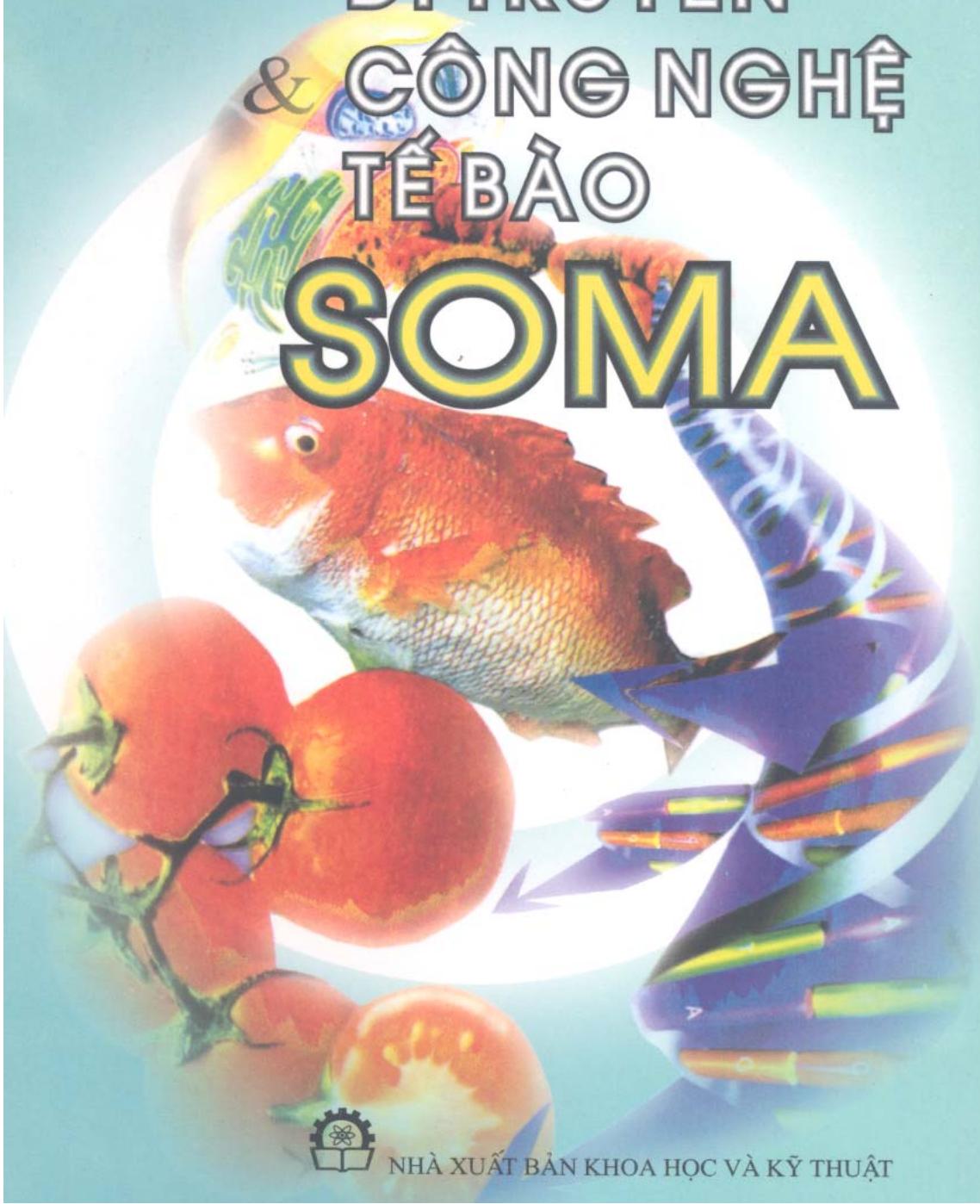


PGS. TS. NGUYỄN NHƯ HIỀN

DI TRUYỀN
& CÔNG NGHỆ
TẾ BÀO
SOMA



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

PGS. TS. NGUYỄN NHƯ HIỀN

**DI TRUYỀN VÀ CÔNG NGHỆ
TẾ BÀO SOMA**



**NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
HÀ NỘI -2002**

Chịu trách nhiệm xuất bản:

PGS., TS. TÔ ĐĂNG HẢI

Biên tập :

NGUYỄN KIM LONG

Sửa bài :

NGUYỄN KIM LONG

Vẽ bìa :

HƯƠNG LAN

$\frac{57 - 57,029}{KHKT - 2001}$ 442 - 28,5 / 4 / 2001

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

70 Trần Hưng Đạo - Hà Nội

In 700 cuốn, khổ 16x24cm, tại Xí nghiệp in 19-8 số 3
dường Nguyễn Phong sác - Nghĩa Tân - Cầu Giấy - Hà Nội.
Giấy phép xuất bản số 442-28 cấp ngày 5-4-2001.

In xong và nộp lưu chiểu tháng 1 năm 2002

LỜI NÓI ĐẦU

Cuốn sách Di truyền và công nghệ tế bào soma là một cuốn sách tham khảo được biên soạn nhằm mục đích giới thiệu những kiến thức lý thuyết và thực nghiệm về một lãnh vực chuyên môn sâu có liên quan đến Di truyền học và Tế bào học của dạng tế bào Eucaryota cấu tạo nên các mô, các cơ quan của cơ thể đa bào - tế bào soma.

Cuốn sách đề cập đến các vấn đề về tổ chức thể nhiễm sắc và bộ gen của tế bào soma, hoạt động của gen và điều chỉnh hoạt động của gen, tập tính của thể nhiễm sắc qua chu trình tế bào, tính biến dị di truyền của tế bào soma, sự lai soma và tạo thành tế bào lai và cơ thể lai soma.

Các vấn đề thực tiễn của ung thư học, của công nghệ tế bào, ứng dụng trong nông nghiệp và y học được đề cập giúp cho bạn đọc hiểu về Công nghệ sinh học đặng có thể áp dụng chung vào thực tiễn nghiên cứu và sản xuất.

Cuốn sách Di truyền và công nghệ tế bào soma phục vụ chủ yếu các đối tượng là sinh viên cao đẳng và đại học cũng như nghiên cứu sinh và sinh viên cao học. Ngoài ra sách còn phục vụ cho các đối tượng bạn đọc là các thầy, cô giáo, nhà nghiên cứu và thực nghiệm trong các lĩnh vực có liên quan đến sinh học và công nghệ sinh học, học sinh phổ thông trung học cuối cấp.

Cuốn sách có thể còn có thiếu sót mong bạn đọc góp ý kiến để cuốn sách được hoàn thiện hơn trong những lần xuất bản sau.

TÁC GIẢ

CHƯƠNG I

CẤU TRÚC VÀ CHỨC NĂNG CỦA TẾ BÀO SOMA

A. TẾ BÀO SOMA

I. KHÁI NIỆM

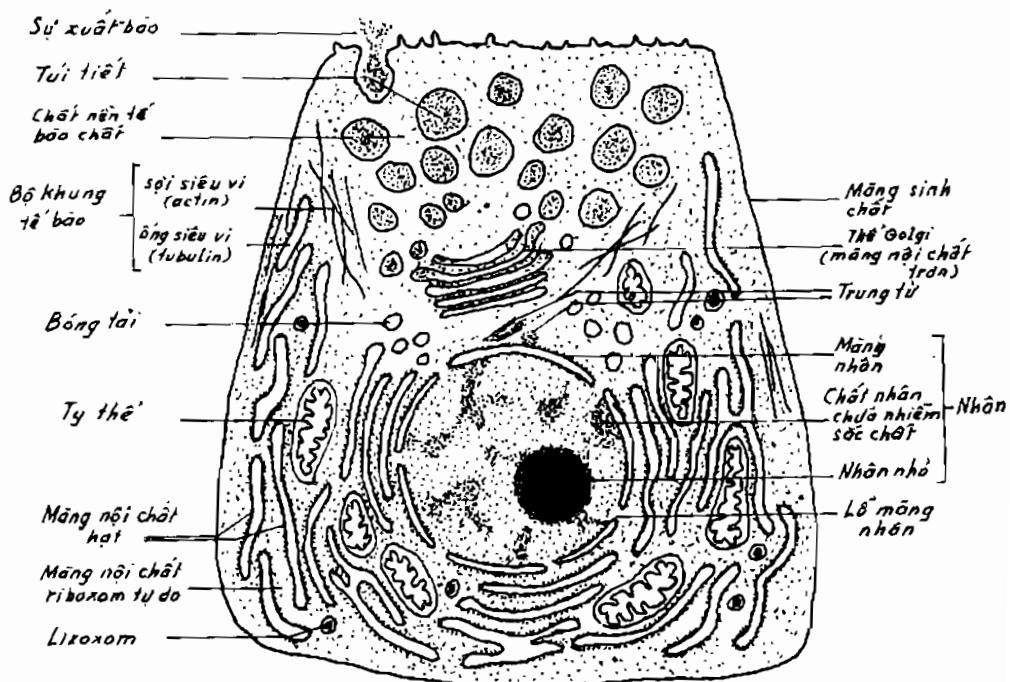
Trong cơ thể đa bào sinh sản hữu tính tồn tại hai dòng tế bào: *tế bào soma* và *tế bào sinh dục*. **Tế bào soma** là những tế bào được phát triển và biệt hoá để tạo nên các mô và cơ quan sinh dưỡng và thực hiện các chức năng như trao đổi chất, trao đổi năng lượng, vận động v.v... bảo đảm sự tồn tại của cơ thể trong một thế hệ. Tế bào soma phân bào bằng phương thức nguyên nhiễm (mitosis), từ những tế bào $2n$ cho ra các thế hệ tế bào con $2n$, chúng không có khả năng phân bào giảm nhiễm. Trái lại tế bào sinh dục chỉ tồn tại trong cơ quan sinh dục (trong tinh hoàn và buồng trứng ở động vật, trong bầu noãn và nhị đực ở thực vật) và có khả năng phân bào giảm nhiễm (meiosis) để tạo nên các tế bào sinh dục chín (giao tử đực và giao tử cái) với n thể nhiễm sắc. Chúng có chức năng duy trì các thế hệ liên tiếp nhau qua phương thức thụ tinh tạo thành hợp tử, từ hợp tử phát triển thành cơ thể tương lai ở thế hệ sau.

Đầu thế kỷ XX, Weismann đã từng giả thiết là dòng tế bào soma có chức năng định dưỡng, có thể bị biến đổi và tiêu diệt theo sự chết của cơ thể, còn dòng tế bào sinh dục thì bất tử và chứa “chất sống” bất biến truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác.

Theo quan điểm của sinh học hiện đại thì dòng tế bào soma và dòng tế bào sinh dục đều có nguồn gốc từ hợp tử và chúng đều được phát triển và biệt hoá qua quá trình phát triển cá thể, chúng cũng chứa bộ nhiễm sắc thể $2n$ và cùng số lượng ADN - tức là chứa một lượng, một chương trình di truyền như nhau (ví dụ ở người các tế bào gan, biểu mô, bạch cầu v.v. đều

chứa $2n= 46$ và 6×10^9 đôi nucleotit giống như các noãn nguyên bào hoặc tinh nguyên bào).

Người ta xem dòng tế bào sinh dục cũng chỉ là một dạng tế bào được biệt hoá trong quá trình phát triển cá thể được phân công chức năng sinh sản hữu tính nghĩa là tạo nên các giao tử có n nhiễm sắc thể để khi thụ tinh - kết hợp n của đực với n của cái tạo nên hợp tử $2n$ và như vậy duy trì được sự ổn định bộ nhiễm sắc thể của loài qua thế hệ (hình 1.1a).



Hình 1.1a. Cấu trúc siêu hiển vi của tế bào nhân chuẩn.

Di truyền tế bào soma là một bộ phận của di truyền tế bào nghiên cứu các đặc tính di truyền của tế bào soma như đột biến soma, tái tổ hợp soma và lai soma tạo nên các phôi soma và cơ thể toàn vẹn không thông qua lai giới tính (giữa yếu tố đực và cái). Chúng không chỉ có ý nghĩa lý thuyết đối với di truyền học, tế bào học và sinh học phát triển mà còn có ý nghĩa thực tiễn trong công nghệ gen và công nghệ tế bào, trong nông nghiệp và y học.

Trong cơ thể đa bào, thực vật cũng như động vật, các tế bào soma được biệt hoá rất khác nhau để cấu tạo nên các mô, các cơ quan thực hiện các chức năng khác nhau, nhưng đều có mô hình cấu tạo điển hình chung nhất của dạng tế bào nhân chuẩn (eucaryota)(hình 1.1a).

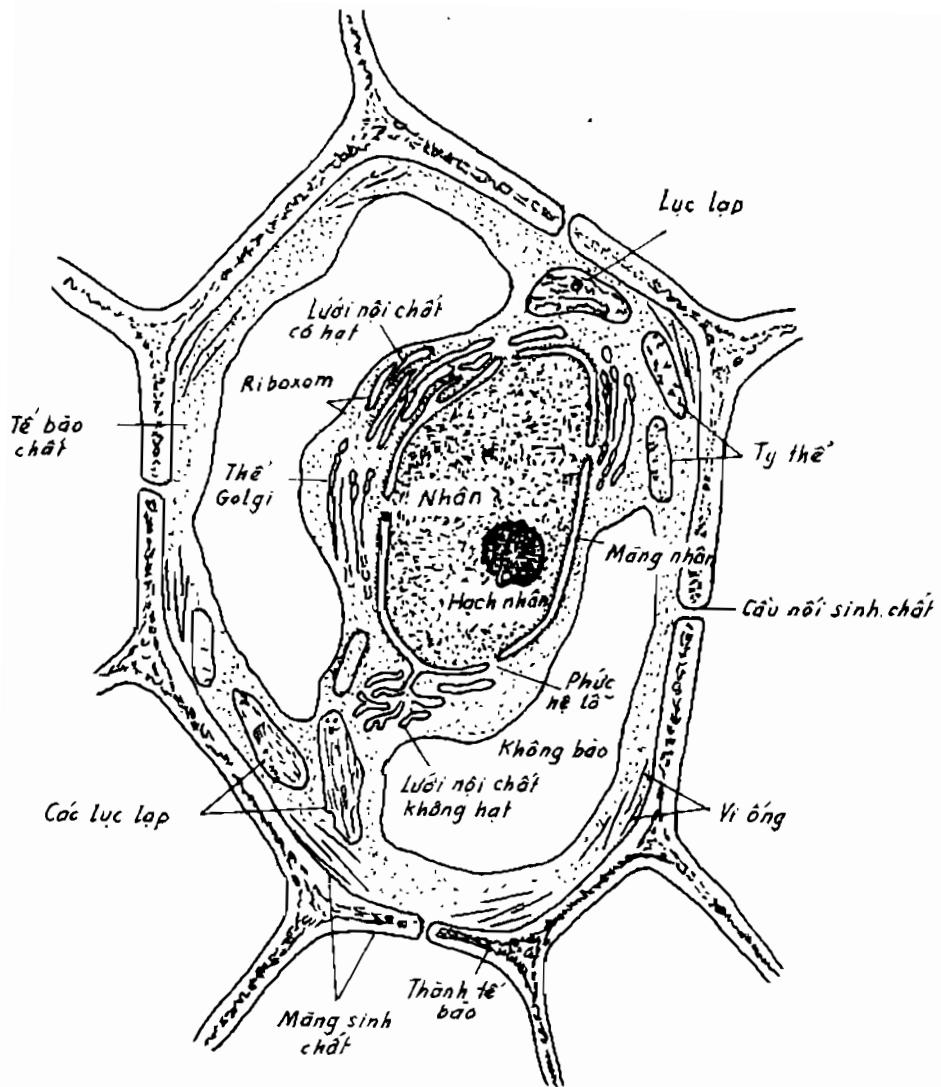
II. CẤU TRÚC

Cấu trúc của tế bào soma gồm ba thành phần: màng sinh chất, tế bào chất và nhân (hình 1.1b).

1. Màng sinh chất

Màng sinh chất (plasma membrane) là màng lipoprotein có độ dày 7,5nm được cấu tạo từ khung photpholipit kép, từ các phân tử protein rất đa dạng phân bố “khẩn” vào khung lipit bằng cách xuyên qua khung, hoặc nằm ở mặt ngoài hoặc ở mặt trong.

1.1. Protein màng có vai trò rất đa dạng, có thể là protein cấu trúc tạo nên các kênh thông thương qua màng, có thể là enzym, là chất vận chuyển (transportor), là thụ quan màng (receptor), là protein đóng vai trò các bơm ion ví dụ bơm Na-K là Na-K-ATPaza. Ngoài ra trong màng sinh chất còn chứa các thành phần khác như cholesterol và gluxit. Gluxit thường liên kết với lipit và protein ở mặt ngoài màng tạo nên lớp áo ở phía ngoài tạo cho màng có tính chất không đối xứng, vừa có tính chất bảo vệ và liên kết với các tế bào bên cạnh trong tổ chức mô. Màng sinh chất có chức năng bao phủ bảo vệ tế bào, tạo cho tế bào có hình dạng nhất định, nhưng màng cũng có tính linh hoạt cao do đặc tính linh hoạt của các phân tử lipit cũng như phân tử protein có trong màng, do đó màng rất thích ứng với các chức năng quan trọng như trao đổi chất qua màng, nhận biết thông tin đặc thù để tế bào kịp thời phản ứng trả lời trong tất cả các tình huống phức tạp của môi trường. Sự trao đổi chất qua màng có thể thực hiện bằng phương thức khuếch tán thụ động, hoặc bằng phương thức hoạt tải kèm theo tiêu phí năng lượng ATP, hoặc bằng phương thức nhập bào và xuất bào.

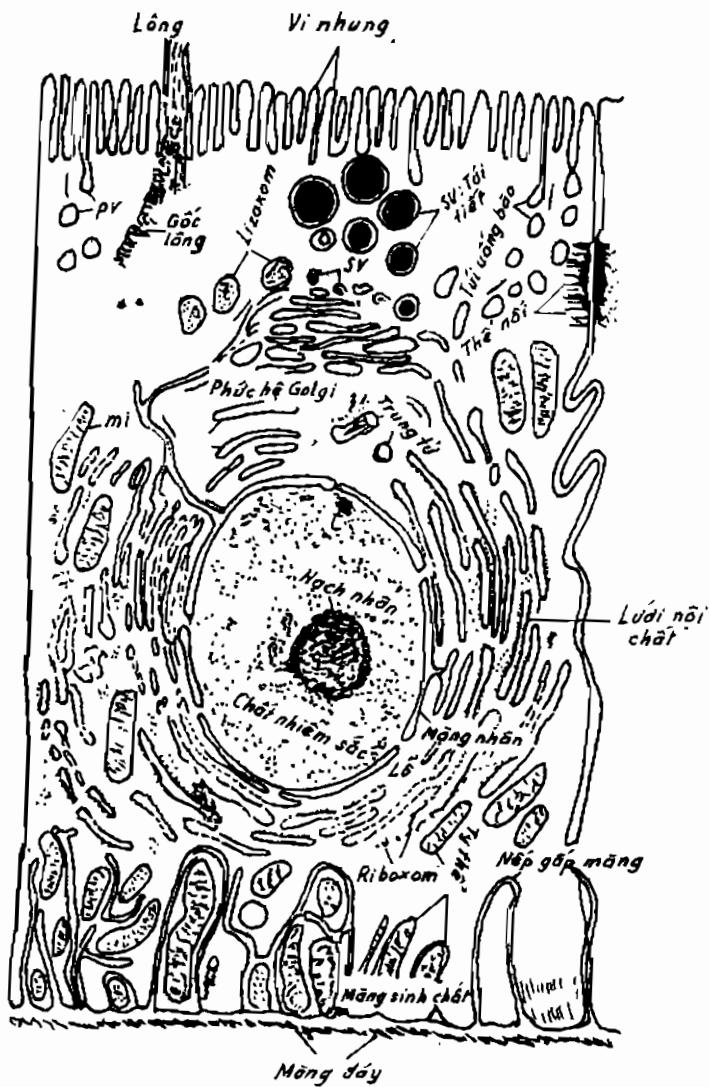


Hình 1.1b. Cấu tạo điển hình chung nhất của dạng tế bào nhân chuẩn (theo De Robert và ctv., 1975).

Hình 1a. Tế bào thực vật điển hình

1.2. Protein đánh dấu. Trong màng sinh chất có chứa các protein đánh dấu (marker protein) đặc thù, các thụ quan màng do đó tế bào có khả năng nhận biết các tế bào cùng loại, nhận biết các tín hiệu đặc thù từ môi

trường để kịp thời phát động các dây chuyền phản ứng trong tế bào, hoặc điều chỉnh sự hoạt hoá các gen đáp ứng kịp thời các thay đổi của điều kiện môi trường.



Hình 1b. Tế bào động vật điển hình.

Trong các mô khác nhau, màng sinh chất có thể bị biến đổi thích nghi với các chức năng khác nhau, như tạo nên có vi mao (microvilli), ví dụ ở tế bào ruột nhằm tăng cao bề mặt hấp thu, như tạo nên lớp màng mielin của sợi trục thần kinh nhằm tăng cao tốc độ dẫn truyền, như tạo nên hệ thống màng ở tế bào que cảm quang, ở võng mạc của mắt nhằm tăng cao dung tích chứa các nhân tố cảm quang (opsin).

Ở nhiều tế bào, bao ngoài màng sinh chất có thành tế bào bằng chất polisaccarit được gọi là lớp glucocalix đóng vai trò bảo vệ, ví dụ lớp polisaccarit tạo nên lớp màng trứng, hoặc lớp thành vỏ xeluloza ở tế bào thực vật.

2. Tế bào chất

Tế bào chất (cytoplasma) là khối nguyên sinh chất nằm trong màng sinh chất và bao quanh nhân. Trong tế bào chất có chứa các bào quan như:

2.1. Mạng lưới nội chất có hạt đóng vai trò vận tải nội bào và tổng hợp protein nhờ các thể riboxom đính trên mạng lưới. Mạng lưới nội chất承担责任 vai trò vận tải nội bào, tổng hợp lipit.

2.2. Riboxom là bào quan đóng vai trò là nhà máy tổng hợp protein, chúng có kích thước rất bé, chỉ 20 - 30 nm, chúng có thể đính trên màng mạng lưới nội chất có hạt hoặc định khu rải rác trong tế bào chất. Điều quan trọng là cấu trúc của riboxom tuy đơn giản chỉ gồm có rARN và protein nhưng thích hợp cho sự cố định phân tử mARN dùng làm khuôn (vì được phiên từ mã của gen tương ứng) để lắp ráp các axit amin đúng như mã quy định và thích hợp để tiếp nhận các tARN khi chúng mang các axit amin đến để lắp ráp thành chuỗi polypeptit (xem phần sau). Trong cơ thể đa bào, các protein được tiết ra ngoài thường được tổng hợp trên riboxom của mạng lưới nội chất có hạt vì thuận tiện cho việc chuyên chở và tiết ra ngoài qua phức hệ Gôngi, ví dụ tế bào gan có thể Berg, tế bào nơron có thể Niss là vùng tế bào chất tập trung nhiều mạng lưới nội chất có hạt.

2.3. Phức hệ Gôngi là bào quan đóng vai trò chế biến đóng gói các sản phẩm chế tiết như các protein, glicoproteit và được tiết ra ngoài nhờ các bong nội bào và qua hiện tượng xuất bào.

2.4. Ty thể (mitochondria) và lục lạp là những bào quan có vai trò là trạm chuyển hoá năng lượng tạo nên ATP (adenozintriphophat) là phân tử tích năng lượng mà tế bào có thể sử dụng cho các quá trình sống như hoạt tải, co cơ, dẫn truyền xung động v.v... Ty thể có trong tất cả tế bào soma của cơ thể hô hấp hiếu khí trừ những tế bào biệt hoá cao như hồng cầu động vật.

có vú hoặc các tế bào biệt hoá cao của mạch dẫn floem và xylem ở thực vật. Ty thể là bào quan có màng kép trong đó khi có mặt oxy sẽ chuyển hoá năng lượng tích trong chất hữu cơ thành năng lượng tích trong ATP thông qua quá trình oxyphotphorin hoá với hiệu suất đạt 40%.

2.5. Lục lạp (chloroplast) là bào quan đặc trưng cho tế bào tảo và thực vật, là những cơ thể có khả năng quang tự dưỡng, nghĩa là có khả năng sử dụng ánh sáng mặt trời để quang hợp tạo nên các chất hữu cơ từ CO₂ và H₂O. Lục lạp là bào quan có hệ thống màng thylacoit là nơi chứa sắc tố lục chlorofin a và b, cũng như các nhân tố, các enzym cần thiết cho sự chuyển hoá quang năng thành năng lượng tích trong ATP với hiệu suất đạt 75%, và nhờ năng lượng ATP này lục lạp tổng hợp nên tinh bột từ các chất vô cơ CO₂ và H₂O. Ty thể cũng như lục lạp có chứa ADN ở dạng trần và có cấu tạo vòng giống ADN của vi khuẩn, vì vậy chúng là những bào quan có hệ di truyền và hệ tổng hợp protein riêng của mình có ADN và riboxom riêng. ADN ty thể và ADN lục lạp là cơ sở vật chất của đặc tính di truyền ngoài nhân. Cũng vì ADN và hệ tổng hợp protein trong ty thể giống vi khuẩn nên các nhà sinh học theo thuyết cộng sinh cho rằng ty thể trong tế bào nhân chuẩn là kết quả của sự cộng sinh của một loại vi khuẩn có khả năng hô hấp hiếu khí trong tế bào, cũng tương tự như vậy lục lạp là kết quả cộng sinh của một loại vi khuẩn lam trong tế bào.

2.6. Lyzoxom (lysosome) là những bào quan dạng bóng có kích thước từ 0,2 - 1μm, được bao bọc màng lipoproteit và chứa hệ enzym phân giải hoạt động ở độ pH = 5, có khả năng phân huỷ các chất hữu cơ như gluxit, lipit, protein hoặc axit nucleic, vì vậy mà lyzoxom đóng vai trò là hệ tiêu hoá của tế bào (tiêu hoá nội bào) và tự tiêu. Chúng có vai trò đặc biệt quan trọng đối với các tế bào soma có vai trò bảo vệ cơ thể như các đại thực bào, các tế bào bạch cầu trung tính v.v... vì chính các vi khuẩn, các chất lạ, độc hại bị tiêu huỷ bởi lyzoxom. Khi con nòng nọc đến giai đoạn biến thái trở thành con ếch thì chiếc đuôi tiêu biến đi là nhờ hoạt động tự tiêu của lyzoxom.

2.7. Trung thể (centrosome) là bào quan có vai trò tạo nên sao và thoi phân bào. Trong tế bào chất còn chứa hệ thống vi sợi và vi ống đóng vai trò là bộ khung xương của tế bào và tham gia vào sự vận động và vận chuyển nội bào. Vi sợi và vi ống còn tham gia tạo nên các cấu trúc vận động như thoi phân bào (để vận chuyển thể nhiễm sắc về hai cực của tế bào con) là hệ thống vi ống được cấu tạo từ protein tubulin; như lông và roi là cơ quan vận động có cấu trúc vi ống xếp theo kiểu 9 + 2; như tơ cơ trong các tế

bào cơ là những cấu trúc vi sợi actin và miozin xếp có trật tự thích nghi với vai trò co rút.

Ngoài ra trong tế bào chất còn chứa các bóng nội bào được bao bởi màng chứa các dịch và chất khác nhau và đặc biệt rất phát triển ở tế bào thực vật tạo nên sức trương. Trong tế bào chất còn chứa các chất dự trữ, các sản phẩm trao đổi chất như glicogen, tinh bột, protein, mỡ, dầu, ancaloit, tinh dầu v.v...

Chất nền của tế bào chất là dung dịch keo loại trong đó diễn ra các phản ứng sinh hoá là cơ sở của quá trình trao đổi chất và trao đổi năng lượng như quá trình đường phân (glycolyse), quá trình thuỷ phân v.v...

Đối với một số tế bào soma như tế bào nơron chẳng hạn tế bào chất cùng màng sinh chất kéo dài thành các sợi trực và sợi nhánh tạo điều kiện cho các nơron ở xa nhau liên hợp với nhau tạo thành mạng lưới nơron rất phức tạp.

3. Nhân tế bào

Nhân tế bào (nucleus) được cấu tạo gồm màng nhân là màng kép có nhiều lỗ, qua lỗ thực hiện sự vận chuyển các chất từ nhân ra tế bào chất và ngược lại. Trong dịch nhân có chứa các cấu thành của nhân là hạch nhân và chất nhiễm sắc.

3.1. Hạch nhân còn gọi là nhân con (nucleolus) là nơi sản sinh và dự trữ ribosom cho tế bào. Hạch nhân cũng như màng nhân mất đi ở cuối tiền kỳ trước và xuất hiện lại ở mạt kỳ của phân bào.

3.2. Chất nhiễm sắc (chromatine) là cấu thành quan trọng nhất của nhân và của tế bào nói chung. Chất nhiễm sắc được cấu tạo gồm ADN (axit deoxyribonucleic) liên kết với protein kiềm histon và các protein axit hình thành nên cấu trúc sợi xoắn, cuộn nhiều cấp được gọi là sợi nhiễm sắc (xem phần sau). Cấu tạo vật lý của chất nhiễm sắc thay đổi theo các giai đoạn của chu kỳ sống của tế bào. Ở gian kỳ (interphase) các sợi nhiễm sắc ở trạng thái mở xoắn giãn ra không có hình dạng rõ ràng mà thể hiện ở các hạt, các sợi rất mảnh khi nhuộm màu và xem với kính hiển vi quang học. Khi tế bào bước vào giai đoạn phân bào các sợi nhiễm sắc xoắn lại, co ngắn thể hiện thành các thể có cấu hình ổn định hình que - được gọi là thể nhiễm sắc (chromosome), thích nghi với hiện tượng phân ly vận động về hai tế bào con.

Nhân và tế bào chất hoạt động như một thể thống nhất, trong cơ thể

đa bào nhiều tế bào mất nhân, ví dụ hồng cầu động vật có vú chẳng hạn, chúng mất khả năng sinh sản và chỉ tồn tại 120 ngày. Ngược lại trạng thái của tế bào chất quyết định trạng thái hoạt động của nhân, ví dụ hồng cầu gà tuy có nhân nhưng nhân ở trạng thái không hoạt động nhưng khi đem lai hồng cầu gà với tế bào HeLa (là tế bào ung thư người) thì nhân của hồng cầu trở thành hoạt động và tổng hợp nên nhiều protein của gà. Những thí nghiệm về cấy và chuyển nhân trong nhân bản vô tính cũng chứng minh nhiều nhân tố điều chỉnh sự hoạt hoá của gen đến từ tế bào chất.

Vì lẽ rằng trong cơ thể đa bào các tế bào soma được biệt hoá tạo nên các mô khác nhau có chức năng khác nhau, chúng hoạt động lệ thuộc vào nhau dưới sự điều hoà và điều khiển chung, nhưng chúng mang đặc tính đa tiềm năng về mặt di truyền - hệ gen của mỗi tế bào soma của bất kỳ mô nào (trừ các tế bào soma mất nhân hoặc nhân bị biến đổi bất hoạt hoàn toàn) đều chứa hệ gen (genome) điển hình đặc trưng cho kiểu gen (genotype) của cơ thể đó. Ví dụ trong tế bào soma của người dù là tế bào da, tế bào ruột, tế bào gan hay tế bào tuyến vú v.v... đều mang hệ gen chứa $2n$ thể nhiễm sắc = 46 và chứa hàm lượng ADN = 6×10^9 đôi nucleotit. Cũng vì lý do đó mà ở nhiều cơ thể bằng phương thức sinh sản vô tính từ các tế bào soma đã phát triển thành một cơ thể toàn vẹn hoặc bằng công nghệ nhân bản vô tính, các nhà khoa học đã tạo được con cừu Dolly từ tế bào soma - tế bào tuyến vú.

B. CHU KỲ SỐNG CỦA TẾ BÀO

Chu kỳ sống của tế bào (cell cycle) là thời gian diễn ra kể từ thời điểm tế bào được hình thành nhờ phân bào của tế bào mẹ và kết thúc bởi sự phân bào để hình thành tế bào mới (hình 1.2). Người ta chia chu kỳ tế bào ra hai thời kỳ chính:

- Thời kỳ giữa hai lần phân chia được gọi là gian kỳ (interphase) được ký hiệu là I là thời gian tế bào trao đổi chất, sinh trưởng và chuẩn bị ch phân bào.

- Thời gian tiếp theo là kỳ phân bào (mitosis) được ký hiệu là M, là thời kỳ tế bào mẹ phân đôi cho ra hai tế bào con.

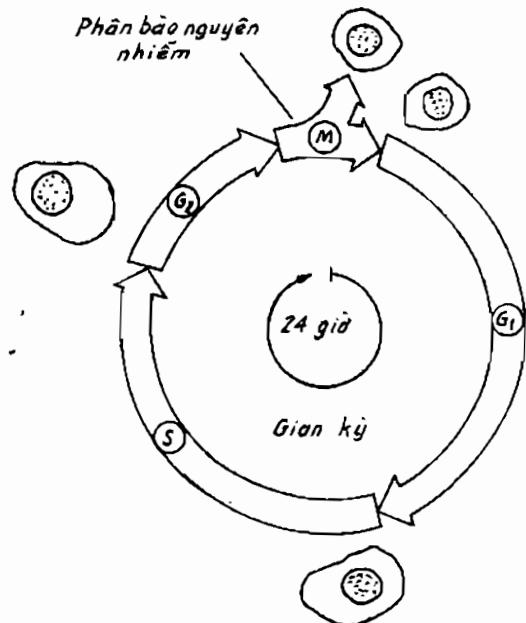
Trong cơ thể đa bào, các tế bào soma được biệt hoá khác nhau để thực hiện chức năng khác nhau nên thời gian kéo dài của chu kỳ sống của chúng

có nhiều thay đổi, đặc biệt là thời kỳ gian kỳ. Ví dụ tế bào ruột phân bào hai lần qua một ngày, tế bào gan phân bào hai lần qua một năm, còn tế bào nơron ở cơ thể trưởng thành hầu như không phân bào mà gian kỳ kéo dài cho đến khi tế bào chết hoặc cơ thể chết. Trung bình chu kỳ sống của đa số tế bào kéo dài từ 8 giờ đến 100 ngày.

I. GIAN KỲ

Trong gian kỳ tế bào thực hiện các chức năng trao đổi chất, các hoạt động sống khác nhau, tổng hợp ARN, ADN, các protein, các enzym v.v... và chuẩn bị cho phân bào. Tuỳ theo đặc điểm chức năng, người ta chia gian kỳ ra 3 giai đoạn hay là pha liên tiếp nhau: *giai đoạn G₁* (gap 1), *giai đoạn S* (synthesis) và *giai đoạn G₂* (gap 2) (hình 1.2).

Thời gian kéo dài của gian kỳ tuỳ thuộc vào thời gian của 3 pha G₁ + S + G₂ đặc biệt tuỳ thuộc vào G₁ vì ở các loại tế bào khác nhau thì thời gian G₁ là rất khác nhau, còn giai đoạn S và G₂ tương đối ổn định.



Hình 1.2. Chu kỳ sống của tế bào
(theo Bruce Albert và ctv., 1994).

1. Pha G₁

Pha G₁ được tiếp ngay sau phân bào

1.1. Thời gian của G₁

Thời gian của G₁ kéo dài từ ngay sau khi tế bào được tạo thành do phân bào, cho đến khi bắt đầu pha S là pha tổng hợp ADN. Thời gian của G₁ tuỳ thuộc vào chức năng sinh lý của tế bào, ví dụ đối với tế bào phôi thì thời gian của G₁ = 1 giờ, đối với tế bào gan động vật có vú G₁ = 1 năm, còn đối với tế bào nơron G₁ có thể kéo dài suốt đời sống cơ thể. Đối với tế bào

ung thư thời gian của G1 bị rút ngắn rất nhiều. Người ta còn phân biệt pha Go là pha trong đó tế bào đi vào trạng thái biệt hoá vĩnh viễn hoặc thoái hoá.

Khi kết thúc G1 tế bào đi vào pha S và G2 để vào thời kỳ phân bào và tùy thuộc vào các điều kiện môi trường. Vào cuối pha G1 có một thời điểm được gọi là *điểm hạn định*, điểm R (restriction point).

Nếu tế bào vượt qua điểm R chúng tiếp tục đi vào pha S. Nhân tố điều chỉnh thời điểm R là phức hệ protein không bền vững có tác dụng kìm hãm gồm có cyclin D và kinaza phụ thuộc cyclin. Pha G1 là pha sinh trưởng của tế bào vì trong pha này xảy ra sự tổng hợp các ARN và protein. Đối với các tế bào biệt hoá thì tế bào không vượt qua R mà đi vào quá trình biệt hoá tế bào để tạo nên các dòng tế bào soma khác nhau có chức năng khác nhau.

1.2. Tổng hợp chất trong pha G1

Trong pha G1 hàm lượng ADN và số lượng thể nhiễm sắc là ổn định (ví dụ ở người là $2n = 46$ thể nhiễm sắc). Mỗi một thể nhiễm sắc chứa một phân tử ADN liên kết với histon và ở pha G1 chúng tạo nên các sợi nhiễm sắc của thể nhiễm sắc và cũng chính trong pha G1 các gen ở trạng thái hoạt động nghĩa là tổng hợp các ARN (phiên mã) và tổng hợp protein (dịch mã). Cũng vì vậy người ta xem pha G1 là pha sinh trưởng tế bào và thực hiện hoạt động sinh lý khác nhau. Khi nhân phiên mã (transcription) thì các gen chứa trong vùng chất nhiễm sắc thực (euchromatine) (có chứa các codon gồm bộ ba deoxyribonucleotit) sẽ tổng hợp nên phân tử mARN (mang các codon gồm bộ ba ribonucleotit) và như vậy mã của một protein nào đó (trình tự các codon) trong ADN đã được “phiên” sang mARN. Phân tử mARN sẽ di ra tế bào chất đến riboxom, ở đây nhờ các tARN, các axit amin được lắp ghép đúng theo các codon của mARN để cho ra phân tử protein mà tế bào cần.

1.3. Sự phiên mã

Sự phiên mã (transcription) của ADN có thể diễn ra trong tất cả các pha của gian kỳ. Sự phiên mã là sự tổng hợp các phân tử mARN cũng như rARN và tARN từ ADN theo nguyên tắc bổ sung (A-U và C-G) diễn ra trong nhân.

Các ARN-polymeraza: ARN-polymeraza là enzym có vai trò phiên mã, nghĩa là xúc tác sự tổng hợp các ARN (mARN, tARN và rARN) trên khuôn của một mạch ADN. Sự tổng hợp ARN diễn ra theo chiều 3'-5' và được xác định bởi promoter. Ở *Bacteria*, người ta chỉ tìm thấy một dạng ARN-

polymeraza với trọng lượng phân tử 500000 D chứa nhiều mạch polypeptit (ví dụ ở *E.coli* có đến năm mạch).

Ở eucaryota có đến ba dạng ARN-polymeraza, mỗi dạng có vai trò riêng, đó là các dạng ARN-polymeraza I, II và III.

- ARN-polymeraza I có vai trò tổng hợp các rARN (trừ rARN 5S)
- ARN-polymeraza II có vai trò phiên mã các mARN
- ARN-polymeraza III có vai trò tổng hợp các tARN và rARN 5S

Trong tế bào động vật có vú, người ta đã tính được có khoảng 40000 phân tử ARN-polymeraza I, 40000 phân tử ARN-polymeraza II và khoảng 20000 phân tử ARN-polymeraza III.

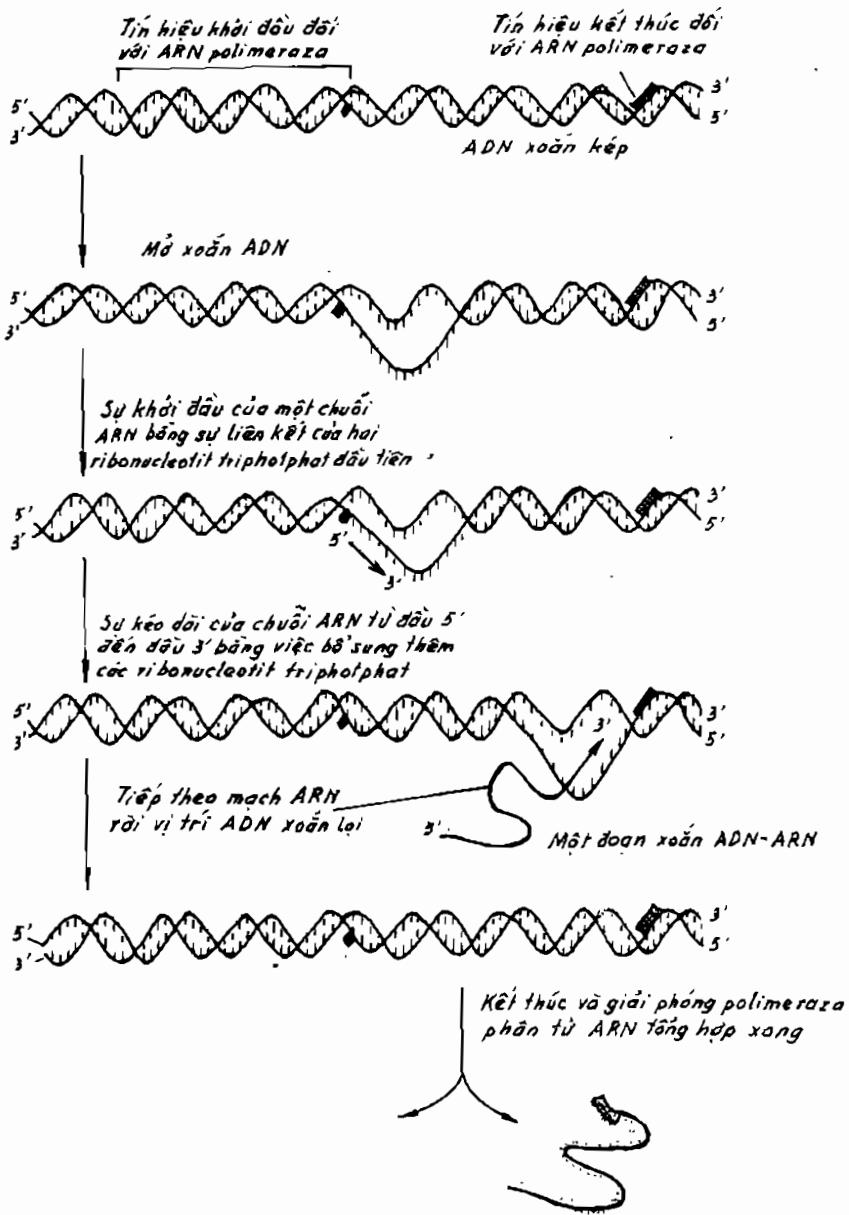
1.4. Cơ chế phiên mã

Sự tổng hợp ARN mang tính chọn lọc cao. Trong tế bào eucaryota (sinh vật nhân chuẩn) khoảng 1% các trình tự nucleotit trong ADN được phiên mã thành ARN phục vụ cho hoạt động của tế bào. Tham gia quá trình phiên mã ngoài các ARN-polymeraza còn có các nhân tố khác đóng vai trò điều chỉnh. Các nhân tố đó thường là các protein axit. Bắt đầu phiên mã là sự acetyl hoá các histon đưa đến biến đổi trong cấu trúc của nucleoxom. Do sự acetyl hoá dạng histon bát hợp (octamere) biến thành histon tứ hợp (tetramere) hoặc nửa - nucleoxom. Sợi ADN giãn vòng và được nới lỏng.

Promoter được nhận biết bởi các ARN-polymeraza nhờ một hoặc nhiều protein liên kết với ADN ở đoạn promoter. Promoter trở thành hoạt động khi đã liên kết với protein (được gọi là nhân tố phiên mã), thì ARN-polymeraza gắn vào promoter và bắt đầu phiên mã từ điểm khởi đầu và di chuyển dọc theo sợi ADN đã tháo xoắn, và bằng cách dùng một mạch ADN làm khuôn theo nguyên tắc bổ sung, các ribonucleotit được lắp ráp thành mạch ARN kéo dài theo hướng 5'- 3' cho đến điểm kết thúc; phân tử ARN được tổng hợp tức thì được tách khỏi ADN. ARN-polymeraza cũng tách khỏi ADN (hình 1.3) sự kéo dài và kết thúc mạch ARN đòi hỏi có sự tham gia của các nhân tố điều chỉnh.

Sự điều chỉnh hoạt động của gen (phiên mã) có thể do yếu tố cấu trúc gen như các enhancer, promoter, v.v... là những đoạn ADN có khả năng liên kết với các nhân tố điều chỉnh - là các protein điều chỉnh để trở thành hoạt động hoặc ức chế. Các nhân tố điều chỉnh hoạt động của gen không chỉ là hệ thống các protein rất đa dạng của nhân và thể nhiễm sắc mà đó có thể là các nhân tố ngoại bào như các sản phẩm trao đổi chất, các hormone, v.v...

ARN polimeraza



Hình 1.3. Sơ đồ quá trình phiên mã (theo Bruce Albert và ctv., 1994).

Mạch ARN mới được tổng hợp bao gồm cả ARN được phiên mã từ các exon và intron vì vậy được gọi là bản phiên khởi thuỷ. Bản phiên này phải được xử lý chế biến (ARN processing) thành các ARN có hoạt tính chức năng trước khi được tế bào sử dụng (các *m*ARN, *t*ARN và *r*ARN). Trong nhân tế bào dưới tác dụng của enzym exonucleaza các đoạn intron trong ví dụ *m*ARN khởi thuỷ bị cắt bỏ và sau đó các đoạn exon được khâu nối lại với nhau nhờ enzym ligaza và tạo thành *m*ARN chín có hoạt tính chức năng nghĩa là dùng để dịch mã khi được chuyển đến riboxom.

1.5. Sự dịch mã

Sự dịch mã (translation) là sự tổng hợp protein cũng có thể xảy ra ở các pha khác nhau của gian kỳ.

Protein là chất trung hợp mang tính đặc trưng loài, đặc trưng cho cá thể và đặc trưng cho tế bào. Sự đặc trưng này được thể hiện trong cấu trúc cấp I của protein, tức là trình tự sắp xếp của các đơn hợp - các axit amin cấu tạo nên protein đó. Trình tự sắp xếp của các axit amin trong mạch polypeptit (protein) được mã hoá bằng trình tự sắp xếp của các nucleotit trong mạch polynucleotit (ADN) - Mã như vậy được gọi là mã di truyền - tức là một bộ ba (hay là codon) nucleotit trong ADN qui định cho một axit amin trong polypeptit và như vậy trình tự các codon trong mạch polynucleotit qui định nên trình tự các axit amin trong mạch polypeptit. Có đến 64 codon ứng với 20 loại axit amin (hình 1.4). Như vậy một axit amin có thể có nhiều codon tương ứng. Kiểu mã như thế gọi là mã thoái hoá. Mã di truyền là vạn năng - nghĩa là áp dụng cho tất cả các cơ thể sống. Gần đây người ta tìm thấy

Vị trí thứ nhất (đầu 5')	Vị trí thứ hai				Vị trí thứ ba (đầu 3')
	U	C	A	G	
U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Sar Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G
C	Leu Leu Ieu Leu	Pro Pro Pra Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

Hình 1.4. Mã di truyền (theo Bruce Albert và ctv., 1994).

trong một số cơ thể ví dụ *Paramecium* hay trong ty thể mã di truyền có ít nhiều sai khác với bộ mã chung. Vì lẽ rằng ADN chứa trong thể nhiễm sắc định khu trong nhân tế bào cho nên mã chứa trong ADN sẽ được phiên thành mã chứa trong mARN - qua xử lý và chế biến, mARN được chuyên chở đến riboxom trong tế bào chất, ở đây mARN được dùng làm khuôn để lắp ráp các axit amin thành protein nhờ các tARN và các nhân tố khác nữa.

1.6. Cơ chế tổng hợp protein

Vai trò của tARN. Mỗi axit amin tương ứng với vài tARN; phân tử tARN liên kết với axit amin đặc trưng nhờ enzym amino-axit-tARN synthetaza. Có đến 20 amino-axit-tARN synthetaza đặc trưng cho 20 loại axit amin. Đầu tiên amino-axit-tARN synthetaza liên kết với axit amin đặc trưng cho riêng mình thành một phức hợp - phức hợp này liên kết với tARN đặc trưng qua đầu 3' với axit amin của phức hợp, tARN nhận biết được axit amin đặc trưng cho mình là nhờ enzym amino-axit-tARN synthetaza, còn liên kết giữa tARN với axit amin đòi hỏi tiêu phí năng lượng từ ATP. Khi tARN đã liên kết với axit amin (aminoaxil-tARN) thì enzym được giải phóng và aminoaxil-tARN chuyển đến bến A của riboxom trong đó anticodon của tARN phù hợp - bổ sung với codon của mARN nghĩa là đúng codon của axit amin được mã hoá (hình 1.5).

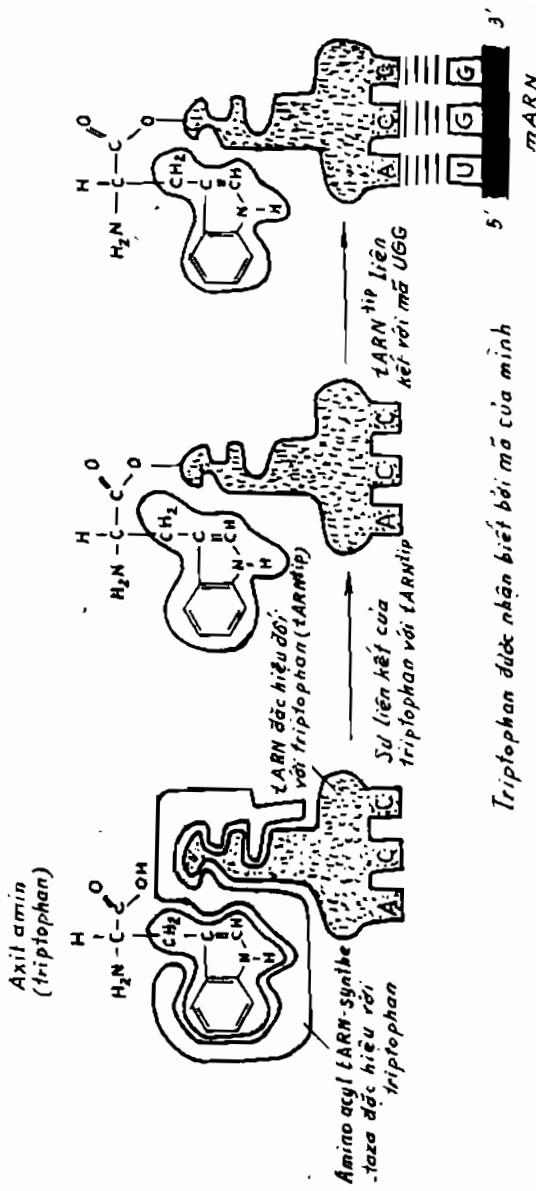
Vai trò của riboxom. Sự lắp ráp các axit amin để tạo thành mạch polypeptit được thực hiện trên riboxom gồm ba giai đoạn:

a. **Giai đoạn khởi đầu** bao gồm sự hình thành phức hệ khởi đầu do sự liên kết của mARN với đơn vị nhỏ 40S của riboxom (nhờ nhân tố F3 và ion Mg⁺) trong đó codon khởi đầu (codon AUG mã hoá cho methionin) được liên kết bổ sung với anticodon của methionin tARN. Đối với tế bào eucaryota thì codon khởi đầu là methionin còn đối với tế bào procaryota là N-formyl-methionin. Methionin tARN kết hợp anticodon UAG với codon AUG nhờ nhân tố F19, F2 và GTP và liên kết vào bến P của đơn vị nhỏ 60S của riboxom.

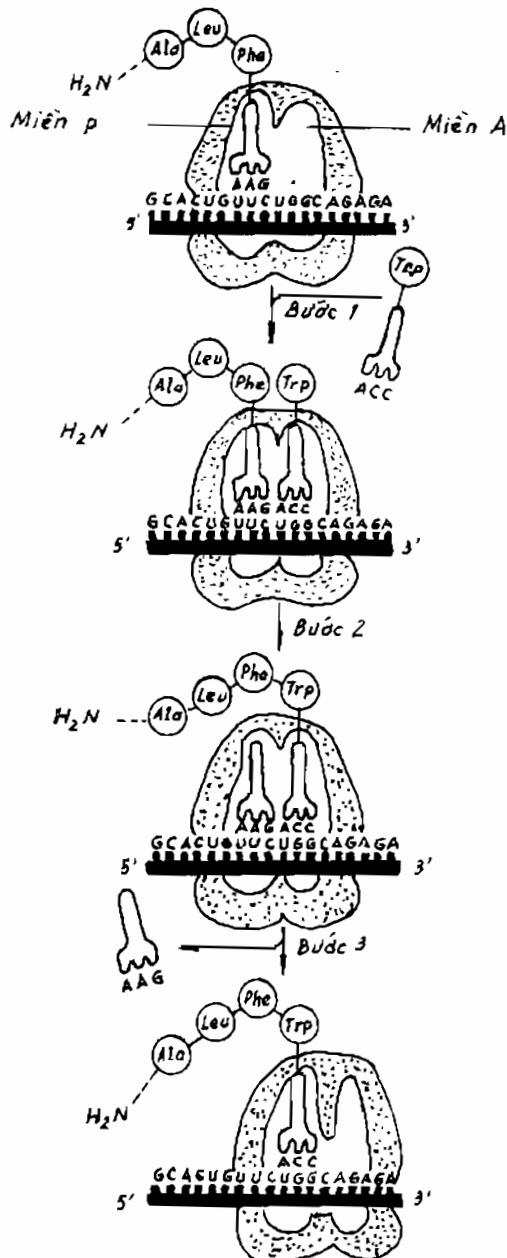
b.. **Giai đoạn kéo dài.** Trong tiến trình kéo dài sự lắp ghép các axit amin thành mạch polypeptit bao gồm sự hình thành liên kết peptit giữa các axit amin và sự chuyển dịch. Các aminoaxil-tARN lần lượt chuyên chở axit amin vào bến A trong đó anticodon của tARN phù hợp với codon tiếp theo của mARN- ví dụ codon tiếp theo AUG là GCA (codon của alanin) chẳng hạn thì alanin-tARN sẽ đến đậu ở bến A và anticodon CGU sẽ khớp với codon GCA. Sự liên kết này đòi hỏi phải có mặt các nhân tố của sự kéo dài là EF1 và GTP. Với sự xúc tác của enzym peptidyl-transferaza và sự có

mặt của ion K^+ , liên kết peptit giữa methionin - alanin được hình thành. Sau đó nhờ nhân tố EF2 và GTP tARN mạng methionin được giải phóng, đồng thời riboxom chuyển dịch theo sợi mARN với khoảng cách một codon và alanin - tARN được chuyển sang bến P, và aminoaxit-tARN tiếp theo vào đậu ở bến A ứng với codon của nó (hình 1.6). Sự hình thành liên kết peptit và chuyển dịch của riboxom xảy ra liên tục, các tARN được giải phóng và lại được quay vòng chuyên chở các axit amin tương ứng vào bến A và kết quả là kết thúc sự tạo thành mạch polypeptit.

c. Giai đoạn kết thúc. Giai đoạn này diễn ra khi riboxom dịch chuyển đến codon kết thúc dịch mã là UAA hoặc UAG hoặc UGA (đây là ba codon kết thúc dịch mã chung cho tất cả mARN). Mạch polypeptit được giải phóng nhờ nhân tố giải phóng RF và GTP, và riboxom phân giải thành hai đơn vị nhỏ, và phân tử mARN cũng được giải phóng nhưng có thể được dùng lại để tổng hợp những phân tử protein khác. Các protein mới được tổng hợp sẽ được kiến tạo thành các cấu



Hình 1.5. Sơ đồ quá trình dịch mã (theo Bruce Albert và ctv., 1994).



Hình 1.6. Quá trình tổng hợp protein trên riboxom (theo Bruce Albert và ctv., 1994).

trúc cấp II, cấp III v.v... là cấu trúc thù hình không gian đặc thù để thực hiện các chức năng của chúng trong tế bào. Trong pha G1 trong quá trình

biệt hoá các tế bào soma tổng hợp nhiều loại protein, nhiều enzym khác nhau đặc trưng cho loại tế bào soma đó, cũng như quy định đặc tính chức năng của chúng trong cơ thể đa bào.

2. Pha S

Pha S là pha tiếp theo pha G1 nếu tế bào vượt qua được điểm hạn định R. Trong pha G1 tế bào chuẩn bị điều kiện cho pha S, vào cuối pha G1 tế bào tổng hợp một loại protein đặc trưng là cyclin A và nhanh chóng tích luỹ trong nhân tế bào. Protein cyclin A cùng với kinaza sẽ xúc tiến sự tái bản ADN. Được gọi là pha S vì trong pha này chủ yếu xảy ra sự tổng hợp ADN và nhân đôi thể nhiễm sắc. Protein cyclin A (nhân tố hoạt hoá tổng hợp ADN) tác động cho tới cuối pha S thì biến mất.

Thời gian kéo dài của pha S tương đối cố định (từ 6 đến 8 giờ). Sự tổng hợp ADN mới có cấu trúc và đặc tính giống với ADN cũ nên được gọi là sự tái bản ADN (replication).

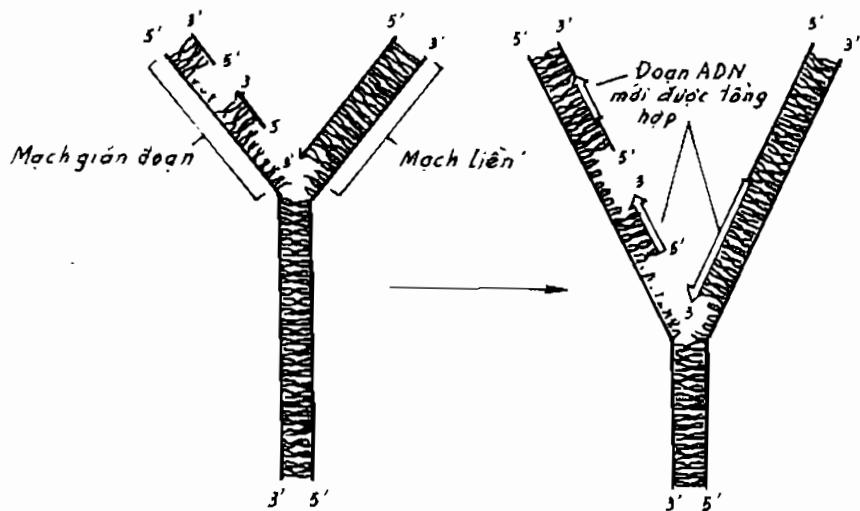
2.1. Đặc tính của sự tái bản ADN

Sự tái bản ADN bảo đảm tính chính xác của sự sao chép mã di truyền từ phân tử ADN mẹ sang các phân tử ADN con là nhờ các cơ chế đặc biệt:

a. Sự tái bản của ADN dựa trên nguyên tắc khuôn và bổ sung, nghĩa là mỗi mạch đơn ADN được dùng làm khuôn theo đó các deoxyribonucleotit (A, T, G, C) được lắp ráp theo nguyên tắc bổ sung (A lắp với T, C lắp với G và ngược lại) vì vậy sợi xoắn kép ADN con có trình tự sắp xếp các nucleotit giống như sợi ADN mẹ.

b. Sự tái bản ADN mang tính nửa bảo tồn nghĩa là sợi ADN con mang một mạch đơn ADN cũ (mạch khuôn) và một mạch đơn ADN mới (mạch mới được tổng hợp).

c. Sự tái bản ADN mang tính định hướng và diễn ra theo hai hướng ngược nhau, vừa liên tục vừa gián đoạn, nghĩa là sự tổng hợp mạch mới chỉ diễn ra theo hướng 3' - 5' (tức là từ đầu ba đến đầu năm của mạch khuôn) và vì lẽ rằng trong sợi kép ADN, hai mạch đơn ADN xoắn theo chiều ngược nhau nên sự tổng hợp diễn ra theo cả hai hướng ngược nhau (một mạch theo hướng 3' - 5', mạch kia theo hướng 5' - 3'). Trong hai mạch khuôn, thì một mạch được dùng để tổng hợp mạch mới một cách liên tục gọi là mạch dẫn đầu (leading strand) còn mạch kia tổng hợp gián đoạn gọi là mạch chậm (lagging strand) nghĩa là tổng hợp từng đoạn ADN ngắn và sau đó mới được khâu lại tạo thành mạch ADN hoàn chỉnh (hình 1.7).



Hình 1.7. Cấu trúc chạc tái bản. Hai phân tử ADN con được tổng hợp theo hướng từ đầu 5' đến đầu 3'. ADN được tổng hợp ở mạch gián đoạn tức nhiều đoạn ngắn (theo Bruce Albert và ctv., 1994).

2.2. Cơ chế và mô hình của sự tái bản ADN

Có nhiều loại protein và enzym tham gia vào quá trình tái bản ADN. Phức hệ replixom (replisome) là một phức hệ enzym gồm có:

- Enzym helicaza có tác động (phối hợp với một protein gây bất ổn định được gọi là SSB) mở xoắn và tách đôi sợi ADN kép.
- Primoxom (primosome) gồm enzym và một số protein có trách nhiệm tổng hợp các đoạn ARN mồi (ARN primer).
- Các enzym ADN-polymeraza I và III có vai trò trùng hợp các deoxyribonucleotit thành mạch ADN.
- Enzym ATPaza có vai trò thuỷ phân ATP.

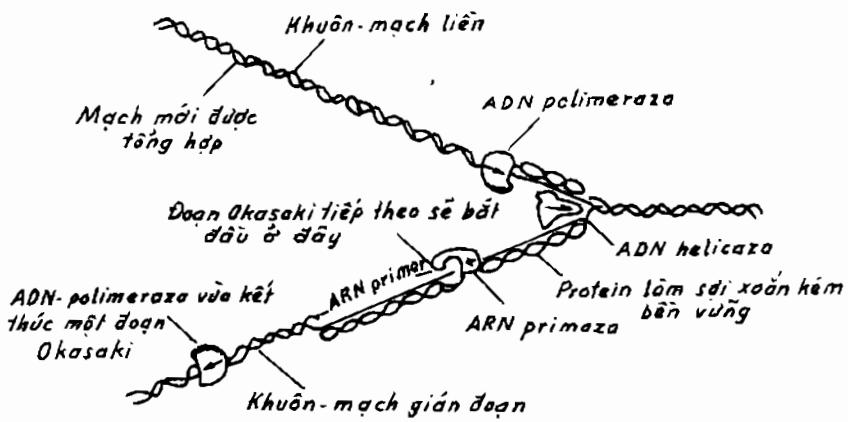
Enzym ADN-polymeraza II, Enzym topoisomeraza có tác dụng như enzym ligaza dùng để khâu các đoạn ADN lại với nhau. Các enzym ADN-polymeraza ngoài tác dụng trùng hợp - xúc tác tổng hợp mạch ADN mới, còn có hoạt tính enzym exonucleasea tức là cắt mạch ADN từ đầu tự do (trong lúc các endonucleasea lại cắt từ các điểm nằm bên trong sợi) và chúng có tác dụng sửa sai, phát hiện và cắt bỏ những bazơ kết cặp sai giúp cho quá trình tái bản được chính xác.

Sự tái bản bắt đầu từ điểm khởi đầu của đơn vị tái bản (replicon). Do sự mở xoắn và tách hai mạch nên ở điểm khởi đầu xuất hiện "con mắt tái bản" ở dạng vòng tròn gồm hai mạch đơn nối liền với sợi xoắn ở hai điểm gọi là điểm tăng trưởng hay điểm chẽ đôi, từ đây sợi kép sẽ tiếp tục mở xoắn và tách ra ở cả hai đầu. Ở điểm tách ra của hai mạch tạo nên cái chẽ ba (gồm hai mạch đơn nối với sợi kép) được gọi là chạc sao chép (replication fork) (hình 1.7). Sự lắp ráp các deoxyribonucleotit diễn ra trong chạc sao chép, dùng các mạch đơn ADN mẹ làm khuôn. Sự mở xoắn và tách hai mạch đơn là do enzym helicaza tác động, đồng thời các protein gây bất ổn định SSB (single - strand binding protein là protein bám mạch đơn) bám vào mạch đơn ngăn không cho chúng xoắn lại với nhau, để chúng có thể làm khuôn tổng hợp mạch mới. Sự xoắn và tách đôi hai mạch đòi hỏi cung cấp năng lượng từ ATP. ATP được thuỷ phân cho ra ADP và P, năng lượng nhờ enzym ATPaza của replixom.

Cứ mỗi lần ADN mở xoắn thì lại làm tăng thêm xoắn ở sợi kép tiếp theo ngay trước enzym helicaza. Sự tăng xoắn có thể dẫn tới làm đứt gãy ADN. Enzym topoisomeraza tác động như một nhân tố làm giãn xoắn bằng cách cắt các đoạn ADN quá xoắn để chúng giãn xoắn và khâu nối lại suốt trong tiến trình hoạt động của helicaza.

Các ADN polymeraza không có khả năng khởi đầu cho việc tổng hợp mạch ADN mới. Để khởi đầu cho việc tổng hợp ADN, đòi hỏi phải có một đoạn ARN mỗi gồm 10 ribonucleotit (ARN primer) (hình 1.8). Về sau đoạn mồi bị tiêu huỷ và sẽ bị ADN thế chỗ. Đoạn ARN mồi được tổng hợp nhờ enzym primaza (ARN - polymeraza phụ thuộc ADN) ngay từ khi khởi đầu tái bản - khi xuất hiện "con mắt tái bản". Vì lẽ rằng hai mạch ADN xếp song song ngược chiều cho nên tiến trình lắp ráp các mạch ADN từ hai mạch khuôn là không giống nhau. Mạch khuôn có hướng 3' - 5' sẽ được tổng hợp trước và liên tục, mạch ADN mới được hình thành có hướng 5' - 3', mạch này được gọi là mạch dẫn đầu. Đối với mạch ADN khuôn thứ hai có hướng 5' - 3' sẽ được diễn ra chậm hơn và diễn ra gián đoạn, nghĩa là tổng hợp từng đoạn ADN và sau đó được khâu nối lại. Mạch ADN mới này có hướng 3' - 5' được gọi là mạch gián đoạn (hình 1.8).

Tiến trình tổng hợp ADN mạch liên tục diễn ra ngay sau khi đoạn ARN mồi được tổng hợp (cùng trên khuôn của mạch ADN 3' - 5') có hướng 5' - 3', do đó ADN-polymeraza III nhận biết đầu 3'-OH của đoạn mồi, bắt đầu xúc tác lắp ráp các deoxyribonucleotit và tạo nên mạch ADN mới có hướng 5' - 3' bổ sung với mạch khuôn. Đoạn mồi bị tách bỏ và bị tiêu huỷ bởi exonucleaza.



Hình 1.8. Một số protein chính tham gia ở chạc tái bản (chạc sao chép) ADN
 (theo Bruce Albert và ctv., 1994).

Tiến trình tổng hợp ADN mạch gián đoạn diễn ra trên mạch ADN uốn thứ hai. Vì lẽ rằng mạch ADN khuôn thứ hai có hướng 5' - 3' nên sự

tổng hợp diễn ra gián đoạn và phức tạp hơn và chậm hơn so với mạch dẫn đầu. Nhờ xúc tác enzym ARN-polymeraza phụ thuộc ADN (một loại primaza) đoạn ARN mới thứ nhất được tổng hợp, enzym ADN - polymeraza III nhận biết đầu 3' - OH của ARN - mồi và bắt đầu tổng hợp một đoạn ADN (có khoảng 2000 nucleotit) được gọi là đoạn Okasaki (hình 1.8). Đoạn ARN mới thứ nhất bị thuỷ phân bởi ADN - polymeraza I (tác động như exonucleaza). Tiếp theo trên khuôn của ADN, đoạn ARN mới thứ hai được tổng hợp và tiếp theo đó ADN - polymeraza tổng hợp đoạn Okasaki thứ hai, đoạn mồi thứ hai bị cắt bỏ. Đoạn Okasaki thứ nhất được khâu nối với đoạn Okasaki thứ hai. Tiến trình cứ tiếp diễn như thế cho đến khi kết thúc sự tái bản - các đoạn Okasaki được khâu nối với nhau nhờ enzym ligaza thành mạch ADN liên tục.

Về cơ bản thì sự tái bản ADN ở eucaryota cũng giống với procaryota. Tuy nhiên ở eucaryota ADN liên kết với histon để tạo thành nucleoxom và tạo thành các sợi nhiễm sắc nhiều cấp phức tạp cho nên quá trình tái bản ADN diễn ra phức tạp hơn và có vài điểm khác biệt.

2.3. Các đơn vị tái bản

Đối với procaryota (sinh vật nhân sơ) chỉ tồn tại một điểm khởi đầu tái bản và quá trình tái bản diễn ra theo hai chiều ngược nhau xuất phát từ điểm đó. Như vậy ở procaryota chỉ là một đơn vị tái bản (replicon). Đối với tế bào eucaryota phân tử ADN vô cùng dài nếu chỉ là một đơn vị tái bản thì thời gian tái bản phải kéo dài tới 76 ngày, trên thực tế thời gian tái bản chỉ kéo dài 6-8 giờ (tốc độ tái bản ADN xảy ra ở mức độ 2 $\mu\text{m}/1\text{ phút}$). Điều đó nói lên rằng ở ADN của eucaryota tồn tại nhiều đơn vị tái bản. Mỗi replicon có chiều dài từ 40-400 μm . Mỗi replicon có điểm khởi đầu tái bản riêng của mình. Tiến trình tái bản trong từng replicon cũng diễn ra giống như ở procaryota nghĩa là theo nguyên tắc khuôn bô trợ, có định hướng theo hai chiều ngược nhau, liên tục và gián đoạn.

Khi tất cả các replicon đã tái bản, các replicon liên thông với nhau và khi đó hai sợi ADN được hình thành.

2.4. Nucleoxom và tiến trình tái bản

Sự tồn tại cấu trúc nucleoxom ở eucaryota làm cho tiến trình tái bản xảy ra chậm hơn và các đoạn Okasaki ngắn hơn. Trong tiến trình tái bản, phân tử ADN nối cuộn khỏi lõi histon, trong lúc đó histon octomer biến dạng thành hai tetramer. Các histon mới tổng hợp từ tế bào chất được chuyên chở vào nhân, tạo thành các octomer mới để cùng sợi kép ADN được

tổng hợp tạo thành các nucleoxom và từ đó tạo thành các sợi nhiễm sắc và thể nhiễm sắc con.

Qua pha S hàm lượng ADN được tăng gấp đôi và số lượng thể nhiễm sắc được tăng gấp đôi và qua quá trình phân bào sẽ chia đôi đồng đều cho hai tế bào con.

3. Pha G2

Tiếp theo pha S là pha G2, thời gian của G2 ngắn từ 4-5 giờ. Trong pha G2 các ARN và protein được tổng hợp chuẩn bị cho phân bào. Cuối pha G2 một protein được tổng hợp là cyclin B và được tích luỹ trong nhân cho đến tiền kỳ phân bào. Cyclin B hoạt hóa enzym kinaza và đóng vai trò quan trọng trong công việc thực hiện quá trình phân bào như sự tạo thành các vimentin để tạo thành khung phân bào.

II. PHÂN BÀO

1. Các dạng phân bào

Tiếp theo pha G2 là thời kỳ tế bào mẹ phân chia thành hai tế bào con. Sự phân bào là phương thức sinh sản của tế bào, đồng thời là phương thức qua đó tế bào mẹ truyền thông tin di truyền chứa trong ADN (đã được nhân đôi qua pha S) cho hai tế bào con. Sự phân bào cùng với sự tổng hợp các chất nội bào và gian bào là cơ sở của sự tăng trưởng của các mô, các cơ quan và cơ thể đa bào. Người ta phân biệt ba dạng phân bào sau đối với tế bào soma:

1.1 Trực phân

Dạng phân bào này đặc trưng cho các tế bào đã biệt hóa cao, các tế bào bệnh lý, các tế bào bị tác hại đang di vào quá trình thoái hóa.

Trong trực phân (mitosis), nhân được phân đôi một cách đơn giản không xuất hiện thể nhiễm sắc cũng như khung phân bào (vì vậy còn được gọi là phân bào không tơ (amitosis); nhiều khi nhân phân thành hai nửa không đều nhau, hoặc phân thành nhiều mảnh, mọc chồi (trực phân bệnh lý hoặc bị tác hại). Tế bào chất có thể được phân đôi cùng với nhân hoặc không phân chia tạo thành tế bào hai nhân hoặc đa nhân (ví dụ tế bào gan).

1.2. Nội phân

Nội phân (endomitosis) là một dạng biến đổi của mitosis, trong đó thể

nhiễm sắc được nhân đôi nhưng không phân chia về các tế bào con mà ở lại trong tế bào, do đó tạo thành tế bào đa bội (polyploide) có số thể nhiễm sắc tăng cao nhiều lần. Trong trường hợp các sợi nhiễm sắc được nhân đôi nhiều lần (do nhân đôi của ADN) nhưng số lượng thể nhiễm sắc không đổi sẽ dẫn đến hiện tượng đa sợi (politenisation) và thể nhiễm sắc đa sợi (politen chromosome).

1.3. Phân bào nguyên nhiễm

Phân bào nguyên nhiễm còn gọi là gián phân hoặc phân bào có tơ (mitosis), là dạng phân bào chuẩn, phổ biến cho tất cả các dạng tế bào soma, qua đó các tế bào có nguyên bộ thể nhiễm sắc như tế bào mẹ ($2n$).

Đặc điểm của phân bào nguyên nhiễm. Phân bào nguyên nhiễm là dạng phân bào phổ biến ở eucaryota. Kết quả của phân bào hình thành hai tế bào con có chứa số lượng thể nhiễm sắc giữ nguyên như tế bào mẹ (cho nên có tên là phân bào nguyên nhiễm); Xuất hiện thể nhiễm sắc và phân chia thể nhiễm sắc về hai tế bào con; Xuất hiện trong tế bào chất bộ máy phân bào tức là thoi phân bào có vai trò hướng dẫn các thể nhiễm sắc con di chuyển về hai cực tế bào. Trong tiến trình phân bào màng nhân và hạch nhân biến mất và lại được tái tạo ở hai tế bào con.

2. Các kỳ của phân bào

Quá trình phân bào diễn ra theo sáu kỳ liên tiếp nhau bắt đầu thời gian tiếp theo pha G2 của gian kỳ và kết thúc khi hình thành hai tế bào con.

Sự phân nhân (caryokinesis) là tiến trình phân đôi của nhân bao gồm năm kỳ là **tiền kỳ, tiền trung kỳ, trung kỳ, hậu kỳ và mạt kỳ**. Còn sự phân tế bào chất (cytokinesis) là tiến trình phân đôi tế bào chất, là kỳ cuối cùng - kỳ phân tế bào chất.

Trong thực tế, trong tế bào sống rất khó phân biệt giới hạn chuyển tiếp giữa các kỳ. Mỗi kỳ được đặc trưng bởi cấu trúc, tập tính của thể nhiễm sắc, bộ máy phân bào, màng nhân, v.v... (hình 1.9a và b).

2.1. Tiền kỳ

Tiền kỳ (prophase) được tiếp theo sau pha G2 của gian kỳ. Rất khó phân biệt một cách chính xác điểm chuyển tiếp này, các hiện tượng đặc trưng cho tiền kỳ là:

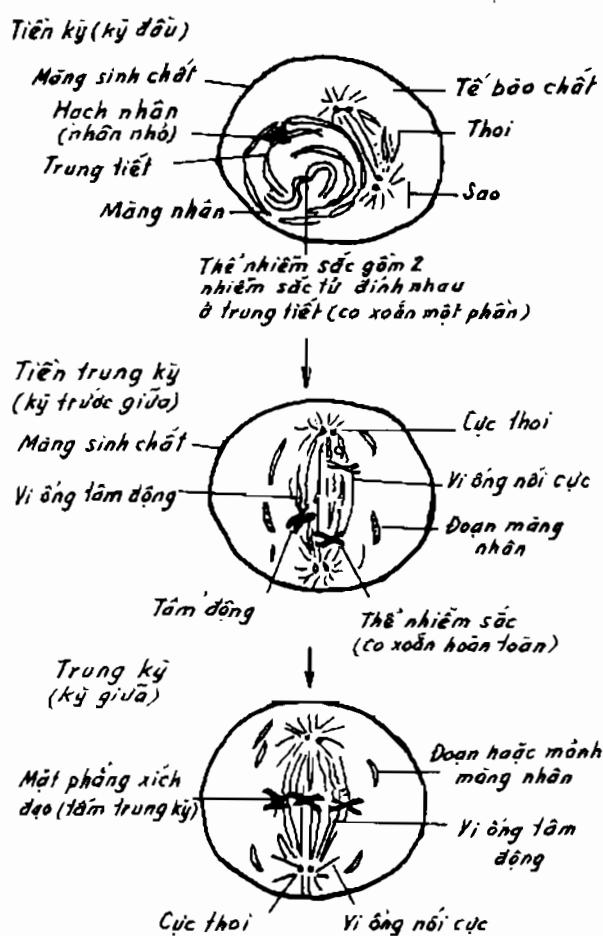
2.1.1. Hình thành thể nhiễm sắc. Chất nhiễm sắc ở gian kỳ bao gồm

các sợi nhiễm sắc đã được nhân đôi qua pha S, trở nên xoắn và cô đặc lại, hình thành các thể nhiễm sắc thấy rõ dưới kính hiển vi thường, mà số lượng, hình thái là đặc trưng cho loài. Mỗi một thể nhiễm sắc gồm hai nhiễm sắc tử chị em (sister chromatid) được dính với nhau bởi một vùng được gọi là trung tiết (centromere). Hai nhiễm sắc tử chị em trong một thể nhiễm sắc chứng tỏ rằng thể nhiễm sắc đã được nhân đôi qua pha S.

2.1.2. Màng nhân và hạch nhân có nhiều thay đổi.

Hạch nhân giảm thể tích, phân rã và biến mất. Màng nhân đứt ra thành nhiều đoạn và biến thành các bóng không bào bé phân tán trong tế bào chất.

2.1.3. Hình thành bộ máy phân bào. Như ta đã biết da số tế bào động vật có trung thể gồm hai trung tử (centriole) và vùng quanh trung tử (pericentriole), qua pha S trung tử được nhân đôi tạo thành hai đôi trung tử con. Mỗi đôi trung tử con trở thành trung thể mới. Do sự hoạt hoá của chất quanh trung tử các đơn hợp tubulin trong tế bào chất trùng hợp hoá



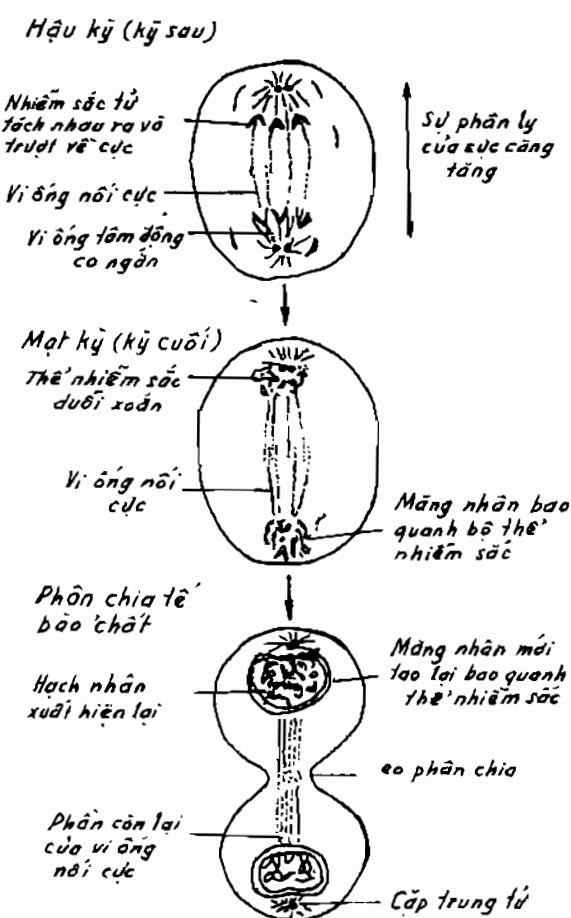
Hình 1.9a. Phân bào nguyên nhiễm (theo Bruce Albert và ctv., 1994).

thành các vi ống tubulin. Các vi ống xếp phỏng xà quanh trung tử mới tạo thành sao phân bào (aster). Hai sao di chuyển về hai cực tế bào. Giữa hai sao các vi ống phát triển sắp xếp thành hệ thống ống có dạng hình thoi được gọi là thoi phân bào. Cấu tạo nên thoi có hai dạng vi ống chạy từ sao của cực này đến cực kia. Các vi ống cực (hay sợi cực) chạy liên tục từ cực này đến cực kia, còn các vi ống tâm động (hay sợi tâm động) là các sợi nối với tâm động của thể nhiễm sắc ở vùng xích đạo của tế bào. Đến cuối tiền kỳ khi màng nhân biến mất thì bộ máy thoi có hai sao đã được hình thành.

Như ta đã biết, ở tế bào thực vật bậc cao không quan sát thấy trung tử, nhưng ở vùng cạnh nhân vẫn có vùng đậm đặc tương tự vùng quanh trung tử và vai trò của chúng là hoạt hóa sự trùng hợp tubulin để tạo thành thoi phân bào ở tế bào thực vật (vì vậy được gọi là phân bào không sao) (hình 1.10)

2.2. Trung kỳ sớm

Trung kỳ sớm (prometaphase) bắt đầu khi màng nhân tiêu biến thành

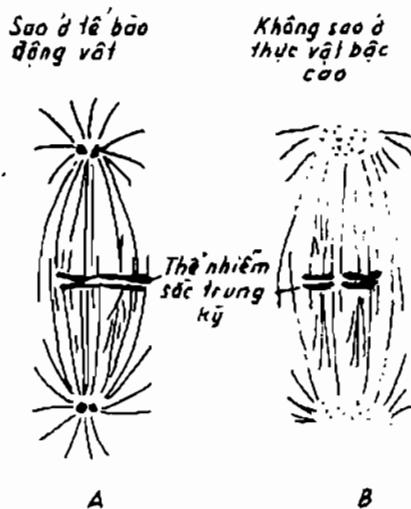


Hình 1.9b

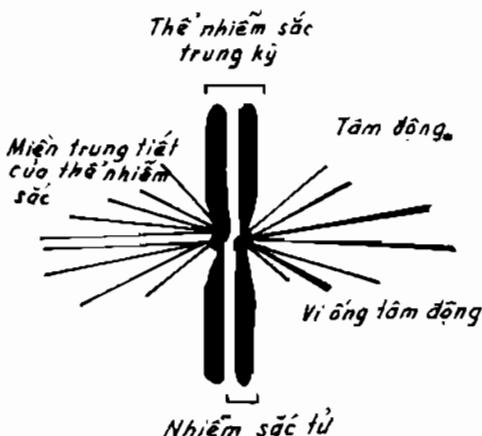
các bóng nhỏ phân tán trong tế bào chất quanh thoi phân bào. Thoi phân bào hình thành lúc đầu ở vùng cạnh màng nhân, khi màng nhân biến mất thì nó di chuyển chiếm ngay vị trí trung tâm. Các thể nhiễm sắc mang trung tiết (centromere) là nơi đính hai nhiễm sắc tử. Trung tiết phân hoá thành hai cấu trúc được gọi là tâm động (kinetochore) kẹp lấy trung tiết có kích thước khoảng 1 μm . Qua tâm động thể nhiễm sắc được đính với các sợi tâm động của thoi. Như vậy thể nhiễm sắc được xếp nằm thẳng góc với các sợi tâm động của thoi còn tâm động có vị trí đối mặt với hai sao ở hai cực, mỗi phía có một tâm động (hình 1.11).

2.3. Trung kỳ

Thể nhiễm sắc ở trung kỳ (metaphase) xoắn, cô đặc và co ngắn tối đa. Mỗi thể nhiễm sắc đính với sợi tâm động qua tâm động, và do tác động của các sợi tâm động các thể nhiễm sắc sắp xếp cùng trên một mặt phẳng xích đạo tạo nên cái gọi là tâm trung kỳ. Tâm trung kỳ nằm thẳng góc với trục dọc của thoi. Hai tâm động đính với các sợi tâm động ở cả hai phía đối mặt với sao. Ngoài các sợi tâm động là sợi đính tâm động ở mặt phẳng xích đạo, và kéo dài tới vùng quanh sao nhưng không đính với trung tử, thì thoi còn có các sợi cực - sợi cực của thoi không đính với tâm



Hình 1.10. Thoi trung kỳ có sao (A) và không sao (B).



Hình 1.11. Thể nhiễm sắc trung kỳ và các vi ống tâm động (theo Bruce Albert và ctv., 1994).

động, sợi cực có hai loại: một loại liên tục chạy từ cực này đến cực kia, một loại chỉ chạy từ cực đến miền xích đạo.

2.4. Hậu kỳ

Đặc điểm của hậu kỳ (anaphase) là sự tách đôi của hai nhiễm sắc tử chị em khỏi nhau và trở thành thể nhiễm sắc con độc lập. Mỗi thể nhiễm sắc con mang một tâm động riêng đính với sợi tâm động phía đối mặt với sao. Tất cả các thể nhiễm sắc con cùng tách khỏi nhau và cùng thời gian di chuyển về hai cực nhờ sự co ngắn của sợi tâm động (do sự giải trùng hợp của vi ống tubulin) phối hợp với sự kéo dài của các sợi cực và hẹp lại của thoι. Người ta đã tính được tốc độ di chuyển về cực của thể nhiễm sắc khoảng 1 µm trong 1 phút.

2.5. Mạt kỳ

Trong mạt kỳ (telophase) các thể nhiễm sắc con đã di chuyển tới hai cực, giãn xoắn, dài ra và biến dạng trở thành chất nhiễm sắc. Thoi phân bào biến mất, đồng thời hình thành màng nhân bao quanh chất nhiễm sắc. Hạch nhân được tái tạo hình thành hai nhân con trong khố tế bào chung.

2.6. Phân tế bào chất

Sự phân tế bào chất (cytokinesis) được bắt đầu từ cuối hậu kỳ hoặc đầu mạt kỳ và diễn ra suốt mạt kỳ. Ở tế bào động vật, sự phân tế bào chất được bắt đầu bởi sự hình thành một eo thắt ở vùng xích đạo ở vùng giữa hai nhân con. Sự hình thành eo thắt và lõm sâu của eo tiến tới cắt đôi tế bào chất là do sự hình thành một vòng co rút ở vùng xích đạo được cấu tạo vi sợi actin. Khi vòng sợi actin co rút kéo theo phần màng sinh chất lõm thắt vào trung tâm và khi màng nối với nhau sẽ phân tách tế bào chất thành hai nửa, mỗi nửa chứa một nhân con. Một phẳng phân cắt tế bào chất thẳng góc với trục của thoï phân bào.

Đối với tế bào thực vật được bao bởi lớp vỏ xenluloza làm cho tế bào không vận động được nên sự phân tế bào chất xảy ra khác với tế bào động vật. Sự phân tế bào chất ở tế bào thực vật được bắt đầu bằng sự xuất hiện một vách ngang ở vùng trung tâm xích đạo, vách ngang phát triển dần ra ngoại vi cho đến khi liên kết với vách bao tế bào và như vậy phân tách tế bào chất thành hai nửa chứa nhân con. Trên vách ngang phân tách hai tế bào con phát triển hệ thống cầu nối tế bào chất tạo thành cầu trúc plasmodesma đặc trưng cho tế bào thực vật. Tham gia vào sự tạo thành

vách ngang có phức hệ Golgi, mạng lưới nội chất và vi ống cực của thoi còn tồn dư lại ở vùng xích đạo.

Ở hậu kỳ, các bào quan như ty thể, lục lạp, mạng lưới nội chất v.v... được phân về hai tế bào con. Nói chung, trong thời kỳ phân bào các hoạt động tổng hợp chất, hoạt động sinh lý của tế bào bị đình chỉ hoặc giảm bớt nhằm phục vụ cho sự phân bào.

3. Thời gian của các kỳ và sự điều chỉnh phân bào

Ở trong cơ thể đa bào, trong các chủng quần tế bào đổi mới, nghĩa là các chủng quần mà ở đó các tế bào luôn được đổi mới nhờ tế bào duy trì một nhịp điệu phân bào ổn định. Bình thường đối với động vật có vú chu kỳ tế bào kéo dài từ 10 giờ đến 20 giờ thì thời gian phân bào có thể kéo dài từ 1 giờ đến 2 giờ. Tuy nhiên thời gian của M không phụ thuộc vào thời gian của chu kỳ. Thời gian của chu kỳ có thể dài hơn nhiều nhưng thời gian của M tương đối ổn định.

Tiền kỳ thường kéo dài từ 10 đến 15 phút, trung kỳ sớm và trung kỳ kéo dài từ 25 đến 35 phút. Thời gian của hậu kỳ là ngắn nhất chỉ kéo dài từ 5 đến 8 phút, còn mạt kỳ diễn ra trong khoảng 20 đến 25 phút.

Để xác định nhịp điệu phân bào của một chủng quần tế bào, người ta xác định chỉ số phân bào hay chỉ số mitos (mitotic index). Chỉ số mitos được tính bằng số phần nghìn của số tế bào đang phân bào (tổng cộng số tế bào ở các kỳ phân bào) trên 1000 tế bào quan sát được với kính hiển vi thường.

Thật ra để tính toán xác định được thời gian của các pha trong chu kỳ tế bào không phải là một việc đơn giản. Với phương pháp đánh dấu phóng xạ và máy phân tích huỳnh quang tự động, người ta đã xác định được tương đối thời gian của các pha trong chu kỳ tế bào ở một số chủng quần tế bào được nghiên cứu, đặc biệt là ở động vật có vú mà ta đã nêu ở các phần trên đây. Chắc chắn rằng ở các dạng tế bào biệt hóa khác nhau, ở các chủng quần tế bào khác nhau, dưới ảnh hưởng của các nhân tố điều chỉnh khác nhau, chu kỳ sống và nhịp điệu phân bào của chúng biến đổi rất linh hoạt, rất khác nhau.

Khi đề cập đến các nhân tố kiểm tra sự phân bào, người ta thấy một nhân tố quyết định là tế bào phải trải qua pha S nghĩa là ADN và thể nhiễm sắc phải được nhân đôi : như ta đã biết ở phần trên, tế bào ở pha G1 muốn vào pha S phải vượt qua điểm R ở cuối pha G1. Điều này tuỳ thuộc vào ~~nhóm~~ độ của một loại protein đặc trưng được gọi là protein cò hay U-protein (unstable protein). Thông qua cường độ tổng hợp và tích luỹ U-

protein mà tế bào có thể dừng lại hoặc vượt qua điểm R để đi vào pha S, pha G2 và phân bào. Cường độ tổng hợp protein nói chung trong pha G1 (sự sinh trưởng) dẫn đến làm mất cân bằng tỷ lệ khôi lượng nhân tế bào chất cũng là nguyên nhân dẫn đến phân bào.

Vượt qua pha G2 cũng là điều kiện cần cho sự phân bào vì trong pha G2 tế bào tổng hợp các protein cần thiết cho sự phân bào, đặc biệt sự trùng hợp hoá các tubulin để tạo thành vi ống. Chất ức chế trung kỳ colchicin ức chế sự trùng hợp các vi ống do đó ức chế sự tạo thoi phân bào và tế bào dừng lại ở trung kỳ. Sự chuyển tiếp từ pha G2 vào pha M còn tuỳ thuộc vào một protein đặc trưng được gọi là cyclin B, có tác dụng hoạt hoá một kinaza tạo điều kiện cho việc hình thành thoi và sự tiêu biến màng nhân.

Người ta đã phát hiện nhiều nhân tố ức chế sự phân bào, đó có thể là hoá chất hoặc các bức xạ có tác động trực tiếp hoặc gián tiếp lên sự phân bào; có thể tác động lên sự tái bản ADN, lên sự tạo thành thoi, lên thể nhiễm sắc hoặc lên sự phân tế bào chất. Các chất kháng sinh, ví dụ actinomycin D, daunomycin, nogalomycin có tác dụng liên kết với ADN do đó ức chế sự tổng hợp ADN. Các chất cycloheximid, puromycin ức chế sự tổng hợp protein bằng cách tác động lên riboxom. Streptomycin ức chế tế bào ở pha G2. Các chất chống chuyển hoá (antimetabolite) chất alkylant, các thuốc nhuộm đều có tác động ức chế hoặc làm sai lệch sự tái bản ADN dẫn đến ức chế phân bào.

Các chất có nguồn gốc thực vật như colchicin, colcemid, podophylin, vinblastin v.v... đều có tác dụng ức chế sự tạo thành thoi phân bào, tế bào dừng lại ở trung kỳ và tạo thành các nhân đa bội. Nhiều chất có tác động lên thể nhiễm sắc làm đứt gãy thể nhiễm sắc hoặc phân ly không chính xác về hai cực, ví dụ các chất yperit, các bức xạ ion hoá v.v... Lithium, cysteamin, cytochalasin ức chế sự phân tế bào chất dẫn đến tạo thành tế bào đa nhân.

Trong cơ thể đa bào tồn tại nhiều chủng quần tế bào soma, mỗi chủng quần được đặc trưng bởi nhịp điệu sinh trưởng và phân bào ổn định, được kiểm soát bởi mối tương quan giữa các tế bào, các mô và cơ thể. Sự ức chế tiếp xúc hay ức chế bề mặt dẫn đến sự kìm hãm quá trình phân bào. Bình thường tế bào gan không phân bào nhưng gan khi bị cắt bỏ một phần thì ở phần bị cắt bỏ các tế bào gan sẽ phân bào tích cực để bù đắp lại phần cắt bỏ. Có thể là các tế bào chết đã tiết ra một chất có tác động kích thích sự phân bào, và sự phân bào diễn ra cho đến khi khôi lượng gan đạt tới khôi lượng nhất định thì dừng lại. Đó cũng là kiểu điều chỉnh theo cơ chế "liên

hệ ngược". Sự ung thư hoá là sự trục trặc trong cơ chế điều chỉnh phân bào, các tế bào khi bị mất sự ức chế phân bào sẽ phân bào tự do không chịu sự kiểm soát chung và di căn trở thành có hại cho cơ thể.

C. SỰ BIỆT HOÁ CỦA TẾ BÀO SOMA

Quá trình phát triển phôi và hình thành các mô, các cơ quan bao gồm hai quá trình chủ yếu là sự phân bào mitos và biệt hoá tế bào. Sự phân bào mitos bảo đảm cho tất cả tế bào của một chủng quần cũng như toàn bộ cơ thể có bộ nhiễm sắc thể ổn định $2n$, xảy ra trong giai đoạn M của chu kỳ tế bào. Trong cơ thể đã trưởng thành, các tế bào soma vẫn phân bào mitos trong các chủng quần đổi mới như biểu mô nền của da, biểu mô ruột, các tế bào nguồn tuỷ đốt xương. Trong các chủng quần ổn định (ví dụ gan) các tế bào soma không phân bào nhưng khi có nhân tố kích thích chúng vẫn có khả năng phân bào mitos (khi hàn gắn vết thương). Đối với thực vật, các tế bào và mô soma có thể phân bào và tái biệt hoá thành cây trưởng thành theo kiểu sinh sản sinh dưỡng.

Sự biệt hoá tế bào là quá trình tạo thành các tế bào biệt hoá khác nhau về hình thái và chức năng - tức là tạo thành các tế bào của các mô và cơ quan khác nhau. Trong quá trình phát triển phôi ở động vật, sự biệt hoá thấy rõ nhất khi tạo thành ba lá phôi: lá phôi ngoài (ngoại phôi bì), lá phôi trong (nội phôi bì) và lá phôi giữa (trung phôi bì) và từ ba lá phôi các tế bào sẽ biệt hoá tạo thành các mô khác nhau. Sự sinh trưởng và biệt hoá xảy ra trong giai đoạn G₁ của chu kỳ sống của tế bào.

I. SỰ BIỆT HOÁ VỀ HÌNH THÁI VÀ CHỨC NĂNG

Các tế bào soma khác biệt nhau về hình thái và chức năng. Có khoảng 200 dạng tế bào soma tập hợp thành 20 dạng mô khác nhau trong cơ thể người. Ví dụ: tế bào hồng cầu không nhân có dạng cầu lõm hai mặt có chức năng chuyên chở O₂ và CO₂; tế bào biểu mô ruột có dạng hình khói trụ có nhiều vỉ nhung mao có chức năng hấp thụ chất dinh dưỡng; bạch cầu có dạng cầu có chân giả có khả năng thực bào; tế bào cơ có dạng hình thoi chứa nhiều tơ cơ có khả năng co rút; tế bào thần kinh có dạng hình sao có nhiều sợi dài có chức năng dẫn truyền xung động.

II. SỰ BIỆT HOÁ VỀ HOÁ SINH

Các tế bào soma khác nhau về mặt hoá sinh chúng tổng hợp các protein đặc thù cho mình, ví dụ hồng cầu chứa hemoglobin, tế bào biểu mô da chứa keratin, tế bào cơ chứa myoglobin, actin và miozin, tế bào thần kinh chứa các chất trung gian thần kinh v.v. Chỉ có tế bào α và β của đảo tuy tổng hợp insulin và glicagon, và chỉ có tế bào tuyến giáp tổng hợp thyroxin.

III. SỰ BIỆT HOÁ TRONG HOẠT ĐỘNG CỦA HỆ GEN

Hoạt động của gen thể hiện ở ba quá trình:

a) Tự tái bản ADN và nhân đôi thể nhiễm sắc ở giai đoạn S của chu trình tế bào - đó là cơ sở cho sự phân bào - phương thức truyền thông tin di truyền qua các thế hệ.

b) Phiên mã các ARN (*m*ARN, *r*ARN và *t*ARN).

c) Dịch mã - sự tổng hợp protein theo khuôn mẫu *m*ARN trên riboxom và lắp ráp axit amin nhờ *t*ARN.

Sự phiên mã và dịch mã xảy ra trong giai đoạn G1 khi tế bào di vào tiến trình biệt hoá - tức là tổng hợp các protein đặc thù để tạo thành các tổ hợp trên phân tử - các siêu cấu trúc đặc thù cho hình thái và chức năng của tế bào biệt hoá.

Sự phiên mã và dịch mã xảy ra theo thời gian và không gian (vị trí của các phần của phôi) của quá trình phát triển cá thể, nghĩa là các gen và hệ gen hoạt động đóng hay mở theo một cơ chế điều hoà ở nhiều cấp độ. Như vậy vấn đề biệt hoá trong hoạt động của hệ gen là vấn đề điều hoà hoạt động của gen (xem phần sau).

D. THỂ NHIỄM SẮC CỦA TẾ BÀO SOMA

I. HÌNH DẠNG, KÍCH THƯỚC, SỐ LƯỢNG

Thể nhiễm sắc quan sát được ở trung kỳ thường có dạng hình chấm hoặc hình que và thường có kích thước vào khoảng 0,2 đến 3 µm đường

kính và 0,2 đến 50 μm chiều dài. Ví dụ thể nhiễm sắc ở người, cái bé nhất là thể nhiễm sắc số 21 và 22 có kích thước $L = 1,5 \mu\text{m}$; còn chiếc lớn nhất là thể nhiễm sắc số 1 có $L = 10 \mu\text{m}$. Về kích thước thì ở các tế bào khác nhau là không giống nhau, nhưng chúng đặc trưng cho các tế bào và cá thể của cùng một loài. Tuy nhiên có trường hợp trong các mô khác nhau của cùng một cơ thể có sự biến đổi về hình dạng kích thước thể nhiễm sắc để thích nghi với chức năng của một giai đoạn phát triển. Ví dụ trong tế bào của mô tuyến nước bọt áu trùng bợn hai cánh như ruồi quả chằng hạn (*Drosophila*), người ta quan sát thấy các thể nhiễm sắc khổng lồ có kích thước đạt tới $l = 300 \mu\text{m}$ và $d = 20 \mu\text{m}$ nghĩa là lớn gấp hàng chục lần so với thể nhiễm sắc bình thường có ở các mô khác của cơ thể ruồi (hình 1.12).

Về số lượng thể nhiễm sắc thì đó là một chỉ tiêu đặc trưng cho loài và bộ thể nhiễm sắc.

Theo qui luật chung, mỗi một cá thể trong cùng một loài có số lượng thể nhiễm sắc đặc trưng cho loài đó.

Ví dụ:

Người (*Homo sapiens*) $2n = 46$

Khỉ Gori (*Gorilla gorilla*) $2n = 48$

Khỉ Maca (*Macaca rhesus*) $2n = 42$

Ếch (*Rana sp*) $2n = 26$

Ruồi quả (*Drosophila melanogaster*) $2n = 8$

Cà chua (*Lycopersicum solanum*) $2n = 24$

Lúa mì mềm (*Triticum vulgare*) $2n = 42$

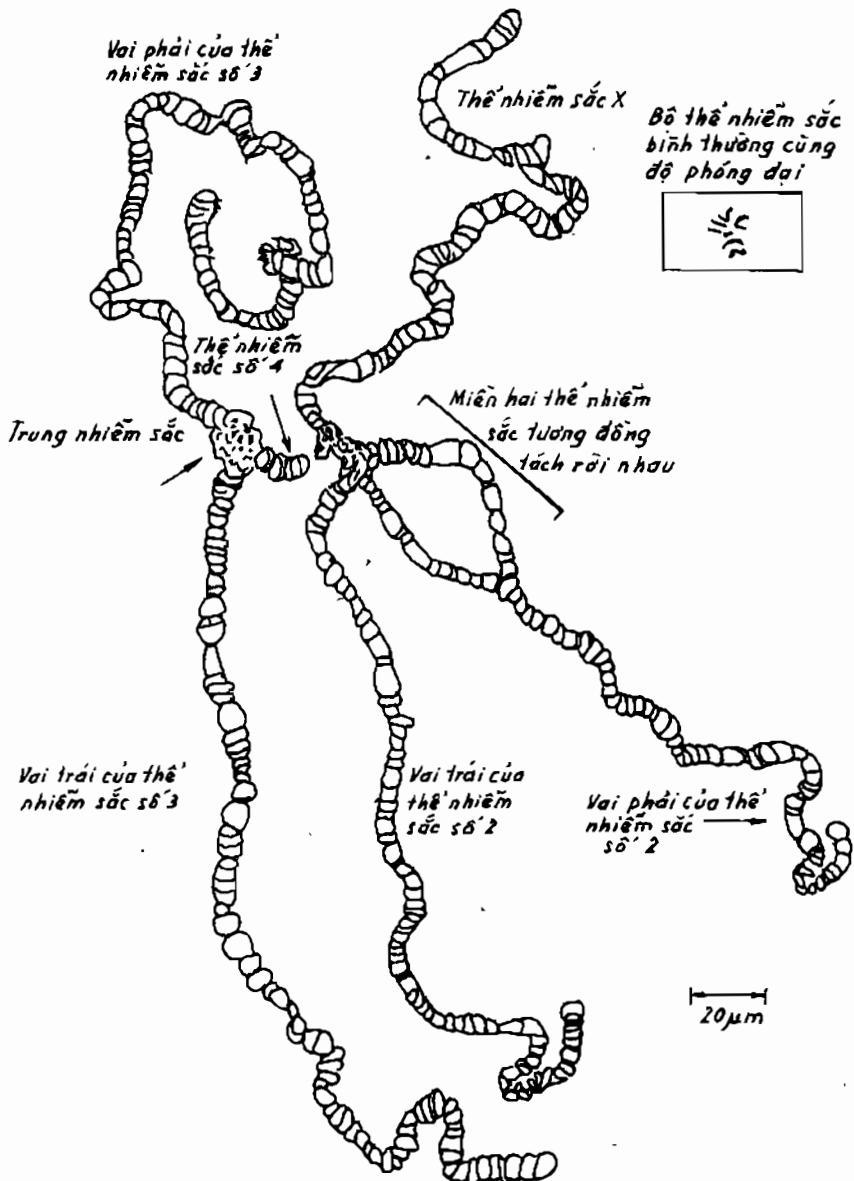
Đậu (*Pisum sativum*) $2n = 14$

Ngô (*Zea mays*) $2n = 20$

Tuy nhiên, ta không thể máy móc dựa vào số lượng thể nhiễm sắc để đánh giá mức độ tiến hoá các loài, vì lẽ rằng các cơ thể ở mức độ tiến hoá cao nhất lại có số lượng thể nhiễm sắc ít hơn (ví dụ: người có 46 thể nhiễm sắc, trong đó số lượng thể nhiễm sắc ở khỉ Gori là 48 và gà có đến 78 thể nhiễm sắc) cũng giống như hàm lượng ADN tuy có tính ổn định loài nhưng chưa thể hiện tính logic của bậc thang tiến hoá, vấn đề là cần phải xem xét mức độ tổ chức và hoạt động của hệ gen trong ADN và trong thể nhiễm sắc.

Số lượng thể nhiễm sắc còn đặc trưng cho bộ thể nhiễm sắc. Người ta phân biệt:

- **Bộ đơn bội (haploid)** ký hiệu là n đặc trưng cho các tế bào, cơ thể đơn bội cũng như các tế bào sinh dục chín (các giao tử) ở cơ thể sinh sản hữu tính. Ví dụ ở người, tinh trùng và tế bào trứng có $n = 23$ thể nhiễm sắc.



Hình 1.12. Sơ đồ chi tiết bộ thể nhiễm sắc khổng lồ ở tuyến nước bọt *Drosophila* (theo Bruce Albert và ctv., 1994).

- **Bộ lưỡng bội (diploid)** ký hiệu $2n$ đặc trưng cho các tế bào và cơ thể lưỡng bội. Trong cơ thể sinh sản hữu tính các tế bào soma có chứa $2n$ thê

nhiễm sắc. Ví dụ ở người $2n = 46$ là tập hợp 23 thể nhiễm sắc của tinh trùng và 23 thể nhiễm sắc của tế bào trứng sau thụ tinh tạo thành hợp tử có $2n = 46$. Như vậy trong cơ thể lưỡng bội, thể nhiễm sắc tồn tại thành cặp (một từ bố và một từ mẹ) được gọi là cặp thể nhiễm sắc tương đồng, cặp được hình thành lúc thụ tinh ($2n$) và phân ly lúc phân bào giảm nhiễm (n).

- **Bộ đa bội (polyploid)**, đặc trưng cho tế bào và cơ thể đa bội. Số thể nhiễm sắc được tăng lên theo bội số của n . Ví dụ tam bội $3n$ (triploid), tứ bội $4n$ (tetraploid).

Nhiều trường hợp các loài trong một giống (genus) có số thể nhiễm sắc tạo thành dãy đa bội, và người ta phân biệt số đơn bội khởi nguyên là X từ đó hình thành các dạng đa bội. Ví dụ: ở lúa mì (*Triticum*) có dãy đa bội là:

Triticum monococcum $2n = 14$ ($n = 7$)

Triticum dicoccum $2n = 28$ ($n = 14$)

Triticum vulgare $2n = 42$ ($n = 21$)

Trong đó số đơn bội xuất phát $x = 7$

Hiện tượng đa bội thường thấy ở thực vật, còn ở động vật ít có trường hợp đa bội. Ở ếch, người ta quan sát thấy có trường hợp bát bội $8n = 104$ thể nhiễm sắc. Ở động vật có vú, trường hợp đa bội quan sát thấy ở chuột đồng (*Cricetus cricetus*). Nói chung, ở động vật bậc cao, tế bào hoặc mô đa bội thể hiện tính trạng bệnh lý.

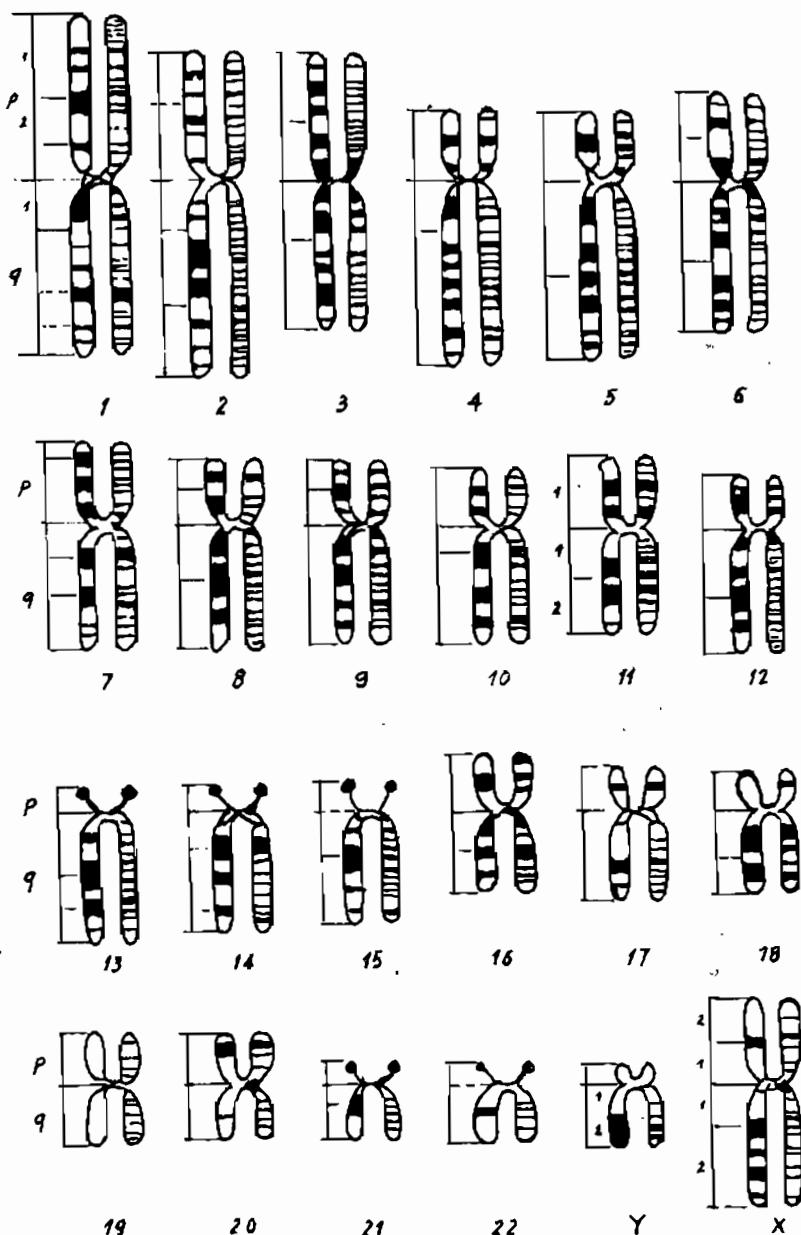
Người ta quan sát thấy chu kỳ xoắn của thể nhiễm sắc thay đổi qua chu kỳ tế bào. Ở gian kỳ các sợi nhiễm sắc ở trạng thái mở xoắn ở nhiều mức độ khác nhau và tồn tại ở dạng chất nhiễm sắc. Ở tiền kỳ của mitos các sợi nhiễm sắc trở nên xoắn hơn, do đó bị đông đặc và co ngắn lại, đến trung kỳ thấy rõ nhất và ở trạng thái xoắn tối đa (so với đầu tiền kỳ độ co ngắn gấp 2,5 lần) và đến met kỳ sẽ được giãn xoắn để bước vào gian kỳ của tế bào con ở trạng thái các sợi chất nhiễm sắc mở xoắn - trạng thái chất nhiễm sắc. Sự giãn xoắn hoặc xoắn lại của thể nhiễm sắc là có liên quan đến chức năng của chúng.

II. CẤU TRÚC HIỂN VI VÀ SIÊU HIỂN VI

1. Thể nhiễm sắc thường và thể nhiễm sắc giới tính

Trong bộ lưỡng bội thường tồn tại nhiều cặp tương đồng, ví dụ ở người có 23 cặp tương đồng, trong cặp hai thành viên (một thể nhiễm sắc từ bố,

một từ mẹ) giống nhau về hình dạng, kích thước. Những cặp như thế được gọi là thể nhiễm sắc thường (autosome). Ngoài ra còn có một cặp mà hai



Hình 1.13. Bàn đồ băng của bộ thể nhiễm sắc người (theo Bruce Albert và ctv., 1994).

thành viên khác nhau về hình dạng, kích thước hoặc trạng thái hoạt động được gọi là thể nhiễm sắc giới tính (sex chromosome). Ví dụ ở người có 22 cặp thể nhiễm sắc thường và một cặp (cặp thứ 23) là thể nhiễm sắc giới tính. Ở nam giới cặp giới tính là XY, còn ở nữ giới là XX (hình 1.13). Cặp thể nhiễm sắc giới tính là cơ sở di truyền để xác định giới tính và xác định tính di truyền liên kết giới tính ở đa số cơ thể sinh sản hữu tính.

2. Trung tiết

Trung tiết (centromere) là cấu trúc định khu trên chiều dọc thể nhiễm sắc ở vùng được gọi là eo thắt cấp 1. Ở trung kỳ ta dễ dàng quan sát thấy trung tiết vì trung tiết là nơi hai nhiễm sắc tử đính kết với nhau. Ở trung kỳ sớm trung tiết phân hoá thành hai tâm động (kinetochore) để đính với các sợi thoi của thoi phân bào ở cả hai phía đối mặt với hai cực. Nghiên cứu về sinh học phân tử cho biết vùng trung tiết được cấu tạo gồm đoạn ADN chứa khoảng 110-120 đôi nucleotit, trong đó giàu A:T (>90%) có khả năng liên kết với protein của sợi của thoi phân bào tạo thành tâm động.

Trung tiết chia thể nhiễm sắc thành hai vế, chiều dài của hai vế phụ thuộc vào vị trí trung tiết. Người ta thành lập chỉ số trung tiết (centromere index - Ic) để xác định vị trí của trung tiết và phân loại các thể nhiễm sắc (hình 1.14).

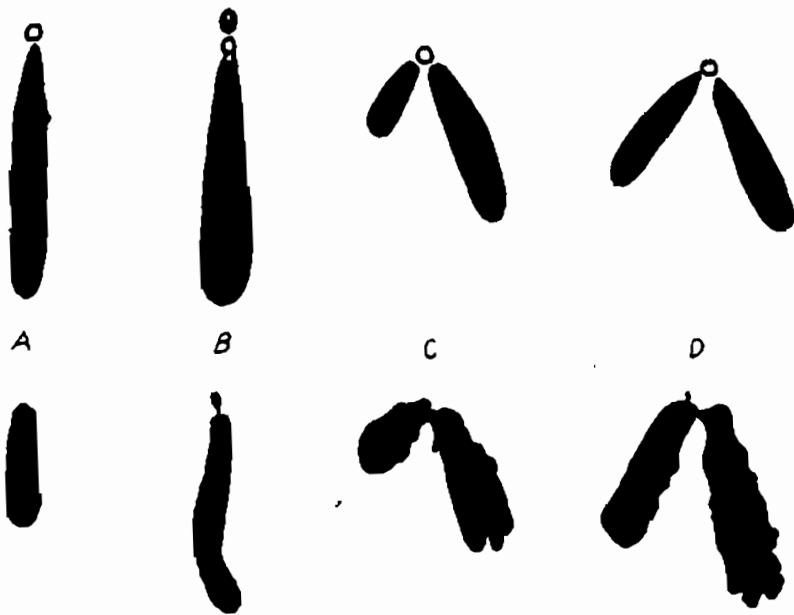
$$Ic = \frac{P}{P + Q}$$

P: chiều dài vế ngắn; Q: chiều dài vế dài.

- Thể nhiễm sắc tâm mút (acrocentric chromosome) có trung tiết ở đầu mút của vế ngắn.
- Thể nhiễm sắc cận mút (telocentric chromosome) có trung tiết ở gần đầu mút của vế ngắn.
- Thể nhiễm sắc tâm lệch (cận tâm) (submetacentric chromosome) có trung tiết ở gần chính giữa, (về P ngắn hơn về Q).
- Thể nhiễm sắc tâm giữa (cân tâm) (metacentric chromosome) có trung tiết ở chính giữa chia hai vế bằng nhau.

3. Điểm mút

Mỗi thể nhiễm sắc chứa một phân tử ADN liên kết protein thành các



Hình 1.14. Hình dạng thể nhiễm sắc

A. Thể nhiễm sắc tâm mút; B. Thể nhiễm sắc tâm cận mút;
C. Thể nhiễm sắc tâm lệch; D. Thể nhiễm sắc tâm giữa;
(theo De Robertis và ctv., 1975).

sợi nhiễm sắc xoắn, gấp khúc chạy suốt thể nhiễm sắc. Đầu tận cùng của phân tử ADN ở một đầu tận cùng của thể nhiễm sắc được gọi là điểm mút (telomere). Điểm mút có cấu trúc và thành phần nucleotit đặc thù gồm những đoạn lặp TTAGGG (ở tế bào soma của người có đến 500-3000 đoạn lặp như thế và bị bớt dần theo tuổi trưởng thành). Vai trò của điểm mút là ngăn cản không cho các thể nhiễm sắc trong bộ thể nhiễm sắc đính kết lại với nhau đồng thời tham gia vào sự điều chỉnh tần số phân bào. Khi bị xử lý bằng tia X thì các đoạn đứt gây thường đính kết với nhau.

4. Thể kèm và eo cấp II

Một số thể nhiễm sắc có mang ở một đầu tận cùng thể kèm (satellite)

là một phần thể nhiễm sắc ở dạng tròn có kích thước bằng hoặc bé hơn đường kính thể nhiễm sắc. Thể kèm được nối với thể nhiễm sắc bởi eo cấp II.

Thể kèm chứa ADN lặp và ở trạng thái chất dị nhiễm sắc (heterochromatine) trong nhân gian kỳ. Eo cấp II là vùng chứa NOR (nucleolus organizing region)-vùng tạo nên hạch nhận ở mạt kỳ vì ADN ở đây có chứa gen cho ARN-ribosom, ở người trong số 23 cặp thể nhiễm sắc thì cặp số 13, 14, 15 và cặp 21, 22 là có thể kèm và eo cấp II (hình 1.13).

5. Các băng nhiễm sắc

Băng kỹ thuật nhuộm cắt băng - nhuộm bằng các chất huỳnh quang hoặc nhuộm màu kết hợp với xử lý bằng enzym hoặc bằng nhiệt sẽ làm xuất hiện các băng trên thể nhiễm sắc còn gọi là các băng nhiễm sắc (chromosome bands) (hình 1.13). Người ta phân biệt các băng Q, C, G hoặc R. Sự phân bố của các băng thể hiện đặc tính của từng thể nhiễm sắc trong bộ, cũng như giữa các loài khác nhau.

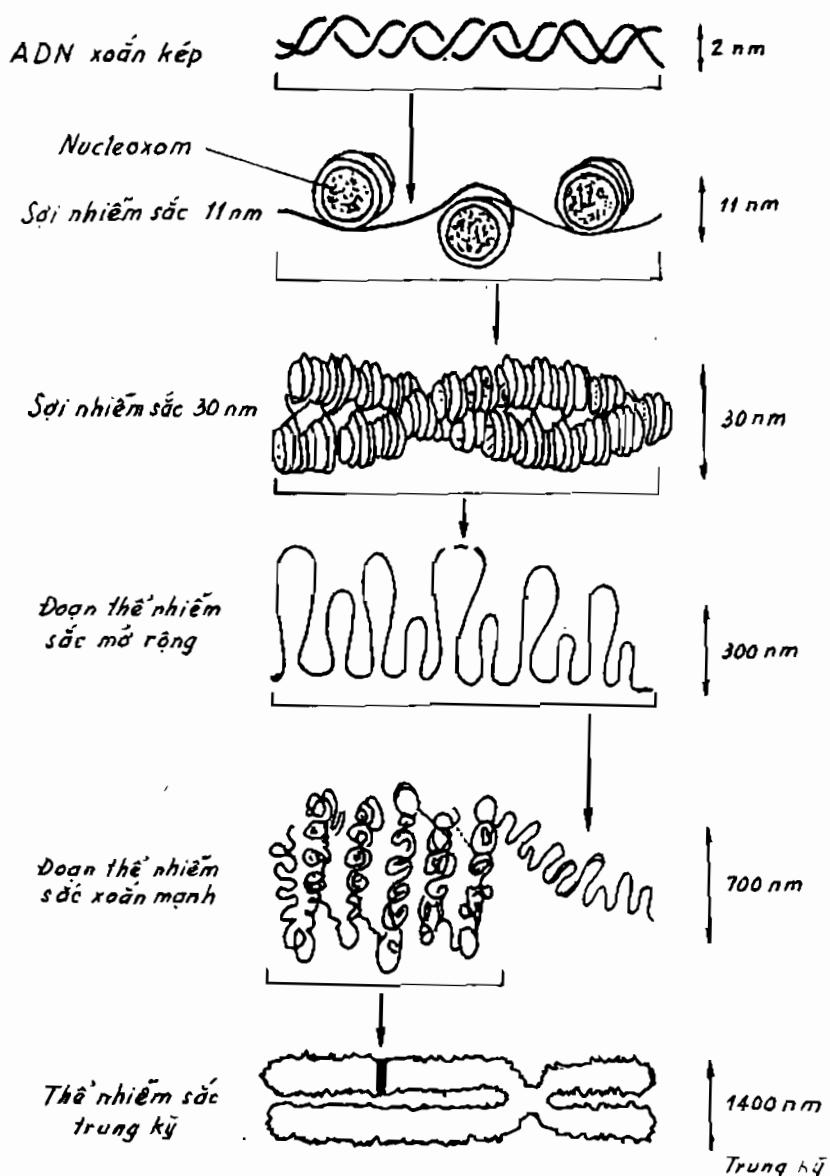
Sự hiện diện và phân bố của các băng ở thể nhiễm sắc trung kỳ có thể là sự phản ánh kiểu tổ chức thành nhóm đơn vị của sự hoạt hóa gen. Ví dụ băng C là tương ứng với vùng chứa chất dị nhiễm sắc ổn định chứa ADN lặp liên kết rất chặt với các protein axit. Băng C thường phân bố ở vùng quanh trung tiết.

6. Cấu trúc siêu vi

Trong thể nhiễm sắc, ADN liên kết với protein tạo nên các cấu trúc sợi xoắn nhiều cấp được gọi là sợi nhiễm sắc. Sợi nhiễm sắc cơ bản có đường kính 11nm là chuỗi hạt cườm được gọi là sợi nucleoxom (nucleosome fiber). Mỗi hạt cườm là một nucleoxom có kích thước 11nm dạng khúc giò gồm lõi được cấu tạo bởi 8 phân tử histon (2H₂A, 2H₂B, 2H₃, và 2H₄); sợi xoắn kép ADN cuốn xung quanh lõi histon với 1 $\frac{3}{4}$ vòng (chứa 146 đôi nucleotit). Các nucleoxom nối với nhau qua sợi xoắn kép ADN dài khoảng 60 nucleotit. Các sợi nucleoxom 11nm gấp khúc, cuộn lại nhờ các histon H₁ để tạo thành các sợi nhiễm sắc lớn hơn có đường kính 30nm được gọi là sợi solenoid (solenoid fiber).

Ở cấp độ các sợi có đường kính 300nm, sợi 30nm sẽ gấp khúc tạo nên các vòng bên (looped domains) chứa khoảng 20000 - 80000 cặp nucleotit và có kích thước khoảng 300nm. Các sợi 300nm sẽ cuộn lại tạo nên các sợi nhiễm sắc ở cấp độ lớn hơn từ 700nm đến 1400nm tức là các nhiễm sắc tử

và thể nhiễm sắc thấy rõ ở kỳ giữa của phân bào (hình 1.15). Nhiều tác giả cho rằng cấu trúc vòng bên là đơn vị hoạt động của gen và thể hiện rõ nhất



Hình 1.15. Các mức độ xoắn của sợi nhiễm sắc để hình thành thể nhiễm sắc
(theo Bruce Albert và ctv., 1994).

ở các cấu trúc vòng bên của thể nhiễm sắc khổng lồ (gigant chromosome) hoặc thể nhiễm sắc chồi bóng đèn (lampbrush chromosome). Ngoài protein histon, trong thể nhiễm sắc còn có các protein axit, chúng rất đa dạng về thành phần và chức năng nhưng chủ yếu là đóng vai trò tham gia điều hòa hoạt động của gen.

Như vậy ở eucaryota cấu trúc thể nhiễm sắc không chỉ là giá thể chứa ADN mà là tổ chức trong đó gen và hệ gen hoạt động một cách có hiệu quả cao nhất đáp ứng sự tồn tại và phát triển của cơ thể.

Trong các tế bào soma, thể nhiễm sắc tồn tại thành cặp $2n$ (ví dụ người $2n=46$) gồm một chiếc từ bố và một chiếc từ mẹ ($n=23$) do đó dẫn đến các locut gen định vị trên thể nhiễm sắc đều tạo thành cặp gen-alen, chúng phân ly qua phân bào giảm nhiễm và tái tổ hợp qua thụ tinh. Trong tế bào soma gen-alen phối hợp hoạt động theo qui luật nhất định để tạo nên các tính trạng của cơ thể.

Trong mỗi thể nhiễm sắc được phân hoá thành các cấu trúc có vai trò nhất định như vùng chất nhiễm sắc thực (eurochromatine), vùng chất di nhiễm sắc (heterochromatine), vùng trung tiết (centromere).

Trong bộ thể nhiễm sắc cũng được phân hoá thành các cặp thể nhiễm sắc thường (autosome) và cặp thể nhiễm sắc giới tính (gonosome), các thể nhiễm sắc có thể kèm và chứa vùng NOR - nơi định khu các gen rARN.

Như vậy từ ADN ở procaryota tiến lên dạng ADN + protein tạo thành thể nhiễm sắc ở eucaryota là bước tiến quan trọng trong sự phức tạp hoá tổ chức của hệ gen ở eucaryota.

E. TỔ CHỨC HỆ GEN Ở EUKARYOTA

I. ĐỘ LỚN CỦA HỆ GEN

Độ lớn của hệ gen (genome) được đánh giá bằng hàm lượng ADN chứa trong tế bào thể hiện ở số lượng đôi nucleotit. Ví dụ đối với vi khuẩn ADN chứa khoảng $0,7 \times 10^6$ đến 10^7 đôi nucleotit mã hoá khoảng vài trăm đến hàng nghìn gen. Đối với tế bào eukaryota, bộ gen của chúng chứa tới 10^8 (ở nấm, tảo, động vật đơn bào) cho tới 10^{11} đôi nucleotit (thực vật và động vật đa bào) tức là vào khoảng 10000 gen cho tới hàng triệu gen. Người ta không

thấy có sự tương ứng giữa số lượng gen với độ phức tạp của cơ thể ở các bậc tiến hoá. Ví dụ bạn chân khớp ở mức độ tiến hoá cao có tổ chức cơ thể phức tạp có hàm lượng ADN dao động trong khoảng từ 10^8 - 10^{10} đôi nucleotit tương tự với bạn động vật đơn bào. Trong nhóm lưỡng thê, hàm lượng ADN giao động từ 10^9 - 10^{11} đôi nucleotit. Đối với con người ở đỉnh cao của tiến hoá hàm lượng ADN trong tế bào $2n$ cũng chỉ có 6×10^9 đôi nucleotit.

Đối với eucaryota, tiến hoá của hệ gen không thể hiện ở số lượng ADN và số lượng gen, mà chính là ở tính đa dạng và tính tổ chức của hệ gen. Nếu tính trung bình một gen có độ lớn khoảng 1500 - 1800 đôi nucleotit thì tế bào con người chứa khoảng hàng triệu gen mã hoá cho hàng triệu protein khác nhau, nhưng theo đánh giá của các nhà hoá sinh học thì cơ thể người có khoảng 100000 loại protein khác nhau và chỉ được mã hoá trong khoảng 35.000-40.000 gen trong hệ gen. Như vậy tại sao lại có một hàm lượng ADN khổng lồ như vậy?

II. SỰ ĐA DẠNG CỦA HỆ GEN,

1. Tổ chức của hệ gen

Hệ gen của eucaryota có tổ chức rất đa dạng và phức tạp gồm:

1.1. Các gen cấu trúc (structure genes) là các gen mã hoá cho polipeptit khi phiên mã sẽ cho ra mARN và khi dịch mã cho ra protein. Có loại gen cấu trúc khi phiên mã cho ra mARN được dùng làm khuôn để dịch mã ngay, có loại gen cấu trúc trong trình tự nucleotit có chứa các đoạn intron xen kẽ với đoạn exon (được gọi là gen khẩn). Các gen cấu trúc khẩn khi phiên mã sẽ cho ra các tiền mARN. Các tiền mARN sẽ bị xử lý chế biến để cắt bỏ các đoạn intron và nối các đoạn exon tạo nên mARN chín - chứa các codon qui định axit amin. Trong gen cấu trúc còn chứa các đoạn promotor (đoạn gen khởi động), silencer (đoạn gen ức chế) hoặc enhancer (đoạn gen tăng cường) là các đoạn chứa nucleotit có vai trò điều hoà sự phiên mã; các đoạn nucleotit báo hiệu khởi đầu và đoạn nucleotit báo hiệu kết thúc phiên mã.

1.2. Các gen điều chỉnh (regulator genes) là các gen chứa các đôi nucleotit có vai trò điều chỉnh sự phiên mã của các gen cấu trúc và điều chỉnh sự phát triển cá thể (qua sự phiên mã và dịch mã hoặc không).

1.3. Các gen tARN và rARN là những gen chứa các đôi nucleotit khi phiên mã sẽ cho ra các tARN, rARN tương ứng.

Các gen có thể ở trạng thái đơn bản hoặc lặp nhiều bản, ví dụ gen mã hóa histon có tần số lặp từ 20 đến 1000 bản. Tồn tại nhiều đoạn có trình tự nucleotit lặp với tần số lặp từ 3 đến 10000 lần. Đoạn nucleotit lặp hoặc chỉ chứa vài đôi nucleotit hoặc 300 đôi nucleotit hoặc nhiều hơn và có khi chiếm 40 - 50% bộ gen. Các đoạn lặp ngăn thường phân bố xen kẽ vào các gen cấu trúc. Có ý kiến cho rằng các cụm nucleotit lặp xen kẽ đóng vai trò điều hoà và tổ hợp hoạt động của các gen cấu trúc.

2. Đặc tính tổ chức

Đặc tính tổ chức của hệ gen thể hiện ở chỗ:

2.1. Gen đơn bản và gen lặp bản tức gồm nhiều bản giống nhau

2.2. Nhiều gen thân thuộc liên kết thành họ gen đa gen. Các họ đa gen này cũng rất đa dạng nhưng đều thể hiện vai trò tổ hợp trong hoạt động của hệ gen đáp ứng nhu cầu của cơ thể trong quá trình sinh trưởng và phát triển.

Có họ đa gen mã hóa cho các họ protein có vai trò cấu trúc và chức năng như actin, tubulin, collagen, keratin, protein màng nuôi, một số protein huyết tương, hemoglobin, một số protein màng, histon, protein noãn hoàng và protein kháng thể.

Có họ đa gen không mã hóa cho protein mà là các gen chỉ phiên mã - đó là các gen rARN và tARN.

Sự định khu và sắp xếp của các họ đa gen trong bộ gen rất đa dạng. Các gen cùng họ có thể giống nhau và xếp liên tiếp cạnh nhau như các gen rARN hoặc có thể là các gen khác nhau xếp liên tiếp cạnh nhau như các gen mã hóa cho globin của hemoglobin; hoặc có thể là các gen khác nhau định khu trong các thể nhiễm sắc khác nhau ví dụ họ gen - actin, họ gen - tubulin.

Giữa các gen trong họ gen có các đoạn nucleotit đệm xen kẽ vào. Các đoạn đệm có thể được phiên mã hoặc không, nhưng không được dịch mã.

Các gen định khu trong thể nhiễm sắc theo trình tự của các nucleotit xếp nối tiếp thẳng hàng liên tục, nhưng có rất nhiều gen sắp xếp theo kiểu nối ghép (split) tức có xen kẽ các **đoạn intron** (là đoạn nucleotit được phiên mã nhưng không được dịch mã) với **đoạn exon** (đoạn nucleotit được phiên mã và dịch mã). Ví dụ gen mã hóa cho vitellogenin A có đến 33 đoạn intron. Các gen có chứa các đoạn intron xen kẽ được gọi là gen phân tán hoặc gen khẩn. Kiểu tổ chức theo gen phân tán có vai trò quan trọng trong

việc thực hiện cơ chế điều hòa hoạt động của gen, cũng như có vai trò trong tiến hoá.

*Trong tổ chức của hệ gen các nhân tố điều chỉnh hoạt động của gen được tăng cường theo con đường đa dạng hoá không chỉ tăng cường các yếu tố điều hoà tại chỗ - các đoạn ADN sắp xếp trước gen, xen kẽ trong gen mà còn bằng sự sắp xếp các gen theo định khu không gian (không tuyến tính) để tổ hợp sự điều hoà cũng như tổ hợp lại các gen sẵn có tạo nên các gen mới.

G. SỰ ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG CỦA HỆ GEN

Đối với tế bào eucaryota vì hệ gen có tổ chức đa dạng và phức tạp hơn nhiều so với procaryota nên sự điều hoà hoạt động của gen ở eucaryota tuy cũng dựa trên nguyên tắc hoạt hoá và ức chế theo mô hình điều hoà ở procaryota của Jacob và Monod (1961, 1963), nhưng có nhiều sai khác lớn về tín hiệu cũng như cơ chế điều chỉnh.

Về tín hiệu thì ngoài những tín hiệu đóng mở gen có trong tế bào chất hoặc đến từ môi trường thì còn có rất nhiều tín hiệu đến từ tế bào bên cạnh, từ các mô và cơ quan khác nhau ví dụ hormone steroid là tín hiệu hoạt hoá gen.

* Về cơ chế thì phức tạp hơn thể hiện sự điều chỉnh theo nhiều cấp độ, lệ thuộc và phối hợp với nhau. Trong tế bào soma của động vật có xương sống bậc cao có khoảng 20 - 20000 gen hoạt động thuộc hai loại:

a. Những gen phổ biến còn được gọi là các "gen giữ nhà" (house keeping genes) là những gen chiếm đa số, hoạt động trong tất cả các dạng tế bào. Ví dụ các gen mã hoá cho các enzym của quá trình đường phân.

b. Những gen đặc thù chỉ hoạt động trong một số dạng tế bào. Các gen này chịu trách nhiệm trong sự biệt hoá tế bào về cấu tạo và chức năng. Các gen này hoạt động (mở) ở một số tế bào và không hoạt động (đóng) ở một số tế bào khác, ví dụ các gen mã hoá cho hemoglobin hoạt động trong dòng tế bào tủy xương biệt hoá thành hồng cầu, còn đối với các tế bào biểu bì da thì các gen mã hoá cho keratin hoạt động, còn gen mã hóa cho hemoglobin ở trạng thái không hoạt động.

I. CẤP ĐỘ ĐIỀU HOÀ

Sự điều hoà hoạt động của gen thực hiện ở 9 cấp độ khác nhau:

1. Tổ chức của ADN trong thể nhiễm sắc bao gồm tổ chức phân tử, siêu hiển vi và hiển vi.
2. Sự phiên mã ADN thành ARN, bao gồm các nhân tố tham gia phiên mã như các ARN polymeraza, các phức hợp nhân tố phiên mã, các nhân tố liên kết với vùng điều chỉnh của gen (nhân tố liên kết được gọi là *trans*, còn vùng ADN bị liên kết được gọi là *cis*).
3. Sự xử lý chế biến ARN sau phiên mã, gồm quá trình chín ARN.
4. Sự chuyên chở mRNA từ dịch nhân qua lỗ màng nhân ra tế bào chất nơi cần để dịch mã.
5. Sự dịch mã trên riboxom để tạo thành protein: protein cấu trúc, protein enzym hoặc protein điều chỉnh.
6. Sự tồn tại và phân giải của mRNA - tuổi thọ của mRNA .
7. Các biến đổi của protein sau dịch mã bao gồm sự gluxit hóa (glycosylation), sự photphorin hóa, sự tạo thành cấu trúc 3D.
8. Sự cung cấp protein đúng địa chỉ, nơi tế bào và cơ thể cần sử dụng.
9. Sự sử dụng và phân giải protein được tổng hợp.

II. ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG CỦA GEN TRONG PHIÊN MÃ

Các nhân tố điều hoà phiên mã là những protein (yếu tố *trans*) gắn vào ADN ở vùng điều chỉnh (yếu tố *cis*) của gen. Đó là những protein có cấu trúc cấp IV ở dạng nhị hợp (dimer) hoặc đa hợp (polymer) có chứa tối thiểu ba vùng hoạt tính: vùng hoạt tính cần cho sự nhị hợp hóa, vùng hoạt tính cần cho sự gắn kết với ADN và vùng hoạt tính cần cho sự điều hoà phiên mã (tương tác với ARN-polymeraza).

Protein điều chỉnh nhận biết trình tự nucleotit của vùng điều chỉnh của gen (gồm khoảng 6 nucleotit) có cả ở hai mạch ADN. Mỗi mạch polipeptit của protein điều chỉnh gắn với một mạch ADN ở vùng điều chỉnh

Khi protein điều chỉnh gắn vào ADN điều chỉnh sẽ tạo nên chỗ gấp cong của ADN. Góc gấp cong ADN thay đổi tùy theo loại protein điều chỉnh và có ảnh hưởng đến tốc độ hoạt động của gen. Đồng thời protein điều chỉnh qua vùng hoạt tính thứ ba sẽ liên kết với ARN-polymeraza II ở vùng

promotor của gen để tạo nên chỗ gấp cong thứ hai và dẫn tới tạo nên những vòng bên ADN. Sự hình thành vòng bên tạo điều kiện cho sự diều hòa phiên mã bởi các vùng ADN ở cách xa nhau của mạch ADN ở dạng tuyến tính.

Cùng một gen có thể có nhiều vùng điều chỉnh gắn với các protein điều chỉnh khác nhau. Các vùng điều chỉnh này có tên gọi chung là “yếu tố trả lời” (response element-RE). Ví dụ RE cho các tín hiệu hormone steroid. Hormone khuếch tán qua màng sẽ liên kết với thụ thể nội bào tạo thành dimer và dimer sẽ gắn với ADN điều chỉnh. Ví dụ RE cho AMP vòng (CRE). AMP vòng xuất hiện khi có tác động của hormone protein với thụ thể màng và khi nồng độ AMP vòng tăng cao sẽ làm photphorin hoá protein-dimer được gọi là CREB (CRE binding protein), dimer này sẽ gắn vào ADN điều chỉnh tức là CRE. Nên nhớ rằng các protein điều chỉnh cũng được mã hoá bởi các gen điều chỉnh và bản thân các gen này cũng có vùng điều chỉnh riêng của mình.

Sự liên kết của protein điều chỉnh với vùng ADN điều chỉnh gây nên hiệu ứng hoạt hoá hoặc ức chế sự phiên mã (mở hoặc đóng gen) và kết quả là làm tăng cao hoặc giảm thiểu lượng mRNA được tổng hợp tùy nhu cầu.

Sự ức chế phiên mã là do sự gắn của protein đặc thù vào vùng ADN được gọi là vùng silencer (vùng gen ức chế).

Những protein đặc thù đó kiểm soát sự phiên mã của các gen mã hoá cho các protein của nơron (các protein tạo nên các tơ thần kinh (neurofilament), các protein tạo nên kênh natri...), chúng không có trong nhân của các nơron mà tồn tại và ức chế các gen này trong các tế bào không phải là nơron.

Sự kích thích phiên mã là do các protein điều chỉnh gắn vào vùng ADN được gọi là vùng enhancer (vùng gen tăng cường).

Một số protein có tác động điều hoà sự phiên mã là cần thiết cho sự biệt hoá tế bào và mô. Ví dụ protein MyoDI tác động trong sự biệt hoá các hợp bào cơ vân, hàm lượng của chúng thay đổi tùy theo các giai đoạn phát triển của hợp bào cơ vân. MyoDI là protein điều chỉnh phiên mã của các gen mã hoá cho các protein tạo nên các tơ cơ co rút và các protein tạo kênh ion trong màng sinh chất hợp bào cơ. Ở giai đoạn cơ bào (myoblast) hàm lượng MyoDI rất ít và được tăng cao ở giai đoạn hợp bào cơ chứa nhiều tơ cơ. Trong hợp bào cơ hàm lượng của chúng giảm khi cơ đã có phân bố thần kinh (hình thành xinap cơ-thần kinh) và sẽ tăng cao khi hợp bào cơ bị cắt mất dây thần kinh. Như vậy MyoDI có tác động hoạt hoá các gen mã hoá

cho các protein co rút hoặc protein kêt ion ở dạng “trưởng thành” của hợp bào cơ khi hợp bào cơ chưa có tiếp xúc thần kinh, và khi đã hình thành tiếp xúc thần kinh các gen này sẽ bị ức chế. Protein MyoDI kết hợp cùng các protein khác cùng họ với MyoDI tác động nối tiếp nhau kiểm tra các giai đoạn biệt hoá của hợp bào cơ.

Nhiều protein điều chỉnh có chứa vùng hoạt tính đặc biệt được gọi là vùng homeo (homeodomaine), chúng chịu trách nhiệm trong sự biệt hoá của phôi giai đoạn sớm tức là kiểm soát sự phân cát và phân cực của phôi.

Đột biến của các gen mã hoá cho các protein này sẽ dẫn đến sai lệch và quái thai ở các phần khác nhau của cơ thể ở ruồi *Drosophila* cũng như ở người. Những gen này vẫn có thể hoạt hoá ở cơ thể trưởng thành và protein do chúng qui định vẫn đóng vai trò điều chỉnh phiên mã cho các gen khác.

Mối tương tác giữa enzym ARN-polymeraza II với promotor cũng là nhân tố điều hoà hoạt động của gen. Promotor là đoạn ADN gồm một số trình tự nucleotit đặc thù có ái lực liên kết với ARN-polymeraza II để bắt đầu phiên mã. Số lượng promotor cũng như vị trí định khu của chúng trong gen cũng là nhân tố kiểm soát sự hoạt động của gen. Ví dụ gen mã hoá cho enzym α-amilaza. Amilaza là enzym xúc tác thuỷ phân tinh bột thành maltoza. Chúng được tổng hợp trong gan (để thuỷ phân glicogen) và trong tuyến nước bọt (để thuỷ phân tinh bột). Gen này có hai promotor và là gen khẩn có chứa các đoạn intron và các đoạn exon S, L, 2, 3,...

Trong tế bào gan promotor nằm cạnh exon L được hoạt hoá và kết quả tạo nên amilaza trong gan. Trong tế bào tuyến nước bọt promotor nằm cạnh exon S được hoạt hoá và tạo nên amilaza trong nước bọt.

Mạch ADN của eucaryota nằm gấp khúc và nén trong cấu trúc thể nhiễm sắc tạo nên sự định vị không gian của các gen cũng như của các promotor tạo điều kiện cho sự liên kết của ARN-polymeraza với promotor điều hoà hoạt động của gen đáp ứng nhu cầu của tế bào.

III. ĐIỀU HÒA HOẠT ĐỘNG CỦA GEN SAU PHIÊN MÃ

Điều hoà hoạt động của gen sau phiên mã thể hiện chủ yếu ở quá trình chín và số phận tương lai của mARN.

Các mARN vừa được tổng hợp chưa thể dùng làm khuôn để dịch mã được gọi là tiền mARN (hay mARN sơ cấp), chúng cần được xử lý ghép nối (alternative splicing) tức là quá trình cắt bỏ các đoạn intron và ghép nối các

đoạn exon tạo thành nhiều mARN chín khác nhau có thể làm khuôn để dịch mã sản sinh nhiều protein khác nhau. Sự chế biến ghép nối có thể tạo nên mARN để dịch mã cho các iso của cùng protein trong cùng một tế bào hoặc trong các tế bào khác nhau, ví dụ một gen có thể sản sinh ra các dạng iso của protein dính kết NCAM 140 và 180 kDa trong nơron và cơ vân, và dạng 120 kDa trong các tế bào thần kinh đệm (astrocyte). Sự chế biến ghép nối có thể tạo nên các mARN để dịch mã cho hai loại protein khác nhau, trong hai loại tế bào khác nhau, ví dụ cùng một gen nhưng trong tế bào cạnh nang của tuyến giáp sẽ sản sinh ra hoemon canxitonin, còn trong nơron vận động lại sản sinh ra CGRP (calcitonin gene related peptide) là chất trung gian thần kinh.

Các quá trình khác trong sự chín của mARN và sự xuất xưởng của mARN cũng tham gia vào sự điều hòa hoạt động của gen, ví dụ độ lớn và thành phần nucleotit của vùng 3' không mã hoá của mARN có ảnh hưởng đến sự ổn định và tuổi thọ của mARN. Phân tử mARN thường gồm ba đoạn: đoạn 5' không mã hoá (không dùng để dịch mã sang protein) có độ lớn khoảng 100 nucleotit tạo thành mū được gắn với protein, cần thiết cho sự vận chuyển mARN qua lỗ màng nhân và dịch mã trên riboxom, và đoạn cuối 3' không mã hoá có độ lớn khoảng 1000 nucleotit và tận cùng bởi đuôi poly-A. Chính đoạn 3' không mã hoá này có chứa tín hiệu địa chỉ nơi tế bào chất mà ở đó mARN cần chuyên chở đến, cũng như chứa tín hiệu liên kết với protein đặc thù trong tế bào chất qui định tuổi thọ của mARN. Độ dài của đuôi poly-A qui định tuổi thọ của mARN, đuôi poly-A càng ngắn thì mARN bị phân giải càng nhanh. Trong tế bào chất đoạn 3' không mã hoá có thể liên kết với các cấu trúc vi sợi và vi ống. Một số dạng mARN có tuổi thọ ngắn khoảng 15 phút, có dạng mARN có tuổi thọ dài tới vài ngày.

Cấu trúc hiển vi và siêu cấu trúc hiển vi của thể nhiễm sắc ở eucaryota cũng đóng góp vào cơ chế điều hòa hoạt động của gen trong các tế bào soma, ví dụ như trạng thái khác biệt giữa vùng nhiễm sắc thực (eurochromatine) và vùng dị nhiễm sắc (heterochromatine), như hiện tượng bất hoạt của một thể nhiễm sắc X ở cá thể cái động vật có vú (hiện tượng bù liều), như hiện tượng hình thành các thể nhiễm sắc đặc biệt qua các giai đoạn phát triển cá thể (thể nhiễm sắc khổng lồ ở giai đoạn ấu trùng ruồi quả (*Drosophila*); thể nhiễm sắc chồi bóng đèn ở giai đoạn tiền kỳ giảm phân I ở một số động vật) v.v...

CHƯƠNG 2

ĐỘT BIẾN VÀ TÁI TỔ HỢP SOMA

A. DI TRUYỀN VÀ BIẾN ĐỊ

Để nghiên cứu đặc tính di truyền và biến dị ở tế bào soma người ta sử dụng các phương pháp nghiên cứu của di truyền và di truyền tế bào thông thường như phương pháp phân tích di truyền ADN và thể nhiễm sắc, phương pháp lai tế bào *in vitro*, phương pháp miễn dịch tế bào v.v... nhằm làm sáng tỏ các vấn đề như ở tế bào soma thông tin di truyền được truyền đạt qua các thế hệ tế bào soma như thế nào? Vấn đề đột biến soma và tái tổ hợp soma xảy ra theo cơ chế nào?

I. SỰ TÁI BẢN ADN, NHÂN ĐÔI THỂ NHIỄM SẮC VÀ PHÂN LY THỂ NHIỄM SẮC

1. Trong các chủng quần tế bào đôi mới và tương đối ổn định các tế bào soma sau giai đoạn G_1 , khi có mặt của các nhân tố kích thích sẽ vượt qua điểm hạn định R để bước vào giai đoạn S là giai đoạn qua đó diễn ra sự tái bản ADN và nhân đôi thể nhiễm sắc. Sau giai đoạn S tế bào trải qua giai đoạn G_2 trong đó diễn ra quá trình chuẩn bị cho phân bào mà chủ yếu là hình thành bộ máy phân bào. Trong giai đoạn phân bào ADN đã được tái bản và thể nhiễm sắc đã được nhân đôi phân ly chính xác về hai tế bào con với bộ nhiễm sắc $2n$ như tế bào mẹ.

2. Những biến đổi xảy ra ở mức độ tái bản mã, nhân đôi thể nhiễm sắc hoặc phân ly thể nhiễm sắc đều gây nên sự biến đổi trong bộ máy di truyền của tế bào soma. Về những điểm chung nhất những biến đổi này diễn ra theo những cơ chế chung với các biến đổi của tế bào sinh dục, nhưng có tính đặc thù riêng.

3. Sự tái bản ADN xảy ra liên tục không kèm theo nhân đôi thể nhiễm sắc dẫn tới hiện tượng đa sợi hoá (polytenisation) và tạo nên các tế bào soma có thể nhiễm sắc khổng lồ trong một số mô và cơ quan của động vật cũng như thực vật. Thể nhiễm sắc khổng lồ được phát hiện lần đầu tiên năm 1881 bởi Balbiani ở ấu trùng muỗi lắc (*Chironomus*), nhưng chúng tồn tại trong nhiều tế bào soma khác nhau như trong tế bào biểu mô ruột, ống Malpighi, tế bào dinh dưỡng của buồng trứng của nhiều loài côn trùng, trong tế bào đối cực (antipod) của túi phôi ở một số thực vật. Thể nhiễm sắc khổng lồ được nghiên cứu nhiều nhất và kỹ nhất ở tế bào tuyến nước bọt của ấu trùng ruồi quả (*Drosophila*) và muỗi lắc vì chúng có tầm quan trọng trong các nghiên cứu về tế bào soma như đặc tính tự tái bản, phiên mã cũng như điều hoà hoạt động của gen qua quá trình biến thái. Thể nhiễm sắc khổng lồ có kích thước lớn gấp hàng trăm lần kích thước thể nhiễm sắc điển hình của cơ thể đó, ví dụ thể nhiễm sắc khổng lồ trong tế bào tuyến nước bọt ấu trùng ruồi quả có kích thước đường kính đạt từ 10 - 20 μm , và chiều dài 100 - 300 μm (trong lúc đó thể nhiễm sắc điển hình chỉ có kích thước vài micron) (hình 1.12). Thể nhiễm sắc khổng lồ có kích thước lớn vì chúng chứa hàm lượng ADN lớn và số sợi nhiễm sắc rất nhiều đạt tới hàng nghìn sợi, đó là do kết quả của sự tái bản nhiều lần của ADN và tạo nên nhiều sợi nhiễm sắc liên kết lại với nhau, ví dụ ở ruồi quả sự tái bản ADN diễn ra liên tiếp 11 lần tạo nên mức đa sợi là $2^{1+11} = 4096n$, và ở muỗi lắc tái bản xảy ra liên tục 14 lần tạo nên $2^{1+14} = 32768n$ (vì vậy chúng còn được gọi là thể nhiễm sắc đa sợi (polyten chromosome)). Sự tái bản liên tục không kèm theo nhân đôi và phân ly thể nhiễm sắc dẫn tới hiện tượng đa sợi hoá tức là các sợi nhiễm sắc liên kết lại với nhau trong một tập hợp đa sợi chứa trong cùng một số $2n$ thể nhiễm sắc của tế bào soma (ở *Drosophila* $2n = 8$). Ngoài hiện tượng đa sợi, thể nhiễm sắc khổng lồ còn có đặc điểm là có kích thước rất dài vì chúng chứa rất nhiều đĩa xen kẽ với các vùng giãn đĩa, ví dụ ở thể nhiễm sắc X chứa 1000 đĩa và trong toàn bộ bộ thể nhiễm sắc chứa đến 6000 đĩa. Sự biến đổi về cấu tạo của thể nhiễm sắc khổng lồ còn liên quan đến hiện tượng nhận bản gen (duplication) và trao đổi chéo mitos (mitotic recombination) mà chúng ta sẽ xem xét ở phần sau, nhằm phục vụ cho quá trình biến thái của côn trùng. Khi ấu trùng chuyển từ giai đoạn III sang giai đoạn IV dưới ảnh hưởng của hormone ecdison thì các đĩa sẽ hình thành các búp (puff) là các phần phồng lên trong đó các sợi nhiễm sắc giãn xoắn tạo nên các vòng bên. Đó là vùng các gen được hoạt hoá để tổng hợp nên các mRNA và protein phục vụ cho quá trình biến thái.

4. Khi ADN được tái bản và kéo theo nhân đôi số thể nhiễm sắc nhưng thể nhiễm sắc không được phân ly qua mitos mà ở lại trong nhân tế bào tạo nên các tế bào soma có bộ thể nhiễm sắc đa bội tức là số thể nhiễm sắc tăng lên theo bội số, hoặc chúng phân ly không chính xác tạo nên các tế bào soma có số lượng thể nhiễm sắc sai lệch so với bộ chuẩn $2n$, được gọi là lệch bội

II. ĐỘT BIẾN SỐ LƯỢNG THỂ NHIỄM SẮC

Đột biến trong số lượng thể nhiễm sắc của các tế bào soma được quan sát thấy *in vivo* trong các tế bào, mô hoặc cơ quan khác nhau hoặc ở toàn bộ cơ thể, cũng như *in vitro* dưới ảnh hưởng của các tác nhân gây đột biến khác nhau như phóng xạ, hoá chất. Đột biến số lượng thể nhiễm sắc có thể gây nên do sai lệch trong quá trình mitos khi bộ thể nhiễm sắc đã được nhân đôi qua giai đoạn S nhưng không phân ly và không tạo nên các tế bào con, mà tạo nên tế bào đa bội (được gọi là nội phân - endomitosis), hoặc các thể nhiễm sắc phân ly không đồng đều tạo nên các tế bào lệch bội. Nên chú ý là sai lệch trong meiosis và thụ tinh có thể dẫn tới hiện tượng đa bội và lệch bội ở các tế bào soma.

1. Đột biến đa bội (polyploid) do nội phân tạo nên, quan sát thấy rất nhiều mô và cơ quan của thực vật thường được gọi là hiện tượng "khảm" và cơ thể đó được gọi là "cơ thể khảm" (chimer organism) tức là chúng có chứa các tế bào đa bội cùng với các tế bào lưỡng bội bình thường.

Hiện tượng đa bội xuất hiện trong cơ thể khảm do sự nội phân tạo nên thường được gọi là đa bội mitos để phân biệt với đa bội meios do sự giảm phân và thụ tinh tạo nên. *Hiện tượng đa bội meios* là rất phổ biến và là một hướng tiến hóa trong thế giới thực vật được các nhà di truyền tế bào nghiên cứu kỹ và ứng dụng vào công tác lai tạo giống mới có năng suất cao, còn hiện tượng đa bội mitos được tạo nên trong các tế bào soma qua đời sống cá thể tuy quan sát thấy ở thực vật và động vật nhưng hiếm hơn.

Hiện tượng đa bội mitos quan sát thấy trong quá trình phát triển và biệt hoá của các tế bào soma ở côn trùng như ở bọt nhện nước *Gerris lateralis* mức đa bội có thể đạt tới 1024 hoặc 2048 thể nhiễm sắc trong một tế bào (bình thường số thể nhiễm sắc $2n = 21$). Ở động vật có vú và người các mô và tế bào đa bội thường là tế bào bệnh lý, ví dụ tế bào ung thư (xem phần sau).

Người ta có thể gây đa bội thực nghiệm bằng các tác nhân nhiệt, chiếu xạ hoặc hóa chất. Sử dụng chất colchisin các nhà tạo giống đã tạo nên các dòng thực vật đa bội cho năng suất cao như dâu tằm, mía. Chất colchicin có tác động ức chế sự trùng hợp của protein tubulin tạo thành vi ống do đó ngăn chặn sự tạo thoi phân bào, bộ thể nhiễm sắc đã nhân đôi không phân ly mà ở lại trong tế bào tạo nên đa bội.

2. Đột biến lệch bội (aneuploid) là trường hợp bộ thể nhiễm sắc có số lượng thể nhiễm sắc sai lệch so với bộ chuẩn $2n$ (euploid) ví dụ $2n+1$, $2n-1$...

Đột biến lệch bội là sự không phân ly của cặp tương đồng qua meios dẫn đến khi thụ tinh tạo hợp tử bị lệch bội về một cặp thể nhiễm sắc nào đó, ví dụ bệnh Đao là trisomi ($2n+1$) về thể nhiễm sắc 21.

Đối với tế bào soma khi phân bào mitos cũng quan sát thấy sự phân ly sai lệch trong mạt kỳ dẫn đến hiện tượng lệch bội và trong mô hoặc cơ quan có chứa các tế bào lệch bội. Đối với động vật có vú và người hiện tượng lệch bội được quan sát thấy trong các mô ung thư (xem phần sau). Trong nuôi cấy *in vitro* dưới tác động của nhiều nhân tố như môi trường dinh dưỡng, hoá chất, chiếu xạ đối với tế bào thực vật cũng như động vật đều quan sát thấy hiện tượng lệch bội trong bộ thể nhiễm sắc.

III. ĐỘT BIẾN CẤU TRÚC THỂ NHIỄM SẮC

Mỗi một loài được đặc trưng không chỉ bởi số lượng thể nhiễm sắc trong bộ mà còn đặc trưng bởi cấu trúc của từng thể nhiễm sắc của bộ. Ví dụ loài *Drosophila melanogaster* có bốn cặp thể nhiễm sắc trong đó có một cặp thể nhiễm sắc giới tính và ba cặp thể nhiễm sắc thường gồm hai cặp thể nhiễm sắc cân đối và một cặp thể nhiễm sắc hình chấm bé, còn loài *Drosophila virilis* có sáu cặp thể nhiễm sắc trong đó có một cặp thể nhiễm sắc giới tính và bốn cặp thể nhiễm sắc thường cân đối và một cặp thể nhiễm sắc thường hình chấm. Như vậy các loài thuộc cùng một chi có thể có số lượng và cấu trúc thể nhiễm sắc khác nhau, và trong quá trình tiến hóa đã xảy ra sự sáp xếp và tổ chức lại bộ thể nhiễm sắc. Các nhà di truyền tế bào thường xác định các dạng đột biến cấu trúc thể nhiễm sắc sau đây.

1. Mất đoạn (deletion) là trường hợp một đoạn nào đó của thể nhiễm sắc bị dứt ra và mất đi, hậu quả là thể nhiễm sắc đó mất đi một số gen (ADN) mà đoạn đó chứa. Nếu đoạn mất là đoạn cuối của thể nhiễm sắc sẽ

không có tâm động nên thường không phân ly được về hai cực và sẽ bị phân huỷ, còn khi thể nhiễm sắc bị đứt và mất cả hai đoạn mút thì hai đầu đứt sẽ dính liền nhau tạo nên thể nhiễm sắc vòng. Tuỳ theo đoạn mất có chứa nhiều gen quan trọng hay không sẽ gây ảnh hưởng nhiều hay ít đến sự biểu hiện tính trạng của cơ thể. Tuỳ theo độ dài của đoạn mất, người ta chia ra đoạn mất lớn, đoạn mất vừa và đoạn mất bé. Đoạn mất lớn thường gây chết cho cơ thể. Đoạn mất vừa sẽ gây chết ở trường hợp đồng hợp tử và có khả năng sống ở trường hợp dị hợp tử. Đoạn mất nhỏ có thể tồn tại ở trạng thái đồng hợp tử và gây ảnh hưởng lên kiểu hình giống với đột biến gen nhưng sai khác ở chỗ chúng không có tính đột biến ngược chiều.

Hậu quả ảnh hưởng lên kiểu hình của mất đoạn được xác định bởi các nguyên nhân sau:

- a. mất hẳn chức năng của một số gen;
- b. thay đổi số lượng vật chất di truyền (ADN);
- c. phá huỷ sự cân bằng gen và điều chỉnh trong hệ gen.

Mất đoạn lớn thường gây ảnh hưởng đến sự hoạt động chức năng của tế bào và sự phát triển của phôi do đó gây chết cho tế bào và cho cơ thể.

Người ta có thể phát hiện các mất đoạn nhờ các phương pháp nghiên cứu tế bào học qua kiểu nhân (caryotype) hoặc phương pháp di truyền học qua lai thế đột biến với kiểu đại. Ví dụ có dòng ruồi quả con cái mang mất đoạn ở một thể nhiễm sắc X ở cạnh gen white (mắt trắng). Ở trạng thái dị hợp tử mất đoạn sẽ dẫn tới hình thành ruồi có cánh bị xé (được gọi là notch), còn khi ở trạng thái đồng hợp tử mất đoạn sẽ gây chết cho ruồi. Khi đem lai con ruồi cái bình thường với kiểu đại với ruồi đực có mang một thể nhiễm sắc X chứa 3 gen lặn (gen y-thân màu vàng, w-mắt trắng, f-tơ ché) thì ta sẽ thu được ở F₁ các ruồi cái và ruồi đực có kiểu hình bình thường. Nhưng nếu ta đem lai con ruồi cái dòng notch có mất đoạn ở một thể nhiễm sắc X với ruồi đực mang các gen lặn y, w và f thì ở F₁ sẽ có 1/2 ruồi cái có kiểu hình bình thường (kiểu đại) và 1/2 ruồi cái mang kiểu hình đột biến tức có cánh bị xé và mắt trắng. Những con ruồi cái này mang gen lặn w (nên có mắt trắng), như vậy gen trội w⁺ là thiểu hẵn ở trạng thái đồng hợp tử. Hai gen lặn khác là y và f không biểu hiện ra kiểu hình bởi vì chúng ở trạng thái dị hợp tử do đó bị át chế bởi các alen trội là y⁺ và f⁺. Như vậy các ruồi cái dòng notch đã bị mất đoạn thể nhiễm sắc X mang các gen w⁺ (y⁺f⁺/ywf), và căn cứ vào sự biểu hiện kiểu hình của gen lặn ở trạng thái dị hợp người ta có thể xác định được mất đoạn mang alen trội.

Bằng phương pháp tương tự người ta có thể xác định được mất đoạn ở bất kỳ thể nhiễm sắc thế nào trong bộ thể nhiễm sắc. Ví dụ ở chuột nhắt xảy ra mất đoạn trong thể nhiễm sắc thường và gây ra đột biến cử động “nhảy van” vòng tròn. Khi ta đem lai chuột cái đồng hợp về gen lặn đó (gen ω) với chuột đực bình thường mang alen trội (ω^+) thì ở F₁ tất cả con đều bình thường nhưng đôi khi có xuất hiện một số con “nhảy van”. Nghiên cứu về tế bào học bằng kiểu nhân chứng tỏ rằng ở các con chuột đột biến “nhảy van” có mang một thể nhiễm sắc mất đoạn và đoạn mất mang gen trội ω^+ , vì vậy gen lặn ω mới biểu hiện ra kiểu hình “nhảy van” khi con lai ở trạng thái dị hợp tử.

Bằng phương pháp tế bào học qua kiểu nhân người ta có thể phát hiện được mất đoạn nhờ sự tạo thành các búi thể nhiễm sắc ở giai đoạn trao đổi chéo của tiền kỳ giảm phân 1 hoặc qua cấu tạo của thể nhiễm sắc không lô ở ruồi quả (tức là khi có tái tổ hợp soma - xem phần sau).

2. Nhân đoạn (duplication) là trường hợp một đoạn nào đó của thể nhiễm sắc được nhân lên gấp đôi hoặc nhiều lần. Đoạn được nhân thêm có thể ở bất cứ vị trí nào hoặc chen vào giữa hoặc ở phần cuối thể nhiễm sắc. Các nhà di truyền tế bào cho rằng nhân đoạn có ý nghĩa quan trọng đối với tiến hóa vì lẽ rằng các kiểu gen được phức tạp hóa là do hiện tượng nhân đoạn thể nhiễm sắc.

Hiện tượng nhân đoạn có thể xảy ra do sự nhân lên của một đoạn nào đó trong thể nhiễm sắc hoặc do hai thể nhiễm sắc đồng dạng bắt cặp và trao đổi đoạn cho nhau, kết quả một thể nhiễm sắc mất đoạn và một thể nhiễm sắc tương ứng sẽ được thêm đoạn. Cơ thể có nhân đoạn ít bị ảnh hưởng hơn so với mất đoạn, tuy nhiên nếu đoạn thêm lớn sẽ gây ảnh hưởng đến sức sống của cơ thể. Hiện tượng nhân đoạn được nghiên cứu nhiều ở ruồi quả, ví dụ đột biến Bar (có mắt hình sọc ngang) là do nhân đoạn ở đoạn 16A trong thể nhiễm sắc X. Ở ruồi quả các đột biến trội cánh nhiều lông (hairy wing) hoặc đột biến mắt bé (asteroid) đều do hiện tượng nhân đoạn gây nên.

3. Đảo đoạn (inversion) là trường hợp một đoạn nào đó của thể nhiễm sắc bị đứt và quay ngược 180° rồi nối lại dẫn đến thay đổi sự sắp xếp của gen trong đoạn đó. Đảo đoạn có thể xảy ra do sự di chuyển của các gen nhảy (transposons) từ thể nhiễm sắc này sang thể nhiễm sắc khác. Như vậy để xảy ra đảo đoạn phải có hai điểm đứt, còn khi chỉ có một điểm đứt ở đoạn mút có thể xảy ra tuy rất hiếm hiện tượng đảo đoạn ở phần mут thể

nhiễm sắc. Người ta phân biệt hai dạng đảo đoạn:

a. đảo đoạn ngoại tâm (đảo đoạn không đối xứng) là trường hợp đoạn đảo không bao gồm tâm động;

b. đảo đoạn quanh tâm (đảo đoạn đối xứng) là trường hợp đoạn đảo có mang tâm động.

Đảo đoạn có thể ở trạng thái đồng hợp tử hoặc dị hợp tử. Khi ở trạng thái đồng hợp tử hoặc bán hợp tử thì đảo đoạn thường gây ảnh hưởng chết cho cơ thể vì lẽ rằng làm thay đổi vị trí của các gen (hiệu ứng vị trí) và đứt gãy thể nhiễm sắc sẽ dẫn tới gây chết. Khi ở trạng thái dị hợp tử thì đảo đoạn gây nên một số thay đổi về di truyền và tế bào, do đó người ta có thể dễ dàng phát hiện ra đoạn đảo. Khi có đảo đoạn ngoại tâm không làm thay đổi vị trí hai vế, còn khi có đảo đoạn quanh tâm sẽ dẫn tới thay đổi về của thể nhiễm sắc, có thể biến thể nhiễm sắc tám mút thành thể nhiễm sắc cân tâm và ngược lại.

Người ta có thể phát hiện đảo đoạn qua quá trình tiếp hợp và trao đổi chéo ở tiền kỳ của giảm phân 1. Khi có đảo đoạn ở trạng thái dị hợp thì sự tiếp hợp giữa thể nhiễm sắc bình thường và thể nhiễm sắc bị đảo đoạn sẽ tạo nên các búi bên khi tiếp hợp hoặc tạo thành cầu nối và đoạn đứt thể nhiễm sắc khi phân ly ở hậu kỳ và mạt kỳ, hậu quả sẽ tạo nên các giao tử không cân bằng gây ảnh hưởng xấu cho thế hệ sau. Người ta cũng có thể phát hiện đảo đoạn trong các tế bào soma, ví dụ theo dõi các thể nhiễm sắc khổng lồ của ruồi quả người ta phát hiện được đảo đoạn ở trạng thái dị hợp căn cứ vào sự tạo thành các vòng bên trong các vế của thể nhiễm sắc khổng lồ.

Trong các quần thể thực vật (ví dụ lúa mạch) hoặc động vật (ruồi quả) thường gặp các dạng đảo đoạn với tần số cao, tuy nhiên đa số đều ở trạng thái đồng hợp nên không gây chết. Trong trường hợp đảo đoạn ở trạng thái dị hợp người ta có thể phát hiện được chúng bằng phương pháp di truyền học hoặc tế bào học

4. Chuyển đoạn (translocation) là hiện tượng thay đổi trong cấu trúc thể nhiễm sắc khi một thể nhiễm sắc có đoạn bị đứt và được nối kết vào một thể nhiễm sắc khác không đồng dạng. Chuyển đoạn có thể xảy ra do sự di chuyển của các gen nhảy từ một thể nhiễm sắc này sang thể nhiễm sắc khác. Hậu quả của chuyển đoạn là làm thay đổi nhóm gen liên kết trong thể nhiễm sắc. Người ta phân biệt các dạng chuyển đoạn sau đây:

a. Chuyển đoạn chéo là trường hợp có sự chuyển một đoạn của một thể nhiễm sắc này sang một thể nhiễm sắc khác và xảy ra trao đổi chéo các đoạn giữa hai thể nhiễm sắc không đồng dạng (có khi có thể là giữa hai thể nhiễm sắc đồng dạng)

b. Chuyển đoạn đơn tâm và chuyển đoạn hai tâm. Chuyển đoạn đơn tâm là khi đoạn chuyển vẫn giữ nguyên thứ tự các locut như cũ so với tâm động, còn chuyển đoạn hai tâm là khi đoạn chuyển quay 180° so với tâm động.

c. Chuyển đoạn đối xứng và không đối xứng. Chuyển đoạn đối xứng là trường hợp sau khi nối các đoạn chuyển sẽ tạo nên hai thể nhiễm sắc đơn tâm, còn chuyển đoạn không đối xứng là khi nối các đoạn chuyển sẽ tạo nên một thể nhiễm sắc hai tâm và một thể nhiễm sắc không có tâm động.

d. Chuyển đoạn thể nhiễm sắc và chuyển đoạn nhiễm sắc tử là trường hợp chuyển đoạn xảy ra ở mức thể nhiễm sắc toàn vẹn khi chưa được nhân đôi hoặc xảy ra ở mức nhiễm sắc tử (tức khi đã được nhân đôi cho ra các nhiễm sắc tử).

e. Chuyển đoạn nêm là khi đoạn chuyển được nối xen vào đoạn giữa thể nhiễm sắc.

g. Chuyển đoạn bên là khi chuyển đoạn từ một thể nhiễm sắc này được nối vào bên cạnh thể nhiễm sắc thể khác.

h. Chuyển đoạn vòng là khi có sự chuyển đoạn của ba thể nhiễm sắc khác nhau xảy ra theo kiểu thay thế đoạn chuyển chứ không phải trao đổi chéo.

Như vậy hiện tượng chuyển đoạn xảy ra rất đa dạng và người ta rất khó phát hiện và phân biệt. Vì lẽ rằng chuyển đoạn đều gây nên thay đổi nhóm liên kết gen cho nên người ta có thể phát hiện chuyển đoạn bằng phương pháp nghiên cứu di truyền dựa trên các tần số thay đổi nhóm liên kết qua lai hoặc dựa vào sự tạo thành các giao tử không cân bằng qua giám phân hoặc nghiên cứu bằng phương pháp tế bào căn cứ vào sự tạo thành các thể nhiễm sắc vòng ở tiền kỳ giám phân 1. Khi xuất hiện thể nhiễm sắc vòng hoặc phân ly các giao tử không cân bằng là dấu hiệu của chuyển đoạn ở trạng thái dị hợp, các giao tử không cân bằng sẽ gây chết còn các giao tử cân bằng sẽ có sức sống. Hậu quả của chuyển đoạn được nghiên cứu nhiều ở thực vật có hoa. Ví dụ khi nghiên cứu hạt phấn dưới kính hiển vi có thể xác định được các hạt phấn bất thường là các hạt phấn xốp rỗng vì chúng được tạo

thành từ các giao tử không cân bằng về bộ thể nhiễm sắc. Các noãn được tạo thành từ giao tử không cân bằng thường không có sức sống và bất thụ. Đối với động vật (ruồi quả) thì chuyển đoạn thường gây chết cho hợp tử hoặc ở giai đoạn phôi sớm.

Các nhà di truyền tế bào thường sử dụng các đột biến cấu trúc thể nhiễm sắc để lập bản đồ gen. Ví dụ căn cứ vào đột biến chuyển đoạn chéo giữa thể nhiễm sắc số 14 với thể nhiễm sắc X ở người, các nhà di truyền học đã xác lập được gen HPRT (gen mã hoá cho enzym hypoxanthin photphoribozyl transferaza) là định khu ở vế dài của thể nhiễm sắc X. Một trong những thành tựu đáng chú ý của di truyền y học gần đây là sự phát hiện ra gen gây nên hội chứng nhược cơ Duchenne ở người là gen DMD (Duchenne muscular dystrophy). Hội chứng nhược cơ Duchenne là bệnh thần kinh cơ rất nguy hiểm. Bệnh bắt đầu từ 6 tuổi và thường chết ở tuổi từ 12-20. Các nhà di truyền tế bào học đã phát hiện bệnh là do đột biến chuyển đoạn của thể nhiễm sắc X sang thể nhiễm sắc số 5 và khi nghiên cứu so sánh thể nhiễm sắc X bình thường bất hoạt với thể nhiễm sắc thể X bị chuyển đoạn trở thành hoạt động, họ đã xác định được vị trí định khu của gen DMD ở vùng p21 của thể nhiễm sắc X.

IV. CÁC NHÂN TỐ GÂY ĐỘT BIẾN THỂ NHIỄM SẮC

Các nhân tố gây đột biến thể nhiễm sắc có thể là nhân tố vật lý như bức xạ ion hoá, bức xạ tử ngoại, nhiệt, v.v. có thể là nhân tố hoá học. Có nhiều dạng bức xạ tác động lên tế bào và cơ thể trong điều kiện tự nhiên và trong điều kiện *in vitro* như tia tử ngoại, tia röntgen, tia α , β , γ , các proton, các neutron. Khi tế bào và cơ thể bị chiếu xạ, nhiều quá trình thay đổi đảo ngược và không đảo ngược xảy ra như sự hoại tử nhân, đính kết thể nhiễm sắc, phân đoạn thể nhiễm sắc, hình thành nhân khổng lồ, tế bào đà nhân, sai lệch phân ly thể nhiễm sắc về nhiều cực tạo nên các tế bào lệch bội v.v.

Tần số và đặc tính của các đột biến thể nhiễm sắc tuỳ thuộc vào liều chiếu xạ và vào giai đoạn của chu kỳ tế bào bị chiếu xạ tức là tuỳ vào giai đoạn G1, giai đoạn khi thể nhiễm sắc chưa được nhân đôi và ở giai đoạn G2 và phân bào là giai đoạn mà ở đó thể nhiễm sắc đã được nhân đôi. Tần số và mức độ đột biến thể nhiễm sắc còn tuỳ thuộc vào thời gian chiếu xạ. Tác hại của chiếu xạ gây nên các đứt gãy thể nhiễm sắc do đó gây nên mất đoạn và qua thời gian khôi phục sau chiếu xạ sẽ xảy ra các đột biến khác như nhân đoạn, đảo đoạn và chuyển đoạn. Tác hại của chiếu xạ cũng có thể gây

nên các trao đổi đoạn giữa các thể nhiễm sắc do đó tạo nên các đột biến chuyển đoạn. Đặc tính nhạy cảm phóng xạ của các cơ thể khác nhau thì khác nhau, ví dụ liều gây chết đối với một số vi khuẩn là 6×10^6 r, còn đối với động vật chỉ vài trăm r. Để gây được đột biến thể nhiễm sắc ở thực vật bậc cao (ví dụ đối với *Vicia* và *Lilium*) chỉ cần chiếu xạ với liều 20r là đủ, còn đối với động vật đơn bào có roi chiếu xạ với liều 20.000r vẫn chưa gây được đột biến. Đối với các mô khác nhau tính nhạy cảm với chiếu xạ cũng khác nhau, ví dụ mô tuỷ đỏ xương nhạy cảm hơn mô dịch hoàn.

Đột biến thể nhiễm sắc có thể được gây nên do các nhân tố hoá chất. Ngày nay, người ta đã phát hiện nhiều loại hoá chất là tác nhân gây đột biến như chất iprit, ethylenimin, glixidol, formaldehit, urethan, chlorit aluminium, các hoá chất trừ sâu, diệt cỏ, các hoá chất dùng trong công nghiệp hoá mỹ phẩm, công nghiệp hoá thực phẩm và công nghiệp nhuộm màu. Vụ nổ bom nguyên tử của Mỹ tại Hiroshima và Nagasaki năm 1945 và chất độc màu da cam (chất diệt cỏ 2,4D và 2,4,5T có chứa dioxin) mà đế quốc Mỹ sử dụng trong cuộc chiến tranh xâm lược Việt Nam đã gây ra cho nhân dân Nhật Bản và nhân dân Việt Nam những hậu quả nặng nề về quái thai ung thư cũng như đột biến thể nhiễm sắc qua nhiều thế hệ.

V. ĐỘT BIẾN GEN

Đột biến gen còn được gọi là đột biến điểm là những biến đổi trong cấu trúc của gen thể hiện ở sự thay thế nucleotit này bằng một nucleotit khác, hoặc mất đi hoặc thêm vào một hay một số nucleotit trong mạch ADN của gen dẫn tới làm biến đổi số lượng hoặc trình tự sắp xếp của nucleotit trong gen. Đột biến gen có thể xảy ra trong tất cả các gen của tất cả cơ thể sống. Đột biến gen cũng như đột biến thể nhiễm sắc dẫn đến hình thành các biến dị di truyền mới và từ đó tạo cho cơ thể có nhiều khả năng thích nghi với các biến đổi của môi trường.

1. Đột biến gen có thể là đột biến soma hay đột biến mầm. Đột biến soma xảy ra trong các tế bào soma ở bất kỳ giai đoạn nào của quá trình phát triển của cơ thể đa bào. Hậu quả của đột biến và khả năng biểu hiện của chúng thành các tính trạng biến dị tuỳ thuộc vào trạng thái trội lặn của gen, vào dạng tế bào mà gen biểu hiện, vào thời gian của chu kỳ tế bào và chu kỳ cơ thể. Đột biến mầm là các đột biến xảy ra trong dòng tế bào sinh dục là những tế bào có khả năng phân bào giảm nhiễm để tạo nên các giao tử.

2. Đột biến soma gây nên các biến đổi kiểu hình thể hiện ở mức độ tế bào, mức độ mô hoặc cơ quan trong thế hệ cơ thể chứ không truyền cho thế hệ sau qua giao tử, ví dụ cam có lỗ rốn (navel orange) mềm ngọt và táo ngọt lịm (delicious apple) đều là những thể đột biến soma. Người ta phải sử dụng phương pháp sinh sản sinh dưỡng như ghép cành, chiết cành để nhân giống chúng. Đối với động vật và con người các đột biến soma thường gây nên các hư hỏng ở mức độ tế bào, mô hoặc cơ quan nào đó, ví dụ ung thư.

3. Đột biến gen là ngẫu nhiên hoặc cảm ứng. Đột biến ngẫu nhiên là đột biến gây nên bởi nguyên nhân chưa biết rõ, có thể là do sự sai lệch trao đổi chất trong tế bào, có thể là do tế bào không tự sửa chữa hết các sai sót xảy ra trước hoặc trong quá trình tái bản mã.

Đột biến cảm ứng là những đột biến xảy ra do tác động của các tác nhân gây đột biến (mutagens) như tác nhân vật lý, hoá học làm biến đổi phân tử ADN.

Trong thực tế thật khó phân biệt các đột biến ngẫu nhiên và đột biến cảm ứng. Các nhà di truyền học thường phân tích các đột biến và so sánh chúng ở mức quần thể. Nếu người ta cho xử lý quần thể với một tác nhân gây đột biến nào đó mà tần số đột biến tăng lên mức 99 trên 100 đột biến có mặt trong quần thể thì đột biến đó là đột biến cảm ứng. Các nhà nghiên cứu thường sử dụng thống kê sinh học để tính toán so sánh các tần số đột biến cảm ứng với tần số đột biến ngẫu nhiên trong các quần thể được tác động bởi các tác nhân gây đột biến với các quần thể không có tác động bởi tác nhân gây đột biến thử nghiệm. Các đột biến ngẫu nhiên xuất hiện không thường xuyên. Tuy nhiên, tần suất của chúng có thể thay đổi từ gen này đến gen khác, từ cơ thể này đến cơ thể khác. Người ta đã tính toán được tần số xuất hiện các đột biến ngẫu nhiên đối với các gen khác nhau là ở mức 10^{-7} đến 10^{-10} đối với một đôi nucleotit và đối với một thế hệ. Nếu ta đem so sánh tần số đột biến đối với một đôi nucleotit với một gen thì tần số đột biến ở mức 10^{-4} đến 10^{-7} (vì trung bình một gen chứa khoảng 1000 đôi nucleotit). Vì lẽ rằng ở các cơ thể bậc cao số gen là rất lớn nên tần số đột biến là ở mức đáng kể.

4. Đột biến là quá trình ngẫu nhiên không có tính thích nghi. Chúng ta rất quen biết với hiện tượng nhờn thuốc của bọn côn trùng có hại khi xử lý bởi các loại thuốc diệt sâu hoặc bọn vi khuẩn gây bệnh khi xử lý bởi kháng sinh. Trong quá trình tác động giữa cơ thể và thuốc đã xuất hiện

các thể đột biến có đặc tính kháng lại thuốc.

Học thuyết tiến hoá cho chúng ta biết rằng tiến hoá là kết quả của đột biến và chọn lọc tự nhiên. Như vậy bản chất của đột biến là gì? Có phải đột biến là hoàn toàn ngẫu nhiên và môi trường là nhân tố duy trì các đột biến có sẵn? Hay là đột biến được định hướng bởi nhân tố môi trường? Nhiều nghiên cứu thực nghiệm và khảo sát trong tự nhiên tiến hành trên đối tượng vi khuẩn và cơ thể đa bào đã chứng minh rằng đột biến di truyền luôn xảy ra trong quần thể và nhân tố môi trường đã chọn lọc, các đột biến có sẵn và tính thích nghi kiểu hình là kết quả của chọn lọc tự nhiên trên cơ sở các đột biến có sẵn trước đó và như vậy đột biến không hề được định hướng và không mang sẵn tính thích nghi.

5. Đột biến là quá trình thuận nghịch. Như chúng ta đã biết nếu đột biến xảy ra đối với gen kiểu đại sẽ sản sinh ra alen đột biến và kết quả sẽ cho ra kiểu hình đột biến bất thường. Alen đột biến lại có thể đột biến nghịch để trở lại kiểu hình kiểu đại ban đầu, như vậy đột biến có tính thuận nghịch.

Đột biến gen kiểu đại để tạo nên gen cho ra kiểu hình đột biến được gọi là đột biến tiến (forward mutation). Nhiều khi sự xác định phân biệt kiểu hình đại và kiểu hình đột biến chỉ là tương đối, và có thể xem chúng chỉ là hai kiểu hình khác nhau nhưng là bình thường, ví dụ các nhà di truyền cho rằng các alen qui định màu mắt nâu và xanh ở người đều là kiểu đại. Nhưng ở mức độ nào đó khi trong quần thể đại đa số cá thể đều có mắt nâu thì alen qui định màu mắt xanh lại được xem là alen đột biến.

Khi một đột biến thứ hai làm khôi phục lại kiểu hình ban đầu đã bị mất đi do đột biến trước đó thì quá trình đó được gọi là đột biến ngược (reverse mutation). Người ta phân biệt hai dạng đột biến ngược:

a. *Do đột biến lùi (back mutation)* tức là khi đột biến thứ hai xảy ra ở ngay vị trí của gen mà ở đó đột biến ban đầu đã xảy ra làm khôi phục lại trình tự nucleotit ban đầu.

b. *Do sự hiện diện của đột biến ức chế (suppressor mutation)* tức là khi đột biến thứ hai xảy ra ở vị trí khác trong hệ gen nhưng có tác động bù trừ cho hiệu quả của đột biến thứ nhất.

Đột biến lùi làm khôi phục lại trình tự nucleotit kiểu đại ban đầu của gen, trong lúc đó đột biến ức chế thì không phải nhu thế. Đột biến ức chế có thể xảy ra ở các vị trí khác nhau của ngay gen đó hoặc của các gen khác

nhau hoặc thậm chí của các thể nhiễm sắc khác nhau. Một số đột biến trở lại trạng thái ban đầu bởi đột biến lùi, nhưng rất nhiều đột biến cũng trở lại trạng thái ban đầu lại do các đột biến ức chế.

Trong nghiên cứu di truyền học, người ta phân biệt hai loại đột biến trên bằng phương pháp lai ngược các thể đột biến ngược với cá thể đại ban đầu. Nếu như kiểu hình đại ban đầu được khôi phục bởi đột biến ức chế thì đột biến ban đầu phải có mặt và sẽ được tách ra khỏi đột biến ức chế nhờ tái tổ hợp. Nếu kiểu hình đại được khôi phục do đột biến lùi thì tất cả thế hệ con của phép lai ngược đều sẽ là kiểu đại cá.

6. Hậu quả kiểu hình của đột biến gen. Đột biến gen gây nên nhiều thay đổi trong kiểu hình của cơ thể từ mức độ phân tử có thể phát hiện bằng kỹ thuật sinh hoá tinh vi, cho đến mức độ cấu tạo hình thái hoặc gây chết cho cơ thể. Một gen là một đoạn trình tự các đôi nucleotit của ADN mã hoá cho một polypeptit nào đó của cơ thể. Bất kỳ đột biến nào đó xảy ra trong một gen nào đó sẽ sản sinh ra alen mới của gen đó. Nếu gen chứa đột biến gây ra hậu quả bé và được phát hiện chỉ bằng kỹ thuật đặc biệt thì được gọi là đồng gen (isoalleles). Các đột biến khác được gọi là alen không (null alleles) khi alen mang đột biến hoàn toàn không hoạt động.

Nếu gen mang các đột biến này hoạt động theo yêu cầu của sự phát triển cơ thể thì cá thể mang các đột biến này ở trạng thái đồng hợp sẽ không sống sót. Những đột biến như thế được gọi là đột biến lặn gây chết (recessive lethals). Các đột biến có thể là trội (dominant) hoặc lặn (recessive). Đôi với các cơ thể đơn bội như virus và vi khuẩn cả hai dạng đột biến trội và lặn đều có thể phát hiện được bởi hậu quả kiểu hình do chúng gây nên ở cơ thể. Còn đối với cơ thể lưỡng bội như cây lúa, ruồi quả hay con người thì chỉ có các đột biến lặn ở trạng thái đồng hợp mới thể hiện ra ở kiểu hình đột biến.

Như vậy trong cơ thể lưỡng bội các đột biến lặn sẽ không thể nhận biết được nếu cơ thể ở trạng thái dị hợp vì chúng không gây nên sự thể hiện kiểu hình. Tuy nhiên các đột biến liên kết giới tính với thể nhiễm sắc X là ngoại lệ bởi vì chúng sẽ được biểu hiện ra kiểu hình khi ở trạng thái bán hợp tử (hemizygote) trong các cơ thể dị giao tử (ví dụ cá thể đực ở ruồi quả hoặc người; cá thể cái ở bướm hoặc chim). Những đột biến gây chết lặn liên kết với X sẽ làm thay đổi tỷ số giới tính ở thế hệ con, bởi vì các cá thể bán hợp tử mang gen đột biến lặn sẽ không sống sót.

7. Đa số các đột biến đều có hại và lặn. Kết luận đó của các nhà di

truyền học khi nghiên cứu khảo sát trên hàng nghìn đột biến khác nhau là căn cứ vào sự hiểu biết về sự kiểm tra di truyền sự trao đổi chất và với nhiều kỹ thuật phát hiện các đột biến.

Sự trao đổi chất bao gồm trình tự các phản ứng hoá học trong đó mỗi một giai đoạn được xúc tác bởi các enzym đặc trưng được mã hoá bởi một hay nhiều gen. Đột biến trong các gen này sẽ dẫn tới ức chế một khâu nào đó trong quá trình trao đổi chất. Sự thay đổi trong trình tự các nucleotit của gen dẫn tới thay đổi trong trình tự các axit amin của polypeptit do đó dẫn đến tạo thành các enzym không có hoạt tính chức năng. Đó là hậu quả thường thấy khi có đột biến gen. Vì lẽ rằng mã di truyền là thoái hoá nghĩa là một axit amin được mã hoá bởi nhiều codon, cho nên có nhiều đột biến không gây hậu quả kiểu hình cho cơ thể, do đó người ta gọi chúng là các đột biến trung tính (neutral mutation). Hơn nữa vai trò của các axit amin trong polypeptit không như nhau, ví dụ các axit amin tạo nên trung tâm hoạt tính của enzym là rất quan trọng do đó nếu đột biến xảy ra ở các codon mã hoá cho các axit amin đó sẽ gây hậu quả tác hại lớn hơn so với các axit amin khác.

Khi nghiên cứu các sai lệch hemoglobin ở người, các nhà di truyền học đã chứng minh tính chất gây hại của các đột biến. Người bình thường khoẻ mạnh có hồng cầu chứa hemoglobin A, trong lúc đó người bị bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm có hồng cầu chứa hemoglobin S.

Hemoglobin A chứa hai mạch globin α và hai mạch globin β . Mỗi mạch α gồm 141 axit amin, còn mỗi mạch β gồm 146 axit amin. Khi so sánh mạch β của hemoglobin A với mạch β của hemoglobin S, người ta thấy có sự sai khác thể hiện ở chỗ trình tự axit amin ở vị trí số 6 ở mạch β của hemoglobin A là axit glutamic đã bị thay thế bởi valin ở mạch β của hemoglobin S. Trong lúc đó hai mạch α ở cả hai hemoglobin A và S hoàn toàn giống nhau. Như vậy chỉ do sai lệch một axit amin trong hàng trăm axit amin đã dẫn đến sai lệch trong polypeptit, trong tế bào (hồng cầu hình lưỡi liềm) và cả cho cơ thể (bị bệnh thiếu máu).

Sự thay thế axit glutamic trong HbA bằng valin trong HbS là do đột biến trong các codon mã hoá cho các axit amin này nghĩa là do sự thay thế nucleotit A bởi nucleotit T dẫn đến codon GAG/CTC (mã hoá cho axit glutamic) đột biến thành codon GTG/CAC (mã hoá cho valin).

Người ta đã phát hiện được hàng trăm dạng hemoglobin sai lệch do sự thay đổi trong mạch β và thường là do sự thay thế chỉ một axit amin nghĩa

là do đột biến trong một codon của gen mã hoá cho mạch β . Ví dụ sai lệch hemoglobin ở người đã chứng minh rằng đột biến gen là quá trình biến đổi trong cấu trúc của gen và thường là sự biến đổi một hoặc vài đôi nucleotit dẫn đến làm thay đổi trình tự của các axit amin trong polypeptit. Sự thay đổi trong cấu trúc protein đến lượt mình dẫn đến làm thay đổi kiểu hình của cơ thể và có thể đó được gọi là thể đột biến (mutant).

Đột biến gen có thể gây hậu quả úc chế một hay vài khâu trong quá trình trao đổi chất do đó dẫn đến làm thay đổi kiểu hình mà ở người thể hiện nhiều bệnh khác nhau vì lẽ rằng đột biến một hay vài gen dẫn đến sự bất hoạt của gen do đó không sản sinh ra enzym (hoặc sản sinh enzym không có hoạt tính) dẫn đến úc chế các khâu của quá trình trao đổi chất dẫn đến gây bệnh. Ví dụ bệnh phenylketon niệu (làm chậm phát triển trí não) là do có đột biến lặn trong các gen mã hoá cho các enzym có chức năng chuyển hóa phenylalanin-tyrosin. Bệnh bạch tạng là do thiếu sắc tố melanin trong da, tóc, mắt gây nên do sai lệch trong các enzym có vai trò chuyển hóa tyrosin thành melanin. Bệnh bạch tạng là bệnh di truyền lặn theo thể nhiễm sắc thường, vì vậy nếu ở trạng thái dị hợp vẫn có màu da bình thường.

Đột biến gây chết có điều kiện là những đột biến gây chết cho cơ thể mang đột biến chỉ trong điều kiện giới hạn nào đó của môi trường, còn khi ở trong điều kiện khác (được gọi là điều kiện chấp nhận) sẽ tồn tại và phát triển. Nghiên cứu các đột biến gây chết có điều kiện cho phép các nhà di truyền học phát hiện và xác định được sự đột biến của gen cần nghiên cứu vì hậu quả của đột biến sẽ thể hiện ở sự thiếu hản sản phẩm có hoạt tính của gen đó ở cá thể đơn bội. Đột biến mang đặc tính gây chết có thể tồn tại và phát triển trong các điều kiện chấp nhận và các hiểu biết về chức năng của protein do gen đó mã hoá có thể xác định được khi chúng không thể hiện trong các điều kiện giới hạn.

Người ta đã sử dụng các đột biến có điều kiện để nghiên cứu làm sáng tỏ nhiều quá trình sinh học như quá trình phát triển cá thể, quá trình quang hợp v.v., hoặc để thành lập bản đồ gen của cơ thể. Ba thể đột biến gây chết có điều kiện được nghiên cứu nhiều nhất là: 1) thể đột biến trợ dưỡng (auxotrophic mutants); 2) thể đột biến cảm nhiệt (temperature-sensitive mutants); và 3) thể đột biến cảm úc chế (suppressor-sensitive mutants).

Thể đột biến trợ dưỡng là các thể đột biến không sống được trong

điều kiện môi trường thiếu một số axit amin, purin, pirimidin hoặc vitamin nào đó (các cá thể kiểu đại sê sống và phát triển được trong môi trường đó vì chúng có khả năng tự tổng hợp được các chất này, còn thể đột biến đã mất khả năng đó). Các thể đột biến trợ dưỡng sê sống và phát triển khi người ta cho thêm các chất trên vào môi trường (tức ở điều kiện chấp nhận), còn trong môi trường thiếu các chất trên chúng sẽ chết (tức là ở điều kiện giới hạn)

Thể đột biến cảm nhiệt là các thể đột biến chỉ tồn tại ở một nhiệt độ nhất định, ở nhiệt độ khác chúng sẽ chết. Đó là vì gen đột biến đã sản xuất ra enzym có hoạt tính ở nhiệt độ thấp, nếu nhiệt độ cao hơn chúng sẽ mất hoạt tính.

Thể đột biến cảm ức chế là các thể đột biến sê sống và phát triển khi có mặt của gen thứ hai là gen ức chế nếu thiếu gen ức chế chúng sẽ chết. Gen ức chế đóng vai trò sửa chữa hoặc hỗ trợ cho các sai sót xảy ra do gen gây đột biến gây nên.

Các nhà di truyền học sử dụng phương pháp phân tích các đột biến gây chết có điều kiện cũng như các đột biến nói chung để làm sáng tỏ nhiều giai đoạn của quá trình phát triển cá thể, quá trình chuyển hóa các chất, quá trình quang hợp, quá trình hoạt hóa và điều chỉnh hoạt hóa của gen.

8. Cơ sở phân tử của đột biến gen. Như ta đã biết đột biến gen là đột biến xảy ra do có sự sai lệch trong ADN của gen. Sự sai lệch đó gây nên do sự thay thế nucleotit (được gọi là đột biến thay thế) hoặc do sự mất nucleotit (được gọi là đột biến mất) hoặc do sự thêm nucleotit (được gọi là đột biến thêm) trong mạch ADN cấu tạo nên gen.

Đột biến thay thế (substitutions) được gọi là đột biến chuyển (transition) là trường hợp một purin này bị thay thế bởi purin khác (ví dụ thay thế A bởi G hoặc ngược lại), pirimidin này bởi pirimidin khác (ví dụ thay thế T bởi C hoặc ngược lại), hay được gọi là đột biến chuyển ngược (transversions) là trường hợp một purin bị thay thế bởi một pirimidin hoặc ngược lại (ví dụ thay thế A bởi C, thay thế C bởi A; hoặc thay thế G bởi T thay thế T bởi G).

9. Cơ chế của các đột biến có thể là :

a. *Do sự biến dạng của ADN dẫn tới sự bắt cặp bổ sung sai và do cá sai sót khi lắp ráp nucleotit do ADN-polymeraza thực hiện*

b. *Do sự dịch chuyển các nguyên tử hydro dẫn tới tạo thành các dàn*

tautomer của nucleotit và dẫn đến sự lấp ráp sai lệch các cặp khác với A-T và G-C

c. *Do sự thay đổi hoá học của các nucleotit.* Người ta đã phát hiện được các nucleotit ở dạng thay đổi hoá học như 5-methycytosin là do sự methyl hoá cytosin bởi enzym methylaza của tế bào, vì 5-methycytosin khi bị khử amin đã chuyển hoá thành tymine do đó dẫn tới sự bất cặp sai G-T.

Các đột biến mất hoặc đột biến thêm xảy ra là do sự mất đi hoặc thêm vào một hoặc vài nucleotit trong quá trình tái bản ADN. Các đột biến này thường làm thay đổi trình tự sắp xếp của nucleotit trong ADN do đó làm sai lệch các codon, vì vậy còn được gọi là đột biến dịch khung (frameshift mutations). Các đột biến dịch khung thường gây nên các hậu quả thể hiện ở sự tổng hợp các protein không có hoạt tính.

Ba dạng đột biến gen: *đột biến chuyển, đột biến ngược và đột biến dịch khung* đều có nguyên nhân là sự sai lệch trong ADN của gen, là sự trực tiếp trong bộ máy tái bản ADN, là sự kém hiệu quả của bộ máy sửa chữa ADN, sửa chữa không hết các sai sót xảy ra trước và trong quá trình tái bản ADN và cũng là do các tác nhân gây đột biến có trong môi trường sống như các bức xạ từ ngoại, bức xạ ion hoá, nhiệt hoặc các chất hoá học gây đột biến v.v.

B. TRAO ĐỔI CHÉO MITOS. TÁI TỔ HỢP SOMA

Sự trao đổi chéo và tái tổ hợp gen xảy ra trong tiền kỳ của phân bào giảm nhiễm (meiosis) là đặc trưng cho sự sinh sản hữu tính khi hình thành giao tử của dòng tế bào sinh dục. Nhưng trong quá trình phát triển và biệt hoá các tế bào soma người ta đã quan sát thấy hiện tượng trao đổi chéo và tái tổ hợp gen giữa hai thành viên của cặp tương đồng qua mitos được gọi là tái tổ hợp soma (somatic recombination).

I. TÁI TỔ HỢP SOMA Ở NẤM ASPERGILLUS

Nấm *Aspergillus nidulans* ở dạng các khuẩn ty (mixel) thường là đơn bội nhưng nhiều khi chúng liên kết tạo thành khuẩn ty lưỡng bội $2n$ và

trong nhiều trường hợp là cá thể dị hợp tử (heterozygote) về một gen nào đó. Khi những tế bào này phân chia mitos thường quan sát thấy hiện tượng trao đổi chéo và tái tổ hợp gen. Sự trao đổi chéo xảy ra ở *Aspergillus* cho phép tạo nên những tổ hợp di truyền thích hợp để nấm có thể thích nghi dễ dàng với các thay đổi của môi trường sống. Bằng phương pháp đánh dấu gen có thể xác định được tần số tái tổ hợp gen xảy ra qua trao đổi chéo soma cũng như tần số đột biến soma.

II. TÁI TỔ HỢP SOMA Ở RUÔI QUẢ

Ở ruồi quả *Drosophila melanogaster* qua phân bào mitos đã quan sát thấy có trao đổi chéo giữa các nhiễm sắc tử không phải chị em ở tiền kỳ. Có những con ruồi cái dị hợp về các gen lặn y (thân có màu vàng) và sn (lông cong):

$$\frac{y \text{ sn}^+}{y^+ \text{ sn}}$$

Đây là những gen liên kết định khu trong thể nhiễm sắc X. Những cá thể cái này thường có thân màu xám và lông thẳng nhưng đôi khi xuất hiện những cá thể cái dị hợp mang một số bộ phận kh盻m túc là có phần thân màu vàng và phần thân mang lông cong. Xuất hiện phân thân thể với các tính trạng lặn rõ ràng là có liên quan tới hiện tượng trao đổi chéo trong tế bào soma. Khi làm tiêu bản tế bào mitos, đã quan sát thấy sự kết hợp của các cặp thể nhiễm sắc tương đồng và các điểm trao đổi chéo ở tiền kỳ. Tuỳ thuộc vào miền trao đổi chéo xảy ra giữa gen sn và trung tiết (centromere) hoặc giữa gen y và sn - sẽ xuất hiện hai điểm (sn và y) hoặc một điểm (chỉ có sn hoặc y). Điểm chéo đơn thường hiếm gặp bởi vì gen y và gen sn định khu gần nhau do đó trao đổi chéo giữa chúng xảy ra với tần số thấp.

Đối với ruồi quả, trao đổi chéo mitos xảy ra không chỉ đối với thể nhiễm sắc giới tính mà còn quan sát thấy ở các thể nhiễm sắc thường, ví dụ thể nhiễm sắc số II và III. Sự hình thành thể nhiễm sắc đa sợi ở tuyến nước bọt áu trùng ruồi quả không chỉ thể hiện đặc tính tăng cao số lượng sợi nhiễm sắc, đặc tính lặp đoạn ('chứa nhiều đĩa và gian đĩa) mà còn thể hiện đặc tính trao đổi chéo soma. Trên tiêu bản số lượng thể nhiễm sắc chỉ có bốn dải dài đính với nhau tại trung nhiễm sắc (chromocentre) và đính với hạch nhân (ở ruồi quả $2n = 8$) chứng tỏ các cặp thể nhiễm sắc tương đồng xếp tiếp hợp với nhau.

III. TÁI TỔ HỢP SOMA Ở ĐỘNG VẬT CÓ VÚ VÀ NGƯỜI

Để làm sáng tỏ một dạng tái tổ hợp soma xảy ra trong quá trình biệt hoá tế bào soma ta hãy dẫn ví dụ về sự tái tổ hợp các gen mã hoá cho globulin miễn dịch trong các dòng tế bào limpho.

1. Globulin miễn dịch (Ig-immunoglobulin) hay còn gọi là kháng thể (antibody) là loại glicoprotein được sản xuất bởi các tương bào có nguồn gốc từ tế bào limpho B. Khi có protein lạ được gọi là kháng nguyên (antigen) xâm nhập vào cơ thể thì cơ thể sẽ đáp ứng lại bằng chuỗi các đáp ứng miễn dịch tế bào và miễn dịch thể dịch. Cơ sở của đáp ứng miễn dịch là tổng hợp các Ig đặc trưng phản ứng liên kết với kháng nguyên làm trung hoà và mất độc tính của chúng.

Bất kỳ một loại kháng nguyên đặc trưng nào xâm nhập vào cơ thể đều bị các kháng thể đặc trưng tương ứng làm trung hoà, như vậy nếu có đến hàng tỷ kháng nguyên đặc trưng khác nhau thì cơ thể phải sản xuất hàng tỷ kháng thể đặc trưng tương ứng khác nhau và trong hệ gen của tế bào limpho phải có đến hàng tỷ gen mã hoá cho các kháng thể đó. Trong thực tế trong tế bào người (kể cả tế bào limpho) $2n$ chứa 6×10^9 đôi nucleotit về lý thuyết có thể mã hoá cho 1 - 2 triệu gen (nếu tính trung bình một gen dài từ 1500 - 1800 đôi nucleotit), nhưng thực chất chỉ có 40.000 gen được hoạt hoá. Như vậy phải có một cơ chế nào đó đảm bảo cho tế bào sản xuất đủ kháng thể đặc trưng đáp ứng đủ các dạng kháng nguyên.

Di truyền miễn dịch phân tử đã cho chúng ta câu trả lời:

a. Trong hệ gen của tế bào limpho có tồn tại họ gen gồm nhiều gen mã hoá cho mỗi một vùng (domaine) của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (khoảng 100 - 200 gen).

b. Có sự đột biến soma trong gen V nguyên gốc trong quá trình phát triển cá thể của tế bào limpho B.

c. Có sự tái tổ hợp soma giữa các gen trong họ gen mã hoá cho các vùng V (vùng biến đổi) và vùng C (vùng ổn định) của mạch L (mạch nhẹ) và mạch H (mạch nặng) của phân tử Ig.

Sự tái tổ hợp gen xảy ra trong quá trình phát triển và biệt hoá của tế bào B để đạt tới sự tổng hợp các phân tử kháng thể đặc trưng đủ đáp ứng với tính đặc trưng đa dạng của kháng nguyên. Sự tái tổ hợp soma để tạo nên những gen mới từ những thành phần gen thuộc cùng họ gen cũng được quan sát thấy trong các họ gen mã hoá cho các họ protein phức tạp, ví dụ

protein thụ thể tế bào limpho T (TCR) hoặc tế bào B (BCR). Tính đa dạng của thụ thể có thể đạt tới 10^9 loại phân tử khác nhau. Nhờ sự sắp xếp lại các gen tạo nên những tổ hợp gen mới đủ đáp ứng sự tổng hợp các thụ thể đa dạng đó.

2. **Sự tái tổ hợp** các gen có sẵn để tạo nên những gen mới với sự xử lý chế biến các tiền mARN sau phiên mã để tạo nên các mARN chín khác nhau là cơ sở tạo nên sự đa dạng trong các họ protein của tế bào và cơ thể.

C. ADN TÁI TỔ HỢP VÀ KỸ THUẬT GEN

Chúng ta hãy xem xét việc xây dựng một phân tử ADN tái tổ hợp. Sử dụng các enzym giới hạn (restriction enzymes) là các enzym có khả năng cắt phân tử ADN ở vị trí các nucleotit đặc thù và enzym gắn (ligaza). Các nhà kỹ thuật di truyền có thể cắt và gắn các đoạn ADN có nguồn gốc khác nhau để tạo nên ADN lai được gọi là **ADN tái tổ hợp** (recombination DNA) và sử dụng chúng trong kỹ thuật gen. Đơn giản nhất khi phân tử đó bao gồm vecto (vector) và một đoạn ADN lạ. Ngoài ra có thể ghép hai hoặc nhiều đoạn ADN có nguồn gốc khác nhau hoặc xuất phát từ các gen khác nhau của một cơ thể rồi đưa chúng vào cùng một vecto. Bằng cách đó, chúng ta có thể thu được phân tử ADN có chuỗi nucleotit theo ý muốn mà không nhất thiết phải tổng hợp chúng bằng con đường nhân tạo (hình 2.1).

I. NGHIÊN CỨU VAI TRÒ CỦA ADN ĐIỀU KHIỂN, CHỨC NĂNG CỦA GEN HOẶC PROTEIN

Phiên mã thông tin di truyền từ một gen được kiểm soát bởi vùng ADN điều khiển (promoter, enhancer....) và pôhụ thuộc vào từng loại tế bào trong các điều kiện khác nhau. Các đoạn ADN này thường nằm trước hoặc sau gen hàng nghìn nucleotit và cùng nhau phối hợp hoạt động. Với một gen bất kỳ, các đoạn ADN điều khiển có thể xác định được nhờ gắn đoạn ADN nằm trước hoặc sau gen đó với một đoạn ADN đặc biệt mã cho một protein đặc hiệu. Đoạn ADN đặc biệt đó được gọi là **gen báo cáo** (reporter gene). Sản phẩm của gen báo cáo được gọi là **protein báo cáo** (reporter protein).

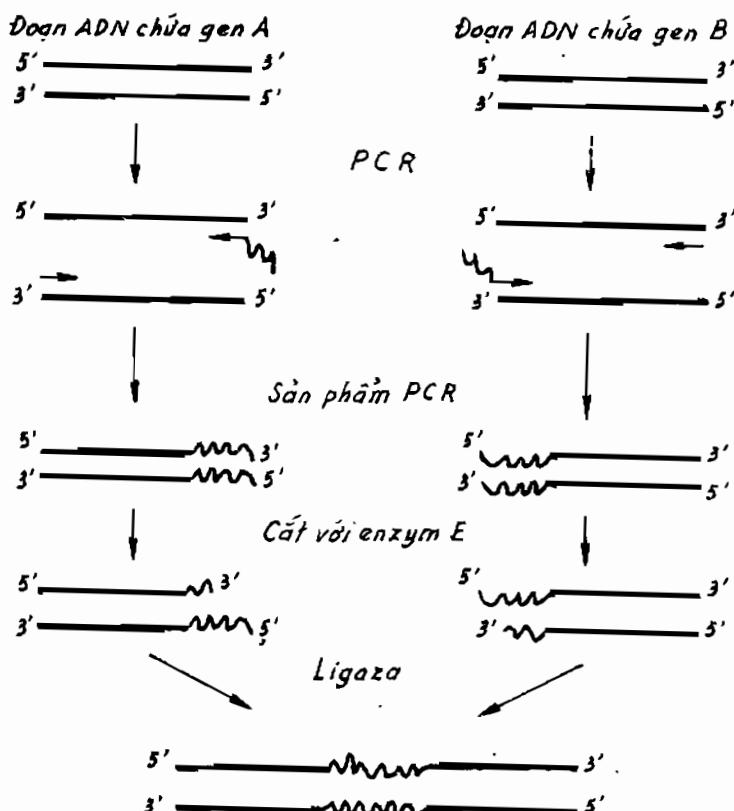
Protein này phát hiện dễ dàng nhờ phản ứng enzym hoặc nhuộm tế bào. Khi đưa phân tử ADN tái tổ hợp xây dựng theo cách này vào tế bào, có thể xác định được thời gian, mức độ hoạt động cũng như đặc tính của gen ghép với gen báo cáo thông qua protein báo cáo.

Khi các

phân tử mARN của một gen đã biết được tổng hợp rất ít trong tế bào, việc tách và tinh sạch

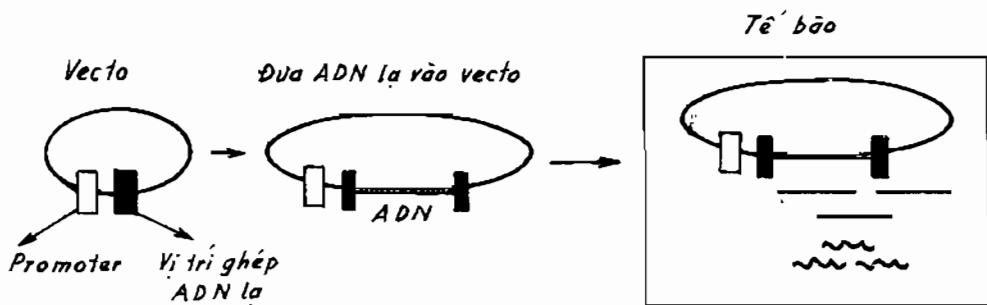
chúng rất khó khăn. Để khắc phục nhược điểm đó, phân tử ADN tái tổ hợp được xây dựng gồm gen đã biết nối với promoter virut. Promoter này được nhận biết bởi ARN polymeraza của virut. Phân tử ADN này được ủ với enzym và bốn loại ribonucleosit triphotphat để tổng hợp *in vitro* các phân tử mARN với số lượng mong muốn.

Để nghiên cứu chức năng, cấu trúc protein tương ứng với một gen đã biết, phương pháp dùng vecto biểu hiện (expression vector) hay còn gọi là phương pháp biểu hiện gen được áp dụng để thu số lượng lớn mARN và



Hình 2.1. Nối các đoạn ADN với nhau bằng phương pháp sử dụng đuôi 5'. Trong phản ứng PCR khi đầu 3' bám vào ADN khuôn, Taq polymeraza tổng hợp sợi ADN mới ngay khi đầu 5' chưa tạo cặp với ADN khôn. Sử dụng tính chất này, một chuỗi oligonucleotid có chứa vị trí cắt của enzym giới hạn E được thêm vào đầu 5' của mỗi, do đó mọi sản phẩm PCR tạo ra đều có vị trí nhận biết của enzym E. Cắt sản phẩm PCR với enzym này tạo đầu đính. Phương pháp này được sử dụng để đưa các đoạn ADN vào vecto.

protein tương ứng trong tế bào sống (hình 2.2). Vecto này mang promoter biểu hiện mạnh nằm gần vị trí ghép gen. Khi đưa vecto vào tế bào sống (tế bào vi khuẩn, virut, nấm men, tế bào động, thực vật), mRNA tương ứng với gen trong vecto cũng như protein được tổng hợp với số lượng lớn. Để tránh hiện tượng protein lạ gây ảnh hưởng tới sự phát triển của tế bào, trong thực tế thường sử dụng các tế bào nhạy cảm nhiệt độ. Phương pháp này rất có hiệu quả trong việc sản xuất vaccine hoặc bất kỳ protein nào với số lượng lớn.

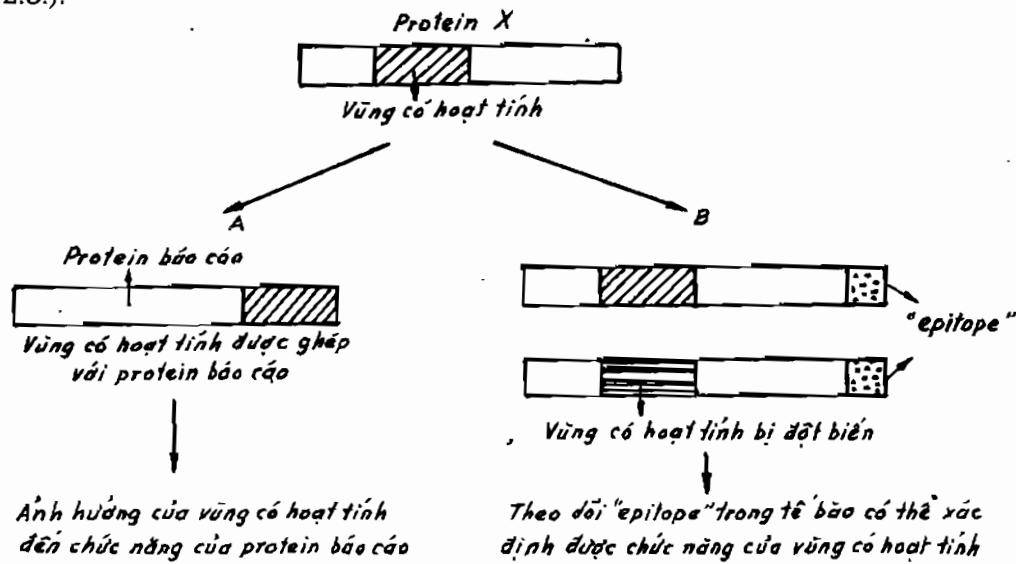


Hình 2.2. Số lượng lớn protein được tạo ra nhờ tách dòng (cloning) đoạn ADN chứa thông tin di truyền vào vecto hoạt động. Vecto này mang promoter hoạt động mạnh, do đó số lượng mRNA và protein tương ứng được tổng hợp nhiều.

Protein thường có đầu NH₂ làm nhiệm vụ cố định protein ở vị trí thích hợp trong tế bào hoặc đảm bảo độ bền vững của nó sau khi tổng hợp. Để nghiên cứu vai trò của đoạn axit amin này, đầu NH₂ của protein cần nghiên cứu được nối với protein báo cáo đã bị cắt bỏ đầu NH₂. Phân tử protein lai này được gọi là protein dung hợp (fusion protein). Kỹ thuật tái tổ hợp ADN cho phép xây dựng phân tử ADN gồm những đoạn nucleotit khác nhau của một gen ghép với gen báo cáo. Từ đó sản phẩm protein lai cho phép xác định chức năng của các đoạn quan trọng trong chuỗi polypeptit có liên quan đến vận chuyển, cố định hoặc hoạt tính của protein.

Không phải mọi phân tử quan trọng của một protein đều có thể ghép được với protein báo cáo. Ví dụ như để vận chuyển protein từ phức hệ Golgi đến lysosom, các đoạn peptit liên quan đến tín hiệu vận chuyển của protein này nằm xa nhau trên phân tử protein và phải được gấp lại theo một cấu trúc đặc biệt khiến chúng trở nên gắn. Để nghiên cứu vai trò của các đoạn này, kỹ thuật "epitope tagging" được sử dụng. Toàn bộ protein cần nghiên

cứu được ghép với một đoạn peptit ngắn 8-12 axit amin. Đoạn này phát hiện dễ dàng nhờ kháng thể. Vị trí, chức năng cũng như sự di chuyển trong tế bào của protein lai được theo dõi nhờ kháng thể, do đó mọi ảnh hưởng do thay thế bất kỳ axit amin nào trong protein đều có thể xác định được (hình 2.3.).



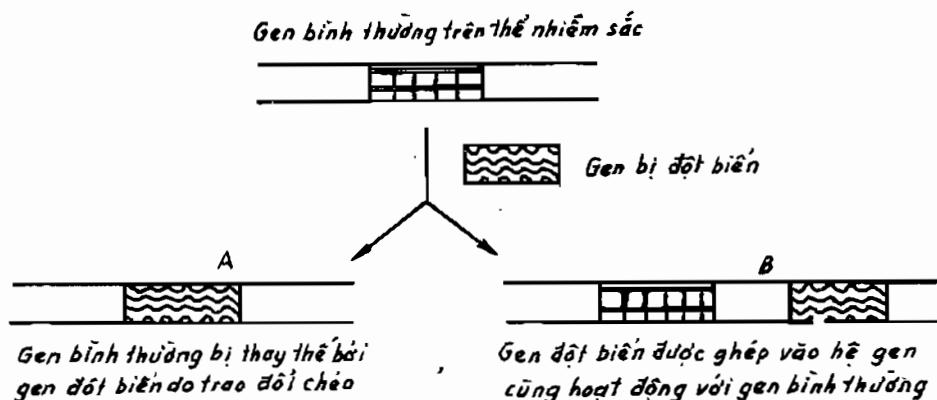
Hình 2.3. Hai kỹ thuật khác nhau cho phép phân tích cấu trúc và chức năng của protein. (A) Theo dõi chức năng mới xuất hiện do ghép protein báo cáo với đoạn nhỏ của protein X cần nghiên cứu. (B) Những thay đổi do đột biến có thể so sánh được giữa protein bình thường và protein đột biến nhờ quan sát "epitope" gắn vào chúng.

II. THAY THẾ HOẶC GÂY ĐỘT BIỂN GEN

Hệ gen (genome) trong tế bào vi khuẩn và một số tế bào nhân chuẩn bậc thấp thường tồn tại ở dạng đơn bội. Thực nghiệm cho thấy đối với những cơ thể này, việc một gen đột biến có thể thay thế cho một gen bình thường (đang hoạt động) do trao đổi chéo tương đồng xảy ra với tần số đáng kể (hình 2.4).

Thông thường, các gen đột biến được chọn sao cho sản phẩm của chúng nhạy cảm với nhiệt độ, tức là gen chỉ hoạt động ở một nhiệt độ thích hợp. Khi chuyển sang nhiệt độ cao hơn hoặc thấp hơn, chúng sẽ bị ức chế hoàn toàn. Loại tế bào nhạy cảm với nhiệt độ được sử dụng rất rộng rãi trong nghiên cứu chức năng, vai trò của protein.

Đối với sinh vật bậc cao như động vật có vú, hệ gen thường tồn tại ở dạng lưỡng bội, các cặp thể nhiễm sắc tương đồng. Quá trình thay thế gen xảy ra rất hiếm với những sự hiểu biết chưa được sáng tỏ. Tuy nhiên, khi đưa một gen đột biến vào tế bào, gen này thường được ghép vào một vị trí bất kỳ trong hệ gen. Do đó bên cạnh gen bình thường, một bản sao của gen cùng tồn tại trong hệ gen nhưng ở dạng đột biến (hình 2.4).



Hình 2.4. Thay thế hoặc bổ sung gen vào hệ gen. (A) Đối với vi khuẩn hoặc các cơ thể đơn bào (nhân chuẩn) bậc thấp, gen đột biến thay thế gen bình thường nhờ trao đổi chéo giữa hai chuỗi nucleotit đồng dạng. (B) Ở cơ thể bậc cao, gen đột biến thường được ghép vào thể nhiễm sắc, do đó hệ gen mang cả gen đột biến và gen bình thường.

Trong thực nghiệm hay sử dụng gen đột biến gây kìm hãm hoàn toàn hoạt động của gen bình thường. Những đột biến này được gọi là đột biến tiêu cực trội (dominant negative mutation). Phản ứng lai ADN được áp dụng để thực hiện những đột biến này. Chúng ta biết rằng khi phiên mã, sợi kép ADN mở xoắn một trong hai sợi đơn được dùng làm khuôn để tổng hợp mARN. Nếu gen đột biến được chọn sao cho nó có trình tự nucleotit chính xác như sợi đơn bổ sung cho sợi khuôn thì việc sao chép thực hiện trên gen đột biến sẽ tạo ra những phân tử ARN có khả năng lai với phân tử mARN của gen bình thường. Do đó quá trình tổng hợp protein bị ức chế hoàn toàn. Trong kỹ thuật này, các phân tử mARN của gen đột biến được gọi là mARN-đối nghĩa (mARN- antisense) (hình 2.5).

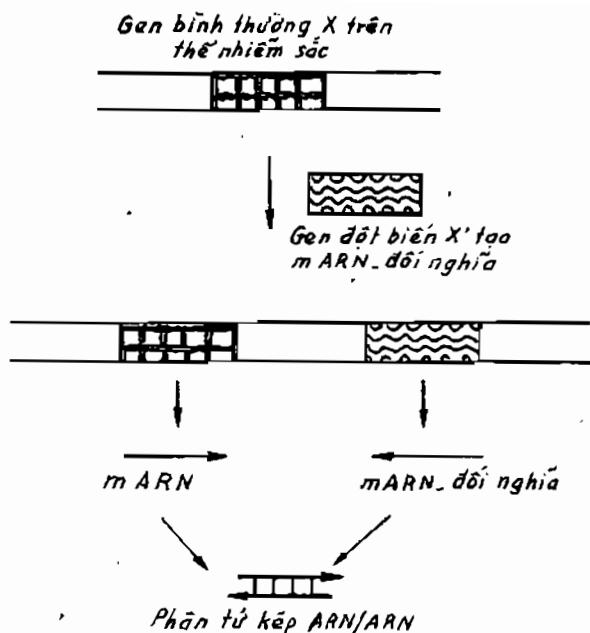
Ngoài ra có thể đưa các phân tử ADN hoặc ARN ngắn được tổng hợp nhân tạo bằng phương pháp hóa học hoặc enzym vào tế bào sống để tạo phân tử lai gen hoặc với mARN của gen cần nghiên cứu. Do đó, quá trình

phiên mã hoặc tổng hợp protein trên những mARN này bị kìm hãm hoàn toàn. Tuy nhiên trong thực tế, việc lai giữa mARN-đổi nghĩa và mARN không phải luôn luôn thực hiện được dễ dàng. Để khắc phục điều đó, các nghiên cứu thường tiến hành trên protein. Trong tế bào, protein thường có hoạt tính khi ở dạng phức hợp do liên kết giữa hai hoặc nhiều chuỗi polypeptit. Nếu như protein giữ vai trò quan trọng trong hoạt động sống của tế bào, việc gây mất hoạt tính của nó sẽ dẫn đến tế bào bị chết. Do đó để có thể quan sát được tính trạng, các gen mang đột biến tiêu cực trội chỉ hoạt

động trong những điều kiện nhất định. Ví dụ như sử dụng các tế bào nhạy cảm nhiệt độ, khi chuyển chúng sang nhiệt độ không thích hợp các gen đột biến mới hoạt động (cùng với gen bình thường) tạo phân tử protein không có hoạt tính. Nhờ đó vai trò, chức năng của protein được xác định.

Ghép một gen đột biến vào hệ gen động vật bậc cao xảy ra với tần số cao hơn việc thay thế gen do trao đổi chéo tương đồng. Tuy nhiên, bất kỳ một gen nào cũng có thể bị ức chế hoàn toàn nhờ thay thế gen. Kỹ thuật này gồm hai bước quan trọng như sau:

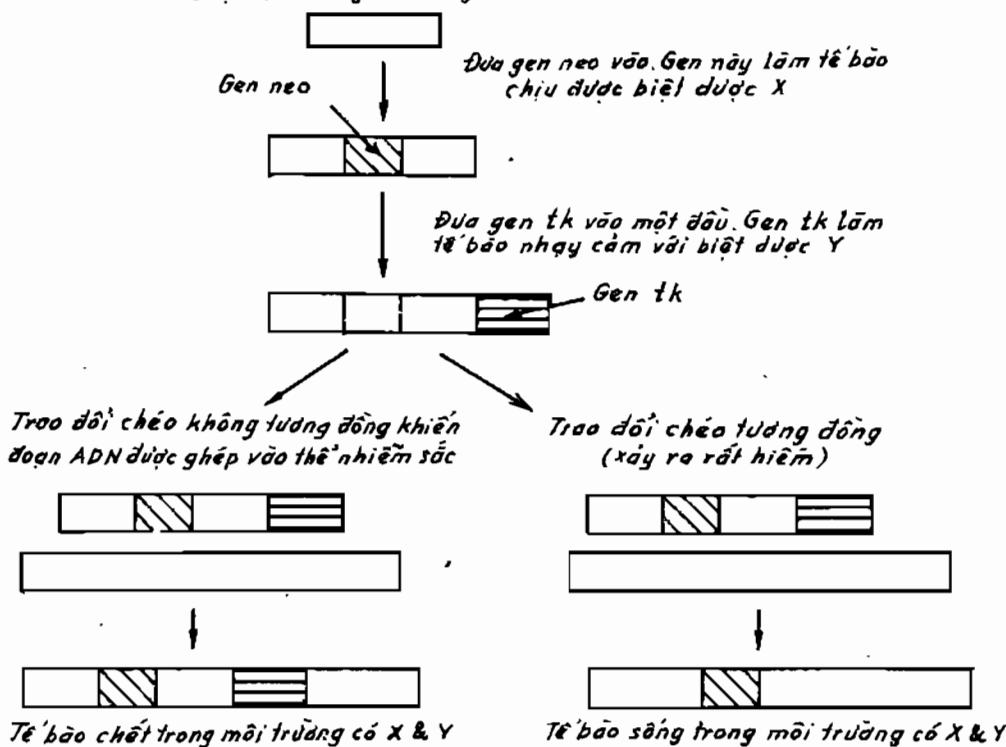
a. Bước đầu tiên, gen đột biến được đưa vào vecto và sau đó đưa vecto chứa gen vào dòng tế bào mầm của phôi (embryonic stem cell). Các tế bào này được nuôi cấy và có khả năng tạo ra các tế bào của loại mô bất kỳ. Khi số lượng tế bào tăng, trong một số rất ít tế bào có xảy ra trao đổi chéo tương đồng gây hiện tượng thay thế gen. Các tế bào này được phân lập dựa vào sự chọn lọc các điểm đánh dấu di truyền (hình 2.6).



Hình 2.5 Tao đột biến tiêu cực trội bằng phân tử mARN đổi nghĩa. Phân tử ARN đổi nghĩa có trình tự nucleotit bổ sung với phân tử mARN bình thường (mARN-sense). Hai phân tử này liên kết tạo phân tử dạng kép, ngăn cản quá trình tổng hợp protein mARN bình thường.

Đoạn ADN chứa gen đột biến ở chuột được biến đổi sao cho mang thêm

Đoạn ADN của gen cần nghiên cứu



Hình 2.6. Trao đổi chéo tương đồng gây mất gen ở chuột.

gen *neo* của vi khuẩn. Gen này giúp cơ thể chống lại độc dược (nếu không có gen này cơ thể sẽ bị chết). Tiếp theo gen *tk* của vi khuẩn được ghép tiếp vào một đầu của đoạn ADN này. Tế bào mang gen *tk* trở nên nhạy cảm với loại biệt dược thứ hai. Đoạn ADN này được đưa vào tế bào và chúng được ghép vào thể nhiễm sắc một cách ngẫu nhiên. Chọn lọc các tế bào có khả năng chống chịu được cả hai biệt dược. Trao đổi chéo xảy ra trong chúng khiến cho phần giữa của đoạn ADN được ghép vào thể nhiễm sắc và hai đầu của nó bị loại bỏ. Do đó gen đột biến được đưa vào thể nhiễm sắc thay cho gen bình thường. Xác suất xảy ra trao đổi chéo thay thế gen nhỏ hơn rất nhiều xác suất bổ sung gen vào hệ gen.

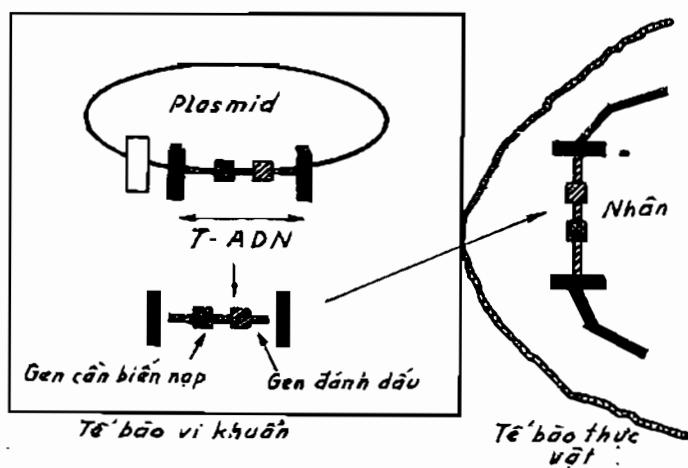
Nhờ kỹ thuật PCR hoặc Southern blot có thể phát hiện được sự thay thế toàn bộ hoặc từng phần gen bình thường bởi gen đột biến.

b. Tiếp theo, các tế bào chọn lọc ở bước thứ nhất được đưa riêng rẽ vào

mô phôi chuột ở giai đoạn sớm. Các tế bào mầm phôi có chứa gen đột biến cùng với tế bào ở phôi nhận gen sẽ phát triển thành chuột con bình thường, nhưng ở trạng thái dị hợp tử đối với gen bị thay thế (tức là chúng chứa một gen bình thường và một gen đột biến trên hai nhiễm sắc thể tương đồng). Khi các con chuột F₁ tự giao phối với nhau, 1/4 số con của chúng sẽ ở trạng thái đồng hợp tử đối với gen đột biến. Nghiên cứu trên những con chuột thuần chủng này có thể xác định được chức năng của gen bị thay thế.

III. BIẾN ĐỔI HỆ GEN THỰC VẬT

Khi thực vật bị tổn thương, các tế bào đã biệt hóa bước vào phân chia, dẫn đến tăng số lượng tế bào và chúng có khả năng tiếp tục biệt hóa tạo ra các loại tế bào khác nhau. Thậm chí ở một số loài cây, tế bào biệt hóa vẫn có khả năng phát triển thành cây hoàn chỉnh cho các giao tử. Tính chất đặc biệt này của tế bào thực vật được ứng dụng để tái tạo cây từ tế bào nuôi cấy.

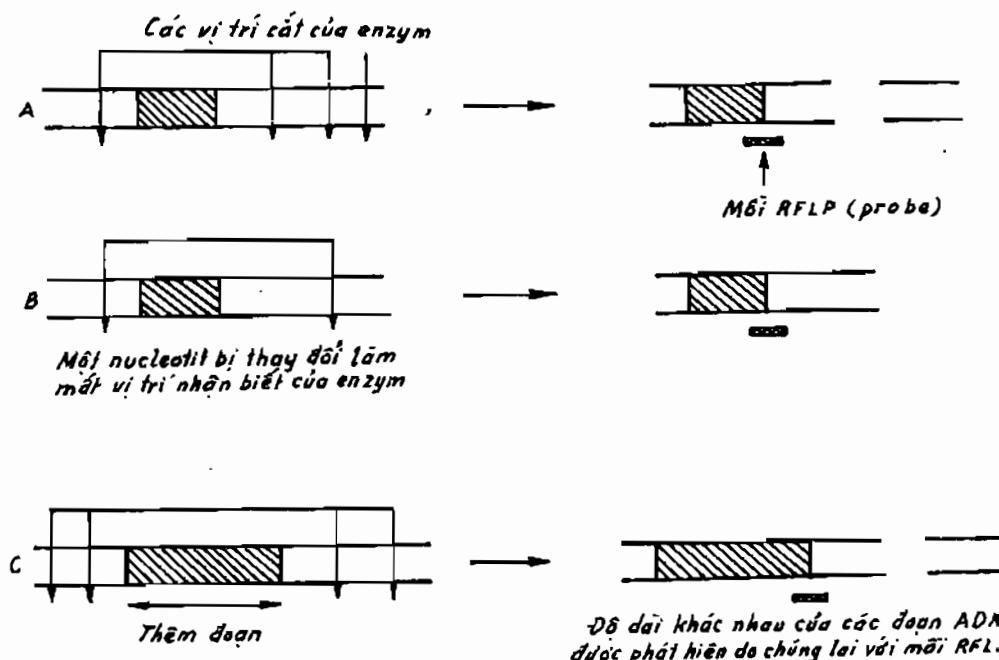


Hình 2.7. Sử dụng plasmid tái tổ hợp vận chuyển gen vào hệ gen tế bào thực vật. Đoạn T-ADN của plasmid Ti được biến đổi, bỏ bớt những gen nằm giữa hai đầu trái và phải, đồng thời nhận thêm gen cần chuyển. Khi *Agrobacterium* xâm nhiễm tế bào thực vật, đoạn T-ADN mang gen lạ được chuyển vào hệ gen.

trường vô trùng, từ một tế bào riêng lẻ có thể phát triển thành cây con hoàn chỉnh. Bằng các kỹ thuật hiện đại, ADN lợ được đưa vào tế bào thực vật. Nuôi cấy các tế bào đó sẽ nhận được cây chuyển gen hoàn chỉnh. Thực tế thường sử dụng *Agrobacteria* như là vecto chuyên chở gen vào hệ gen thực vật (hình 2.7).

IV. RFLP TRONG NGHIÊN CỨU HỆ GEN VÀ LẬP BẢN ĐỒ GEN

Bản đồ hệ gen có thể được xác định theo hai cách khác nhau: *bản đồ vật lý* và *bản đồ liên kết di truyền* (physical map và genetic linkage map). Bản đồ vật lý bao gồm độ dài của các đoạn ADN tính theo số lượng các nucleotit trên một nhiễm sắc thể kể cả các vị trí giới hạn. Ngược lại bản đồ liên kết di truyền dựa vào tần số cùng di truyền của hai hay nhiều tính

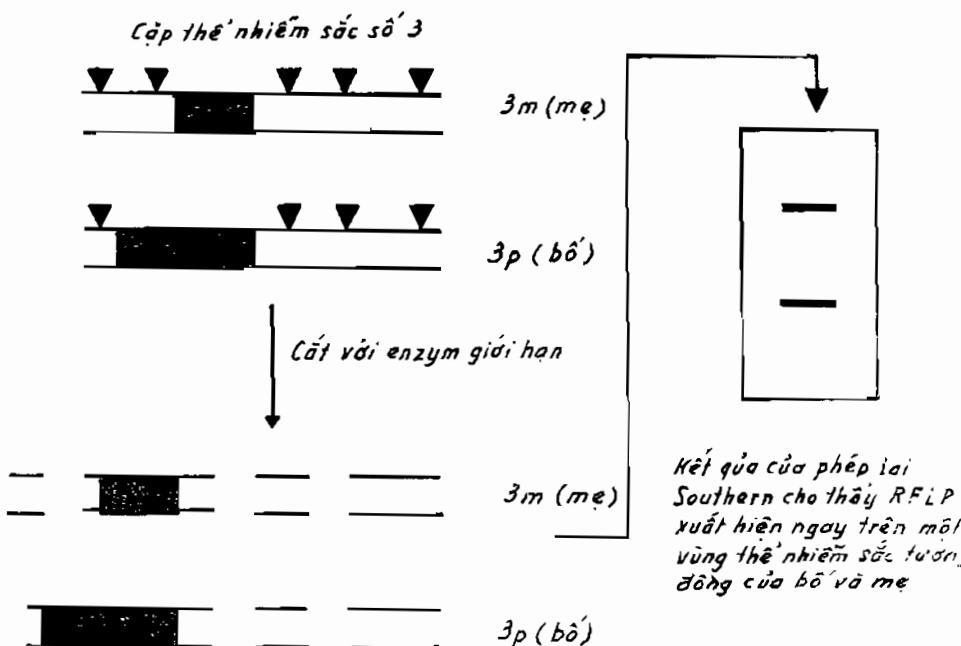


Hình 2.8. Tính đa dạng các đoạn ADN bị cắt bởi enzym giới hạn. (A) Đoạn nhiễm sắc của đa số các tế bào trong quần thể bị enzym giới hạn cắt tại ba vị trí tạo hai đoạn ADN. Một trong hai đoạn này được phát hiện nhờ phương pháp Southern blot sử dụng mỗi RFLP. (B) Khi có sự thay đổi của nucleotit tại một vị trí cắt, enzym không nhận biết được vị trí đó nữa, nên chỉ cắt ở hai vị trí kia tạo một đoạn ADN dài, lúc này được xem như một RFLP. (C) Khi xảy ra đột biến thêm đoạn, đoạn ADN bị cắt dài hơn. Loại RFLP này thường phổ biến ở những vùng nhiễm sắc chứa các đoạn ngắn nucleotit lặp đi lặp lại như GTGTGT... Số lần lặp lại thay đổi rất nhiều trong quần thể. Tại một vùng nhất định, số lần lặp lại đa trung cho từng cá thể. Đó là các minisatellite hoặc còn gọi là các VNTR (variable number of tandem repeat).

trạng trong các phép lai (các tính trạng này được sử dụng như các điểm đánh dấu di truyền (marker) hay còn gọi là gen đánh dấu). Mỗi một điểm đánh dấu di truyền là một vị trí trên bản đồ này. Các vị trí có thể thay đổi khi có sự khác nhau giữa các cá thể ngay trong một quần thể. Khi sự thay đổi xảy ra hiếm thì xem như xảy ra *đột biến*, khi thay đổi xảy ra phổ biến thì được gọi là *đa dạng* (polymorphism). Bản đồ liên kết di truyền được xây dựng dựa vào cách di truyền các tính trạng.

Thông thường, bản đồ liên kết di truyền được xác định nhờ biểu hiện của các đột biến như màu mắt, nhóm máu. Gần đây, các phương pháp ADN tái tổ hợp sử dụng các điểm đánh dấu di truyền mới - các đoạn ADN có độ dài khác nhau giữa các cá thể bình thường, để lập bản đồ di truyền.

Đặc điểm của các đoạn ADN này là sự sai khác giữa chúng không hề có biểu hiện tính trạng. Tuy nhiên, thay đổi nhỏ giữa chúng có thể làm thay đổi vị trí nhận biết của enzym giới hạn. Ví dụ như thay đổi một nucleotit có thể làm mất vị trí nhận biết, do đó khi cắt bởi enzym thì thu được các đoạn ADN dài ngắn khác nhau (hình 2.8). Tương tự, sự thêm bớt các nucleotit vào một vùng ADN bất kỳ cũng làm thay đổi kích thước của các đoạn ADN bị cắt ra từ vùng đó. Sự sai khác này được gọi là *tính đa dạng của các đoạn*.



Hình 2.9. Kỹ thuật Southern blot được sử dụng để phát hiện một RFLP. Các bản sao của một vùng thế nhiễm sắc số 3 di truyền từ bố và mẹ có thể phân biệt dựa vào kết quả của phép lai.

ADN bị cắt bởi enzym giới hạn, viết tắt là RFLP (restriction fragment length polymorphism).

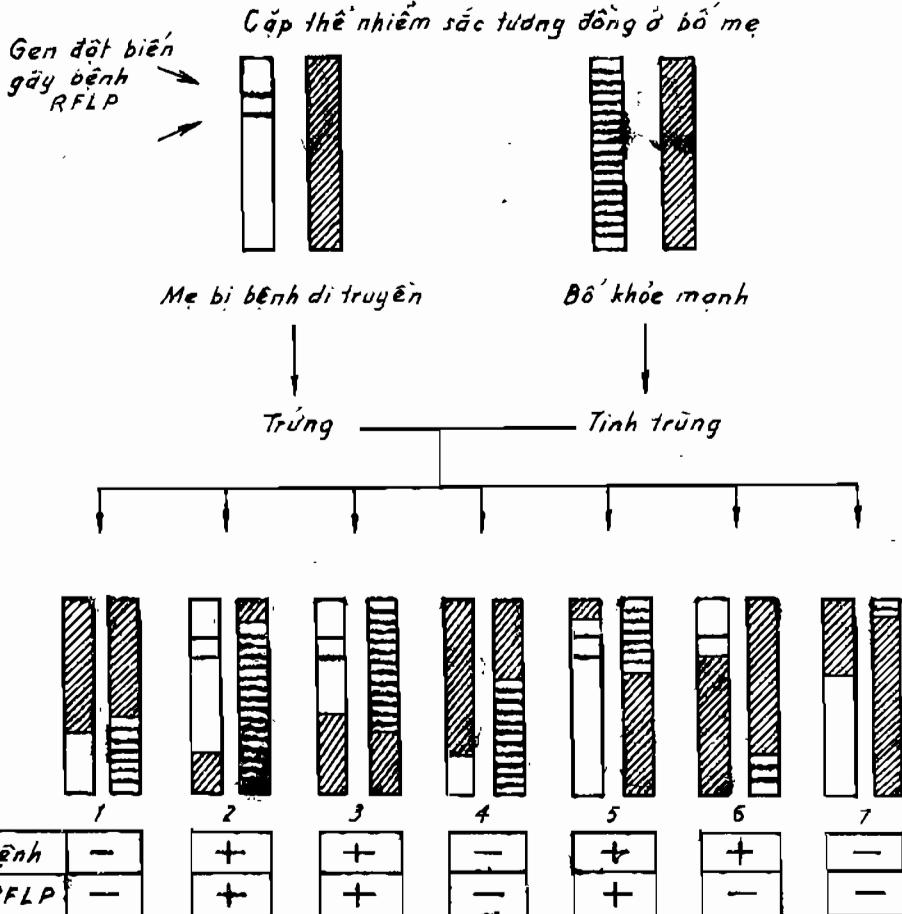
Khi một RFLP rất phổ biến trong quần thể, sự khác nhau giữa hai cá thể có thể xác định nhờ RFLP đó. Thường sử dụng các đoạn ADN ngắn, lặp đi lặp lại, có chiều dài khác nhau do số lần lặp lại thay đổi từ 4 đến 40 lần như các RFLP. Sự khác nhau về kích thước của các đoạn ADN mà một cá thể được thừa hưởng từ cha và mẹ có thể phát hiện dễ dàng nhờ phép lai Southern. Mỗi lai phải tạo liên kết bổ sung với một chuỗi nucleotit nằm trong các đoạn ADN đó (hình 2.9.)

Khi hai điểm đánh dấu di truyền nằm trên hai thể nhiễm sắc khác nhau, xác suất để một cá thể nhận được hai điểm đánh dấu di truyền này chỉ chiếm 50% khi hai thể nhiễm sắc cùng di về một cực trong phân bào giảm phân. Ngay với hai điểm đánh dấu di truyền nằm ở hai phía của một thể nhiễm sắc đối diện nhau qua tâm động, xác suất phân ly của chúng khá cao do xảy ra trao đổi chéo trong phân bào giảm phân. Các điểm đánh dấu di truyền càng gần nhau trên một thể nhiễm sắc, xác suất để chúng cùng được truyền cho một cá thể con cháu càng lớn.

Trong một gia đình đồng, khi sàng lọc các cá thể con cháu có biểu hiện mối liên quan giữa một số RFLP với cùng một tính trạng - ví dụ một bệnh di truyền do đột biến gây ra, gen đó có thể xác định được nhờ những RFLP này dựa vào các kỹ thuật như nhảy bước (gen nhảy) trên thể nhiễm sắc hoặc chọn dòng theo vị trí. Rất nhiều gen gây bệnh ở người đã được tìm ra bằng phương pháp sử dụng RFLP, nhờ đó các protein tương ứng được phân tích rõ ràng (hình 2.10).

Tren hình 2.10 mô tả một gen đánh dấu RFLP nằm gần một gen gây bệnh. Khi gen đánh dấu nằm càng gần gen gây bệnh thì càng dễ phát hiện được gen đó. Để phát hiện một gen bất kỳ dựa vào RFLP thì vị trí của các gen đánh dấu RFLP phải được xác định trên thể nhiễm sắc chứa gen đó. Vị trí của tất cả các gen đánh dấu RFLP (số lượng đến hàng nghìn) tạo thành bản đồ RFLP của hệ gen. Trên bản đồ này, khoảng cách giữa hai gen đánh dấu khoảng 10^6 bp. Ở khoảng cách này, chúng cùng được di truyền cho con cháu với xác suất 99%.

Dựa vào bản đồ RFLP, khi một tính trạng cùng được di truyền với một gen đánh dấu RFLP thì vị trí của gen qui định tính trạng đó có thể xác định được dễ dàng. Nhờ đó, việc sàng lọc các dòng ADN tương ứng từ ngân hàng hệ gen và phân lập được gen liên quan đến tính trạng trở nên thực thi.

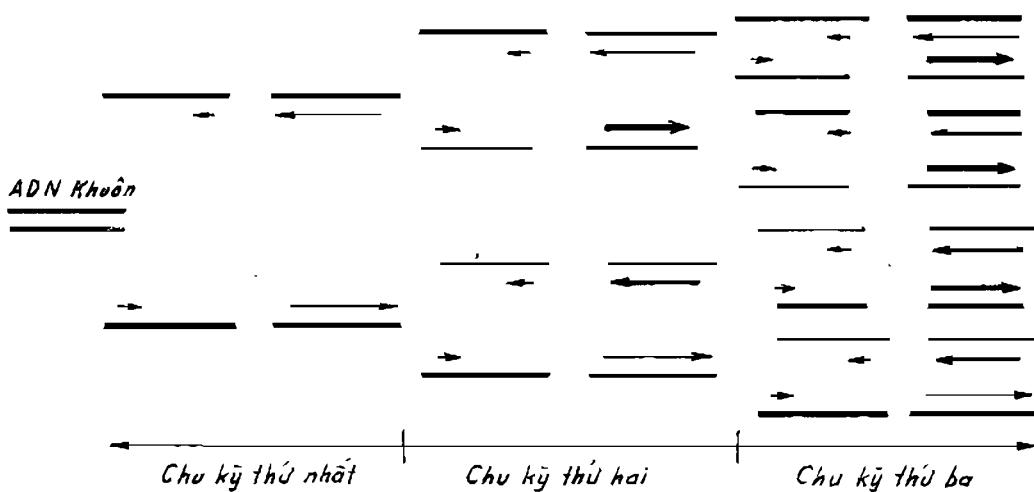


Hình 2.10. Sử dụng đánh dấu RFLP để phân tích bẩn đố di truyền. Một tính trạng đặc biệt ở người (bệnh di truyền) được di truyền sang thế hệ sau cùng với gen đánh dấu RFLP. Nếu đại đa số các cá thể bị bệnh đều có mang gen đánh dấu này thì gen gây bệnh và gen đánh dấu RFLP có mối quan hệ liên kết nằm gần nhau trên cùng một thể nhiễm sắc. Để đảm bảo độ tin cậy, tính cùng di truyền phải được kiểm tra trên hàng trăm cá thể. Cần lưu ý đến hiện tượng trao đổi chéo trong giảm phân khi tạo tế bào sinh dục (trứng hoặc tinh trùng). Lúc này gen đánh dấu RFLP sẽ phân ly với gen gây bệnh (trường hợp số 6)

V. PHẢN ỨNG PCR

Sử dụng enzym ADN polymeraza và oligonucleotit tổng hợp nhân tạo

các mồi (primers), một đoạn ADN bất kỳ có thể được nhân lên nhanh chóng hàng tỷ lần mà không cần đưa vào tế bào vi khuẩn. Đó chính là kết quả tuyệt vời của phản ứng PCR (polymerase chain reaction) hay còn gọi là phương pháp PCR, tạm dịch là chuỗi phản ứng tổng hợp. Nhờ phản ứng này, một đoạn ADN ở một vùng bất kỳ trong hệ gen được khuếch đại lên rất nhiều lần khi trình tự nucleotit ở hai đầu đoạn ADN đó đã biết. Dựa vào trình tự đó, các cặp oligonucleotide được tổng hợp nhân tạo, mỗi oligo tạo liên kết bổ sung với từng sợi đơn. Chúng được sử dụng làm mồi để tổng hợp ADN *in vitro* nhờ enzym ADN polymeraza.



Hình 2.11. Phản ứng PCR. Ba chu kỳ đầu tiên của phản ứng được mô tả trên hình vẽ. Từ hai sợi đơn ADN biến tính, sau ba chu kỳ thu được 16 sợi đơn, trong đó 8 sợi có kích thước đúng bằng khoảng cách giữa hai mồi oligo (in đậm). Sau một chu kỳ, số lượng sợi ADN có kích thước duy nhất chiếm ưu thế tuyệt đối trong phản ứng.

$$N = (2^n - 2n) \cdot x$$

n : số chu kỳ; $2n$: số sợi có chiều dài không xác định

x : số sợi không ban đầu; N : số sợi tổng hợp được trong phản ứng.

Các bước cơ bản của phản ứng PCR được mô tả trên hình 2.11. Mỗi chu kỳ phản ứng đòi hỏi ba bước. Đầu tiên, ADN khuôn được xử lý nhiệt độ để tách thành hai sợi đơn. Bước tiếp theo, nhiệt độ giảm xuống cho phép các mồi (số lượng rất lớn) liên kết tạo cặp bổ sung với hai sợi đơn ADN khuôn, do số lượng mồi lớn nên liên kết giữa mồi và ADN khuôn xảy ra chủ yếu so với liên kết phục hồi giữa hai sợi đơn. Trong bước thứ ba, hỗn hợp ADN và

mỗi được ủ với enzym Taq polymeraza và bốn loại deoxyribonucleotit triphotphat. Đoạn ADN nằm giữa hai mồi được tổng hợp. Khi các chu kỳ được lặp lại, các đoạn ADN vừa được tổng hợp ở các chu kỳ trước trở thành khuôn mẫu cho chu kỳ sau. Số lượng phân tử ADN tạo ra tăng gấp đôi sau mỗi chu kỳ. Chỉ sau vài chu kỳ đầu, sản phẩm tạo ra chủ yếu là các đoạn ADN có kích thước bằng đúng khoảng cách giữa hai mồi. Số chu kỳ lặp lại trong mỗi phản ứng PCR thường là không quá 60 và mỗi chu kỳ thường kéo dài khoảng 5 phút.

Phản ứng rất nhạy vì có thể chỉ cần dùng một phân tử ADN làm khuôn cũng thu được sản phẩm. Phản ứng được ứng dụng rất rộng rãi, ví dụ như để tách dòng, nghiên cứu mRNA hoặc tạo các đột biến gen... Kỹ thuật PCR được áp dụng với hiệu quả rất cao trong chọn giống, chẩn đoán bệnh di truyền và phát hiện sự viêm nhiễm vi khuẩn, virut khi mật độ các vi sinh vật này trong cơ thể vật chủ rất ít. Ngoài ra, trong công tác hình sự, phản ứng PCR cho phép sử dụng mẫu là những dấu vết còn sót lại trên hiện trường như vết máu, tóc, tinh trùng, thậm chí chỉ một tế bào (hình 2.12).

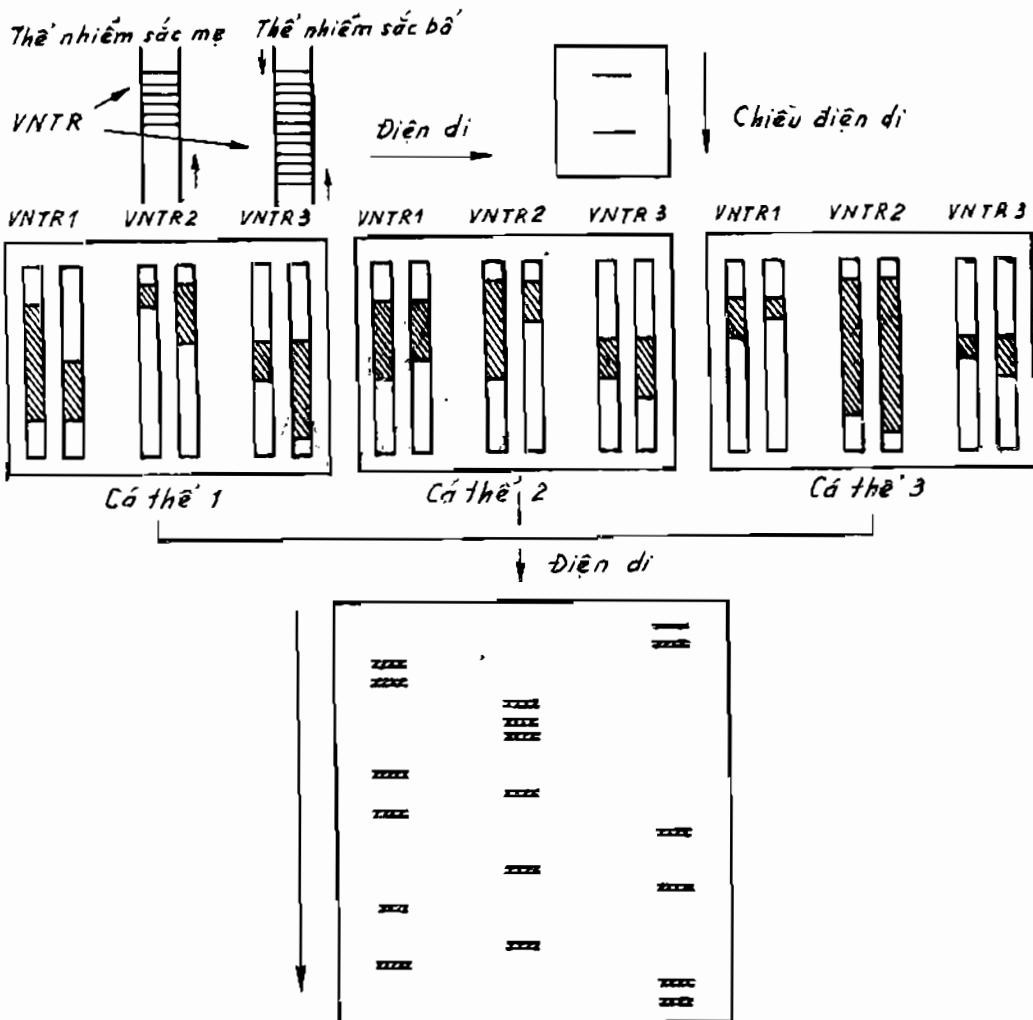
Từ kết quả phân tích có thể xác định được cá thể liên quan đến dấu vết đó bằng phương pháp fingerprinting.

Phản ứng PCR được áp dụng rộng rãi và có những biến đổi phù hợp với từng mục đích nghiên cứu riêng. Vì vậy chúng ta gặp nhiều phương pháp kỹ thuật khác nhau như Nested-PCR; Reversed-PCR; RAPD-PCR vv... nhưng tất cả đều dựa trên nguyên lý của phản ứng PCR. Ngày nay có thể nói *mọi lĩnh vực nghiên cứu sinh học đều sử dụng kỹ thuật PCR*.

Khi thực hiện phản ứng PCR, một số yếu tố có ảnh hưởng đáng kể đến kết quả của phản ứng như nồng độ mồi, nhiệt độ và thời gian ủ mồi (đảm bảo tính đặc hiệu của phản ứng); nồng độ ADN khuôn, nồng độ một số ion, đặc biệt là ion Mg^{+2} .

1. Các yếu tố ảnh hưởng

a. *Các mồi oligonucleotit*. Tỷ lệ GC ở các mồi thường chiếm khoảng 40-75%. Khoảng cách giữa hai mồi thường không dài quá 3 kb. Các mồi không được tạo cấu trúc bậc hai do liên kết giữa các nucleotit ngay trong một mồi. ADN được tổng hợp khi đầu 3' của mồi đã liên kết với khuôn, mặc dù đầu 5' có thể tự do. Do đó đầu 5' của mồi có thể được gắn thêm linker hoặc đoạn nucleotit điều khiển (promoter). Nồng độ mồi khoảng 0,1 μM đến 1 μM . Nồng độ của mồi thường được xác định dựa vào giá trị OD đo ở 260nm.



Hình 2.12. Sử dụng phản ứng PCR trong nghiên cứu khoa học hình sự. Hai mồi nằm ở hai đầu của một microsatellite (VNTR). Sau phản ứng PCR, thu được hai băng ADN có chiều dài khác nhau tương ứng với hai thể nhiễm sắc tương đồng nhận từ bố và mẹ. Khi phản ứng PCR sử dụng các cặp mồi ứng với các VNTR khác nhau, các băng ADN thu được ở mỗi cá thể là đặc hiệu và được xem như dấu vân di truyền (fingerprinting). Phản bối các băng ADN của từng cá thể là duy nhất không trùng nhau. Phản ứng có thể dùng với mẫu thử chỉ một sợi tóc hoặc thậm chí một tế bào.

b. Liên kết giữa mồi và ADN khuôn. Mồi gắn vào sợi khuôn ADN nhờ liên kết tạo cặp bổ sung giữa chúng. Liên kết này phụ thuộc thời gian, nhiệt độ, nồng độ mồi cũng như nồng độ sợi khuôn. Khi nồng độ mồi rất lớn so với nồng độ khuôn, thời gian ủ mồi với sợi khuôn không cần thiết quá lâu. Nhiệt độ ở giai đoạn này phụ thuộc chiều dài của mồi và hàm lượng GC. Khi oligo mồi gồm 12 đến 15 nucleotit, nhiệt độ ủ khoảng 40-45°C.

Nhiệt độ 72°C thích hợp cho phản ứng tổng hợp ADN bằng Taq polymeraza (là ADN polymeraza vẫn giữ được hoạt tính ở nhiệt độ cao). Lúc này cần lưu ý các mồi ngắt thường bị biến tính tách ra khỏi sợi khuôn. Ngoài ra, trong trường hợp mồi được tổng hợp xuất phát từ trình tự axit amin thì liên kết giữa mồi với ADN khuôn không hoàn toàn bổ sung, do đó mồi cũng dễ dàng tách ra khỏi sợi khuôn ở nhiệt độ tổng hợp ADN. Vì vậy trong trường hợp này, nhiệt độ để tổng hợp ADN có thể bắt đầu ở 55-60°C để mồi được thêm vài chục nucleotit, sau đó mới tăng nhiệt độ lên 72°C. Rõ ràng nhiệt độ ở giai đoạn này rất quan trọng; nhiệt độ quá cao gây biến tính, nhiệt độ quá thấp tạo ra các liên kết không đặc hiệu (mồi có thể bám không chính xác vào vị trí bất kỳ). Ngoài ra khi ADN khuôn chiếm tỷ lệ rất nhỏ, ví dụ một đoạn ADN trong hệ gen, thời gian cần thiết để mồi tìm đúng vị trí liên kết đặc hiệu và tạo cặp với khuôn thường khoảng 2 phút trong một số chu kỳ đầu tiên. Điều đáng lưu ý khi chỉ vài nucleotit ở đầu 3' của mồi đã liên kết với khuôn thì Taq polymeraza sẽ kéo dài sợi mồi thành sợi ADN mới, bắt chấp mồi chưa liên kết hoàn toàn với khuôn ở đầu 5'.

Nồng độ một số ion cũng như bốn loại nucleotit trong môi trường đều ảnh hưởng đến phản ứng PCR. Ví dụ như ion Mg²⁺ kích thích phản ứng tổng hợp ADN trong khi muối nhân được đoạn ADN dài cần loại bỏ hoàn toàn KCl khỏi môi trường. ADN khuôn có thể là ADN hệ gen tách ra từ tế bào, ADN từ các ngân hàng hệ gen hoặc cADN, các ADN bất kỳ; ARN tổng số hoặc mRNA. Nồng độ ADN khuôn thường nhỏ hơn nanogram (ng) với cADN, hoặc nhỏ hơn microgam (μg) với ADN hệ gen.

2. Một số ứng dụng

a. PCR lồng (nested-PCR). Sản phẩm ADN của phản ứng PCR thứ nhất được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR thứ hai với khoảng cách giữa hai mồi lần sau ngắn hơn lần trước. Cách tiến hành như vậy nhằm làm tăng tính đặc hiệu, chính xác cho sản phẩm cần nhân bản. Các đoạn ADN không đặc hiệu có thể được tạo ra trong lần PCR thứ nhất nhưng rất khó trở thành khuôn trong lần thứ hai do các sản phẩm đặc hiệu chiếm ưu thế tuyệt đối.

b. PCR phức (multiplex PCR). Phương pháp này sử dụng nhiều cặp mồi trong một phản ứng PCR để thu được cùng một lúc các băng đặc hiệu cho từng cặp. Nhờ đó giảm được thời gian thí nghiệm cũng như hạn chế việc nhiễm mầm do thao tác. Ví dụ như bệnh nhược cơ Duchenne (DMD) gây ra do sự thiếu hụt các đoạn ADN ở gen tương ứng. Gen này dài khoảng 2000 kb

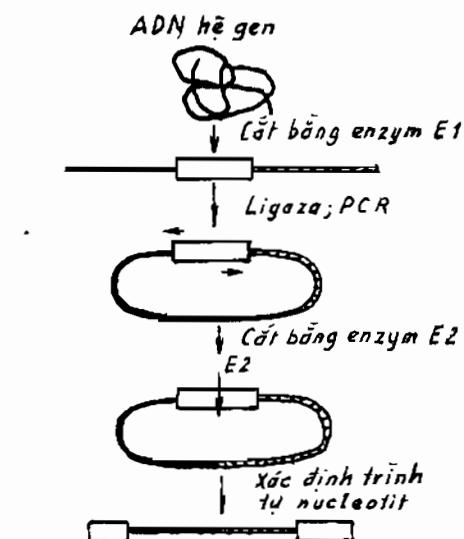
(kilô bazô) gồm 70 exon (kích thước trung bình của intron khoảng 35 kb). Sự mất đoạn chủ yếu xảy ra ở hai vị trí trên gen (các vị trí nhạy cảm đột biến). Sử dụng các cặp mồi đặc hiệu của từng exon trong cùng một phản ứng PCR phức có thể phát hiện được 80-90% bệnh nhân nhược cơ do mất đoạn.

c. PCR đảo đoạn (inverse-PCR). Dùng phương pháp này để phân lập những phần nằm trước hoặc sau một đoạn ADN đã biết. Từ đó phân tích được chuỗi nucleotit nằm trước hoặc sau của một gen. Đầu tiên ADN hệ gen được cắt bởi enzym giới hạn tạo ra các đoạn ADN khác nhau. Sau đó, các đoạn ADN được nối lại thành dạng vòng và sử dụng như ADN khuôn cho phản ứng PCR với hai oligo xuất phát từ phân ADN đã biết (hình 2.13).

Phương pháp này tương tự như phương pháp đi trên thẻ nhiễm sắc. Nó được ứng dụng để xác định promoter hoặc các đoạn nucleotit làm nhiệm vụ điều khiển hoạt động của gen.

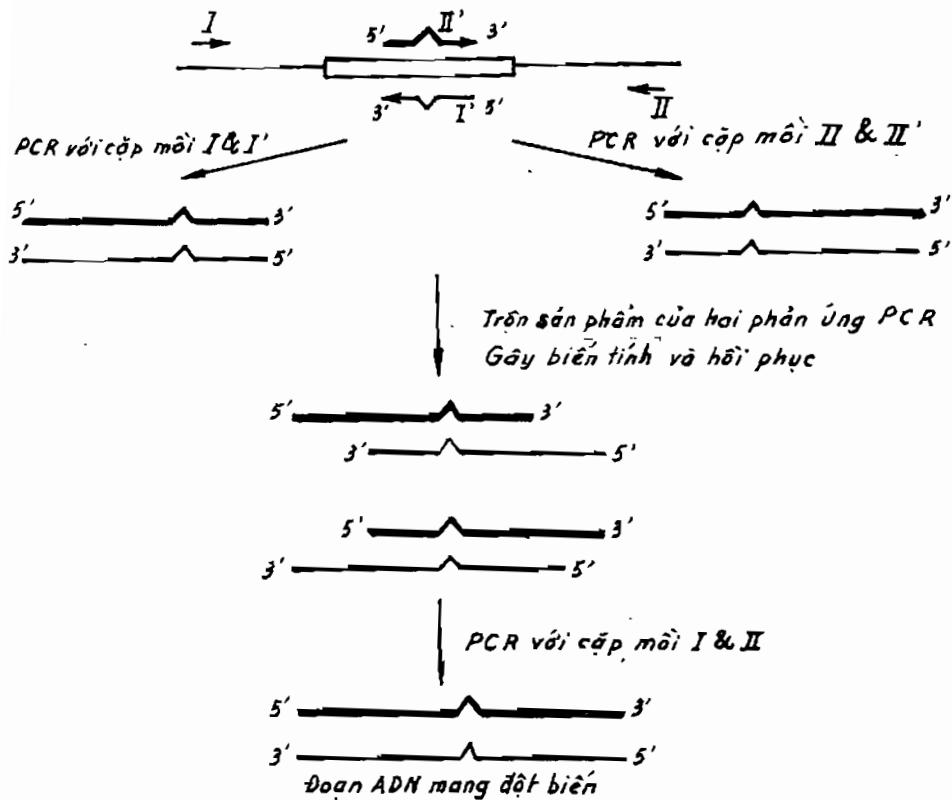
d. PCR tái tổ hợp. Phương pháp này được áp dụng để xây dựng phân tử ADN tái tổ hợp, đưa vào hoặc bỏ đi hoặc thay thế các nucleotit trong một đoạn ADN. Kỹ thuật này được mô tả cụ thể trong hình 2.14.

e. PCR ngược (reversed-PCR). Phản ứng này nhằm nghiên cứu số lượng mRNA, làm giàu các mRNA hiếm trong tế bào. Đầu tiên ARN tổng số hoặc mRNA được dùng làm khuôn để tổng hợp cADN nhờ enzym transcriptaza ngược. Sau đó các sợi đơn cADN được tổng hợp thành sợi kép nhờ Taq polymeraza. cADN dạng sợi kép được sử dụng làm khuôn trong phản ứng PCR. Các oligo trong phản ứng này thường bắt nguồn từ các exon để dễ dàng phân biệt các đoạn ADN chứa intron tạo ra do nhiễm ADN hệ



Hình 2.13. Phản ứng PCR đảo đoạn được sử dụng để xác định đoạn nucleotit nằm trước hoặc sau một đoạn ADN đã biết. Hai mồi được thiết kế sẽ nằm ở hai đầu của đoạn ADN đó. Sau phản ứng PCR, sản phẩm được cắt bởi enzym giới hạn E2 có vị trí cắt nằm trong đoạn ADN này. Thay cho phương pháp đi trên thẻ nhiễm sắc, promoter hoặc các đoạn ADN làm nhiệm vụ điều khiển hoạt động của gen được xác định nhanh chóng nhờ PCR đảo đoạn.

gen với các đoạn nhân lên từ mARN (cADN). Chỉ cần 1 µg ARN tổng số (~10⁶ tế bào) đủ để nhân phân tử mARN hiếm (1-10 bản/tế bào).



Hình 2.14. Sử dụng phản ứng PCR để thay thế các nucleotit trong một đoạn ADN đã biết.

g. Nhân ngẫu nhiên các đoạn ADN bằng PCR (RAPD-PCR) (*random amplified polymorphic DNA-PCR*). Dựa vào các minisatellit hoặc các micro-satellit (VNTR) đã biết để tìm được các đoạn nucleotit nằm trước và sau các VNTR này. Chúng được dùng làm mồi trong PCR, sản phẩm thu được là những băng ADN có kích thước khác nhau. Phản ứng có thể dùng một mồi riêng biệt. Phương pháp này hay được sử dụng để xây dựng cây phân loại.

CHƯƠNG 3

LAI TẾ BÀO SOMA

Trong quần thể sinh sản hữu tính tế bào hợp tử là tế bào lai hình thành do sự kết hợp giữa hai giao tử - đó là lai hữu tính. Trong nuôi cấy tế bào *in vitro* người ta có thể tạo thành tế bào lai bằng cách kết hợp hai tế bào soma với nhau - đó là lai soma. Sự lai soma rất hiếm xảy ra trong cơ thể sống ở thực vật và động vật.

I. LAI GHÉP Ở THỰC VẬT

Lai ghép hay là lai dinh dưỡng từ lâu đã được thực hiện ở thực vật và có ý nghĩa lớn trong thực tiễn trồng trọt các cây ăn trái, cây cảnh v.v... và một số nhà nghiên cứu cho rằng lai dinh dưỡng bằng ghép là lai soma, nhưng thực chất thì cây "lai dinh dưỡng" chẳng qua là một loại cơ thể khẩm vừa mang các tế bào và mô của gốc ghép và cành ghép. Giữa các tế bào và mô của gốc ghép và cành ghép có thể có sự trao đổi thông tin điều chỉnh sự trao đổi chất tạo cho cành ghép có một số tính chất của gốc ghép, nhưng không thể xảy ra sự hoà hợp nhân để tạo nên tế bào lai thực sự, vì màng sinh chất và màng xenluloza là hàng rào ngăn cản sự hoà hợp đó. Hơn nữa các tính trạng trung gian chỉ có ở thế hệ cành ghép, còn khi đem gieo các hạt của cành ghép thì thế hệ sau không còn có tính trạng trung gian vì hạt được hình thành chỉ từ hệ gen của cành ghép. Tính phổ biến hiện tượng đa bội trong thế giới thực vật chủ yếu là do lai hữu tính hoặc do nội phân (endomitosis) tạo thành rất hiếm có trường hợp do lai soma. Nhiều nhà nghiên cứu cho rằng hiện tượng các mixel đơn bội của nấm *Aspergillus* cho ra các mixel lưỡng bội, hoặc trong thụ tinh kép dẫn tới tạo thành các tế bào tam bội là một dạng lai soma

II. CÁY GHÉP MÔ Ở ĐỘNG VẬT

Nghiên cứu cấy ghép mô và cơ quan ở động vật không chỉ có ý nghĩa thực tiễn trong miến dịch y học, trong phẫu thuật cấy ghép mô và cơ quan mà còn có ý nghĩa đối với di truyền, di truyền tế bào soma và di truyền ung thư v.v... Bản chất của cấy ghép mô và cơ quan là hiện tượng tương hợp hay không tương hợp giữa các mô và cơ quan của người nhận và người cho và được xác định bởi đặc tính di truyền của chúng. Các nhân tố di truyền (các gen) được di truyền theo các qui luật Mendel.

Đặc tính tương hợp hay không tương hợp được xem như một cặp tính trạng đối lập. Nguyên nhân của tính không tương hợp là do người nhận lặn đã hình thành kháng thể chống kháng nguyên xác định bởi các gen trội của người cho. Nói một cách khác nếu ta cấy ghép mô có tính khác biệt về kháng nguyên giữa người cho và người nhận thì chỉ sau một thời gian mảnh mô ghép sẽ bị chết hoặc bị bong đi. Vì vậy miếng ghép hoặc cơ quan ghép tồn tại chỉ khi ghép các mô của cùng cơ thể hoặc giữa các cơ thể sinh đôi cùng trứng

Người ta phân biệt các kiểu ghép sau:

1. Ghép tự hợp (autotransplantation) là trường hợp ghép mô của một cá thể, ví dụ ghép da bụng vào da mặt của cùng một người (hoặc nuôi cấy tế bào da của người đó để dùng làm mảnh ghép cho người đó) khả năng sống đạt 100%.

2. Ghép dãng hợp (isotransplantation) là trường hợp ghép mô, cơ quan giữa hai người sinh đôi cùng trứng hoặc giữa các cá thể thuộc một dòng lai nội dòng (inbreeding), khả năng sống gần 100%.

3. Ghép đồng hợp (homotransplantation) là trường hợp ghép mô, cơ quan giữa các cá thể thuộc các dòng của cùng một loài, thường xảy ra không tương hợp và ghép sẽ không kết quả nếu không sử dụng biện pháp ức chế tính không tương hợp mô.

4. Ghép dị hợp (heterotransplantation) là trường hợp ghép mô, cơ quan giữa hai cá thể thuộc hai loài khác nhau, ghép không có kết quả.

5. Ghép lai (hybridotransplantation) là trường hợp cá thể lai giữa hai dòng nội lai còn cá thể nhận là cá thể lai giữa hai dòng nội lai đó. Mảnh ghép tồn tại trong một số trường hợp.

Tính tương hợp hay không tương hợp mô được qui định bởi phức hệ các protein đặc thù được gọi là phức hệ tương hợp mô chủ yếu (MHC – major

histocompatibility complex), phức hệ protein này được mã hoá bởi các gen được gọi là gen tương hợp mô (histocompatibility genes) là hệ thống gồm nhiều gen, nhiều alen và biểu hiện đồng trội. Ở người, phức hệ MHC được gọi là phức hệ HLA (human leucocyte antigens) được mã hoá bởi họ đan gen định khu trong vế ngắn của thể nhiễm sắc số 6.

Sự cấy ghép mô ở động vật không gây ra hiện tượng dung hợp tế bào *in vivo* vì không vượt qua tính không tương hợp, ngay như đối với động vật có vú có nhau thai thì phôi phát triển trong dạ con được xem như một cơ quan lạ cấy ghép vào cơ thể mẹ tuy không bị loại thải nhờ những cơ chế đặc biệt ức chế được tính không tương hợp mô nhưng không xảy ra sự dung hợp tế bào của thai và mẹ.

III. LAI TẾ BÀO SOMA ĐỘNG VẬT *IN VITRO*

1. Sự tạo thành ngẫu nhiên tế bào lai soma *in vitro*

Như ta đã biết *in vivo* sự tạo thành tế bào lai soma là vô cùng hiếm. Bằng phương pháp nuôi cấy tế bào *in vitro*, người ta có thể nuôi cấy các loại tế bào của cùng một mô hoặc của các mô khác nhau của cùng một cơ thể hoặc các cơ thể khác nhau của cùng một loài hoặc thuộc các loài khác nhau thậm chí rất xa nhau.

Năm 1960, lần đầu tiên các tác giả Barski, Sorieul, Cornefert thông báo là đã tạo được tế bào lai soma *in vitro* khi họ nuôi cấy trộn các tế bào sarcoma của chuột thuộc hai dòng khác nhau. Các dòng tế bào được nuôi cấy khác biệt nhau ở các đặc điểm: (1) khả năng tạo thành u khi tiêm chúng vào chuột mang tính tương hợp mô và (2) số lượng và hình thái thể nhiễm sắc.

Khi phân tích bộ thể nhiễm sắc của các tế bào lai thấy rõ sự tổ hợp của hai bộ thể nhiễm sắc của cả hai dòng tế bào khởi nguồn (bảng 3.1)

Bảng 3.1. Bộ thể nhiễm sắc của dòng tế bào khởi nguồn N₁ và N₂ và của tế bào lai M.

	N ₁	N ₂	M
Số lượng thể nhiễm sắc	55	62	115-116
Số lượng thể nhiễm sắc cân bằng	0	9-19	9-15

Khi nuôi cấy trộn lẫn các tế bào dòng L (từ chuột C₃H) với các tế bào dòng MT1 (từ chuột SWR) người ta thu nhận được các tế bào lai. Sử dụng đặc tính về khả năng gây ung thư khi tiêm tế bào vào chuột mang tính tương hợp mô người ta thấy khi tiêm tế bào lai cho chuột C₃H hoặc SWR đều không gây được ung thư, nhưng khi tiêm tế bào lai cho chuột lai (giữa C₃H và SWR) thì gây được ung thư.

Điều đó chứng tỏ tế bào lai chứa cả hai loại kháng nguyên bề mặt của cả hai dòng tế bào khởi nguồn do đó chúng đã bị thải loại khi tiêm cho mỗi một dòng chuột khởi nguồn, (bảng 3.2).

Bảng 3.2. Khả năng tạo ung thư của tế bào lai (1)

Tế bào	Nguồn tế bào	Tạo ung thư		
		chuột C ₃ H	chuột SWR	chuột lai C ₃ H x SWR
L	Chuột C ₃ H	có	không	đôi khi có
MT1	Chuột SWR	không	có	có
Lai	Tế bào L x MT1	không	không	có

(1) Dẫn theo Ringert và Savage, (1979)

Bằng phương pháp chọn lọc dòng tế bào khởi nguồn mang đặc tính đặc trưng nào đây để đánh dấu - tế bào, ví dụ thiếu một loại enzym đặc thù nào đây, và nuôi cấy chúng với các tế bào bình thường (có enzym đó) trong môi trường chọn lọc (có hoặc không sản phẩm tác động bởi enzym nào đó), người ta dễ dàng tạo dòng tế bào lai *in vitro*.

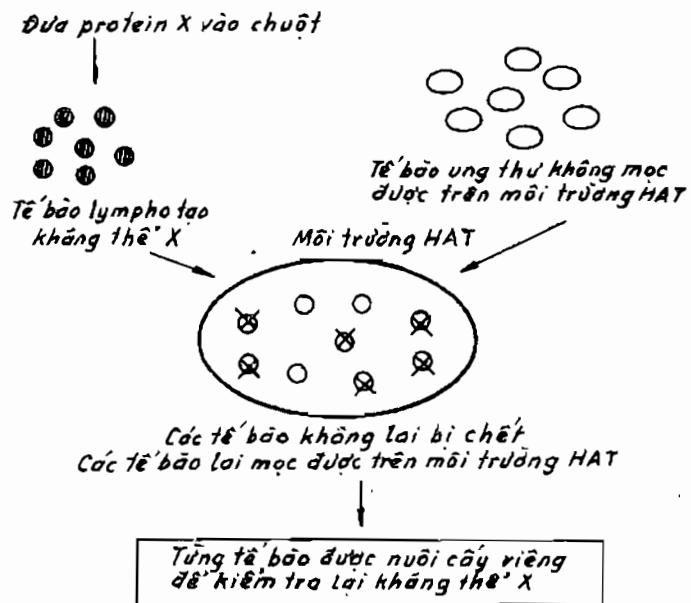
Khi tế bào lai được hình thành từ các tế bào cùng một khởi nguồn, thì tế bào lai được gọi là tế bào đồng nhân (homocaryon), còn khi các tế bào được nuôi cấy thuộc các cơ thể khác nhau về bậc phân loại, tức các loài, giống hoặc họ, bộ... khác nhau ta thu được tế bào lai dị nhân (heterocaryon). *Với nghĩa đúng đắn thì các heterocaryon mới thực sự là tế bào lai.*

Trong nuôi cấy *in vitro*, khi nuôi cấy trộn lẫn các tế bào thuộc hai loài khác nhau, ví dụ tế bào chuột + tế bào người, vẫn thu được tế bào lai một cách ngẫu nhiên, tuy xảy ra với tần số rất thấp. Khi sử dụng các nhân tố kích thích ví dụ hoá chất, virut v.v. thì lai tế bào xảy ra dễ dàng hơn và với tần số lai cao hơn.

2. Lai tế bào khi sử dụng virut kích thích

Năm 1965, các nhà nghiên cứu Harris, Watkins, Okada và Murayama

đã sử dụng virut Sendai đã bị bắt hoạt bởi bức xạ tử ngoại, làm tác nhân kích thích trong nuôi cấy, họ đã tạo được các tế bào lai heterocaryon giữa chuột với người, giữa lợn với người. Các tế bào lai này có thể tăng sinh để cho ra các thế hệ tế bào lai hợp nhân (syncaryon). Lúc đầu tế bào lai còn chứa cả hai nhân - được gọi là heterocaryon. Heterocaryon có thể



Hình 3.1. Sử dụng tế bào lai tạo kháng thể đơn dòng.

tồn tại một thời gian hoặc bị chết (trường hợp lai ngẫu nhiên), hoặc heterocaryon sẽ biến thành syncaryon khi hai nhân hòa hợp tạo thành một nhân chung. Các syncaryon có khả năng phân bào mitos cho ra các thế hệ nối tiếp tạo nên dòng tế bào lai (hình 3.1).

Ngày nay trong nghiên cứu tế bào *in vitro*, việc sử dụng virut làm tác nhân kích thích đã trở thành phổ biến và thông dụng. Nhiều dạng virut có khả năng kích thích sự hoà hợp tế bào *in vitro* như các virut chứa ADN (nhóm virut Herpes, virut đậu mùa...), các virut chứa ARN (virut lợn, virut Niucatxơn, virut Sendai...), các virut gây ung thư (virut Sarcoma Rous)...

Nhưng gây hiệu quả nhiều nhất là virut Sendai là loại virut chứa ARN có tác động ngưng kết hồng cầu tìm thấy ở Nhật bản nên có tên gọi là virut HVJ và vì lần đầu tiên được phân lập tại Trường đại học Tohoku ở Sendai (Nhật bản) nên có tên gọi là virut Sendai.

Virut Sendai được cấu tạo bởi lõi ARN và được bao bởi các phân tử glicoproteit có khả năng làm ngưng kết máu và dung hợp tế bào, và ngoài cùng là màng lipoproteit có nguồn gốc từ màng sinh chất tế bào vật chủ. Virut Sendai ký sinh trong các tế bào động vật bằng cách liên kết với màng sinh chất tế bào vật chủ và bằng hiện tượng nhập bào và tạo thành các bong nhập bào để xâm nhập vào tế bào vật chủ.

Do tính chất của virut liên kết với màng tế bào nên chúng làm liên kết các màng hồng cầu với nhau tạo nên ngưng kết máu. Trong nuôi cấy *in vitro*, virut Sendai làm liên kết màng sinh chất của hai tế bào với nhau tạo điều kiện cho sự dung hợp hai tế bào tạo thành heterocaryon. Tuy nhiên, sự dung hợp tế bào còn tuỳ thuộc vào đặc tính của tế bào, vào số lượng hạt virut, vào nồng độ các ion, vào độ pH, vào nguồn năng lượng v.v. Để tăng tính liên kết, người ta thường sử dụng virut kết hợp với một loại hoá chất cũng có khả năng tạo sự dung hợp tế bào là polyethylen glicol.

IV. CÁC TẾ BÀO LAI HETEROCARYON

Có nhiều công trình nghiên cứu về các đặc tính di truyền và biến dị, sự tái bản mã, phiên mã và dịch mã của tế bào lai, cũng như đặc tính biệt hoá tế bào của chúng.

1. Sự hoạt hoá của nhân

Khi lai các tế bào mang nhân hoạt hoá như limpho bào (lymphoblast) của chuột, tế bào ung thư Hela (là tế bào ung thư cổ tử cung của chị Henrietta được tách ra để nuôi cấy từ 1951 khi chị bị tử vong) của người với tế bào mang nhân bất hoạt, ví dụ tế bào hồng cầu của gà, người ta thu được tế bào lai có chứa cả nhân của hồng cầu gà và nhân của tế bào chuột (khi lai với tế bào chuột) hoặc người (khi lai với tế bào Hela).

Trong môi trường tế bào chất của tế bào lai, nhân của hồng cầu gà được hoạt hoá thể hiện ở các hiện tượng sau:

- khối lượng nhân tăng lên, nhân ở dạng xốp hơn và chứa chất nhiễm sắc ở dạng phân tán;
- có sự xâm nhập của các protein đặc trưng cho người từ tế bào chất vào nhân;
- có sự hoạt hoá các ARN-polymeraza và tổng hợp các dạng ARN;
- có sự tạo thành hạch nhân và tạo nhiều riboxom;
- có sự tổng hợp nhiều loại protein đặc trưng cho gà bao gồm các enzym, các protein kháng nguyên bề mặt, các protein thụ thể;
- có sự tổng hợp ADN;
- tạo thành tế bào lai syncaryon chứa một nhân trong đó đa số thể nhiễm sắc của gà bị thải loại.

Ta xem xét một số hiện tượng trong các biến đổi trên đây: **tổng hợp ARN và ADN trong tế bào lai.**

Trong tế bào lai giữa hồng cầu gà với tế bào Hela, diễn ra sự tổng hợp ARN tức là phiên mã từ nhân hồng cầu. Sử dụng H^3 -uridin để đánh dấu và theo dõi sự tổng hợp ARN thì sự tổng hợp ARN tăng lên theo sự tăng thể tích và tăng độ xốp của chất nhiễm sắc của nhân hồng cầu vào những ngày đầu tiên sau khi dung hợp, dạng ARN được tổng hợp là các mARN và chỉ sau đó các rARN mới được xuất hiện sau khi xuất hiện hạch nhân.

Khoảng 10 - 15 giờ sau khi dung hợp thì nhân hồng cầu trong tế bào lai heterocaryon tăng cao thể tích nhưng vẫn còn ở giai đoạn G₁. Sử dụng H^3 -timidin để đánh dấu và theo dõi sự tổng hợp ADN thì quan sát thấy sau 48 giờ hàm lượng ADN trong nhân hồng cầu được tăng lên. Sự tăng cao thể tích của nhân không tương ứng với sự tổng hợp ADN, nhưng cần có sự tác động của các nhân tố (các protein) đến từ tế bào chất của tế bào Hela vào nhân hồng cầu.

Khi sử dụng các tế bào nhân bất hoạt nhưng ở mức độ vừa phải so với nhân hồng cầu, ví dụ các đại thực bào. Bình thường các đại thực bào không tổng hợp ADN và tế bào ở giai đoạn biệt hoá G₁, chúng chứa hạch nhân nhỏ và tổng hợp một ít ARN. Khi nuôi cấy các đại thực bào (từ thỏ hoặc chuột) với các tế bào hoạt hoá như tế bào Hela hoặc tế bào melanom của người, sẽ tạo nên các tế bào lai heterocaryon trong đó nhân đại thực bào tăng cao thể tích và chúng tổng hợp ARN tăng 4 - 10 lần so với bình thường chỉ một giờ sau dung hợp và sau ba giờ xảy ra tổng hợp ADN. Điều đó chứng tỏ so với nhân của hồng cầu gà, nhân của đại thực bào bất hoạt ở mức thấp hơn.

Khi nghiên cứu tiến trình tổng hợp các ARN và ADN trong tế bào lai giữa đại thực bào và tế bào melanom, người ta đã chứng minh là sự tổng hợp ADN trong nhân đại thực bào không phụ thuộc vào sự tổng hợp ARN và protein trong nhân đại thực bào mà phụ thuộc vào các nhân tố đến từ tế bào chất của tế bào melanom.

Sử dụng virut Sendai làm tác nhân kích thích có thể tạo được tế bào lai từ các tế bào soma ($2n$) với các tế bào giao tử (n) như tinh trùng hoặc tế bào trứng.

Khi lai với tinh trùng thì nhân của tinh trùng tồn tại trong tế bào lai rất lâu (có thể tới vài tháng) và vẫn ở trạng thái bất hoạt, nhưng khi đem lai tinh tử (spermatide) với tế bào soma (ví dụ lai tinh tử chuột cống với tế bào soma chuột nhắt) thì tạo nên các tế bào lai có khả năng phân bào.

Khi đem tế bào trứng chưa thụ tinh của chuột nhắt lai với các tế bào soma khác nhau như tế bào chuột cổng, khi hoặc người sẽ tạo nên tế bào lai và tế bào lai này có thể phát triển tới giai đoạn phôi dâu (morula).

Sự thụ tinh là sự dung hợp giữa tinh trùng và trứng để tạo nên hợp tử chứa cả nhân tinh trùng và nhân trứng - có thể được xem như một tế bào lai giữa hai tế bào đơn bội cùng loài hoặc đổi khi khác loài xảy ra *in vivo* trong ống dẫn trứng của con cái (hoặc ở phần nào đó trong xoang bụng ngoài ống dẫn trứng) là đã được chương trình hoá trong bộ gen của chúng. Trong nuôi cấy *in vitro* để thực hiện được sự thụ tinh giữa tinh trùng và trứng thì tinh trùng phải được xử lý để làm thay đổi tính chất sinh lý của chúng được gọi là sự khả năng hoá (capacitation), nhưng khi sử dụng virus Sendai thì tinh trùng không cần phải “khả năng hoá” vẫn thực hiện được thụ tinh với trứng.

Sự điều hòa tổng hợp ADN và ARN trong tế bào lai. Khi sử dụng các dạng tế bào soma có đặc tính hoạt hoá hay bất hoạt khác nhau về tổng hợp ARN và ADN trong nhân để tạo tế bào lai và nghiên cứu sự tổng hợp ADN và ARN ở tế bào lai người ta thấy:

Tế bào có hoạt tính càng cao tham gia vào tế bào lai sẽ kích thích nhân tế bào không có hoạt tính hoặc có hoạt tính thấp tổng hợp ADN và ARN càng tích cực hơn, (trừ trường hợp nhân tế bào ít hoạt tính to hơn nhiều lần so với nhân tế bào hoạt tính cao, hoặc khi heterocaryon được tạo thành từ các tế bào quá già).

Nhân không có hoạt tính hoặc có hoạt tính thấp sẽ đạt mức tổng hợp ADN và ARN như ở nhân có hoạt tính. Ví dụ khi dùng tế bào chỉ có hoạt tính tổng hợp ARN mà không tổng hợp ADN (tế bào cơ, đại thực bào) thì trong tế bào lai, nhân không hoạt tính chỉ tổng hợp có ARN (bảng 3.3).

. Tín hiệu phát động sự tổng hợp ARN và ADN đến từ tế bào chất của tế bào có hoạt tính cao và không mang tính đặc trưng mô hoặc loài.

Cơ chế và nguyên tắc điều hòa sự tổng hợp ADN (tái bản mã) và ARN (phiên mã) diễn ra trong tế bào lai tương tự ở tế bào bình thường. Nhiều gen là bất hoạt trong các tế bào không có hoạt tính vẫn giữ trạng thái bất hoạt trong tế bào lai chứng tỏ chúng không mang tính ngược chiều, nhưng nhiều gen bất hoạt đã trở lại hoạt động trong tế bào lai chứng tỏ chúng có tính ngược chiều. Những công trình cấy ghép nhân hoặc nhân bản vô tính từ tế bào soma chứng tỏ là tuỳ loại tế bào, tuỳ mức độ và giai đoạn biệt hoá mà tính ngược chiều của hoạt động gen thể hiện khác nhau từ các gen riêng lẻ, các họ gen hay toàn bộ genom.

Bảng 3.3. Sự tổng hợp ARN và ADN trong các tế bào bố mẹ I và II và tế bào lai heterocaryon (I x II)

Heterocaryon						ARN		ADN	
Tế bào I	ARN	ADN	Tế bào II	ARN	ADN	I	II	I	II
Hela (người)	+	+	Đại thực bào (thở)	+	-	+	+-	+	+-
Hela (người)	+	+	Tế bào limpho (chuột)	+	-	+	+-	+	+-
Hela (người)	+	+	Hồng cầu (gà)	-	-	+	+-	+	+-
Đại thực bào (thở)	+	-	Hồng cầu (gà)	-	-	+	+-	-	-
Nguyên bào cơ (chuột)	+	+	Hồng cầu (gà)	-	-	+	+-	+	-
Tế bào cơ (chuột)	+	-	Hồng cầu (gà)	-	-	+	+-	-	-
Melanocyt (chuột)	+	+	Đại thực bào (thở)	+	-	+	+-	+	+-

Ghi chú: + có; - không, +- khi có khi không

2. Sự biến đổi của bộ thể nhiễm sắc trong tế bào lai

Phân tích bộ thể nhiễm sắc của tế bào lai có tầm quan trọng trong việc xác định các tế bào dung hợp có thực sự là tế bào lai hay không, và cho phép ta nghiên cứu nhiều vấn đề về cấu trúc, tập tính của thể nhiễm sắc như là cấu trúc hiển vi chứa thông tin di truyền của tế bào. Bằng phương pháp đánh dấu thể nhiễm sắc và các phương pháp tế bào học khác như xây dựng kiểu nhân, nhuộm cắt băng cũng như phương pháp lai ADN v.v. người ta đã làm sáng tỏ nhiều vấn đề di truyền và biến dị của các tế bào lai soma.

Trong tế bào lai khác loài ví dụ giữa chuột và người, giữa chuột với khỉ, giữa chuột với gà v.v... khi hai bộ thể nhiễm sắc của hai tế bào bố mẹ tổ hợp lại với nhau sẽ xảy ra sự biến mất một số thể nhiễm sắc của một trong hai bộ hoặc của cả hai bộ thể nhiễm sắc (bảng 3.4).

Theo dõi sự biến đổi bộ thể nhiễm sắc trong dòng tế bào lai qua các thế hệ thấy các quần thể tế bào lai chứa bộ thể nhiễm sắc rất đa dạng về mức bội thể (heteropolyploid) và tùy thuộc không chỉ về loài mà còn tùy thuộc vào loại mô bố mẹ (tim, gan, thận, tuỷ xương, tuyến ức, iách, não, v.v...) và còn tùy thuộc vào trạng thái của thể nhiễm sắc của tế bào bố mẹ trước khi đệm lai (bị đột biến do chiếu xạ, hoá chất hoặc ung thư v.v...) và cả trạng

thái hoạt động của gen. Xu thế là thể nhiễm sắc nào bị tổn thương, hoặc thể nhiễm sắc chứa nhiều gen hoạt động sẽ bị thải loại trong tế bào lai.

Bảng 3.4. Sự biến mất thể nhiễm sắc trong tế bào lai khác loài

Tế bào lai	Loài bị mất thể nhiễm sắc
Người + Chuột nhắt	Người
Người + Chuột hamster	Người
Chuột nhắt + Khỉ	Khỉ
Chuột nhắt + Chuột cống	Chuột nhắt, chuột cống
Chuột nhắt + Gà con	Gà con
Chuột hamster + Gà con	Gà con

Số lượng thể nhiễm sắc bị mất cũng như tốc độ mất tuỳ thuộc vào sự khác biệt chủng loại giữa tế bào bố mẹ và tuỳ thuộc vào dòng tế bào lai qua các thế hệ sống còn. Ví dụ trong tế bào lai giữa chuột nhắt với chuột hamster sự thải loại thể nhiễm sắc xảy ra chậm, còn trong tế bào lai giữa người với gà, thải loại thể nhiễm sắc xảy ra nhanh hơn trong giai đoạn sống đầu tiên nhưng càng về sau sự thải loại xảy ra chậm dần cho tới khi tế bào lai mang số thể nhiễm sắc ổn định (giữ lại từ một đến ba thể nhiễm sắc của người). Trong một dòng tế bào lai sự thải loại thể nhiễm sắc diễn ra cũng rất khác nhau, ví dụ tế bào lai giữa chuột và người có dòng vẫn giữ nguyên bộ thể nhiễm sắc người trong suốt 4 tháng, trong thời gian đó có dòng bị thải loại tới 50% thể nhiễm sắc người. Để thuận tiện phân tích bộ thể nhiễm sắc, các nhà nghiên cứu ưa sử dụng tế bào chuột hamster Trung quốc ($2n = 22$) lai với tế bào người ($2n = 46$). Các tế bào lai chỉ qua thời gian sống từ 1 - 2 tuần đã cho các dòng ổn định với toàn bộ bộ thể nhiễm sắc của chuột và 1 - 2 thể nhiễm sắc người và như vậy rất thích hợp cho việc nghiên cứu.

Sự giữ lại hoặc thải loại thể nhiễm sắc nào trong bộ thể nhiễm sắc bố hoặc mẹ trong tế bào lai xảy ra không phải ngẫu nhiên mà chắc chắn là tuân theo các cơ chế tương tác giữa hai genom trong trạng thái tế bào chung của tế bào lai và với môi trường nuôi cấy *in vitro*.

Trong tế bào lai xảy ra sự biến đổi về cấu trúc thể nhiễm sắc. Các tế bào bố mẹ được dùng để lai trong nuôi cấy có thể ở các giai đoạn khác nhau của chu kỳ tế bào: có tế bào ở giai đoạn M (mitosis - giai đoạn phân bào), có tế bào ở giai đoạn gian kỳ I (Interphase - gian kỳ gồm G_1 , S , và G_2). Khi các tế bào bố mẹ dung hợp tạo thành tế bào lai heterocaryon chứa một nhân dung hợp thống nhất với hai hoặc vài bộ thể nhiễm sắc, thường quan sát

thấy sự biến đổi về cấu trúc trong các thể nhiễm sắc như sự đồng đặc hoá, dứt đoạn v.v... Nếu tế bào bố mẹ 1 ở giai đoạn M thì nhân của tế bào bố mẹ 2 có thể đang ở giai đoạn G₁, S hoặc G₂. Nếu ở G₁ người ta quan sát thấy các sợi nhiễm sắc qua tế bào 1 ở dạng đồng đặc sợi đơn, nếu ở G₂ tức là giai đoạn sau tổng hợp ADN, các sợi nhiễm sắc đồng đặc ở dạng sợi đôi gần giống như ở tiền kỳ của mitos bình thường. Nếu ở S thì dạng đồng đặc ở dạng các mảnh vụn. Người ta cho rằng, dưới ảnh hưởng của các nhân tố phân bào của tế bào 2 đã làm biến đổi cấu trúc của thể nhiễm sắc của tế bào 1, sang dạng đồng đặc gần giống với dạng đồng đặc và co ngắn của thể nhiễm sắc ở kỳ giữa trong phân bào mitos bình thường. Các thể nhiễm sắc bị đồng đặc và dứt mảnh sẽ bị thải loại qua các kỳ phân bào của tế bào lai syncaryon.

Trong nuôi cấy, các syncaryon có xu thế đồng thời hoá (synchronisation) các pha qua các thể hệ phân bào, và để thuận tiện cho việc nghiên cứu tế bào lai các nhà nghiên cứu thường thực hiện phương pháp làm đồng thời hoá các pha của các tế bào bố mẹ trước khi đem nuôi cấy để lai để loại trừ hiện tượng đồng đặc hoá. Nhưng khi cần nghiên cứu so sánh trạng thái mở xoắn và xốp hoá của chất nhiễm sắc ở gian kỳ với trạng thái xoắn và đồng đặc của thể nhiễm sắc ở phân bào, cũng như khi cần nghiên cứu ảnh hưởng của các tác nhân gây đột biến (như bức xạ, hoá chất) lên cấu trúc của chất nhiễm sắc ở gian kỳ thì các nhà nghiên cứu thường sử dụng các tế bào lai mang các thể nhiễm sắc đồng đặc.

3. Sự biểu hiện của gen thành các tính trạng kiểu hình ở tế bào lai

Khi ta cho lai hai loại tế bào soma khác loài *in vitro* ta thu được tế bào lai ở dạng heterocaryon chứa hai nhân hoặc vài nhân riêng biệt, về sau cả nhân trong heterocaryon dung hợp tạo nên một nhân độc nhất chứa tổ hợp các bộ thể nhiễm sắc trong một tế bào lai được gọi là syncaryon. Cá heterocaryon có thể tồn tại rất lâu hoặc chết đi hoặc biến thành syncaryon. Người ta theo dõi số phận và đời sống của các tế bào lai qua các đặc tính như biểu hiện của hệ gen thành các tính trạng kiểu hình (phenotip) chủ yếu là tổng hợp các protein, các enzym, sự tạo thành các siêu cấu trúc, sự biến hoá tế bào về hình thái và một số đặc tính sinh lý sinh hoá khác như phản ứng với các tác nhân kích thích, sự sinh sản và phát triển v.v...

Để nghiên cứu sự biểu hiện tính trạng của các tế bào lai syncaryon người ta thường dùng: các tế bào bố mẹ có các đặc tính như tính toàn năng (totipotential) hoặc đa năng (multipotential) ví dụ tế bào trứng đã thụ tinh

tế bào phôi ở giai đoạn sớm; tế bào teratoma (tế bào ung thư trong cơ quan sinh dục) hoặc các tế bào phôi ở giai đoạn phát triển muộn, tế bào của các mô ở động vật trưởng thành; hoặc các tế bào dị bội (heteroploide) chưa biệt hoá và sẽ không biệt hoá trong nuôi cấy lâu dài. Điểm hình cho hai loại tế bào này là tế bào Hela người và tế bào L chuột nhắt.

Để theo dõi sự biểu hiện tính trạng của tế bào lai người ta thường dựa vào sự phân tích các tính chất sau được xem là kiểu đánh dấu:

- đặc tính hình thái, tốc độ tăng trưởng, ức chế tiếp xúc và sự già (kiểu đánh dấu A);
- các đặc tính sinh lý và miễn dịch, nhu cầu chất dinh dưỡng (kiểu đánh dấu B);
- các protein đặc trưng ví dụ các enzym, globulin miễn dịch, hocmon (kiểu đánh dấu C);
- đặc tính nhạy cảm với chất có hoạt tính sinh học (kiểu đánh dấu D).

Ta cần chọn hai dạng tế bào bố mẹ khác nhau một trong các đặc tính nêu trên thì ta xem đó là kiểu đánh dấu để theo dõi và phân tích ở tế bào lai. Ví dụ khi ta chọn tế bào bố mẹ 1 có một trong các tính chất ABCD và tế bào bố mẹ 2 không có một trong các tính chất đó (ta ký hiệu abcd) và dựa vào từng cặp tính chất (kiểu đánh dấu ABCD và abcd) để phân tích ở tế bào lai ở các dòng khác nhau có hay không có các tính trạng đó.

Một trong các kiểu đánh dấu được sử dụng nhiều nhất là phân tích protein gồm các enzym, các protein đặc thù và các hocmon. Enzym là protein đóng vai trò chất xúc tác sinh học có vai trò rất quan trọng trong các quá trình trao đổi chất đặc trưng cho toàn bộ cơ thể ví dụ các enzym của đường phân (glycolyse), của chu trình Krebs, các enzym tham gia tái bản mā và phiên mā v.v... Các enzym được dùng như là kiểu đánh dấu thường là lactatdehydrogenaza, malatdehydrogenaza, β -glucoronidaza, glucozo-6-phosphate dehydrogenaza cùng các dạng isoenzym của chúng. Các protein đặc thù được sử dụng làm kiểu đánh dấu thường là globulin miễn dịch, các kháng nguyên bề mặt, các chất hoạt tính thần kinh (như protein S-100, axetylcholinesteraza), các protein cấu trúc như hemoglobin, actin, albumin, collagen v.v... Các hocmon được sử dụng làm kiểu đánh dấu thường là hocmon sinh trưởng v.v...

Sử dụng các protein đặc thù làm kiểu đánh dấu người ta theo dõi được sự biểu hiện của gen mã hoá cho protein đó và quá trình biệt hoá của tế bào lai, ví dụ hemoglobin là protein đặc thù cho hướng biệt hoá của hồng cầu,

protein S-100 là protein sẽ dẫn tới biệt hoá tế bào thần kinh v.v... Nhưng cần phải lưu ý là: protein actin là đặc thù tế bào cơ, nhưng actin cũng có mặt trong rất nhiều dạng tế bào tạo nên cấu trúc vi sợi có chức năng là bộ khung xương tế bào và tham gia các kiểu vận động nội bào như vận động tế bào chất, vận động amip quan sát thấy ở bạch cầu, đại thực bào v.v... Vì vậy để đánh giá trạng thái biệt hoá của tế bào lai cần sử dụng kiểu đánh dấu hình thái và sinh lý ví dụ để đánh giá dạng biệt hoá nơron cần phân tích các cấu trúc như vi sợi thần kinh, các sợi lồi tế bào chất, cũng như hoạt tính điện sinh lý v.v..., dạng biệt hóa tế bào cơ là các cấu trúc tơ cơ v.v..

Đặc tính nhạy cảm với các chất có hoạt tính sinh học đặc biệt được sử dụng thường là các tác nhân gây đột biến (mutagen), là kiểu đánh dấu để phân tích khi nuôi cấy và lai các tế bào bố mẹ đã bị đột biến.

Sử dụng các kiểu đánh dấu ta có thể theo dõi sự biểu hiện của các gen trong các thể nhiễm sắc thường hoặc các gen trong các thể nhiễm sắc giới tính, đặc biệt là nhiễm sắc thể X. Ví dụ khi lai tế bào người với tế bào chuột nhắt, ta dùng các kiểu đánh dấu như enzym lactatdehydrogenaza hoặc β -glucoronidaza hoặc kháng thể HLA người và kháng thể H_2 chuột, ta có thể theo dõi sự biểu hiện trội hoặc lặn hoặc biểu hiện tương tác của các gen mã hoá cho các protein đó trong tế bào lai qua các thế hệ. Nhiều kết quả nghiên cứu chứng minh là trong tế bào lai các gen này của chuột thường ở trạng thái trội (tức là có tổng hợp các protein), còn các gen này của người thường ở trạng thái lặn (tức là không tổng hợp protein).

Khi sử dụng enzym glucozo-6-phosphate dehydrogenaza là enzym di truyền liên kết với thể nhiễm sắc X (gen mã hoá nằm trong X) để theo dõi biểu hiện của gen trong tế bào lai thì thấy là trong tế bào lai quan sát được cả hai dạng enzym của bố và mẹ, đồng thời còn xuất hiện cả dạng enzym tổ hợp gồm các tiểu đơn vị của cả hai enzym bố và mẹ. Điều đó chứng tỏ rằng một thể nhiễm sắc X bị bất hoạt hoá trong quá trình phát triển phôi, quan sát được ở dạng chất nhiễm sắc giới tính - thể Barr, đã được tái hoạt hoá trong tế bào lai.

Để nghiên cứu quá trình biệt hoá của tế bào lai người ta thường sử dụng tế bào bố mẹ đặc biệt là các tế bào ung thư của các mô như tế bào melanom (tế bào ung thư sắc tố), hepatom (tế bào ung thư gan), teratom (tế bào ung thư sinh dục), neuroblastom (tế bào ung thư thần kinh), hoặc các tế bào của các chủng quần biệt hoá cao ổn định như tế bào limpho, tế bào sợi tế bào dòng hồng cầu v.v... Ví dụ khi lai tế bào melanin của chuột hamster (là tế bào có chứa sắc tố melanin ở dạng các hạt đen trong tế bào chất) với tế

bào L (là tế bào được nuôi giữ *in vitro* không chứa melanin của chuột, ta thu được tế bào lai với các dòng khác nhau đều không chứa melanin. Bình thường melanin xuất hiện trong các tế bào sắc tố (melanocyte) là sự chuyển hóa của tirozin thành melanin dưới sự xúc tác của enzym diphenoloxida và gen mã hóa cho enzym này phải ở trạng thái hoạt động tức là phiên mã và dịch mã. Như vậy trong tế bào lai không xuất hiện melanin chứng tỏ các gen đó của tế bào melanom đã bị ức chế.

Ví dụ khi đem lai tế bào hepatom của chuột nhắt (là tế bào tích cực tổng hợp albumin) với tế bào bạch cầu người (là tế bào không tổng hợp albumin), người ta thu được tế bào lai trong đó bộ thể nhiễm sắc của chuột nhắt được giữ nguyên nhưng đa số thể nhiễm sắc của người bị thải loại, người ta quan sát thấy trong một số tế bào lai tổng hợp cả hai loại albumin chuột và người. Điều đó chứng tỏ dưới ảnh hưởng của trạng thái hoạt động của gen chuột đã làm hoạt hóa gen mã hóa albumin của người trong tế bào lai.

Để nghiên cứu các **đặc tính biệt hoá về hình thái**, người ta thường sử dụng các tế bào ung thư thần kinh - neuroblastom. Trong nuôi cấy *in vitro*, các tế bào neuroblastom thể hiện hàng loạt đặc tính biệt hoá của nơron như đặc tính điện thế màng, hoạt tính acetylcholinesteraza cao, xuất hiện các cấu tạo hình thái như vi sợi thần kinh, các phân nhánh tế bào chất v.v... Khi sử dụng tế bào neuroblastom chuột nhắt lai với các loại tế bào khác nhau như tế bào L chuột nhắt, nguyên sợi bào (fibroblast), người ta thu nhận được quần thể tế bào lai đa dạng về kiểu đánh dấu tế bào nơron, ví dụ tế bào lai từ neuroblastom chuột nhắt với fibroblast người, thể hiện hoạt tính cholinacetyltransferaza cao hơn hàng 100 lần so với tế bào bố mẹ, và khi phân tích bộ thể nhiễm sắc của tế bào lai thì thấy chúng chỉ giữ lại thể nhiễm sắc người số 9 trong tế bào lai. Sự xuất hiện các đặc tính của nơron ở tế bào lai rất đa dạng từ hoạt tính các enzym đến các cấu trúc như vi sợi thần kinh, nhánh lồi thần kinh, điều đó chứng tỏ trong quá trình biệt hoá nơron, các đặc tính xuất hiện theo từng giai đoạn và có sự điều hoà phối hợp lẫn nhau.

4. Các bào quan trong tế bào lai

Trong quá trình hình thành và phát triển của tế bào lai *in vitro* xảy ra nhiều biến đổi của các bào quan như sự dính kết hai màng sinh chất của hai tế bào bố mẹ để tạo thành màng sinh chất chung, sự dung hợp hai nhân để tạo thành nhân độc nhất với bộ thể nhiễm sắc hỗn hợp, sự biến đổi trong

hoạt động của riboxom, của ty thể v.v...

Ta xem xét một số vấn đề có liên quan đến biến đổi của riboxom và ty thể:

a. Khi theo dõi sự tổng hợp rARN-28S trong tế bào lai giữa tế bào chuột nhắt và tế bào người với sự sử dụng phương pháp nguyên tử đánh dấu bằng H³-hipoxantin người ta quan sát thấy nếu tế bào lai khi còn chứa gần đủ bộ thể nhiễm sắc của người và chuột thì khi đó tế bào lai tổng hợp cả hai loại rARN người và chuột, nhưng trong các dòng tế bào lai chỉ chứa đủ bộ thể nhiễm sắc của chuột còn thể nhiễm sắc của người bị thải loại nhiều thì rARN được tổng hợp chỉ là của chuột, và khi phân tích bộ thể nhiễm sắc trong các tế bào lai này thì chúng không còn chứa các thể nhiễm sắc có thể kèm (thể nhiễm sắc số 13, 14, 15, 21 và 22) là những thể nhiễm sắc có chứa vùng NOR (nucleolus organizing region) tức là chứa các gen rARN-45S từ đây sẽ phiên mã thành rARN 45S và sau đó được chế biến để tạo thành các rARN 28S; 5,8S và 18S của riboxom. Các thể nhiễm sắc đó bị thải loại thì các gen đó cũng bị thải loại.

b. Nghiên cứu hoạt động của ty thể trong tế bào lai đã đóng góp nhiều dẫn liệu cho nghiên cứu di truyền ty thể - một bào quan tuy nằm trong tế bào chất và bị sự kiểm tra của hệ gen trong nhân nhưng chúng vẫn giữ đặc tính di truyền tự lập vì chúng có chứa ADN và hệ tổng hợp protein riêng (rARN và tARN).

Ty thể của chuột hoặc người chứa các phân tử ADN kép, trắn, dạng vòng có kích thước dài khoảng 5 micron chứa vài chục gen mã hoá cho khoảng 13 protein riêng của ty thể (chiếm 5% tổng số protein ty thể) và các rARN và tARN của ty thể. Loại ADN có trong ty thể được gọi là ADN-ty thể (M-ADN) có tính tự tái bản và phiên mã diễn ra trong ty thể.

Khi theo dõi các chủng quần tế bào lai giữa chuột nhắt và người và theo dõi M-ADN người, ta thấy có sự tương quan giữa sự thải loại thể nhiễm sắc và thải loại M-ADN. Ở các chủng quần tế bào lai còn có đủ bộ thể nhiễm sắc chuột và đa số thể nhiễm sắc người thì còn có cả M-ADN chuột và người, và theo đà thể nhiễm sắc người bị thải loại dần thì M-ADN người bị thải loại tương ứng và ở tế bào lai không còn chứa thể nhiễm sắc người thì chỉ tìm thấy M-ADN chuột mà thôi. Điều đó chứng tỏ có sự tương quan mật thiết giữa bộ gen trong nhân với M-ADN của ty thể. Điều lý thú là trong tế bào lai mà trong đó có cả hai loại M-ADN chuột và người, đã phát hiện ra loại M-ADN lai tức là M-ADN tái tổ hợp giữa người và chuột.

Khi nghiên cứu tế bào lai người ta cũng đã xác định được hệ enzym ty

thể do gen của nhân kiểm soát và hệ enzym ty thể do gen của ty thể (M-ADN) kiểm soát.

V. LẬP BẢN ĐỒ GEN

Nghiên cứu các đặc tính di truyền và biến dị của các tế bào lai soma đã cung cấp nhiều dẫn liệu làm sáng tỏ nhiều vấn đề của di truyền tế bào, di truyền phân tử như tập tính của thể nhiễm sắc trong chu kỳ tế bào, sự tái tổ hợp soma, sự điều hoà hoạt động của gen, sự điều hòa hoạt động của phôi như vấn đề lai các loài rất xa nhau, vấn đề biệt hoá tế bào, đồng thời phương pháp lai tế bào soma được áp dụng để giải quyết những vấn đề thực tiễn như lập bản đồ gen, nghiên cứu ung thư, nghiên cứu các tác nhân độc hại của môi trường (virut, chất độc) cũng như trong công nghệ nuôi cấy tế bào mô và công nghệ gen.

Để lập bản đồ gen các nhà di truyền học sử dụng rất nhiều phương pháp trong đó có phương pháp lai tế bào soma. Khi lai các tế bào khác loài thì trong tế bào lai xảy ra sự đồng đặc và thải loại có chọn lọc các thể nhiễm sắc của một trong hai loài, vì vậy căn cứ vào phân tích kiểu hình và bộ thể nhiễm sắc cho phép ta xác định được gen định khu trong thể nhiễm sắc nào, xác định các nhóm liên kết gen từ đó xác lập được bản đồ gen của mỗi một thể nhiễm sắc trong bộ. Hơn nữa có thể sử dụng tế bào lai để phân tích tính bổ trợ của gen tức là các sai lệch di truyền trong tế bào có liên quan đến một hoặc nhiều locut gen khác nhau.

Người ta sử dụng các tế bào lai để lập bản đồ gen của nhiều loài động vật thuộc các bậc phân loại xa nhau hoặc gần nhau như chuột nhắt, chuột cống, thỏ, ngựa, lừa, khỉ thấp, khỉ cao và con người để nghiên cứu cơ sở phân tử và di truyền của tiến hoá và phân loại.

Ngay từ năm 1975, các nhà nghiên cứu đã phát hiện và kiểm tra lại hàng trăm gen định khu trong tất cả 22 đôi thể nhiễm sắc thường cũng như hàng chục gen định khu trong thể nhiễm sắc X và Y của người bằng phương pháp lai tế bào soma giữa tế bào người với tế bào các động vật khác như chuột nhắt, chuột cống, chuột hamster v.v... Ví dụ trong thể nhiễm sắc số 1 phát hiện được 19 gen và vị trí phân bố của chúng.

VI. LAI TẾ BÀO SOMA VÀ CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT

Tế bào thực vật khác biệt với tế bào động vật về nhiều đặc tính trong

đó có đặc điểm tồn tại ở tế bào thực vật lớp thành vỏ xenluloza bao ngoài màng sinh chất. Vỏ xenluloza ngăn cản các tế bào thực vật dung hợp với nhau *in vitro*.

Bằng các phương pháp cơ học (vi phẫu thuật) hoặc hoá học (xử lý bằng enzym) người ta có thể tách bỏ lớp vỏ xenluloza và tế bào trở thành **nguyên bào** hay còn gọi là **tế bào trần** (protoplast). Trong nuôi cấy *in vitro* các tế bào trần dễ dàng dung hợp tạo các tế bào lai giống như tế bào động vật, và còn có ưu thế hơn ở chỗ các tế bào lai có thể phát triển thành các khối tế bào đa năng (callus) và từ đó tạo thành phôi (được gọi là phôi soma) và sẽ phát triển thành cây hoàn chỉnh.

1. Phương pháp tạo protoplast

a. Phương pháp cơ học - vi phẫu thuật. Người ta cho miếng mô vào dung dịch ưu trương để khôi tế bào chất cùng màng sinh chất tách khỏi vỏ xenluloza. Sử dụng kim nhọn và dao phẫu thuật để tách cắt các mô cùng lớp vỏ và sau đó ngâm vào môi trường nuôi cấy pha loãng, tế bào chất sẽ phồng to và tách khỏi vỏ xenluloza ra ngoài và tạo thành các tế bào trần tự do.

b. Phương pháp sử dụng enzym. Người ta có thể sử dụng các enzym: xenlulaza, pectinaza và hemixenlulaza để phân huỷ lớp vỏ xenluloza tạo tế bào trần. Enzym sử dụng phải tinh khiết nếu còn chứa ít nhiều các proteaza hoặc peroxydaza sẽ làm hỏng tế bào trần. Hiệu quả tạo tế bào trần còn tuỳ thuộc vào loại mô và cây được sử dụng.

Cũng cần chú ý là các tế bào trần có thể sống *in vitro* và tái tạo lại vỏ xenluloza và trở thành tế bào nhiều nhân hoặc nhân đa bởi do hiện tượng nội phân, hoặc do hiện tượng liên kết của hai hoặc vài tế bào cùng loại, vì tế bào thực vật có đặc tính liên kết tế bào chất với nhau qua cầu nối tế bào chất (plamadesma) và chúng dễ dàng hợp nhất với nhau khi mất lớp vỏ xenluloza để tạo thành tế bào đa nhân. Vì vậy khi nuôi cấy *in vitro* các tế bào trần thuộc các loài hoặc chi khác nhau ta cần phải xác định chính xác các tế bào lai heterocaryon thực sự trong đó có chứa bộ gen của cả hai loài.

2. Sự liên kết và dung hợp tế bào trần

Sự liên kết và dung hợp tế bào trần để tạo thành các tế bào lai heterocaryon giữa các mô cùng một loài hoặc thuộc các loài khác nhau tuỳ thuộc vào nồng độ các ion natri, kali và canxi cũng như độ pH của môi trường nuôi cấy, cũng như tuỳ thuộc vào một số chất có tác dụng tăng cường liên kết tế bào như lysozym và đặc biệt là polyethylen glicol do cấu trúc

phân tử của chúng có thể tạo nên các liên kết ion với các chất có ở bề mặt màng sinh chất của tế bào. Sử dụng polyethylen glicol (với nồng độ 0,2 - 0,3 M) có thể tạo các tế bào lai đạt từ 25 - 50% và các tế bào lai có thể tồn tại qua nhiều thế hệ. Sự tạo thành callus và tái sinh cây từ tế bào lai syncaryon không phụ thuộc vào phương pháp tạo tế bào lai.

3. Sự phát triển của tế bào lai

Các tế bào trân được nuôi cấy *in vitro* có thể chết, có thể dung hợp thành tế bào lai chứa hai nhân khác loài - heterocaryon. Nếu heterocaryon tái sinh thành vỏ xenluloza và phân bào sẽ được xem như chúng sống và phát triển. Điều lý thú đối với lai tế bào trân ở thực vật là chúng không những có khả năng biểu hiện hoạt động của gen và sinh trưởng và biệt hoá giống như tế bào lai động vật mà còn có khả năng tái sinh thành cây toàn vẹn được xem như cây lai soma.

Khi heterocaryon phân chia thì nhân ở thế hệ tế bào con chưa dung hợp thành một nhân lai độc nhất, tuy chúng có xu thế đồng thời hoá mitos, một số heterocaryon qua vài thế hệ nhanh chóng bị chết đi. Trong các heterocaryon có nhân ở cạnh nhau thì qua mitos hai bộ thể nhiễm sắc sẽ hợp nhất để cho ra một nhân lai và ở các thế hệ sau các tế bào con đều là tế bào lai chứa một nhân lai độc nhất - các syncaryon. Tất cả các tế bào phát triển từ một syncaryon tạo nên một dòng lai (clon line). Các tế bào lai syncaryon cũng giống như các tế bào soma thực vật cho ra khói mô da tiêm nồng (mô sẹo - callus) và khi nuôi cấy chúng với các hormone thực vật và chế độ chiếu sáng khác nhau sẽ biệt hoá thành chồi lá và rễ và sẽ tái sinh thành cây toàn vẹn và ra hoa kết quả như cây lai hữu tính. Ví dụ, khi lai tế bào trân giữa hai loài thuốc lá *Nicotiana* đã tạo được các cây lai soma giống như cây lai hữu tính.

4. Chọn lọc và xác định các dòng tế bào lai và mô sẹo

Để xác định các dòng tế bào lai soma thực vật các nhà nghiên cứu cũng sử dụng các điểm đánh dấu như ở tế bào lai động vật. Những chỉ tiêu hình thái thường được dùng để đánh dấu di truyền cho các giai đoạn phát triển của tế bào lai, của mô sẹo cho tới khi tái sinh cây toàn vẹn như sự có mặt hay không các loại lạp thể (bạch lạp, sắc lạp, lục lạp), sự sinh trưởng của mô sẹo tuỳ thuộc vào hormone auxin, mức độ phát triển biểu mô, hình dạng lá khi tái sinh cây v.v... Những đánh dấu di truyền như số lượng thể nhiễm sắc, bản chất các isoenzym, sự biểu hiện của gen v.v... đều được sử dụng để

theo dõi, xác định và chọn lọc các dòng tế bào lai. Phân tích kiểu nhân ở tế bào lai thực vật cũng đóng vai trò quan trọng như ở tế bào lai động vật mà ta đã xem xét.

Sử dụng các đột biến và bổ trợ gen làm chỉ tiêu đánh dấu di truyền, người ta có thể phát hiện trạng thái hoạt động của gen khi so sánh tế bào lai và cây lai soma với tế bào bố mẹ và cây lai hữu tính. Ví dụ khi đem lai soma từ các tế bào trung mô lá của hai thế đột biến *Nicotiana tobacum* (đều không có khả năng tổng hợp chlorophil nên sinh trưởng chậm và không có màu xanh) người ta thu nhận được các tế bào lai và từ đó tái sinh thành cây toàn vẹn, cây lai soma này cũng giống các cây lai hữu tính (giữa hai thế đột biến) về các đặc điểm như tổng hợp chlorophil, có màu xanh và sinh trưởng bình thường. Khi nghiên cứu hiện tượng bổ trợ gen các nhà nghiên cứu phát hiện thấy trong tế bào lai soma giữa hai loài thuốc lá *Nicotiana* xuất hiện phức hệ enzym diphotphoribulozocacboxilaza (có khối lượng phân tử 550000D) là enzym tham gia vào quá trình quang hợp (cố định CO₂) trong lục lạp là phân tử lai.

Phức hệ chứa hai đơn vị mã hoá bởi gen của lục lạp thuộc một loài bố mẹ, còn các đơn vị còn lại của enzym được mã hoá bởi cả hai gen của hai loài bố mẹ. Điều đó chứng tỏ có sự hoạt động bổ trợ và ức chế của gen thuộc hai loài khi chúng phối hợp hoạt động.

5. Ưu thế của lai soma thực vật

Trong tự nhiên ở mức độ cơ thể rất khó vượt qua hàng rào giới tính để xảy ra lai hữu tính giữa các cá thể thuộc các loài khác nhau để cho ra con lai hữu thụ, nhưng khi trong điều kiện *in vitro* với phương pháp lai soma, người ta có thể tạo ra nhiều dạng lai giữa các loài rất xa nhau thậm chí giữa các chi, họ và bộ. Ưu thế của tế bào lai thực vật so với tế bào lai động vật không chỉ về phương diện phương pháp, về phân tích di truyền... mà quan trọng là về ứng dụng thực tiễn vì từ tế bào lai thực vật người ta dễ dàng tái sinh được cây toàn diện và có thể sử dụng trong việc tạo giống mới và tăng năng suất cây trồng. Ta xem xét một số ưu thế đó:

Sử dụng mô hình tế bào lai thực vật có thể nghiên cứu nhiều vấn đề về di truyền tế bào như đối với tế bào lai động vật: sự biểu hiện và điều chỉnh hoạt động của gen trong quá trình biệt hoá, sự bổ trợ và tái tổ hợp gen.

Hơn nữa kỹ thuật lai các tế bào trên thực vật không đòi hỏi phức tạp như lai động vật về môi trường dinh dưỡng, về hoạt chất kích thích sự dụng hợp phức tạp như virut, mà chỉ cần sử dụng polyethylen glicol kết hợp với

sự xử lý bằng ion canxi là dễ dàng tạo tế bào lai với hiệu suất cao.

Từ các mô của thực vật có thể thu nhận được nhiều loại tế bào tràn đơn bội, lưỡng bội, đa bội và lệch bội và từ đây có thể dễ dàng chọn lọc nguyên liệu đồng nhất để nghiên cứu mà không cần phải sử dụng kỹ thuật chọn dòng (clonning) phức tạp như đối với tế bào động vật.

Các dòng tế bào tràn sống lâu và dễ dàng tạo tế bào lai.

Đối với tế bào lai thực vật có thể sử dụng nhiều đặc tính hình thái để quan sát làm kiểu đánh dấu như sự có mặt lục lạp, đặc tính mô callus và các đặc tính hình thái của cây tái sinh.

Ưu thế trội nhất của tế bào lai thực vật là ở chỗ không chỉ các tế bào tràn mà tế bào lai khi nuôi cấy *in vitro* đều có thể phát triển thành mô callus và từ đó tái sinh thành cây toàn vẹn, do đó có thể nghiên cứu sự biểu hiện của gen trong quá trình phát sinh hình thái (morphogenesis), và ứng dụng vào công nghệ tế bào và công nghệ gen để tạo các giống lai với đặc tính mong muốn, có năng suất cao, có khả năng chống chịu bệnh tật, thích nghi với các điều kiện ngoại cảnh v.v...

VII. CÔNG NGHỆ TẾ BÀO LAI VÀ ỨNG DỤNG

Ở đây chúng ta chỉ đề cập đến một số ứng dụng thực tiễn của công nghệ lai tế bào soma trong việc tạo giống cây trồng và thực tiễn y học.

1. Tạo và chọn lọc giống cây trồng

Trong sinh giới, thực vật và động vật sinh sản hữu tính, cá thể được hình thành từ sự thụ tinh giữa hai cá thể bố mẹ, là cá thể lai hữu tính và chúng chỉ hữu thụ khi lai trong loài và sự lai hữu tính khó vượt qua hàng rào phân loại. Sự lai soma *in vitro* tạo điều kiện cho phép lai các tế bào thực vật và động vật thuộc các bậc phân loại rất xa nhau.

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào tràn cũng như lai tế bào tràn thực vật cho phép tái sinh các dạng cây lai theo những tính trạng mà nhà chọn giống đã thiết kế trước. Tế bào tràn cũng như tế bào lai là những mô hình lý tưởng để thực hiện kỹ thuật chuyển gen, chuyển các bào quan (ty thể, lục lạp), vi khuẩn và virut vào tế bào, vào nhân, và từ đó tạo nên các dạng lai, tái tổ hợp khác nhau.

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào tràn và tế bào lai có ý nghĩa đặc biệt quan trọng trong công tác tạo và chọn giống cây trồng nhất là đối với các giống ít

khi sinh sản hữu tính như chuối, mía, khoai tây, sắn, v.v.... Ví dụ bằng phương pháp kỹ thuật tế bào trần và lai soma, người ta đã tạo được giống cải lai giữa *Brassica napus*, *Brassica campestris* và *Raphanus sativus* trong đó có mang các đặc tính di truyền của kiểng nhân *B. napus* và các gen tái hợp giữa ty thể (*R. sativus*) với lục lạp (*B. campestris*). Cây lai không những có năng suất cao mà còn có khả năng chống chịu với thuốc diệt cỏ.

2. Sản xuất kháng thể đơn dòng

Kỹ thuật lai tế bào soma động vật *in vitro* không chỉ để nghiên cứu di truyền tế bào soma mà còn được ứng dụng trong thực nghiệm y học để sản xuất kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody) là kháng thể có tính đồng nhất về cấu trúc và tính chất được sử dụng trong miễn dịch học để nhận dạng và phân tích các kháng nguyên đặc thù, sử dụng trong kỹ thuật cấy ghép mô và cơ quan, trong chẩn đoán ung thư, dẫn dắt định hướng thuốc đến nơi cần đến v.v....

Kỹ thuật sản xuất kháng thể đơn dòng có thể tóm tắt như sau: chuột nhắt được gây miễn dịch bằng một kháng nguyên nào đó, trong huyết thanh miễn dịch của chuột sẽ có chứa các kháng thể đa dòng khác nhau, tuy mỗi dòng tế bào lympho B chỉ sản xuất một loại kháng thể đơn dòng.

Bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* với môi trường chọn lọc có chứa HAT (gồm hypoxanthin, aminopterin và timidin) người ta nuôi các tế bào lympho B được tách từ lách chuột đã được miễn dịch với các tế bào u tuỷ myeloma và người ta thu nhận được các tế bào lai (hybridoma).

Các tế bào lympho B có khả năng tổng hợp kháng thể có thể chống chịu được môi trường chứa HAT nhưng chúng không sống được lâu và nhanh chóng bị chết đi. Các tế bào u tuỷ myeloma không có khả năng tổng hợp kháng thể nhưng chúng có khả năng sống rất lâu trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, nhưng vì trong môi trường chọn lọc có HAT là chất chúng không chống chịu được cho nên chúng cũng bị chết. Trái lại các tế bào lai vừa có khả năng tổng hợp kháng thể, sống được trong môi trường chứa HAT lại vừa có khả năng phân bào và sống lâu dài. Bằng kỹ thuật chọn dòng (clonning) để tạo ra quần thể tế bào xuất phát từ chỉ một tế bào lai và mỗi dòng tế bào lai sẽ chỉ sản xuất ra một loại phân tử kháng thể hoàn toàn giống nhau - đó là kháng thể đơn dòng (hình 3.1)

Kháng thể đơn dòng được sản xuất hàng loạt và có nhiều ứng dụng thực tiễn. Chúng có thể được dùng để chẩn đoán và chữa trị các bệnh nhiễm trùng, dùng để thử nghiệm miễn dịch để phát hiện các kháng nguyên với

nồng độ thấp. Các kháng thể đơn dòng chống kháng nguyên ung thư được sử dụng để chẩn đoán và điều trị ung thư, đặc biệt có hiệu quả khi dùng kết hợp với các hoá chất độc như ricin chẳng hạn. Có thể dùng kháng thể đơn dòng dẫn dắt hướng chất thuốc đến đúng mô ung thư để tiêu diệt chúng do đó không gây ảnh hưởng tác hại đến mô lành. Kết hợp với kỹ thuật chuyển gen với kỹ thuật lai soma, người ta đã chế được các kháng thể đơn dòng đặc hiệu của người do đó không gây nên phản ứng miễn dịch có hại khi dùng chúng.

CHƯƠNG 4

DI TRUYỀN TẾ BÀO SOMA VÀ UNG THƯ

Nghiên cứu di truyền tế bào soma, đặc biệt là lai soma có liên quan đến nhiều vấn đề quan trọng của y học như vấn đề ung thư và các bệnh liên quan đến virut. Trong chương này ta sẽ xem xét cơ sở tế bào soma của ung thư được xem như là một bệnh: bệnh ung thư.

I. BỆNH UNG THƯ

Theo quan điểm của R. Virchow (1864) về "bệnh học tế bào" thì bệnh ung thư là bệnh của tế bào. Ngày nay bệnh ung thư được xem là một nhóm bệnh thể hiện sự biến đổi bất bình thường trong các đặc tính của tế bào về di truyền, sinh lý, sinh hoá, miễn dịch cũng như sinh trưởng và sinh sản không chịu sự kiểm soát chung của cơ thể dẫn tới tạo thành những khối mô bệnh được gọi là u (tumor).

Các u này không thực hiện một chức năng gì có ích cho cơ thể, trái lại chúng phá huỷ cấu trúc và chức năng của mô và cơ quan bình thường dẫn tới tử vong.

Người ta phân biệt hai loại u: u lành và u ác.

a. **U lành (benign tumor)** chứa các tế bào ung thư sinh sản chậm và bám vào mô liên kết tại chỗ nên chưa gây nguy hiểm. Nếu phát hiện sớm và điều trị bằng phẫu thuật hoặc chiếu xạ sẽ có kết quả tốt.

b. **U ác (malignant tumor)** chứa các tế bào ung thư sinh sản rất nhanh và đặc biệt là chúng có khả năng giải phóng khỏi mô và di chuyển đến các phần khác nhau của cơ thể được gọi là di căn (metastasis). Các tế bào ung thư di căn vào máu và theo dòng máu xâm nhập vào các mô khác và ở đây chúng sinh sản phát triển thành khối u mới gây rối loạn và phá huỷ các tế bào và mô của phần đó.

Các tế bào ung thư có nguồn gốc từ đâu? Nhiều nghiên cứu về tế bào ung thư *in vitro* cũng như *in vivo* đã chứng minh rằng tế bào ung thư là do sự chuyển hóa của các tế bào lành của mô thành tế bào ung thư và nguyên nhân gây chuyển hóa là rất nhiều. Vì vậy các nhà ung thư học thường căn cứ vào típ mô để phân loại khối u: ví dụ khối u xuất hiện ở mô gan được gọi là hepatom, ở mô liên kết là sarcom, ở mô tạo máu là leuco và leukemia, ở mô thần kinh là neuroblastom v.v... Người ta còn phân biệt dạng u rắn và u báng. U báng xuất hiện ở dạng thể dịch trong đó chứa các tế bào ung thư và đó là một dạng tồn tại tự do của tế bào ung thư trong thể dịch của cơ thể rất nguy hiểm.

II. SỰ CHUYỂN HÓA UNG THƯ

Để phân tích và nghiên cứu tế bào ung thư người ta xem xét so sánh các đặc tính của tế bào ung thư so với tế bào lành *in vitro* cũng như *in vivo*.

Trong cơ thể các tế bào của các mô khác nhau có thể chuyển hóa thành tế bào ung thư mang nhiều đặc tính về cấu trúc, sinh lý và di truyền khác với tế bào lành của mô đó. Trong nuôi cấy các tế bào lành của các mô *in vitro* với thời gian lâu dài hoặc có tác động của các tác nhân gây ung thư (hoá chất, bức xạ, virut) đều có thể chuyển hóa thành tế bào ung thư.

1. Tế bào lành và tế bào ung thư *in vitro*

Trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, các tế bào lảng xuống đáy bình, bám vào bề mặt đáy để sinh trưởng và sinh sản bằng phân bào, như vậy mặt tiếp xúc coi như điều kiện cần thiết cho tế bào sinh sản. Chúng thường phát triển thành lớp tế bào trật tự cho tới khi bám hết giá thể, chúng ngừng sinh sản và không di động được do lực ức chế tiếp xúc bề mặt. Trái lại, tế bào ung thư có thể phát triển và sinh sản trong môi trường nuôi cấy dạng lỏng sệt hoặc dạng huyền phù và tạo thành các quần thể tế bào vô trật tự hoặc nhiều lớp chồng lên nhau trên giá thể. Điều đặc biệt là các tế bào ung thư không chịu tác động của lực ức chế tiếp xúc, chúng có thể di động chiếm một không gian nào đó cho đến khi chúng ngừng sinh sản.

Như vậy *in vivo* cũng như *in vitro*, tế bào lành của các mô chịu tác động của lực ức chế tiếp xúc cũng như lực định vị, trái lại tế bào ung thư không chịu tác động của các lực đó. Điều này có thể là do thay đổi trong chương trình di truyền cũng như trong cấu trúc và tính chất của màng sinh

chất của các tế bào ung thư, đặc biệt là trong cấu trúc của các receptor màng đóng vai trò nhận biết và đánh dấu.

Về bộ máy di truyền có sự khác biệt giữa tế bào lành và tế bào ung thư: tế bào lành thường giữ bộ thể nhiễm sắc ổn định là $2n$, trong lúc đó các tế bào ung thư thường có bộ thể nhiễm sắc dị bộ (heteroploide) với các sai lệch rất đa dạng về số lượng và cấu trúc. Trong hệ gen của tế bào ung thư đã quan sát thấy các gen đột biến mang tên "gen ung thư".

Tế bào ung thư còn khác biệt với tế bào lành trong nhiều đặc tính sinh lý khác như chỉ số mitos cao hơn, phân bào không hạn định nếu môi trường nuôi cấy được cấy chuyển đổi mới, ví dụ tế bào fibroblast của người nuôi cấy *in vitro* chỉ phân bào tối đa 50 - 70 lần dù có được cấy chuyển nhiều lần, trong lúc đó các tế bào Hela trong nuôi cấy *in vitro* được xem như bất tử và từ tế bào ung thư đầu tiên của chị Henrietta Lack được nuôi cấy *in vitro* cho tới nay, khối lượng sinh sôi này nở của chúng trong các phòng thí nghiệm trên toàn thế giới đã lớn hơn cả trọng lượng cơ thể của chị.

2. Sự chuyển hoá ung thư khi lai tế bào

Trong nuôi cấy các tế bào *in vitro* để tạo các tế bào lai, người ta quan sát thấy có hai trường hợp dựa vào các biểu hiện kiểu hình để đánh giá tế bào ung thư. Biểu hiện kiểu hình (phenotyp) để đánh giá chủ yếu dựa vào tính không bị ức chế tiếp xúc tạo thành nhiều lớp tế bào, phát triển tốt trong môi trường lỏng sánh.

a. *Trường hợp tế bào lai là tế bào bị chuyển hoá thành tế bào ung thư.* Khi lai tế bào ung thư (ví dụ fibroblast người bị chuyển hoá ung thư do virut SV40) với fibroblast lành của người hoặc chuột nhắt, người ta thu nhận được các tế bào lai đều là tế bào bị chuyển hoá thành tế bào ung thư, chúng đều có các đặc tính như sinh sản nhanh thành đồng tế bào nhiều lớp, phát triển tốt trong môi trường lỏng sánh và có đời sống kéo dài hơn, và đều có kháng nguyên T đặc thù cho virut SV40. Một số dòng tế bào lai bị chuyển hoá ung thư chỉ còn mang thể nhiễm sắc số 7 của người. Khi đem cấy những tế bào ung thư này cho chuột lành đã lây cho chuột nhiễm ung thư và xuất hiện kháng nguyên T. Các dẫn liệu trên chứng tỏ virut SV40 đã gây ung thư cho fibroblast người, và ADN của virut đã xâm nhập khu trú trong thể nhiễm sắc số 7 và với sự biểu hiện là kháng nguyên T, và trong các tế bào lai có mang thể nhiễm sắc số 7 của người sẽ biểu hiện là tế bào bị chuyển hoá ung thư *in vitro* cũng như *in vivo* khi nhiễm các tế bào lai này cho chuột lành.

b. Trường hợp tế bào lai không thể hiện kiểu hình (phenotype) chuyển hoá. Khi đem lai fibroblast của chuột hamster bị chuyển hoá ung thư bởi virut SV40 với fibroblast lành của chuột nhắt 3T₃, người ta thu được tế bào lai đa dạng: có dòng tế bào lai bị chuyển hoá ung thư và dòng tế bào lai không bị chuyển hoá ung thư. Khi phân tích thể nhiễm sắc của tế bào lai dòng không bị chuyển hoá, người ta thấy chúng đã mất hết thể nhiễm sắc chuột hamster (đã bị thải loại hết) là thể nhiễm sắc có mang nhân tố gây chuyển hoá ung thư SV40. Trong các tế bào lai bị chuyển hoá ung thư đều còn giữ lại các thể nhiễm sắc của chuột hamster (hoặc ít hoặc nhiều). Điều đó chứng tỏ nhân tố gây chuyển hoá ung thư là virut SV40 biến nạp vào bộ thể nhiễm sắc của chuột hamster.

3. Sự chuyển hoá ung thư *in vivo*

Để nghiên cứu tính chất ung thư của các tế bào u hoặc các tế bào bị chuyển hoá ung thư, kể cả các tế bào lai, người ta thường tiêm hoặc cấy các tế bào đó vào cơ thể động vật. Động vật thí nghiệm chuẩn thường là chuột nhắt thuộc dòng đồng gen tức là các cá thể đều có típ di truyền tương tự và khi cấy ghép các tế bào và mô giữa chúng sẽ không bị thải loại, còn khi cấy ghép tế bào và mô giữa các cá thể khác nhau về di truyền (dị gen) sẽ xảy ra thải loại, và như ta đã biết đó là do các kháng nguyên tương hợp mô qui định nên. Nếu cá thể cho và nhận có kháng nguyên khác nhau thì tế bào cấy ghép sẽ bị thải loại. Đa số tế bào ung thư đều chứa kháng nguyên đặc thù riêng của mình và kháng nguyên này đã gây ảnh hưởng đến sự "sống còn" của tế bào ung thư khi cấy ghép chúng cho các chuột đồng gen. Các tế bào ung thư do virut gây ung thư chuyển hoá thường chứa các kháng nguyên nhân hoặc bề mặt đặc trưng cho virut do đó chúng thường bị thải loại khi cấy ghép chúng cho chuột đồng gen. Những tế bào ung thư do tác động của hóa chất thường chứa các kháng nguyên rất khác nhau và nhiều dòng ung thư có thể tồn tại khi cấy ghép chúng cho chuột đồng gen.

Nói chung các tế bào bị chuyển hoá ung thư khi cấy ghép cho động vật thí nghiệm thường gây nên ung thư *in vivo* và kết quả động vật nhận sẽ chết. Tuy nhiên tính gây ung thư *in vivo* còn tùy thuộc vào nhiều yếu tố như dòng động vật nhận, đặc tính miễn dịch của động vật thí nghiệm cũng như đặc tính của tế bào bị chuyển hoá ung thư (do virut hoặc hóa chất v.v...).

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh là *in vivo* các tế bào ung thư có thể dung hợp với các tế bào lành và chuyển hoá chúng thành tế bào ung thư.

III. CƠ SỞ DI TRUYỀN TẾ BÀO CỦA UNG THƯ

Nguyên nhân gây ung thư không chỉ có một mà rất nhiều do đó việc chẩn đoán và chữa trị ung thư không đơn giản. Hiện nay người ta cho rằng các nhân tố môi trường như hoá chất, bức xạ, virut v.v... đều là những nhân tố tác động gây chuyển hóa tế bào lành thành tế bào ung thư - **các nhân tố** được gọi là tác nhân gây ung thư (carcinogen). Nhưng bản chất của sự chuyển hóa ung thư là có sự thay đổi trong bộ máy di truyền của tế bào cụ thể là phân tử ADN của tế bào - đột biến gen - từ đó dưới tác động của các tác nhân gây ung thư tế bào thể hiện các kiểu hình đặc thù cho tế bào ung thư.

1. Đột biến di truyền và ung thư

Các tế bào ung thư trong cơ thể cũng như trong nuôi cấy *in vitro* là các chủng quần tế bào có bộ thể nhiễm sắc rất đa dạng từ lưỡng bội đến lệch bội hoặc đa bội lệch. Trong các tế bào ung thư cũng quan sát thấy các dạng sai lệch cấu trúc thể nhiễm sắc như mất đoạn hoặc chuyển đoạn v.v... Ví dụ điển hình trong các tế bào ung thư dạng bạch cầu thường có mất đoạn trong vế dài của thể nhiễm sắc 22, thường được gọi là thể nhiễm sắc Philadelphia. Các nhà di truyền tế bào cho rằng, quá trình chuyển hóa ung thư phải được xuất phát từ các đột biến gen hoặc đột biến thể nhiễm sắc xảy ra trong tế bào soma dẫn đến tích luỹ những "gen gây ung thư" (oncogenes). Khi các gen này hoạt hoá sẽ tổng hợp các protein sai lệch dẫn đến sai lệch trong kiểu hình của tế bào như không có khả năng kiểm soát phân bào và liên kết tế bào do đó mô phát triển vô tổ chức thành khối u và di căn. Ngày nay người ta đã phát hiện là các ung thư bàng quang, ung thư xương, ung thư phổi và ung thư buồng trứng v.v... đều có liên quan đến các gen gây ung thư. Ví dụ người ta đã phát hiện bốn gen gây ung thư gây nên sự tiến triển của ung thư kết tràng và ung thư trực tràng ở người. Gen gây ung thư thứ nhất xuất hiện trong thể nhiễm sắc số 5 gây nên u lành bé trong lớp biểu mô. Gen thứ hai xuất hiện trong thể nhiễm sắc số 12 và gen thứ ba xuất hiện trong thể nhiễm sắc số 18 và khi chúng hoạt hoá làm cho khối u lớn dần lên nhưng vẫn giữ là u lành. Gen gây ung thư thứ tư xuất hiện trong thể nhiễm sắc 17 và khi tế bào mang đủ cả bốn gen gây ung thư thì u lành biến thành u ác và các tế bào ung thư bắt đầu di căn.

Gen gây ung thư xuất hiện có thể do sự đột biến gen xảy ra trong quá trình tái bản gen mà không được sửa chữa, hoặc có thể là các gen điều

chỉnh lúc đầu hoạt động bình thường nhưng do rối loạn cơ chế điều chỉnh nên đã biến thành gen gây ung thư.

Gen gây ung thư xuất hiện do hiện tượng chuyển đoạn thể nhiễm sắc (ví dụ giữa thể nhiễm sắc 14 và 18) gây ra dạng ung thư lymphoma nang.

Nếu các gen gây ung thư tồn tại trong bộ gen của tinh trùng và trứng thì các gen đó sẽ di truyền cho thế hệ sau. Các dạng ung thư vú, ung thư kết tràng, trực tràng, ung thư tuyến tiền liệt thường hay gặp trong các thành viên cùng một gia đình. Các gen ung thư có thể được xuất hiện từ virut gây ung thư.

2. Virut - tác nhân gây ung thư

Virut là cơ thể sống không có cấu tạo tế bào, chúng được cấu tạo gồm một lõi axit nucleic (ADN hoặc ARN) chứa thông tin di truyền của virut, và một vỏ bọc bằng protein có vai trò bảo vệ hoặc tạo điều kiện cho virut xâm nhập vào tế bào vật chủ. Virut chỉ tồn tại và phát triển khi chúng sống ký sinh trong tế bào vật chủ. Khi virut xâm nhập vào tế bào có thể có hai khả năng:

- virut sinh sản và phá huỷ tế bào;
- ADN của virut (hoặc ARN của virut) được phiên mã ngược cho ra ADN) sẽ biến nạp và gắn vào ADN của tế bào vật chủ, và chúng sẽ được tái bản cùng với ADN của tế bào.

Chính ở trạng thái biến nạp này mà các gen virut biến thành các gen gây ung thư và các tế bào mang các gen này sẽ bị chuyển hoá thành tế bào ung thư. Các virut gây ung thư có thể là virut ADN như virut SV40, virut Polio, virut Epstein-Barr, có thể là virut ARN ví dụ virut B, virut C gây ung thư gan, virut Papilloma gây ung thư cổ tử cung v.v... .

Các nghiên cứu về lai tế bào soma đã chứng minh ADN của virut SV40 khi biến nạp vào ADN của tế bào trong thể nhiễm sắc số 7 của người đã biến thành các gen gây ung thư và là tác nhân gây chuyển hoá tế bào lành thành tế bào ung thư *in vivo* cũng như *in vitro*.

Những gen ung thư (oncogenes) do virut gây nên được gọi là v-onc gen để phân biệt với các gen gây ung thư tồn tại ngay trong bản thân hệ gen của tế bào - được gọi là c-onc gen hay còn gọi là proto-oncogen.

3. Các proto-oncogen

Người ta đã phát hiện được trong tế bào tồn tại nhiều protein có vai trò

quan trọng trong cơ chế điều chỉnh hoạt tính phân bào, giống với protein do các v-onc mã hoá. Những protein đó được mã hoá bởi các gen bản thân của hệ gen của tế bào được gọi là các proto-oncogen hay c-onc gen. Những c-onc gen này sai khác với các v-onc (tức là các gen ung thư có nguồn gốc từ virut) ở chỗ chúng có chứa các đoạn intron; trong lúc đó các v-onc gen không chứa intron. Nhưng điểm sai khác quan trọng nhất thể hiện ở chỗ các v-onc gen khi hoạt hoá sẽ sản xuất một lượng lớn protein có tác động gây nên sự sinh sản không kiểm soát được của tế bào do đó biến tế bào lành thành tế bào ung thư, trong lúc đó các c-onc gen bình thường không gây ung thư mà chỉ trong trường hợp chúng bị đột biến mới dẫn tới phát triển ung thư. R. Weinberg khi nghiên cứu ung thư bóng đái ở người đã phát hiện thấy gen c-onc đột biến có liên quan đến phát triển ung thư đó là gen c-H.ras bị đột biến (được gọi là c-H.ras vì nó tương ứng với v-H.ras). Gen c-H.ras đột biến đã sản xuất một số lượng lớn protein đột biến có tác dụng hoạt hoá và kích thích sự tăng sinh tế bào không kiểm soát do đó dẫn tới ung thư hoá.

Các dạng ung thư khác nhau ở người như ung thư phổi, ung thư vú, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư kết tràng, ung thư bóng đái, v.v.... đều có liên quan đến đột biến trong các v-onc gen của tế bào soma.

4. Các gen ức chế ung thư

Trong tế bào có tồn tại các gen có vai trò ức chế sự tăng sinh tế bào. Khi các gen này bị đột biến chúng làm cho tế bào tăng sinh không kiểm soát và từ đó có thể dẫn đến ung thư. Các gen này được gọi là gen chống ung thư (antioncogenes) hay như thường gọi là gen ức chế ung thư.

Bình thường các gen ức chế ung thư (tumor suppressor genes) khi hoạt hoá sẽ sản xuất các protein đóng vai trò quan trọng trong các quá trình như phân bào, biệt hoá tế bào, chết của tế bào, sửa chữa ADN, v.v... Các nhả di truyền phân tử đã phát hiện hàng loạt gen ức chế ung thư như: gen RB-mã hoá cho protein pRB, khi bị đột biến sẽ gây ra ung thư võng mạc (retinoblastoma), ung thư xương, ung thư bóng đái, ung thư cổ dạ con, ung thư tuyến tiền liệt, vì protein pRB có vai trò trong sự điều chỉnh chu kỳ tế bào.

Được nghiên cứu nhiều nhất là protein p53 (được gọi như vậy vì protein có khối lượng 53 kDa (kilodalton) được mã hoá bởi gen ức chế ung thư là TP53. Sự đột biến soma xảy ra trong gen TP53 dẫn tới phát triển nhiều dạng ung thư.

Người ta đã chứng minh sự đột biến trong gen TP53 đều có liên quan

đến đa số dạng ung thư ở người. Protein p53 đóng vai trò chủ đạo trong quá trình đáp ứng của tế bào đối với stress. Trong các tế bào bình thường mức p53 rất ít nhưng khi bị xử lý bởi các nhân tố gây ung thư ví dụ phóng xạ ion hoá, thì mức p53 tăng lên đột ngột và chúng trở nên rất bền và hoạt hoá và chúng có vai trò ngăn chặn chu kỳ tế bào hoặc gây nên tự hoại tế bào (apoptosis) (tuỳ vào các nhân tố trung gian). Sự đột biến bất hoạt của p53 là tiền đề chính dẫn tới phát triển ung thư.

IV. CHẨN ĐOÁN VÀ CHỮA TRỊ

Thường có ba liệu pháp chữa trị ung thư phổ biến là: 1) phẫu thuật cắt bỏ khối u; 2) chiếu xạ; 3) sử dụng hoá chất chống ung thư.

Ngày nay, theo đà phát triển của di truyền học phân tử và công nghệ gen, người ta đã kết hợp với các phương pháp chẩn đoán, chữa trị ung thư cổ điển với liệu pháp gen trong chẩn đoán và chữa trị ung thư. Các nhà công nghệ di truyền kết hợp với công nghệ vi tính đã phát hiện **công nghệ gen-chip** nhằm phát hiện sớm các gen sai lệch, phát hiện virut, phát hiện sự biểu hiện gen bất thường trong tế bào và mô bệnh. Sử dụng các gen-chip để phát hiện virut HIV gây bệnh AIDS, phát hiện các đột biến trong cấu trúc của gen ức chế ung thư p53 ở người đã được áp dụng tại nhiều bệnh viện và gen-chip đã trở thành hàng hoá thương phẩm.

Liệu pháp gen được sử dụng để chữa trị nhiều bệnh di truyền cũng như ung thư. với công nghệ nuôi cấy và biệt hoá các tế bào nguồn thành các tế bào của các mô, kết hợp với kỹ thuật chuyển gen, các tế bào hỏng, cũng như các gen hỏng trong cơ thể người bệnh sẽ được thay thế bằng các tế bào lành, các gen lành giống như các nhà kỹ thuật thay thế các chi tiết, các phụ tùng hỏng của một cái máy, đặng khôi phục sự hoạt động bình thường của chúng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1. Albert B., Bray D., Raff J., Roberts M., Watson J. 1994.** Molecular Biology of the Cell . 3rd ed. New York.
- 2. Biotechnologies d'aujourd'hui. 1993.** Sous la direction de R. Julien. Publin. Paris.
- 3. Gurdon J. B. 1974.** The controle of gene expression in animal development. Clarendon Press. Oxford.
- 4. Harris H. 1970.** Nucleus and cytoplasm. Clarendon Press. Oxford.
- 5. Ephrussi. 1972.** Hybridization of somatic cell. Princeton Univ. Press. New Yersey.
- 6. Ringertz N. R., Savage R. E. 1976.** Cell hybrids. Academic Press. New York.
- 7. Snustad D. P., Simons J. M.. 2000.** Principles of Genetics. Second edition. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- 8. Swanson C. P., Mertz Y., Young W. J. 1967.** Cytogenetis. Prentice-Hall, Inc. New Yersey.

MỤC LỤC

Trang

Lời nói đầu

3

Chương I

CẤU TRÚC VÀ CHỨC NĂNG CỦA TẾ BÀO SOMA

A. TẾ BÀO SOMA.....	5
I. Khái niệm.....	5
II. Cấu trúc.....	7
1. Màng sinh chất.....	7
2. Tế bào chất.....	10
3. Nhân tế bào.....	12
B. CHU KỲ SỐNG CỦA TẾ BÀO.....	13
I. Gian kỳ.....	14
1. Pha G1.....	14
2. Pha S.....	22
3. Pha G2.....	27
II. Phân bào.....	27
1. Các dạng phân bào.....	27
2. Các kỳ của phân bào.....	28
3. Thời gian của các kỳ và sự điều chỉnh phân bào	33
C. SỰ BIỆT HOÁ CỦA TẾ BÀO SOMA.....	35
I. Sự biệt hoá về hình thái và chức năng.....	35

II. Sự biệt hoá về hoá sinh	36
III. Sự biệt hoá trong hoạt động của hệ gen.....	36
D. THỂ NHIỄM SẮC THỂ CỦA TẾ BÀO SOMA.....	36
I. Hình dạng, kích thước, số lượng.....	36
II. Cấu trúc hiển vi và siêu hiển vi.....	39
1. Thể nhiễm sắc thường và thể nhiễm sắc giới tính.....	39
2. Trung tiết.....	41
3. Điểm mút.....	42
4. Thể kèm và eo cấp II	42
5. Các băng nhiễm sắc.....	43
6. Cấu trúc siêu vi.....	43
E. TỔ CHỨC HỆ GEN Ở EUKARYOTA.....	45
I. Độ lớn của hệ gen.....	45
II. Sự đa dạng của hệ gen.....	46
1. Tổ chức của hệ gen.....	46
2. Đặc tính tổ chức.....	47
G. SỰ ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG CỦA HỆ GEN.....	48
I. Cấp độ điều hòa.....	49
II. Điều hòa hoạt động của hệ gen trong phiên mã.....	49
III. Điều hòa hoạt động của hệ gen sau phiên mã.....	51

Chương II **ĐỘT BIẾN VÀ TÁI TỔ HỢP SOMA**

A. DI TRUYỀN VÀ BIẾN ĐỊ.....	53
I. Sự tái bản ADN, nhân đôi thể nhiễm sắc và phân ly thể nhiễm sắc	53
II. Đột biến số lượng thể nhiễm sắc.....	55
1. Đột biến đa bội (polyploid)	55
2. Đột biến lệch bội (aneuploid)	56
III. Đột biến cấu trúc thể nhiễm sắc.....	56

1. Mất đoạn (deletion)	56
2. Nhân đoạn (duplication)	58
3. Đảo đoạn (inversion)	58
4. Chuyển đoạn (translocation)	59
IV. Các nhân tố gây đột biến thể nhiễm sắc.....	61
V. Đột biến gen.....	62
B. TRAO ĐỔI CHÉO MITOS. TÁI TỔ HỢP SOMA.....	69
I. Tái tổ hợp soma ở <i>Aspergillus</i>	69
II. Tái tổ hợp soma ở ruồi quả <i>Drosophila</i>	70
III. Tái tổ hợp soma ở động vật có vú và người.....	71
C. ADN TÁI TỔ HỢP VÀ KỸ THUẬT GEN.....	72
I. Nghiên cứu vai trò của ADN điều khiển, chức năng của gen hoặc protein.....	72
II. Thay thế hoặc gây đột biến gen.....	75
III. Biến đổi hệ gen thực vật.....	79
IV. RFLP trong nghiên cứu hệ gen và lập bản đồ gen.....	80
V. Phản ứng PCR.....	83
1. Các yếu tố ảnh hưởng.....	85
2. Một số ứng dụng.....	87

Chương III **LAI TẾ BÀO SOMA**

I. Lai ghép ở thực vật.....	90
II. Cấy ghép mô ở động vật.....	91
III. Lai tế bào soma ở động vật <i>in vitro</i>	92
1. Sự tạo thành ngẫu nhiên tế bào lai soma <i>invitro</i>	92
2. Lai tế bào khi sử dụng virut kích thích.....	93
IV. Các tế bào lai heterocaryon.....	95
1. Sự hoạt hoá của nhân.....	95

2. Sự biến đổi của bộ thể nhiễm sắc trong tế bào lai.....	98
3. Sự biểu hiện của gen thành các tính trạng kiểu hình ở tế bào lai	100
4. Các bào quan trong tế bào lai.....	103
V. Lập bản đồ gen.....	105
VI. Lai tế bào soma và công nghệ tế bào thực vật	105
1. Phương pháp tạo protoplast.....	106
2. Sự liên kết và dung hợp tế bào trân.....	106
3. Sự phát triển của tế bào lai.....	107
4. Chọn lọc và xác định các dòng tế bào lai và mô sẹo.....	107
5. Ưu thế của lai soma thực vật.....	108
VII. Công nghệ tế bào lai và ứng dụng.....	109
1. Tạo và chọn giống cây trồng.....	109
2. Sản xuất kháng thể đơn dòng.....	110

Chương IV **DI TRUYỀN TẾ BÀO SOMA VÀ UNG THƯ**

I. Bệnh ung thư.....	112
II. Sự chuyển hóa ung thư.....	113
1. Tế bào lành và tế bào ung thư <i>in vitro</i>	113
2. Sự chuyển hóa ung thư khi lai tế bào.....	114
3. Sự chuyển hóa ung thư <i>in vivo</i>	115
III. Cơ sở di truyền tế bào của ung thư.....	116
1. Đột biến di truyền và ung thư.....	116
2. Virut - tác nhân gây ung thư.....	117
3. Các proto-oncogen	117
4. Các gen ức chế ung thư	118
IV. Chẩn đoán và chữa trị ung thư	119
Tài liệu tham khảo.....	120

201293

dị truyền và công nghệ th



Giá: 14.000đ