Những kích thích gây phân bào từ môi trường bên ngoài đi vào, tác dụng tương hỗ với thành phần thích ứng ở bề mặt tế bào gây ra một loạt thay đổi ở màng có liên quan tới các hệ thống: Ca^{2+} - cAMP - cGMP microfilament - microtubule, sự tăng cường vận chuyển các chất và ion qua màng, tính lỏng màng, *v.v*... Tất cả những thay đổi này đều được chuyển vào nhân mà cụ thể là trên thể nhiễm sắc hoặc bằng con đường trực tiếp, hoặc bằng con đường gián tiếp.

5.2. Dòng gen

Khi có những tín hiệu ở bên ngoài vào thì, nhiều gen có sự cảm ứng và tăng cường hoạt động. Vai trò của một loạt các hiện tượng metyl hoá axetyl hoá các histon, photphorin hoá các protein nhân, các polyamin, các ARN nhân và một loạt các gen (nhạy cảm, hợp nhất, tiếp nhận, sản xuất v.v...) hoạt động kéo theo.



Hình 5.10. Quan hệ gen – màng trong sự phân chia tế bào

Hai dòng này phối hợp tạo điều kiện cơ cở vật chất cho tế bào phân chia.

Vấn đề ung thư, chủ yếu là sự tăng sản tế bào. Vì vậy lý thuyết hai dòng trong sinh sản tế bào bình thường cũng là cơ sở để tìm hiểu sự biến hình tế bào bình thường thành tế bào ung thư.

Ở tế bào bình thường, hai dòng này hoạt động có sự kiểm tra và được điều hoà. Nhưng ở tế bào ung thư chúng hoạt động không được kiểm tra. Cứ thế quá trình tăng sản ngày càng đi xa mãi, và càng tăng sản thì thế hệ sau ngày càng xa lạ với thế hệ nguồn gốc bởi những biến dị xảy ra trong nhiều lần phân chia nhanh tụ tập lại vì không kịp được sửa chữa. Mặt khác tính lỏng của màng cũng ngày càng thay đổi, kết hợp với những tác nhân virut, hoá chất, phóng xạ đi vào làm cho bộ gen tế bào có những biến đổi sâu sắc. Kết quả từ ung thư lúc đầu còn lành tính và có khả năng thuận nghịch, đi tới ác tính và không thuận nghịch nữa. Lại cộng thêm trong tế bào ung thư tăng sản xuất các enzym proteaza và enzym lyzosom. Loại này phân tán vào trong cả nhân và bề mặt tế bào, càng làm thay đổi sâu sắc cả cấu trúc phân tử thể nhiễm sắc cũng như bề mặt tế bào và dẫn đến di căn, thẩm lậu và xâm lấn vào các tế bào khác. Mô hình này ngoài sự tóm tắt những biểu hiện nay về điều hoà hoạt động phân chia tế bào bình thường và ung thư thì còn nêu ra phương hướng để hướng dẫn sự tìm kiếm tiếp tục trong tương lai.

PHẦN B

CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH GEN VÀ CÔNG NGHỆ BIỂU HIỆN GEN

CHƯƠNG VI

CÁC ENZYM CẮT, BIẾN ĐỔI VÀ NỐI ADN

Trong công nghệ gen, sau khi tách được ADN thì cần phải kết cấu lại phân tử ADN, phân tử này gọi là phân tử ADN tái tổ hợp (recombinant DNA molecule). Để tạo ra phân tử này thì phải có vectơ (vật trung gian chuyển gen) cũng như ADN được chọn dòng cần phải được cắt ở những điểm đặc biệt và được nối lại với nhau theo kiểu phải được kiểm tra, kiểm soát.

Cắt và nối là hai thí dụ của kỹ thuật thao tác tinh vi trên phân tử ADN và được phát triển mạnh trên 30 năm nay. Nhờ sự cắt và nối mà các phân tử ADN có thể được ngắn lại, dài ra, được sao ra thành ARN hoặc tái bản lại phân tử ADN mới và có thể bị biến đổi do thêm vào hoặc tách ra những nhóm hoá học đặc hiệu.

Tất cả những thao tác tinh vi đó được thực hành ***trong các ống nghiệm*** không những cung cấp cơ sở cho sự chọn dòng gen mà còn cho những hiểu biết trong nghiên cứu cơ bản về hoá sinh ADN, cấu trúc gen và *sự kiểm tra của biểu hiện của gen.*

Hầu hết tất cả các thao tác kỹ thuật cắt nối ADN đều tiến hành sử dụng các enzym. Trong tế bào, các enzym này tham gia vào các quá trình chủ yếu như sao chép (replication) phiên mã (transcription) các ADN, làm gẫy ADN, cởi xoắn hoặc đưa ADN ngoại lai vào (như sự xâm nhập của ADN virut) sửa chữa ADN bị biến dị và tái tổ hợp lại giữa các ADN khác nhau. Sau khi chiết xuất làm sạch từ các dịch chiết tế bào. Nhiều enzym tin rằng, có thể dẫn ra những phản ứng tự nhiên của chúng hoặc những phản ứng có liên quan chặt chẽ với chúng dưới những điều kiện nhân tạo.

Cắt và nối gen được thực hiện bởi những enzym được gọi là các enzym hạn chế hay còn gọi là enzym giới hạn có tên là *endonucleaza hạn chế* (restrictase) dùng cho *sự cắt và các ligaza dùng cho sự nối.*

I. CÁC ENZYM HẠN CHẾ

Một số enzym hạn chế hay còn gọi là enzym giới hạn cắt phía trong phân tử ADN thành những đoạn đặc hiệu của mình. Gọi là enzym hạn chế bởi vì người ta phát hiện đầu tiên chúng có mặt trong những vi khuẩn làm hạn chế sự lớn lên của virus gây bệnh (thực khuẩn thể). Những enzym này bảo vệ ADN của vật chủ trước ADN của cơ thể ngoại lai. Song những enzym này đều có mặt trong các tế bào, mà những tế bào này kéo theo những enzym có khả năng metyl hoá ADN của vật chủ. Điều đó làm biến đổi ADN chủ thành cơ chất không thích hợp nữa cho sự tiêu hoá bằng enzym hạn chế. Đối với từng vị trí ADN xác định riêng, metylase và enzym hạn chế luôn luôn xảy ra ở vi khuẩn như là cặp song đôi.

Tên gọi enzym hạn chế này bắt nguồn từ tên vi khuẩn được dùng để tách enzym này. Chẳng hạn EcoRI là enzym hạn chế tách từ *E.coli*, còn Bam HI bắt nguồn từ *Bacillus amyloliquefaciens* (bảng 6.1 và 6.2). Cách viết tên và gọi tên như sau: chữ đầu tiên là tên chi của vi khuẩn hay gọi là giống (E), hai chữ của từ sau chỉ tên loài của vi khuẩn (co), còn có thể bổ sung thêm chủng xác định (R) và chữ số La Mã (I) (II) là chỉ enzym được tách ra lần đầu tiên hay lần thứ hai ở vi khuẩn đó (EcoRI, EcoRII).

Ví dụ: *E. coli* RI, *E. coli* RII

Escherichia	*coli*	R	I hoặc II
Tên chi hay giống (genus) của vi khuẩn. Tên này ***phải viết hoa*** và có thể viết tắt *E.*	Tên loài (species) của vi khuẩn. Tên loài *viết thường* và ***không được*** viết tắt *coli*	ví dụ: chủng mẫu là ATCC 11775	Là chữ số La Mã chỉ lần đầu hay lần hai enzym được tìm thấy ở *E.coli*

Mỗi enzym hạn chế nhận biết và cắt một đoạn có chiều dài 4-7 đôi base của chuỗi đuôi ADN. Sự cắt ADN như vậy có thể tạo đầu tù hay đầu bằng (HpaI) hoặc đầu dính (BamHI) phụ thuộc vào cơ chế cắt của enzym (hình 6.1). Đầu dính đặc biệt được sử dụng trong cấu trúc phân tử ADN lai hay khảm.

Tạo đầu dính

...GGATGG... -G GATCC...

HamHI +

...CCTAGG... ...CCTAG G...

Tạo đầu tù:

...GTTAAC... ...GTT AAC...

HpaI +

...CAATTG... ...CAA TTG...

Hình 6.1. **Cắt bằng enzym hạn chế BamHI và HpaI**

Bảng 6.1. **Các enzym endonucleaza hạn chế và những đoạn cắt của chúng**

Enzym hạn chế	Các đoạn cắt	Có nguồn gốc từ vi khuẩn
Bam III	G↓G A T C C C C T A G↑G	*Bacillus amylolique faciens H*
Bgl II	A↓G A T C T T C T A G↑A	*Bacillus globigi*
Eco RI	G↓A A T T C C T T A G↑A	*Escherrichia coli Ry 13*
Eco RII	C C T G↓G G G A C C↑	*Escherichia coli R245*
Hind III	A↓A G C T T T T C G A↑A	*Haemophilus influenzeae R_d*
Hha I	G C G↓C C↑G C G	*Haemophilus haemolyticus*
Hpa I	G T T↓A A C C A A↑T T G	*Haemophilus parainfluenzea*
Mst II	C C↓T N A G G G G A N T↑C C	*Micrococcus stuartii*
Pst I	C T G C A↓G G↑A C G T C	*Providencia stuartii 164*
Taq I	T↓C G A A G C↑T	*Thermus aquaticus YTI*

Nếu như trong phạm vi phân tử ADN lai hay nucleotid được sắp đặt một cách ngẫu nhiên, người ta có thể tính được số enzym cắt toàn bộ phân tử ADN. Đối với mỗi vị trí trong phân tử ADN có bốn khả năng (A, C, G hoặc T) bởi vậy enzym hạn chế nhận biết đoạn có chiều dài bốn đôi base sẽ cắt trung bình ADN ở mỗi 256 đôi base (4^4) trong khi đó enzym khác, nó nhận biết đoạn sáu đôi base thì mỗi lần sẽ cắt 4096 đôi base (4^6). Đoạn ADN đã cho sẽ sắp đặt sẵn vị trí cắt đối với những enzym khác nhau, mà cái đó cho phép cấu trúc bản đồ hạn chế.

Bảng 6.2. **Một số enzym giới hạn**

Enzym	Vi khuẩn có enzym	Các đoạn cắt	Số điểm cắt ADN virut		
			phage	Ad2	SV40
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens*	G|G A T C C C C T A G|G	5	3	1
*Bgl*II	*Bacillus globigi*	A|G A T C T T C T A G|A	5	12	0
*Eco*RI	*E.coli RY 13*	G|A A T T C C T T A G|A	5	5	1
*Hae*III	*Haemophilus egyptius*	G G|C C C C|G G	50	50	18
*Hha*I	*Haemophilus haemolyticus*	G C G|C C|G C G	50	50	2
*Hind*III	*Haemophilus influenzeae* R_d	A|A G C T T T T C G A|A	6	11	6
*Pst*I	*Providencia stuartii*	C T G C A|G G|A C G T C	18	25	3
*Sma*I	*Serratia*	C C C|G G G G G G|C C C	3	12	0

Các methylaza

Chúng ta cần biết trong *intro* người ta sử dụng các vị trí methylaza đặc hiệu để cải biến các chỗ nhận biết với mục đích bảo vệ ADN khỏi bị restrictaza (RE) tác động. Vị trí methylaza chuyển nhóm methyl từ S-adenosin-L - metionin tới cytozin hoặc adenin nhất định của mỗi sợi thuộc vị

trí nhận biết. Trong điều kiện phòng thí nghiệm có thể cải biến một sợi ADN và như thế cũng đủ tạo cho vị trí nhận biết tránh được tác động của restrictaza.

II. NHỮNG ENZYM KHÁC LIÊN QUAN ĐẾN CÁC THAO TÁC TRÊN ADN

Ta có thể kể ra các enzym đó thuộc vào những loại sau đây:

- ***Nucleaza*** đó là những *enzym cắt*, làm ngăn hoặc thoái hoá các phân tử acid nucleic.

- ***Ligaza*** là những *enzym nối* các phân tử acid nucleic lại với nhau.

- ***Polymeraza*** là những *enzym sao chép* các phân tử acid nucleic.

- ***Các enzym biến đổi*** (modifying enzym) - là những *enzym tách hay cộng thêm* các nhóm hoá học.

- ***Topoisomeraza*** là những *enzym làm xoắn trôn ốc* cao độ hay cởi xoắn từ các ADN đóng vòng khép kín.

Trước khi đi vào chi tiết mỗi loại enzym này, có hai điểm chúng ta cần lưu ý:

- Hầu hết các enzym đều phân phối tới một loại riêng rẽ, song một vài enzym biểu hiện những hoạt động đa dạng mà những hoạt động đó trải ra hai hay nhiều loại. Chẳng hạn, nhiều polymeraza phối hợp cả khả năng tạo ra phân tử ADN mới rồi hoạt động thoái hoá ADN được liên kết.

- Trong các enzym cắt, nối ADN có nhiều enzym tương tự hoạt động trên ARN đã được biết. Các ribonucleaza được dùng để tách ARN trong chế phẩm ADN là một ví dụ. Mặc dù các enzym liên quan đến ARN có sử dụng trong chọn dòng gen nhưng chúng ta không nói ở đây.

1. Các nucleaza

Nucleaza làm thoái hoá phân tử ADN bằng cách làm gẫy các liên kết phosphodiester - mà liên kết này gắn một nucleotid vào cái sau của chuỗi ADN. Do đó có hai loại nucleaza.

- Exonucleaza - là những enzym tách nucleotid ở đầu tận của phân tử ADN.

- Endonucleaza - là những enzym có khả năng làm gãy những liên kết phosphodiester bên trong phân tử ADN.

Sự phân biệt chính giữa các exonucleaza là nằm trong số các chuỗi đó bị thoái hoá khi phân tử xoắn kép bị tấn công enzym được gọi là Bal 31 (được tách chiết từ vi khuẩn *Alteromomas sepefiana* là một ví dụ về exonucleaza nó tách nucleotid từ hai chuỗi của phân tử xoắn kép.

Exonucleaza III của *E.coli* làm thoái hoá chỉ một chuỗi của phân tử xoắn kép, giải phóng ra ADN chuỗi đơn.

Chính tiêu chuẩn đó cũng được dùng để phân loại các endonucleaza. S_1 endonucleaza (từ fungus acfegillus oyzae) sẽ chỉ làm gẫy những chuỗi đơn trong khi đó deoxyribonucleaza I (ADNse) nó được chuẩn bị từ tuỵ bò cắt cả các phân tử chuỗi đơn và chuỗi kép. ADNse I thì không đặc hiệu, trong đó nó tấn công ADN ở chuỗi phosphodiester bất kỳ bên trong. Kết quả cuối cùng sau sự thuỷ phân này ta có hỗn hợp các mononucleotid và những oligonucleotid ngắn. Mặt khác một nhóm chuyên biệt của enzym loại này được gọi là endonucleaza hạn chế chỉ làm gãy ADN chuỗi kép ở số lượng giới hạn của các vị trí nhận diện đặc hiệu.

2. Các polymeraza

Polymeraza ADN là những enzym mà chúng tổng hợp một chuỗi mới bổ sung vào khuôn ADN hay ARN. Hầu hết các polymeraza chỉ có vùng xoắn kép - mà vùng đó hoạt động như là primer cho việc mở đầu sự trùng hợp.

Ba loại polymeraza ADN được dùng thông dụng trong công nghệ gen. Đầu tiên là polymeraza ADN I, enzym này được tách ra từ *E.coli*. Nó buộc vào vùng chuỗi đơn ngắn (hoặc chỗ nứt) trong phân tử ADN chuỗi kép và rồi tổng hợp chuỗi mới một cách hoàn toàn làm thoái hoá chuỗi hữu hiệu. Vì vậy polymeraza ADN I là một thí dụ về enzym hoạt động hai hướng: tổng hợp ADN và thoái hoá ADN.

Thật ra hoạt động polymeraza và nucleaza của polymeraza ADN I thì được kiểm tra bởi những phần khác nhau của phân tử enzym và có thể được tách ra nếu enzym bị gãy theo con đường đặc biệt. Phần của enzym duy trì chức phần polymeraza thì được gọi là đoạn Klenow. Đoạn Klenow thiếu hoạt động nucleaza, nó có thể tổng hợp chuỗi ADN bổ sung chỉ trên khuôn

chuỗi đơn. Sự áp dụng phần lớn của enzym này là trong phân tích thứ tự ADN.

Loại thứ ba của polymeraza là enzym phiên mã ngược-reverse transcriptaza, một enzym gồm trong sao chép của một vài loại virus - và là enzym quan trọng trong công nghệ di truyền.

Reverse transciptase duy trì nhất là dùng cái khuôn ARN. Khả năng của enzym tổng hợp sợi ADN bổ sung vào khuôn ARN là trung tâm của vấn đề chọn dòng phân tử ADN bổ sung.

3. Các enzym làm biến đổi ADN

Có nhiều enzym làm biến đổi ADN bằng cách thêm hay tách các nhóm hoá học đặc biệt. Đó là:

- Phosphataza kiềm (từ *E.coli* hay ruột bê) làm tách ra những nhóm phosphat có mặt ở đầu tận 5' của phân tử ADN.

- Kinaza polynucleotid - từ *E.coli* bị nhiễm phage T4 - có tác dụng ngược lại enzym phosphataza kiềm tức là xúc tác gắn nhóm phosphat vào đầu 5' tận tự do.

Transferaza terminal kết thúc được tách ra từ mô tuyến ức của bê - xúc tác sự thêm một hay nhiều deoxynucleotid vào đầu tận 3' của phân tử ADN.

4. Các topoisomeraza

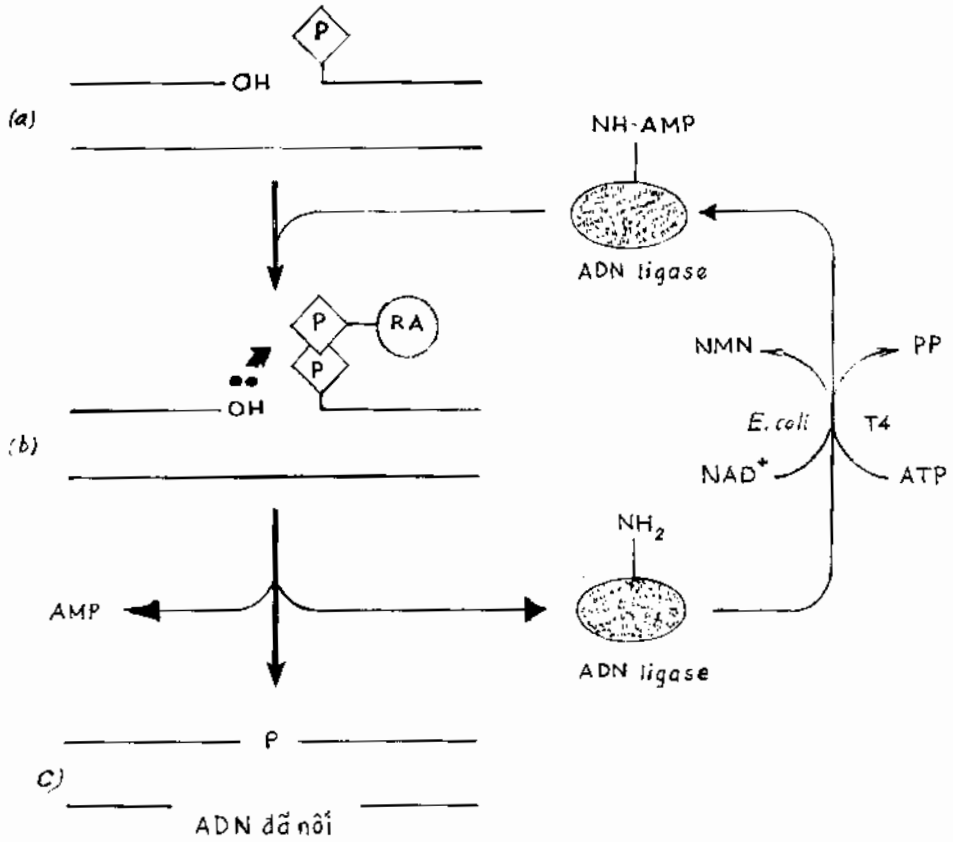
Topoisomeraza là những enzym có khả năng thay đổi cấu tạo hình của ADN đóng vòng (như phân tử ADN của plasmid) bằng cách đưa vào hoặc tách ra những vòng xoáy trôn ốc cao cấp.

5. Các ligaza

ADN ligaza là một enzym nối quan trọng trong tế bào vì chức năng của nó là sửa chữa các mối liên kết photphodiester bị đứt gãy một cách ngẫu nhiên hoặc do hậu quả của việc sao chép hoặc tái tổ hợp ADN. Trong kỹ thuật di truyền, nó được sử dụng để hàn gắn những chỗ gián đoạn chuỗi đường - photphat, những gián đoạn này thường diễn ra khi ADN tái tổ hợp được hình thành bằng cách nối các phân tử ADN từ những nguồn khác nhau. Vì vậy, nó được coi là chất keo phân tử được sử dụng để kết dính các mẩu ADN với nhau. Chức năng này là hết sức quan trọng đối với sự thành công của nhiều thí nghiệm, và vì vậy ADN ligaza là enzym nối chủ chốt trong kỹ

thuật di truyền.

Enzym được sử dụng nhiều nhất trong các thí nghiệm là ADN ligaza của T4, nó được tách chiết từ các tế bào *E.coli* bị nhiễm phage T4. Mặc dù enzym này hiệu quả nhất khi hàn gắn các khe hở trong các đoạn được giữ với nhau bằng các đầu dính, nó cũng có thể nối các phân tử ADN đầu bằng với nhau trong những điều kiện thích hợp. Enzym này hoạt động tốt nhất ở 37^{0}C, nhưng nó được sử dụng ở nhiệt độ thấp hơn nhiều (4-15^{0}C) để ngăn ngừa sự biến tính nhiệt của những đoạn kết cặp ngắn, các đoạn này giữ các đầu dính của các phân tử ADN với nhau. Cách hoạt động của ADN ligaza được minh họa trên hình 6.2.



Hình 6.2. **Kiểu tác động của ADN ligaza**

Enzym này nối các nucleotit thông qua các đầu 3'-OH và 5'-PO3- liền kề do có một điểm cắt (a). ADN ligaza được adenyl hoá bởi NAD$^+$ (E.coli) hoặc ATP (phage T_4). Sau đó enzym này adenyl hóa photphat đầu 5' tại điểm cắt (RA là ribose-adenin), nó tạo điều kiện hình thành mối liên kết photphodiester (b,c)

Khả năng cắt, sửa đổi và nối các phân tử ADN đã đưa vào tay các kỹ sư di truyền công cụ sắc bén trong việc tạo ra các phân tử ADN tái tổ hợp. Công nghệ sử dụng ở đây là công nghệ thí nghiệm trong ống nghiệm, không đòi hỏi các hệ thống sống. Tuy nhiên, một khi đoạn ADN tái tổ hợp đã được tạo ra in vitro, nó thường cần phải được nhân lên sao cho đủ số lượng để có thể sử dụng trong các phép thao tác và phân tích tiếp theo. Việc nhân bản thường đòi hỏi phải có một hệ thống sinh học, và vì vậy, chúng ta cần xem xét các hệ thống sống khác nhau có thể sử dụng để nhân bản các phân tử ADN tái tổ hợp.

Trong tế bào, ligaza ADN là sửa chữa những đoạn gãy của chuỗi đơn trong quá trình phân tử cần xoắn kép lại khi tái bản, ligaza nối hai đoạn riêng lẻ của ADN xoắn. Vai trò của các enzym đó trong tái tổ hợp ADN thì cũng sẽ được mô tả dưới đây.

6. Sự nối kết các phân tử ADN lại với nhau

Giai đoạn cuối cùng trong cấu trúc phân tử ADN tái tổ hợp là nối kết phân tử vecto và ADN được chọn dòng, enzym xúc tác quá trình này gọi là ligaza ADN.

6.1. Kiểu hoạt động của ligaza ADN

Tất cả các tế bào sống đều sản xuất các enzym ligaza ADN nhưng enzym được sử dụng trong công nghệ gen thì thường được tách chiết và làm sạch từ vi khuẩn *E.coli* mà vi khuẩn này được nhiễm với phage T4. Trong tế bào, enzym này mang chức phận khá quan trọng là sửa chữa bất kỳ sự không liên tục nào ở trong một chuỗi của phân tử chuỗi kép. Mặc dù sự không liên tục có thể xảy ra bởi sự gãy phân tử ADN tế bào chúng cũng là kết quả tự nhiên của các quá trình như tái bản và tái tổ hợp ADN. Do đó ligaza đóng một vai trò thực sự trong tế bào.

Trong ống nghiệm các enzym ligaza ADN được tách và làm sạch sửa chữa chuỗi đơn không liên tục nhưng cũng liên kết hai phân tử ADN hoặc hai đầu tận của chúng.

6.2. Những đầu dính làm tăng lên hiệu quả của sự nối buộc

Những đoạn đầu tù thì được nối với nhau. Mặc dù phản ứng này có thể xảy ra trong ống nghiệm, nhưng không hiệu quả lắm. Bởi vì ligaza không có khả năng cầm giữ phân tử để nối kết mà phải chờ sự kết hợp mang đến

những đầu tận đồng thời. Có thể sự nối buộc đầu tù được tiến hành ở nồng độ ADN cao để làm tăng sự may mắn những đầu tận của các phân tử đi đến với nhau đồng thời.

Ngược lại sự nối buộc của những đầu tận bổ sung thì có hiệu quả hơn nhiều. Bởi vì những đầu dính có thể nối đôi base với một cái khác bởi liên kết hydro hình thành cấu trúc bền cho enzym tiến hành công việc.

6.3. Đặt những đầu dính vào những phân tử có đầu tù

Như trên đã nói, những đầu dính thích hợp thì rất tốt cho các phân tử ADN gắn buộc với nhau trong thí nghiệm cloning gen. Thường những đầu dính đó có thể được cung cấp bởi sự tiêu hoá cả vector và ADN được xoay dòng với cùng một enzym cắt hạn chế, hoặc với những enzym khác mà chúng gây ra cùng đầu dính. Song, điều đó không phải luôn luôn có thể thực hiện được. Tình hình chung là ở đấy phân tử vector có những đầu dính, còn đoạn ADN được tạo dòng thì có đầu tù. Trong tình huống đó thì một trong ba phương pháp sau đây có thể được dùng để đặt những đầu dính chính xác vào những đoạn ADN.

a. Các linkơ

Linkơ (linker) là những mảnh ngắn của ADN chuỗi đôi, tuy có đầu tù nhưng chứa vị trí cắt hạn chế. Ligaza ADN sẽ xúc tác sự nối buộc những đầu tận của các phân tử ADN có đầu tù lớn. Sự nối buộc đầu tù, có thể được tiến hành một cách rất hiệu quả, do các oligonucleotid (tức các linkơ) được đưa vào hỗn hợp nối buộc ở một nồng độ cao.

Hơn nữa các linkơ buộc vào mỗi đầu tận của phân tử ADN sẽ tạo ra cấu trúc chuỗi. Sự tiêu hoá bằng BamHI sẽ làm gãy chuỗi ở dãy nhận diện tạo ra một lượng lớn các linkơ bị gãy và đoạn ADN nguyên uỷ bây giờ mang những đầu dính BamHI. Đoạn cải tiến này thì bây giờ sẵn sàng để nối buộc vào vector tạo dòng và được cắt hạn chế bởi BamHI.

b. Các adaptơ

Một phương pháp thứ hai để buộc đầu dính vào phân tử từ đầu tù là qua việc sử dụng adaptơ (adapter). Adaptơ - giống như linkơ là những oligonucleotid ngắn. Song không giống linkơ, adapter thì được tổng hợp sao cho một đầu dính vào đầu kia tù.

Lý tưởng của quá trình đó là liên kết đầu tù của adaptơ vào đầu tù của

đoạn ADN tạo ra một phân tử với những đầu dính. Điều này có thể đơn giản nếu dùng linkơ nhưng phức tạp nếu dùng adaptơ.

c. Sản xuất đầu dính gắn với đuôi homopolymer

Kỹ thuật gắn đuôi homopolymer là một cách để sản xuất ra những đầu dính trên những phân tử ADN đầu tù. Homopolymer là một polymer đơn giản trong đó tất cả các tiểu đơn vị thì như nhau. Ví dụ một chuỗi ADN được tiến hành gắn đuôi là toàn polydeoxyguanosin (poly dG). Khi gắn đuôi người ta dùng enzym transferaza deoxynucleotid tận để đưa một loạt nucleolid vào đầu tận 3'-OH của phân tử ADN chuỗi kép.

Dĩ nhiên để có khả năng gắn buộc lại với nhau hai phân tử có đuôi phải có các homopolymer ở dạng bổ sung. Thường đuôi poly (dG) của ADN được chọn dòng buộc vào đuôi poly dC của vector.

Bảng 6.3. **Tóm tắt các enzym thông dụng dùng trong công nghệ gen: cắt, nối và biến đổi ADN**

Stt	Loại enzym	Enzym cụ thể	Vai trò, cơ chế tác dụng	Ứng dụng trong công nghệ gen
1	Các enzym giới hạn (restriction enzym-RE) (giới hạn được hiểu ngầm là giới hạn của sự xâm nhiễm, tức là ADN phage bị một hệ thống bảo vệ của vi khuẩn tiêu diệt khi vừa mới xâm nhập, hệ thống bảo vệ này là RE) Chú ý: Methylaza là enzym gắn nhóm methyl vào A hay C ở vị trí cắt của RE điều đó có nghĩa là khi A hay C được methyl hoá thì RE không còn nhận biết được vị trí cắt, vì vậyADN vi khuẩn không bị chính RE của chúng cắt là nhờ cơ chế này.	- RE là endonucleaza có khả năng thuỷ phân ADN mạch đôi một cách lặp lại ở những vị trí xác định. - Có ba loại RE_1, RE_2 và RE_3 nhưng chỉ có RE_2 nhận biết được một trình tự và cắt ngay tại đó nên được sử dụng trong sinh học phân tử. - Loại RE_2 đã biết tới hơn 100 loại ở vi sinh vật.	- Mỗi RE nhận biết được một trình tự nucleotit đặc trưng (thường 4-6) và trình tự này có cấu trúc palindromic có nghĩa là hai mạch của trình tự hoàn toàn giống nhau theo chiều 5'-->3', do đó vị trí cắt là giống nhau trên hai mạch. - Có kiểu cắt đầu bằng (blunt ends) và kiểu cắt đầu so le hay dính (cohesive ends)	- Dùng cắt nhỏ bộ gen khổng lồ của sinh vật. - Dùng trong phương pháp tạo dòng để thu được dòng gen mong muốn có số lượng lớn. - Dùng trong lập bản đồ giới hạn để so sánh bộ gen giữa các loài thông qua kỹ thuật RFLP (retrtiction fragment length polymorphism = *tính đa hình kích thước của trình tự giới hạn*) Chú ý: lập bản đồ các điểm giới hạn hiểu với nghĩa là phần lớn các đoạn ADN đều có các điểm nhận biết đối với nhiều enzym giới hạn khác nhau và thường rất hữu ích nếu ta biết vị trí tương đối của một số điểm này. Kỹ thuật để làm việc này gọi là *lập bản đồ giới hạn.*

2	Các polymeraza (ADN và ARN polymeraza) a) ADN polymeraza xúc tác tổng hợp ADN theo chiều 5'-3')	ADN polymeraza I (ADN pol I)	ADN pol I có vai trò sửa sai khi sao chép ở vi khuẩn cụ thể tổng hợp ADN theo chiều 5'-3' và thuỷ phân ADN theo chiều 5'-3' và 3'-5'. - Thực tế người ta chỉ sử dụng một sản phẩm đoạn Klenow của pol I giữ được hoạt tính polymeraza và exonucleaza 5'-3' không mong muốn.	- Xác định trình tự ADN theo phương pháp dideoxy nucleotit . - Tổng hợp mẫu dò có độ phóng xạ cao. - Xây dựng các vectơ từ ADN mạch đơn.
		T_4 ADN polymeraza	- Có hoạt tính giống hệt đoạn Klenow, nhưng có exonucleaza 5'-3' mạnh hơn	Vì có exonucleaza 5'-3' mạnh hơn nên được sử dụng nhiều hơn khi cần tổng hợp mẫu dò có độ phóng xạ cao.
		Taq polymeraza	Có hoạt tính sinh tổng hợp ADN	Vì chịu nhiệt tốt nên dùng trong chạy phản ứng PCR.
		Enzym phiên mã ngược (reverse transcriptase) có nguồn gốc từ retro virus như Avian myeloblastosis virus = AMV và Moloney murine leukenia virus = MMLV.	Tổng hợp mạch ADN bổ sung cADN vào khuôn ARN theo chiều 3'-5' khi có mặt của mồi.	- Thiết lập ngân hàng cADN. - Tiến hành phản ứng PCR trên mARN. - Xác định trình tự của axit nucleic bằng phương pháp sử dụng các dideoxynucleotit.

	b) Các ARN polymeraza	Ba loại ARN polymeraza hay được sử dụng: - SP_6ARN polymeraza (có nguồn gốc từ phage xâm nhiễm *S.typhimurium*) - T_3ARN polymeraza. - T_7ARN polymeraza (hai loại sau có nguồn gốc từ phage xâm nhiễm *E.coli)*	Tổng hợp một lượng lớn ARN từ ADN sau khi gắn với promotơ thích hợp.	- Tổng hợp mẫu dò ARN đánh dấu phóng xạ hay hoá học. - Xác định trình tự của một ADN được dòng hoá trong một vectơ có mang promotơ đặc trưng cho phage SP_6, T_3, T_7. - Nghiên cứu bản phiên mã của ARN của một ADN đã được dòng hoá.
3	Các ligaza (nối hai đoạn ADN bằng ADN ligaza hay hai đoạn ARN bằng ARN ligaza)	- *E.coli* ADN ligaza	Nối hai đầu so le	- Hàn gắn những chỗ gián đoạn và những đầu mẫu các ADN tái tổ hợp lại với nhau.
		- T4 ADN ligaza (có nguồn gốc từ phage T4 lây nhiễm cho E.coli)	Nối hai đầu bằng với nhau.	- Hàn gắn những chỗ gián đoạn trong chuỗi pentoza photphat. - Nối những đầu ADN tái tổ hợp lại với nhau.
		- T_4 ARN ligaza	Nối hai trình tự ARN bằng liên kết photphodieste	- Đánh dấu phóng xạ ở đầu 3' của ARN nếu dùng làm mẫu dò phân tử.
		T_4 plolynuclotit kinase (có nguồn gốc từ phage T4 xâm nhiễm *E.coli*	Xúc tác sự chuyển nhóm γ-photphat của ATP cho đầu 5' của ADN hay ARN	- Đánh dấu phóng xạ đầu 5' của ADN trong các kỹ thuật xác định trình tự ADN hay làm mẫu dò phân tử trong các kỹ thuật lai. - Photphoryl hoá các trình tự ADN không có nhóm (P) đầu 5' để chuẩn bị cho phản ứng nối trong tạo dòng.

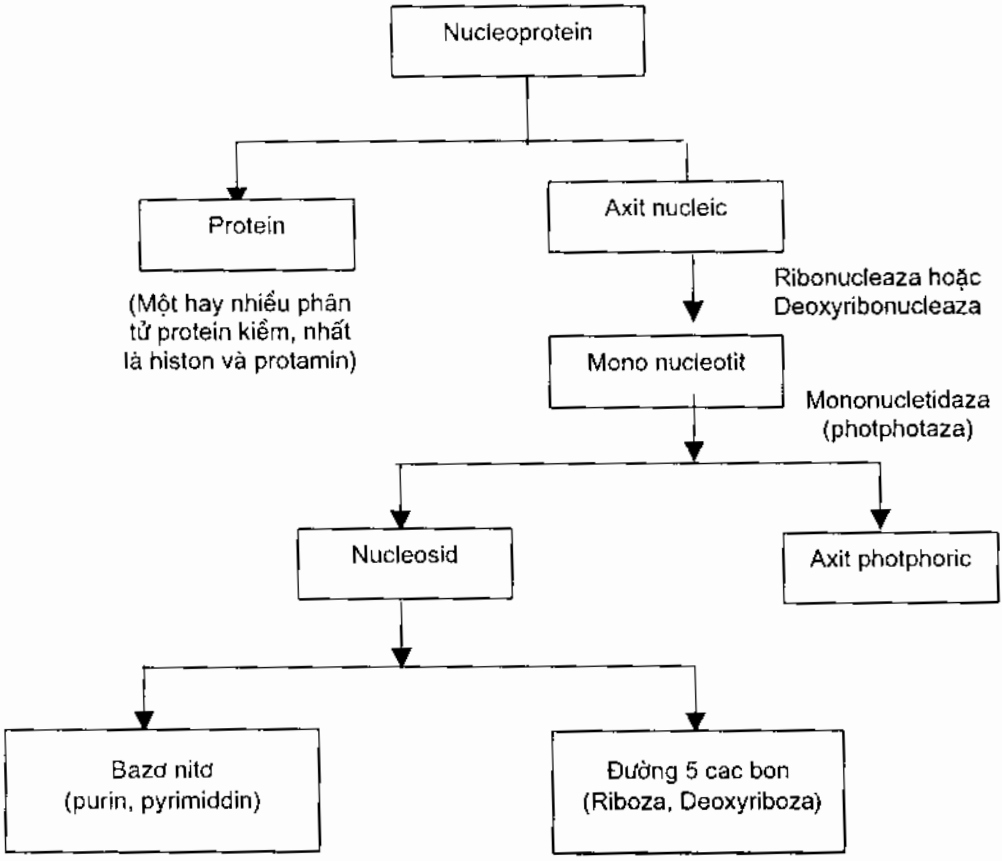
4	Các nuclase (ADNse thuỷ phân ADN; ARNse thuỷ phân ARN)	ADNse I (từ tuỵ bò)	- Thuỷ phân liên kết nằm ngay sau một pyrimidin trên chuỗi mạch đôi hay đơn.	- Loại cácADN tạp nhiễm trong phân đoạn ARN hay protein. - Tạo chỗ đứt (nick) trên ADN trong kỹ thuật đánh dấu mẫu dò. - Phát hiện các gen hoạt động trên nhiễm sắc thể.
		Nucleaza S_1 (từ *Aspergillus oryzae*)	- Thuỷ phân ADN mạch đơn, mạch đôi, phân tử lai ADN, ARN	- Phân tích cấu trúc các phân tử lai ADN, ARN loại bỏ các phần mạch đơn của một đầu so le trên ADN. - Loại bỏ các cấu trúc bậc hai (nút vòng) trên ARN để tạo đầu bằng.
		- Exonucleaza III (từ *E.coli*)	- Thuỷ phân tuần tự các nucleotit từ đầu 3'→5'. - Enzym còn có hoạt tính 3'-photphotaza, ARNse H.	- Tạo cấu trúc mạch đơn ở một số vùng trên phân tử ADN dùng làm cơ chất cho đoạn Klenow của ADN polymeraza I để sản xuất mẫu dò đặc trưng cho từng mạch. - Tạo ra những đột biến mất đoạn tại những vùng đặc biệt trên ADN khi phối hợp với nucleaza S_1.
		ARNaza A (từ tuỵ bò 90°C 1giờ không mất hoạt tính	- Cắt một cách đặc trưng liên kết photphodiester nằm ngay sau một pyrimidine của một ARN mạch đơn.	- Dùng để loại bỏ ARN trong các chế phẩm ADN hay protein. - Loại bỏ các vùng không bắt cặp trên ARN trong phân tử lai ARN và ADN.
		ARNaza H	- Loại bỏ ARN trong phân tử lai ARN và ADN.	- Dùng để loại bỏ ARN sau phản ứng phiên mã ngược để tiếp tục tổng hợp mạch thứ hai của cADN hình thành một ADN mạch đôi.
		ARNaza III và IV ARNaza T_1 ARNaza U_2 ARNaza T_2	- Cắt ARN mạch đôi - Cắt ngay sau G - Cắt đặc trưng cho A - Đặc trưng cho A, G, C, U...	

5	Các enzym sửa đổi các đầu của phân tử ADN	Phosphataza kiềm (từ vi khuẩn và từ ruột bò)	- Có tác dụng loại bỏ nhóm photphat từ các đầu 5' của ADN để lại nhóm 5'-OH	- Dùng loại bỏ nhóm photphat ở đầu 5' và cũng dùng nó trước khi bổ sung (P) có hoạt tính phóng xạ vào đầu 5' khi dùng polynucleotit kinaza.
		Polynucleotit kinase	- Có tác dụng bổ sung (P) vào đầu 5' của ADN	- Dùng để đánh dấu ^{32}P phóng xạ
		Terminal deoxyribonucleotid transferase	- Liên tục bổ sung các nucleotit vào bất cứ đầu 3' nào đang tồn tại.	- Dùng để thêm đuôi polynucleotit, để tạo đầu so le trong tạo dòng. - Dùng để bổ sung các đuôi homopolymer vào phân tử ADN trước khi thiết kế các phân tử tái tổ hợp. - Đánh dấu đầu 3'-OH trong phương pháp Maxam, Gilbert.
6		Topoisomeraza	Thay đổi tạo hình của ADN đóng vòng bằng cách đưa vào hoặc tách ra, những vòng xoáy trôn ốc cao cấp.	- Cởi xoắn sợi kép ADN để chúng sao chép.

CHƯƠNG VII

PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT AXIT NUCLEIC

Thành phần axit nucleic thường ở dưới dạng nucleoprotein. Tách axit nucleic ra khỏi nucleoprotein theo sơ đồ chỉ dẫn ra ở đây. Toàn bộ sơ đồ chỉ ra thành phần hoá học tạo axit nucleic (hình 7.1).



Hình 7.1. **Sơ đồ cấu tạo acid nucleic**

Chúng ta biết rằng, bộ gen người chứa khoảng 3 x10^9 đôi base, nếu chiều dài trung bình mỗi gen là 3 x10^3 đôi base (3kb) thì toàn bộ genom có khoảng 10^6 gen. Song thật ra bộ gen người chỉ khoảng 30.000 gen và một số gen mã hoá còn chưa xác định rõ chức phận.

Hai sợi ADN xoắn nhau và có nút đậm đặc lại nhờ các phân tử protein, chủ yếu là *protein kiềm đó là histon*. Sự đậm đặc này có thể đóng vai trò điều hoà và chắc chắn có ý nghĩa thực tiễn. Khi ADN trong nhân tế bào là hình sợi thì kéo dài chiếm khoảng 1 m. Protein của nhiễm sắc thể làm đậm đặc phân tử ADN lại và như vậy ADN được bao gói trong nhân có thể tích vài μm^3.

Trong công nghệ gen, người ta cần chuẩn bị ít nhất ba loại ADN khác nhau:

- ***Loại thứ nhất là ADN của toàn bộ tế bào***, thường đòi hỏi như là nguồn nguyên liệu, từ đó thu được các gen để làm tách dòng. Toàn bộ ADN tế bào có thể là ADN từ sự nuôi cấy vi khuẩn, thực vật, động vật hoặc từ cơ thể khác mà chúng đang được nghiên cứu.

- ***Loại thứ hai là ADN của plasmid***. Sự tách ADN plasmid từ nuôi cấy vi khuẩn kéo theo những giai đoạn cơ bản giống những giai đoạn tách ADN toàn bộ tế bào.

- ***Loại thứ ba là loại ADN của thực khuẩn thể (phage)*** cũng cần nếu như phương tiện vận chuyển gen cần nó. ADN của thực khuẩn thể thì được chuẩn bị từ các tiểu phần của thực khuẩn thể hơn là từ các tế bào bị nhiễm nó vì để khỏi bị bẩn bởi ADN vi khuẩn. Song cần có kỹ thuật để tách vỏ của thực khuẩn thể. Trừ một sự ngoại lệ là dạng nhân đôi xoắn kép của M_{13} thì chỉ được chuẩn bị ở *E.coli*, mặc dầu nó là plasmid của vi khuẩn.

I. SỰ CHUẨN BỊ ADN CỦA TOÀN BỘ TẾ BÀO

Thủ tục chuẩn bị ADN của toàn bộ tế bào từ các vi khuẩn nuôi cấy có thể chia làm bốn giai đoạn:

- Nuôi cấy vi khuẩn cho lớn lên và thu hoạch.
- Phá vỡ tế bào để giải phóng nội dung bên trong.
- Làm sạch ADN từ dịch chiết tế bào.
- Làm đậm đặc các mẫu ADN.

1. Nuôi cấy và thu hoạch vi khuẩn

Hầu hết các vi khuẩn lớn lên và phân chia không có một chút khó khăn gì trong môi trường lỏng đầy đủ các chất dinh dưỡng.

Song để chuẩn bị cho việc chiết xuất tế bào, các vi khuẩn cần phải thu ở một lượng thể tích nhỏ. Do đó khi thu hoạch nuôi cấy thì phải tiến hành ly tâm ở nồng độ thấp. vi khuẩn từ 1000 ml nuôi cấy ở đậm độ tế bào tối đa thì có thể thu vào một thể tích chỉ 10 ml hoặc ít hơn.

2. Chuẩn bị sự chiết ADN từ tế bào vi khuẩn

Tế bào vi khuẩn được bao bọc trong một màng bào tương và một thành cứng. Tất cả các hàng rào này sẽ bị phá vỡ để giải phóng các thành phần của tế bào vi khuẩn. Phương pháp phá vỡ tế bào này được chia làm hai loại phương pháp: phương pháp vật lý và phương pháp hoá học.

Phương pháp vật lý chủ yếu làm gãy bằng những lực cơ học.

Phương pháp hoá học thì thường dùng những chất hoá học như EDTA, lyzozym hay phối hợp cả hai.

Lyzozym là một enzym có mặt trong lòng trắng trứng và trong nước bọt. Nó thuỷ phân những thành phần trùng hợp của thành tế bào, còn ETDA lấy ion Mg, mà ion này tham gia vào sự duy trì cấu trúc của toàn bộ thành tế bào, đồng thời EDTA cũng ức chế các enzym tế bào để khỏi làm thoái hoá ADN. Cũng có khi cần thêm cả sodium dodecyl (SDS), chất này phá màng tế bào làm ly giải màng, tách rời các phân tử lipid và do đó gây ra gãy màng tế bào.

3. Làm sạch ADN từ dịch chiết tế bào vi khuẩn

Trong dịch chiết tế bào vi khuẩn có ADN, protein và ARN. Vấn đề đặt ra là phải tách được các thành phần nhiễm bẩn ra khỏi ADN để có ADN dạng tinh khiết; do đó phải khử protein của dịch chiết bằng cách thêm phenol hay hỗn hợp phenol và chloroform theo tỷ lệ 1:1. Những dung môi hữu cơ đó làm kết tủa protein và giải phóng ra ADN và ARN vào dung dịch lỏng.

Khi ly tâm có ba lớp, trong đó lớp lỏng axit nucleic ở trên cùng có thể hút ra bằng ống hút. Để tách hết protein cần phải làm vài lần như trên nhưng thường dẫn đến ADN bị gãy, do đó thường xử lý dịch chiết tế bào với

protease như pronase hay proteinase K trước khi chiết xuất bằng phenol.

Những enzym đánh gãy polypeptid thành những đơn vị nhỏ và những tiểu đơn vị đó dễ dàng tách ra khỏi phenol nhưng hầu như còn lẫn với ADN trong lớp nước. Còn phân tử ARN, đặc biệt mARN cũng được tách ra bởi xử lý phenol nhưng hầu như cũng còn lẫn với ADN trong lớp nước.

Chỉ có một cách có hiệu quả để tách ARN là xử lý thêm với enzym ribonuclease, enzym này thuỷ phân nhanh chóng các phân tử ARN để thành các tiểu đơn vị ribonucleotid.

4. Làm đậm đặc các mẫu ADN

Phương pháp thông dụng để làm đậm đặc ADN là tủa bằng ethanol trong sự có mặt của ion Na^+ và ở nhiệt độ -20^0C hay thấp hơn. Ethanol tuyệt đối sẽ làm lắng tủa một cách có hiệu quả các axit nucleic trùng hợp và khi ly tâm cao tốc thì ADN lắng xuống đáy và đo lường sự hấp thụ của nó ở bước sóng 260 nm, điều đó phù hợp với 50μg của ADN xoắn kép trong 1ml.

5. Sự chuẩn bị ADN của toàn bộ tế bào từ những cơ thể khác

Ngoài vi khuẩn, ADN toàn bộ tế bào của thực vật, động vật cũng có thể tiến hành tách chiết để phục vụ cho dự kiến tiến hành công nghệ gen. Các giai đoạn cơ bản trong sự làm sạch ADN cũng giống như trên chỉ có giai đoạn nuôi cấy và phá màng thì có thể khác, tuỳ theo từng loại tế bào mà xử lý thích hợp.

II. SỰ CHUẨN BỊ ADN CỦA PLASMID

Sự tách chiết và làm sạch plasmid từ sự nuôi cấy vi khuẩn giống như sự chuẩn bị ADN toàn bộ tế bào. Sự nuôi cấy tế bào chứa plasmid sẽ được lớn lên trong môi trường lỏng, rồi thu hoạch và dịch chiết tế bào được chuẩn bị. Dịch chiết sẽ được khử protein, ARN được tách ra và ADN được làm đặc lại bởi kết tủa bằng ethanol.

Song có một sự khác biệt cơ bản giữa làm sạch ADN plasmid và ADN toàn bộ tế bào, đó là trong chế phẩm plasmid, ADN cần phải tách khỏi một lượng lớn ADN nhiễm sắc thể của vi khuẩn.

Tách riêng hai loại ADN này rất khó khăn nhưng điều đó đặc biệt quan trọng, nếu như plasmid được dùng như phương tiện để tiến hành thuần

hoá gen. Sự có mặt một lượng nhỏ nhất của sự nhiễm bẩn ADN vi khuẩn trong phòng thí nghiệm thuần hoá gen có thể dẫn tới những kết quả không thích hợp.

Thật may mắn, người ta đã tìm ra một vài phương pháp có thể tách ADN vi khuẩn khi làm sạch plasmid. Đó là những phương pháp dựa trên sự khác nhau về tính chất lý hoá giữa hai loại ADN. Đó là kích thước plasmid lớn nhất cũng chỉ chiếm tới 8% kích thước của nhiễm sắc thể vi khuẩn *E.coli*. Do đó kỹ thuật tách *phân tử ADN nhỏ* khỏi *phân tử ADN lớn* có thể có hữu hiệu trong sự làm sạch plasmid này.

Ngoài kích thước, ADN plasmid và ADN vi khuẩn khác nhau về cấu hình. ADN plasmid có *hình thể vòng*, còn ADN của nhiễm sắc thể vi khuẩn cũng vòng nhưng trong quá trình chuẩn bị dịch chiết tế bào thì loại này luôn luôn bị gãy để cho những *đoạn thẳng*. Phương pháp tách các phân tử vòng khỏi các phân tử thẳng được sử dụng để làm sạch ADN plasmid.

1. Kỹ thuật tách dựa vào kích thước ADN

Xử lý bằng EDTA và lysozym được dẫn ra trong sự có mặt của đường (sucrose). Sau đó ly giải tế bào sẽ được gây ra bởi thêm vào những *chất phá màng không mang ion* như triton X-100, *còn chất phá màng mang ion* như SDS sẽ gây ra làm gãy nhiễm sắc thể. Phương pháp này bảo toàn ADN của vi khuẩn , rất ít bị gẫy. Như vậy khi ly tâm sẽ được chất dịch sáng trong đó chứa hầu như toàn bộ ADN.

2. Kỹ thuật tách dựa trên cơ sở hình thái cấu trúc ADN

ADN plasmid có hai hình thái vòng:

- Một là hai chuỗi nguyên vẹn nhưng cuộn vòng trôn ốc cao độ.
- Hai là vòng mở- trong đó một hoặc hai chuỗi bị nứt ra.

2.1 Sự biến tính kiềm

Có một dãy pH hẹp, ở đó ADN không xoắn trôn ốc thì bị biến tính, còn plasmid xoắn trôn ốc thì không. Nếu thêm NaOH vào dịch chiết tế bào để pH đạt tới 12-12,5 thì liên kết hydro trong phân tử ADN không xoắn trôn ốc sẽ bị gãy, làm cho sợi xoắn kép cởi ra và hai chuỗi polynucleotid tách nhau.

Nếu như bây giờ thêm acid vào, những chuỗi ADN vi khuẩn bị biến

tính sẽ tụ lại thành một khối lộn xộn. Ly tâm sẽ vón thành một mảng không hoà tan, tách khỏi ADN plasmid trong dịch nổi.

Cũng trong phương pháp này, dưới một số tình huống, đặc biệt là ly giải tế bào bằng SDS và làm trung hoà bởi acetat natri thì hầu hết protein và ARN cũng sẽ không hoà tan và được tách ra ở giai đoạn ly tâm. Sự chiết xuất phenol và xử lý enzym ribonuclease có thể cũng không cần thiết như phương pháp biến tính kiềm được sử dụng.

2.2 Ly tâm trong gradient nồng độ ethidium bromite cesium chlorid

Gradient nồng độ được tạo ra bởi ly tâm dung dịch chlorid cesium (CsCl) ở tốc độ rất cao. Bởi vì sự tiến triển gradient ở lực ly tâm cao sẽ kéo các ion cesium và chlorid xuống đáy ống. Các đại phân tử sinh học có mặt trong dung dịch CsCl khi được ly tâm sẽ hình thành các giải ở những điểm khác nhau trong gradient.

ADN đậm độ nổi vào khoảng 1,7g/cm3 và như vậy nó sẽ di chuyển đến vùng có độ đậm này của CsCl. *Protein* có đậm độ nổi thấp hơn nên nó ở *đỉnh ống* ly tâm, còn *ADN* thì vón lại ở *đáy ống* ly tâm.

Khi ly tâm gradient nồng độ trong sự có mặt của ethidium bromide (EtBr) có thể được dùng để tách *ADN xoắn trôn ốc* ra khỏi phân tử *ADN không xoắn trôn ốc*.

EtBr liên kết với phân tử ADN giữa đôi base dính kết, gây ra cởi xoắn một phần của sợi xoắn kép, còn phân tử xoắn trôn ốc cao độ không có đầu tự do nên ít liên kết với EtBr. *Như vậy sự ly tâm gradient nồng độ EtBr+CsCl là phương pháp rất có hiệu lực để thu hồi ADN plasmid tinh sạch.*

3. Sự phóng đại plasmid

Plasmid được nhân lên nhiều lần trong vi khuẩn chỉ khi vi khuẩn đó ngừng sản xuất protein. Vì vậy trong quá trình nuôi cấy phải thêm chloramphenicol, chất ức chế tổng hợp protein thì trong vòng 12 giờ từ 20 plasmid trong một vi khuẩn sẽ tăng tới 4000 plasmid.

III. SỰ CHUẨN BỊ ADN CỦA THỰC KHUẨN THỂ

Đối với thực khuẩn thể (phage) thì bắt đầu nguyên liệu không phải là tách chiết từ tế bào, bởi vì các tiểu phần thực khuẩn thể có thể thu được một

lượng lớn từ môi trường ngoài tế bào của nuôi cấy vi khuẩn bị nhiễm. *Khi ly tâm môi trường nuôi cấy*, vi khuẩn lắng xuống đáy, còn *các tiểu phần của thực khuẩn thể nổi lên trên. ADN của thực khuẩn thể được tách bằng khử protein khỏi vỏ của nó.*

Toàn bộ quá tình tách chiết này đơn giản hơn phương pháp tách ADN của toàn bộ tế bào và của plasmid. Song sự tách chiết và làm sạch với một lượng có ý nghĩa của ADN thực khuẩn thể là đối tượng của công việc phải làm.

Cái khó khăn chính, đặc biệt với thực khuẩn thể lamda (λ) là làm tăng sự nuôi cấy nhiễm khuẩn. Sự chuẩn độ tối đa của thực khuẩn thể lamda vào khoảng 10^{10}/ml, thì chỉ mới có được 500 ng ADN. Vậy thể tích nuôi cấy phải lớn ở hàng 1000 đến 2000 ml thì mới đủ số lượng ADN thu được.

1. Sưu tập thực khuẩn thể từ sự nuôi cấy bị nhiễm khuẩn

Để làm giảm dịch treo từ 1000-2000 ml xuống đến 5 ml hay dưới nữa để tiến hành chiết xuất ADN cần phải ly tâm. Song các tiểu phần thực khuẩn thể thì quá nhỏ nên để chống vón lại khi ly tâm phải làm tủa với polyethylen glycol (PEG). Đây là thành phần trùng hợp chuỗi dài, trong sự có mặt của muối, thì nó hấp thụ nước do đó gây ra sự tập hợp các đại phân tử như các tiểu phần của thực khuẩn thể để kết tủa. Tủa này thu được bằng ly tâm rồi hoà tan trở lại trong một thể tích nhỏ.

2. Làm sạch ADN từ các tiểu phần của thực khuẩn thể lamda

Khi protein của tủa PEG, rồi hoà tan trở lại thì cần thiết bởi vì tủa này cũng chứa một lượng nhất định mảnh vụn, có lẽ bao gồm cả ADN tế bào được cởi chuỗi. Những tạp bẩn đó được tách ra bởi gradient nồng độ CsCl. Dải băng tiểu phần ADN của thực khuẩn thể ở trong gradient CsCl là từ 1,45-1,50g/cm^3. Thu dải băng đó và tách CsCl bằng thẩm tích, chúng ta được chế phẩm thực khuẩn thể tinh sạch. Từ chế phẩm này, ADN có thể được tách chiết bởi xử lý phenol hoặc enzym protease để thuỷ phân lớp protein áo khoác bên ngoài của thực khuẩn thể.

3. Làm sạch ADN của M_{13}

Dạng tái bản chuỗi đôi của M_{13}, mà nó giống như số bản sao plasmid, rất dễ làm sạch giống như phương pháp chuẩn bị plasmid. Dịch

chiết tế bào được chuẩn bị bị nhiễm với M_{13} và dạng tái bản được tách ra khỏi ADN vi khuẩn bởi ly tâm gradient nồng độ EtBr - CsCl.

Song dạng chuỗi đơn của bộ gen M_{13} được chứa trong tiểu phần thực khuẩn thể. Các tế bào nhiễm khuẩn luôn luôn bài tiết các tiểu phần M_{13} vào trong môi trường. Lượng 10^{12}/ml hoặc trên nữa vẫn có thể thu được một cách dễ dàng khi nuôi cấy. Do có nồng độ cao như vậy nên một lượng có ý nghĩa của ADN M_{13} chuỗi đơn có thể được chuẩn bị từ sự nuôi cấy với dung tích 5 ml hoặc ít hơn. Hơn nữa các tế bào bị nhiễm không ly giải nên không có sự nhiễm bẩn những mảnh vụn trong dịch treo của thực khuẩn thể. Giai đoạn ly tâm gradient nồng độ CsCl rất ít cần cho M_{13} nhưng lại cần cho thực khuẩn thể lamda.

IV. CÁC PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT AXIT NUCLEIC CỤ THỂ

Mọi nghiên cứu và ứng dụng sinh học phân tử đều bắt đầu bằng việc thu nhận một lượng axit nucleic đủ lớn và tinh sạch để tiến hành các thí nghiệm kế tiếp. Mối quan tâm hàng đầu của các kỹ thuật tách chiết axit nucleic là thu nhận được các phân tử này ở trạng thái nguyên vẹn tối đa không bị phân huỷ bởi các tác nhân cơ học (phân tử bị gãy do nghiền, lắc mạnh) hay hoá học (phân tử bị thuỷ giải bởi các enzym nội bào giải phóng ra môi trường khi tế bào bị phá vỡ). Các axit nucleic cần được tách chiết trong điều kiện nhiệt độ thấp để ức chế hoạt động của các enzym nội bào (desoxyribonucleaza – ADNza và ribonucleaza- ARNza).

1. Phương pháp tách chiết ADN

ADN là phân tử có kích thước lớn, do đó trong thao tác cần tránh mọi tác nhân cơ học hay hoá học quá mạnh có thể làm đứt gẫy phân tử này.

Có nhiều phương pháp tách chiết ADN tế bào. Nói chung, các phương pháp tách chiết cơ bản đó đều được tiến hành theo ba bước:

1.1. Bước 1

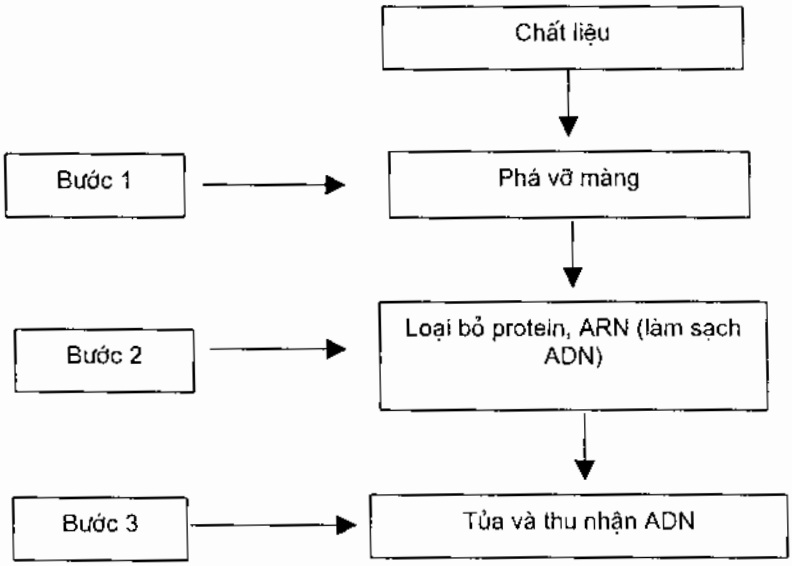
Phá màng tế bào và màng nhân (tế bào eukaryote). Thông thường tế bào, mô được nghiền trong một hỗn hợp chất tẩy (như SDS, sarcosyl) và proteaza K. Khi đó màng tế bào, màng nhân sẽ bị vỡ và giải phóng ADN ra ngoài môi trường và phân huỷ các protein liên kết với ADN.

1.2. Bước 2

Loại bỏ các thành phần không mong muốn trong mẫu, *chủ yếu là protein* bằng cách lắc mẫu mạnh trong dung dịch phenol và cloroform, dung dịch này có tác dụng làm biến tính protein đồng thời không hoà tan axit nucleic, sau khi ly tâm sẽ tủa thành lớp nằm giữa pha nước và pha phenol, cloroform. Thu nhận axit nucleic.

1.3. Bước 3

Tủa axit nucleic, nhằm *thu nhận axit nucleic dưới dạng cô đặc*, bảo vệ axit nucleic tránh bị phân huỷ của enzym; mặt khác có thể hoà tan chúng lại trong dung dịch theo nồng độ mong muốn. Có thể tủa axit nucleic trong ethanol (2,5 dung tích ethanol/ 1dung tích mẫu), môi trường có nồng độ muối cao, nhiệt độ thấp. Tuy nhiên cũng có thể tủa trong isopropanol (1 thể tích isopropanol/ 1 thể tích mẫu), không cần muối. Sau khi thu nhận axit nucleic, cặn tủa cần phải rửa trong ethanol 70% để loại bỏ muối hoặc isopropanol dính vào. Dưới đây là sơ đồ tiến hành theo ba bước *(hình 7.2)*.



Hình 7.2. **Sơ đồ tiến hành tách chiết ADN**

Phương pháp cụ thể tách chiết ADN theo Blin và Stafford

Bước 1

Phá vỡ màng: sử dụng PBS, kết hợp ly tâm 6000 vòng/ phút để phá vỡ màng và rửa tế bào, sau đó sử dụng EDTA làm ức chế ADNza; SDS là chất tẩy rửa mạnh phá vỡ liên kết nucleoprotein và sacaroza (phân giải histon và lipid), đồng thời tách riêng chúng ra. Để loại bỏ tạp chất bẩn này phải dùng enzym thuỷ phân proteaza K, quá trình này cần được theo dõi qua nồng độ trong của dung dịch, thời gian xử lý tối thiểu là 30 phút.

Bước 2

Loại bỏ tạp chất: quá trình này sử dụng hai lần phenol bão hoà với một lượng tương ứng và một lần chloroform. Các chất này làm biến tính mạnh protein và khi ở dạng biến tính thì protein không hoà tan trong nước, còn ADN hoà tan trong nước. Sau khi ly tâm 8000 vòng/ phút thì hỗn hợp được chia làm ba phần: *dung dịch trong chứa ADN ở phía trên*, dịch trắng ở giữa là protein, dưới cùng là phenol. Quá trình lấy dịch trong để được ADN phải hết sức cẩn thận mới đạt yêu cầu.

Bước 3

Tủa ADN: sử dụng cồn tuyệt đối với thể tích 2,5/ 1 thể tích mẫu của dung dịch chiết kết hợp ly tâm 14000 vòng/ phút, sau khi đã để lạnh qua đêm hoặc để lạnh ở -20^{0}C trong 3 giờ. Tiếp tục rửa cồn 70% ly tâm 14000 vòng/ phút, tiến hành hai lần để loại bỏ muối, ta thu được ADN tế bào.

2. Phương pháp tách chiết ARN

Các phân tử ARN không bền, dễ bị phân huỷ bởi các enzym là các ribonucleaza (ARNza-ARNse). Hơn nữa, các ARNza lại có mặt ở khắp nơi (có rất nhiều các tác nhân thường dùng để loại bỏ enzym (việc xử lý nhiệt độ 90^{0}C trong 1 giờ không làm mất hoạt tính ARNza). Vì những lý do đó, việc tách chiết ARN đòi hỏi nhiều biện pháp thận trọng để tránh mọi tạp chất bởi các ARNza từ môi trường: thao tác trong điều kiện vô trùng, mọi dụng cụ, hoá chất đều được khử trùng bằng nhiệt hay hoá chất, tránh mọi tiếp xúc với dụng cụ bằng tay trần ...

2.1 Phương pháp tách chiết ARN tổng số

Phương pháp này gồm các bước như đối với ADN. Tế bào, mô được nghiền trong một dung dịch gồm chất tẩy (như SDS, sarcosyl), một tác nhân

gây biến tính protein mạnh (guanidinium thiocynate), một chất khử (2-mecaptoethanol). Hai loại chất sau có tác dụng ức chế các hoạt động của các ARNza nội bào và tách các protein liên kết khỏi phân tử ARN.

Các protein được loại bỏ khỏi mẫu qua xử lý phenol: chloroform và ly tâm. ARN hoà tan trong pha nước được tủa bằng ethanol thu nhận qua ly tâm. ARN có thể được bảo quản trên một năm dưới dạng tủa trong dung dịch ethanol hoặc đông lạnh ở -70^{0}C trong nước có chứa ARNsin (một chất ức chế ARNza).

2.2. Tách chiết tARN, mARN, rARN

Khoảng 80% tổng số ARN tế bào là ARN ribosom (rARN), khoảng15% là ARN vận chuyển (tARN). Các ARN này có kích thước và trình tự xác định và có thể dễ dàng tách riêng bằng kỹ thuật điện di, ly tâm v.v... ARN thông tin (mARN) chiếm khoảng 1-5% tổng số ARN có kích thước và trình tự đa dạng. Tuy nhiên chúng có đặc điểm chung là cấu trúc đuôi poli A (có thể lên tới 100A). Dựa vào cấu trúc này và đặc tính liên kết bổ sung A-T của nucleotit có thể tách ARN thông tin ra khỏi mẫu bằng sắc ký ái lực trên cột oligo (dT)-cellulose. Hiện nay đã xuất hiện những bộ mẫu thử (còn có tên là kit) sử dụng các viên bi từ có mang oligo (dT) trên bề mặt. Sau khi các ARN thông tin bám lên bề mặt các viên bi này được ly tâm tách ARN thông tin. Phương pháp này cho phép tách cả những ARN thông tin có khối lượng rất nhỏ.

3. Tinh sạch axit nucleic

Các axit nucleic có thể được tinh sạch nhờ một số kỹ thuật như siêu ly tâm, sắc ký hay điện di.

3.1. Siêu ly tâm

Siêu ly tâm trên một gradien liên tục cesium chloride (CsCl). Trong quá trình ly tâm, dung dịch CsCl đậm đặc trong ống ly tâm sẽ tự động hình thành một gradien tỷ trọng tăng dần từ miệng ống xuống đáy ống. Các axit nucleic di chuyển trong ống dưới tác dụng của lực ly tâm, đến vị trí tỷ trọng bằng tỷ trọng ống. Lớp này sẽ được thu nhận lại sau ly tâm. Độ phân giải của một gradien tỷ trọng này có thể đạt tới 1% đơn vị tỷ trọng cho phép phân tách hai phân tử giống hệt nhau, trong đó một phân tử được đánh dấu bằng đồng vị nặng. Kỹ thuật này được dùng để tinh sạch plasmid và phage.

Siêu ly tâm trên đệm CsCl (gradien không liên tục). Hỗn hợp nhiều axit nucleic có tỷ trọng biết trước khác nhau được đặt trên một lớp dung dịch CsCl. Trong quá trình ly tâm chỉ những phân tử có tỷ trọng cao hơn tỷ trọng lớp đệm mới di chuyển xuyên qua lớp đệm. Thông thường, ống ly tâm bao gồm nhiều lớp đệm có tỷ trọng tăng dần từ miệng đến đáy ống. axit nucleic cần tinh sạch sẽ nằm ở mặt phân cách giữa hai lớp đệm. Kỹ thuật này được dùng để tinh sạch một lượng phage.

Siêu ly tâm trên gradien sacaroza. Dùng để phân tách thô một hỗn hợp có kích thước chênh lệch nhau nhiều kilô bazơ (kb); ứng dụng trong chọn lọc các đoạn ADN có kích thước xác định trong việc lập ngân hàng gen.

3.2. Sắc ký

Với phương pháp sắc ký có các loại sắc ký sau đây:

a. Sắc ký ái lực trên poly U- sepharoz hay trên oligo (dT)- celluloza dùng để tinh sạch ARN thông tin.

b. Sắc ký lọc gel dùng trong phân tách các axit nucleic và các nucleotit tự do sau quá trình tạo mẫu dò (probe) đánh dấu.

c. Sắc ký trao đổi ion trên vi cột để thu hồi những lượng rất nhỏ ADN.

d. Sắc ký lỏng hiệu suất cao (high performance liquid chromatography), đây là một kỹ thuật mới có độ phân giải rất cao được dùng trong tinh sạch các oligonucleotid tổng hợp (độ phân giải mono nucleotit), plasmid, phân tách các đoạn ADN.

3.3. Điện di

Phương pháp này giới thiệu chi tiết ở mục 4.2.

4. Phân tích định tính và định lượng axit nucleic

4.1. Phương pháp định lượng bằng quang phổ kế

Phương pháp này không thật chính xác nhưng cho phép ước lượng tương đối nồng độ axit nucleic có trong mẫu. Nguyên tắc dựa vào sự hấp phụ mạnh ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 260 nm của các bazơ pyrimidin. Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260 nm (OD 260 nm) của các mẫu cho phép xác định nồng độ axit nucleic có trong mẫu. Một đơn vị OD 260 nm tương ứng

với một nồng độ là 50μg/ ml cho một dung dịch ADN sợi đôi; 40 μg/ ml cho một dung dịch ARN hay ADN sợi đơn.

Tuy nhiên, cách tính này chỉ đúng với các dung dịch axit nucleic sạch. Để kiểm tra độ sạch của dung dịch, ta có thể đo thêm giá trị OD ở 280nm; 280 nm là bước sóng mà ở đó các protein hấp thụ ánh sáng cao nhất nhưng các protein cũng hấp phụ ánh sáng ở bước sóng 260 nm như các axit nucleic và do đó làm sai lệch giá trị thật của nồng độ axit nucleic. *Dung dịch axit nucleic được xem như là sạch không tạp nhiễm protein , khi tỷ số OD 260nm/ 280nm nằm trong khoảng 1,8 đối với ADN tinh khiết và 2,0 đối với ARN tinh khiết.*

4.2. Phương pháp điện di

Phương pháp này được sử dụng rộng rãi trong phân tích định tính và *trong việc thu nhận mẫu axit nucleic*. Đó là phương pháp chủ yếu làm cho các đoạn axit nucleic hiển thị trực tiếp.

a. Nguyên tắc của phương pháp

Dựa vào đặc tính cấu tạo của các axit nucleic. Các axit nucleic là các đại phân tử sinh học *tích điện âm* đồng đều trên khắp bề mặt nên khi chịu tác động của điện trường chúng sẽ di chuyển về *cực dương*. Tính linh động của phân tử phụ thuộc vào hai chỉ tiêu là *khối lượng phân tử* tức là số lượng nucleotit hay cặp nucleotit (ADN mạch dài) và *nồng độ các chất cấu thành gel*.

Hai loại gel được sử dụng trong nghiên cứu axit nucleic là gel polyacrylamide và gel agaroza (agarose). Việc chọn loại gel cũng như nồng độ các chất tạo thành gel phụ thuộc kích thước trung bình của các đoạn axit nucleic.

b. Gel agrose

Đây là loại gel thông dụng nhất, thao tác đơn giản, thường dùng để phân tách các đoạn có kích thước tương đối lớn trong khoảng 0,5-20 kb (kilô bazơ). Gel được đổ trên một giá thể nằm ngang và điện di thực hiện theo phương nằm ngang.

Các axit nucleic trong gel agaroza sẽ được hiện hình dưới tia tử ngoại (UV) nhờ một hoá chất là ethidium bromide. Chất này có khả năng gắn xen vào giữa các bazơ của axit nucleic và phát quang dưới tác dụng của tia tử

ngoại ($\lambda \approx 300$ nm), axit nucleic sẽ hiện hình dưới dạng những vạch đỏ da cam. Tiếp theo, so sánh kích thước của axit nucleic với kích thước đã biết của marker chuẩn (gồm nhiều trình tự ADN có kích thước đã biết).

c. Gel polyacrylamide

Dùng để tách các đoạn có kích thước < 1000 bp (cặp bazơ) (bảng 7.1), tuy nhiên thao tác với gel polyacrylamide phức tạp hơn gel agaroza. Do đó gel này chỉ thao tác với mục đích đặc hiệu như:

- Tinh sạch các oligonucleotid tổng hợp
- Xác định trình tự đoạn ADN nhỏ
- Tách các đoạn ADN nhỏ có chiều dài < 500 bp

Gel được đổ giữa hai tấm thuỷ tinh và phương điện di thực hiện theo chiều thẳng đứng.

Bảng 7.1. **Đặc tính phân tách của các gel agarose và polyacrylamide**

Loại gel	Phạm vi phân tách (cặp bazơ)
0,3 % agaroza	50000 đến 1000
0,7 % agaroza	20000 đến 300
1,4 % agaroza	6000 đến 300
4 % acrylamid	1000 đến 100
10 % acrylamid	500 đến 25
20 % acrylamid	50 đến 1

d. Điện di trường xung điện

Phương pháp điện di trường xung điện (pulse field gel eletrophoresis) sử dụng để phân tách các phân tử ADN rất lớn > 50 kb, không thể phân tách được bằng gel agaroza dù ở nồng độ tối thiểu là 0,4% (dưới 0,4% gel quá mềm không thể thao tác được).

Nguyên tắc của loại điện di này dựa vào sự thay đổi hướng điện trường trong quá trình điện di. Mỗi lần hướng điện trường thay đổi thì phân tử ADN phải tự định hướng lại. Thời gian cần cho sự định hướng tuỳ thuộc vào kích thước của phân tử, phân tử càng dài thì thời gian tự định hướng càng lớn khiến cho nó di chuyển chậm hơn một phân tử kích thước nhỏ.

e. Tinh sạch axit nucleic bằng điện di trên gel agroza

Sau khi điện di, các vạch tương ứng với ADN cần tinh sạch được phát hiện và thu nhận lại theo một trong các phương pháp sau:

- Phần agaroza chứa các vạch đó được cắt ra và ADN được thu nhận sau khi đã khuyếch tán từ gel agaroza vào một dung dịch đệm thích hợp.

- Một "giếng nhỏ" được khoét trong agaroza ngay trước vạch ADN. "Giếng" này được bơm đầy dung dịch đệm và điện trường được tái lập. ADN di chuyển vào "giếng" chứa đầy dung dịch đệm và được thu nhận lại.

- Điện di được thực hiện trong một gel agaroza đặc biệt như (như nusieve hay seaplaque) có điểm nóng chảy thấp (65^0C). Khi agarose đã hoàn toàn tan chảy, ADN được thu nhận lại sau nhiều công đoạn tách chiết và tủa.

CHƯƠNG VIII

PHƯƠNG PHÁP LAI PHÂN TỬ VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH DẤU PHÂN TỬ

I. PHƯƠNG PHÁP LAI AXIT NUCLEIC

Phương pháp lai axit nucleic còn gọi là phương pháp lai phân tử. Cơ sở của hiện tượng lai phân tử là sự tách rời hai mạch đôi của chuỗi xoắn kép ADN khi nhiệt độ môi trường vượt quá nhiệt nóng chảy (Tm) của phân tử và sự tái bắt cặp giữa các trình tự tương đồng sau đó. Các trình tự bổ sung có thể là ADN hay ARN để tạo thành các phân tử mới là ADN – ADN, ARN – ARN và ADN – ARN. Đây là sự lai phân tử đặc hiệu tuyệt đối.

Các yếu tố ảnh hưởng đến sự lai phân tử gồm có: nồng độ ADN trong môi trường, nhiệt độ và thời gian phản ứng, kích thước các trình tự lai, lực ion của môi trường.

Hiện có ba kiểu lai phân tử ADN.

1. Lai trong pha lỏng

Các trình tự cần lai nằm trong pha lỏng. Sự lai phân tử xảy ra khi các trình tự này gặp nhau do chuyển động nhiệt và khi nhiệt độ môi trường thấp hơn Tm ít nhất vài độ. Phương pháp này được sử dụng để tính tỷ lệ phần trăm (%) các trình tự giống nhau ở các loài gần nhau, để phân tích các trình tự lặp lại và ứng dụng trong việc so sánh kích thước các bộ gen không chứa trình tự lặp lại.

Ba phương pháp thường được sử dụng để phân tích định lượng các phân tử lai là:

- phương pháp dùng quang phổ kế;
- phương pháp sử dụng nucleaza S_1 và
- phương pháp sắc ký trên hydroxylapatit.

ADN mạch đôi hấp thu ánh sáng yếu hơn mạch đơn, do đó trong phân tử lai, sự giảm OD 260 nm tương ứng với sự tăng số lượng các phân tử lai. Nucleaza S_1 có khả năng thuỷ phân các nucleotit mạch đơn, vì vậy dung dịch phản ứng lai cho tác dụng với enzym này thì chỉ còn các phân tử lai là không bị thuỷ phân, trên cơ sở đó tủa và định lượng được các phân tử lai. Trong phương pháp sắc ký trên hydroxylapatit, photphat canxi gắn các axit nucleic mạch đôi trên cơ sở đó tách được các phân tử lai để định lượng.

2. Lai trên pha rắn

Lai trên pha rắn có cùng nguyên tắc với lai trên pha lỏng. Điểm khác biệt ở đây là một trong hai trình tự bổ sung được cố định trên một giá thể rắn (màng lai). Việc sử dụng giá thể rắn tạo điều kiện dễ dàng trong thao tác và việc tách trình tự không lai ra khỏi phân tử lai, mặt khác còn ngăn sự tái bắt cặp giữa hai mạch của cùng một phân tử. Trình tự có đánh dấu dùng để gen cần tìm được gọi là mẫu dò (probe). Vận tốc lai trên pha rắn thấp hơn mười lần vận tốc lai trong pha lỏng. Ba kỹ thuật lai trên pha rắn thông dụng sử dụng lai axit nucleic là: Southernn Blot, Northern Blot, và Dot hay Slot Blot.

2.1 Southernn Blot

Các trình tự ADN thu được sau khi thuỷ giải ADN bộ gen bằng các enzym giới hạn (RE), được phân tách qua điện di trên gel agaroza. Sau đó, ADN được biến tính và được chuyển lên màng lai. Màng lai được đem lai với mẫu dò đánh dấu và kết quả thu nhận dưới dạng phóng xạ tự ghi hay ngay trên màng lai thông qua kỹ thuật miễn dịch học. Southern Blot được sử dụng trong kỹ thuật RFLP để lập bản đồ giới hạn của một gen hay để phát hiện các đột biến làm thay đổi bản đồ giới hạn của gen.

2.2 Northern Blot

Các bước tiến hành cũng giống như trong kỹ thuật Southern blot. Ở đây trình tự cần xác định là ARN. Kỹ thuật này được sử dụng để phát hiện các ARN đặc trưng cho loại mô hay cho thời điểm phát triển của cá thể cho phép định lượng và xác định kích thước của chúng. ARN được biến tính rồi tách ra trên gel agaroza, sau đó chuyển lên màng lai và lai với mẫu dò có đánh dấu phóng xạ.

2.3 Dot hay Slot Blot

Là kỹ thuật định lượng trong đó axit nucleic được thấm trực tiếp lên màng lai tạo một điểm (dot) hay một khe (slot). Quá trình lai và phát hiện phân tử lai giống như trên.

3. Lai tại chỗ

Lai tại chỗ là một kiểu lai phân tử trong đó trình tự axit nucleic cần tìm (trình tự đích) nằm ngay trong tế bào hay mô. Lai tại chỗ cho phép nghiên cứu axit nucleic mà không cần tách chiết chúng ra khỏi khỏi mô, tế bào. Có ba phương pháp lai tại chỗ:

3.1. Lai trên khuẩn lạc

Phương pháp này được sử dụng để phát hiện dòng vi khuẩn có mang vectơ tái tổ hợp cần tìm trong một ngân hàng gen bằng cách áp một màng lai trên mặt thạch và khuẩn lạc sẽ để lại một vài tế bào vi khuẩn trên màng lai. Màng lai được xử lý NaOH để làm vỡ vi khuẩn và làm biến tính ADN. Sau đó các bước phát hiện giống như trên.

3.2. Lai trên nhiễm sắc thể

Phương pháp này cung cấp thông tin chính xác về vị trí và sự phân bố của một trình tự ADN cần tìm trên nhiễm sắc thể nhờ một mẫu dò chuyên biệt. Các nhiễm sắc thể này thường ở gai đoạn trung kỳ, từ tế bào bạch cầu, được xử lý như kiểu tế bào bọc trên lam kính. Loại bỏ ARN (bằng RNase*) và protein (bằng protease K), rồi đem lai với mẫu dò phóng xạ và đem phủ nhũ tương và soi dưới kính hiển vi.

3.3. Lai trên tế bào và mô

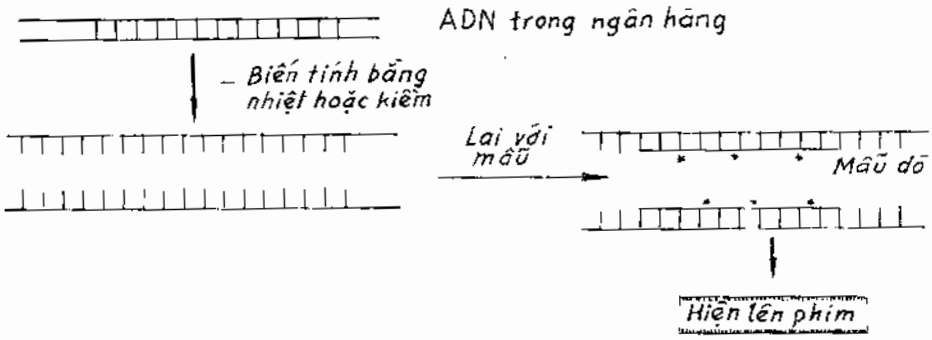
Phương pháp này sử dụng để nghiên cứu sản phẩm mARN phiên mã và sản phẩm protein dịch mã của một gen xác định trong mô hay tế bào. Thao tác xử lý như trong phương pháp lai trên nhiễm sắc thể.

II. PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH DẤU AXIT NUCLEIC

Phương pháp đánh dấu axit nucleic gọi là phương pháp đánh dấu phân tử. Mẫu dò (probe) dùng trong phương pháp lai phân tử là những trình tự tương đồng với gen cần tìm được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ hay bằng phương pháp hóa học (hình 8.1). Mẫu dò có tính chuyên biệt nghĩa là chỉ lai

với một gen nhất định và có tính nhạy hơn nên dễ phát hiện để định tính và định lượng. Mỗi loại tác nhân đánh dấu có những ưu và nhược điểm riêng.

Đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ có ưu điểm là có độ nhạy cao cho tín hiệu mạnh với thời gian phơi sáng ngắn nhưng nhược điểm là có hại cho sức khoẻ con người và các mẫu dò cũng không thể dùng được trong một thời gian dài do chu kỳ bán rã của các đồng vị phóng xạ.



Hình 8.1. **Phát hiện gen đích bằng mẫu dò ADN (DNA probe) (lai ADN)**

Đánh dấu bằng phương pháp hoá học có thể khắc phục được các nhược điểm của việc đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ. Tuy vậy độ nhạy vẫn kém hơn so với phương pháp trước.

Với phương pháp đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, người ta thường dùng ^{32}P, ^{35}S, ^{3}H phát ra tia beta (β) năng lượng cao, còn đánh dấu bằng phương pháp hoá học người ta dùng hệ avidin hay streptavidine. Chất biotin và hệ phát quang sinh học (petroxidase) do gắn với ADN. Hệ đầu, biotin gắn vào ADN từ những nucleotit được tổng hợp; sau quá trình lai, biotin hiện diện trong phân tử lai và dùng ligand avidin gắn nhóm huỳnh quang phản ứng với biotin đó sẽ phát hiện phân tử lai. Còn hệ hai thì peroxidase có khả năng phát sáng.

Các phương pháp đánh dấu chính là:

1. Phương pháp nick – translation

Nguyên tắc của phương pháp này là DNase I sẽ cắt phân tử ADN ở

nhiều vị trí tạo ra những "lỗ thủng" phân bố một cách ngẫu nhiên trên cả hai mạch. Từ những "lỗ thủng" này, ADN polymeraza I một mặt "gặm' dần mạch bị cắt theo chiều 5' – 3' (nhờ hoạt tính exonucleaza), mặt khác lại tổng hợp bù đoạn bị thiếu (nhờ hoạt tính polymeraza). *Do trong phản ứng có sự hiện diện của một loại nucleotit đánh dấu.* Kết quả cuối cùng là ADN sẽ được đánh dấu trên khắp chiều dài phân tử.

2. Phương pháp thiết lập mồi ngẫu nhiên (random priming)

Mẫu dò được biến tính bằng nhiệt độ rồi làm lạnh đột ngột. Thêm vào phản ứng hỗn hợp oligonucleotide tổng hợp, thường là các hexanucleotid- gồm sáu nucleotit. Một vài hexanucleotid trong số đó sẽ bắt cặp được với hai mạch đơn của mẫu dò. Khi chúng trở thành mồi (primer) cho ADN polymeraza được tổng hợp mạch bổ sung. Vì một trong bốn *loại nucleotit thêm vào phản ứng được đánh dấu* nên mạch mới tổng hợp cũng sẽ được đánh dấu.

3. Phương pháp đánh dấu các oligonucleotid

Các oligonucleotid được tổng hợp dưới dạng mạch đơn, *được đánh dấu ở đầu 5'* nhờ enzym T_4 kinaza với sự hiện diện của một nucleotit đánh dấu. Sau phản ứng các nucleotit tự do cũng được loại bỏ bằng sắc ký lọc gel, sắc ký lỏng cao áp *v.v...*

4. Phương pháp tạo mẫu dò ARN

Trình tự ADN dùng để sản xuất mẫu dò ARN phải được đưa vào một vectơ có mang các promotơ dạng SP_6, T_3, T_7. Vectơ này được cắt ra thành dạng mạch thẳng. Sau đó, ARN polymeraza thích ứng được thêm vào phản ứng cùng với các nucleotit đánh dấu. ARN polymeraza sẽ phiên mã trình tự ADN bắt đầu từ promotơ, tạo ra một lượng lớn ARN đánh dấu . Sau phản ứng vectơ có mang trình tự ADN gốc bị DNase I phân huỷ, các enzym được loại bỏ qua tách chiết bằng phenol, sau đó ARN được tinh sạch trên sắc ký lọc gel.

Ưu điểm là các phân tử lai ADN – ARN hiệu quả lai cao và bền vững hơn phân tử lai ADN – ADN. Nhờ hoạt tính riêng của mẫu dò và hiệu quả lai cao, có thể sử dụng ^{32}S làm nhân tố đánh dấu, mặc dù tia xạ có năng lượng yếu vẫn cho phép thu được tín hiệu tinh và rõ, sử dụng được mẫu dò trong thời gian dài.

CHƯƠNG IX

CÁC LOẠI VẬT CHỦ THU NHẬN VÀ CÁC LOẠI VECTƠ CHỌN DÒNG

I. CÁC LOẠI VẬT CHỦ THU NHẬN

Hiện nay chúng ta biết có bốn loại vật chủ thu nhận và các loại vectơ chọn dòng* trình bày tóm tắt trong bảng 9.1 và 9.2.

1. Vật chủ là *E.coli* và các vi khuẩn khác

- Các vectơ tạo dòng biểu hiện trong vật chủ *E.coli* gồm các vectơ plasmid *E.coli* và các vectơ phage.

- Các vectơ chọn dòng được dưa trên plasmid *E.coli* gồm có pBR322, pBR325, pAT153, pUC8.

- Các vectơ chọn dòng được dựa trên phage gồm có vectơ M_{13} mp2, M_{13} mp7, vectơ bacteriophage lamda.

- Cosmid.

- Ngoài vật chủ là *E.coli*, các vi khuẩn khác cũng được dùng làm vật chủ cho các thí nghiệm tách dòng gen, đó là *Bacillus*, *Subtilis*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*. Tất nhiên có những hạn chế nhất định đối với các vật chủ này.

2. Vật chủ là nấm men và nấm mốc

- Hệ gen của *S.cerevisae* có khoảng 1,35x107 bazơ nitơ, nhiều hơn *E.coli* khoảng 3,5 lần. Các nấm *A.nidulans*, *N.crassa* cũng được dùng trong thì nghiệm tách dòng gen.

- Vectơ 2 μm plasmid episom của nấm men được dùng trong vật chủ nấm men Aiep, Yips, Yrps.

---

* Thuật ngữ này còn có tên gọi là tách dòng, nhân dòng - *BTV*

Bảng 9.1. **Các loại tế bào chủ dùng trong công nghệ gen**

Các nhóm chính	Kiểu loại sinh vật	Kiểu loại tế bào	Thí dụ
Vi khuẩn	Nhân sơ	Gram âm Gram dương	*Escherichia coli* *Bacillus subtilis* *Streptomyces spp*
Nấm	Nhân chuẩn	Vi sinh vật có khuẩn ty	*Saccharomyces cerevisiae* *Aspergillus nidulans*
Thực vật	Nhân chuẩn	Tế bào trần Tế bào nguyên Cả cơ thể	Các loại khác nhau Các loại khác nhau Các loại khác nhau
Động vật	Nhân chuẩn	Tế bào sâu bọ Tế bào động vật Tế bào trứng Cả cơ thể	*Drosophila melanogaster* Các loại khác nhau Các loại khác nhau Các loại khác nhau

Bảng 9.2. **Các loại vectơ dùng cho các tế bào động vật và thực vật**

Loại tế bào	Loại vectơ	Loại hệ gen	Thí dụ
Thực vật	Plasmid	ADN	Plasmid Ti của *Agrobacterium tumefacines*
	Virut	ADN ADN	Virut khảm cải hoa, virut Gemini (Geminivirut) Virut khảm thuốc lá
Động vật	Plasmid	ADN	Các loại vectơ plasmid khác nhau. Nhiều loại là vetơ lai có chứa một phần hệ gen của SV40
	Virut	ADN	Virut Baculo Virut Papilloma Virut Simian 40 (Simianvirus 40-SV40) Virut Vaccinia
	Virut	ARN	Virut Retro
	Gen nhảy	ADN	Các phần tử P trong *Drosophila melanogaster*

3. Vật chủ là thực vật bậc cao

Các vectơ tạo dòng được biểu hiện trong nó gồm:

- Ti plasmid của *Agrobacterium tumefacien*.
- *Cauliflowre mosaic* virus (virus khảm cải hoa).

- Gemini virut (virus khảm thuốc lá).

- Simple bacterral plasmid: PBR322.

4. Vật chủ là các tế bào động vật có vú

Các vectơ chọn dòng biểu hiện trong chúng gồm:

- Các vectơ dựa trên virut Simian 40 (Simianvirus 40-SV_{40}).

- Các vectơ dựa trên các virut (virus) Baculo (Baculovirus), Papilloma (Papillomavirus), Vaccinia (Vacciniavirus).

- Các vectơ được dựa trên BPV.

- Các vectơ virut Retro (Retrovirus).

II. CÁC LOẠI VECTƠ CHỌN DÒNG

Những kỹ thuật cơ bản trong tạo dòng gen đã được mô tả ở các chương trên bao gồm các công đoạn:

- Chiết và làm sạch phân tử ADN.

- Cắt và nối ADN thành phân tử ADN tái tổ hợp.

- Đưa phân tử ADN tái tổ hợp đó vào trong tế bào sống qua việc gắn với vectơ gọi là ***vectơ chọn dòng*** hay còn có tên gọi là ***kỹ thuật biến nạp ADN***.

Bây giờ ta phải nghiên cứu xem vectơ chọn dòng nào thì đưa vào tế bào sống nào. Đó là *vấn đề các tế bào chủ thu nhận các vectơ chọn dòng*. Mở đầu ở trên đã giới thiệu, hiện nay có bốn loại vật chủ thu nhận các vectơ như *E.coli*, nấm men nấm mốc, thực vật bậc cao và các tế bào động vật có vú. Dưới đây chúng ta lần lượt tìm hiểu sâu hơn các loại vectơ đưa vào đối với từng loại vật chủ đó.

1. Các vectơ đối với *E.coli*

Các vectơ chọn dòng đơn giản nhất, được sử dụng rộng rãi nhất trong ***tạo dòng gen*** là dựa trên các plasmid vi khuẩn. Một lượng lớn các vectơ plasmid khác nhau có thể sử dụng cho *E.coli*. Chúng liên hợp dễ dàng giữa sự làm sạch với các tính chất mong muốn như: hiệu quả biến nạp cao, các markơ (marker) chọn lọc thuận tiện cho biến nạp và tái tổ hợp, có khả năng

chọn dòng những mẫu ADN lớn tới 5kb.

1.1. Các vectơ chọn dòng được dựa trên plasmid của E.coli

a. Vectơ pBR322

Các vectơ thông dụng được sử dụng với *E.coli* trước tiên phải kể đến là pBR322 (chữ p là chữ viết tắt của cụm từ plasmid; BR là tên viết tắt của hai nhà khoa học ở phòng thí nghiệm đầu tiên tìm ra vectơ này là: F. Bolivar và R. Rodrigues; 322 là danh số của plasmid này để phân biệt với các plasmid khác trong khi nghiên cứu cũng do phòng thí nghiệm này tìm ra như pBR325, pBR327 *v.v...*).

Plasmid có kích thước nhỏ hơn 10 kb nên dễ loại trừ vấn đề ADN bị gãy khi làm sạch: pBR322 có 4361 bp (bazơ pair = đôi hay cặp base). Kích thước đó nói lên rằng, không chỉ vectơ có thể làm sạch một cách dễ dàng mà còn có thể cả phân tử ADN được cấu trúc với nó. Thậm chí thêm vào 6 kb ADN, phân tử pBR322 tái tổ hợp vẫn còn là kích thước có thể điều khiển được.

Plasmid này có hai bộ gen kháng kháng sinh là gen kháng ampicilin hoặc gen kháng tetracyclin được dùng làm markơ chọn lựa đối với tế bào chứa plasmid này. Mỗi gen markơ gồm những vị trí cắt gen hạn chế duy nhất, mà chúng được dùng trong các thí nghiệm chọn dòng.

Việc gài ADN mới vào pBR322 mà chúng ta đã được cắt với Pst I, PvuI hoặc ScaI sẽ làm ức chế gen amp^R và khi dùng gài một trong tám enzym cắt hạn chế (đã ghi trong bản đồ gen là BamHI và Hind III) làm ức chế kháng tetracyclin. Sự thay các vị trí cắt hạn chế - mà chỗ đó có thể dùng để ức chế gài - pBR322 có thể được dùng để chọn dòng các đoạn ADN có đầu dính.

Một sự tiến bộ thứ ba của pBR322 là cơ số bản sao (copy) cao. Có khoảng 15 phân tử có mặt trong *E.coli* bị biến nạp nhưng số lượng này có thể tăng từ 1000 tới 3000 phân tử bởi sự phóng đại plasmid với sự có mặt của chất ức chế tổng hợp như chloramphenicol. Do đó sự nuôi cấy *E.coli* đã cung cấp một sự sản sinh lớn phân tử pBR322 tái tổ hợp.

b. Vec tơ pBR325 chứa ba markơ chọn lựa

pBR325 là plasmid pBR222 có thêm đoạn ADN. Đoạn này mang gen acetylcholintransferaza của chloramphenicol (CAT) một enzym ức chế hoạt

động của chloramphenicol và như vậy kháng kháng sinh này. Gen CAT chỉ chứa vị trí enzym cắt hạn chế *E.co*RI trên plasmid. Như vậy vị trí này có thể được dùng để chọn dòng những tái tổ hợp được phát hiện bởi ức chế gài của kháng chloramphenicol, pBR325 có tiến bộ hơn pBR322 là thêm một vị trí chọn dòng và thêm một markơ chọn lựa.

c. Vectơ pATI 53 - plasmid có số bản sao cao

Vectơ pATI 53 là một dẫn suất khác của pBR322 nhưng trong trường hợp này sự thay đổi không bao gồm sự cộng thêm markơ chọn dòng mới hay những vị trí chọn dòng bên ngoài. Ngược lại, vectơ pATI 53 đã được cấu trúc bởi sự tách ra một đoạn 700 đôi base của pBR322, trong đó có cả gen amp^R và tet^R nhưng làm thay đổi sự tái bản và tiếp tục tạo ra plasmid. pATI 53 khác với pBR322 ở hai phương diện.

- *pARI 53 có số lượng bản sao cao hơn pBR322*, thường có mặt khoảng 30-45 phân tử trên một *E.coli*. Với số lượng copy này thì dễ dàng được phát hiện khi nghiên cứu hiệu quả của gen được chọn dòng trong tế bào chủ.

- pARI 53 là một plasmid không liên tục, không trực tiếp vận chuyển được tới tế bào *E.coli* khác do sự phát đi 700 đôi base đã làm phá huỷ khả năng liên tục của pBR322. Điều này quan trọng đối với sự kiểm chế sinh học để tránh đi khả năng làm tẩu thoát "phân tử pATK - 53 tái tổ hợp từ trong các ống nghiệm".

d. Vectơ pUC8 - sự chọn dòng gen lacZ

Vectơ pUC8 đã được dẫn ra từ pBR322, mặc dù trong trường hợp này sự tái bản và gen amp^R vẫn còn nguyên vẹn. Một đoạn nucleotid của gen này đã bị thay đổi. Tất cả những vị trí chọn dòng bây giờ đã được tụ tập lại trong một đoạn ngắn của gen *lacz'*. Sự chọn dòng bằng gen *lacz'* không thuận tiện hơn khi dùng markơ kháng kháng sinh song giá trị của nó ở chỗ là tập trung lại được các vị trí cắt hạn chế và cho phép một đoạn ADN có hai đầu dính khác nhau được chọn dòng mà không còn chất gắn.

1.2. Các vectơ chọn dòng được dựa trên bacteriophage M13

Hầu hết những thí nghiệm đối với vectơ chọn dòng là phải được tái bản trong tế bào vật chủ. Với các vectơ plasmid, sự đòi hỏi này dễ dàng thoả mãn. Những đoạn thứ tự ADN ngắn có khả năng hoạt động như những plasmid có nguồn gốc của sự nhân lên và hầu hết các enzym cần thiết để nhân lên được cung cấp bởi tế bào chủ. PBR322 do cắt ngắn cũng tạo ra

được cấu trúc cuối cùng có sự nhân lên.

Với bacteriophage như M13, tình hình nhân lên có phức tạp hơn. Các phân tử ADN phage nói chung mang một vài gen mà những gen đó chủ yếu là nhân lên, bao gồm cả gen mã hoá đối với số thành phần của protein áo của phage và những enzym nhân ADN đặc hiệu của phage. Sự thay đổi hoặc sự mất một số gen đó sẽ làm hư hại hoặc làm phá huỷ khả năng nhân lên của cả phân tử. Do đó rất hạn hữu để cải tiến các phân tử ADN của phage. Bộ gen của M13 bình thường là 6,4 kb chiều dài, trong đó có mười gen chiếm hầu hết. Mỗi gen ấy có chức năng chủ yếu đối với sự nhân lên của phage. Chỉ có một đoạn giữa 507 nucleotid, trong đó ADN lạ có thể gắn vào mà không làm gãy gen khác và vùng này có vị trí nhân lên mà nó cần được nguyên vẹn.

a. Vectơ M13 mp2

Giai đoạn đầu tiên trong cấu trúc vectơ M13 là đưa gen *lacZ'* vào đoạn giữa đó và hình thành nên M13mp1, mà nó tạo nên đám màu xanh trên aga X-gal.

M13mp1 không có lấy một vị trí cắt hạn chế trong gen *lacZ'*. Song nó chứa sáu nucleotid GGATTC ở gần đầu của gen. Một sự thay đổi nucleotid đơn giản có thể làm cho đoạn này được dẫn ra khi dùng biến dị và lúc này ta có vectơ M13 mp2.

M13 mp2 có sự thay đổi gen *lacZ'* rất nhỏ (tức là codon thứ năm bây giờ làm đặc hiệu cho asparagin thay thế acid aspartic nhưng enzym beta - galactosidaza được sản xuất bởi các tế bào bị nhiễm với M13 mp2 thì giữ nguyên chức phận). M13 mp2 là vectơ M13 đơn giản nhất. Những đoạn ADN với những đầu dính *Eco*RI có thể gài được vào vị trí chọn dòng và các tái tổ hợp được phân biệt bằng một đám sáng trên agar X-gal.

b. Vectơ M13 mp7

Giai đoạn tiếp theo trong phát triển vectơ M13 là đưa thêm vào những vị trí cắt hạn chế vào gen *lacZ'*. Điều này đã đạt được nhờ sinh tổng hợp trong ống nghiệm những oligonucleotid ngắn được gọi là polylinkơ (polylinker). Polylinkơ gồm hàng loạt những đầu dính là *Eco*RI. Polylinkơ mới này gài vào M13 mp2 ở vị trí cắt *Eco*RI để hình thành nên M13 mp7. Đây là một vectơ phức tạp hơn với bốn vị trí có thể chọn dòng (*Eco*RI, BamHI, SalI và PstI). Polylinker không làm gãy gen *lacZ'*, khi M13 mp7 bị cắt hoá bởi *Eco*RI, BamHI hoặc SalI thì một phần polylinker bị chặt.

Khi nối kết, trong sự có mặt của ADN mới thì một trong ba biến cố có thể xảy ra:

- ADN được gắn vào.

- Polylinkơ được gắn trở lại.

- Vectơ tự nối kết mà không có sự gắn cài.

Nếu sự cài ADN mới thì gen *lacZ'* bị gãy do đó *plaque sáng* trên agar X-gal. Nếu polylikơ được gắn trở lại thì gen *lacZ'* không bị gãy do đó có *plaque màu xanh*. Cũng như vậy (plaque màu xanh) nếu trường hợp vectơ tự nối kết lại.

Sự tiến bộ của vectơ M13 mp7 là những vị trí chọn dòng cân xứng vì ADN được cài vào hoặc BamHI, SalI hoặc PstI đều có thể bị cắt từ phân tử tái tổ hợp khi dùng *Eco*RI.

c. Những vectơ M13 phức tạp hơn

Đó là vectơ M13 có polylinkơ phức tạp hơn gài vào gen *lacZ'*, chẳng hạn M13 mp8 - nó là một phần của plasmid pVC8. Giống như vectơ plasmid, ưu điểm của vectơ M13 mp8 là khả năng của nó nhận những đoạn ADN với hai đầu dính khác nhau.

Vai trò của vectơ M13 mp9 cũng cùng một polylinkơ nhưng theo hướng ngược lại.

Những đôi vectơ M13 khác như: M13 mp10/11.M13 mp18/19 tương tự như M13 mp8/9, song có polylinkơ khác nhau do đó có những vị trí cắt hạn chế khác nhau.

1.3. Các vectơ chọn dòng được dựa trên phage lamda

Hai vấn đề giải quyết trước khi các vectơ chọn dòng được dựa trên lamda phát triển.

Phân tử ADN lamda (λ) chứa 52 kb có thể tăng lên khoảng 5% tức là khoảng 3kb ADN mới thêm vào nữa. Nếu kích thước của phân tử lớn hơn 52kb, thì nó không bao gói vào cấu trúc đầu lamda được và các tiểu phần phage gây nhiễm không tiến hành được. Điều đó làm hạn chế kích thước của đoạn ADN cài vào vectơ lamda.

Bộ gen lamda thì quá lớn, điều đó phải có nhiều đoạn thứ tự nhận diện đối với các enzym cắt hạn chế. Song enzym cắt hạn chế không thể được

dùng để làm gãy phân tử lamda bình thường trong cái kiểu - mà kiểu đó sẽ cho phép gài ADN mới vào đó được. Hình như phân tử này có thể được cắt thành nhiều mẫu nhỏ mà những mẫu này có thể tạo thành bộ gen lamda mới thay đổi do kết cấu nối trở lại.

Do những khó khăn đó nên làm chúng ta ngạc nhiên rằng: có nhiều kiểu vectơ chọn dòng lamda được phát triển. Việc sử dụng đầu tiên của chúng là những mẫu ADN lớn từ 5 kb đến 40 kb, còn những mẫu quá lớn thì lại được dùng bởi plasmid hay vectơ M13.

Dưới đây là những vectơ gài vào và thay thế dựa vào phage lamda.

a. Vectơ gài vào ít nhất phải có một vị trí cắt hạn chế

Gồm có:

- Lamda NM607 đó là vectơ gài, nó mang tới 9 kb ADN mới được gài vào vị trí *Eco*RI trong gen CI.

- Lamda charon 16, ADN mới được gài vào vị trí *Eco*RI làm ức chế gen *lacZ'*.

b. Vectơ thay thế phải có hai vị trí cắt hạn chế

Gồm có:

- Lamda (UEλB'): đoạn ADN mới có thể thay vào là 15 kb.

- Lamda EMBL4: đoạn ADN mới thay vào là 23 kb.

1.4. Các vectơ chọn dòng dựa trên cosmid

Cosmid là vectơ lai tạo giữa phân tử ADN phage và plasmid vi khuẩn.

Cosmid về cơ bản là một plasmid mang vị trí cos. Vị trí cos cần cho chức phận bao gói của phage. Cosmid thiếu các gen lamda nên không sản xuất plaque.

Thí nghiệm chọn dòng với cosmid thì được giãn ra như sau: cosmid mở ra một vị trí cắt hạn chế và những đoạn ADN mới được gài vào. Những đoạn này thì được sản xuất bằng enzym cắt hạn chế và được dẫn vào cosmid. Sự nối kết được giãn ra. Sau đó ADN cosmid tái tổ hợp được bao gói và làm nhiễm *E.coli* mặc dù vòng plaque không được hình thành.

Cosmid được dùng để thuần hoá những đoạn ADN lớn có khi tới 40 kb. Khả năng này đã làm dấy lên vấn đề thư viện genom hay còn gọi là thư viện bộ gen. Thư viện bộ gen là một bộ của các dòng tái tổ hợp - mà dòng đó

chứa tất cả các ADN có mặt trong một cơ thể riêng lẻ, chẳng hạn thư viện bộ gen *E.coli* chứa tất cả những gen *E.coli*. Các cơ thể có thư viện bộ gen được giới thiệu ở bảng 9.3.

Bảng 9.3. **Số lượng các dòng gen có mặt trong thư viện bộ gen của các cá thể.**

Các cá thể khác nhau	Kích thước bộ gen (đôi base)	Số đoạn dài 17kb (1)	Số đoạn dài 35 kb (2)
Escherichia coli	$4x10^6$	700	340
Bacillus megaterium	$3x10^7$	5.300	2.600
Aspergillus nidulans	$4x10^7$	7.000	3.400
Saccharomyces cerevisiae	$7x10^7$	12.500	6.000
Drosophila melanogaster	$8x10^7$	1.410	6.850
Cà chua	$7x10^8$	125.000	60.000
Người	$3x10^9$	535.000	258.000
Ếch	$2,3x10^{10}$	4.280.000	1.997.000

(1) đoạn 17kb có thể dùng vectơ lamda EMB L4 nhân dòng.

(2) đoạn 35kb có thể dùng vectơ cosmid nhân dòng.

Những thư viện này có thể giữ lại nhiều năm, có thể gửi cho nhau từ nhóm nghiên cứu này tới nhóm nghiên cứu khác. Điều đó giúp cho sự phát triển nghiên cứu nhanh chóng trong lĩnh vực sinh học phân tử.

Ngoài vectơ đối với *E.coli* còn có các vectơ đối với các vi khuẩn khác, đó là *Streptomyces*, *Bacillus* và *Pseudomonas*. Các vectơ này phần lớn là plasmid còn một số thì từ phage như vectơ chọn dòng của *Streptomyces* thì dựa trên ϕ C31 - một loại bacteriophage.

2. Các vectơ chọn dòng đối với các vật chủ khác

Những thí nghiệm chọn dòng vi khuẩn *E.coli* chủ yếu là để nghiên cứu cấu trúc, chức năng và biểu hiện của gen trong các nghiên cứu cơ bản của sinh học phân tử. Còn trong công nghệ sinh học không chỉ nghiên cứu gen mà còn dùng sự nhân, tách dòng để kiểm tra hoặc tổng hợp những sản phẩm chuyển hoá quan trọng như hormon insulin hay thay đổi tính chất của cơ thể, chẳng hạn đưa khả năng kháng sâu bọ vào các cây trồng. Do đó chúng ta cần phải xem xét các vectơ chọn dòng đối với các cơ thể khác.

2.1. Vectơ đối với nấm men và các nấm khác

- Nấm men *S.cerevisiae* là một trong những cơ thể quan trọng nhất trong công nghệ sinh học.

- Vectơ có cấu trúc vòng 2 μm, kích thước 6kb tồn tại trong tế bào nấm men và có số lượng bản sao từ 70 đến 200.

Dùng gen leu.2 như là markơ chọn lọc.

Vectơ được dẫn ra từ vòng 2μm được gọi là *plasmid episom nấm men* hay γEps, điển hình của loại này là pJDB 219.

pJDB 219 cũng gồm các đoạn liên tiếp như pBR322 do đó có thể nhân lên và được chọn lọc cả trong nấm men và trong *E.coli* có sự gài pJDB vào một nhiễm sắc thể của các vectơ khác của nấm men.

Plasmid integrative yeast: (YLp) là plasmid vi khuẩn mang gen nấm men. Plasmid replicative yeast (YRp) là plasmid mang đoạn gen thứ tự ADN của nhiễm sắc thể chứa đoạn sao chép. Các vectơ này kết hợp với ADN nhiễm sắc thể theo kiểu tái tổ hợp giữa markơ plasmid với gen vật chủ thích hợp.

2.2. Các vectơ chọn dòng đối với thực vật bậc cao

Có ba hệ thống vectơ:

- Vectơ plasmid Ti của vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

- Vectơ virut *Cauliflower mosaic* (Ca MV).

- Vectơ vận chuyển gen trực tiếp khi dùng plasmid vi khuẩn đơn giản.

a. Vectơ chọn dòng là vi khuẩn Agrobacterium tumefaciens

A.tumefaciens (A-T) là vi khuẩn thường gây ra bệnh nổi u ở chồi (crown gall disease) trong nhiều loài thực vật hai lá mầm, bệnh này xảy ra khi có tổn thương, cho phép vi khuẩn tấn công thực vật.

Sự sinh ra bệnh này liên quan với sự có mặt của plasmid Ti (tumour inducing) trong tế bào vi khuẩn. Đó là plasmid dưới 200kb, mang nhiều gen gây nhiễm. Sau khi gây nhiễm một phần, phân tử hợp nhất vào ADN nhiễm sắc thể thực vật. Phần này được gọi là T-ADN giữa 15 và 30kb và được di truyền trong các thế hệ sau của thực vật.

Trong tự nhiên *A.tumefaciens* (A-T) gây nhiễm gần 100 loài thực vật nhưng tất cả đều là loài hai lá mầm. Sự gây nhiễm loài một lá mầm (như lúa

mạch, lúa mì, lúa gạo...) thì còn chưa được chứng minh một cách rõ ràng.

Gen mới được đưa vào qua plasmid pBR, sau đó plasmid pBR đó hợp nhất vào plasmid T_1 rồi mới đưa vào cây hai lá mầm.

b. Vectơ chọn dòng là virus Cauliflower mosaic

Hầu hết thực vật là đối tượng của những virus, phần lớn virus đó là loại ARN, cho nên khó biến nạp. Chỉ có virus ADN được biết gây nhiễm ở thực vật bậc cao, đó là Geminvirus và Caulimoviruses (CaMV). Geminvirus còn ít biết.

Bộ gen CaMV khoảng 8kb có ít nhất sáu gen và một vùng hợp nhất. Bộ gen này có hai hạn chế:

- Chỉ thêm được khoảng từ 200 đến 300 nucleotid nữa mà thôi.

- Vật chủ nhận đưa được bộ gen này vào rất hạn chế, chủ yếu là cải súp lơ và củ cải trắng. Hiện nay người ta đang mở rộng nghiên cứu xem ở loài ngũ cốc và cỏ đồng có đưa được bộ gen này vào không?

c. Vectơ vận chuyển gen trực tiếp cung cấp hệ thống chọn dòng tốt nhất đối với thực vật nông nghiệp.

Dòng pBR332 gắn gen mới dựa vào protoplast qua bắn gen hoặc qua xung điện gọi là ***chuyển gen trực tiếp***. Có lẽ đó là con đường chọn dòng đối với công nghệ gen của những cây trồng nông nghiệp, vì Ti plasmid và CaMV là hai hệ tự nhiên nhưng chúng có nhiều khó khăn và hạn chế khi sử dụng.

2.3. Vectơ chọn dòng đối với các tế bào động vật có vú

a. Vectơ dựa trên SV40

SV40 có khả năng gây nhiễm một số loài động vật có vú kéo theo vòng tan (lytic) và sinh tan (lysogenic).

Giống như lamda và CaMV, sự bắt buộc bao gói làm hạn chế lượng ADN mới gài vào bộ gen. Bộ gen SV40 nhỏ khoảng 5,2kb và chỉ dung hợp được vài trăm nucleotid ở ngoài vào.

Chỉ mới thành công được khi làm mất một đoạn gen bình thường bằng SVGT-5 người ta đưa được gen globin beta của thỏ vào tế bào khỉ.

b. Vectơ virus khác của động vật có vú

Khuyết điểm của vectơ SV40 là phân tử ADN tái tổ hợp trong đó duy

trì ở tế bào bị biến nạp chỉ một thời gian ngắn. Sự biến nạp thường xuyên không được tạo ra.

Bovine papilloma virus (BPV) là vectơ khác của động vật có vú cung cấp sự biến nạp thường xuyên hơn. BPV chủ yếu gây ra mụn cóc trên bò nhưng cũng gây nhiễm trên các loài khác. Trong các tế bào chuột, BPV có nhiều bản sao với gần 100 phân tử/1 tế bào. Chúng không gây chết tế bào chủ, các phân tử BPV chuyển sang tế bào con cháu khi tế bào vi khuẩn đã được cấu trúc. Nó chỉ ra có tiềm năng lớn để đưa những mẫu lớn ADN vào tế bào động vật có vú.

CHƯƠNG X

CÁC LOẠI VECTƠ TRONG TẠO DÒNG

I. NHỮNG VẤN ĐỀ CHUNG

Chúng ta biết rằng, tạo dòng là nhằm thu nhận một lượng lớn bản sao ADN từ một trình tự ADN xác định. Phương pháp tạo dòng này gồm năm bước trình bày trong bảng 10.1.

Bảng 10.1. **Phương pháp tạo dòng**

Các bước	Nội dung thực hiện
Bước 1	Chọn và xử lý vectơ
Bước 2	Xử lý ADN cần cho tạo dòng
Bước 3	Tạo vectơ tái tổ hợp từ hai thành phần trên
Bước 4	Chuyển vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ là vi khuẩn
Bước 5	Chọn lọc dòng vi khuẩn có chứa vectơ tái tổ hợp cần tìm hay còn gọi là phát hiện dòng cần tìm trong thư viện gen

Trong chương này trình bày chi tiết bước 1 của vấn đề chọn và xử lý vectơ.

Vectơ là một ADN, thường có dạng vòng được dùng để chuyển một đoạn ADN lạ vào tế bào vật chủ như vi khuẩn, nấm men, tế bào động thực vật v.v... vectơ được dùng chủ yếu trong phương pháp chuyển gen hay vectơ được dùng trong phương pháp tạo dòng vì xác định một gen trong sinh vật nhân chuẩn (eukaryote) là rất khó, người ta thường ví chẳng khác nào như đáy bể mò kim, nhưng kim ở đây lại nằm trong biển kim nên phải tách chiết, tinh sạch và nhân dòng.

- Bốn đặc tính phải có của một vectơ được trình bày tóm tắt trong bảng 10.2.

Bảng 10.2. **Các đặc tính của vectơ**

Đặc tính	Nội dung đặc tính
Đặc tính 1	Vectơ phải có khả năng và xâm nhập được vào tế bào chủ
Đặc tính 2	Vectơ phải tự sao chép tích cực bên trong tế bào chủ
Đặc tính 3	Vectơ phải cho phép chọn lọc dễ dàng các dòng vi khuẩn có mang vectơ tái tổ hợp.
Đặc tính 4	Vectơ phải có khả năng đặc biệt tiếp nhận tốt gen lạ

Thông thường có năm loại vectơ được trình bày tóm tắt trong bảng 10.3.

Bảng 10.3. **Các loại vectơ**

Loại vectơ	Đặc tính
1. Vectơ plasmid	- Thông thường gắn 8-9kb ADN lạ, tế bào chủ là vi khuẩn
2. Vectơ phage	- Có thể gắn 15-20 kb ADN lạ, xâm nhiễm tế bào vi khuẩn cao.
3. Vectơ cosmid (phối hợp giữa plasmid và phage lamda)	- Có thể gắn tới 35-50 kb ADN lạ, phát triển ở vi khuẩn.
4. Vectơ virut của sinh vật nhân chuẩn SV40 đối với động vật, CaMV đối với thực vật. Adenovirus Retrovirus Herpesvirus Vacciniavirus	- Có thể xâm nhiễm vào tế bào động vật, thực vật
5. Vectơ thể nhiễm sắc nấm men nhân tạo	- Có thể xâm nhập vào tế bào nấm men. - Đưa gen lạ có kích thước lớn 150-1000 kb

Tuỳ theo ADN tạo dòng, người ta phân biệt được hai loại thư viện gen dưới đây (bảng 10.4).

Bảng 10.4. **Phân biệt hai loại thư viện gen**

	Loại thư viện gen	Đặc tính
Loại 1	Thư viện bộ gen	- ADN được tạo dòng là toàn bộ trình tự ADN của bộ gen. - Cho phép nghiên cứu toàn bộ các trình tự mã hoá và không mã hoá chứa trong bộ gen.
Loại 2	Thư viện cADN	- ADN được tạo dòng là tập hợp tất cả cADN xuất phát từ các m ARN của một loạt tế bào chuyên biệt. - Chỉ cho phép biểu hiện của gen ở mức độ phiên mã trong tế bào sinh vật

II. CÁC LOẠI VECTƠ

1. Vectơ plasmid

Những đặc điểm cơ bản của vectơ plasmid

1.1 Plasmid là phân tử ADN vòng có trong vi khuẩn. Plasmid mang một hay nhiều gen và thường những gen đó có ích cho vật chủ: chẳng hạn plasmid mang gen kháng kháng sinh làm cho vi khuẩn chống được một số kháng sinh, đồng thời có lợi cho công nghệ gen vì chúng cung cấp một phương tiện thuận lợi để lựa chọn các tế bào có mang gen lạ.

1.2 Tất cả các plasmid có ít nhất một đoạn ADN có nguồn gốc nhân lên, do đó chúng có khả năng nhân lên mà hoàn toàn không lệ thuộc vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn.

1.3 Một vài loại plasmid cũng có khả năng nhân lên bởi tự gài vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn, plasmid đó gọi là episom.

1.4 Kích thước của các plasmid khoảng từ 10 kb cho tới 250 kb.

1.5 Số lượng bản sao (copy) từ 1 đến 50

1.6 Có năm loại plasmid chính

a. *Plasmid F* - có khả năng khởi động chuyển plasmid sang một cơ thể khác.

b. *Plasmid R kháng lại kháng sinh.*

c. *Plasmid col - mã hoá colicin* một phân tử protein giết vi khuẩn khác.

d. *Plasmid thoái hoá* - cho phép vi khuẩn làm thoái hoá những phân tử chuyển hoá không bình thường như toluen, acid salicylic.

e. *Plasmid độc* - gây bệnh lý cho vật chủ như plasmid Ti sinh ra bệnh ung thư rễ trên cây hai lá mầm.

1.7 Trong nấm men S. cerevisae cũng có plasmid vòng 2μm; nó kết hợp với pBR322 của *E.coli* tạo ra vectơ episom gài vào ADN chromosom của nấm men và nhân lên nhiều lần

Tóm lại ***plasmid vi khuẩn*** là phân tử ADN hai chuỗi vòng nhỏ, có chức phận tự nhiên là kháng kháng sinh . Plasmid có nhiều đặc tính mà những đặc tính đó được sử dụng đặc biệt vào cấu trúc vectơ chọn dòng. Chúng có thể có một bản duy nhất hay nhiều bản sao trong phạm vi một vi khuẩn và tái bản không lệ thuộc vaò ADN của vi khuẩn. Thứ tự ADN toàn

bộ của nhiều plasmid đã được biết. Nhờ đó người ta có thể gài đoạn ADN ngoại lai vào những vị trí chính xác bởi những enzym cắt hạn chế. Plasmid nhỏ hơn nhiễm sắc thể vật chủ (vi khuẩn), bởi vậy người ta có thể tách nó dễ dàng ra khỏi ADN vi khuẩn để thao tác gắn ADN ngoại lai.

Từ khi phát hiện được plasmid có các đặc điểm và tính chất nêu ở trên, cho đến nay các plasmid không ngừng được cải tiến, ngày càng mang thêm nhiều đặc tính quý cho việc tạo dòng. Hiện nay đã sinh ra ba thế hệ của plasmid (xem bảng 10.5).

***Bảng 10.5.* Các đặc tính của các thế hệ plasmid**

Các thế hệ của plasmid	Ví dụ	Các đặc tính quý
Plasmid thế hệ 1	Đó là các plasmid tự nhiên như: pSC101, Col E_1...	Góp phần tạo dòng các gen eukaryote
Plasmid thế hệ 2	pBR322	- Kích thước 4363 bp - Có hai gen kháng kháng sinh : + Ap^R- kháng ampicilin + Tc^R- kháng tetracilin - Có 20 vị trí nhận biết enzym giới hạn RE. - Có 11 vị trí đưa gen ADN lạ xen vào trong số đó có những vị trí nằm trong các gen kháng kháng sinh nên khi có gen ADN lạ xen vào sẽ làm mất tính kháng kháng sinh tương ứng
Plasmid thế hệ 3		- Đây là plasmid mạnh nhất với hai đặc tính: + Kích thước nhỏ nên sao chép nhanh, tạo ra số bản sao lớn. + Có mang polylinkơ, đó là một đoạn polynucleotit tổng hợp tương ứng với một chuỗi các vị trí nhận biết duy nhất của các enzym giới hạn (RE). - Hiện có ba nhóm: + Nhóm pUC, 2600bp, mang gen ApR và một phần gen *lacZ* để dễ phát hiện mẫu xen vào giữa gen *lacZ* là polylinkơ có thể cho phép gắn xen vào bất cứ gen lạ nào. + Nhóm pSP và Gemini, 3000bp mang gen ApRp và polylinkơ, có một promoter đặc trưng cho ARN polymeraza ở hai bên polylinkơ thuận lợi cho phiên mã ra nhiều ARN để làm mẫu dò nghiên cứu. + Nhóm pBluescript kết hợp được tất cả các ưu điểm nói trên.

2. Vectơ thực khuẩn thể

Những đặc điểm và tính chất của thực khuẩn thể

Thực khuẩn thể (phage) là virus gây nhiễm vi khuẩn, nó có một số tính chất sau:

2.1. Cấu trúc của chúng rất đơn giản phần chủ yếu là ADN (đôi khi là ARN) mang nhiều gen, trong đó có gen nhân thực khuẩn thể được bao bọc bởi lớp áo bảo vệ hoặc capsid là những phân tử protein.

2.2. Quá trình gây nhiễm gồm ba giai đoạn:

a. *Giai đoạn 1.* Những tiểu phần thực khuẩn thể buộc vào phía bên ngoài của vi khuẩn và tiêm nhiễm sắc thể vào bên trong tế bào.

b. *Giai đoạn 2.* ADN của thực khuẩn thể được tái sinh.

c. *Giai đoạn 3.* Những gen khác của thực khuẩn thể trực tiếp tổng hợp các thành phần protein của nó. Những tiểu phần mới được tập hợp lại và được giải phóng khỏi vi khuẩn.

2.3. Chỉ có thực khuẩn thể lamda và thực khuẩn thể M13 là được tìm thấy vai trò thực như những vectơ chọn dòng, mặc dù có nhiều loại thực khuẩn thể khác nhau.

2.4. Tổ chức gen trong phân tử ADN lamda

Lamda là loại thực khuẩn thể điển hình có đầu và đuôi. ADN chứa trong cấu trúc đầu polyhedral và đuôi thì dùng để buộc thực khuẩn thể vào bề mặt vi khuẩn để tiêm ADN vào tế bào.

Phân tử ADN lamda về kích thước gồm 49kb và đã được nghiên cứu bằng kỹ thuật làm bản đồ gen và phân tích thứ tự ADN.

Nó là chuỗi kép ADN, có dạng thẳng và vòng.

2.5. Tổ chức gen trong phân tử ADN M13.

Đó là thực khuẩn thể hình sợi, hoàn toàn khác gen lamda. Về chiều dài nó gồm 6407 nucleotit và là ADN chuỗi đơn dạng vòng với vỏ chỉ có ba protein chứ không phải 15 protein như lamda. Mặc khác chu kỳ gây nhiễm đơn giản hơn và bộ gen không gài vào ADN vật chủ.

Khi gây nhiễm, ADN của M13 vào trong tế bào *E.coli* qua lông rụng. Chuỗi đơn này làm khuôn để tổng hợp chuỗi bổ sung và như vậy có ADN chuỗi kép. Phân tử này không được gài vào bộ gen vi khuẩn nhưng được

dùng để tái bản cho tới hơn 100 bản sao ADN trong tế bào. Khi vi khuẩn phân chia, mỗi bản sao ADN con cháu của bộ gen thực khuẩn thể tiếp tục tái bản và duy trì một lượng lớn trong mỗi tế bào. Những tiểu phần thực khuẩn thể mới tiếp tục tập hợp và giải phóng, vào khoảng 1000 thực khuẩn thể mới được sản xuất cho mỗi thế hệ của tế bào bị nhiễm.

2.6. M13 là phương tiện tách dòng hấp dẫn

Vì:

a. Dạng tái bản ADN chuỗi kép của bộ gen M13 rất giống plasmid và có thể được xử trí như vậy trong các mục đích thí nghiệm.

b. Những dạng này dễ dàng được tạo ra từ nuôi cấy tế bào *E.coli* và có thể đưa vào bởi sự gây nhiễm.

c. Những gen được tách dòng với vectơ dựa trên M13 có thể thu được ở dạng ADN chuỗi đơn.

d. Những chuỗi đơn này có thể dễ dàng để phân tích thứ tự và dễ dàng gây biến dị *invitro*.

Tóm lại thực khuẩn thể chứa ADN thẳng, trong đó người ta có thể đưa ADN ngoại lai vào nhiều vị trí hạn chế. *Plasmid chỉ có thể tiếp nhận đoạn ADN có chiều dài 6-10kb*; trong khi đó *thực khuẩn thể có thể nhận đoạn ADN có chiều dài tới 10-20kb*. Mặt khác sử dụng phage làm vectơ có ưu điểm hơn so với vectơ plasmid và phage có một hệ thống xâm nhập tế bào vi khuẩn chủ, có khả năng tăng hiệu quả xâm nhiễm nhanh hơn nhiều so với chuyển plasmid vào vi khuẩn.

Nhưng nếu đoạn ADN ngoại lai dài hơn thì có thể chọn dòng cosmid, mà nó là sự phối hợp những đặc tính tốt nhất của plasmid và thực khuẩn thể lamda. Cosmid là plasmid có đoạn cos cần thiết cho việc bao gói ADN lamda vào thực khuẩn thể. Vectơ này phát triển ở dạng plasmid trong vi khuẩn. Nhiều cosmid có thể mang đoạn ADN gài vào với chiều dài từ 35-50kb. Dưới đây là bảng những vectơ phổ biến để chọn dòng (bảng 10.6).

***Bảng 10.6.* Các vectơ phổ biến để chọn dòng**

Vectơ	Độ lớn của ADN ngoại lai có thể gài được
Plasmid pBR322	0,01-10 kb
Charon 4A	10-20 kb
Cosmid	35-50 kb

Hiện nay phage cũng được cải tiến nhiều để hoàn thiện các tính chất của vectơ (bảng 10.7).

Bảng 10.7. **Những đặc điểm các phage**

Các thế hệ vectơ phage	Ví dụ	Các đặc điểm
Phage thế hệ 1	Phage tự nhiên lamda	48502 bp
Phage thế hệ 2	Phage EMBL 3 và 4	Có polylinkơ tiếp nhận 15-20 kb ADN là thích hợp. Thích hợp cho vectơ thiết lập thư viện bộ gen.
Phage thế hệ 3	Lamda GEM 11 và 12	- Có vùng polyliker. - Có promotơ đặc trưng cho ARN polymerase để tổng hợp một lượng lớn ARN, để dò ADN trong thư viện gen
Phage thế hệ 4	Lamda 11 và 18-23	Đây là vectơ biểu hiện có mang một gen *lacZ* để phát hiện vectơ tái tổ hợp trong thư viện gen

3. Các nhiễm sắc thể nhân tạo của động vật có vú

Các nhiễm sắc thể nhân tạo của động vật có vú còn có tên là MAC (mammifere artificial chromosomes). Những vectơ này có nguồn gốc từ người TEL, CEN... Đưa MAC vào tế bào động vật có vú và giữ ổn định trong tế bào.

4. Các nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men

Nấm men (YAC = yeast artificial chromosomes), cho phép tạo dòng những đoạn ADN có kích thước từ 150-1000 kb (kích thước trung bình là 350 kb).

- Nhiễm sắc thể nhân tạo bây giờ được kết cấu có ba trình tự sau thì nhân đôi và phân ly rất tốt.

+ TEL [Telomeric sequense- Trình tự đầu cuối của nhiễm sắc thể (NST)].

+ CEN (Centromeric sequense- Trình tự trung tâm của nhiễm sắc thể)

+ ARS (Autonomous replicating sequense- Trình tự sao chép tự chủ).

- YAC này đưa vào tế bào nấm men bằng phương pháp biến nạp và ở đó chúng sẽ nhân lên như nhiễm sắc thể tự nhiên.

- YAC liên tục được cải tiến chẳng hạn gắn thêm ORI (điểm khởi đầu sao chép) gen kháng ampicilin, polylinkơ và promotơ đặc trưng cho T_3, T_4, ARN polymeraza..

5. Các vectơ là virut của sinh vật nhân chuẩn

Các virut (virus) là những phương tiện chọn dòng đối với các cơ thể khác vì rằng: hầu hết các cơ thể sống đều bị nhiễm bởi virus. Điều này đặc biệt quan trọng khi nhớ lại rằng, các vectơ plasmid chỉ đưa được vào vi khuẩn và nấm men nhưng vectơ virus thì có tiềm năng đưa được vào cả động vật và thực vật.

Những virus động vật như SV40, virus thực vật như virus khảm xúp lơ CaMV là những virus được chú ý nhất hiện nay. Các virus khác sử dụng trong vectơ chọn dòng còn đang được nghiên cứu đó là Adenovirut, Retrovirut, Herpesvirus và Vacciniavirus.

CHƯƠNG XI

SỰ TẠO DÒNG GEN VÀ PHÁT HIỆN DÒNG CẦN TÌM

I. CÁC BƯỚC CỦA PHƯƠNG PHÁP TẠO DÒNG GEN

1. Các vấn đề cơ bản

Các vấn đề cơ bản trong việc tạo dòng gen gồm bốn công đoạn:

1. Tạo ra các đoạn ADN
2. Gắn vào một vectơ
3. Nhân trong một tế bào vật chủ
4. Chọn lọc các đoạn trình tự quan tâm

Mục đích của việc tạo dòng là nhằm thu được một lượng lớn bản sao của một trình tự ADN xác định. Tuỳ thuộc vào thư viện gen cần thiết lập, do đó các nhân tố tham gia vào quá trình tạo dòng (vectơ, tế bào chủ, chuyển vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ...) có thể thay đổi nhưng tiến trình tạo dòng bao giờ cũng gồm các bước sau:

1.1. Chọn và xử lý vectơ

- Trước hết vectơ được cắt ở một vị trí xác định bằng một enzym giới hạn.

- Xử lý ở hai đầu mối cắt để chúng không thể nối lại được.

- Vectơ chỉ ở dạng vòng khi hai đầu chỗ mối cắt được nối với một gen lạ.

1.2. Xử lý ADN cần cho tạo dòng (insert)

- Chọn các đoạn ADN có kích thước gần nhau và tương ứng với loại vectơ đã chọn.

- Xử lý hai đầu của các ADN này cho phù hợp với hai đầu chỗ mối cắt

của vectơ (bằng cùng một enzym giới hạn cắt).

1.3. Tạo vectơ tái tổ hợp

- Vectơ và ADN cần tạo dòng được trộn chung theo một tỷ lệ nhất định với sự hiện diện của ligase.

- Vectơ tái tổ hợp sẽ được hình thành dưới tác dụng của ligase làm nối vectơ với ADN.

- Vectơ tái tổ hợp này được tinh sạch qua tách chiết và tủa.

1.4. Chuyển vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ

Chuyển vectơ tái tổ hợp vào tế bào chủ nhằm sử dụng bộ máy của tế bào chủ thích hợp , để sao chép vectơ tái tổ hợp thành một số lượng lớn bản sao.

1.5. Phát hiện dòng cần tìm trong thư viện gen

Để phát hiện dòng cần tìm người ta sử dụng một mẫu dò. Mẫu dò đó có thể là kháng thể đặc trưng cho protein được mã hoá bởi gen cần tìm hoặc mẫu dò đó là trình tự ADN bổ sung cho gen cần tìm.

2. Các thư viện gen

2.1. Thư viện bộ gen

- Để thiết lập thư viện bộ gen (genomic library), trước hết người ta tách chiết ADN bộ gen của sinh vật đó.

- Cắt ADN thành những đoạn có kích thước xác định bằng các enzym giới hạn.

- Gắn các đoạn đó vào vào vectơ, tạo vectơ tái tổ hợp (bảng 11.1)

- Các vectơ tái tổ hợp sau đó được đưa vào tế bào chủ. Các tế bào chủ sẽ được nuôi cấy trên môi trường đặc và hình thành nên những dòng (clone).

- Việc thiết lập thư viện bộ gen theo các bước cơ bản của kỹ thuật tạo dòng nói trên.

- Vectơ tạo dòng thư viện bộ gen có thể sử dụng

+ Phage: đoạn ADN khoảng 10-20 kb.

+ YAC: đoạn ADN > 150 kb.

+ Cosmid: đoạn ADN khoảng 35-45 kb.

- *Thư viện bộ gen* chỉ cần khi giải mã di truyền của một cấu trúc intron- exon của một gen xác định và tạo dòng các trình tự ADN điều hoà biểu hiện gen.

Bảng 11.1. **Kích thước thư viện hệ gen của các sinh vật khác nhau**

Sinh vật	Kích thước hệ gen	Đoạn xen 20 kb	Đoạn xen 45 kb
Escherichia coli (vi khuẩn)	$4,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$
Sacchromyces cerevisiae (nấm men)	$1,4 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$	$9,3 \times 10^2$
Arabidopsis thaliana (thực vật bậc cao đơn giản)	$7,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$4,7 \times 10^3$
Drosophila melanogaster (ruồi quả)	$1,7 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
Stronglyocentrotus purpuratus (nhím biển)	$8,6 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$5,7 \times 10^4$
Homo sapiens (người)	$3,0 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$
Triticum aestivum (lúa mì lục bội)	$1,7 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$

2.2. Thư viện cADN

- Thư viện cADN là tập hợp các bản sao cADN từ tất cả các mARN của một tế bào nhờ qua enzym nhiên mã ngược dòng.

- Việc thiết lập thư viện cADN cũng tuân theo nguyên tắc của kỹ thuật tạo dòng nói trên.

- Vectơ tạo dòng thư viện cADN thường được sử dụng loại plasmid pUC, Gemini, Bluescript.

- Các loại vectơ này kết hợp với cADN (<9 kb) tạo thành vectơ tái tổ hợp và đưa vào vi khuẩn bằng phương pháp biến nạp như đã nói ở chương biến nạp.

II. SỰ PHÁT HIỆN DÒNG CẦN TÌM

Người ta có thể phát hiện dòng tái tổ hợp cần tìm trong thư viện bộ gen hay thư viện cADN bằng hai phương pháp thông dụng sau đây:

1. Phương pháp sử dụng các oligonucleotit tổng hợp

Protein cần nghiên cứu được tách chiết tinh sạch, vài trình tự ngắn (15-

200 axit amin) của protein được xác định.

Tương ứng với trình tự axit amin, trình tự oligonucleotit phù hợp nhất được tổng hợp với đánh dấu ở đầu 5' bằng đồng vị phóng xạ hay bằng hoá chất nhờ polynucleotit kinaza.

Mẫu dò oligonucleotit sau đó được đem lai với thư viện gen qua phương pháp lai tại chỗ và phát hiện bằng kỹ thuật phóng xạ tự ghi hay kỹ thuật miễn dịch tế bào.

2. Phương pháp sử dụng kháng thể

- Sử dụng phương pháp này khi có một kháng thể đặc trưng cho protein mã hoá bởi gen cần tạo dòng và vectơ sử dụng là vectơ cho phép dịch mã đoạn ADN tạo dòng thường gặp đó là vectơ lamda gtl.

- Nguyên tắc của phương pháp theo Huỳnh Hoàng Dương đã mô tả như sau:

+ Khi các đĩa phân giải do các phage tái tổ hợp tạo ra trên mặt lớp vi khuẩn đạt kích thước nhất định (1-2 mm), người ta đặt lên trên một màng nitrocellulose tẩm IPTG, chất cảm ứng của operon lac. IPTG sẽ cảm ứng sự tổng hợp protein "lai" (được mã hoá bởi tổ hợp gen *lac*Z-ADN cần tạo dòng).

+ Protein "lai" hấp phụ lên bề mặt màng và màng được đem ủ với kháng thể đặc trưng. Phức hợp kháng thể – protein sẽ được phát hiện nhờ một protein đánh dấu bằng ^{125}I có khả năng gắn với kháng thể. Kết quả thu nhận dưới dạng một bảng phóng xạ tự ghi. Các đĩa phân giải tương ứng với tín hiệu nhận được sẽ được thu nhận lại.

CHƯƠNG XII

PHƯƠNG PHÁP PCR DÙNG TRONG TẠO DÒNG IN VITRO

Các phương pháp tạo dòng *in vivo*[*] đã được đề cập ở các phần trước tuy giải quyết được vấn đề về số lượng vật chất di truyền nhưng đòi hỏi thao tác phức tạp và thời gian dài. Sự ra đời của phương pháp PCR đã đảo lộn nguyên tắc của việc tạo dòng cổ điển, mở ra những triển vọng ứng dụng to lớn. Phương pháp PCR thực chất là một phương pháp tạo dòng *in vitro*[*], không cần sự hiện diện của tế bào, nhằm mục đích thu nhận một số lượng lớn bản sao của một trình tự xác định. Qua 32 chu kỳ số phân tử ADN mạch kép sinh ra đã là 1.073.741.82 (bảng 12.1)

Phương pháp PCR (polymerase chain reation) thực chất gồm bốn bước sau:

Bước 1. Nghiên cứu và tổng hợp các cặp đoạn mồi (primer) đặc hiệu cho gen muốn tạo dòng.

Bước 2. Tách chiết ADN từ các mẫu đối tượng nghiên cứu đem đo quang phổ cũng như chạy điện di trên gel agarose.

Bước 3. Nghiên cứu các điều kiện tối ưu để tiến hành PCR, câu gen muốn tạo dòng và phóng đại nó.

Bước 4. Tiến hành điện di sản phẩm PCR trên gel agarose và so sánh với đối chứng để phát hiện.

I. PHẢN ỨNG CHUỖI POLYMERAZA

1. Nguyên tắc chung

Trước khi đi vào các bước tiến hành PCR chúng ta cân nhắc lại tổng hợp ADN trong tế bào.

---

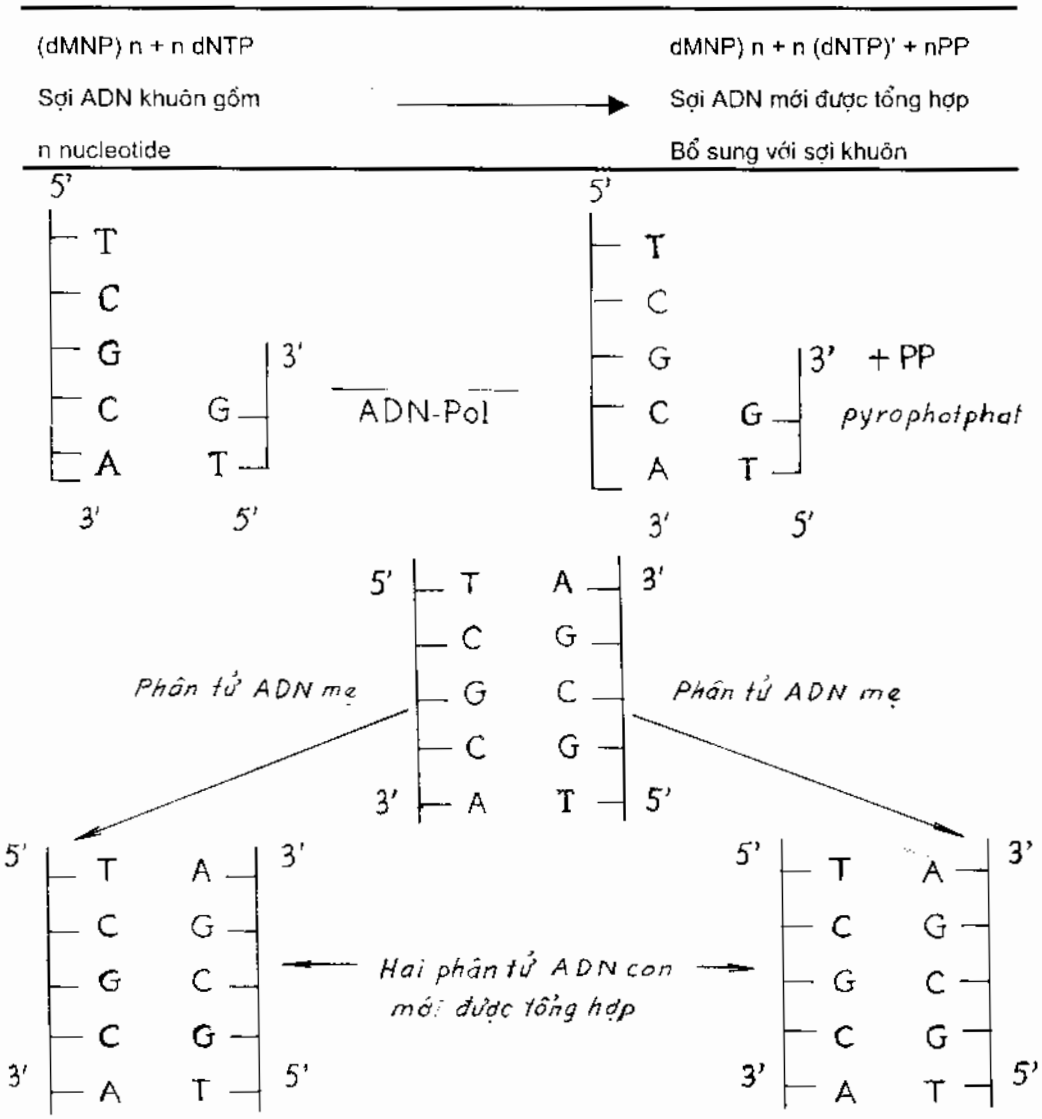
[*] In vitro: trong ống nghiệm; in vivo: trong cơ thể sống – *BTV*.

Bảng 12.1. **Số phân tử ADN sinh ra tương ứng với các chu kỳ**

Số chu kỳ	Số phân tử ADN - Mạch kép sinh ra
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	5.024
13	2.048
14	4.096
15	8.192
16	19.384
17	32.768
18	65.536
19	31.072
20	262.144
21	524.288
22	1.048.567
23	2.097.152
24	4.194.304
25	8.388.608
26	16.777.246
27	33.544.432
28	67.108.864
29	134.217.728
30	268.435.456
31	536.870.912
32	1,073.741.82

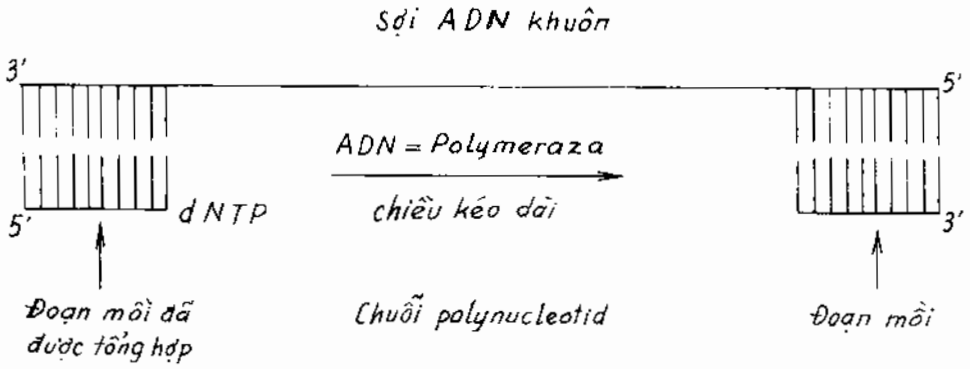
Trong tế bào (in vivo) phân tử ADN được tổng hợp nhờ ADN polymeraza (DNA - Pol). Mỗi sợi ADN đều được dùng làm sợi khuôn (template), ADN polymeraza xúc tác sự gắn các deoxyribonucleosid - triphophat (dNTP) đó là dATP, dCTP, dTTP tạo nên sợi thứ hai bổ sung với sợi khuôn.

Sơ đồ tổng quát sự tổng hợp ADN trong tế bào dưới đây (hình 12.1)



Hình 12.1. **Sự gắn dần từng nucleosid monophotphat (dNMP) vào sợi bổ sung đang được tổng hợp**

Quá trình tổng hợp ADN trong tế bào diễn ra rất phức tạp với sự tham gia của rất nhiều yếu tố. Ở đây chỉ nêu một điểm rất quan trọng đó là: oligonucleotid gọi là đoạn mồi bổ sung với những đoạn tương ứng ở sợi ADN khuôn, sau đó là sự kéo dài ADN bổ sung nhờ ADN - polymeraza (hình 12.2).



Hình 12.2. **Chuỗi polynucleotid tổng hợp**

Như vậy tạo sự tạo thành nhiều đoạn ADN bổ sung với sợi ADN khuôn, sau đó là sự loại trừ những đoạn mồi ADN. Sự lấp đầy và nối các đoạn ADN bổ sung thành sợi ADN hoàn chỉnh bổ sung với sợi ADN khuôn.

2. Phản ứng PCR

Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) là một kỹ thuật tổng hợp nhiều lần in vitro (nhân lên hay khuyếch đại) một đoạn ADN nằm giữa hai vùng có chuỗi nucleotid đã biết.

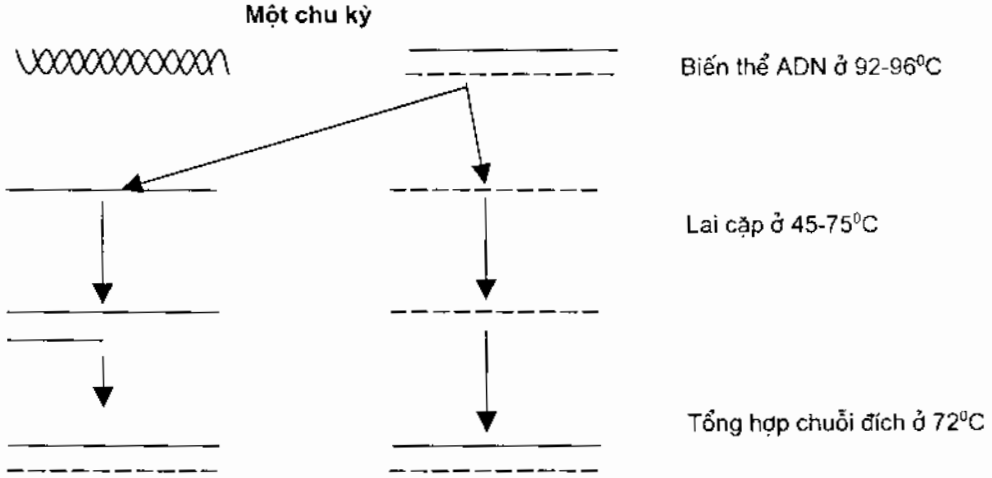
Trong phản ứng PCR, nhiệt độ là yếu tố cực kỳ quan trọng và kèm theo nó là những yếu tố thời gian. PCR diễn ra qua ba bước cho mỗi chu kỳ.

a. Bước 1. Làm biến thể ADN khuôn ở 92^0C - 96^0C khiến cho hai sợi ADN tách rời nhau và duỗi ra, bộc lộ chuỗi đích (targel sequence) tức là đoạn ADN đặc hiệu định nhân lên (của một sinh vật định nghiên cứu). Sự biến thể ADN diễn ra dưới sự có mặt của dư thừa (về mặt phân tử) của hai đoạn mồi và bốn loại dNTP diễn ra trong vòng 30 giây - 1 phút.

b. Bước 2. Lai cặp những đoạn mồi với chuỗi đích ở nhiệt độ 45^0C-

75^{0}C. Các đoạn mồi gắn với chuỗi đích theo quy luật bổ sung đôi bazơ trong 30 giây -1 phút.

c. Bước 3. Tổng hợp chuỗi đích ở 72^{0}C. Các đoạn mồi được kéo dài nhờ ADN polymeraza, bản sao của chuỗi được tổng hợp. Sau đó chuỗi đích và bản sao của nó lại được dùng làm khuôn cho chu kỳ sau. Như vậy, chu kỳ biến thể, lai cặp, tổng hợp đoạn ADN được lặp lại nhiều lần (35 - 40 lần), sau mỗi chu kỳ sản phẩm định nghiên cứu (đoạn ADN đích) tăng gấp hai lần. Sau n chu kỳ sẽ có 2^n đoạn ADN "đích" được nhân lên. Thời gian kéo dài từ 30 giây - nhiều phút, theo tính toán sau 30 giây chu kỳ sự khuếch đại sẽ là 10^6 so với số lượng mẫu ban đầu (hình 12.3).



Hình 12.3. **Sơ đồ các bước phản ứng chuỗi polymeraza (PCR)**

Trong các chu kỳ kể trên, sự thay đổi về nhiệt độ diễn ra trong thời gian ngắn, vì vậy khó mà thực hiện được bằng cách thủ công. Vì vậy sự khuếch đại đoạn ADN được thực hiện trong một máy vi tính hoá với những chương trình vận hành do người nghiên cứu xác định: máy luân nhiệt (thermal cycler).

2.1. Phản ứng PCR gồm những thành phần

a. Chuỗi đích

ADN của gen muốn tạo dòng hay của virut (ví dụ virut viêm gan B), của tế bào sinh vật (ký sinh trùng sốt rét, vi khuẩn...). Trong nghiệm phẩm được đưa vào hỗn hợp PCR dưới dạng sợi đơn hay sợi đôi hoặc có thể phân

cắt thành những đoạn ngắn hơn nhờ enzym giới hạn (restriction endonuclease), chuỗi đích (đoạn ADN cần khuếch đại) được khuếch đại dưới dạng thẳng có hiệu quả hơn là dạng vòng kín. Do đó thường làm duỗi thẳng ADN plasmid (vòng) trước khi chúng được dùng làm khuôn trong PCR.

b. Những đoạn oligonucleotid mồi

Chúng có ít nhất 16 nucleotid và thường có 20 - 30 nucleotid. Chúng phải có thứ tự nucleotid bổ sung tuyệt đối với những đoạn tương ứng của ADN khuôn, không có cấu trúc bậc hai phức tạp, không bổ sung lẫn nhau, có thể tổng hợp được trên *in vitro*. Đoạn mồi lại cặp với ADN khuôn ở nhiệt độ thấp (37 - 55^{0}C), ở nhiệt độ này ADN polymeraza bắt đầu hoạt động kéo dài đoạn mồi với tốc độ chậm (tăng nhanh ở 72^{0}C). Nồng độ đoạn mồi thường dùng là 1μM đã cho ít nhất 30 chu kỳ khuếch đại.

c. Taq ADN - polymeraza

Trước đây, người ta dùng *E.coli* ADN - polymeraza, nhưng nó có nhiều nhược điểm nên ngày nay người ta dùng Taq ADN - polymeraza chịu nhiệt, chiết xuất từ một vi khuẩn ưa nhiệt *Thermus aquaticus*. Enzym này vẫn tồn tại ở nhiệt độ ủ 95^{0}C kéo dài, không bị bất hoạt bởi giai đoạn gây biến thể bằng nhiệt và không cần thay thế ở mỗi chu kỳ khuếch đại.

d. Những dung dịch đệm được dùng trong PCR

Dung dịch đệm chuẩn cho PCR chứa 50mM KCl, 10 mM tris- HCl (pH = 8,3 ở nhiệt độ phòng) và 1,5 mM $MgCl_2$, khi ủ ở nhiệt độ 72^{0}C. pH của dung dịch đệm giảm còn khoảng 7,2 vì nồng độ Mg^{+2} rất thấp nên nghiệm phẩm ADN khuôn không được chứa nhiều tác nhân chelat hoá (EDTA) hoặc nhiều nhóm có điện tích âm (photphat...) ADN đích dùng làm khuôn nên được pha trong 10mM tris- HCl (pH = 7,6), 0,1mM EDTA (pH = 8,0). Cũng có thể thay đổi nồng độ các thành phần (thí dụ: 10mM tris - HCl, 50mM KCl và nồng độ $MgCl_2$ thay đổi 0,05 - 5mM với mức tăng mỗi lần 0,5mM thực hiện PCR với mỗi dung dịch và rút kinh nghiệm.

e. Deoxyribonucleosid tripphotphat (dNTP)

dNTP được sử dụng với những nồng độ bão hoà (200μM đối với mỗi dNTP). Một dung dịch dự trữ của các dNTP (5mM), nên điều chỉnh tới pH = 7,0 bởi NaOH 1N để đảm bảo pH của phản ứng cuối cùng không giảm thấp hơn 7,1 (bảng 12.2).

Bảng 12.2. **Các yếu tố tham gia phản ứng PCR**

Các yếu tố		Đối tượng	Mục đích
1	Đoạn ADN đích	Được tách ra từ virut (*HIV Dengue, Hepatitis B, EBV...*) vi khuẩn, ký sinh trùng	Một sợi ADN để làm khuôn tổng hợp sợi ADN mới bổ sung
2	Primer	Có khoảng 20-30 mononucleotid được tổng hợp từ máy Synthesizer	Được bổ sung vào hai đầu của đoạn ADN khuôn khổ để làm mồi kéo dài tổng hợp.
3	Taq ADN polymeraza	Enzym ADN polymeraza Thermus aquaticus là enzym chịu nhiệt có thể tới 95^{0}C mà không bất hoạt từ vi khuẩn ưa nhiệt. Enzym này chịu được nhiệt nên không cần thay thế enzym cho mỗi bước của chu kỳ khuếch đại.	Xúc tác cho việc gắn bổ sung các mononuleotid vào sợi ADN khuôn
4	Dung dịch đệm	tris HCl, pH = 8,3; KCl, $MgCl_2$	Để phản ứng tiến hành thuận lợi trong môi trường giữ pH cố định và Mg^{2+} kích hoạt enzym
5	Deoxyribonu -cleosid triphophat (dNTP)	Có bốn loại bazơ dNTP	Là những cơ chất cần cho phản ứng enzym ADN polymeraza để tổng hợp sợi ADN bổ sung.

2.2. Cách tiến hành chạy PCR

Bảng 12.3. **Nội dung của bốn bước tiến hành chạy PCR**

Các bước	Nội dung các bước			
1	Đặt chương trình thời gian cho máy luân nhiệt			
	Thời gian	Biến thể 95^{0}C	Lai tạo primer 50^{0}C	Kéo dài 72^{0}C
	Chu kỳ đầu	5 phút	2 phút	3 phút
	Chu kỳ tiếp theo	1 phút	2 phút	3 phút
	Chu kỳ cuối	5 phút	2 phút	10 phút
2	Chuẩn bị mẫu dung dịch chứa đủ các thành phần phản ứng trong một ống nghiệm: H_2O, dung dịch đệm, $MgCl_2$, dNTP, cặp primer, Taq ADN pol, ADN đích từ virut, vi khuẩn hay gen muốn nhân dòng.			

3	Chạy máy luân nhiệt Cho các ống nghiệm vào máy luân nhiệt Bật máy hoạt động cho đến khi kết thúc cho chữ END (Như vậy có khoảng 25 chu kỳ khuếch đại thì mới dễ phát hiện bằng điện di)
4	Chạy điện di trên agel agarose Pha mẫu thử ống nghiệm với thuốc chỉ thị màu, chuyển vào giếng thạch gel. agarose và cho chạy điện di trong khoảng 60 phút, 90v, 11A. Quan sát bằng đèn tử ngoại, sản phẩm ADN khuếch đại có màu hồng.

II. CÁC CHỈ TIÊU ẢNH HƯỞNG ĐẾN PHẢN ỨNG PCR

1. ADN mẫu

Lượng ADN mẫu chỉ cần một lượng nhỏ (100ng).

2. Enzyme

ADN polymerase chịu nhiệt.

3. Mồi và nhiệt độ lai

Mồi là chỉ tiêu quan trọng nhất để đạt được một sự khuếch đại đặc trưng và có hiệu quả cao. Việc chọn mồi phải tuân thủ một số nguyên tắc sau:

3.1. Trình tự của mồi không có sự bắt cặp bổ sung giữa mồi "xuôi" và mồi "ngược" và không có cấu trúc "kẹp tóc" do sự bắt cặp bổ sung giữa các phần khác nhau của một mồi.

3.2. Tm của mồi xuôi và mồi ngược không cách biệt quá xa. Thành phần nucleotitde của các mồi cân bằng tránh các cặp GC lặp đi lặp lại nhiều lần.

3.3. Các mồi chọn phải đặc trưng cho trình tự ADN cần khuếch đại, không trùng với các trình tự lặp lại trên gen.

3.4. Trình tự nằm giữa hai mồi "xuôi" và "ngược" không quá lớn, phản ứng PCR sẽ tối ưu trên những trình độ nhỏ hơn 1kb.

4. Các thành phần khác

Các thành phần của phản ứng PCR: Bốn loại nucleotide thường được sử dụng ở nồng độ 20- 200 μM/ mỗi nucleotide. Nồng độ cao hơn hay sự mất cân bằng trong thành phần các nucleotide sẽ làm tăng lỗi sao chép của polymerase. Nồng độ ion Mg^{++} cũng là một nhân tố ảnh hưởng mạnh đến

quá trình PCR.

5. Số lượng chu kỳ của phản ứng PCR

Không vượt quá 40 chu kỳ cho một phản ứng PCR vì sẽ làm giảm hiệu quả khuếch đại. Số chu kỳ cho một phản ứng tuỳ thuộc số lượng bản mẫu ban đầu.

6. Thiết bị và dụng cụ cho phản ứng PCR

Cần đáp ứng được yêu cầu là thay đổi nhiệt độ thật nhanh và chính xác, ống nghiệm dùng cho các phản ứng của cùng một nghiên cứu phải thuộc cùng một kiểu vì đặc tính truyền nhiệt, độ tiếp xúc giữa ống và bộ phận tạo nhiệt của thiết bị có ảnh hưởng lớn đến quá trình khuếch đại.

III. CÁC ỨNG DỤNG CHỦ YẾU CỦA PHƯƠNG PHÁP PCR

Bảng 12.4. **Các ứng dụng của PCR**

	Các lĩnh vực ứng dụng PCR	Ý nghĩa của ứng dụng
1	Trong lĩnh vực nghiên cứu khoa học	- Xác định trình tự nucleotide của các đoạn ADN được nhân lên. - Tách dòng những đoạn ADN đặt hiệu khi cần. - Giúp phát hiện đột biến. - Phân tích liên tiếp gen từ những tế bào riêng lẻ. - Giúp nghiên cứu quá trình tiến hoá ở mức độ phân tử. - Giúp phục hồi những gen đã tồn tại cách đây hàng chục triệu năm.
2	Trong lĩnh vực khoa học hình sự	- Giúp chẩn đoán nhanh và chính xác từ vết máu khô, nước bọt, sợi tóc của thủ phạm còn lưu lại ở hiện trường. - Xác định quan hệ huyết thống cha con, ông cháu...
3	Trong ngành nông nghiệp: chọn giống cây trồng và vật nuôi	- Chọn cặp cha mẹ tốt làm giống rất nhanh chóng
4	Trong ngành y học hiện đại	- Chẩn đoán sớm và nhanh chóng các bệnh nhiễm trùng di truyền và ung thư.
5	Trong lĩnh vực tư vấn di truyền	- Chẩn đoán nhanh và chính xác các bệnh di truyền. - Chẩn đoán trước sinh được giới tính 8 tuần tuổi và các dị tật bẩm sinh.
6	Trong lĩnh vực bảo vệ môi trường	- Xác định mức độ ô nhiễm sinh học nhanh chóng.

- Việc sản xuất mẫu dò dùng trong các phương pháp lai phân tử.

- Khuếch đại số lượng các ARN thông qua kỹ thuật RT-PCR (phiên mã ngược tạo cADN từ ARN- khuếch đại cADN).

- Định lượng so sánh một sản phẩm thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau.

Ngoài ra phương pháp này cũng có những hạn chế cần phải thận trọng khi sử dụng: mức độ ngoại nhiễm, sự kém trung thực trong quá trình tổng hợp bởi Taq polymerase.

Ứng dụng của kỹ thuật PCR có rất nhiều ở các lĩnh vực khác nhau nhưng được tóm tắt trong một số lĩnh vực chính ở bảng 12.4.

CHƯƠNG XIII

KỸ THUẬT BIẾN NẠP VÀ KỸ THUẬT LÂY NHIỄM

Sự cắt và nối ADN cho phép các nhà sinh học tạo ra được những phân tử ADN tái tổ hợp mới. Giai đoạn tiếp theo là đưa ADN tái tổ hợp vào các tổ hợp vật chủ. Để đưa được ADN tái tổ hợp vào tế bào, người ta dùng kỹ thuật biến nạp ADN (transformation) và kỹ thuật lây nhiễm (transfection). Đối với *E.coli* thì ***biến nạp có nghĩa là đưa ADN plasmit*** vào trong tế bào, còn ***lây nhiễm và đưa ADN phage*** vào trong tế bào. Thuật ngữ biến nạp (sự biến nạp, kỹ thuật biến nạp) hiện nay được hiểu theo nghĩa rộng là đưa bất kỳ ADN nào vào bất cứ tế bào nào. Các tế bào này lớn lên và phân chia tạo ra dòng thuần.

Nói một cách chặt chẽ thuật ngữ "tạo dòng" (cloning) chỉ biểu hiện ở các giai đoạn sau của thủ tục chứ không phải chỉ cấu trúc của chính phân tử ADN tái tổ hợp. Sự chọn dòng phục vụ hai mục đích chính:

Trước hết nó cho phép một lượng lớn các phân tử ADN tái tổ hợp có thể được sản xuất ra từ một lượng nhất định của nguyên liệu ban đầu. Khởi sự chỉ vài nanogam (ng) của ADN tái tổ hợp thu được, nhưng mỗi vi khuẩn nhận plasmid thì sẽ phân chia nhiều lần để tạo ra một dòng mà mỗi tế bào của dòng này sẽ chứa nhiều bản sao phân tử ADN. Vài miligam (mg) của ADN tái tổ hợp có thể được tách ra từ một dòng vi khuẩn đơn giản - biểu hiện sự tăng lên hàng nghìn lần so với số lượng ban đầu.

Nếu như dòng đó không chỉ dùng nguồn ADN mà còn dùng để đưa vào trong nuôi cấy lỏng thì những tế bào này sẽ lớn lên và cung cấp hàng miligam ADN tức là hàng triệu lần tăng lên trong sinh sản. Về phương diện này, sự chọn dòng có thể cung cấp một lượng lớn ADN cần thiết để các nhà sinh học phân tử nghiên cứu cấu trúc, chức phận và biểu hiện của gen.

Chức phận quan trọng thứ hai của sự chọn dòng có thể là sự làm thuần khiết phân tử ADN mong muốn.

I- KỸ THUẬT BIẾN NẠP - ĐƯA CÁC ADN CỦA PLASMIT VÀO TẾ BÀO VI KHUẨN

Hầu hết các vi khuẩn đều có khả năng nhân phân tử ADN từ môi trường tế bào mà chúng lớn lên. Thường phân tử ADN được lấy bằng kiểu này thì bị thoái hoá, xong hạn hữu cũng có phân tử ADN tồn tại và nhân lên trong vật chủ.

Ở đây ta nói đến phân tử ADN plasmid và sự nhân lên được nhận diện bởi vật chủ.

Sự đi vào và duy trì của plasmid thường được phát hiện bởi nhìn thấy sự biểu hiện của các gen của plasmid. Chẳng hạn các tế bào *E.coli* thường nhạy cảm với hiệu quả ức chế lớn lên của các kháng sinh ampicilin, tetracyclin. Song các tế bào chứa plasmid pBR322, một vector cloning phổ biến, thì kháng lại những kháng sinh đó. Bởi vì BR322 có hai bộ gen - một gen mã hoá enzym beta phát triển lactamaza - mà nó biến đổi ampicilin thành dạng không độc trong vi khuẩn và gen khác mã hoá enzym khử độc của tetracylin. Sự đi vào của BR322, có thể được phát hiện trong vi khuẩn *E.coli* bị biến nạp các kháng sinh đó (amprtet^R).

Những năm gần đây, thuật ngữ biến nạp được mở rộng, đó là quá trình vi khuẩn thu được thêm thông tin di truyền. Thí nghiệm đã chỉ ra một vài loại như: *Bacillus* và *Streptococcus* có thể bị biến nạp một cách dễ dàng do chúng có những cơ chế để liên kết ADN và để ADN đi vào.

Hầu hết những vi khuẩn, kể cả *E.coli* chỉ lấy một lượng giới hạn của ADN dưới hoàn cảnh bình thường. Mục đích để làm biến nạp những đoạn ADN một cách có hiệu quả, vi khuẩn có thể trải qua một số xử lý lý học và hoá học, mà sự xử lý nàylàm tăng khả năng thu nhận ADN. Những tế bào đã trải qua sự xử lý thì gọi là *những tế bào có năng lực*.

1. Chuẩn bị những tế bào *E.coli* có năng lực

Những khám phá trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp thấy rằng sự biến nạp ADN được xảy ra tăng lên khi quan sát tế bào *E.coli* bị ẩm ướt trong dung dịch muối mạnh hơn là các tế bào không ẩm ướt. Dung dịch muối có nồng độ 50mM chlorid calcium hay chlorid rubidium đều có hiệu quả tốt.

Một cách chính xác, tại sao có kiểu xử lý này thì chưa hiểu, có lẽ cách gây cho ADN làm tủa được phía ngoài của tế bào. Sự di chuyển ADN vào các tế bào phải được kích thích thêm bởi tăng nhiệt độ lên 40^0C (sốc nhiệt ngắn: 2 phút ở 42^0C). Lại một lần nữa ta vẫn không rõ tại sao shock nhiệt thì lại có hiệu quả này.

2. Sự chọn lựa đối với các tế bào biến nạp

Sự biến nạp các tế bào là thủ tục không mấy thành công, mặc dù 1ng của pBR322 có thể sinh ra 1.000 đến 10.000 tế bào được biến nạp. Điều đó biểu hiện sự đi vào chỉ cần 0,01% của tất cả các phân tử. Tuy có tới 10.000 vector biến nạp nhưng chỉ có một tỷ lệ rất nhỏ các tế bào có khả năng. Để phân biệt những tế bào có khả năng này người ta cần chọn lựa. Trong trường hợp pBR322, các tế bào *E.coli* mang plasmid sẽ có khả năng hình thành những dòng trên môi trường agar - mà chúng chứa ampicillin hay tetracyclin. Hầu hết các vector chọn dòng plasmid dẫn ra ít nhất một gen mà gen đó kháng lại kháng sinh trong vật chủ. Sự chọn lựa đối với các vector biến nạp này sẽ rất đơn giản bởi đạt trên môi trường có chứa kháng sinh.

II. SỰ CHỌN LỰA ĐỐI VỚI CÁC VẬT TÁI TỔ HỢP

Vật tái tổ hợp là tế bào biến nạp chứa chất plasmid có phân tử ADN tái tổ hợp. Trong thí nghiệm chọn dòng gen cần thiết phải chọn lựa các tế bào tái tổ hợp đó từ những tế bào được biến nạp.

1. Sự ức chế gài một marker chọn lọc gen kháng kháng sinh

Hầu hết các vector chọn dòng được cho rằng, gài đoạn ADN vào plasmid là làm phá huỷ sự nguyên vẹn một trong những gen có mặt ở plasmid đó.

PBR322 có một hai vị trí hoạt động của enzym hạn chế, mà những vị trí đó có thể được dùng để mở vector trước khi gài vào đoạn ADN mới. Chẳng hạn BamHI cắt pBR322 ở ngay điểm mà trong đó có gen mã hoá sự kháng lại tetracyclin. Phân tử pBR322 tái tổ hợp mang một mẫu ADN bên ngoài trong vị trí BamHI, do đó không có khả năng kháng tetracyclin nữa. Như vậy tế bào chứa pBR322 tái tổ hợp này chỉ còn kháng ampicillin nhưng lại nhạy cảm tetracyclin. Đó là sự sàng lọc vật tái tổ hợp pBR322 bằng sự ức

chế gen kháng tetracyclin bởi sự gài thêm đoạn ADN vào vị trí của gen đó.

2. Sự ức chế gài không phải là marker chọn lọc gen kháng kháng sinh

Trong trường hợp này, người ta gài một gen *lacZ* - tức là gen mã hoá enzym beta galactosidaza trong pUC8. Enzym này đánh gẫy lactose thành glucose và galactose. Có một chất cũng tương tự lactose đó là X - gal (5brome - 4 chloro - 3 indoly1 - D - galactopyranosid) và cũng bị đánh gẫy bởi beta galactosidaza để tạo một sản phẩm mang màu xanh đậm. Vậy nếu tái tổ hợp với gen *lacZ* bị gẫy thì không có khả năng sinh ra enzym và do đó không có màu trên agar khi thêm X - gal và cả chất cảm ứng hoạt động của enzym như isopopylthiogalactosid (IPTG).

III. KỸ THUẬT LÂY NHIỄM - ĐƯA CÁC ADN CỦA PHAGE VÀO TẾ BÀO VI KHUẨN

Có hai phương pháp khác nhau, nhờ chúng mà phân tử ADN tái tổ hợp được đưa vào cấu trúc với vector phage để lây nhiễm (transfection) cho tế bào vi khuẩn và bao bì đóng gói trong ống nghiệm.

1. Kỹ thuật lây nhiễm

Quá trình này thì tương đương với sự biến nạp, nó chỉ khác nhau là một đằng là dùng *ADN của phage*, còn đằng kia là dùng *ADN của plasmid*; ADN được làm sạch, tạo ra phân tử phage tái tổ hợp, rồi được trộn với các tế bào *E.coli* có năng lực và sự đi vào của ADN được cảm ứng bởi shock nhiệt.

2. Bao bì đóng gói trong ống nghiệm

Kỹ thuật lây nhiễm với các phân tử ADN lamda không phải là luôn luôn có hiệu quả như là gây nhiễm các tế bào nuôi cấy với các tiểu phần phage lamda. Do đó phân tử lamda tái tổ hợp có thể được bao gói thành các cấu trúc đuôi và đầu lamda trong ống nghiệm.

Điều này có thể có khó khăn, song sự thật cũng dễ dàng đạt tới sự bao gói đòi hỏi một số protein khác nhau được mã hoá bởi bộ gen lamda nhưng chúng có thể được chuẩn bị một lượng lớn các tế bào bị nhiễm với những dòng phage lamda bị khiếm khuyết (defective). Những dòng này mang đến một sự biến dị trong một của các thành phần protein áo ngoài. Các tế bào bị nhiễm sẽ tiếp tục tổng hợp và tích tụ tất cả những thành phần khác thậm chí

mặc dầu cả các tiểu phần phage chín chưa được tập hợp.

Một hỗn hợp khăn gói *in vitro* được chuẩn bị bởi dung dịch của hai sự nuôi cấy tế bào: một bị nhiễm với dòng lamda khuyết bởi một protein và dòng khác khuyết lỗi một protein thứ hai. Hỗn hợp sẽ chứa tất cả những thành phần cần thiết và sẽ có ADN của lamda bao gói một cách hữu hiệu hay là những phân tử tái tổ hợp thành những tiểu phần phage chín. Các phân tử được bao gói theo con đường này có thể được đưa vào *E.coli* một cách đơn giản bằng cách cộng thêm những phage được tập hợp đó vào trong nuôi cấy vi khuẩn và cho phép quá trình nhiễm khuẩn lamda bình thường chiếm chỗ.

3. Sự nhiễm phage được nhìn thấy như là plaque trên môi trường agar

Giai đoạn cuối của chu kỳ nhiễm khuẩn phage là sự ly giải tế bào. Nếu các tế bào bị nhiễm phân tán trên môi trường agar rắn, ngay lập tức sau đó sự ly giải tế bào có thể được nhìn thấy như plaque trong nuôi cấy vi khuẩn. *Mỗi plaque là một vùng sáng được tạo ra như là phage làm dung giải các tế bào* còn gọi là vết tan và gây nhiều ly giải vi khuẩn bên cạnh.

Cả lamda và M13 hình thành plaque. Với lamda chúng là những plaque thật được tạo ra bởi ly giải tế bào. Song, những plaque M13 thì hơi khác vì M13 không ly giải tế bào chủ. Ngược lại M13 gây ra giảm tốc độ lớn của các tế bào bị nhiễm đủ để gây ra một vùng làm sáng ra trong đám vi khuẩn. Mặc dù không phải là plaque thật nhưng vùng đó cũng được nhìn thấy giống như những plaque của phage bình thường.

Kết quả cuối cùng của thí nghiệm chọn dòng gen là khi dùng phage lamda hoặc vector M13, một đĩa agar được phủ những plaque. Mỗi plaque được dẫn ra từ một tế bào đơn vị gây nhiễm chứa những tiểu phần phage giống hệt nhau. Chúng có thể chứa những phân tử vector tự nối buộc lại hay là những vật tái tổ hợp.

4. Sự chọn lựa các phage tái tổ hợp

Hầu hết các phage ly giải tế bào mà chúng gây nhiễm nên không một dạng chọn lựa nào trên sự kháng sinh mà được thích hợp mặc dù đó là dạng chọn lựa phổ biến của vector plasmid. Do đó có một số cách khác để phân biệt plaque tái tổ hợp như sau:

4.1. Sự ức chế gài của gen lacZ được mang đến bởi vector phage

Tất cả các vector ML3 cũng như một vài vector lamda mang bản sao

của gen *LacZ*. Gài ADN mới vào gen này làm ức chế sự tổng hợp emzym beta galactosidaza - giống như với vector plasmid pUC8. Những vật tái tổ hợp thì được phân biệt trên agar X- gal. Các plaque gồm các phage bình thường thì xanh, các phage tái tổ hợp thì sáng.

4.2 Sự ức chế gài của gen cI lamda

Một vài loại vector tạo dòng lamda có những vị trí cắt hạn chế duy nhất của gen cI. Ức chế gài gen này gây ra thay đổi hình thái plaque. Plaque bình thường biểu hiện đục ngầu trong khi đó tái tổ hợp với gen cI bị gẫy thì sáng. Sự khác nhau thì hoàn toàn có thể phân biệt bằng mắt thường.

4.3. Sự chọn lựa dùng tính trạng Spi

Phage lamda không gây nhiễm cho *E.coli* được khi ở dạng kết hợp với phage liên quan gọi là P2. Lúc này lamda gọi là Spi^+ nhạy cảm với sự ức chế prophage P2 (sensitive to P2 prophage inhibition). Một vài vector chọn dòng phage lamda mà bị gài ADN mới thì sẽ làm thay đổi tính trạng Spi^+ thành Spi^-, như vậy các vật tái tổ hợp có thể làm nhiễm các tế bào mà các tế bào đó mang prophage P2. Các tế bào như vậy được dùng như vật chủ cho các thí nghiệm tạo dòng các vector đó. Chỉ những tái tổ hợp là Spi thì mới hình thành có plaque.

4.4. Sự lựa chọn trên cơ sở kích thước bộ gen lamda

Hệ thống bao gói lamda, mà nó tập hợp các tiểu phần phage chín có thể gài các phân tử ADN vào giữa 37 và 52 kb vào cấu trúc đầu. Bất cứ vật nào dưới 37 kb sẽ không bao gói được. Nhiều vector lamda có cấu trúc mất đi một đoạn lớn phân tử ADN lamda và như vậy có chiều dài kém hơn 37 kb. Chúng chỉ bao gói thành phage chín được khi có thể ADN từ bên ngoài vào mang đến kích thước toàn bộ gen tới 37 kb hay hơn nữa. Chỉ những vector đó, các phage tái tổ hợp mới có khả năng sinh sản.

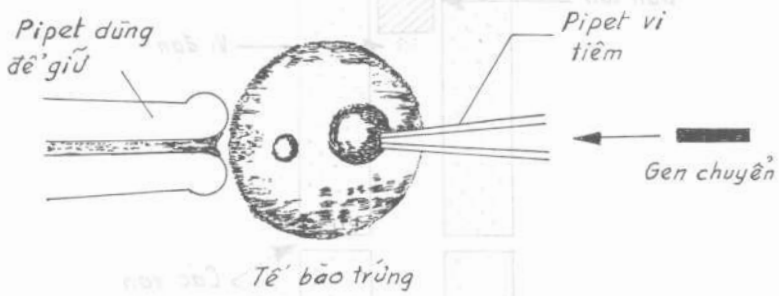
IV. KỸ THUẬT BIẾN NẠP VÀO CÁC TẾ BÀO KHÔNG PHẢI VI KHUẨN

Các con đường đưa ADN vào các tế bào nấm mốc, động vật và thực vật thì cũng cần thiết nếu như các cơ thể đó được dùng như vật chủ để chọn dòng gen. Nói chung làm ướt bằng muối chỉ có hiệu quả với vài loại vi

khuẩn mà không hiệu quả với cơ thể bậc cao. Song xử trí trước với lithium chlorid hay lithium acetat thì vẫn làm tăng sự đi vào nấm men của ADN và vấn đề này hiện nay được dùng một cách điều hoà trong sự biến nạp của *Saccharomyces cerevisiae*.

Hàng rào chủ yếu cho sự đi vào của ADN là thành tế bào. Các tế bào động vật được nuôi cấy - thiếu thành tế bào, thì chúng lấy ADN hoàn toàn đặc biệt nếu ADN được lắng cặn lại trên bề mặt tế bào với phosphat calcium.

Một số emzym làm thoái hoá thành tế bào nấm mốc hay tế bào thực vật và do đó có thể thu được tế bào trần (protoplast) nguyên vẹn. Protoplast sẵn sàng nhận ADN đi vào khi tiến hành vi tiêm (hình 13.1)



Hình 13.1. **Tiến hành vi tiêmcho tế bào trần.**

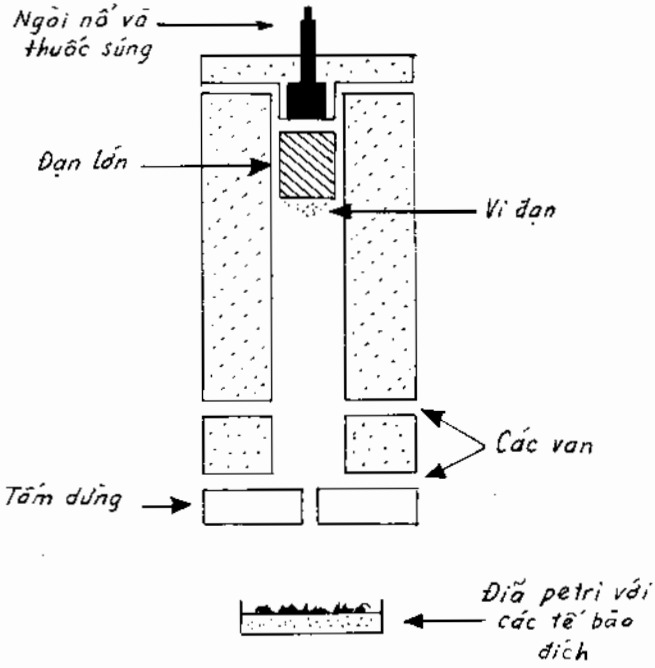
Tế bào được giữ trên pipet thủy tinh bằng cách hút nhẹ (bên trái hình). Kim vi tiêm được chế tạo bằng cách kéo dài ống thủy tinh mao dẫn đang nóng chảy cho đến khi có đầu nhọn hoắt. Dùng máy vi thao tác chọc kim vào bên trong tế bào (bên phải hình) cho đến khi đầu kim xuyên vào nhân.

Một sự biến nạp khác được kích thích bởi kỹ thuật đặc biệt như là kích thích xung điện (electroporation). Sau biến nạp các propolast có thể phục hồi lại thành tế bào, phân chia sinh sản các cơ thể bị biến nạp đó.

Còn có một phương pháp khác nữa của kỹ thuật biến nạp là vi tiêm (microinjection) dùng bơm tiêm tế vi tiêm phân tử ADN trực tiếp vào nhân tế bào. Quá trình này không cần dùng vectơ tạo dòng mà trực tiếp ADN hợp nhất vào nhiễm sắc thể. Quá trình này xảy ra khi tiến hành trên ếch, chuột vào ruồi quả.

Những năm gần đây người ta có phương pháp biến nạp đối với tế bào

thực vật bằng súng bắn gen vào tế bào. ADN được dùng để bao bọc các hạt vonfram cực nhỏ gọi là siêu vi đạn. Khi nhắm bắn vào tế bào, các siêu vi đạn sẽ đưa ADN vào trong tế bào (hình 13.2).



Hình 13.2. **Súng bắn gen**

ADN được bọc vỏ để trở thành các viên đạn siêu nhỏ, chúng được gia tốc nhờ viên đạn lớn khi ngòi súng phát nổ. Đến tấm dựng thì viên đạn lớn bị giữ lại trong khoang, còn siêu vi đạn tiếp tục lao tới mô đích trên đĩa Petri. Cũng có súng bắn gen dùng khí nén thay cho thuốc nổ.

CHƯƠNG XIV

CÁC PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ CỦA AXIT NUCLEIC

Hai phương pháp xác định trình tự chính của axit nucleic là *phương pháp hoá học của Maxam và Gilbert* (1977) và *phương pháp enzym học của Sanger* và cộng sự (1977). Dù rất khác nhau về nguyên tắc, hai phương pháp này có một số điểm chung: hình thành một tập hợp nhiều oligonucleotid có chiều dài khác nhau, mỗi oligonucleotid có xác suất hiện bằng nhau trong phản ứng. Các trình tự này sau đó được phân tách dựa vào kích thước bằng phương pháp điện di trên gel polyacrymid có khả năng phân tách hai trình tự chỉ cách nhau một nucleotid. Kết quả được đọc trên bản phóng xạ tự ghi hoặc nhờ một máy đò tự động.

I. PHƯƠNG PHÁP MAXAM VÀ GILBERT

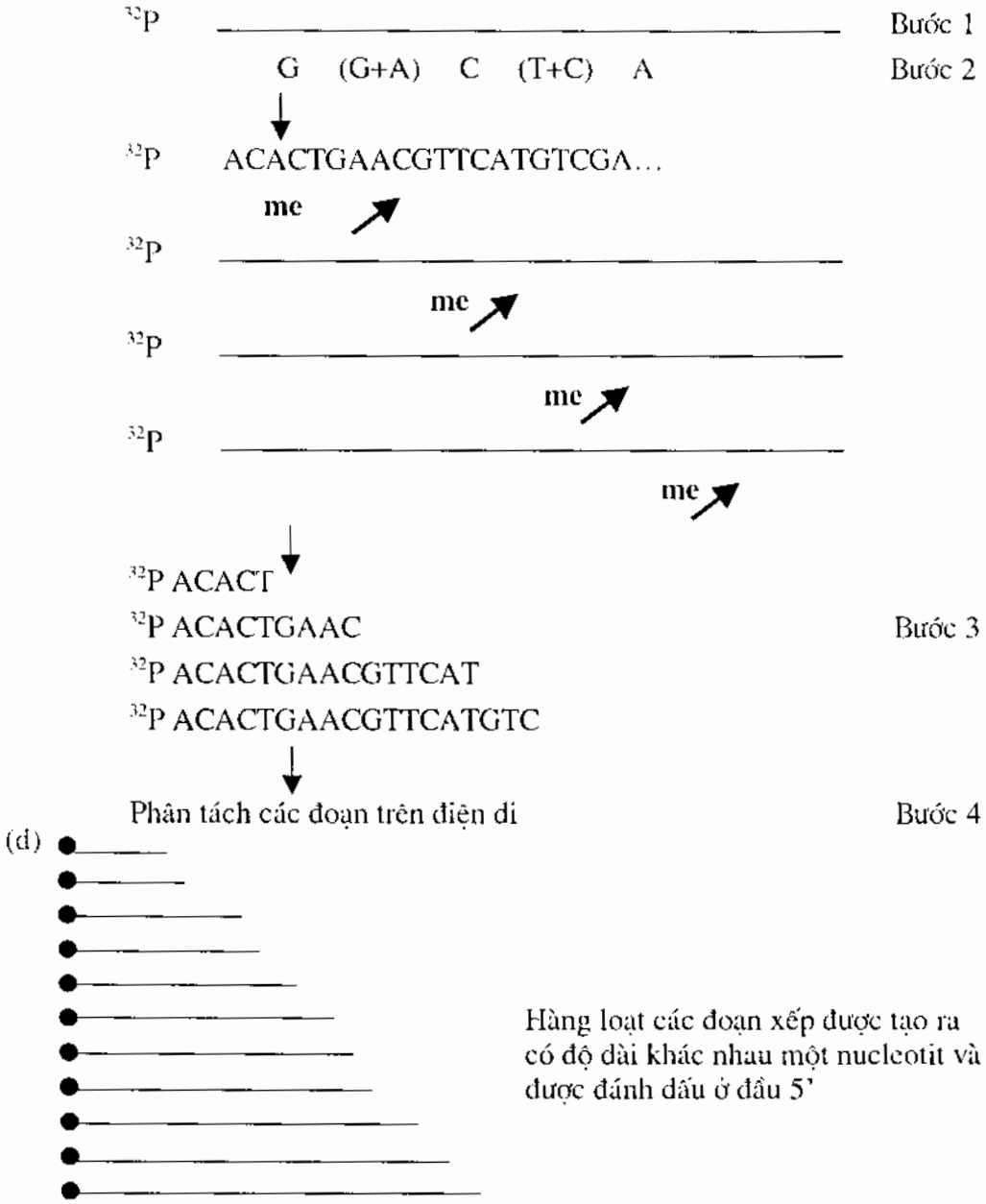
Phương pháp này dựa vào sự thuỷ giải đặc trưng phân tử ADN cần xác định trình tự bằng phương pháp hóa học.

Bảng 14.1. **Tóm tắt phương pháp Maxam - Gilbert xác định trình tự acid nucleic**

Bước 1	ADN sợi đơn cần xác định được đánh dấu phóng xạ ^{32}P ở một đầu 5'.
Bước 2	Tiến hành 5 phản ứng cắt: Cắt ở G, cắt ở G+A, cắt ở C, cắt ở T+A, cắt ở A. Ở đây là phản ứng G- biến đổi các G bởi dimethyl sylfate (me).
Bước 3	Loại các G đã bị biến đổi, và thuỷ phân liên kết đường phosphat bằng piperidin
Bước 4	Phân tách các đoạn trên điện di

Trước hết các phân tử ADN được đánh dấu bằng ^{32}P ở một đầu. Sau đó chúng được chia thành năm phân đoạn: G, A, C , G+A, T+C; mỗi phân đoạn

chịu một xử lý hoá học chuyên biệt (như dimethylsulfate) có khả năng tương tác với các bazơ đặc hiệu và tạo điểm đứt có chọn lọc đối với các bazơ đặc hiệu bị phá bằng tác động hoá chất, ta có thể xác lập được chính xác trình tự các bazơ dọc theo chuỗi ADN ban đầu (hình 14.1).



Hình 14.1. **Xác định trình tự ADN bằng phương pháp Maxam - Gilbert**

II. PHƯƠNG PHÁP SANGER

Phương pháp này dựa vào sự tổng hợp nhờ enzym ADN polymeraza mạch bổ sung cho trình tự ADN mạch đơn cần xác định. Ngoài bốn loại nucleotid thông thường còn sử dụng thêm bốn loại dideoxynucleotid không còn khả năng hình thành các cầu nối phosphodiester và do đó sẽ làm ngừng quá trình tổng hợp. ADN polymeraza sử dụng có thể là đoạn Klenow của ADN polymeraza I, Taq polymeraza hay Sequenase.

Sự tổng hợp mạch mới bắt đầu từ một mồi bắt cặp với một trình tự chuyên biệt trên phage M13, với sự hiện diện của bốn loại nucleotid trong đó có một loại được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ ^{35}S. Phản ứng tổng hợp được tiến hành trong bốn phân đoạn dideoxynucleotid với hàm lượng rất nhỏ. Do hàm lượng thấp nên thỉnh thoảng mới có một dideoxynucleotid được sử dụng vào phản ứng tổng hợp một oligonucleotid, lập tức sự tổng hợp oligonucleotid đó dừng lại. Tính xác suất thì trong mỗi phân đoạn oligonucleotid sẽ có mặt tất cả các cỡ oligonucleotid ứng với tất cả các nucleotid cùng loại trên trình tự ADN. Các phản ứng tổng hợp sẽ được đem phân tách trên gel polyacrylamid và kết quả được đọc trên bản phóng xạ tự ghi.

*** Các phương pháp cải biên từ phương pháp của Sanger**

- Xác định trình tự bằng máy tự động: Không đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ mà bằng hoá chất - các fluochrom. Mỗi loại dideoxynucleotid được đánh dấu bằng một fluochrom có màu khác nhau. Sau khi điện di trên gel polyacrylamide, kết quả sẽ được đọc qua hệ thống máy vi tính.

- Phương pháp PCR dùng trong xác định trình tự acid nucleic: nguyên tắc của phương pháp này dựa trên sự phối hợp giữa phương pháp PCR và phương pháp sử dụng các dideoxynucleotid. Đoạn ADN cần xác định trình tự được khuếch đại bằng phương pháp PCR. Sau đó hai mạch của phân tử ADN được tách rời nhau. Mỗi mạch được bắt gặp với một mồi (có thể là mồi dùng cho phản ứng PCR hay một mồi nằm bên trong đoạn ADN. Phản ứng tổng hợp xảy ra tương tự như trong các phương pháp enzym học sử dụng dideoxynucleotid).

*** Phương pháp Sanger sử dụng dideoxynucleotide**

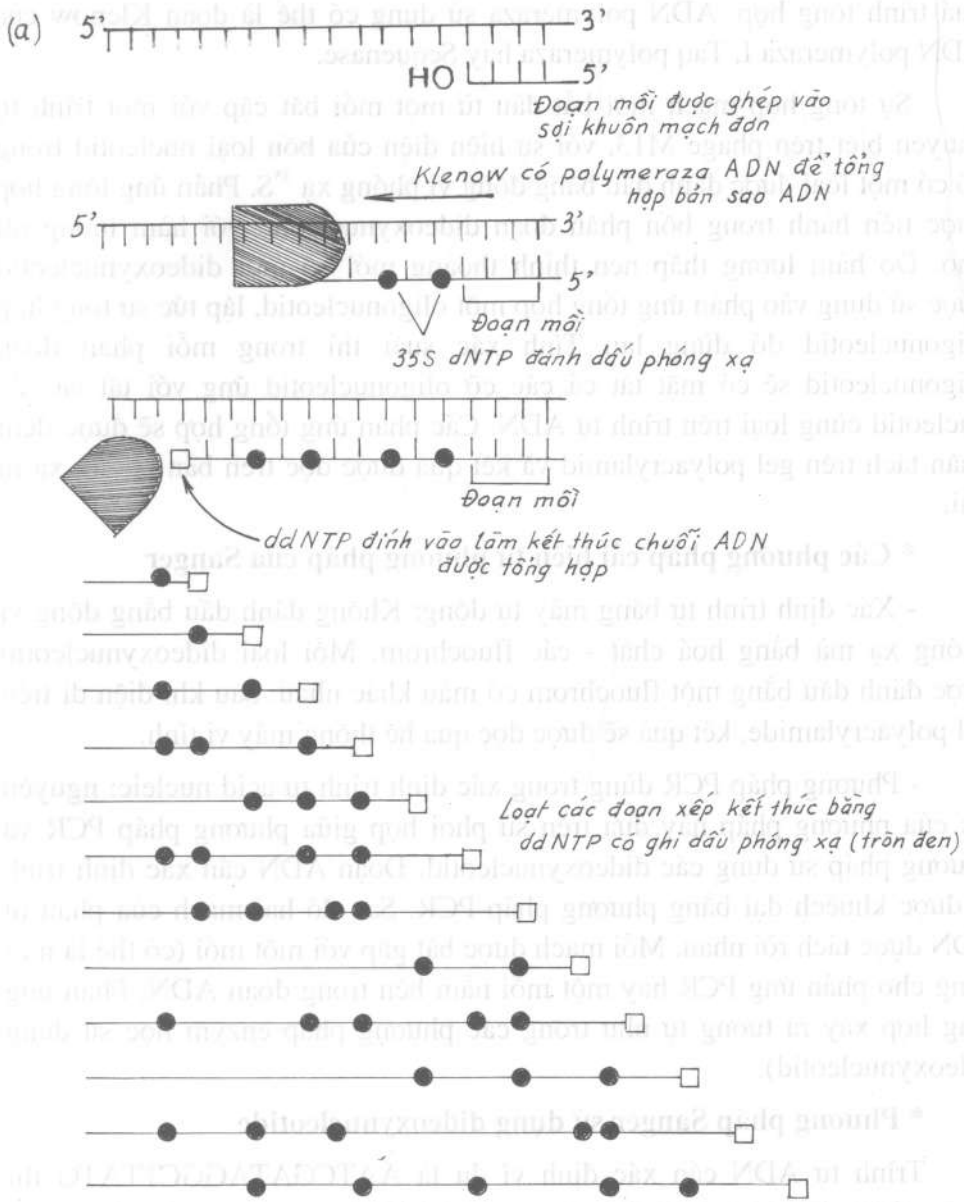
Trình tự ADN cần xác định ví dụ là AATCGATAGGCTTATG thì trong phân đoạn có mặt dideoxynucleotid ddC sẽ có sự tổng hợp các

oligonucleotid sau (hình 14.2 và 14.3).

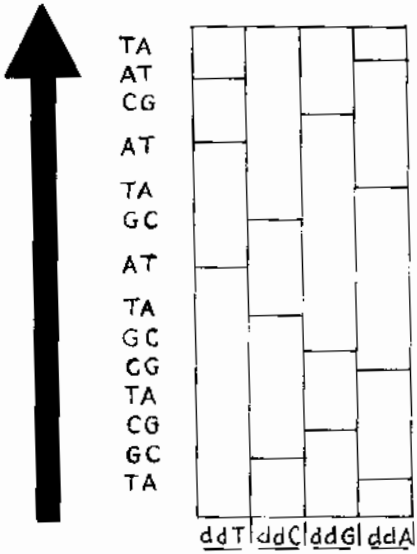
AATC

AATCGATGGC

AATCGATAGGCTTGC



Hình 14.2. **Xác định trình tự ADN bằng phương pháp Sanger**



Hình 14.3. **Phương pháp Sanger sử dụng các dideoxynucleotid**

Sau đó, bốn phản ứng tổng hợp sẽ được đem phân tách trên gel polyacrylamid và kết quả được đọc trên bản phóng xạ tự ghi.

Ở đây trình tự cần xác định được tạo dòng trong phage M13. Ví dụ cho thấy sự hình thành 5 vạch trên bản điện di trong phản ứng có thêm ddATP; mỗi vạch tương ứng với một đoạn ADN đã kết nạp một ddATP thay vì dATP và do đó không tiếp tục kéo dài thêm. Bản điện di được đọc theo chiều mũi tên. Trình tự đọc bên trái chính là trình tự bổ sung cho trình tự đọc được trên bản điện di.

CHƯƠNG XV

CÔNG NGHỆ BIỂU HIỆN GEN

I. NHỮNG VẤN ĐỀ CHUNG CỦA CÔNG NGHỆ

1. Các hệ biểu hiện gen

Sự biểu hiện gen là một vấn đề phức tạp. Hiện tại người ta đang sử dụng các hệ sau đây để biểu hiện gen:

- Hệ vi khuẩn: *E.coli* và *B.subtilis*.
- Hệ nấm men: *S.cerevisiae* và *P.pastisis*.
- Hệ tế bào động vật.

Các đặc điểm của các hệ biểu hiện trên được trình bày trong bảng 15.1.

Bảng 15.1. **Các đặc điểm của hệ biểu hiện**

Hệ biểu hiện gen	Phân tử protein biểu hiện	Các đặc tính khác
Ở vi khuẩn *E.coli*	Đó là các protein không quá nhỏ >80 acid amin, hoặc không quá lớn <500 acid amin.	- Không quá kỵ nước. - Không quá chứa nhiều gốc lystein và disulfua. - Phải gắn với một đoạn peptid khác để được bền vững và dễ nhận biết khi tách chiết.
Ở vi khuẩn *B.subtilis*	Protein có nguồn gốc từ prokaryote	Protein này tiết ra môi trường.
Ở nấm men	Protein có ở prokaryote	- Sinh trưởng nhanh. - An toàn cao nên được sử dụng trong công nghiệp dược liệu, thực phẩm.
Ở tế bào động vật	Có khả năng biểu hiện được hết các protein	Thời gian dài và nhân dòng nuôi phức tạp

2. Phân lập gen

- Để biểu hiện được một gen thì trước hết phải tách dòng để xác định được trình tự nucleotide.

- Có hai cách phân lập gen từ ngân hàng gen và từ phương pháp PCR (bảng 15.2 và 15.3).

Bảng 15.2. **Phân lập từ ngân hàng gen**

Gen ở prokaryote	Gen ở eukaryote
- Không có intron - Cắt ADN bằng enzym hạn chế tạo ra những đoạn 3-5Kb đưa vào vectơ chọn dòng. - Sau đó các dòng plasmid mang đoạn ADN mong muốn được nhận biết, tách chiết và xác định đặc điểm	- Thông qua ngân hàng cADN - do đó phải tách ARNm bằng cột oligo (dT). - Rồi dùng men sao chép ngược (reverse transcriptas-RT) và mỗi oligo (T) để tổng hợp nên phân tử lai cADN-mARN. - Bỏ mARN bằng thuỷ phân kiềm. - Tổng hợp chuỗi kép cADN dưới tác dụng của ADN polymeraza. - Đưa vào vectơ để tạo ngân hàng cADN. - Phân lập gen mong muốn bằng phương pháp: + Lai ADN. + Phân tích miễn dịch. + Phân lập dựa vào hoạt tính protein.

Bảng 15.3. **Phân lập bằng phương pháp PCR**

Bắt đầu từ ADN hệ gen	- Bắt đầu từ ngân hàng cADN (qua phiên mã ngược ARNm). - Nhân gen qua ba bước: Biến tính, hồi tính, tổng hợp tạo số gen hàng triệu bản. - Được các đoạn gen rồi đưa vào vectơ tách dòng. - Sau đó đưa vào vectơ biểu hiện để biểu hiện gen

3. Plasmid được chọn lựa để biểu hiện trong vi khuẩn nấm men

Plasmid được chọn là plasmid có số lượng lớn và có khả năng ổn định tốt trong tế bào.

- Có chứa promotơ mạnh.

- Có vùng khởi đầu dịch mã cũng phải là vùng khởi đầu tốt.

- Chú ý những protein có glycosyl hoá, phosphoryl hoá, hay gắn với lipit thì chúng phải biến đổi sâu sắc sau quá trình dịch mã. Các protein này

thường có nguồn gốc từ eukaryote nên phải biểu hiện trong nấm men hoặc tế bào động vật.

4. Vùng khởi đầu phiên mã (promotơ)

Có những đặc điểm:

- Phải mạnh để có khả năng tạo protein ngoại lai lớn hơn từ 10-30% protein tổng số của tế bào.

- Chỉ hoạt động phiên mã gen khi không có cảm ứng ở mức độ nhỏ tối đa.

- Được cảm ứng theo cách đơn giản, nhưng hiệu quả lớn (như nhiệt độ, chất thường sử dụng).

5. Vùng kết thúc phiên mã (terminatơ)

- Giảm tốc độ phiên mã.

- Dừng không đặc hiệu.

II. CÔNG NGHỆ BIỂU HIỆN GEN TRONG *E.COLI*

Chúng ta biết rằng để biểu hiện gen cần phải tiến hành bởi những tín hiệu - mà vật chủ thừa nhận. Những tín hiệu đó có thể gồm ba điểm quan trọng nhất.

- Promotơ:

Là điểm ở đó sự phiên mã của gen được bắt đầu. Trong *E.coli* promotơ thì được nhận diện bởi yếu tố sigma, một thành phần của enzym polymeraza ARN phiên mã.

- Terminatơ:

Là điểm kết thúc sự phiên mã của gen, tín hiệu kết thúc thường là đoạn ngắn ADN mà đoạn đó có base kết đôi với chính nó để hình thành cấu trúc vòng cuống lá.

- Vị trí liên kết ribosom:

Một đoạn nucleotid ngắn được thừa nhận bởi ribosom như cái điểm ở đó nó có thể buộc vào phân tử mARN. Codon mở đầu của khung đọc thì luôn luôn ở vị trí này.

Lý do tại sao những gen của cơ thể bậc cao lại không làm việc được trong tế bào vi khuẩn vì những tín hiệu nói trên thì khác nhau trong cơ thể khác nhau. Ví dụ các gen *E.coli* thì được đặt trước bởi hai đoạn tách nhau. TTGACA và TATAAT, chúng phối hợp để cung cấp tín hiệu mở đầu cho sự sao chép. Trong tế bào động vật promotơ cũng gồm hai đoạn tách nhau, nhưng cái đó không giống cái mà polymeraza ARN của *E.coli* có khả năng để nhận diện những đoạn promotơ động vật.

Những tín hiệu tận cùng và những vị trí liên kết ribosom thì cũng khác nhau trong vi khuẩn và động vật. Những gen động vật được chọn dòng thì không biểu hiện trong *E.coli* hoàn toàn một cách đơn giản bởi vì các enzym trong vi khuẩn thì không nhận diện những đoạn điều hoà của các gen động vật.

1. Các vectơ

Muốn các gen ngoại lai của động vật, thực vật được biểu hiện trong *E.coli* thì những gen đó phải được gài vào trong một vectơ dưới sự kiểm soát của các tín hiệu của *E.coli*. Vectơ đó gọi là vectơ biểu hiện.

- Một vectơ biểu hiện đơn giản nhất là cung cấp chỉ một promotơ.

- Promotơ mạnh là promotơ có tốc độ cao của phiên mã và trên cơ sở đó sản phẩm dịch mã cũng tạo ra nhiều. Còn promotơ yếu thì tạo ra rất ít sản phẩm dịch mã trong tế bào.

- Có những yếu tố điều hoà promotơ mà trong *E.coli* là chất cảm ứng và chất ức chế do những gen tương ứng sinh ra.

Nhiều promotơ được dùng trong các vectơ biểu hiện ở *E.coli* như promotơ lac; promotơ trp, promotơ tac với những chất gây cảm ứng như IPTG. P-indolylacetic acid; IPTG tương ứng.

2. Vectơ cassette cung cấp tất cả những tín hiệu biểu hiện

Trong những năm vừa qua, nhiều vectơ biểu hiện đã được phát triển. Những cái đó cung cấp tất cả những tín hiệu cần cho sự biểu hiện của gen (promotơ, terminatơ, vị trí liên kết ribosom) trong một dạng gọi là băng cassette. Sở dĩ gọi như vậy vì gen mới chỉ việc gài vào.

Vị trí cắt hạn chế duy nhất trong giữa một cụm những tín hiệu biểu hiện.

3. Các vấn đề cần chú ý trong việc sản xuất các protein tái tổ hợp ở *E.coli*

Khi sản xuất một lượng lớn protein tái tổ hợp, có một số vấn đề cần lưu ý ở các giai đoạn.

3.1. Ở mức phiên mã

Gen ngoại lai có thể chứa những đoạn như là những dấu hiệu kết thúc trong *E.coli*. Những đoạn đó sẽ là vô hại trong tế bào động vật hoặc thực vật, nhưng trong vi khuẩn thì là một sự kết thúc sớm và mất biểu hiện gen.

3.2. Ở giữa phiên mã và dịch mã

Nếu như gen ngoại lai chứa các intron thì chúng cần phải được tách ra trước khi gen đó được chọn dòng và nhân lên trong *E.coli*. Vi khuẩn thì không đủ khả năng để chặt các intron, vì đó là cả một vấn đề trừ khi cADN được tạo ra từ mARN.

3.3. Ở mức dịch mã

Việc sử dụng codon có thể cũng là vấn đề. Mặc dù hầu hết các cơ thể đều dùng chung một mã di truyền mà ở đấy có khuynh hướng là những codon riêng lẻ. Nhưng với glicin được mã hoá bởi hàng loạt codon như GGA, GGG, GGU và GGC và ở tại một cơ thể nào đó chỉ dùng có GGA và GGC - mà những mã này đã bị khử đi cùng phân tử tARN đó.

3.4. Ở hậu dịch mã

Có thể sản phẩm bị thoái hoá nhanh vì trần trụi dễ bị enzym thuỷ phân hoặc quá trình chế biến không chính xác bởi trong vi khuẩn thiếu hiện tượng glicosyl hoá.

3.5. Ở mức độ tế bào

Sự biểu hiện của gen được chọn dòng và nhân lên nhanh có thể có hại đối với tế bào chủ vì sự tiêu hao năng lượng quá nhiều.

Bởi vậy phân tử protein tái tổ hợp có được sản xuất ra một lượng có ý nghĩa hay không trong *E.coli* thì phụ thuộc vào rất nhiều gen riêng lẻ được liên quan đó. Với một vài gen hệ thống đã làm việc tốt, còn một số khác, vấn đề rất khó khắc phục.

III. CÔNG NGHỆ BIỂU HIỆN GEN TRONG NẤM MEN

Sản phẩm của biểu hiện gen tái tổ hợp trong *E.coli* thì nằm trong nội bào, muốn thu sản phẩm đó phải phá vỡ tế bào. Song đối với nấm men thì sản phẩm đó được tiết ra môi trường.

1. Ở nấm men có các loại promotơ sau đây được dùng để biểu hiện các gen là:

- Promotơ glycolytic (khởi động các gen mã hoá, các enzym glycolytic).

- Promotơ glactose (khởi động các gen mã hoá các chất tham gia quá trình trao đổi glactose).

- Promotơ phosphat - khởi động gen phosphataza acid.

- Promotơ CUP1 v.v...

2. Một số tecminatơ của nấm men như:

TRP1, GAP, FNP, gen D v.v... đã được sử dụng để biểu hiện gen lạ.

3. Ngoài ra ở nấm men còn một loạt các yếu tố khác ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen biến nạp đó là điểm khởi đầu phiên mã (IR) tín hiệu bổ sung đuôi poly A, cấu trúc làm bền vững ARN, yếu tố khởi đầu quá trình dịch mã, yếu tố kéo dài quá trình dịch mã, đóng gói chuỗi polypeptid, quá trình hậu dịch, độ bền của protein nội bào, quá trình glycosyl hoá và vận chuyển protein đó ra ngoại bào....

PHẦN C

ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ GEN

CHƯƠNG XVI

KHÁI QUÁT VỀ ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ GEN

I. KHÁI QUÁT VỀ ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ GEN

Công nghệ gen cho phép các nhà sinh học lấy gen từ tế bào này và ghép vào một tế bào khác. Khi được ghép vào một tế bào mới, gen có thể biến đổi chức năng của tế bào đó, để có lợi cho con người, vật nuôi và cây trồng.

1. Hiện nay công nghệ gen đã mang nhiều hy vọng làm gia tăng sản lượng nông nghiệp, khiến mùa màng bội thu bằng cách chuyển gen cho cây trồng và vật nuôi tạo ra giống mới cho năng suất cao, tạo lương thực, thực phẩm có phẩm chất tốt, tạo giống mới chống chịu với khí hậu khắc nghiệt, khô hạn, lạnh hay chua mặn và tạo ra giống kháng được nhiều và chống được nhiều bệnh tật do vi sinh vật có hại gây ra.

2. Công nghệ gen cũng đang được nghiên cứu để phát triển khoa học máy tính: bằng cách sử dụng trình tự ADN để thay thế cho con bọ bán dẫn, nhằm vượt qua những hạn chế của máy tính điện tử hiện nay.

3. Công nghệ gen cũng đang giúp cho vấn đề nghiên cứu nguồn gốc sự sống và đa dạng sinh học, giúp cho tìm hiểu cơ chế sống trong đó có điều hoà hoạt động, biệt hoá, tăng sinh tế bào dẫn đến ung thư v.v... ngày càng sáng rõ hơn.

4. Công nghệ gen giúp phát triển công nghiệp sản xuất các acid amin, các vitamin, các kháng sinh, các sắc tố, các thuốc trừ sâu, các protein đơn bào và các enzym.

5. Công nghệ gen trong giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường như chuyển gen phân huỷ cellulose vào các vi khuẩn chịu nhiệt hay tạo tập đoàn vi khuẩn phân huỷ chất thải công nghiệp *biphenyl polychlorid*.

6. Đặc biệt công nghệ gen được ứng dụng rõ nhất và sớm nhất là trong điều trị gen và chẩn đoán gen các bệnh trong y học.

Dưới đây chúng tôi tập trung nói về một số thành tựu đạt được của hai vấn đề này trong những năm gần đây.

II. ĐIỀU TRỊ GEN

1. Mở đầu

Những thành tựu của Temin, Baltimore 1975 với sự phát hiện ra enzym phiên mã ngược dòng (reverse transcriptase) người ta thấy có thể dùng nó để tổng hợp gen nhân tạo nhất là đi từ mARN lên ADN.

Rồi 1979 thành tựu của Aber, Nathan và Smith về enzym thuỷ phân hạn chế acid nucleic (restrictase), người ta có thể dùng nó cắt gen và gài gen mới vào để tạo ra giống mới có năng suất cao – và cũng từ đó người ta luôn luôn nghĩ tới liệu có thể sửa chữa gen, thay thế gen bệnh bằng gen lành và tạo ra một ngành phẫu thuật phân tử – trong điều trị của y học.

Điều trị gen trên người chính thức phải kể từ tháng 3/1991, bác sĩ Stephen Rosenberg ở Viện ung thư quốc gia Betherda, Mỹ đã thử nghiệm trên một phụ nữ bị ung thư da cách trị liệu bằng gen đầu tiên.

Ông trích lấy từ máu bệnh nhân loại lymphocyt T rồi đưa vào đó yếu tố tiêu huỷ khối u (tumour necrosis factor TNF) và hoàn trở lại người bệnh. Những tế bào T biến đổi này đã sản xuất ra NTF. Kết quả khối u đã thoái hoá nhưng vẫn chưa đủ để lành bệnh.

Thao tác này đánh dấu bước khởi đầu của một giai đoạn y học mang nhiều hy vọng, đó là giai đoạn điều trị gen cho các bệnh.

2. Các biện pháp gen trong chữa bệnh cho người

Tuy điều trị gen mới ra đời, nhưng đến nay đã hình thành một số hướng về liệu pháp gen trong chữa bệnh cho người như sau:

2.1. Liệu pháp antisense, antigene.

2.2. Đưa một gen mới vào bù đắp cho gen hỏng hóc.

2.3. Đưa một gen mới vào sản xuất ra chất cần thiết để tiêu huỷ tế bào bệnh.

2.4. Cấy gen vào các vi khuẩn, nấm men... để sản xuất các dược phẩm mới quý, hiếm sử dụng trong điều trị các bệnh (bốn loại liệu pháp trên xem

cuốn Công nghệ gen và công nghệ sinh học ứng dụng trong y dược học hiện đại do GS.TS Đái Duy Ban và PTS. Lữ Thị Cẩm Vân chủ trì. Nhà xuất bản y học, 1994).

Bảng 16.1. **Các bệnh có khả năng điều trị gen bằng kỹ thuật antisense, antigene**

Phân loại bệnh	Trên các bệnh cụ thể
Các bệnh do virus	1. Adeno virus
	2. Herpes simplex virus 1 (HSV 1)
	3. Herpes simplex virus 1 (HSV 2)
	4. Herpes Zoster
	5. Cytimegalovirus (CMV)
	6. Epstein – Barr virus (EBV)
	7. Human paplilloma virus (HPV)
	8. Human T cell lymphotropio virus – 1 (HTLV-1)
	9. Human – imunodeficiency virus (HIV)
	10. Influense A
	11. Influenzse B
	12. Farain fluense
	13. Hepatitis A
	14. Hepatitis B
Các bệnh ung thư	15. Lymphoma
	16. Leukemia
	17. Melanoma
	18. Osteosarcoma
	19. Carcinomas colon
	20. Prostate carcinoma
	21. Kidney carcinoma
	22. Bladder carcinoma
	23. Breast carcinoma
Các bệnh khác	24. Psoriasis
	25. Allergy
	26. Inslammation
	27. Drug resistance

2.5. Tái tổ hợp gen trong tạo vaccin thế hệ mới, vaccin phân tử – vaccin ADN (xem cuốn Công nghệ gen sản xuất vaccin thế hệ mới của GS.TS Đái Duy Ban năm 1994).

2.6. Sử dụng công nghệ gen trong cấy ghép các cơ quan để thay thế những cơ quan bệnh.

2.7. Thay phẫu thuật bằng liệu phép gen.

Các liệu pháp trên sẽ được trình bày chi tiết hơn dưới đây.

2.1. Liệu pháp antisense, antigene

Điều trị antisense là điều trị ngược hướng còn điều trị antigene là điều trị chống lại gen bằng cách một chuỗi oligonucleotid trói buộc cả chuỗi kép ADN. Thực chất của các điều trị này là lai tạo bổ sung vào phân tử ADN hay ARN làm cho các gen đó không hoạt động được nữa.

Phương pháp điều trị gen này rất hứa hẹn vì đặc hiệu và rất có ứng dụng trong điều trị các bệnh do virus, trong ung thư và trong các bệnh di truyền.

2.2. Liệu pháp đưa một gen mới vào bù đắp cho gen hỏng

Thế giới trong những năm qua đã có một số kết quả trong điều trị gen một số bệnh kiểu này. Dưới đây có thể kể ra một số thí dụ điển hình.

- Ken Culver ở Betherda (Mỹ) đã báo cáo chiến lược điều trị gen của bệnh thiếu enzym adenosin deaminase (ADA). Thiếu enzym này thì chất độc tích tụ lại giết tế bào lymphocyte T và B. Trẻ chết ngay năm đầu do suy giảm miễn dịch phối hợp nặng. Tác giả đã nghiên cứu bệnh bằng cách tách tế bào lymphocyt T của bệnh nhân đưa ra ngoài rồi gây nhiễm bằng retrovirus có mang gen ADA, sau đó truyền lại tế bào T đó vào máu bệnh nhân. Kết quả hai trường hợp đã được xử lý kiểu này thấy hiệu giá kháng thể được cải thiện rõ và các bệnh nhân đã phát triển hạch lympho.

- Charles Coutelic ở Luân Đôn (Anh) đã điều trị gen đối với bệnh xơ nang (cytic fibrosis) gây rối loạn vận chuyển ion clo (Cl^-) ở phổi. Nguyên nhân do thiếu yếu tố điều hoà dẫn Cl^- qua màng xơ nang. Tác giả đã dùng adenovirus làm vector dẫn gen sinh yếu tố điều hoà đó để đưa vào cơ thể cải thiện tình trạng nói trên.

- Marianne Grassman ở Michigan (Mỹ) đã mô tả sự điều trị gen đối với bệnh tăng cholesterol di truyền.

Bảng 16.2. **So sánh các chức phận đã được biết của các cytokin với các hiệu quả của chúng khi được biểu hiện bởi virus được tái tổ hợp**

STT	Các cytokin	Các chức phận chủ yếu đã được biết	Hiệu quả miễn dịch khi được biểu hiện ra trong virus đậu tái tổ hợp
1	IL-1γ	Làm hoạt hoá các tế bào T	Làm tăng sự trả lời kháng thể trí nhớ
2	IL-1β	Làm hoạt hoá các tế bào T	
3	IL-2	Yếu tố lớn của T làm hoạt hoá các tế bào B, các momocyt và các tế bào giết tự nhiên	Làm yếu sự lớn của virus làm kích thích các tế bào giết tự nhiên sản xuất ra IFNγ
4	IL-3	Yếu tố sinh trưởng và biệt hoá tế bào máu	Tạo máu trong các hoạt động vật bị chiếu xạ
5	IL-4	Làm điều hoà trả lời kháng thể, đặc biệt IgE	Làm tăng tính chất bệnh lý của virus
6	IL-5	Làm điều hoà sản xuất IgA	Làm kích thích sự trả lời IgA đặc hiệu kháng nguyên
7	IL-6	Được bao gồm trong sự chín của tế bào B tới những tế bào bài tiết kháng thể đặc biệt IgGl	Làm kích thích sự trả lời IgGl đặc hiệu kháng nguyên phục hồi bổ sung của các tế bào giúp đỡ T
8	IL-7	Chất hoạt hoá sớm tế bào B	
9	IL-10	Làm điều hoà miễn dịch trung gian tế bào	
10	TN-∞	Hoạt động chống virus invitro, hoạt động tế bào T độc	Hạn chế sự lớn lên của virus tái tổ hợp, cho phép chuột thiếu tế bào T chống nhiễm khuẩn
11	TNF-γ	Làm điều hoà phức hợp các phân tử hoà hợp tổ chức (MHC) trên các tế bào trình diện kháng nguyên	Hạn chế sự lớn lên của virus tái tổ hợp cho phép chuột khuyết tế bào T vẫn chống được nhiễm khuẩn
12	TGF-β	Ức chế các chức phận của tế bào T và B in vitro làm hoạt hoá trí nhớ của T	

Người ta thấy thiếu gen mã hoá receptor của LDL (Low densitylipoprotein) vận chuyển cholesterol vào gan để chuyển hoá, nên cholesterol ứ lại trong máu gây vữa xơ động mạch – nhất là động mạch vành tim dễ bị tắc mạch – gây nên bệnh nhồi máu cơ tim. Đó là bệnh nguy hiểm. Tác giả đã sử dụng retrovirus mang gen receptor của LDL đưa vào tế bào gan người – và thấy rằng 25% cholesterol đã giảm được trong máu bệnh nhân.

2.3. Đưa một gen mới vào sản xuất ra các chất cần thiết để tiêu huỷ tế bào bị bệnh

Đó là trường hợp liệu pháp gen bằng các cytokin tái tổ hợp thường được áp dụng trong điều trị ung thư.

Các gen cytokin như gen IL2 (interleukin -2) IL-4, TNF (tumour necrosis factor) v.v... đưa vào virus đậu, rồi gây nhiễm cho lymphocyt T tách ra từ máu các bệnh nhân ung thư.

Sau đó lại đưa các tế bào T đã được chuyển gen nói trên vào trong cơ thể người bệnh. Các tế bào đó tiết ra các cytokin diệt tế bào ung thư. Đây còn gọi là vacxin tế bào sống.

2.4. Chuyển gen vào các vi khuẩn, nấm men... để sản xuất các dược phẩm quý hiếm điều trị bệnh

Ngày nay nhờ phát triển công nghệ gen, người ta đã làm cho các vi sinh vật – chủ yếu *E.coli* và nấm men *Saccharomyces cerevisae* – tạo ra những hormon, protein, kháng sinh...

Vì các chức năng tạo ra những sản phẩm này không quen thuộc với chúng nên trước đó các vi sinh vật phải được cấy gen mang thông tin cần thiết để sản sinh ra những chất mong muốn bằng phương pháp tái tổ hợp gen.

Sau đó chúng được nuôi cấy và sinh sôi nảy nở nhanh hơn trong những bình lên men: 5 lít, 10 lít hoặc thậm chí 100 lít, 500 lít và rồi người ta tách chiết được các sản phẩm đó từ vi sinh vật hoặc từ môi trường cấy chủng để làm thuốc men.

Hiện nay có hàng chục công ty Genentech ra đời và cạnh tranh nhau để sản xuất và thương mại hoá các sản phẩm nói trên. Họ thu về một lợi nhuận kếch xù kể hàng tỷ đôla cho mỗi hãng trong vài năm lại đây.

Ví dụ đối với hormon somatotostatin – kể từ tháng 11/1977 tại phòng thí nghiệm Genetech ở Francisco, giống vi khuẩn được mang gen sản xuất hormon đó bằng công nghệ gen đầu tiên ra đời. Chúng sản sinh ra somatostatin để chữa bệnh tuyến yên chỉ cần 100g vi khuẩn biến đổi gen đã tạo ra 5mg hormon một cách nhanh chóng mà trước đấy đã phải dùng đến 100 tấn não cừu để chiết xuất hormon đó.

Đối với insulin, sau đó một năm cũng hãng Genentech đã sản xuất

thành công bằng con đường tái tổ hợp gen vào vi khuẩn *E.coli* mà trước đấy cũng phải tách chiết từ hàng trăm, ngàn tấn tuỵ bò, lợn mới được vài gam đến chục gam. Đấy là thị trường to lớn vì có tới 5 triệu người bị bệnh tiểu đường trên thế giới phải dùng đến insulin hàng ngày cho đến suốt đời.

Đối với một loạt những chất khác như:

Somatotropin, interpheron, protein đông máu yếu tố XIII, protein CD4, albumin huyết thanh v.v... cũng đều được các công ty cạnh tranh sản xuất theo con đường tái tổ hợp gen. Bảng 16.3 dưới đây nêu ví dụ điển hình bằng các vi sinh vật các hãng trong sản xuất albumin huyết thanh bằng công nghệ nói trên.

Bảng 16.3. **Các sinh vật được dùng để sản xuất albumin huyết thanh người bằng con đường tái tổ hợp gen**

Các sinh vật	Các công ty (các hãng) tiến hành sản xuất
1. *E.coli*	Genetech, South San Francisco, CA, USA Upjohn, Kalamazoo, MI, USA Genetica, Rhone Poulenc. Paris, France
2. *Bacillus subtitis*	Genex, Gaithersberg, MD, USA
3. *Sacharomyces cerevisise*	Gentech. South San Francisco, CA, USA, Delta, Nottingham, UK Rhone Poulenc, Paris, France Green Croos corp, Osaka, Japan, Tonen, Tokyo, Japan SkADNigen/vepex Biotechnika, Stockholm, Sweden
4. Schizosaccharo	Delta, Notingham, UK
5. Pichia Pastoris	Philipps, Mahwah, NJ.USA Green Cross corp, Osaka, Japan
6. Hanseula Rolymorpha Kluyveromyxes Lactis *Aspergillus niger*	Delta. Notingham, UK Rhone, Poulenc. Paris, France Gist, Brocades, Delft. The NetherlADNs
7. *Aspergillus nidulans*	Delta, Notingham. UK
8. Notingham	Delta, UK
9. *Nerospora crassa*	Tonen, Tokyo, Japan
10. Solanum tuberosum (Potato)	Mogen inteARNtional NV. Leiden The NetherlADNs
11. *Sus scrota* (pig)	DNX, Princeton. NJ. USA

2.5. Tái tổ hợp gen trong tạo vaccin thế hệ mới vaccin phân tử và vaccin ADN

Hiện nay phòng và chống một số bệnh do virus, do vi khuẩn và cả bệnh ung thư thành công nhờ vào việc sản xuất vaccin tái tổ hợp gen.

- Một số kháng nguyên virus dễ được sản xuất từ nấm men như kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg) trong phòng và chống bệnh viêm gan B nguy hiểm cho người; Kháng nguyên Glycoprotein của virus HSV-1, kháng nguyên hemagglutinin (HA) của virus cúm, kháng nguyên T của virus polioma, kháng nguyên gag của virus HTLV-III v.v...

- Một số vaccin phân tử khác cũng được sản xuất trong E.Coli, hoặc trong virus đậu tái tổ hợp như vaccin sốt rét, vaccin dại, vaccin HIV...

- Gần đây một hướng vaccin mới được ra đời đó là vaccin ADN. Nhờ kỹ thuật sinh học phân tử phát triển, kết hợp với việc hiểu tường tận hơn về bệnh tật và hệ miễn dịch – mà các nhà nghiên cứu đã đưa ra thử nghiệm loại vaccin này. Các thử nghiệm lâm sàng đầu tiên ở người mới bắt đầu từ năm 1955, về nguyên tắc, vaccin này ra đời có thể hầu hết chống lại bất kỳ một bệnh nào.

Chúng ta biết rằng, hiện nay nhiều loại vaccin chỉ có tác dụng kích thích hệ miễn dịch dịch thể, nghĩa là chống bệnh dựa trên hàng rào kháng thể lưu hành trong máu và bạch huyết. Các kháng thể này trôi nổi trong dòng máu cho tới khi gặp một protein lạ vừa vặn thì chúng kết hợp và làm mất tác dụng gây bệnh của kháng nguyên. Nhưng trong quá trình đó, có lúc phải theo đuổi rượt bắt protein lạ ngoại xâm, nên các đại thực bào tham gia các tế bào này báo cho hệ miễn dịch lymphocyt B và T phối hợp tạo ra kháng thể nhanh hơn thông qua trí nhớ nhận biết protein lạ trước đấy. Chính vaccin đưa cho hệ miễn dịch trí nhớ như vậy. Thế nhưng khi vào được trong tế bào chủ, tác nhân gây bệnh thoát được khỏi sự chú ý của kháng thể. Trong trường hợp này phải huy động đến hệ miễn dịch tế bào và hệ này tiêu diệt toàn bộ cả tế bào nhiễm bệnh để ngăn chặn bệnh lan rộng. Song có một số tác nhân gây bệnh tinh quái hơn, luôn luôn thay đổi hình dạng bề mặt làm khó khăn trong việc nhận dạng để tấn công. Kế đó, dù đã được làm yếu, vaccin phải thật sự "sống" mới ngăn chặn lây bệnh đúng nghĩa, nhưng như thế thì hiểm hoạ sẽ gia tăng. Vaccin ADN không đem lại hiểm hoạ như vậy. Lí do là chúng tác động bằng cách làm cho các tế bào tạo ra những protein lạ mà không có tác nhân gây bệnh bên cạnh.

- Tiến sĩ Marget Liu (Mỹ) đã tạo ra được vaccin ADN đầu tiên - đó là bản sao phân tử của gen bên trong gọi là nucleoprotein. Tác giả đưa gen này vào plasmid và đưa vào vi khuẩn. Dùng vi khuẩn sinh sôi nảy nở một lượng lớn các plasmid mang gen virus cúm này trong một thời gian ngắn. Sau khi thu hoạch được các plasmid đó nhóm tác giả đưa chúng vào cơ thể chuột và họ vô cùng phấn khởi vì đã khám phá ra được chuột có đáp ứng miễn dịch mạnh đối với bệnh cúm.

Kết quả này vượt xa hy vọng mong đợi của nhóm nghiên cứu. Mấy con chuột của họ đã thật sự miễn dịch đối với cả hai loại cúm: một loại có từ năm 1934 và loại kia có năm 1968. Các virus cúm thường xuyên đổi lớp áo khoác ngoài làm cho hệ miễn dịch khó nhận diện. Nhưng phân tử nucleoprtein từ vaccin ADN, nhờ chức năng giỏi phán xét đã tồn tại tương đương hơn 60 năm qua và đủ sức nhận ra và tấn công virus cúm.

Hiện nay nhiều nhóm nghiên cứu khác bắt chước vaccin ADN chống cúm - đã bắt đầu chế tạo vaccin ADN khác – như vaccin ADN chống lao, vaccin ADN chống viêm gan B, vaccin ADN chống ung thư.

- Đầu tháng 8/1996 tạp chí Nature medicine (Anh) đăng tường trình hai nhóm nghiên cứu chế tạo ra vaccin ADN lấy từ vi khuẩn lao. Khi họ tiêm vaccin này cho chuột nhắt, con chuột đã tạo được miễn dịch đối với lao. Bác sĩ Douglas B.Lowrie, nhà nghiên cứu và phát triển loại vaccin mới này tại Viện Y học quốc gia Anh nói rằng những kết quả vừa khám phá sẽ giúp các nhà khoa học sản xuất một vaccin cho người chống lao hữu hiệu hơn BCG. Vaccin BCG – dùng tiêm cho người trên cơ sở vi khuẩn sống làm yếu độc lực. Người ta hy vọng có thể sẽ tạo nên sức kháng bệnh, nhưng thật ra đến nay hiệu quả của nó không chắc chắn. Trước đây nhiều viên chức y tế cộng đồng tin rằng, giữa thập niên 80 lao không còn là mối đe đoạ tới sức khoẻ con người. Thế nhưng thập niên vừa qua sự trở lại của lao là đáng sợ, bởi nhiều trường hợp lao có liên quan đến đà gia tăng của bệnh AIDS trên toàn cầu.

Mặc dù mối liên quan giữa vi khuẩn *Tuberculosis mycobacterium* và lao là một trong những vấn đề được khám phá sớm nhất, nhưng đến nay chúng ta biết tương đối ít về bệnh này. Một số loại lao kháng thuốc khiến các bác sĩ vất vả khi điều trị lao cho nhiều bệnh nhân. Theo WHO, 70% bệnh nhân lao kháng thuốc sẽ chết trong vòng bốn tháng và tổ chức này báo động chính phủ các nước cần có chương trình chống lao rộng lớn, nếu không, 30 triệu người nữa sẽ chết trong 10 năm tới và 90 triệu sẽ bị nhiễm

lao. Tại Mỹ có hơn 15 triệu người mắc lao ngầm.

Loại vaccin BCG hiện nay cũng có khi không tạo được miễn dịch chống lao. Vì vậy khi thấy vaccin ADN chống lao hữu hiệu ra đời tiến sĩ Lee Reichman – Giám đốc Trung tâm lao quốc gia thuộc trường y New Jersey tại Newark phát biểu: " Tôi rất vui khi thấy loại vaccin mới ra đời" và Elisercarz, giáo sư miễn dịch học, Trường đại học California nhấn mạnh: vaccin từ gen dễ sản xuất hơn các vaccin chứa vi khuẩn còn sống – và rất hi vọng vaccin chống lao loại này sẽ rẻ hơn, dễ bảo quản, dễ vận chuyển và cho mức bảo vệ chắc chắn hơn – sẽ ngăn chặn được bệnh lao lây lan rộng.

- Đối với vaccin ADN chống bệnh viêm gan B, cũng đã được một số tác giả thảo ra. Heather David và cộng sự ở trường đại học Ottawa đang tiến hành sản xuất vaccin loại này. Không giống như bệnh cúm, bệnh viêm gan B từ lâu đã có thể ngừa bằng dòng vaccin kích thích các kháng thể. Nhưng việc chúng ngừa thì dài dòng, phức tạp, người nhận cần phải được tiêm ba lần trong sáu tháng. Ở nhiều nơi, viêm gan virus B lan tràn thành dịch rộng lớn, việc tiêm chủng phiền phức như trên tỏ ra không có ích. Tiến sĩ David hy vọng vaccin ADN chống viêm gan B này sẽ đem đến cho cơ thể sự miễn dịch tốt và lâu dài, đồng thời cũng hi vọng cả chữa trị cho người đã mắc bệnh nữa.

- Đối với vaccin ADN chống ung thư đã ra đời cách đây 5 đến 6 năm khi các nhà khoa học nhận ra rằng có thể thuyết phục hệ thống miễn dịch của cơ thể phá huỷ các tế bào ung thư. Nếu điều này xảy ra, hệ thống miễn dịch có thể chỉ tấn công tế bào ung thư như những phân tử ngoại lai. Các tế bào ung thư có lớp protein duy nhất ở trên bề mặt của chúng và chính những protein này được sử dụng để khơi dậy sức đề kháng của hệ thống miễn dịch.

Nhóm nghiên cứu ở Sauthampton và Cambridge sản xuất vaccin này bằng cách lấy chuỗi ADN là mật mã của một loạt protein trên tế bào ung thư và tái tổ hợp gen vào plasmid tạo ra vector chuyển gen. Khi tiêm vector vào cơ bắp bệnh nhân, thì bộ phận chế tạo protein của tế bào cơ sẽ bắt đầu sản xuất ra loại protein ung thư.

Sự xuất hiện đột ngột của hàng triệu phân tử protein ung thư sẽ kích thích hệ thống miễn dịch sản xuất hàng tỷ kháng thể chống lại chúng. Các nhà khoa học rất hy vọng trên cơ sở này các kháng thể cũng sẽ tấn công các protein bám trên bề mặt của tế bào ung thư và vì vậy diệt ung thư ở bệnh nhân.

2.6. Sử dụng công nghệ gen trong cấy ghép các cơ quan

Hàng năm trên thế giới có hàng vạn bệnh nhân chờ được ghép các cơ quan nội tạng như tim, phổi, thận, giác mạc *v.v*... Tuy các nước tiên tiến đều có ngân hàng các cơ quan đó – do những người tự nguyện hiến dâng. Song số cung bao giờ cũng thấp hơn số cầu gấp hàng chục lần. Do đó bọn maphia dựa vào cơn sốt đó buôn bán trẻ em để lấy phủ tạng, hoặc đánh cắp những phủ tạng của các bệnh nhân mới chết đem bán kiếm những khoản tiền lớn.

Để góp phần giải quyết nạn khan hiếm các phủ tạng ghép đó – các nhà khoa học đã nghiên cứu việc ghép các nội tạng thú vật vào cho người và đã bước đầu có hy vọng.

Cách đây 90 năm về trước một nhà phẫu thuật người Pháp đã ghép thận lợn cho bệnh nhân, nhưng bị thải loại và bệnh nhân không sống được. Năm 1910 người ta đã thay thận khỉ cho một bệnh nhân khác nhưng người này cũng chỉ sống được có 30 giờ. Những năm gần đây, người ta vẫn thực hiện các ca ghép nội tạng thú vật cho người, nhưng khó kéo dài cuộc sống.

Về mặt lý thuyết có thể bù đắp sự thiếu cơ quan người bằng cấy ghép cơ quan loài vật. Song khó khăn là ở chỗ cơ thể người bệnh không chấp nhận bộ phận được ghép ngay cả khi dùng nội tạng của người để ghép cho nhau. Hệ thống miễn dịch của người nhận rất nhạy cảm với vật lạ và bằng mọi cách tấn công để thải loại cơ quan được ghép. Vì vậy các bác sĩ mỗi khi ghép các cơ quan của người – ngay cả người cận huyết – anh em cũng phải dùng thuốc ức chế miễn dịch. Dùng nội tạng thú vật để ghép cho người còn nguy hiểm hơn. Để khắc phục tình trạng khó khăn này người ta đã đánh lừa hệ miễn dịch. Các nhà nghiên cứu đã nghĩ đến việc tạo ra giống vật được cấy gen người đó là lợn và chuột.

David White – giáo sư miễn dịch học và Hohn Wallword chuyên gia ghép tim ở bệnh viện Boston (Mỹ) đã thành lập tại Boston một trung tâm mang tên " Imutran" nhằm mục đích cấy gen người vào phôi lợn để cho ra đời loại lợn có nội tạng chấp thuận protein người, và những con lợn này sẽ được nuôi và hoàn thiện việc lai tạo chúng để nội tạng chúng có thể ghép được cho người.

Một thành công đầu tiên là ghép tim. Một ca ghép tiến hành đầu tiên trên thế giới thành công là do giáo sư Chris BaARNrd thực hiện ghép tim lợn sang người. Cho đến nay sau một năm theo dõi, quả tim lợn nằm trong ngực người vẫn làm việc tốt, không có sự đào thải. Hiện nay các bác học Mỹ có

trong tay 500 con lợn giống để gửi đến các trung tâm có nhu cầu ghép.

Như vậy việc ghép gen vào phủ tạng các động vật để ghép cơ quan cho người là thắng lợi trong tầm tay, nhưng lúc ấy những người yêu nhau liệu có dám chấp nhận sống với nhau bằng quả tim lợn trong người không?

2.7. Thay phẫu thuật bằng liệu pháp gen

Như trên chúng ta đã biết, liệu pháp gen ngày càng vững vàng bước vào nền y học hiện đại – trong điều trị các bệnh lỗi di truyền, các bệnh tim mạch, ung thư v.v... Tuy nhiên gần đây các nhà khoa học Mỹ còn hy vọng rằng, ngay cả trong những trường hợp bi kịch nhất, nhờ áp dụng liệu pháp gen, họ vẫn có thể bảo vệ được người bệnh đối với nguy cơ tàn phế. Tại những nơi mạch máu bị co thắt, họ đưa vào cơ thể một loại gen có thể thực hiện được chức năng tạo ra hợp chất thúc đẩy sự sinh sôi những mạng mạch máu phụ. Bằng cách đó các nhà khoa học Mỹ đã tạo ra được các tác phẩm "typass" kinh điển từng thực hiện trong kỹ thuật phẫu thuật tim mạch hiện đại, song không cần phải phẫu thuật phức tạp.

Giáo sư Jeffrey Isner – Trường đại học tổng hợp Tuffts mới đây đã xử trí liệu pháp gen nói trên cho một nữ bệnh nhân trên 70 tuổi được tăng lưu lượng máu trên 80% ở những nơi cần thiết. Tác giả đã khẳng định trên tạp chí "Lancet" rằng, liệu pháp gen này có thể trở thành phương pháp điều trị thay thế hữu hiệu một số bệnh tim mạch trầm trọng một khi mọi tân dược tỏ ra bất lực.

Ngày nay dùng liệu pháp gen, các bác sĩ đang đưa ra những bọc một lớp polimer chứa đầy đội quân gen vào các mạch máu như kiểu trước đây đưa những "khinh khí cầu đầy gas" để mở rộng mạng mạch máu. Sau khi lớp polimer chứa gen bám vào thành mạch, thì ADN sẽ được thâm nhập vào bên trong, sản xuất ra các nhân tố làm gia tăng mạch máu. Và kết quả chỉ vài tuần đã xuất hiện cả mạng mạch máu mới. Nhờ liệu pháp này bệnh nhân đẩy lùi được những cảm giác đau đớn trong chân cũng như những vết thương cơ bắp. Các nhà khoa học đang hoàn thiện phương pháp này, điều đó mở ra một kỷ nguyên y học mới.

III. CHẨN ĐOÁN GEN

Chẩn đoán gen hay còn gọi là thăm dò axit nucleic là dùng một đoạn

ADN hay ARN có khả năng nhận biết một đoạn nucleotide bổ sung và hình thành với nó một phân tử sợi kép bền trong quá trình lai tạo. Sự hình thành sợi kép nó có thể chứng minh được bằng những chất đánh dấu như những đồng vị phóng xạ, các enzym và chất sinh màu, các phân tử huỳnh quang hay là quang phát sáng (xem phần công nghệ gen).

Những tiến bộ trong kỹ thuật chẩn đoán gen hay còn gọi là công nghệ ADN cung cấp một lợi khí mới trong phát hiện một loạt các bệnh di truyền phân tử và các bệnh nhiễm vi sinh vật. Sự chẩn đoán gen được tăng lên bởi phản ứng chuỗi polymerase (PCR) và phản ứng chuỗi polymerase kết đối với phản ứng sao chép ngược (RT – PCR), dẫn tới trực tiếp phát triển những kỹ thuật lai tạo phân tử trong di truyền học, y học và thú y học, ***đặc biệt trong chẩn đoán nhanh và chính xác các bệnh virus*** mà trong đó tác nhân gây bệnh không thể tách nhận được bằng các phương pháp thông thường và cổ điển.

Trong chẩn đoán gen có ba loại chính:

1. Chẩn đoán gen các bệnh di truyền
2. Chẩn đoán gen các bệnh nhiễm trùng
3. Chẩn đoán gen trong pháp y

1. Chẩn đoán gen các bệnh di truyền

Trên thế giới, các bệnh di truyền ở người là những bệnh rất quan trọng. ở nước Anh, 30% trẻ em được nhận bảo hộ nhi đồng là có bệnh di truyền. Bệnh viêm xơ nang xảy ra ở Caucasians với mức 1/2000 trẻ mới sinh. Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne có nhiều ở thế giới thứ ba gây bất lực, cũng như kiệt sức trước khi chết. ở Sardinia và Cyprus, khoảng 1% trẻ em sinh ra là có gen beta – thalassaemia. Bệnh thiếu enzym glucose – 6 phosphate đehdrogenase trên thế giới có tỷ lệ mắc $1/10^8$ người dân.

1.1. Các chẩn đoán đặc hiệu gen

Đó là những đoạn ADN có chiều dài khoảng 1-6 kb tương ứng với vùng gen quan tâm nằm trong bộ gen. Chẩn đoán gen đặc hiệu này được chuẩn bị bằng một vài nguồn. Trước hết mARN có thể được làm sạch từ tế bào, rồi dùng enzym reverse transcriptase để tạo ra cADN. cADN được thuần hoá vào trong vector vi khuẩn như đã nói ở trên. Phương pháp này có thể được áp dụng nếu như mARN tương ứng với gen quan tâm phong

phú trong một loại tế bào nào đấy ví dụ gen globin trong các tế bào erthropoietic. Song phổ biến là mARN có tỷ lệ thấp – khoảng 0,01% của toàn bộ mARN tế bào nên một phương pháp khác được sàng lọc là lập ra thư viện của những đoạn ADN thuần hoá - mà những đoạn đó bắt nguồn hoặc từ ADN của toàn bộ tế bào (thư viện của cả bộ gen) hoặc là phiên mã ngược của tất cả mARN của tế bào (thư viện cADN). Rồi thì áp dụng một trong những kỹ thuật sau đây để tách riêng những đoạn gen đặc hiệu đang quan tâm. Phương pháp đó là sàng lọc trong thư viện bằng những đoạn oligonucleotide được tổng hợp hoá học. Như vậy một hỗn hợp của các oligonucleotide (mỗi chúng có ít nhất 11 mononucleotide) được tổng hợp ra có thành phần tương ứng với đoạn ADN mã hoá protein đặc hiệu. Một hỗn hợp oligonucleotide như thế là cần thiết bởi vì có sự thoái hoá mã di truyền.

Phương pháp này lần đầu tiên đã được dùng để tách gen mã hoá cho protein bổ thể và vừa qua là đối với yếu tố đông máu VIII ở người. Cấu trúc đầu tiên của protein này thì không rõ, nhưng những đoạn ADN thì được sàng lọc, rồi biểu hiện trong vi khuẩn, các kháng thể chống lại sản phẩm gen có thể được dùng để tách những đoạn gen cần muốn.

Một cách nữa là một đoạn gen mã hoá cho một protein nào đó đã được tách trong một loài khác, mà nó có khả năng đồng nhất thì được dùng để sàng lọc thư viện của người. Thí dụ gen phenylalanine hydroxylase, khuyết nó gây ra phenylketonuria (PKU), thì đã được tách ra bởi sàng lọc ở thư viện gen người bởi dòng cADN của chuột sống.

Bước ngoặt trong chẩn đoán phân tử là sự ra đời của phản ứng chuỗi polymerase (PCR). Phản ứng này có khả năng thu được hàng triệu copy những đoạn ADN đặc hiệu qua sự phóng đại bằng enzym của nó.

Kỹ thuật PCR thực chất đã thực hiện một bước ngoặt trong chẩn đoán lâm sàng, vì rằng nó không đòi hỏi chất đồng vị phóng xạ, còn về số lượng ADN thì đủ để quan sát trực tiếp và đánh giá trong giai đoạn phân tách bằng điện di. Để phục vụ cho chẩn đoán người ta tiến hành trung bình 35 chu kỳ PCR. Các tác giả đã sử dụng PCR để phóng đại *invitro* gen insulin người. Lúc đầu người ta sử dụng enzym mới của mỗi lần sau biến tính. Thường xuyên trong phản ứng tạo ra những sản phẩm không đặc hiệu, bởi vì nhiệt độ tổng hợp giới hạn chỉ đến 37^{0}C và dẫn ra các liên kết không đặc hiệu của các primer. Sự dẫn ra enzym polymerase bền nhiệt ở vi khuẩn *Thermus aquaticus* (polymerase Taq) như các phần trên đã nói làm đơn giản phản

ứng phóng đại, giảm giá thành và góp phần đẩy nhanh sự ứng dụng phản ứng này vào trong sinh học và y học.

Hiện nay trên thị trường có nhiều loại enzym polymerase ưa nhiệt, không làm thay đổi hoạt tính của mình trong dãy nhiệt độ cao.

Sự chỉ ra có hay không có một đoạn đặc biệt ADN là quan trọng nhất của phản ứng PCR trong chẩn đoán y học. Sự nhạy cảm rất lạ thường của phương pháp trong các hoàn cảnh hơi tối ưu một chút là có thể đi đến phóng đại những đoạn không đặc hiệu. Để thu được sản phẩm chính xác cũng cần thiết phải xác định số lượng cơ chất đặc hiệu và thực nghiệm những điều kiện phản ứng được xác định.

Cũng cần nhớ rằng khi so sánh với enzym Klenow, những khả năng biểu hiện lỗi sao chép của polymerase Taq cao hơn, cho nên không có thể sử dụng quá ít lượng ADN vào mục đích chẩn đoán mặc dù sự phóng đại ADN của một tế bào duy nhất có thể làm được.

Một ví dụ tuyệt vời của sự chẩn đoán gen tiến bộ đó là chẩn đoán bệnh nhầy nhớt. Sự chẩn đoán trực tiếp ADN nhờ PCR đã phát hiện đó là bệnh di truyền. Khi sử dụng PCR, Williams và cộng sự 1988 đã dẫn ra sự chẩn đoán đầy đủ bệnh này trong vòng một ngày. Sự có mặt của một số phản ứng có thể phát hiện những biến dị điểm của bệnh.

Việc phân lập ra những biến dị còn chưa biết dẫn đến tình trạng bệnh lý có thể rất đơn giản qua sự phân biệt mARN thay thế cho ADN. Sự loạn dưỡng cơ Duchenme qua sự phân tích mARN của tế bào lymphocyte máu ngoại vi.

Chẩn đoán phân tử với sự sử dụng PCR cũng có thể lợi dụng để phát hiện sự chuyển dịch đặc hiệu đối với ung thư trong mARN hay ADN của bộ gen. Người ta sử dụng thường xuyên PCR trong chẩn đoán bệnh ung thư lymphocyte. Dấu hiệu di truyền tế bào của bệnh này là có nhiễm sắc thể Philadelphia, ngược lại ở mức độ phân tử dẫn đến hợp chất gen BCR trên nhiễm sắc thể 22 với gen ABL trên nhiễm sắc thể 9 và tạo ra dạng khảm mARN và protein. ý nghĩa của những nghiên cứu này tăng lên sau phát hiện mARN của gen BCR – ABL ở các bệnh nhân mà trước đấy không chỉ ra sự có mặt của nhiễm sắc thể Philadelphia.

Phương pháp phân tử học được sử dụng ngày càng nhiều để phát hiện mARN đặc hiệu đối với các ung thư cũng như đánh giá sự biểu hiện của chúng. ý nghĩa to lớn của PCR là để đánh giá sự điều trị bệnh nhân như

người ta đã chỉ ra gần đây trong các nghiên cứu biến dị gen p53 trong ung thư phế quản, ung thư đường dẫn nước tiểu và ung thư dạ con. Người ta cũng mô tả một loạt những biến dị điểm gây ra bởi thay đổi gen này trong ung thư phổi và cổ tử cung.

1.2. Phân tích trực tiếp những biến dị gen dùng chẩn đoán đặc hiệu gen

Trước đây hiểu một cách đầy đủ tường tận bệnh lý phân tử của người thì chỉ có bệnh Hemoglobin. Những thay đổi ở mức độ sao chép đã gây ra biến dị trong những đoạn promotor hoặc mất tất cả hoặc chỉ một phần của gen globin như đã được mô tả.

Những lỗi đó có thể phát hiện trực tiếp khi dùng những chẩn đoán đặc hiệu gen, nhờ phương pháp thấm Southern.

Trong kỹ thuật này, ADN của người được cắt ra thành những đoạn đặc hiệu bởi những enym tiêu hoá hạn chế. Những đoạn này được chuyển vào màng lọc theo kích thước. Sau đó tách bởi điện di gel, rồi được đánh dấu phóng xạ. Đoạn ADN chẩn đoán đặc hiệu có thể được phát hiện bởi phương pháp tự phóng xạ mô.

Sự biến dị của một nhóm gen globin làm ảnh hưởng tới vị trí nhận diện của enym hạn chế sau đó những đoạn khác nhau về kích thước sẽ được sản xuất ra. Chẩn đoán đặc hiệu gen sẽ được quan sát bằng phương pháp thấm Southern với sự lai tạo với đoạn ADN. Đoạn được nhận diện sẽ được lọc và vì sự thay đổi kích thước nên làm thay đổi sự chuyển dịch khi chạy điện di. Chẩn đoán này cần ít nhất 2 mg ADN để chẩn đoán trẻ trước khi sinh hay phát hiện người mang bệnh di truyền. ADN đủ cho thấm Southern có thể thu được từ mẫu máu sạch, hoặc từ dịch ối 16-18 tuần của thai hay từ vi nhung mao của màng ối lúc 8-10 tuần. Mỗi mẫu xử lý bằng phương pháp thấm phải mất tối thiểu sáu ngày.

Thông thường những biến dị riêng lẻ gây ra bệnh không làm thay đổi vị trí liên kết enym hạn chế mà chỉ có thể phân lập được bởi phân tích thứ tự ADN. Nếu như đoạn biến dị được biết, thì lỗi này có thể được chẩn đoán bằng cách dùng oligonucleotide ngắn tổng hợp. Sự chẩn đoán oligonucleotide có cấu trúc tương ứng để sửa chữa những đoạn biến dị ADN của người mang sẽ được lai tạo với cả ADN chẩn đoán và ADN từ cá thể bình thường. Kỹ thuật này hoàn toàn được dùng trong chẩn đoán bệnh thiếu máu hình liềm (được gây ra bởi sự thay đổi đơn giản GAG thành GTG) và

bệnh lỗi di truyền alpha – antitrypsin (đó là điều kiện mở đường dẫn tới bệnh khí thủng và bệnh gan). ở đây cũng cần nhắc đến khái niệm đa hình về độ dài của đoạn hạn chế RFLP:

Vì nhiều những biến dị khác nhau ở locus globin gây nên bệnh thalassamia điều đó làm cho việc chẩn đoán trở nên khó khăn về phân tích biến dị để đi đến phương pháp lai tạo oligonucleotide. Vấn đề này nghiên cứu cả sự liên kết với gia đình làm chẩn đoán ADN như là những dấu hiệu di truyền. Người ta tiến hành phân tích và phát hiện có những thay đổi trong kích thước các đoạn trên giấy thấm Southern và chúng đều được gọi là đa hình về độ dài đoạn hạn chế (RFLP).

Trong chẩn đoán thiếu máu hình liềm bởi sự có mặt HpaI vị trí đa hình gần 5kb cách xa gen bị ảnh hưởng. Phương pháp này bây giờ được dùng để chẩn đoán bệnh Hemophylia A và B, OTC, Lesch – Nyhan sydrome và PKU.

Chẩn đoán đặc hiệu gen chẳng những giúp chẩn đoán những lỗi gen mà còn phân tích chi tiết chức phận và cấu trúc các gen. Vị trí gây biến dị trực tiếp có thể được dùng để cải tiến hoạt động của sản phẩm. Chẳng hạn kỹ thuật này được dùng để phân tích chức phận các phần khác nhau của receptor acetylcholine. Những thay đổi được tiến hành ở những gen làm mã hoá tiểu đơn vị receptor mà chúng làm thay đổi đoạn axit amin và như vậy làm thay đổi cấu trúc bậc ba của các phần chủ yếu của protein như là các vị trí liên kết với toxin và agonist.

1.3. Phân tích gián tiếp khi dùng phép chẩn đoán ADN

Phương pháp ADN tái tổ hợp có thể cũng được dùng khi lỗi hoá sinh là cơ sở rối loạn một nguồn duy nhất chưa rõ. Trường hợp này lại khai thác sự liên kết bệnh với RFLP, nhưng ở đây RFLP được đặc trưng bởi những đoạn ADN được thuần dòng. RFLP có thể được khu trú khoảng vài ngàn đôi base cách locus khiếm khuyết. Nguyên tắc khi dùng RFLP để phân tích liên kết thì không phức tạp. ở meiosis, các nhiễm sắc thể đồng nhất liên kết lại, sự gẫy nhiễm sắc thể xảy ra (vào khoảng 2 lần/1 nhiễm sắc thể) cho phép trao đổi nguyên liệu di truyền, sự trao đổi này được gọi là trao đổi chéo.

Nếu hai gen hay RFLP đồng thời trên một nhiễm sắc thể thì điều đó không phải là trao đổi chéo giữa chúng. Như vậy nếu hai đoạn ADN được di truyền trong gia đình thì chúng cũng được liên kết. Nếu hai dấu hiệu cùng

được di truyền tới 99% một lần, chúng ta có thể nói liên kết được ở khoảng cách di truyền 1 centi Morgan (1cM). Bộ gen của người có gần 3000 cM chiều dài.

PFLP là những chỉ thị tốt để làm bản đồ của những bệnh người.

- Bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne (DMD – Duchenne muscular dystrophy) là bệnh được liên kết đặc trưng bởi sự yếu cơ dần rồi dẫn đến liệt và chết ở tuổi 20 – 30 của cuộc đời. DMD là bệnh đầu tiên được tìm thấy ở khu trú ở vùng nhiễm sắc thể có liên kết với RFLP. Trong mấy năm qua ít nhất 10 RFLP đặc trưng hai phía của locus bệnh đã được phát hiện và giúp chẩn đoán khi trẻ mới sinh.

- Bệnh múa giật Huntingon (huntington's chorea) là bệnh thoái hoá hiếm gặp của hệ thống thần kinh trung ương, mà ở đó các triệu chứng trở nên biểu hiện chỉ ở tuổi trung niên. Khi nghiên cứu tính di truyền của RFLP trong nhiều gia đình ở Venezuelan người ta đã thấy sự liên kết giữa RFLP (được gọi là G8) và bệnh múa giật Huntington ở gần 10 cM. Người ta vừa mới phát hiện bệnh này ở cánh tay ngắn của nhiễm sắc thể 4. Điều đó làm dễ dàng cho việc tìm thấy RFLP mới trong bệnh Huntington bởi sự tách ra những thử nghiệm trực tiếp ở nhiễm sắc thể 4.

- Chẩn đoán DX 13 làm phát hiện RFLP được liên quan chặt chẽ tới bệnh Haemophilia A. Bệnh này chịu sự biến dị và làm thay đổi sự biểu hiện của gen yếu tố VIII. Trong các trường hợp này, DX 13 cung cấp một chỉ thị rất có ích cho chẩn đoán bệnh khi trẻ mới sinh.

1.4. Một số phát hiện khác của chẩn đoán gen

a. Phát hiện những rối loạn đa nguồn

Một vài rối loạn như bệnh tim là kết quả của sự tác động tương hỗ giữa các yếu tố môi trường (như ăn kiêng, tập luyện và hút thuốc) với các thành phần của gen – mà những điều đó hoàn toàn còn chưa hiểu. Song những gen nào đó, kiểm tra chuyển hoá cholesterol là tiêu chuẩn tốt để nghiên cứu. Có sự liên kết giữa các gen apoliporotein và receptor LDL. Sự mất cân bằng liên kết giữa RFLP ở locus $ApoA_1$ và hyperlipidami đã được chứng minh và là nguyên nhân của những bệnh mạch vành.

b. Phát hiện những rối loạn không di truyền

Việc áp dụng các phương pháp sinh học phân tử đã làm lợi cho y học

hơn là di truyền. Khả năng chẩn đoán các gen vi sinh vật cho phép nghiên cứu bệnh của người. Những thí dụ hiện nay bao gồm việc sử dụng các chẩn đoán cho Papillomavirus người để sàng lọc bệnh nhiễm trùng đốt sống cổ và phát hiện virus ADN Herpes simplex trong thuỳ thái dương của vài loại động kinh. Chẩn đoán ADN cũng rất có giá trị trong phân tích bệnh lý của ung thư.

1.5. Một số bệnh di truyền đã được chẩn đoán gen

Bảng dưới đây có thể kể ra một số bệnh di truyền ở người đã được chẩn đoán gen theo Dorkin và công sự.

Các chẩn đoán	**Các bệnh lâm sàng**
Chẩn đoán đặc hiệu gen	
Enzymes	
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	Bệnh Favism
Ornithine transcarbamylase	Khuyết OTC
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase syndrome	Hội chứng Lesch-Nyhan
Phenylalanyne hydroxylase 3-hydroxy 3-methylglutaryl-CoA-reductase	Bệnh phenylxeto niệu
Hormones	
Insulin	Đái đường tuỵ
Growth hormone	Bệnh lùn
Gonadotrophin	
Prolactin	
Receptor bề mặt tế bào	
Acetylcholine receptor	
Low-density lipoprotein receptor	Vai trò trong bệnh tim mạch
Protein của hệ thống miễn dịch và máu	
Globins	Bệnh lý hemoglobin
Clotting factors VIII, IX	Bệnh ưa chảy máu A, B
Antithromin III	Nguy cơ nhồi máu tăng

Histocompatibility antigens	
Complement componens	
Immunoglobins	Các bệnh suy giảm miễn dịch khác
T-cell receptor	
Các gen khác	
Collagen	Rối loạn collagen
a_1 Antitrypsin	Khí thủng, bệnh gan
Oncogenes	Ung thư
Chẩn đoán phát hiện RFLP được liên kết với những gen lỗi	
DX13	Bệnh ưa chảy máu A
G8	Bệnh múa giật Huntington
RC8, K1.28,754	Bệnh loạn dưỡng cơ Duchene

Trong những năm qua, sinh học phân tử đang đóng một vai trò quan trọng trong lĩnh vực y học dự phòng thông qua sự chẩn đoán gen các bệnh của trẻ còn trong bụng mẹ hay vừa mới đẻ ra. Nhờ sinh học phân tử, nhiều bệnh hiện nay được hiểu ở mức độ ADN. Sinh học phân tử đang đóng một vai trò quan trọng trong chẩn đoán và điều trị các bệnh ở lâm sàng.

2. Chẩn đoán gen các bệnh nhiễm trùng

- Mục tiêu của các chẩn đoán ADN trong các bệnh nhiễm trùng là phát hiện và tách ra tác nhân bệnh lý đặc trưng trực tiếp tới hình ảnh lâm sàng làm thông tin cho sự điều trị bệnh được nhanh chóng.

- Hiện nay người ta sử dụng rộng rãi chẩn đoán ADN hay chẩn đoán gen để phát hiện một loạt các bệnh nhiễm trùng như bảng dưới đây đã chỉ ra một số bệnh.

Một số chẩn đoán gen các bệnh nhiễm trùng

1. Lĩnh vực y học
2. Bệnh nhiễm Mycoplasma
3. Phát hiện các gen nội độc tố vi khuẩn
4. Phát hiện virus chậm như Herpes sinplex
5. Phát hiện virus HIV

6. Phát hiện CMV
7. Phát hiện virus papilloma người
8. Phát hiện virus viêm gan B ở tổ chức gan người
9. Phát hiện các gen vi khuẩn kháng sinh
10. Phát hiện các tác nhân gây bệnh cho thực vật
11. Phát hiện các ký sinh trùng sốt rét như *Plasmodium falciparum v.v...*

Trong lãnh vực thú ý và thực phẩm một số kit hiện hành đã được thương mại hoá cho phép chẩn đoán một số vi sinh vật bằng PCR như bảng dưới đây.

Bảng một số chẩn đoán gen đối với vi sinh vật thú y và thực phẩm

Lĩnh vực thú y

1. Phát hiện *Mycoplasma gallisepticum*
2. Phát hiện *Mycobacterium paratuberculosis*
3. Phát hiện BCV (Leucose bovin)
4. Phát hiện virus của bệnh Aujeszky

Lĩnh vực thực phẩm

1. *Listeria monocytogenes*
2. *Escherichia coli*
3. *Salmonella spp*
4. *Staphylococcus aureus*
5. *Campylobacter spp*
6. *Yersinia enterocolitica*

3. Chẩn đoán gen trong pháp y

Chẩn đoán pháp y là một lĩnh vực đặc biệt của y học và thường gồm:

1. Nhận dạng một cá thể
2. Xác định một mối quan hệ huyết thống

Sử dụng công nghệ gen- đặc biệt là xem xét trình tự ADN có thể ***nhận dạng cá thể*** và ***xác định huyết thống*** được một cách đúng đắn hơn là những phương pháp xem xét kiểu hình (nhóm máu, kiểu huyết thanh, các enzym,

hệ hô hấp...) trước đây để luận chứng trong hình pháp học và tội phạm học.

IV. MỘT SỐ LƯU Ý CUỐI CÙNG

Vì khuôn khổ cuốn sách có hạn chỉ nêu lên các nguyên lý chung của công nghệ gen, còn những vấn đề riêng biệt của công nghệ gen chuyên ngành như:

1. Công nghệ gen trong vi khuẩn
2. Công nghệ gen trong thực khuẩn thể
3. Công nghệ gen trong nấm men
4. Công nghệ gen trong thực vật
5. Công nghệ gen trong động vật
6. Công nghệ gen trong ty thể
7. Công nghệ gen trong lục lạp
8. Công nghệ gen trong tế bào gốc (nhân bản)
9. Ứng dụng công nghệ gen trong các ngành nông, lâm, thuỷ sản
10. Ứng dụng công nghệ gen trong ngành y dược học hiện đại
11. Ứng dụng công nghệ gen trong sản xuất vaccin phân tử
12. Ứng dụng công nghệ gen trong trong nghiên cứu nguồn gốc sự sống như điều hoà biệt hoá tế bào và vấn đề ung thư.

Chúng tôi xin được trình bày ở những tập sau nếu có cơ hội tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Aucubel F.M et al.** Short protocols in molecular biology : Third edition, Niley, 1995
2. **Blackburn M.G ADN Gait M.J.** Nucleic acids in chemistry and biology. Second edition Oxford University Press, 1996.
3. **Brown T.A.** Genomy. Wydawnictwo Nauka PWN. Warszawa, 2001
4. **Đái Duy Ban và Lữ Thị Cẩm Vân.** Công nghệ gen và Công nghệ Sinh học ứng dụng trong y dược học hiện đại. Nhà xuất bản Y học, 1994
5. **Đái Duy Ban và Lữ Thi Cẩm Vân.** Công nghệ gen và Công nghệ Sinh học ứng dụng trong nông nghiệp hiện đại. Nhà xuất bản Nông nghiệp, 1994
6. **Đái Duy Ban.** Kỹ thuật gen và các vấn đề nghiên cứu y học hiện đại. Tổng hội Y học Việt Nam, 1985.
7. **Đái Duy Ban, Trương Nam Hải, Đinh Duy Kháng, Lữ Thị Cẩm Vân, Nguyễn Đình Phúc.** Sinh học phân tử của ung thư vòm họng. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, 2003.
8. **Đái Duy Ban, Trương Nam Hải, Đinh Duy Kháng.** Sinh học phân tử của các bệnh gan và ung thư gan. Nhà xuất bản Khoa học Kỹ thuật, 2004.
9. **Đái Duy Ban, Lữ Thị Cẩm Vân.** Công nghệ gen trong sản xuất thế hệ mới ứng dụng trong y học và nông nghiệp hiện đại. Trung tâm thông tin tư liệu Trung tâm KHTN&CNQG, 1994.
10. **Đái Duy Ban, Trần Thị Minh Tâm, Đái Thị Ngân Hà, Đái Thị Hằng Nga.** Công nghệ ADN trong điều trị gen các bệnh hiểm nghèo. Nhà xuất bản Y học, 1998
11. **Griffin HG. Griffin A.M.** PCR technology current Innonation CRC, Press 1994

12. **Harris ELV ADN Angal S.** Protein purification methods. A practical approach ILR. Press 1989

13. **Hoàng Thị Bích Ngọc.** Acid nucleic. Trong cuốn sách Hoá sinh y học. Nhà xuất bản Y học

14. **Hồ Huỳnh Thuỳ Dương.** Sinh học phân tử. Nhà xuất bản Giáo dục, 1997

15. **Lê Đình Lương.** Nguyên lý kỹ thuật di truyền. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, 2001

16. **Newton C.R, Graham A.** PCR-Bios scientific publishers, 1994

17. **Nguyễn Đình Huyên.** Những điều cơ bản của kỹ thuật di truyền. Nhà xuất bản Nông nghiệp, 1999

18. **Rolfs A. Schuller I. Finckh U, Weber-Rolfs I.** PCR: Clinical Diagnostics ADN Research, Sringer lab, 1992

19. **Sambrook, Fritsch, Maniatis.** Molecular cloning, a laboratory manual 1, 2, 3. Second edition, CSH 1989

20. **Schumann W.** Genetic Engineering Techniques. Institute of Genetics. Germany

21. **Watson, Hopkins, Roberts, Steitz, Weiner.** Molecular biology of the gene. 4th edition. The Benjamin cummings Publishing company, Inc 1987

22. **Winter P.C, Hickey G.I, Fletcher H.I.** Genetics, Bios Scientific Publisers, limited, 1998.

GS. TSKH. ĐÁI DUY BAN

CÔNG NGHỆ GEN

Chịu trách nhiệm xuất bản: PGS, TS TÔ ĐĂNG HẢI
Biên tập: Nguyễn Kim Long
Kiểm tra kỹ thuật: Trần Khánh Thịnh
Vẽ bìa: Hương Lan

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
70 Trần Hưng Đạo, Hà Nội

In 600 cuốn, khổ 16x24 cm, tại Nhà in Khoa học và công nghệ.
Giấy phép xuất bản số: 136-2006/CXB/142-06/KHKT do Cục xuất bản cấp ngày 13 tháng 4 năm 2006.
In xong và nộp lưu chiểu tháng 6 năm 2006

công nghệ gien

Giá : 30.000 đ