

Chương 3

DI TRUYỀN PHÂN TỬ VÀ KỸ THUẬT DI TRUYỀN ỨNG DỤNG TRONG NHÂN GIỐNG ĐỘNG VẬT

Đến những năm 1940, di truyền học cổ điển được gọi là “di truyền học hình thức” vì chỉ căn cứ vào kết quả lai hay quan sát tế bào học mà suy đoán về gen. Gen có bản chất như thế nào? Nó thực hiện chức năng sinh hóa ra sao? Đó là những vấn đề con bỏ ngõ.

Năm 1941, G. Beadle và E. Tatum nghiên cứu các đột biến sinh hóa ở nấm mốc *Neurospora crassa* và nêu lên giả thuyết 1 gen - 1 men - tính trạng, cho thấy, gen xác định tính trạng thông qua việc điều khiển tổng hợp các enzym, chất xúc tác các phản ứng sinh hóa. Tiếp theo, các đối tượng vi sinh vật bắt đầu được sử dụng rộng rãi đã tạo một bước phát triển mới trong nghiên cứu di truyền..

Vào những năm 40, J. Lederberg, với các công trình của mình đã góp phần đưa một vi khuẩn trở thành đối tượng được sử dụng nhiều nhất trong sinh học phân tử, đó là vi khuẩn *E. coli*.

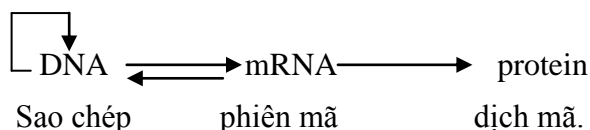
Nhiều nhà vật lý, hóa học chuyển sang nghiên cứu di truyền học đã ứng dụng các phương pháp mới trong nghiên cứu sinh học.

Việc xác định DNA chính là vật chất di truyền đã mở màn cho các nghiên cứu phân tử về cấu tạo và chức năng của gen. Năm 1944, Oswald Avery, Colin McLeod và Maclyn McCarty nghiên cứu *Streptococcus pneumoniae*, một vi khuẩn gây viêm phổi, dựa vào các quan sát trước của Fred Griffiths đã phát hiện ra hiện tượng biến nạp và đã chứng minh DNA là nhân tố gây biến nạp, làm thay đổi kiểu di truyền ở phế cầu khuẩn *D. pneumoniae*. Alfred Hershey và Martha Chase (1952) củng cố thêm kết luận trên bằng các thực nghiệm trên thực khuẩn thể (bacteriophage), đó là các virus có khả năng xâm nhiễm vi khuẩn *E. coli*.

Sự phát hiện cấu trúc chuỗi xoắn kép DNA của James D. Watson và Francis H.C. Crick (1953) chính thức khởi đầu cho thời kỳ nghiên cứu di truyền phân tử. Cấu trúc đơn giản và trình tự bổ sung của phân tử DNA

là cơ sở cho cơ chế tự sao chép của phân tử DNA ở mỗi thể hệ tế bào cũng như cơ chế tổng hợp RNA từ khuôn DNA.

Học thuyết trung tâm của sinh học phân tử ra đời.



Vào cuối những năm 70, sự xuất hiện một loạt kỹ thuật mới đã tạo ra cuộc cách mạng trong sinh học phân tử. Với các enzym cắt hạn chế, người ta có thể cắt phân tử DNA ở những vị trí xác định thành những đoạn có kích thước mong muốn, gắn chúng vào các vector, rồi chuyển vào tế bào vi khuẩn. Việc nuôi cấy các tế bào vi khuẩn này cho phép thu hồi lại một lượng lớn DNA cần. Đó là phương pháp tạo dòng. Sau đó, người ta đã hoàn thiện các phương pháp xác định nhanh trình tự DNA. Như vậy các nhà sinh học bây giờ không chỉ ngồi đếm nhiễm sắc thể hay thiết lập bản đồ gen dựa vào đột biến và lai, họ nắm đến từng nucleotit của đoạn DNA. Hơn thế nữa, họ còn có thể tùy ý tạo các đột biến trên đoạn DNA rồi chuyển chúng trở vào tế bào để nghiên cứu chức năng của một gen trên một loại tế bào xác định, xác định trình tự toàn bộ gen người, giải quyết vấn đề bệnh ung thư, sự phát triển phôi, biệt hóa mô...

1. DNA và vai trò của nó trong di truyền.

Vào năm 1868, Miescher, nhà sinh hóa học người Thụy Điển, phát hiện trong nhân tế bào bạch cầu một chất không phải protein và ông gọi là nuclein (chất nhân). Về sau thấy chất này có tính axit nên gọi là nucleic axit. Có hai loại là desoxyribonucleic axit (viết tắt là DNA) và ribonucleic axit (viết tắt là RNA). Chất mà Miescher tìm ra là DNA. Năm 1914, nhà bác học Đức R. Fulgen đã tìm ra phương pháp nhuộm màu DNA. Năm 1944, vai trò mang thông tin di truyền của DNA mới được chứng minh và đến năm 1952 mới được công nhận.

1.1. Chứng minh gián tiếp.

Nhiều số liệu cho thấy có sự liên quan chặt chẽ giữa DNA và vật chất di truyền.

Thứ nhất, DNA có trong tế bào của tất cả các sinh vật, chỉ giới hạn trong nhân và là thành phần chủ yếu của nhiễm sắc thể (một cấu trúc của tế bào, có chứa nhiều gen).

Thứ hai, Tất cả các tế bào sinh dưỡng của bất kỳ một loại sinh vật nào đều chứa một lượng DNA rất ổn định, không phụ thuộc vào sự phân hóa chức năng hay trạng thái trao đổi chất.

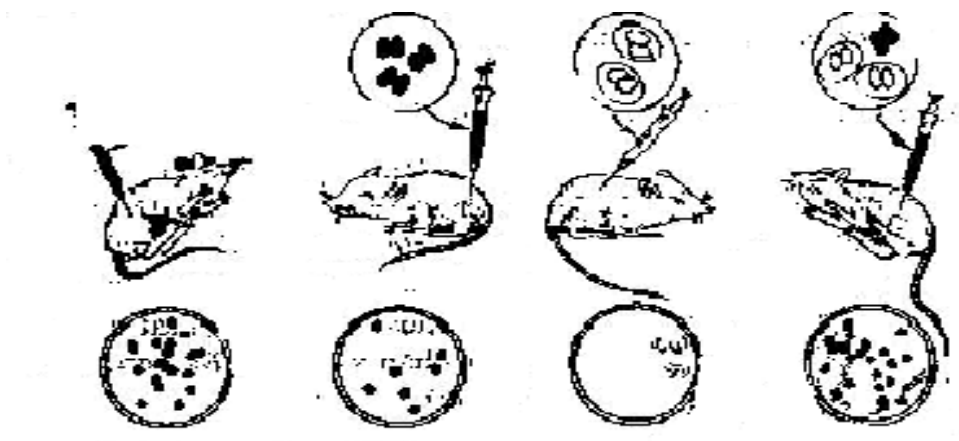
Thứ ba, số lượng DNA tăng theo bội số nhiễm sắc thể trong tế bào. Ở tế bào sinh dục, đơn bội (n) có số lượng DNA là 1 thì ở tế bào sinh dưỡng, lưỡng bội ($2n$) có số lượng DNA tăng lên gấp đôi.

Thứ tư, tia tử ngoại (uv) có hiệu quả gây đột biến cao nhất ở bước sóng 260 nm, đây chính là bước sóng mà DNA hấp thụ tia tử ngoại nhiều nhất.

1.2 Bằng chứng trực tiếp chứng minh axit nucleic là vật liệu di truyền.

1.2.1 Hiện tượng biến nạp.

Thí nghiệm của Griffiths, 1928 trên phế cầu khuẩn *Diplococcus pneumoniae* gây bệnh viêm phổi cho động vật có vú.



Hình 36. Thí nghiệm biến nạp ở chuột

a/ Tiêm vi khuẩn S sống gây bệnh cho chuột → chuột chết

b/ Tiêm vi khuẩn R sống không gây bệnh → chuột sống

c/ Tiêm vi khuẩn S đã nung nóng cho chuột → chuột sống

d/ Hỗn hợp vi khuẩn S bị đun chết trộn với vi khuẩn R sống đem tiêm cho chuột → chuột chết. Trong xác chuột có vi khuẩn S và R.

D. pneumoniae có 2 nòi: nòi S có vỏ bọc và 1 phân tử DNA, khi nuôi cấy cho khuẩn lạc trơn, bóng, có khả năng gây bệnh.

Nồi R: không có vỏ bọc, có 1 phân tử DNA, khi nuôi cấy cho khuẩn lạc không trơn, bóng, không có khả năng gây bệnh.

Tiêm nồi S cho chuột, chuột sẽ chết. Tiêm nồi R cho chuột, chuột vẫn sống. Nung nóng nồi S và tiêm cho chuột, chuột vẫn sống. Trộn lẫn nồi S đã nung nóng với nồi R, tiêm cho chuột, chuột chết. Ở đây đã có yếu tố nào đó từ nồi S đã bị giết chết chuyển sang nồi R (không gây bệnh) làm thay đổi đặc điểm của nồi R. Khi chuyển sang nồi R, làm cho nồi R từ chỗ không gây bệnh trở nên gây bệnh.

Năm 1944, T. Avery, McLeod và McCarty đã tách chiết DNA của nồi S đem cho vào các tế bào nuôi cấy chủng R. Kết quả là một số khuẩn lạc biến thành dạng trơn, bóng: chúng đã được biến nạp. Đặc biệt khi phân hủy DNA bằng DNase thì hiện tượng biến nạp không xảy ra. Các tác giả đã chứng minh được rằng DNA chính là nhân tố biến nạp làm thay đổi các kiểu di truyền ở phẩy cầu khuẩn.

Ngày nay có thể thực hiện được biến nạp ở sinh vật Eucaryotae như nấm men, tế bào thực vật, tế bào chuột và cả ở tế bào người, thậm chí có thể thực hiện biến nạp ở các loài khác nhau. Do đó, biến nạp có thể được coi là phương tiện chung để chuyển gen giữa các sinh vật.

1.2.2 Sự xâm nhập của DNA virus vào vi khuẩn.

Năm 1952, A. Hershey và M. Chase đã tiến hành thí nghiệm với bacteriophage T₂ (thực khuẩn thể) cho xâm nhập vi khuẩn Escherichia coli (E. coli).

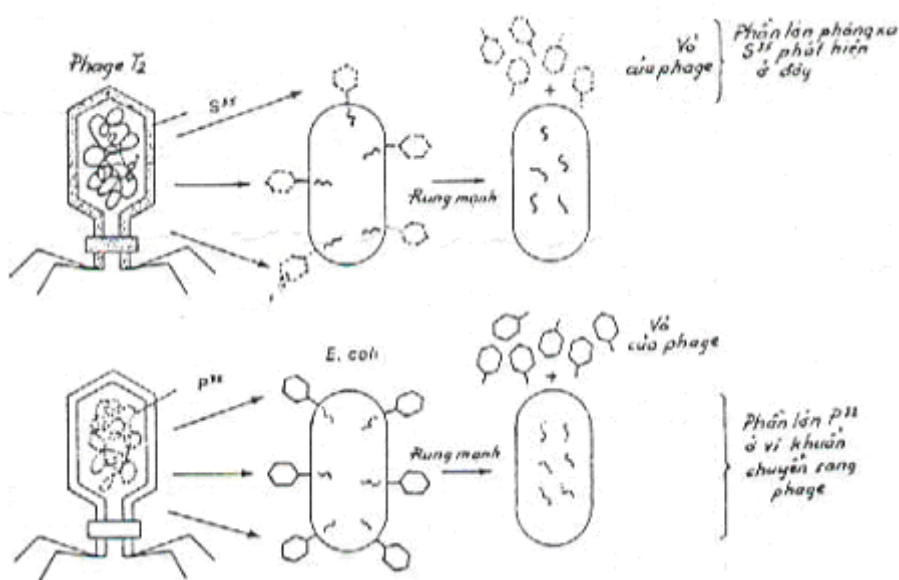
Phage T₂ có cấu tạo đơn giản gồm vỏ protein và phân tử DNA bên trong. Khi cho phage T₂ vào vi khuẩn, chúng gắn lên bề mặt bên ngoài, một phần chất nào đó đã xâm nhập vào trong vi khuẩn và sau 20 phút làm tan tế bào vi khuẩn, phóng thích nhiều phage mới.

Thí nghiệm của A. Hershey và M. Chase nhằm xác định, chất nào của phage đã vào bên trong tế bào vi khuẩn: DNA, protein hay cả hai chất trên.

Vì DNA chứa nhiều photpho (P) nhưng không có lưu huỳnh (S) còn protein chứa nhiều lưu huỳnh nhưng không có photpho, nên có thể phân biệt DNA và protein nhờ các đồng vị phóng xạ P và S.

Phage được nuôi trên vi khuẩn đã nhiễm đồng vị phóng xạ P³² và S³⁵. Các phage nhiễm trong khoảng thời gian đủ để bám vào vách tế bào và bơm chất nào đó vào trong tế bào. Sau đó đem phân tích nhận thấy,

phần ngoài vi khuẩn có chứa nhiều S^{35} , nhưng rất ít P^{32} , chứng tỏ phần lớn protein vỏ phage nằm ngoài tế bào vi khuẩn. Phân tích phần bên trong tế bào vi khuẩn thấy chúng chứa nhiều P^{32} nhưng rất ít S^{35} .



Hình 37. Vật chất di truyền của phage là DNA

Điều này chứng tỏ DNA của phage đã được bơm vào trong tế bào vi khuẩn, ở đó thông tin di truyền chứa trong DNA sẽ được dùng để tổng hợp những virus mới.

2 Thành phần hóa học và cấu trúc phân tử DNA

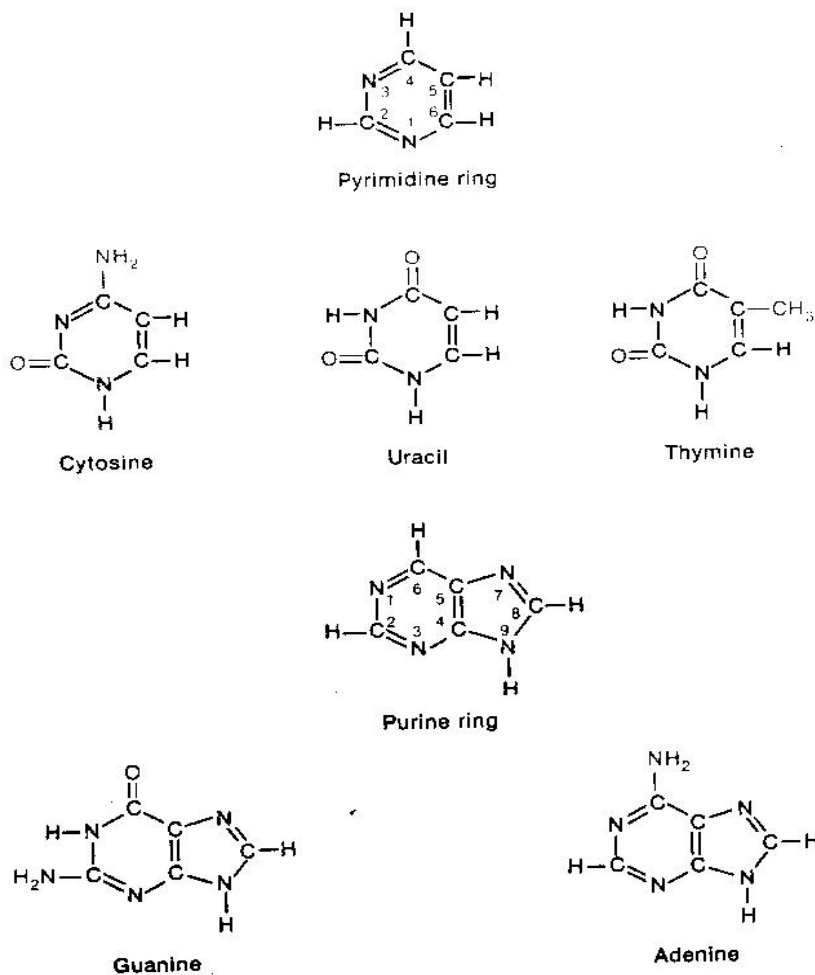
2.1. Thành phần hóa học.

Phân tử DNA là một chất trùng hợp (polymer), polynucleotit. Nó được tạo nên do sự nối liền các đơn phân (monomer).

Mỗi monomer gồm 3 thành phần:

- Đường pentose (5 carbon) - desoxyribose
- Base nitơ gồm 2 nhóm purine: Adenine (A) và Guanine (G) và pyrimidine : Thymine (T) và Cytosine (C).
- Nhóm phosphate.

Đường pentose gắn với base nitơ ở vị trí C_1 sẽ tạo nên nucleoside. Nucleoside được gắn thêm nhóm phosphate vào C_5 của đường pentose thành nucleotid.

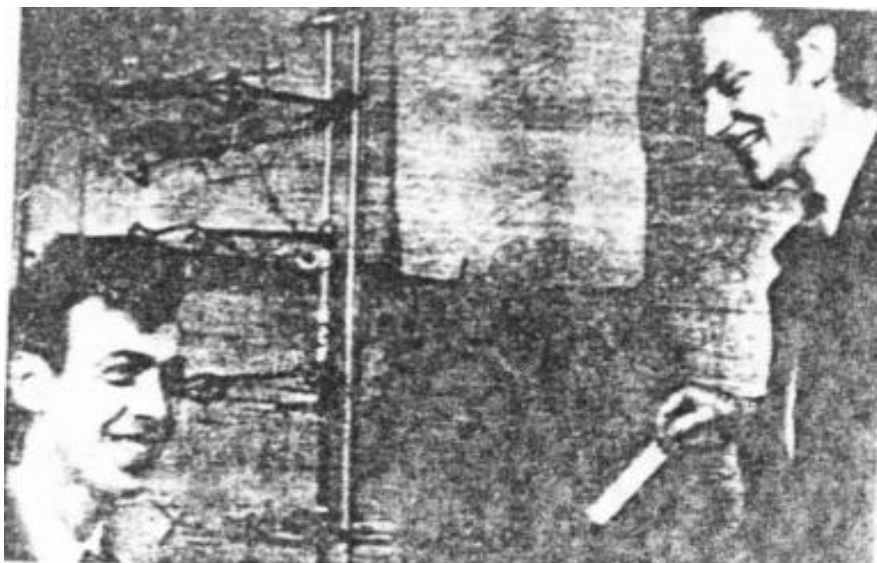


Hình 38. Cấu tạo các base nitơ

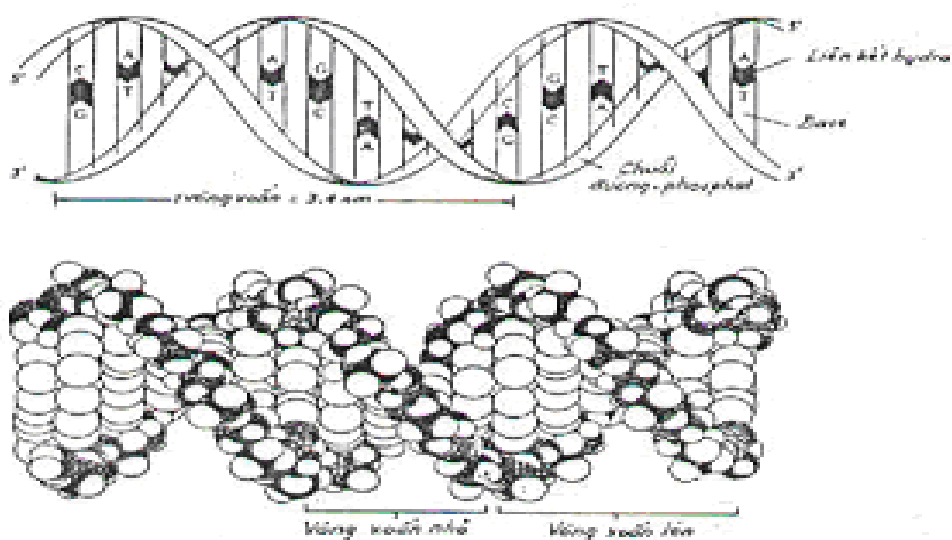
2.2. Mô hình xoắn kép DNA của J. Watson và F. Crick.

Năm 1953, J. Watson và F. Crick đã đưa ra mô hình cấu trúc phân tử DNA. Theo mô hình này, phân tử DNA là một chuỗi xoắn kép mà hai mạch gồm khung đường pentose xen kẽ với các nhóm phosphate, được gắn với nhau nhờ các cầu nối hydro (liên kết hydro) theo nguyên tắc bổ

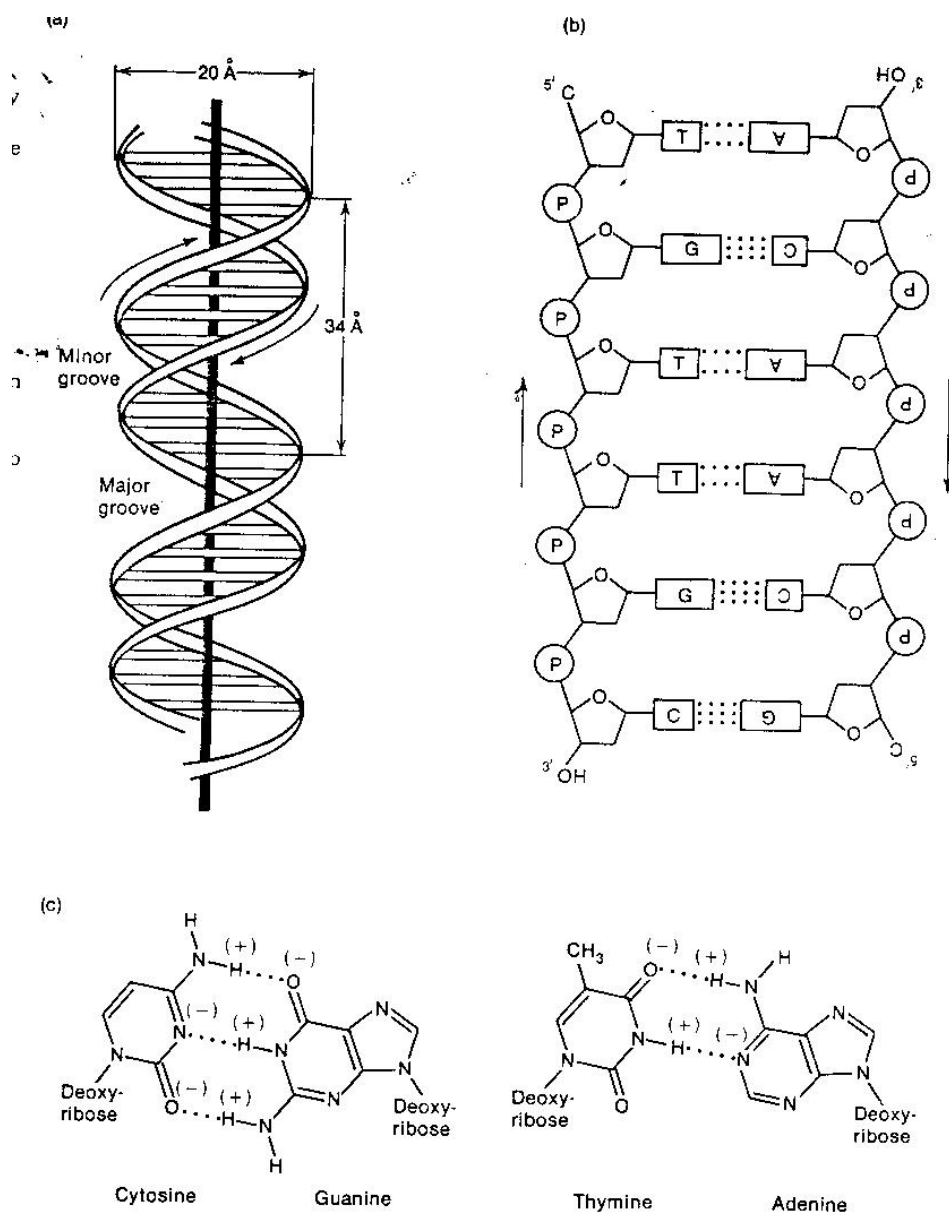
sung. Có nghĩa là adenine của mạch này sẽ liên kết với thymine của mạch kia, guanine của mạch này liên kết với cytosine của mạch kia và ngược lại. Giữa adenine với thymine liên kết với nhau bằng 2 cầu nối hydro, còn giữa guanine với cytosine liên kết với nhau bằng 3 cầu nối hydro.



J. Watson và F. Crick



Hình 39. Chuỗi xoắn kép DNA của Watson - Crick



Hình 40. Sơ đồ cấu trúc 2 mạch của phân tử DNA theo Watson-Crick

Điều này đã được các thực nghiệm của Chargaff xác định. Khi thủy phân DNA nhận thấy, tổng số các loại base purine bằng tổng số các loại pyrimidine. Đặc điểm này được gọi là định luật Chargaff. Theo định

luật này thì $A = T$; $G = C$, tức là $\frac{A}{T} = \frac{G}{C} = 1$; $\frac{A + G}{T + C} = 1$, nhưng tỷ số

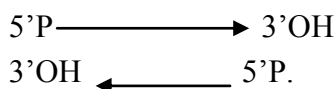
$\frac{A + T}{G + C} \neq 1$, ở các loài sinh vật khác nhau, tỷ số này đặc trưng cho loài,

dựa vào đó có thể phân biệt các loài với nhau. Sinh vật bậc cao, tỷ số $\frac{A + T}{G + C} > 1$, sinh vật bậc thấp, tỷ số $\frac{A + T}{G + C} < 1$. Từ năm 1953 trở lại

nay, mô hình phân tử DNA của J. Watson và F. Crick là trung tâm của các nghiên cứu di truyền học và sinh học phân tử, Watson và Crick đã nhận giải thưởng Nobel vào năm 1962.

Mỗi vòng xoắn của phân tử DNA gồm có 10 cặp nucleotid, chiều dài là 34 \AA ; đường kính của phân tử DNA là 20 \AA .

Sự sắp xếp của 2 mạch theo kiểu đối song song, đầu $5'P$ (nhóm P tự do gắn với C_5 của đường) đối diện với $3'OH$ (nhóm OH gắn với C_3 của đường) và ngược lại.



3. Sao chép DNA

Watson và Crick đã cho rằng, nếu hai mạch của phân tử DNA được tách ra do các liên kết hydro giữa các cặp base bị đứt, mỗi mạch sẽ làm khuôn cho việc tổng hợp mạch mới, tương tự với mạch cặp trước đó.

Kết quả một phân tử DNA ban đầu (mẹ) qua quá trình sao chép sẽ cho ra hai phân tử DNA (con) giống hệt nhau. Mỗi phân tử con đều mang một mạch cũ và một mạch mới. Kiểu sao chép này gọi là sao chép bán bảo tồn.

Những nghiên cứu tiếp theo đã tìm ra các cơ chế phân tử của quá trình sao chép DNA. Đó là quá trình rất phức tạp, phải trải qua các cơ chế chung như sau:

- Các liên kết hydro gắn hai mạch với nhau phải bị phá vỡ và hai mạch phải tách nhau ra, từ mạch kép trở thành hai mạch đơn.

- Phải có đoạn mồi, tức là đoạn DNA hoặc RNA ngắn, bắt cặp bổ sung với 1 đầu của mạch khuôn.

- Có đủ 4 loại nucleosid triphosphate (ATP, TTP, GTP, CTP) bắt cặp với mạch đơn khuôn.

- Mạch mới tổng hợp theo hướng 5'P - 3'OH, các nucleotid mới được nối lại với nhau bằng liên kết phosphodiester.

Mỗi bước được điều khiển bởi enzym đặc hiệu và được thực hiện một cách nhanh chóng, chính xác.

3.1 Các enzym, protein tham gia vào quá trình tái bản DNA

- DNA polymerase I là loại enzym được phát hiện đầu tiên, lúc đầu người ta cho rằng đây là loại enzym có vai trò chủ yếu trong tái bản DNA. Về sau người ta còn phát hiện được các enzym DNA polymerase II và DNA polymerase III.

- DNA polymerase II có chức năng xác định sự bắt đầu tổng hợp một phân đoạn mới DNA và kết thúc sự tổng hợp DNA.

- DNA polymerase III là enzym tham gia chủ yếu vào tái bản DNA kéo dài dần chuỗi mới tổng hợp. Loại enzym này có khoảng 10 phân tử trong một tế bào, chúng có tốc độ tổng hợp DNA nhanh hơn nhiều lần so với DNA polymerase I và DNA polymerase II.

- Trên mỗi phân tử DNA dạng vòng ở vi khuẩn *E. coli* có khoảng 400.000 vòng xoắn, nên sự tháo xoắn phải xảy ra theo một cơ chế tối ưu nào đó để khi tháo xoắn không làm rối loạn cấu trúc của nó. Sự tháo xoắn được tạo ra do đứt tại một điểm nhất định trên một mạch đơn trong quá trình tái bản, các chỗ đứt này sẽ nhanh chóng được sửa chữa sau khi tháo xoắn. Enzym tham gia vào sửa chữa này là DNA gyrase (hay topoisomerase).

- Ngoài ra còn có các enzym khác như: Enzym “rep” mở xoắn chuỗi xoắn kép, RNA primase tổng hợp đoạn mồi RNA ngắn để tạo nhóm 3'OH, enzym DNA ligase nối các đoạn DNA ngắn (đoạn Okazaki) thành phân tử DNA dài. Bên cạnh đó, trong quá trình tổng hợp DNA còn thấy có vai trò protein DNA-B nhận ra và đánh dấu điểm khởi đầu tái bản, protein SSB bám vào hai mạch đơn ổn định để thực hiện quá trình tái bản DNA.

3.2 Các giai đoạn sao chép.

3.2.1 Khởi sự.

Ở *E. coli*, quá trình sao chép bắt đầu khi một protein đặc hiệu (B) nhận biết điểm bắt đầu sao chép và gắn vào trình tự base đó. Tiếp theo