

Nguyễn Hoàng Lộc (Chủ biên)
Trần Thị Lệ - Hà Thị Minh Thi

Giáo trình

Sinh học phân tử



NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC HUẾ

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

L i n ó i u

Sinh học phân tử là khoa học nghiên cứu các hiện tượng sinh học phân tử. Phạm vi nghiên cứu của môn học này có phần trùng lặp với một số môn học khác trong sinh học đặc biệt là di truyền học và hóa sinh học. Sinh học phân tử chủ yếu tập trung nghiên cứu mức độ tác động của các hệ thống cấu trúc khác nhau trong tế bào, bao gồm mối quan hệ qua lại giữa quá trình tổng hợp của DNA, RNA và protein và tìm hiểu cách thức tích hợp của các mức độ tác động này.

Hiện nay, sinh học phân tử và sinh học tế bào được xem là những ngành quan trọng của công nghệ sinh học. Nhờ phát triển các công cụ cơ bản của sinh học phân tử như các enzyme cắt restriction, DNA ligase, các vector tái tổ hợp, lai phân tử, kỹ thuật PCR... sinh học phân tử ngày càng trở nên thành tựu đáng quan trọng.

Giáo trình sinh học phân tử này cung cấp những kiến thức cơ bản cho sinh viên về các nội dung chính sau:

- Cấu trúc và chức năng của gen
- Cấu trúc genome
- Các quá trình tái bản, phiên mã và dịch mã của nguyên liệu di truyền
- Tích hợp và biểu hiện gen
- Sản xuất và biểu hiện gen
- Tái tổ hợp và chuyển gen

Do mức độ xuất bản lần đầu nên giáo trình này khó tránh khỏi thiếu sót hoặc chưa đáp ứng yêu cầu cần thiết. Vì thế, chúng tôi mong nhận được những ý kiến đóng góp để lần xuất bản sau được hoàn thiện hơn.

Chúng tôi chân thành cảm ơn Quý Nhà cao cấp Trường Đại học Giáo dục và Đào tạo đã hỗ trợ chúng tôi biên soạn giáo trình này, PGS. TS. Nông Văn Hải đã chấp thuận và góp những ý kiến quý báu.

Các tác giả

Chương 1

Các phân tử sinh học

I. Nucleic acid

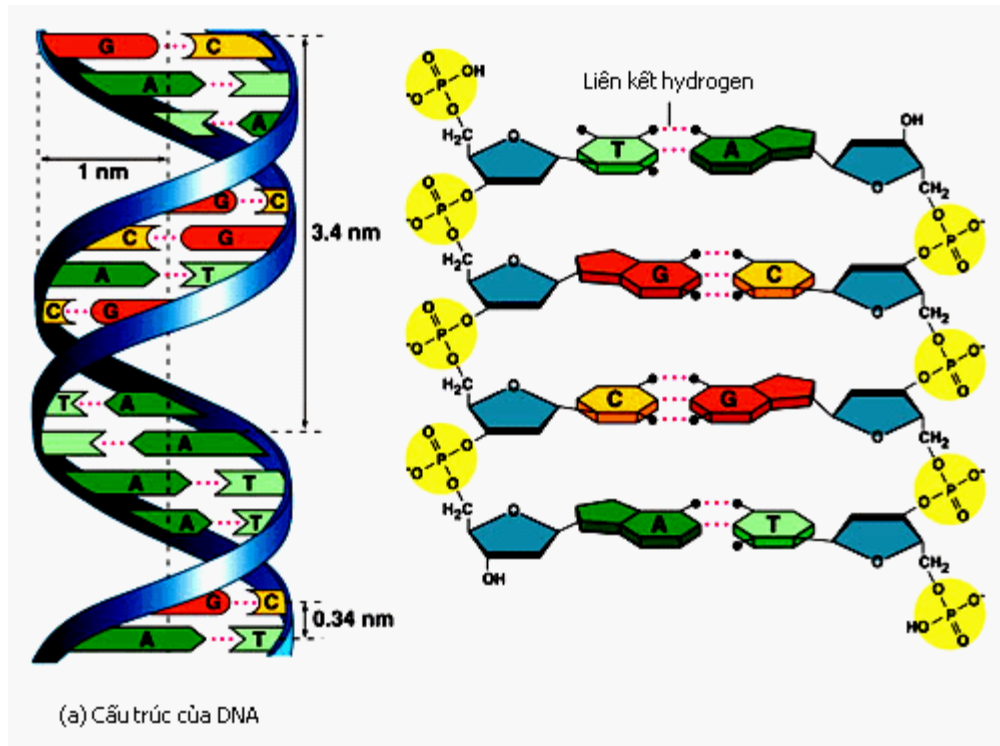
Nucleic acid, vật chất mang thông tin di truyền của các hệ thống sống, là một polymer hình thành từ các monomer là nucleotide. Mỗi nucleotide gồm ba thành phần: nhóm phosphate, đường pentose (đường 5 carbon) và một nitrogen base. Các nitrogen base thuộc hai nhóm: các purine gồm adenine (A) và guanine (G), các pyrimidine gồm thymine (T), cytosine (C) và uracil (U). Các nucleotide liên kết với nhau bằng liên kết phosphodiester tạo thành chuỗi dài.

Nucleic acid gồm hai loại phân tử có cấu trúc riêng nhau là deoxyribonucleic acid (DNA) và ribonucleic acid (RNA).

1. Deoxyribonucleic acid

Phân tử DNA là một chuỗi xoắn kép gồm hai sợi. Mỗi sợi là một chuỗi nucleotide (Hình 1.1). Mỗi nucleotide gồm ba thành phần: nhóm phosphate, đường deoxyribose và một trong bốn base (A, C, G và T) (Hình 1.2). Hai sợi liên kết với nhau nhờ các liên kết hydrogen hình thành giữa các base bổ sung nằm trên hai sợi: A bổ sung cho T và C bổ sung cho G. Mỗi sợi có một trình tự hướng về một đầu là 5' phosphate đầu, đầu kia là 3' hydroxyl đầu (quy ước là 5'→3'). Hướng của hai sợi trong chuỗi xoắn kép ngược nhau, nên chúng gọi là hai sợi đối xứng.

Những phân tích cấu trúc hiện tại đã cho thấy cấu trúc của DNA không phải luôn luôn tương tự như mô hình của Watson và Crick đã đề xuất. Do sự tác động của các hợp chất có khả năng liên kết với protein, dạng B có thể chuyển sang dạng A (nén chặt hơn) hoặc dạng Z (xoắn trái). Chúng có thể gấp lại hoặc xoắn nhiều, ví dụ một sợi DNA có chiều dài là 20 cm có thể nén trong một chromosome có kích thước là 5 μm.

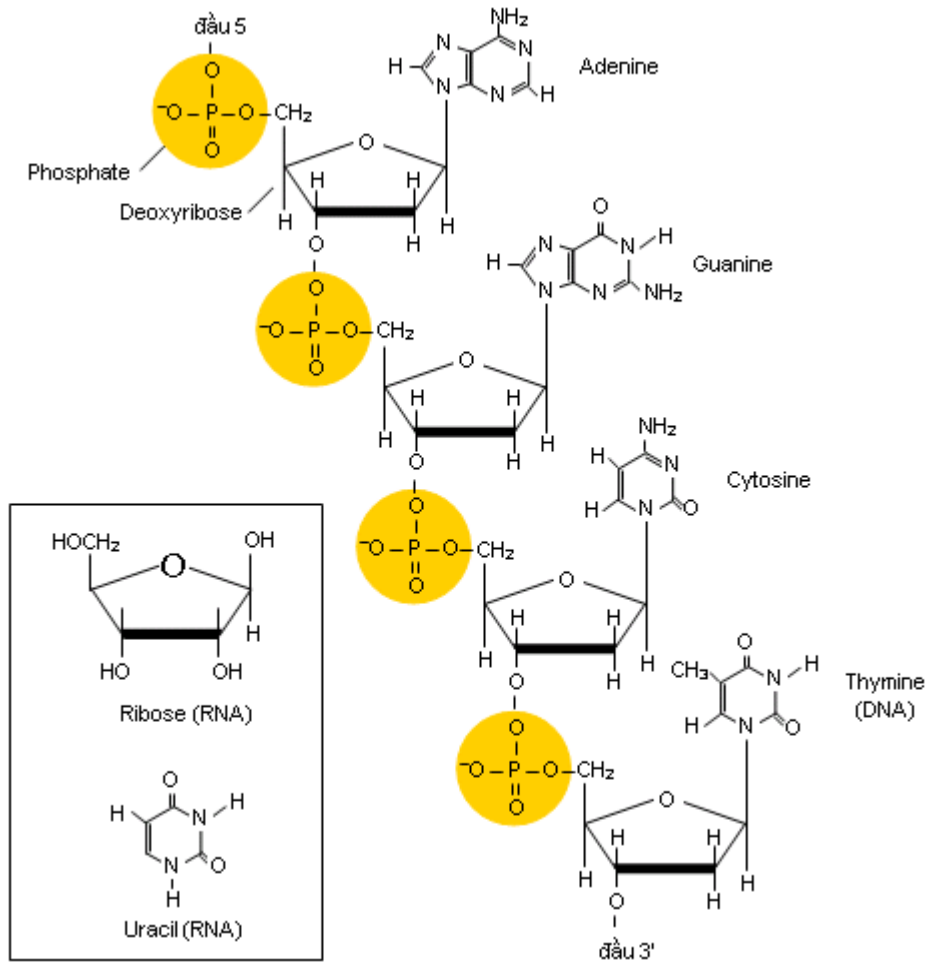


Hình 1.1. Cấu trúc xoắn kép của DNA

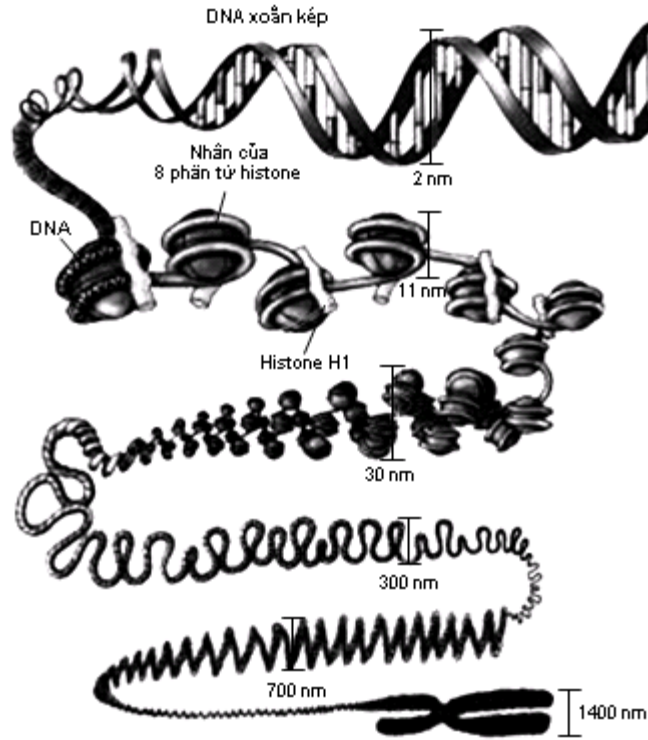
Phân tử DNA trong nhân sinh vật eukaryote dài hàng mét, còn phân tử nhân bào prokaryote (vi khuẩn) phân tử DNA lại có dạng vòng. Tuy nhiên, dù dạng nào thì các phân tử DNA này đều tuân theo quy luật chung. Trong tế bào eukaryote, DNA kết hợp chặt chẽ với các protein là histone.

DNA eukaryote có kích thước rất lớn (Ví dụ: DNA người có thể dài hàng mét) nên vấn đề đặt ra là phân tử này phải được nén chặt như thế nào trong một thể tích rất nhỏ của nhân. Việc nén chặt chỉ nên như thế nào, mà cấu trúc phân tử là nucleosome và mức cao nhất là cấu trúc nhiễm sắc thể. Thứ tự, đường kính của chuỗi DNA chỉ là 20 Å, trong khi số nhiễm sắc thể quan sát được kính hiển vi điện tử có đường kính 100 Å, đôi khi tới 300 Å. Vì vậy, phân tử DNA tham gia hình thành nên cấu trúc phức tạp (Hình 1.3).

Số nhiễm sắc thể có đường kính 100 Å là một chuỗi của nucleosome. Đó là những cấu trúc hình thành từ một sợi DNA quấn quanh một lõi gồm 8 phân tử histone (mức cao nhất của DNA). Số có đường kính 100 Å này có cấu trúc phức tạp hơn số có đường kính 300 Å. Trong nhân tế bào, các sợi khác nhau kết hợp chặt chẽ với nhau protein khác nhau và các RNA tạo thành nhân nhiễm sắc thể, mức cao nhất của DNA.



Hình 1.2. C u trúc các nucleotide i n hình



Hình 1.3. Cấu trúc nucleosome và nhiễm sắc thể. Phân tử DNA cuộn lại trên nhiễm sắc thể làm cho chiều dài gen chỉ 50.000 lần.

Các DNA eukaryote có cấu trúc khác với DNA prokaryote. Toàn bộ phân tử DNA prokaryote đều mang thông tin mã hóa cho các protein trong khi ở DNA của eukaryote bao gồm những trình tự mã hóa (các exon) xen kẽ với những trình tự không mã hóa (intron). Các trình tự mã hóa eukaryote chìm ngập trong một khối lớn DNA mà cho đến nay vẫn chưa rõ tác dụng của nó là “DNA rác” (junk DNA). Tùy theo mức độ phân bố của chúng trong nhân, các trình tự DNA được chia làm ba loại:

- **Các trình tự lặp lại nhiều lần.** Ví dụ: những vật có vú các trình tự này chỉ chiếm 10-15% genome (hệ gen). Đó là những trình tự DNA ngắn (10-200 kb), không mã hóa, thường tập trung ở những vùng chuyên biệt trên nhiễm sắc thể như vùng tâm động (trình tự CEN) hay ở các nhiễm sắc thể (trình tự TEL). Chức năng của các trình tự này chưa rõ, có thể chúng tham gia vào quá trình di chuyển DNA trên sợi vô số (trình tự CEN) hoặc vào quá trình sao chép toàn bộ phần DNA nằm ở mút nhiễm sắc thể (trình tự TEL).

- **Các trình tự có số lần lặp lại trung bình.** Ví dụ: genome người các trình tự này chiếm 25-40%. Chúng đa dạng hơn và có kích thước lớn hơn (100-1.000 kb) các trình tự lặp lại nhiều lần. Các trình tự này phân bố trên toàn bộ genome. Chúng có thể là

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

nhưng trình tự không mã hóa mà có thể là những trình tự mã hóa cho rRNA, tRNA và 5S RNA.

- **Các trình tự duy nhất.** Là các gen mã hóa cho các protein, có trình tự đặc trưng cho từng gen.

Một cách cơ bản để phân tích DNA có ý nghĩa rất quan trọng và cần dựa vào phương pháp lai phân tử, đó là kỹ thuật biến tính và hybrid hóa. Biến tính là khi nhiệt độ hai sợi của phân tử DNA tách rời nhau khi các liên kết hydrogen giữa các base bổ sung nằm trên hai sợi bị đứt do các tác nhân hóa học (dung dịch kiềm, formamide, urea) hay do tác nhân vật lý (nhiệt). Sau đó, nếu điều chỉnh nhiệt độ và nồng độ muối thích hợp, các sợi có thể bắt cặp trở lại theo nguyên tắc bổ sung, hình thành phân tử DNA ban đầu, đó là sự hybrid hóa.

2. Ribonucleic acid

Phân tử RNA có cấu trúc khác DNA ngoài ba điểm khác biệt sau:

- Phân tử RNA là chuỗi đơn.
- Đường pentose của phân tử RNA là ribose thay vì deoxyribose.
- Thymine (T), mặt trong bốn loại base hình thành nên phân tử DNA, được thay thế bằng uracil (U) trong phân tử RNA.

Cấu trúc và chức năng của RNA có sự biến đổi rất rõ rệt. Ví dụ bản thân RNA chỉ là chất mang thông tin di truyền virus, sau đó nó lại chứng minh rằng nó không chỉ đóng vai trò cơ bản vì chuyên truyền thông tin di truyền mà còn có vai trò cấu trúc khi tạo nên phức hợp RNA-protein.

Theo mô hình lý thuyết tiến hóa mà Friedrich Eigen đề xuất, RNA là chất mang thông tin di truyền, thành viên trung gian của sự tiến hóa, thành phần cấu tạo và là chất xúc tác. Nhóm OH ở vị trí 2' của ribose cần thiết cho các chức năng làm nhiệm vụ xúc tác để tạo thành sợi, qua đó làm tăng cường độ bền vững của liên kết phosphodiester.

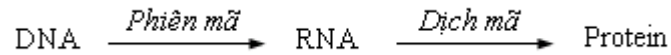
Trong tế bào có ba loại RNA chính, có các chức năng khác nhau:

2.1. Các RNA thông tin (mRNA)

mRNA là bản sao của những trình tự nhất định trên phân tử DNA, có vai trò trung tâm là truyền thông tin mã hóa trên phân tử DNA về bản máy ghi mã thành phân tử protein tương ứng. Các RNA có cấu trúc đa dạng, kích thước nhỏ hơn so với DNA vì chức năng truyền thông tin mã hóa cho một hoặc vài protein và chỉ chiếm khoảng 2-5% tổng RNA trong tế bào.

Quá trình truyền thông tin được thể hiện như sau:

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html



E. coli, kích thước trung bình của một phân tử mRNA khoảng 1,2 kb.

2.2. RNA vận chuyển (tRNA)

tRNA làm nhiệm vụ vận chuyển các amino acid hoạt hóa đến ribosome để tổng hợp protein từ các mRNA tương ứng. Có ít nhất một loại tRNA cho mỗi loại amino acid. tRNA vận chuyển chứa khoảng 75 nucleotide (có khối lượng khoảng 25 kDa), là phân tử RNA nhỏ nhất. Các tRNA có cấu trúc dạng ba lá. Cấu trúc này chứa nhiều các liên kết bổ sung hiên diện nhiều vùng của phân tử tRNA. Hai vị trí không có liên kết bổ sung đóng vai trò đặc biệt quan trọng về vị trí gắn của tRNA:

- Trình tự anticodon gồm ba nucleotide.
- Trình tự CCA, có khả năng liên kết cộng hóa trị với một amino acid cụ thể.

2.3. RNA ribosome (rRNA)

rRNA là thành phần cấu tạo của ribosome, đóng vai trò xúc tác và cấu trúc trong tổng hợp protein.

Tùy theo hình thức của rRNA được chia thành nhiều loại: eukaryote có 28S; 18S; 5,8S và 5S rRNA; còn các rRNA của *E. coli* có ba loại: 23S, 16S và 5S.

rRNA chỉ chiếm một phần nhỏ trong ba loại RNA (80% tổng RNA tế bào), tỉ lệ phần trăm là tRNA khoảng 16% và mRNA chỉ khoảng 2%. Ngoài ra, tế bào sinh vật eukaryote còn chứa nhiều phân tử RNA kích thước nhỏ của nhân (small nuclear, snRNA) chỉ chiếm khoảng <1% tham gia vào ghép nối các exon. Ribosome là những phân tử cần thiết cho sự tổng hợp protein, ribosome của mỗi tế bào đều gồm một tiểu đơn vị lớn và một tiểu đơn vị nhỏ. Mỗi tiểu đơn vị có mang nhiều protein và rRNA (trong đó rRNA là thành phần chủ yếu chiếm khoảng 65%) có kích thước khác nhau. Ngựa vằn có hệ thống ribosome trong ty thể, nó có sự tổng hợp một số protein ty thể.

Bảng 1.1. Các phân tử RNA trong *E. coli*

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Loại	Tổng số tương đối (%)	Hệ số lắng (S) ¹	Khối lượng phân tử (kDa)	Số lượng nucleotide
rRNA	80	$\begin{cases} 23 \\ 16 \\ 5 \end{cases}$	$\begin{cases} 1,2 \times 10^3 \\ 0,55 \times 10^3 \\ 3,6 \times 10^1 \end{cases}$	$\begin{cases} 3700 \\ 1700 \\ 120 \end{cases}$
tRNA	15	4	$2,5 \times 10^1$	75
mRNA	5		Không đồng nhất	

2.3.1. Ribosome của prokaryote

T bào nghiên cứu về ribosome như một là *E. coli*. Ribosome (70S) của *E. coli* gồm hai tiểu đơn vị: tiểu đơn vị nhỏ (30S) và tiểu đơn vị lớn (50S). Cấu trúc vào hình ảnh, người ta phân biệt ba loại rRNA: 23S rRNA, 16S rRNA và 5S rRNA.

- Tiểu đơn vị 30S chứa: 1 phân tử 16S rRNA (có 1540 nu) và 21 ribosomal protein khác nhau.

- Tiểu đơn vị 50S chứa: 1 phân tử 5S rRNA (có 120 nu), 1 phân tử 23S rRNA (có 2900 nu) và 34 ribosomal protein.

Hai tiểu đơn vị nhỏ và lớn khi kết hợp với nhau sẽ tạo ra một rãnh chôn tiếp giáp của chúng cho mRNA đi qua.

2.3.2. Ribosome của eukaryote

Ribosome của eukaryote (80S) lớn hơn ribosome của prokaryote cũng bao gồm hai tiểu đơn vị: tiểu đơn vị nhỏ (40S) và tiểu đơn vị lớn (60S).

- Tiểu đơn vị 40S chứa: 1 phân tử 18S rRNA (có 1900 nu) và 33 ribosomal protein.

- Tiểu đơn vị 60S chứa: 3 phân tử rRNA (5S; 5,8S và 28S) và 49 ribosomal protein.

Tóm lại, tất cả RNA trong tế bào được tổng hợp nhờ enzyme RNA polymerase. Enzyme này đòi hỏi hình thành thành phần sau đây:

- Mất khuôn mẫu, thường là DNA sợi đôi.

- Tiềm chất hóa học: Bốn loại ribonucleoside triphosphate: ATP, GTP, UTP và CTP.

Sinh tổng hợp RNA giống DNA một chiều, nhưng hướng tổng hợp là 5'→3', hai đầu chôn kéo dài giống nhau: nhóm 3'-OH ở cuối của chuỗi tổng hợp là vị trí

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

g n k t c a nucleoside triphosphate ti p theo. Th ba, s t ng h p x y ra do th y phân pyrophosphate.

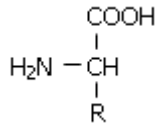
Tuy nhiên, khác v i DNA là RNA không ời h i m i (primer). Ngoài ra, RNA polymerase không có ho t tính nuclease s a ch a khi các nucleotide b g n nh m.

C ba lo i RNA trong t bào c t ng h p trong *E. coli* nh m t lo i RNA polymerase. ng v t có v ú, các RNA khác nhau c t ng h p b ng các lo i RNA polymerase khác nhau.

II. Protein

1. C u trúc c a protein

Amino acid là n v c s (monomer) c u thành protein. T t c 20 amino acid có m t trong protein u c xây d ng theo m t ki u m u chung:



Công th c t ng quát c a L- α -amino acid

Trong ó, g c R (m ch bên) c ng là ph n khác duy nh t gi a 20 lo i amino acid, quy nh tính ch t c a t ng lo i.

Nhóm amine (NH₂) ính nguyên t C₂, theo tên c là nguyên t C _{α} . Vì v y, ng i ta g i là nhóm α -amine. Các amino acid t n t i ch y u trong t nhiên có nhóm amine ng bên trái tr c, c g i là amino acid d ng L. D ng D-amino acid ch t n t i riêng bi t, ví d trong thành t bào vi khu n.

Các amino acid riêng bi t có nh ng c tính khác nhau là do g c R c a chúng. Nh ng amino acid trung tính có m t nhóm amine và m t nhóm carboxyl. Nh ng protein ch a nhi u amino acid trung tính là nh ng protein trung tính. Khi chi u dài g c R t ng s hình thành c tính k n c. Nh ng protein có ch a nhi u amino acid nh valine, leucine, isoleucine có tính ch t c tr ng là k n c. Nh ng amino acid có tính acid trong ph n g c có m t nhóm carboxyl. Protein ch a nhi u amino acid có tính acid là nh ng protein acid. T ng t nh v y i v i protein ch y u c hình thành b i nh ng amino acid có tính ki m là nh ng protein ki m. Ph n g c R c a amino acid có ý ngh a quy t nh i v i c tính c a protein mà chúng t o nên. i u này không nh ng có ý ngh a i v i tính ch t hóa h c mà c c u trúc c a protein.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Thành phần hoàn toàn protein, thu được chủ yếu từ các L- α -amino acid. Mặc dù protein rất đa dạng nhưng hầu hết chúng đều được cấu tạo từ 20 L- α -amino acid. Dựa vào tính đặc trưng, amino acid được chia làm bảy nhóm chính sau đây:

- **Amino acid trung tính mạch thẳng.** Bao gồm glycine, alanine, valine, leucine và isoleucine.

- **Các hydroxyl amino acid mạch thẳng.** Bao gồm serine và threonine.

- **Amino acid chứa lưu huỳnh mạch thẳng.** Bao gồm cysteine và methionine. Khi oxy hóa hai nhóm -SH của hai phân tử cysteine tạo thành cystine có chứa cầu disulfide (-S-S-).

- **Các amino acid acid và các amide.** Bao gồm aspartic acid và glutamic acid. Trong phân tử của chúng có một nhóm amine và hai nhóm carboxyl. Ở pH sinh lý (6-7), các amino acid này tích điện âm. Amine hóa nhóm carboxyl mạch bên của aspartate và glutamate tạo thành các amide tương ứng là asparagine và glutamine.

- **Các amino acid kiềm.** Bao gồm lysine và arginine.

- **Iminoacid.** Proline.

- **Các amino acid thơm và dị vòng.** Bao gồm phenylalanine, tyrosine và tryptophan. Do có chứa vòng thơm nên các amino acid này có một số tính chất đặc biệt.

Các amino acid liên kết với nhau bởi các liên kết peptide, liên kết này được hình thành do sự kết hợp nhóm amine của một amino acid với nhóm carboxyl của amino acid kế tiếp. Phản ứng kết hợp gọi là phản ứng ngưng tụ phân tử H_2O .

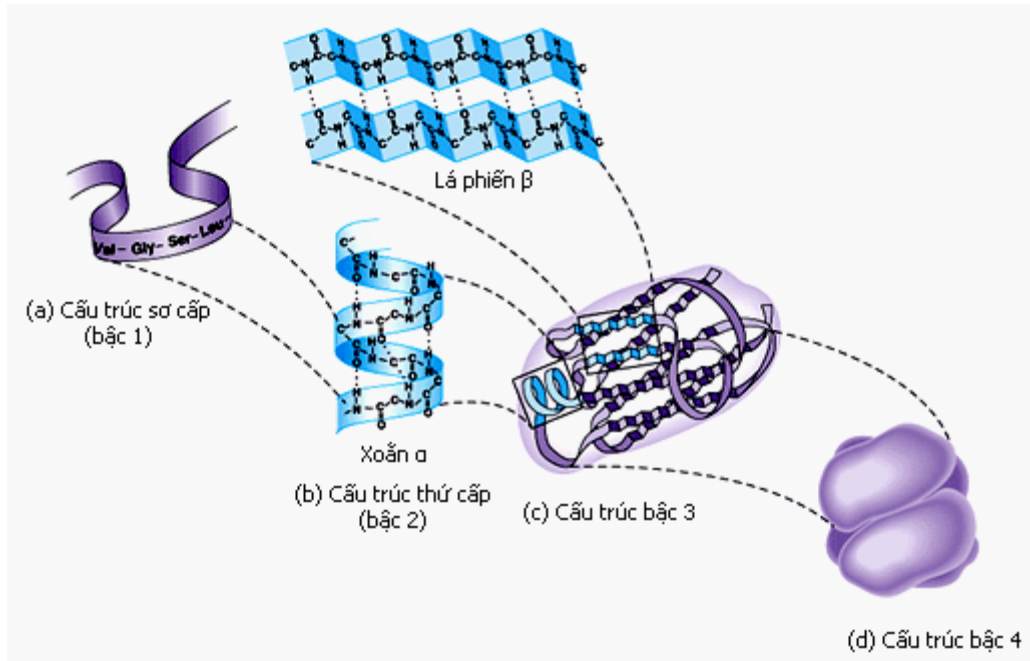
Peptide là một chuỗi liên tiếp của amino acid (số lượng ít hơn 30). Với số lượng amino acid liên tục chuỗi được gọi là polypeptide. Một polypeptide có hai đầu tận cùng, một đầu mang nhóm amine tự do, đầu kia mang nhóm carboxyl tự do. Protein được dùng để chỉ những chuỗi dài, nghĩa là một cấu trúc phức tạp trong không gian chứ không phải những chuỗi ngắn là một trình tự amino acid.

Chuỗi polypeptide có thể uốn thành cấu trúc hình sợi trong các protein hình sợi hay cấu trúc khảm cục bộ trong các protein dạng cầu hay một cấu trúc globulin hai dạng trên. Một protein có thể được hình thành từ nhiều chuỗi polypeptide.

Ngay cả thành phần phân bố của cấu trúc của phân tử protein thành bốn bậc sau (Hình 1.4):

- **Cấu trúc bậc 1.** Là trình tự sắp xếp các gốc amino acid trong chuỗi polypeptide. Cấu trúc này được gọi là liên kết peptide (liên kết cộng hóa trị).

Vì mỗi một amino acid có gốc khác nhau, các gốc này có những tính chất hóa học khác nhau, nên một chuỗi polypeptide các thành phần khác nhau có những tính chất hóa học rất khác nhau. Tuy nhiên, về tổng quát thì tất cả các chuỗi polypeptide được xây dựng một cách có hệ thống từ các nhóm nguyên tử CO, CH và NH. Vì vậy xây dựng có hệ thống này là cơ sở để phân tích cấu trúc bậc hai.



Hình 1.4. Các m c t ch c a phân t protein

- **C u trúc b c 2.** Là t ng tác không gian gi a các g c amino acid g n nhau trong chu i polypeptide. C u trúc c b n v ng ch y u nh liên k t hydrogen hình thành gi a các liên k t peptide k g n nhau, cách nhau nh ng kho ng xác nh.

C u trúc b c 2 c a phân t protein: xo n α (α -helix), lá phi n β và xo n collagen. Lo i α -helix là s i d ng xo n c, cu n xung quanh m t tr c, m i vòng xo n có 3,6 g c amino acid.

Nh ng s i collagen ch y song song t o nên nh ng bó s i dai c a gân. Collagen c ng có trong x ng và trong các mô n i. Elastin là m t protein, g m nh ng s i protein t ng i ng n, g n k t v i nhau nh liên k t c ng hóa tr . Nh ng chu i polypeptide quay theo d ng xo n c, t du i xo n khi có áp l c.

- **C u trúc b c 3.** Là t ng tác không gian gi a các g c amino acid xa nhau trong chu i polypeptide, là d ng cu n l i trong không gian c a toàn chu i polypeptide.

Nhi u chu i polypeptide trong c th s ng t n t i không ph i d ng th ng mà g p khúc và qua ó t o nên c u trúc không gian ba chi u. Tuy nhiên, c u trúc này hoàn toàn xác nh, ch y u là do trình t các amino acid và môi tr ng. Khi m t chu i polypeptide tách ra kh i ribosome sau khi t ng h p và c a vào trong t bào ch t nh là môi tr ng t o hình thì nó s hình thành nên c u trúc t nhiên r t nhanh, c bi t i v i c u trúc hình c u, em l i cho protein nh ng c tính sinh lý quan tr ng. Có th do chuy n ng nhi t c a các chu i polypeptide mà các nhóm c a các g c amino acid ti p xúc v i

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

nhau, đôi khi có thể kết hợp với nhau. Trong nhiều protein hình cầu có chứa các gốc cysteine, sẽ tạo thành các liên kết disulfite giữa các gốc cysteine xa nhau trong chuỗi polypeptide sẽ làm cho chuỗi bền vững hơn. Các liên kết khác, như liên kết Van der Waals, liên kết tĩnh điện, phân cực, kỵ nước và hydrogen giữa các mạch bên của các gốc amino acid đều tham gia làm bền vững cấu trúc bậc 3. Cấu trúc hình cầu của protein cũng gọi là cấu trúc bậc ba, đó chính là cấu trúc của enzyme.

- **Cấu trúc bậc 4.** Là tác động không gian giữa các chuỗi của các phân tử protein gồm hai hay nhiều chuỗi polypeptide hình cầu. Mỗi chuỗi polypeptide này cũng gọi là một tiểu đơn vị (subunit). Sự kết hợp giữa các phân tử này lại với nhau và chủ yếu là do liên kết hydrogen và kỵ nước. Bằng cách này hai phân tử xác định có thể kết hợp với nhau tạo thành một dimer. Chẳng hạn: hemoglobin có tạo nên từ hai chuỗi α và mỗi chuỗi có 141 gốc amino acid và hai chuỗi β và mỗi chuỗi là 146 gốc amino acid.

Cấu trúc của một hoặc nhiều chuỗi polypeptide có ý nghĩa quan trọng vì nó hòa tan và chức năng của chúng. Cấu trúc protein cũng phụ thuộc vào pH của môi trường. Protein và chuỗi polypeptide hòa tan tốt khi nhóm amino hướng ra phía ngoài, nhóm kỵ nước hướng vào bên trong. Khi một protein thay đổi cấu trúc thì nhóm kỵ nước quay ra ngoài, protein mất khả năng hòa tan trong nước, ví dụ trường hợp kết tủa không đồng tính của protein sữa trong môi trường chua. Lactic acid cũng sinh do vi khuẩn làm giảm pH sữa, làm thay đổi protein sữa. Nhiều nhóm kỵ nước hướng ra bên ngoài, protein mất khả năng tan trong nước. Vì vậy, việc theo dõi duy trì giá trị pH trong tế bào chất rất quan trọng, vì chỉ có như vậy chức năng hoạt động của các enzyme trong tế bào chất mới được đảm bảo.

2. Chức năng của protein

Một trong những vai trò quan trọng của protein là vận chuyển các chất dinh dưỡng và các phân tử nhỏ trong tế bào. Một trong các cách phân loại protein là dựa vào chức năng sinh học của chúng. Bảng 1.2 tóm tắt sự phân loại protein theo chức năng và đưa ra một số ví dụ điển hình cho mỗi loại.

Bảng 1.2. Các chức năng sinh học của protein và một số ví dụ

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Các nhóm chức năng	Ví dụ
Enzyme	Ribonuclease Trypsin Phosphofructokinase Alcohol dehydrogenase Catalase Malic enzyme
Protein điều khiển	Insulin Somatotropin Thyrotropin <i>lac</i> repressor NF1 (nuclear factor 1) Catabolite activator protein (CAP) AP1
Protein vận chuyển	Hemoglobin Serum albumin Glucose transporter
Protein dự trữ	Ovalbumin Casein Zein Phaseolin Ferritin
Protein vận động và co rút	Actin Myosin Tubulin Dynelin Kinesin
Protein cấu trúc	α -Keratin Collagen Elastin Fibroin Proteoglycans
Protein cấu trúc tạm thời (scaffold protein)	Grb 2 crk shc stat IRS-1
Protein bảo vệ	Immunoglobulins Thrombin Fibrinogen Antifreeze proteins Snake and bee venom proteins Diphtheria toxin Ricin

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

2.1. Chức năng enzyme

Phần lớn protein là enzyme. Hiện nay, có hơn 3.000 loại enzyme đã được biết. Enzyme là chất xúc tác sinh học có vai trò làm tăng tốc độ phản ứng. Một lượng nhỏ trong trao đổi chất của cơ thể xúc tác bởi enzyme. Enzyme có thể làm tăng tốc độ phản ứng lên 10^{16} lần so với tốc độ phản ứng không xúc tác. Sự kết hợp giữa enzyme và chất phản ứng tạo ra vị trí hoạt động của enzyme.

2.2. Protein điều hòa

Một số protein không thể hiện bản chất sinh học nào, tuy nhiên nó điều hòa khi các protein khác thể hiện chức năng sinh học, chẳng hạn insulin điều hòa nồng độ glucose trong máu. Đó là một protein nhỏ (5,7 kDa), gồm hai chuỗi polypeptide nối với nhau bằng các liên kết disulfite. Khi không có insulin thì sự tiếp nhận glucose trong tế bào bị ngăn chặn. Vì vậy, mức độ glucose trong máu tăng và dẫn đến sự thiếu hụt năng lượng qua các tế bào (bệnh tiểu đường).

Một nhóm protein khác tham gia vào sự điều hòa biểu hiện gen. Những protein này có chức năng là gắn vào những trình tự DNA hoặc hoạt hóa hoặc ức chế sự phiên mã thông tin di truyền sang mRNA, ví dụ chất ức chế (repressor) điều chỉnh sự phiên mã.

2.3. Protein vận chuyển

Làm nhiệm vụ vận chuyển chất từ vị trí này sang vị trí khác, ví dụ vận chuyển O_2 từ phổi đến các mô do hemoglobin hoặc vận chuyển acid béo từ mô mỡ đến các cơ quan khác như protein trong máu là serum albumin.

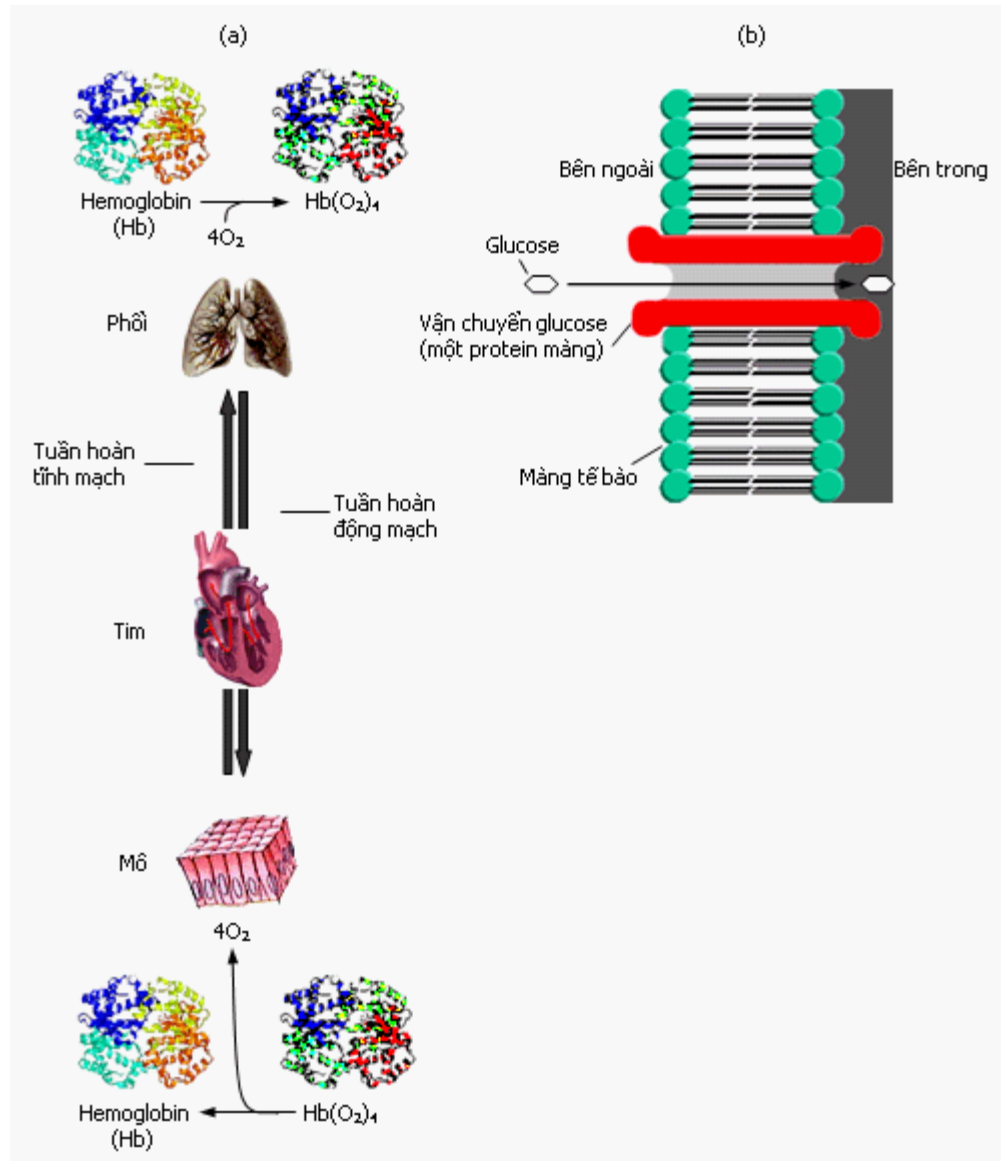
Các chất được vận chuyển qua màng thể hiện bằng các protein đặc biệt, chẳng hạn vận chuyển glucose hoặc các amino acid qua màng (Hình 1.5).

2.4. Protein dinh dưỡng

Các protein là nguồn cung cấp các chất cần thiết cho cơ thể là protein dinh dưỡng. Protein là polymer của các amino acid và nitrogen thường là yếu tố cần thiết cho sinh trưởng, nên cần thiết phải có protein dinh dưỡng cung cấp nitrogen khi cần. Chẳng hạn, ovalbumin là protein dinh dưỡng trong lòng trứng cung cấp nitrogen cho phôi phát triển. Casein là protein sữa cung cấp nitrogen cho động vật có vú còn non. Một số chất béo cao cấp

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

chứa một lượng protein đáng kể (khoảng 60%), cung cấp nitrogen cho quá trình này một cách hiệu quả.



Hình 1.5. Hai kiểu vận chuyển cơ bản. (a): vận chuyển bên trong hoặc giữa các tế bào hoặc mô. (b): vận chuyển vào hoặc ra khỏi tế bào.

Protein cũng có thể chứa các chất khác ngoài thành phần amino acid (N, C, H, O và S), ví dụ ferritin là protein tìm thấy trong mô sống và tích trữ sắt (Fe). Khối lượng phân tử ferritin (460 kDa) gồm có 4.500 nguyên tử Fe (chỉ chiếm 35% khối lượng). Protein có vai trò

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

giới là kim loại Fe cần thiết cho sự tổng hợp những protein có chứa Fe quan trọng như hemoglobin.

2.5. Protein vận động và co rút

Một số protein mang lại cho tế bào khả năng vận động, tế bào phân chia và co cơ. Các protein này có đặc điểm: chúng dễ dàng bị hydrolyse polymer hóa ngược lại, chẳng hạn actin và myosin. Tubulin là thành phần cấu trúc của thoi vô sắc (sụp đổ khi phân chia các nhiễm sắc thể và các cực).

2.6. Protein cấu trúc

Có chứa trong tế bào và mô. Chẳng hạn: α -keratin là protein không tan, cấu tạo nên tóc, móng và sừng. Collagen là protein hình sợi có trong xương.

Trong tế bào collagen chiếm 1/3 protein tổng số. Fibroin (β -keratin) là thành phần cấu trúc của kén tơ.

Một chức năng phụ khác của protein là cấu tạo nên màng sinh học.

2.7. Protein bảo vệ

Trong việc giữ các kim loại nặng, phytochelatin có một ý nghĩa quan trọng, đây là những polypeptide ngắn có nguồn gốc từ glutathione và có công thức chung như sau:

$(\gamma\text{-glutamyl-cysteinyl})_n\text{-glycine}$

Do có nhiều nhóm SH nên chúng có khả năng kết hợp chặt chẽ với các kim loại nặng, làm cho những kim loại nặng này không thể gây rối loạn trao đổi chất. Sự tổng hợp phytochelatin sẽ kích thích bởi những kim loại nặng như Cd, Cu, Ag, Bi và Au.

Protein bảo vệ có vai trò quan trọng trong các phản ứng miễn dịch. Trong tế bào có những sợi có một chiều dài ngắn và phát triển cao để ngăn ngừa những tác nhân vi sinh vật gây bệnh. Chức năng này có liên quan đến tính đặc hiệu của chuỗi polypeptide. Khi một protein lạ (có nguồn gốc virus, vi khuẩn hoặc nấm) xâm nhập vào máu hoặc vào mô thì phản ứng tế bào sẽ xảy ra rất nhanh. Protein lạ sẽ là kháng nguyên (antigen) chứa một vùng có trật tự xác định các nguyên tử có thể kết hợp với tế bào lympho và kích thích tế bào này sản sinh kháng thể. Những tế bào lympho tồn tại trong hệ thống miễn dịch với số lượng 10^9 và trên bề mặt của nó có những vùng nhận biết riêng biệt mà kháng nguyên sẽ kết hợp (Hình 1.6). Những vùng nhận biết này rất khác nhau và đặc hiệu cho từng loại kháng nguyên. Trong cơ thể luôn có sẵn một lượng lớn các tế bào lympho khác nhau và chúng có thể tổng hợp rất nhanh các kháng thể đặc hiệu khi

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

kháng nguyên xu t hi n. M i lo i kháng th có m t v trí k t h p duy nh t c tr ng v i kháng nguyên. Kh n ng b o v c a h mi n d ch ã làm cho protein l c a tác nhân gây b nh tr thành vô h i. Nh ng kháng th này c g i là globulin mi n d ch. Chúng chi m kho ng 20% protein t ng s trong máu.

M t nhóm protein b o v khác là protein làm ông máu thrombin và fibrinogen, ng n c n s m t máu c a c th khi b th ng.

Cá các vùng c c c a Trái t có protein ch ng ông (antifreeze protein) có tác d ng b o v máu khi nhi t xu ng d i 0°C.

2.8. Protein l /ngo i lai

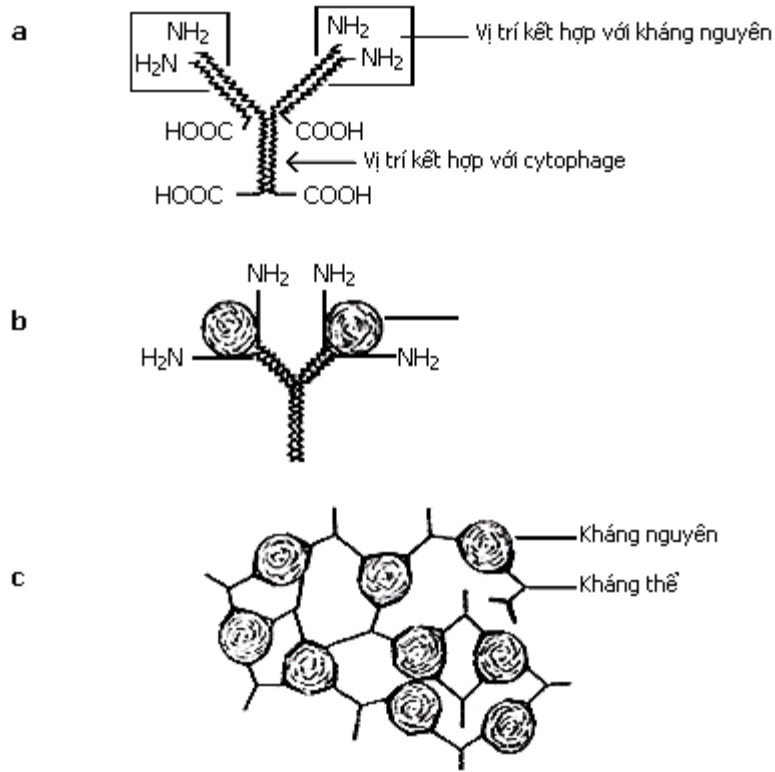
Ví d monellin là m t lo i protein c tìm th y m t lo i cây châu Phi, c coi là ch t ng t nhân t o cho con ng i.

m t s sinh v t bi n nh h Trai ti t ra lo i protein keo (glue protein), cho phép nó g n ch t lên b m t.

III. Lipid

M c dù không mang ho t tính sinh h c cao nh protein nh ng lipid c ng óng m t vai trò c bi t trong h th ng s ng. Chúng là nhân t chính t o nên các màng sinh h c mà n u thi u thì m i ho t ng c a protein s không th ph i h p nh p nhàng.

n v c u trúc c a lipid là các acid béo. M i acid béo c c u t o t m t m ch carbohydrate (g m các nguyên t C và H) g n v i m t nhóm carboxyl có tính acid. Các acid béo khác nhau b i dài c a chúng, b i s l ng và v trí các liên k t ôi. Các acid béo không có liên k t ôi c g i là các acid béo bão hòa, các acid béo không bão hòa có ít nh t m t liên k t ôi.



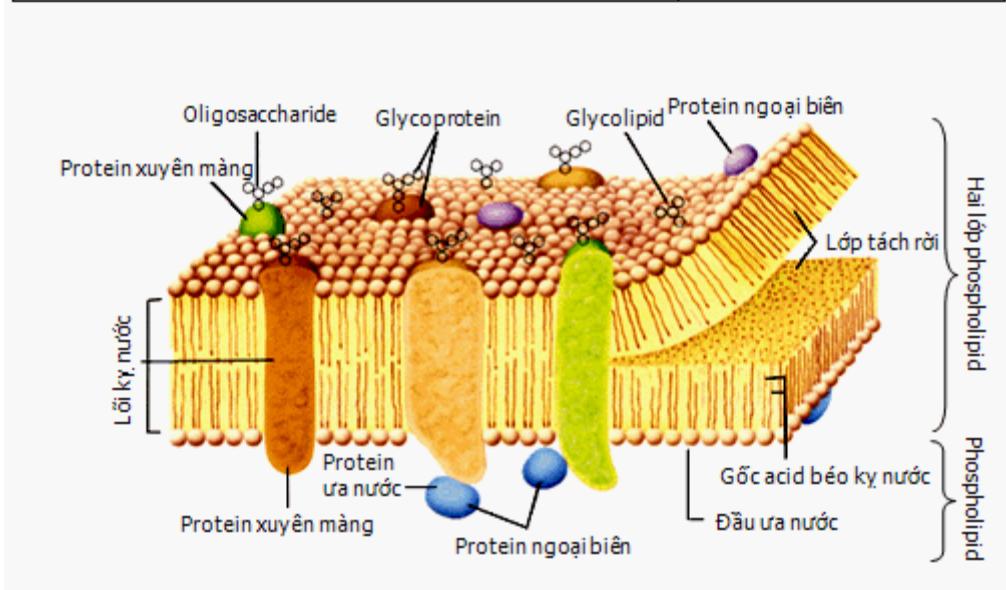
Hình 1.6. Sơ đồ cấu trúc của kháng thể và kháng nguyên. a: kháng thể gồm 4 chuỗi polypeptide. b: kháng thể kết hợp với kháng nguyên. c: kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể.

Màng sinh học có chức năng là giới hạn và tham gia vào việc vận chuyển các chất. Membran sinh học có khả năng chuyển đổi năng lượng. Protein màng có thể là các enzyme. Chức năng này có thể hiển thị màng trong các tế bào và lớp tế bào. Membran sinh học bao gồm lớp kép lipid và protein phân bố trong đó (Hình 1.7)

Các lipid màng cấu hình thành một chuỗi dài acid béo với các nhóm có tính phân cực cao và các gốc là những phân tử không phân cực vì một đầu tác dụng với nước, còn đầu kia thì kỵ nước.

Bảng 1.3. Cấu trúc của acid béo tiêu biểu trong hệ thống sinh học

Công thức hóa học	Tên thường dùng
<i>Acid béo bão hòa</i>	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10} \text{COOH}$	Lauric
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14} \text{COOH}$	Palmitic
<i>Acid béo không bão hòa</i>	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	Oleic
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4 \text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2 \text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7 \text{COOH}$	Linoleic



Hình 1.7. S bi u di n m t o n c t c a màng sinh h c

IV. Polysaccharide

Các polysaccharide có nhi u ch c n ng quan tr ng trong t bào, chúng tham gia vào c u t o t bào và là ngu n đ tr n ng l ng ch y u. Các polysaccharide c hình thành t nhi u monomer, là các ng n gi n (monosaccharide) n i v i nhau b ng liên k t glycoside. Liên k t này c hình thành t s k t h p gi a C₁ c a m t phân t ng v i nhóm hydroxyl c a phân t k t i p.

Ngu n đ tr tinh b t các t bào ng v t là glycogen, trong khi ó th c v t là tinh b t. M t polymer khác c a glucose là cellulose thì t o nên thành t bào th c v t và là h p ch t h u c hi n d n nhi u nh t trong sinh quy n.

Chúng ta v a i m qua riêng r t ng thành ph n c u t o t bào chính. Trong th c t, ho t ng c a chúng ph i h p m t thi t v i nhau. Các nucleic acid trong t bào th ng k t h p ch t ch v i các protein t o thành nucleoprotein. DNA c a t bào

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

eukaryote thì các thành phần protein chủ yếu là các histone. Màng tế bào cũng không phải chỉ có phospholipid, chính các protein gắn trong màng cũng tạo ra những cấu trúc riêng của màng sinh học. Một điểm cần lưu ý là những cấu trúc và các tính chất hóa lý của nucleic acid, lipid và polysaccharide thường liên quan thì các protein liên kết sẽ ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng. Một phân tử protein thường bao gồm nhiều vùng mang những tính khác nhau: vùng gắn kết hay kết nối, vùng gắn kết, vùng có hoạt tính xúc tác, vùng liên kết với nucleic acid hay với một protein khác. Tất nhiên chức năng của tế bào, tổ chức hình thành và chức năng mang thông tin di truyền, truyền thông tin di truyền, sự chuyển hóa năng lượng, sự liên lạc giữa các tế bào... đều có sự tham gia của các protein. Điều kiện để các hoạt động này thực hiện được là tất cả các hoạt động vô cùng đa dạng này thực hiện được là nhờ sự phân tử duy nhất.

Tài liệu tham khảo/ bổ sung

1. **Huỳnh Thùy Dung**. 1998. Sinh học phân tử. NXB Giáo dục, Hà Nội.
2. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD**. 2002. Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. *Garland Publishing, Inc.* New York, USA.
3. **Lewin B**. 2000. Gene VII. *Oxford University Press*, Oxford, UK.
4. **Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL and Darnell J**. 2004. Molecular Cell Biology. 5th ed. *WH Freeman and Company*, New York, USA.
5. **Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M and Loscik R**. 2004. Molecular Biology of the Gene. *The Benjamin Cummings/Cold Spring Harbor Laboratory Press*, San Francisco, CA, USA.
6. **Weaver RF**. 2003. Molecular Biology. 2nd ed. *McGraw-Hill Company Inc.* New York, USA.

¹S (Svedberg): đơn vị đo vận tốc lắng. Hệ thống các hạt tiểu phân phân tử không nhúng vào khi lắng các hạt này có mà còn phân tử vào hình dạng và trọng lượng, vì vậy này thích hợp để so sánh hai tiểu phân 50S và 30S là thành phần của ribosome 70S.

Chương 2

Cấu trúc genome

Genome (hệ gen, bộ gen) là tập hợp các đơn vị các gen khác nhau như sau:

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Nguyên liệu di truyền của một tế bào : 1) nhiễm sắc thể trong tế bào vi khuẩn (hoạt động trong môi trường nhiễm sắc thể nhân moltiplicat, ví dụ : các nhiễm sắc thể lớn hoặc bé của *Vibrio cholerae*), 2) DNA hoặc RNA trong một virion, 3) nhiễm sắc thể cùng với một plasmid (ví dụ : nhiễm sắc thể và hai plasmid nhỏ trong vi khuẩn *Buchnera*).

- Tất cả các gen (khác nhau) trong tế bào hoặc virion.

- Bộ nhiễm sắc thể nhân hoặc genome nhân trong tế bào.

Chuỗi genome hoàn chỉnh (nghĩa là trình tự hoàn chỉnh của các nucleotide trong genome) đã được công bố cho một số loài vi khuẩn. Các trình tự khác cũng đã được công bố, ví dụ genome của cây cúc dại (*Arabidopsis thaliana*) và genome người.

Genome chứa toàn bộ thông tin di truyền và các chức năng trình tự cần thiết cho một sinh vật. Các sinh vật nhân thật (eukaryote), 99% genome nằm trong nhân tế bào và phần còn lại nằm trong một số quan trọng nhất và lập thể. Các genome vi khuẩn và phần genome chứa trong các quan trọng nhất có kích thước nhỏ và đáng kể vòng khép kín. Ngược lại, phần genome trong nhân thật rất lớn và phân bố trên các nhiễm sắc thể đáng kể.

Dự án genome là dự án xác định cấu trúc di truyền chính xác của một genome thực nghiệm, nghĩa là trình tự DNA của tất cả các gen của nó. Dự án genome của một số sinh vật mô hình (model organisms) đã hoàn thành như sau:

- Các genome vi khuẩn. Các trình tự hoàn chỉnh của genome *Escherichia coli* đã được xác định theo phương pháp cộng đồng (consortium) của các phòng thí nghiệm. Năm 1995, hai trình tự genome hoàn chỉnh của vi khuẩn *Haemophilus influenzae* và *Mycoplasma genitalium* cũng đã hoàn thành. Loài *M. genitalium* có một genome ngắn (khoảng 580.067 base), do nó dựa vào vật chủ và nhân đôi bằng máy trao đổi chất của mình. Loài *H. influenzae* là một vi khuẩn ký sinh nội bào, và có genome khoảng 1.830.121 base với 1.749 gen.

- Chuỗi genome hoàn chỉnh của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* đã hoàn chỉnh trong năm 1996, như một consortium của các phòng thí nghiệm. Genome của chúng dài 12.146.000 base.

- Các dự án genome động vật nhai nhai : chuột, con người, giun tròn (*Caenorhabditis elegans*), ruồi giấm (*Drosophila melanogaster*)..., hoặc thực vật nhai nhai : lúa nước, lúa mì, ngô, táo, cúc dại..., mà nổi bật nhất trong số đó là dự án genome người cũng đã được thực hiện.

Ngày 12. 2. 2001 genome người đã được công bố với khoảng 30.000 gen, ít hơn nhiều so với dự kiến trước đây (hàng trăm ngàn gen), và chỉ gấp hai lần giun tròn hoặc ruồi giấm. Người ta đã xác định được gen người gấp 98% so với tinh tinh và có đến 99% là giống nhau giữa các dân tộc, các cá thể. Do đó, vốn hình thành và phát triển nhân

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

cách, chức năng thông minh... phản chiếu trên các xã hội và sự rèn luyện cá nhân để phát triển tiềm năng sinh học cá nhân.

Trình tự genome của sinh vật mô hình rất có ý nghĩa trong những nghiên cứu chuyên ngành khoa học mà đó là genome học (genomics). Dựa vào đây, các nhà sinh học phân tử có thể phân tích cấu trúc, hoạt động và chức năng của các gen, làm sáng tỏ vai trò của DNA lặp lại, DNA không mã di truyền, DNA mã hóa các gen... Điều đáng chú ý là khi so sánh các genome với nhau, có thể hiểu được hoạt động của genome trong các cơ thể sống, mối quan hệ giữa chúng, sự đa dạng sinh học và mức tiến hóa.

Kết quả của so sánh genome giữa các loài sinh vật với nhau đã cho thấy có ba đặc điểm nổi bật: 1) các gen phân bố trong genome không theo qui luật, 2) kích thước của genome thay đổi không tương thu (tính quan) với tính phức tạp của loài, 3) sự lặp lại của các gen khác nhau ngay giữa các loài rất gần nhau.

I. Thành phần và chức năng của genome

Genome chứa mọi thông tin di truyền cần thiết cho từng loài, thậm chí cho từng cá thể trong loài. Genome có thể bao gồm các phân tử DNA hoặc RNA. Ở vi sinh vật bậc cao, kích thước genome thay đổi từ 10^9 bp (ở virus có vỏ) đến 10^{11} bp (thực vật). Khác với bào tử nhân (prokaryote), các gen trong genome của eukaryote thường tồn tại như những sao và thường bị gián đoạn bởi các đoạn mã không mang thông tin di truyền (các intron). Vì vậy, một trong những vấn đề quan tâm là chức năng phi mã của các gen khác nhau có mặt trong genome cũng như sự lặp lại của các gen hoạt động trong từng loại mô, từng giai đoạn phát triển và tất cả các gen so với kích thước genome...

1. Genome của các quần thể

Huấn luyện genome của các quần thể, những không phải luôn luôn, có dạng phân tử DNA mạch vòng của một chuỗi duy nhất.

Genome của các quần thể mã hóa cho một số, không phải tất cả, các protein cần tìm thấy trong các quần thể. Do có nhiều quần thể trong một tế bào, cho nên có nhiều genome của các quần thể trên một tế bào. Mặc dù bản thân genome của các quần thể là duy nhất. Nhưng nó có một số chuỗi lặp lại liên quan với nhau không lặp lại của nhân. Về nguyên tắc, các gen của các quần thể mã hóa và dịch mã bởi các quần thể.

1.1. Genome của ty thể

DNA ty thể (mitochondrial DNA-mtDNA) là một genome nhỏ, thường là mạch vòng, nằm trong ty thể.

- DNA ty thể của tế bào động vật mã hóa cần thiết cho 13 protein, 2 rRNA và 22 tRNA.

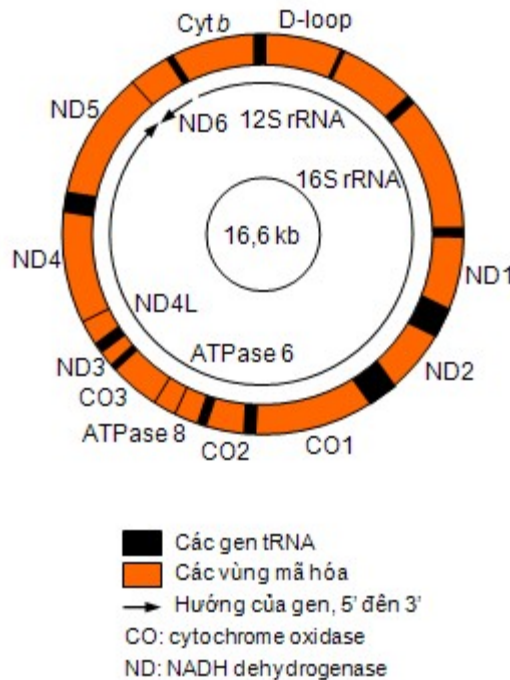
Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- DNA ty thể của nấm men *S. cerevisiae* dài hơn mtDNA của tế bào nguyên vẹn mà lớn do sự có mặt của các intron dài.

Các genome ty thể có kích thước rất khác nhau, các tế bào nguyên vẹn có kích thước genome nhỏ (khoảng 16,5 kb nguyên vẹn có vú) (Hình 2.1). Có khoảng một vài trăm ty thể trên một tế bào. Mitochondria có hình dạng như sao DNA. Số lượng ty thể của DNA ty thể so với DNA nhân là rất nhỏ (<1%).

Trong nấm men *S. cerevisiae*, genome ty thể có kích thước khá lớn (khoảng 80 kb) và khác nhau tùy thuộc vào chủng. Có khoảng 22 ty thể trên một tế bào, tổng khoảng 4 genome trên một quần thể. Mỗi tế bào sinh trưởng, một mtDNA có thể cao hơn (khoảng 18%).

Kích thước của genome ty thể các loài thực vật là rất khác nhau, từ dưới 100 kb. Kích thước lớn của genome đã gây khó khăn cho việc phân lập nguyên vẹn DNA, nhưng bản đồ hạn chế (restriction map) trong một vài loài thực vật đã cho thấy genome ty thể thường là một chuỗi liên tục, cắt ở những điểm nhất định. Trong một chuỗi vòng này có những chuỗi liên tục và sự tái tổ hợp giữa chúng đã sinh ra các phân tử genome (subgenome) nhỏ hơn, cùng tồn tại với genome “chủ” (master genome) hoàn chỉnh, đã gợi ý thích cho sự phức tạp của các DNA ty thể thực vật.



Hình 2.1. DNA ty thể của nấm men. Bao gồm 22 gen tRNA, 2 gen rRNA, và 13 vùng mã hóa protein.

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

B ng 2.1 tóm t t s phân công c a các gen trong m t s genome ty th . T ng s gen mã hóa protein là khá ít, và không t ng quan v i kích th c c a genome. Ty th ng v t có v ú s d ng các genome 16 kb c a chúng mã hóa cho 13 protein, trong khi ó ty th n m men *S. cerevisiae* dùng các genome t 60-80 kb mã hóa cho kho ng 8 protein. Th c v t v i genome ty th l n h n nhi u mã hóa cho nhi u protein h n. Các intron c tìm th y trong h u h t các genome c a ty th , nh ng l i không có trong các genome r t nh c a ng v t có v ú.

Hai rRNA chính luôn c mã hóa b i genome ty th . S l ng các tRNA c mã hóa b i genome ty th dao ng t không cho n y (25-26 trong ty th). Nhi u protein ribosome c mã hóa trong genome ty th c a th c v t và sinh v t nguyên sinh, nh ng ch có m t ít ho c không có trong genome c a n m và ng v t.

B ng 2.1. Các genome ty th có các gen mã hóa cho các protein, rRNA và tRNA

Ty thể mã hóa cho các RNA và protein			
Loài	Kích thước (kb)	Các gen mã hóa protein	Các gen mã hóa RNA
Nấm	19-100	8-14	10-28
Sinh vật nguyên sinh	6-100	3-62	2-29
Thực vật	186-366	27-34	21-30
Động vật	16-17	13	4-24

1.2. Genome c a l p th

DNA l p th (chloroplast DNA-ctDNA) c ng là m t DNA genome c l p, th ng là m ch vòng, c tìm th y trong l p th c a th c v t.

- Genome c a l p th r t khác nhau v i kích th c, nh ng l n mã hóa cho kho ng 50-100 protein c ng nh rRNA và tRNA.

- DNA l p th dài t 120-190 kb. Các genome c a l p th ã c phân tích trình t cho th y có kho ng 87-183 gen. B ng 2.2 mô t các ch c n ng c mã hóa b i genome l p th cây tr ng.

B ng 2.2. Genome c a l p th các cây tr ng mã hóa cho 4 rRNA, 30 tRNA và kho ng 60 protein

Các loại thể có hơn 100 gen
Các gen
- Mã hóa RNA
16S rRNA
23S rRNA
4,5S rRNA
5S rRNA
tRNA
- Biểu hiện gen
Các r-protein
RNA polymerase
Khác
- Các chức năng của loại thể
Rubisco và thylakoids
NADH dehydrogenase

Nói chung, các thành phần của genome loại thể thực vật ty thể, ngoại trừ loại thể mang nhiều gen hơn. Genome loại thể mã hóa cho tất cả các loại rRNA và tRNA cần thiết trong tổng hợp protein, và cho khoảng 50 protein, bao gồm các RNA polymerase và các protein ribosome.

Các intron trong loại thể thực vật chia thành hai nhóm: 1) những intron trên các gen tRNA thực vật (mặc dù không chắc chắn) nằm chủ yếu trong vòng anticodon, giống như các intron thực vật tìm thấy trong các gen tRNA của nấm men *S. cerevisiae*; 2) những intron trong các gen mã hóa protein thực vật vì các intron của các gen thực vật.

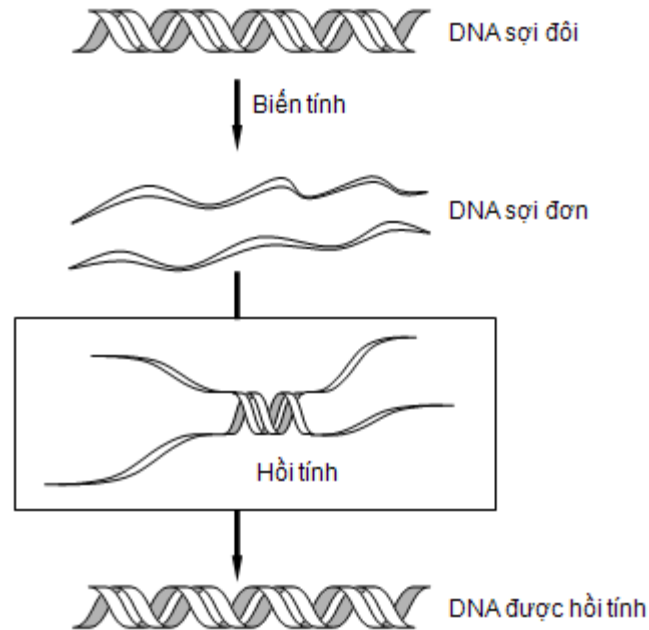
Vai trò của loại thể là thực hiện quá trình quang hợp. Do đó, nhiều gen của nó mã hóa cho các protein của các phức hợp nằm trong các màng thylakoid. Một vài phức hợp protein của loại thể giống các phức hợp protein của thực vật: có một số tiểu đơn vị được mã hóa bởi genome của các quan t và một số khác được mã hóa bởi genome của nhân. Những phức hợp còn lại được mã hóa hoàn toàn bởi genome loại thể.

2. Nghiên cứu về sự tái liên kết DNA

Benichou và cộng sự đã nghiên cứu về sự tái liên kết của các phân tử DNA (DNA reassociation kinetics) bằng phương pháp biến tính. Sự tái liên kết giữa các chuỗi DNA bổ sung xảy ra như một quá trình biến tính (denaturation) mà ngược lại chúng sẽ tách rời (Hình 2.2) thực hiện sự tái biến tính hoặc phiên mã. Nghiên cứu

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

hệ các phân tử liên kết phân mảnh khác nhau của các chuỗi hiện diện, vì thế phân tử này có thể dùng như là các gen và các sản phẩm RNA của chúng.



Hình 2.2. DNA có thể biến tính và hồi tính

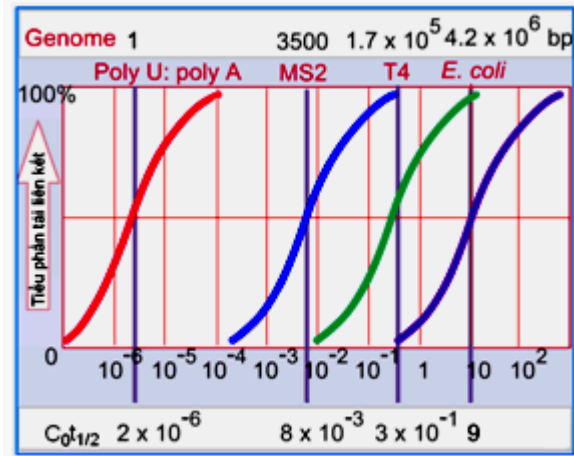
Bảng 2.3 mô tả phân tử liên kết. Sự hồi tính của DNA (renaturation) phụ thuộc vào số và hàm lượng của các chuỗi bổ sung. Phân tử của các DNA riêng biệt có thể mô tả bằng các điều kiện thí nghiệm cho sự hoàn thành một nửa (half-completion). Đây là tích số của $C_0 \times t_{1/2}$ và hằng số là $C_0 t_{1/2}$. Giá trị này thường chỉ phụ thuộc vào bản chất của phân tử và thời gian yêu cầu cho một nửa hoàn thành, nên một giá trị $C_0 t_{1/2}$ là một đặc trưng của phân tử.

Bảng 2.3. Một phân tử liên kết của DNA được mô tả bởi $C_0 t_{1/2}$

Phản ứng lai phụ thuộc vào C_0t
<i>Tốc độ phản ứng</i>
Phản ứng theo phương trình bậc hai
$\frac{dC}{dt} = -kC^2$
C là nồng độ của DNA sợi đơn ở thời điểm t . K là hằng số tốc độ tái liên kết.
<i>Tiến độ phản ứng</i>
Lấy tích phân phương trình tốc độ giữa các giới hạn: nồng độ ban đầu của DNA = C_0 ở thời điểm $t = 0$; nồng độ duy trì sợi đơn = C sau thời gian t
$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{1+k.C_0t}$
<i>Thông số tới hạn là $C_0t_{1/2}$</i>
Khi phản ứng hoàn thành một nửa ở thời điểm $t = \frac{1}{2}$
$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{2} = \frac{1}{1+k.C_0t_{1/2}}$
Vì thế $C_0t_{1/2} = C_0t_{1/2} = \frac{1}{k}$

Số hiệu tính của DNA thường có dạng C_0t , trong đó C_0 là nồng độ ban đầu của DNA và t là thời gian. Hình 2.3 trình bày đồ thị của C_0t của một số genome điển hình. Các genome có độ phức tạp khác nhau, nhưng giá trị $C_0t_{1/2}$ của mỗi genome là khác nhau.

Các genome trong hình 2.3 là điển hình cho các nucleic acid khác nhau (PolyU:PolyA, thực khuẩn thể MS2, thực khuẩn thể T4 và vi khuẩn *E. coli*). $C_0t_{1/2}$ liên quan trực tiếp với lượng DNA trong genome. Vì vậy, nếu biết được $C_0t_{1/2}$ của một genome, thì sẽ có thêm một số bản sao của nó trong một lượng DNA có sẵn. Ví dụ: nếu C_0 của DNA là 12 pg, thì nó sẽ chứa khoảng 3.000 bản sao của nó trong genome vi khuẩn.



Hình 2.3. $C_{0t_{1/2}}$ phụ thuộc vào phức tạp của genome. PolyU:PolyA, thực khuẩn thể MS2, thực khuẩn thể T4 và vi khuẩn *E. coli*.

3. Kích thước của genome

Không phải tất cả các phân tử DNA trong genome đều mang thông tin mã hóa cho protein hoặc các sản phẩm chức năng khác (như rRNA, tRNA, các yếu tố di truyền...). Trước năm 1970, bằng các thí nghiệm gây bão hòa đột biến ngẫu nhiên đã có thể xác định số gen nằm trên một nhiễm sắc thể. Ngày nay, nhờ các kỹ thuật phân tích DNA và RNA hiện đại (Southern blot, Northern blot, microarray...) các nhà khoa học có thể xác định số gen hoạt động trong một tế bào. Ví dụ: tế bào nấm men *S. cerevisiae* (sinh vật eukaryote bậc thấp) có khoảng 4.000 gen hoạt động, còn tế bào động vật có vú có khoảng 10.000-15.000 gen. Như vậy, nếu dài trung bình của một gen khoảng 10 kb thì tổng số chỉ số dài các gen hoạt động trong một tế bào chỉ chiếm 1-2% genome. Hay nói cách khác, chỉ một phần rất nhỏ genome mang thông tin di truyền cần thiết cho hoạt động sống của tế bào. Vậy phần genome còn lại có vai trò gì, và tính phức tạp của loài có liên quan gì với kích thước genome hay không?

Để làm sáng tỏ vấn đề trên, chúng ta cần xem xét kích thước genome của một số loài gần nhau trong bậc thang tiến hóa (có phức tạp loài tương đương nhau) cũng như genome của những loài xa nhau (có tính phức tạp khác nhau). Chúng ta có:

- Genome của người có kích thước khoảng $3,3 \times 10^9$ bp, trong khi ở genome của nhện loài lớn nhất có chiều dài khoảng $3,1 \times 10^9$ bp hoặc thậm chí lên đến 10^{11} bp. Như vậy, có phải là các loài lớn nhất có tính phức tạp tương đương chúng ta?

- Hay là ngay trong cùng một loài, chúng ta có nên nhận thấy có sự mâu thuẫn về kích thước genome? Ví dụ: ruồi nhà (*Musca domestica*) có genome khoảng $8,6 \times 10^8$ bp, lớn gấp sáu lần kích thước genome của ruồi giấm khoảng $1,4 \times 10^8$ bp. Ngoài ra, trong các loài lớn nhất kích thước genome của chúng cũng thay đổi khá lớn từ 10^9 - 10^{11} bp. Vì sao ngay trong cùng một loài mà kích thước genome lại biến thiên như vậy, có phải ruồi nhà có cấu trúc phức tạp hơn nhiều so với ruồi giấm?

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Tính năng dữ liệu trên, chúng ta có thể nhận thấy rằng tính phức tạp của loài không liên quan đến kích thước của genome. Tuy nhiên, vai trò của phần genome còn lại (phần không mã hóa) ngày nay vẫn chưa được biết nhiều.

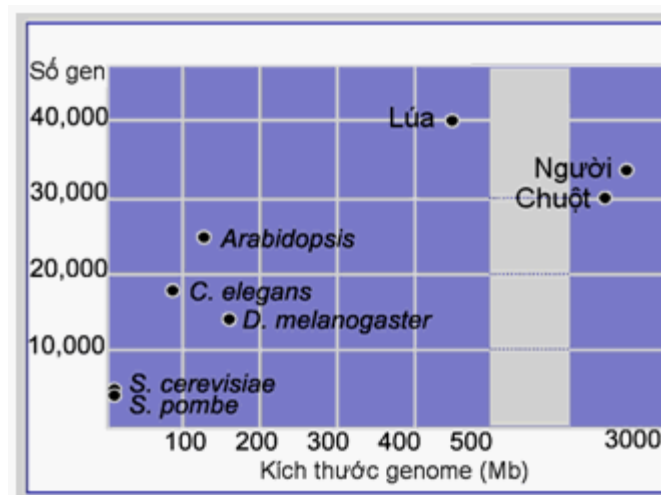
4. Tổng số gen và tỉ lệ mã hóa ở loài eukaryote

Có 6.000 gen ở nấm men *S. cerevisiae*, 18.500 gen ở giun tròn, 13.600 gen ở ruồi giấm, 25.000 gen ở *Arabidopsis*, và có khoảng 30.000 gen ở chuột và < 30.000 gen ở người.

Như chúng ta đã biết, mối quan hệ giữa kích thước genome và số lượng gen đã không còn nữa. Genome của các sinh vật eukaryote thường có cùng phạm vi kích thước với genome của vi khuẩn lớn nhất. Các eukaryote bậc cao có nhiều gen hơn, nhưng số lượng không tương quan với kích thước genome.

Hình 2.4 cho thấy genome của loài nấm men *S. cerevisiae* dài 13.500 kb và loài nấm men *S. pombe* là 12.500 kb, có khoảng 6.000 gen và 5.000 gen tương ứng. Khung trung bình khoảng 1,4 kb, vì thế khoảng 70% genome được chi phối bởi các vùng mã hóa. Sự khác nhau chủ yếu giữa chúng là chỉ 5% gen của *S. cerevisiae* có intron, so với 43% của *S. pombe*.

Genome của giun tròn có khoảng 18.500 gen. Mặc dù genome của ruồi giấm lớn hơn genome của giun tròn, nhưng chúng lại có số gen ít hơn. Ngày nay, chúng ta chưa hiểu tại sao ruồi giấm-một thành phần nhỏ của nhện-chó có 70% số gen so với giun tròn. Điều này đã cho thấy không có mối quan hệ chính xác giữa số gen và tính phức tạp của cơ quan.



Hình 2.4. Số lượng gen của sinh vật eukaryote rất khác nhau. Thay vì 6.000-40.000, chúng ta không thể thấy mối quan hệ giữa kích thước genome và độ phức tạp của cơ thể.

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Cây *Arabidopsis* có kích th c genome trung gian gi a giun tròn và ru i gi m, nh ng l i có s gen l n h n c hai (25.000). i u này m t l n n a cho th y không có m t quan h rõ ràng, và c ng nh n m nh nét c bi t c a th c v t, là có th có nhi u gen h n (do s nhân ôi c a ông bà t tiên truy n l i) các t bào ng v t. a s genome *Arabidopsis* c tìm th y trong các o n c nhân ôi, g i ý r ng có m t s nhân ôi xa x a trong genome (t o ra m t đ ng t b i). Ch 35% các gen c a *Arabidopsis* hi n đ i n nh các b n sao n.

Genome c a lúa l n h n *Arabidopsis* kho ng 4 l n, nh ng s gen ch l n h n kho ng 50%, có kh n ng kho ng 40.000 gen. DNA l p l i chi m kho ng 42-45% genome. H n 80% gen tìm th y trong *Arabidopsis* c hi n đ i n trong lúa. Trong s nh ng gen chung này, kho ng 8.000 có trong *Arabidopsis* và lúa nh ng không th y b t k genome ng v t ho c vi khu n nào (nh ng gen ã c phân tích trình t). Có kh n ng ây là t p h p các gen mã hóa cho các ch c n ng c tr ng c a th c v t, ch ng h n nh quang h p.

II. Tính ph c t p c a genome

K t qu nghiên c u ng h c c a các ph n ng lai c ti n hành gi a genomic DNA v i cDNA (complementary DNA-DNA b sung), gi a DNA v i mRNA... cho th y h u h t các gen ho t ng u n m trong thành ph n DNA không l p l i. Nh v y, thành ph n này có ý ngh a r t quan tr ng trong vi c ánh giá tính ph c t p c a genome. Hay nói cách khác, d a vào thành ph n DNA không l p l i có th bi t c kích th c genome c ng nh m c ti n hóa c a loài. N u nh kích th c genome (tr ng thái n b i) c coi là m t thông s ng h c (ký hi u C), thì giá tr này c tr ng cho t ng loài và không ph i luôn luôn t l thu n v i tính ph c t p c a loài. Ng c l i, giá tr C ph n ánh các c i m sau:

- S l ng DNA mã hóa cho các s n ph m c n thi t i v i ho t ng s ng c a c th r t nh so v i s l ng DNA có trong genome.

- Có s bi n i r t l n c a giá tr C gi a m t s loài mà tính ph c t p c a chúng không khác nhau nhi u.

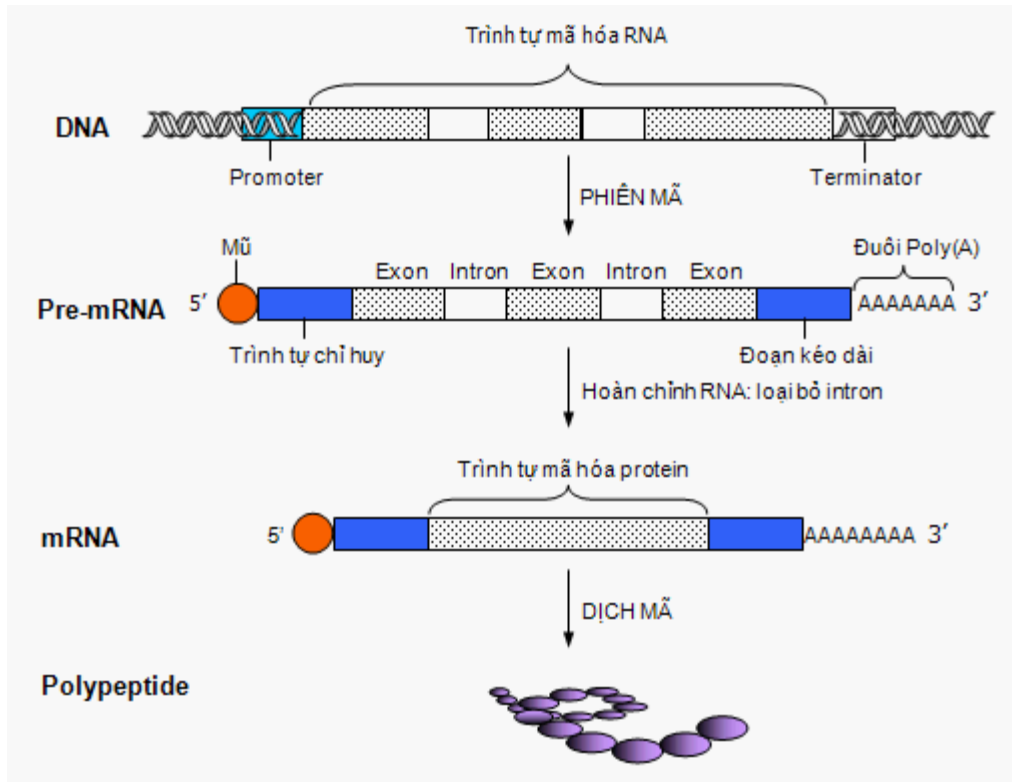
Genome vi khu n c xem là ch ch a các o n DNA không l p l i và các gen th ng t n t i b n sao n. Ng c l i, genome c a eukaryote th ng ch a các gen có hai ho c nhi u b n sao. H n n a, trình t nucleotide c a các b n sao này có th không gi ng nhau hoàn toàn m c dù s n ph m protein mà chúng mã hóa có cùng m t ch c n ng. Các b n sao t ng ng c a m t gen c x p chung vào m t nhóm g i là m t h gen (gene family). Nh v y, ngoài các gen có m t b n sao gi ng nh vi khu n, genome c a eukaryote còn ch a các h gen. H u h t các gen mã hóa cho protein ã c phân l p u n m trong các h gen khác nhau. Các gen trong m t h th ng ho t ng theo th i gian và không gian. i u ó có ngh a, m i thành viên trong h th ng ho t ng m t th i i m nh t nh trong quá trình hình thành và phát tri n cá th ho c ho t ng trong

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

các mô chuyên biệt. Khi một thành viên trong họ bắt đầu (bắt đầu) thì thành viên khác có thể bắt đầu thay thế.

Khái niệm về gen được hình thành khi các nhà di truyền học tiến hành nghiên cứu về những tính trạng mà do gây đột biến DNA của genome vi khuẩn hay thực khuẩn (bacteriophage). Một gen được xem là một đoạn DNA mà bắt đầu từ một vị trí nào đó trên ổ đĩa để xuất hiện tính trạng mà. Vì vậy điều này dường như giống genome của các gen có mặt trên sao (như genome của prokaryote). Tuy nhiên, genome của eukaryote, khi có nhiều gen cùng quy định một tính trạng hoặc các gen tương tác với nhau thì đột biến trên một gen không phải lúc nào cũng quan sát được ở kiểu hình. Mặt khác, các đoạn DNA tương ứng với trình tự mã hóa (coding sequence, exon) cho một protein thường nằm rải rác giữa các đoạn DNA không chứa thông tin di truyền (non-coding sequence, intervening sequence, intron). Các intron được phiên mã cùng với các exon sang phân tử RNA sơ cấp là phân tử tiền thân mRNA (pre-mature mRNA hay pre-mRNA) nhưng sau đó chúng bị loại bỏ và các exon nối lại với nhau để thành phân tử mRNA hoàn chỉnh (mature mRNA hay mRNA) được dùng cho quá trình sinh tổng hợp protein. Quá trình cắt các intron, nối exon không tuân theo một trật tự bất biến mà biến đổi để tạo ra các phân tử mRNA khác nhau từ một phân tử pre-mRNA (Hình 2.5). Bên cạnh mRNA, các phân tử rRNA và tRNA cũng được hình thành từ các phân tử tiền thân chứa intron. Ngoài ra, còn có hiện tượng mã di truyền của gen này nằm xen kẽ với các mã di truyền của gen khác (các gen nằm chồng lên nhau-overlapping) hoặc trình tự dịch chuyển khung ngay trên một đoạn DNA.

Chúng ta đã biết rằng chức năng của các phân tử RNA trong họ tương tự nhau. Bên cạnh ba loại RNA đã nghiên cứu khác (mRNA, rRNA và tRNA), vai trò của một số loại RNA khác mà được phát hiện vào những năm cuối thế kỷ 20. Chúng kiểm soát sự hoạt động của gen (hiện tượng tắt gen-gene silencing), tham gia phần nào của thông tin di truyền trên phân tử mRNA (hiện tượng RNA editing) hay quy định tính bền vững của mRNA (các ribonuclease)... Thậm chí có những phân tử pre-mRNA được tổng hợp không phải mã hóa cho protein mà vì mục đích phân cắt để tạo ra những phân tử RNA có kích thước nhỏ hơn tham gia quá trình kiểm soát hoạt động của các gen khác. Đột biến những đoạn DNA mã hóa cho tất cả các loại RNA này thường gây nên những biến đổi về tính trạng mà. Do đó, cần xem xét các đoạn nucleotide ở những các gen mà dù chúng không mã hóa cho protein.



Hình 2.5. Các gen b gián o n c bi u hi n thông qua RNA ti n thân. Các intron c lo i b , trong khi ó các exon c n i l i v i nhau. mRNA ch có các trình t c a exon c d ch mã thành chu i polypeptide.

Ngày nay, theo quan i m c a sinh h c phân t , m t gen c xem là m t o n DNA mã hóa cho m t s n ph m c n thi t i v i ho t ng s ng c a t bào. Rõ ràng r ng không ph i ch có DNA mã hóa cho protein mà c các DNA mã hóa cho rRNA, tRNA và các lo i RNA khác tham gia vào nh ng ph ng th c ki m soát ho t ng c a genome c ng c xác nh là gen.

III. Thay i tr t t c a các o n DNA trong genome-Transposon

1. S thay i tr t t c a các o n DNA trong genome

Nh ã bi t kích th c và c u trúc genome c a các loài r t khác nhau. Nguyên nhân c a s ã d ng này là do: 1) trao i chéo gi a các c p nhi m s c th t ng ng x y ra trong phân bào gi m nhi m ã d n n s ã d ng trong loài; 2) trong genome tr t t các o n DNA c ng nh c u trúc các gen c s p x p l i, c tr ng cho t ng cá th . Chính các y u t di truy n có kh n ng di chuy n gi a các v trí trong m t genome ho c gi a các genome khác nhau ã góp ph n làm ã d ng di truy n gi a các cá th trong loài.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Các yếu tố di truyền có khả năng di chuyển được xếp vào ba nhóm chính tùy thuộc vào tính di động của chúng:

- Nhóm thứ nhất gồm các yếu tố có khả năng di chuyển giữa các vị trí khác nhau trong genome.

- Nhóm thứ hai gồm các yếu tố có khả năng ghép vào và tách ra khỏi genome tạm thời di động trong tế bào (các episome như plasmid F, bacteriophage).

- Nhóm thứ ba chỉ di chuyển dưới sự kiểm soát của tế bào như giai đoạn sinh trưởng phát triển nhất như sự xâm nhập khi nhiễm gen cassette (hình thành cassette hoist trong men *S. cerevisiae*, ký sinh trùng nhân bào *Trypanosome*).

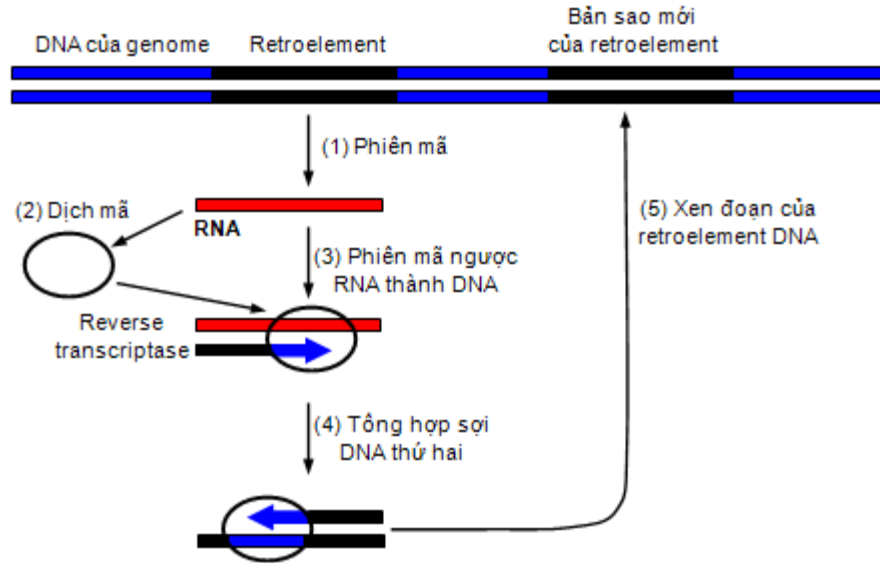
Sự di chuyển của các yếu tố nhóm thứ hai và thứ ba liên quan tới tái tổ hợp ngang hoặc tái tổ hợp các vị trí cụ thể. Mặc dù không có khả năng tạm thời di động bên ngoài genome, nhóm thứ nhất kiểm soát sự di chuyển của chúng trong genome và không đòi hỏi sự tiếp xúc giữa chúng với vị trí ghép vào. Do đó, có thể nói chúng di chuyển một cách tự do trong genome và được gọi tên chung là các yếu tố di chuyển (transposable elements, transposons). Trong khi thì khuynh hướng của chúng xem là episome, thì khuynh hướng của *Mu* và một số retrovirus eukaryote được xem là transposable elements.

2. Các transposon

Các yếu tố di chuyển có thể được chia làm hai loại dựa vào cách thức di chuyển của chúng:

- Loại thứ nhất được gọi là retroelement, chúng phi truyền qua hình thức trung gian RNA trong quá trình di chuyển (RNA genome được sao chép nhờ reverse transcriptase tạo ra cDNA được ghép vào vị trí mới) (Hình 2.6).

- Loại thứ hai là các đơn DNA hoặc bị tách ra hoặc tái bản rồi thêm bản sao ghép vào vị trí mới. Thông thường, loại thứ hai này được gọi là transposon.



Hình 2.6. Retroelement

S t n t i c a các transposon (còn g i là gen nh y) là nét c tr ng c a t bào th c v t. sinh v t eukaryote, các transposon còn c g i là y u t ki m soát (controlling elements). Transposon có th di chuy n t nhi m s c th này sang nhi m s c th khác ho c các v trí khác nhau trên cùng m t nhi m s c th . Chúng có th “nh y” vào gi a dẫy mã c a m t gen ang ho t ng làm cho gen này b t ho t ho c ng c l i. cây ngô, ng i ta ã phát hi n 10 nhóm transposon và m t s trong chúng ã c gi i mã. T t c chúng u có kích th c kho ng 4.200 nucleotide và khác nhau ch y u o n mã t n cùng c a gen.

Khi di chuy n, các transposon gây ra vi c s p x p và t ch c l i genome c a t ng cá th nh t o các o n DNA m i v trí chúng ghép vào và tách ra. Chúng có th di chuy n t i v trí b t k và hoàn toàn không c n m t m i quan h nào gi a hai v trí m i và c . Khi tách ra transposon có th mang theo các o n DNA bên c nh, gây ra s m t o n t i v trí c . Ng c l i, khi ghép vào v trí m i, chúng gây ra hi n t ng thêm o n ho c chuy n o n v trí m i. Do ó, transposon gi ng nh các vector chuyên ch DNA t n i này sang n i khác trong m t genome ho c t genome này sang genome khác.

Ngoài ra, trao i chéo gi a các transposon t ng ng hai v trí khác nhau trên m t ho c trên hai nhi m s c th c ng t o ra nh ng bi n i t ng t . Nh ng bi n i ó d n n vi c s p x p l i genome, t o ra tính a d ng gi a chúng và tính c thù riêng c a t ng cá th . c b i t, s thay i v trí c a các transposon còn có th nh h ng n ho t ng c a các gen phân b xung quanh ngay khi chúng không làm thay i tr t t nucleotide nh ng gen này. T n s ghép c a các transposon vào genome kho ng 10^{-5} - 10^{-7} sau m i th h . Ng c l i, t n s tách ra kho ng 10^{-6} n 10^{-10} .

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Các transposon có thể chia làm hai nhóm dựa vào khả năng di chuyển: cắt bỏ hay phiên bản thu nhập vào sự có mặt của transposon khác:

- Nhóm thứ nhất gồm các đơn DNA có khả năng di chuyển cắt bỏ. Chúng chuyển mã hóa cho các protein liên quan khi cần quá trình đó, ví dụ như enzyme nhận biết hai đầu transposon tách chúng ra khỏi vị trí cũ và ghép vào vị trí mới. Do đó, quá trình này có thể diễn ra hoàn toàn cắt bỏ. Nhờ khả năng này, chúng tạo ra các đột biến không bền vững.

- Nhóm thứ hai gồm các transposon không có khả năng tự hoạt động, tức là chúng không có khả năng di chuyển do không mang thông tin di truyền mã hóa cho các enzyme cần thiết. Vì vậy, các transposon loại này tạo ra những đột biến gen một cách tự phát nhưng là đột biến bền vững. Việc di chuyển của transposon nhóm này phụ thuộc vào sự có mặt của transposon có khả năng hoạt động cắt bỏ cùng nhóm. Hai transposon có thể xếp vào cùng nhóm khi chúng có cấu trúc tương đồng nhau, tức biệt là các đơn oligonucleotide phân bố hai đầu transposon. Đây là vị trí enzyme nhận biết và cắt bỏ của transposon vị trí cũ và mới.

Các transposon ngắn nhất vì khu vực gọi là IS (insertion sequences). Chúng có thể nằm trên chromosome hoặc trên các plasmid. Transposon vi khuẩn không giống một thực thể nào trong tế bào. Trình tự nucleotide một đầu IS thường lặp lại ngược nhau để chiụ sự đảo ngược (inverted repeat). Ví dụ như GGTAT-X_n-ATACC. Do đó, khi sự đảo ngược IS tách thành hai sợi thì mỗi sợi này có khả năng hình thành liên kết bổ sung giữa hai đầu của IS tạo cấu trúc thân-quai/cán-thòng lọng (stem-loop).

Transposon thường mã hóa cho các enzyme transposase làm nhiệm vụ nhận biết trình tự nucleotide lặp lại ngược nhau (inverted repeat) của transposon và di chuyển. Khi một đầu IS được ghép vào vị trí bất kỳ của genome thì một đơn vị của DNA tại vị trí này sẽ nhân đôi, tức là hai đầu của IS sẽ gắn liền các nucleotide ngược nhau, sắp xếp theo cùng một chiều. Vì vậy, đơn vị của DNA này được gọi là "lặp lại xuôi chiều" (direct repeat). Chiều dài của chúng thường khoảng 9 bp (Hình 2.7). Dựa vào sự có mặt của các đơn cùng chiều và ngược chiều có thể xác định vị trí transposon ghép vào hoặc chuyển đi.

Ngoài các IS, vi khuẩn còn có các đơn DNA có khả năng di chuyển với kích thước dài hơn, gọi là T_n. Các T_n thường phân bố trên plasmid (phân tử DNA dạng vòng, kích thước thường không lớn) và có khả năng chèn vào bất kỳ vị trí nào trong genome. Chúng thường mang thông tin di truyền mã hóa cho các protein kháng kháng sinh. Giữa IS và T_n có mối quan hệ về trình tự các nucleotide. Các T_n thường có hai đầu bổ sung cho IS nào đó.

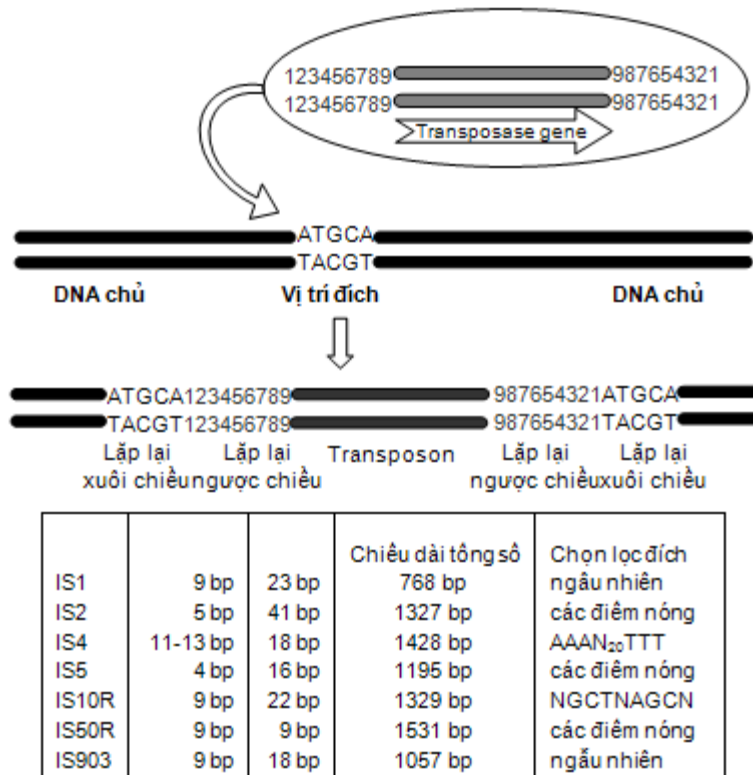
Quá trình di chuyển của một transposon từ vị trí cũ (vị trí cho, donor) sang vị trí mới (vị trí nhận, recipient) xảy ra theo hai cách khác nhau:

- **Cắt sao chép (transposon có mặt ở hai vị trí).** Theo cách này, phiên bản sau khi cắt sao chép từ vị trí cho sẽ được ghép vào vị trí nhận. Như vậy, một

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

lên di chuyển thì sẽ lên bản sao cắt lên. Quá trình này liên quan đến hai loại enzyme: transposase (tác động vào hai đầu bản gốc transposon) và resolvase (tác động lên bản sao).

- **Cách tách ra khỏi vị trí cũ di chuyển đến vị trí mới.** Theo cách này, một transposon có thể tách ra khỏi vị trí cũ và ghép vào vị trí mới. Như vậy, sẽ lên transposon không thay đổi. Khi di chuyển này chỉ cần enzyme transposase. Khi transposon chuyển đi, vị trí cũ gãy và nó sẽ có hình thức sacha DNA trong tế bào.



Hình 2.7. Một transposon có một cặp lặp ngược chiều chỉ có 9 nucleotide (123456789) gắn vào vị trí có 5 nucleotide (ATGCA). Một đoạn ATGCA có một cặp hai đầu của IS và có trình tự nucleotide sắp xếp theo cùng một chiều.

Khi transposon ghép vào vị trí mới, một đoạn nucleotide ngắn sẽ sao thành hai bản, mỗi bản nằm một đầu của transposon (direct repeat). Tại vị trí này, mỗi bản DNA bắt chéo nhau vài nucleotide. Transposon nối vào các đầu, tạo ra hai khoảng trống (gaps). Chúng sẽ sacha theo nguyên tắc bổ sung. Do đó, một nucleotide nằm giữa hai vị trí cũ sao chép thành hai bản, mỗi bản một đầu và trình tự sắp xếp các nucleotide giống nhau. Vì vậy, chúng sẽ là lặp xuôi chiều.

IV. Tác động của T-DNA và genome thực vật

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Sự di chuyển DNA từ genome vi khuẩn sang genome thực vật được nghiên cứu khá kỹ lưỡng về tác giả *Agrobacterium tumefaciens* hoặc *A. rhizogenes* và hiểu về các cây hai lá mầm. Hiện tượng di chuyển DNA này gây nên bệnh rễ vẩy trắng di truyền, bệnh rễ vẩy trắng vì sự xuất hiện các khối u trên thân cây (*A. tumefaciens*) hoặc mô sẹo thực vật (*A. rhizogenes*) trên nhiều loài thực vật.

A. tumefaciens và *A. rhizogenes* là hai loài vi khuẩn gây bệnh thực vật. Tuy nhiên, sau đó bệnh được duy trì là không phụ thuộc sự tồn tại của vi khuẩn. Đó là do một số gen của vi khuẩn đã di chuyển vào genome cây chủ và hoạt động gây bệnh.

Các gen vi khuẩn có khả năng di chuyển và hoạt động trong tế bào thực vật nằm trên Ti-plasmid (tumor inducing plasmid) của *A. tumefaciens* hoặc trên Ri-plasmid (hairy-root inducing plasmid) của *A. rhizogenes*. Cũng như các khối u thực vật, các tế bào thực vật có DNA vi khuẩn ghép vào genome bằng chuyển sang trạng thái mới, đó là sự phát triển và biệt hóa của chúng hoàn toàn khác với các tế bào bình thường. Đó là do hoạt động của các gen vi khuẩn trong genome của thực vật. Bình thường, những gen này có mặt trong genome vi khuẩn nhưng chúng chỉ hoạt động (m) sau khi hợp nhất vào genome thực vật và chúng kiểm soát các tế bào cây chủ. Quá trình này có tính chọn lọc cao vì vậy, thực vật là một loài vi khuẩn chỉ có khả năng gây khối u trên một số loài cây chủ này mà không tác động lên các loài cây khác.

Việc tìm hiểu hay thậm chí quá trình chuyển gen từ vi khuẩn sang genome thực vật đã dẫn đến những hiểu biết về trạng thái sinh lý của tế bào thực vật đòi hỏi các điều kiện sau:

- Phải có hoạt động của các gen trên ba vùng *chvA*, *chvB*, *pscA* nằm trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn khi tiếp xúc với các mô thực vật.

- Ti-plasmid hoặc Ri-plasmid phải mang vùng *vir* (nằm ngoài vùng T-DNA). Vùng này mang các gen cần thiết cho việc tách và vận chuyển T-DNA sang tế bào thực vật.

- Các gen trên vùng T-DNA của Ti-plasmid hoặc Ri-plasmid được ghép vào genome thực vật gây nên những trạng thái các tế bào này.

1. Ti-plasmid và Ri-plasmid

Plasmid là các vòng DNA tự sinh sản độc lập bên ngoài nhân. Vi khuẩn và thực vật, plasmid liên quan tới sự tồn tại tính của tế bào, nên khả năng chọn lọc các loài kháng sinh... Vì vậy, quản lý các plasmid là chúng có thể liên kết vào nhiễm sắc thể như các gen có thể tồn tại bên ngoài nhiễm sắc thể một cách độc lập.

Các plasmid của *Agrobacterium* mang các vùng T-DNA, *vir* (virulence region), gen chuyển hóa opine, và vùng *ori* khởi đầu sao chép trong tế bào thực vật.

Sự khác nhau giữa Ti-plasmid và Ri-plasmid chính là, vùng T-DNA của Ti-plasmid chứa các gen tổng hợp auxin, cytokinin và opine. Trong khi đó, vùng T-DNA của Ri-plasmid chỉ mang gen tổng hợp auxin và opine. Đây là điểm khác nhau gây ra hiện tượng

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

tác động khác nhau lên thực vật. Chức năng của các *Agrobacterium* là sau khi xâm nhiễm vào tế bào, chúng gắn vào T-DNA vào bộ máy di truyền của tế bào thực vật, làm rời khỏi các chất sinh trưởng nội sinh, tạo ra auxin (trung hợp *A. tumefaciens*) hoặc cytokinin (trung hợp *A. rhizogenes*). Khi chuyển các gen này về thực vật, chúng khai thác chuyển gen ngoại lai vào bộ máy di truyền của tế bào thực vật theo ý muốn.

2. T-DNA

Vùng T-DNA được nghiên cứu rất kỹ. Đó là một đoạn DNA có kích thước 25 kb trong đó chứa các gen mã hóa cho sinh trưởng auxin, cytokinin và opine (trung hợp Ti-plasmid) hoặc auxin và opine (trung hợp Ri-plasmid). Trong plasmid, vị trí của T-DNA được giới hạn bởi biên phải (right border-RB) và biên trái (left border-LB), mỗi biên có chiều dài 25 bp.

3. Vùng vir

Trong các vùng DNA của Ti-plasmid và Ri-plasmid, ngoài T-DNA, được nghiên cứu nhiều hơn là vùng DNA phụ trách khi lây nhiễm còn gọi là vùng *vir* (virulence). Sản phẩm hoạt động của các gen nằm trong vùng *vir* điều khiển các kích thích của các hợp chất phenol từ thực vật thành một loạt các protein đặc biệt như *virA*, *virE2*, *virB*, *virD*, *virD2*, *virC1*... Các protein này nhận biết các thực vật thành các cây chủ thích hợp (hầu hết là cây hai lá mầm), kích thích sản sinh ra các đoạn T-DNA, bao bọc các đoạn DNA này và giúp chúng tiếp cận với genome của cây chủ một cách an toàn.

4. Quá trình chuyển T-DNA vào tế bào thực vật

Quá trình chuyển T-DNA ra khỏi plasmid và vận chuyển nó vào tế bào thực vật thực hiện phụ thuộc vào sản phẩm của các gen *vir*. Ví dụ, khi xâm nhiễm từ vết cắt trên thân thực vật nào đó trên thân cây. Cây có vết thương do sự hư hại tự nhiên của màng tế bào thực vật hoặc do vết thương từ các hợp chất mã hóa bởi các gen *vir*. Hoạt động của các gen này được hoạt hóa bởi các hợp chất phenolic của cây (ví dụ như acetosyringone, catechol, các dẫn xuất của chalcone...). Ngoài ra, các monosaccharide như glucose, arabinose có mặt trong môi trường cũng làm tăng khả năng gây nhiễm nhóm gen *vir*.

Protein VirA đóng vai trò quan trọng vì quy định loại cây chủ bị nhiễm bởi *Agrobacterium*. Trong thực tế, *Agrobacterium* không có khả năng xâm nhập vào cây một lá mầm, có thể protein VirA không nhận biết các tín hiệu do cây một lá mầm tiết ra. Nói chung, *Agrobacterium* chủ yếu lây nhiễm cho cây hai lá mầm, vì vậy người ta cho rằng chúng chỉ có thể đưa T-DNA vào hệ gen của cây hai lá mầm. Tuy nhiên, gần đây nhiều tác giả chứng minh khi nhiễm vi khuẩn, các cây một lá mầm cũng có thể sản xuất opine và vì thế có thể khai thác khả năng bị nhân bản gen của *Agrobacterium* vào cây một lá mầm. Hiện nay, người ta cũng đã thành công trong việc chuyển gen vào mô sẹo cây một lá mầm như lúa, mía... qua trung gian *A. tumefaciens*.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Khi cây nhiễm *A. tumefaciens*, do T-DNA hợp nhập vào trong genome của cây chủ bắt đầu tổng hợp và sản xuất ra auxin, cytokinin và opine, toàn bộ sinh trưởng của cây bị rối loạn, các tế bào phân chia vô trật tự và tạo ra các khối u. Opine của vi khuẩn sản xuất giống một loại "thức ăn" như gen chuyển hóa opine trên Ti-plasmid. Các cây nhiễm của *A. rhizogenes* là ví dụ cây hai lá mầm mọc thành cây bụi, như trong vùng T-DNA của *A. rhizogenes* chỉ có gen sản xuất ra auxin, vì thế thay đổi hình thái chính của thực vật là chúng tạo ra rễ nhiều khi bị nhiễm bệnh.

Gen T-DNA vào tế bào thực vật, đầu tiên vi khuẩn *A. tumefaciens* phải tiếp xúc với thành tế bào thực vật để tiến hành. Quá trình này cần các gen *chvA* và *chvB*. Gen *chvB* mã hóa một protein liên quan đến hình thành -1,2 glucan mạch vòng, trong khi đó gen *chvA* xác định một protein vận chuyển, như vỏ màng trong các tế bào vi khuẩn. Protein vận chuyển giúp vận chuyển -1,2 glucan vào khoang giữa thành tế bào và màng sinh chất. -1,2 glucan giữ vai trò quan trọng đối với vi khuẩn *Agrobacterium* tiếp xúc với thành tế bào thực vật. Nếu không có sự tiếp xúc này, sẽ không có sự xâm nhập của T-DNA.

Các sản phẩm protein của vùng *vir* có tác động cho việc xâm nhập của T-DNA từ vi khuẩn vào tế bào thực vật. Các loại protein ở rìa của plasmid, cần thiết cho quá trình chuyển T-DNA từ plasmid, cần thay đổi màng tế bào thực vật mà chúng tiếp xúc, tham gia di chuyển phần T-DNA qua màng vi khuẩn từ tế bào thực vật, vận chuyển từ nhân thực vật cùng xâm nhập vào genome của cây chủ.

Thực tế, chỉ riêng T-DNA của plasmid được chuyển vào genome tế bào thực vật, mà không còn phần nào khác. Quá trình xâm nhập chỉ do sản phẩm của các gen *vir* và gen *chv* quyết định mà không liên quan đến các gen khác trên T-DNA. Tuy nhiên, chuỗi DNA 25 bp (RB và LB của T-DNA) có vai trò là vị trí cần thiết cho các sản phẩm của các gen vùng *vir*, cần thiết là protein của gen *virE* mang chúng xâm nhập vào tế bào thực vật. Chúng hoạt động như các tín hiệu nhận biết và khởi đầu quá trình xâm nhập. Trước hết gen *virA* trong tế bào thực vật phosphoryl hóa các thành phần phenol như acetosyringone để giải phóng ra các tế bào thực vật tiến hành. Sản phẩm của quá trình này là tiếp tục phosphoryl hóa gen *virG*. Sản phẩm của gen *virG* liên tiếp làm hoạt hóa toàn bộ các gen *vir* còn lại, mà hai gen cuối cùng cần thiết là gen *virB* và *virE*. Trước đó, khi gen *virD* được hoạt hóa, sản phẩm của nó cần thiết để giải phóng RB và LB của T-DNA và làm tách phần T-DNA ra khỏi DNA của plasmid thành các sản phẩm. Như thế, quá trình phosphoryl hóa này cần làm thay đổi thẩm thấu màng tế bào thực vật, màng tế bào bị mở ra và bị tổn thương. Các sản phẩm của T-DNA được gắn vào protein do gen *virE* tổng hợp và di chuyển về phía màng tế bào vi khuẩn. Ngay sau đó, sự xâm nhập của T-DNA từ vi khuẩn vào tế bào thực vật. Cuộc gặp gỡ chính là sự tiếp hợp (conjugation) giữa hai tế bào do cần sản phẩm gen *virB* mà thành. Khi T-DNA đã được chuyển giao vào tế bào thực vật, chúng nhanh chóng hợp nhập vào genome tế bào thực vật để nhân lên và di truyền như các gen bình thường khác.

V. Sự sắp xếp và khuếch đại các gen trong genome

1. Sự sắp xếp lại các gen

Nói chung, genome có cấu trúc và tổ chức bền vững. DNA của genome thường không biến đổi bất kỳ phát triển vô tính, nhưng thông qua các trình tự của chúng có thể chuyển đổi trong gen, biến đổi, khuếch đại hoặc thậm chí biến mất, như là một trường hợp tự nhiên.

Trao đổi chéo trong phân bào giảm nhiễm là một trong những nguyên nhân gây ra biến đổi của genome. Tuy nhiên, điều này xảy ra chủ yếu trong tế bào sinh dục mà không có trong các tế bào soma. Ví dụ sự sắp xếp lại genome sẽ dẫn đến những thay đổi sau:

- Tạo ra các gen mới cần thiết cho sự biến đổi trong các trường hợp đặc biệt.

- Sự tái sắp xếp có thể áp dụng cho việc hình thành các gen. Đây cũng chính là cơ chế của sự hòa biến đổi gen.

Một ví dụ điển hình là hiện tượng sắp xếp lại các gen trong genome của nấm men *S. cerevisiae* và các ký sinh trùng *Trypanosome* châu Phi khi gây bệnh ngủ li bì ở vật chủ.

1.1. Chuyển đổi dạng giao phối của nấm men

Nấm men có thể tồn tại ở hai dạng lưỡng bội hoặc lưỡng bội. Các dạng lưỡng bội là dạng phổ biến trong các locus liên quan đến giao phối, và các tế bào lưỡng bội có thể hình thành là MATa hoặc MAT α . Việc chuyển đổi trạng thái được thông qua giao phối, kết hợp các bào tử lưỡng bội thành lưỡng bội và qua việc tái tổ hợp nhiễm sắc thể. Tuy nhiên, giao phối chỉ xảy ra giữa hai loại tế bào lưỡng bội và . Các tế bào lưỡng bội cùng loại không thể kết hợp với nhau để thành tế bào lưỡng bội.

MAT (mating type locus) là vị trí hoạt động hay cassette hoạt động: một vùng đặc biệt của nhiễm sắc thể chứa các gen quy định dạng giao phối (a và α). Các gen này còn tồn tại ở hai vị trí khác trong genome. Tuy nhiên, đó chúng đều bắt buộc. Hai vị trí này được gọi là hai vị trí tĩnh (hay cassette tĩnh HML và HMR). Mỗi vị trí tĩnh chỉ mang các gen quy định cho một dạng giao phối. Khi các gen được sao chép từ vị trí tĩnh vào vị trí hoạt động thì mRNA mới có thể phiên mã các gen đó. Như vậy, quá trình sao chép quy định dạng giao phối của nấm men. Bằng cách luôn có một vị trí tĩnh và một vị trí hoạt động hai vị trí này ở vị trí hoạt động.

Nếu vị trí tĩnh có mang một biến thể thì chúng sẽ sao chép vào vị trí hoạt động. Tuy nhiên, nếu xảy ra một biến thể cassette MAT thì tính trạng một vị trí tĩnh không bền. Một khi dạng giao phối chuyển đổi thì các gen ở vị trí MAT sẽ thay thế bởi biến thể của vị trí tĩnh khác. Lúc đó, một biến thể loại i và tính trạng một vị trí tĩnh biến mất.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

So sánh giữa các dòng cùng sinh m (homothallic) và khác sinh m (heterothallic) như là những thể dị hợp heterothallic có gen *HO* hoạt động và có thể chuyển đổi giữa các kiểu giao phối, và vì thế mầm bào tảo có thể làm tăng quần thể phối, trong khi dòng homothallic không có gen *HO* và duy trì cùng một kiểu giao phối trong suốt chu trình sinh trưởng của nó.

Phân tích di truyền cho thấy các gen sau đây cần cho việc chuyển đổi kiểu giao phối:

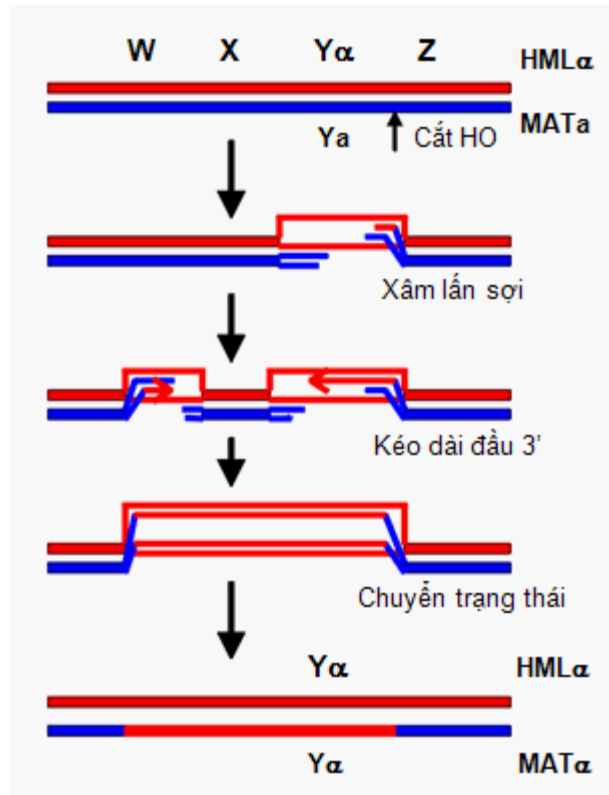
- *MAT*
- *HO*, mã hóa cho enzyme endonuclease
- *HML α* (cho MATa chuyển thành MAT α)
- *HMRa* (cho MAT α chuyển thành MATa)

Trình tự các nucleotide ở vị trí nhất định và vị trí hoạt động khác nhau một số nucleotide ký hiệu là Ya và Y (Hình 2.8). Enzyme HO-endonuclease nhận biết vị trí cắt cụ thể ranh giới phân cách giữa Z và Y và cắt cassette hoạt động MAT và cắt hai sợi DNA tại đó. Vì vậy enzyme này không cắt DNA khi chúng hiện diện cassette tảo.

Sau khi chọn Y của vùng MAT bị phân hủy, chọn Y của mầm trong hai cassette tảo sẽ dùng làm khuôn mẫu sao chép vào vị trí bị phân hủy (Hình 2.8). Nếu mầm xuất hiện vùng MAT (chọn Y), tính trạng mầm bị ức chế sẽ mất. Một khi dòng giao phối chuyển đổi, các gen bình thường sẽ sao chép vào vùng MAT và mầm bị loại bỏ.

1.2. Chuyển đổi gen *Trypanosome*

Trypanosome có khả năng lẩn tránh hệ thống miễn dịch của vật chủ thông qua việc thay đổi kháng nguyên bề mặt (surface antigen) của chúng. Một loại kháng nguyên cắt ngang hình xoắn kép của mầm gen tảo ngược vị trí hoạt động. Gen này có thể thay thế bằng mầm gen mã hóa cho loại kháng nguyên khác nằm ở vị trí nhất định nào đó trong genome. Một vị trí nhất định của mầm gen trưởng thành không hoạt động. Gen này chỉ có mầm khi chuyển đổi vị trí hoạt động. Trong genome của *Trypanosome*, có rất nhiều vị trí nhất định nhưng chỉ có một vị trí hoạt động.



Hình 2.8. Quá trình chuyển đổi gen giao phối sang nhà trao đổi gen giữa vùng MAT α và HML α trên nhiễm sắc thể số 3

Bình thường, *Trypanosome* sử dụng một số lượng nhỏ các hình thái khi truy cập ruồi châu Phi sang vật chủ. Bộ mã gen của bào *Trypanosome* có bao gồm một số lượng lớn (khoảng 5×10^6) phân tử của một loại glycoprotein (VSG-variable surface glycoprotein). Đây chính là kháng nguyên bề mặt của *Trypanosome* khi chúng xâm nhập vào vật chủ. Điều đáng chú ý là chúng có khả năng thay đổi kháng nguyên bề mặt, do đó tránh được phản ứng miễn dịch của vật chủ. Quá trình thay đổi kháng nguyên bề mặt phụ thuộc vào sự chuyển đổi các gen mã hóa cho chúng xảy ra một cách bất thường trong genome (vị trí hoán vị). Chuyển đổi gen mã hóa kháng nguyên bề mặt nhằm mục đích hoạt hóa gen mã hóa kháng nguyên bề mặt mới thay thế cho kháng nguyên trước đó. Khi một gen đang hoạt động thay thế bởi một gen khác sẽ ngừng việc sản xuất kháng nguyên mới và loại bỏ kháng nguyên cũ.

- Cấu trúc của một VSG *Trypanosome*

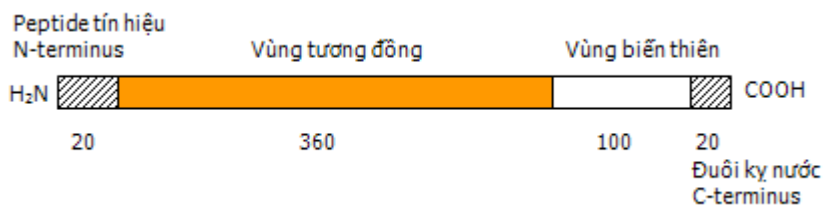
Cấu trúc chung của một VSG được mô tả trên hình 2.9 và 2.10. Một VSG có cấu trúc hình sợi dài khoảng 500 amino acid gồm phần đầu N-terminus, tiếp theo là một peptide quy định tính kháng nguyên; một peptide bổ trợ giữa các VSG và đuôi kỵ nước. Phần này có cấu trúc protein tiền thân (pre-protein). Do đó, chúng phải trải qua biến đổi hai đầu NH₂ và COOH trở thành dạng protein hoàn chỉnh (mature form). Dạng này có thể chèn vào màng tế bào từ đầu COOH.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

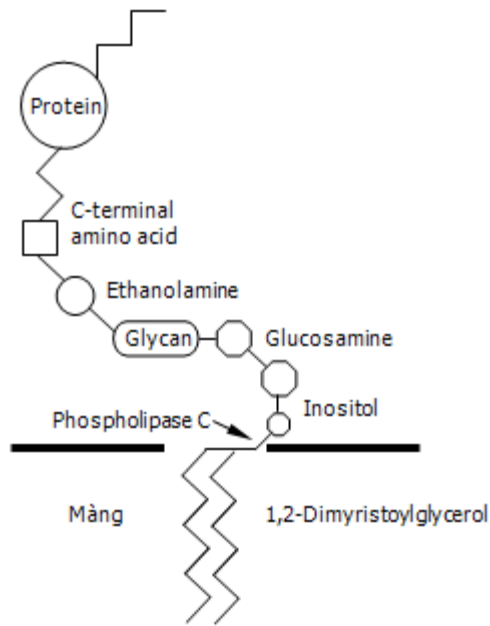
Một loài *Trypanosome* có thể tạo ra ít nhất khoảng 100 VSG từ khi nhiễm cho đến khi gây chết vật chủ. Số gen mã hóa cho VSG có thể nhiều hơn 1.000 gen, tất cả các gen này đều nằm trong genome. Tuy nhiên, tại một thời điểm bất kỳ chỉ có một gen hoạt động nên một loài VSG. Do đó, sự thay đổi kháng nguyên từng ngày của vật chủ thay đổi hoạt động của gen. Khi một gen mới xâm nhập, gen hoạt động trước nó phải bị xóa bỏ hoàn toàn. Lúc đó, một kháng nguyên mới sẽ thay thế kháng nguyên trước nó.

Hình 2.9 cho thấy chuỗi polypeptide chứa khoảng 500 amino acid. N-terminus chứa một peptide tín hiệu được vận chuyển qua ER (lưới nội sinh chất, endoplasmic reticulum) và tới màng plasma, rồi tách ra khỏi protein hoàn chỉnh. Vùng biến thiên là khác nhau giữa VSG, vì vậy cho thấy các VSG có ít hoặc không có tính kháng nguyên. Hướng tới phần C-terminus, chuỗi polypeptide được bao toàn thể và phần này cũng giống là vùng tương đồng. Một liên kết tín hiệu như một liên kết glycolipid (glycolipid anchor) (Hình 2.10). Khi một neo được gắn thì 20 amino acid cuối cùng sẽ được tách ra.

Glycoprotein biến dị bề mặt (VSG) được gắn vào màng thông qua một liên kết glycolipid chứa ethanolamine, một cấu trúc glycan mang một chuỗi mannose (mannose moiety), một glucosamine và một phosphoinositol liên kết với 1,2-dimyristoylglycerol có gai trong màng plasma. Các glycolipid là yếu tố quyết định phản ứng chéo (cross-reacting) (CRD) của nhiễm trùng bằng các kháng thể phản ứng với các dạng biến dị của VSG, như khi VSG được phóng thích khỏi màng. Màng liên kết với VSG không chứa nhiễm trùng bằng các kháng thể anti-CRD. Sự phóng thích VSG được xúc tác bởi hoạt tính của trypanosome-specific phospholipase C cũng giống như là hiện diện một bên trong (inner face) của màng plasma. Ngay cả khi không biết enzyme có thể liên kết phosphoester trên một khác của màng như thế nào.



Hình 2.9. Schematic minh họa chuỗi protein của một VSG trưởng thành



Hình 2.10. Cấu trúc của màng neo glycolipid của VSG

- Hoạt động của gen VSG

Gen mã hóa cho một VSG cụ thể là bản gen gốc (basic copy gene). Các gen này có thể phân thành hai nhóm tùy thuộc vào vị trí của chúng trên nhiễm sắc thể.

+ Các gen nằm telomere (khoảng 5-15 kb) > 200 gen.

+ Các gen nằm cách telomere hơn 50 kb.

Trong tế bào mầm, các gen mã hóa cho VSG nằm rải rác trong genome và trạng thái không hoạt động. Một gen bất kỳ có thể hóa ch khi nó được sao chép vào vị trí hoạt động (expression site) trong khi nguyên bản của nó vẫn ở vị trí bất động. Bản sao của bản gen gốc vào vị trí hoạt động cụ thể là ELC (bản sao hoạt động-expression linked copy). Vị trí hoạt động nằm gần telomere. Như vậy, vì chỉ một bản gen gốc được sao chép tới bản sao hoạt động sẽ phụ thuộc vào vị trí của bản gen gốc telomere hoặc nằm phía trong telomere. Có hai giả thiết về một gen trở nên hoạt động như sau:

- Vị trí hoạt động không thay đổi mà chỉ có các ELC thay thế cho nhau. Bản sao của một bản gen gốc sẽ thay thế cho bản sao của một gen khác tại vị trí đó, điều này xảy ra trong tế bào mầm các gen cassette tương tự được sao chép vào cassette hoạt động trong trường hợp vi nhân men.

- Vị trí hoạt động thay đổi, khi cần tổng hợp một VSG mới, gen ở vị trí hoạt động cũ bị ngừng và gen mới ở vị trí khác (gần telomere) được kích hoạt.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Một số phân tử mRNA tổng hợp từ các VSG khác nhau có phân tử và các xác định trình tự nucleotide (thông qua cDNA). Điều này có nghĩa là phần oligonucleotide ở 3' của mã gen VSG khác với phần 3' của các mRNA có phiên mã từ các gen đó. Một số khác, các gen này không có phần 5' giống như các mRNA. Như vậy, các mRNA không có trình tự hoàn toàn trên khuôn mẫu của các gen này. Phần 3' của các mRNA tổng hợp từ phần 3' của vật chủ (ví dụ như ELC, trong khi phần 5' (gồm 35 nucleotides) có trình tự như ở DNA khác và được gắn vào mRNA (hiện tượng trans-splicing).

2. Khuếch đại các gen

Số lượng bản sao của mã gen có thể tăng lên một phần trong quá trình phát triển các tế bào soma. Ví dụ như số lượng của mã gen có thể bị thu hẹp vào trình tự inactivated tế bào và xảy ra không phổ biến. Các bản sao có thể trung thành một nhóm gen bản sao này nên tiếp bản sao khác hoặc có thể tiến hành như ở DNA có khả năng tái bản chéo. Chúng như sau:

- Số nhân bản của gen mã hóa cho rRNA tăng lên. Tăng lên có thể có thể kính khoảng 2-3 mm, đối với rRNA. Chúng có phiên mã từ rDNA. Các gen này có nhân lên (khoảng 2.000 lần) theo cách “vòng tròn quay” (xem chương 4) trong quá trình phát triển và tiến hành các vòng tròn khép kín.

- Khi nuôi cấy các tế bào có vú trong môi trường có thể, DNA tích lũy ở vị trí trong genome có nhân lên. Ví dụ: nuôi cấy các tế bào ung thư trong môi trường chứa chất methotrexate. Chất này có thể hoạt động như enzyme dihydrofolate reductase (DHFR) giữ vai trò trong trình tự các nucleotide của DNA. Các tế bào ung thư nuôi cấy trong môi trường có chất này phát triển thành các quần thể kháng lại chất. Khi ngừng chất ức chế, ngừng DHFR cũng ngừng theo, có thể tới 1.000 lần nhân lên bình thường. Ngừng enzyme tổng hợp số lượng các gen mã hóa cho chúng tăng. Cách chính xác của hiện tượng này khá rõ ràng, nhưng có thể xảy ra theo hai cách:

- Trao đổi chéo không cân bằng giữa hai nhiễm sắc thể (chromatid) của nhiễm sắc thể đơn nhân một số tế bào không có gen *dhfr* và một số khác có hai bản sao của gen này. Trong môi trường có chất, trao đổi chéo không cân bằng chéo và các tế bào chứa nhiễm gen *dhfr* vẫn phát triển tốt trong môi trường này.

- Các phân tử DNA (100-1.000 kb) chứa 2-4 gen *dhfr* (~31 kb/gen) có sao chép từ nhiễm sắc thể bình thường tạo ra các nhiễm sắc thể rỗng, không có tâm động. Các nhiễm sắc thể này ghép vào các nhiễm sắc thể bình thường khác. Quá trình này lặp lại và qua một số lần phân bào nguyên nhiễm, tế bào nào mang số lượng các gen *dhfr* càng có điều kiện phát triển thuận lợi trong môi trường có chất.

3. *Biến nạp gen*

Một phương thức truyền gen di truyền là nhập các tác nhân sinh-ký sinh, trong đó DNA được chuyển vào tế bào vật chủ tế bào vi khuẩn. Cách này tương tự với sự tiếp xúc của vi khuẩn. Sự biến nạp của DNA vi khuẩn trong vật chủ mới của nó sẽ làm thay đổi kiểu hình của tế bào. Ví dụ điển hình là vi khuẩn *A. tumefaciens* chuyển gen tới tế bào thực vật để chúng xâm nhiễm.

Khi DNA được đưa vào tế bào eukaryote, nó có thể tồn tại ngoài nhiễm sắc thể hoặc tích hợp vào nhiễm sắc thể trong genome. Ngược lại theo trình tự thứ hai, genome sẽ mang những biến di truyền và nhiễm khi DNA được nhập tế bào để làm xuất hiện các tính trạng mới. Việc đưa các gen vào tế bào soma hoặc tế bào sinh dục mà vẫn duy trì hoạt động của những gen đó gọi là chuyển nhiễm (transfection). Các biến nạp tính trạng mới như hoạt động của gen đưa vào tế bào sinh dục gọi là các chuyển gen. Quá trình này có thể làm thay đổi cấu trúc của genome. DNA sau khi được tiêm vào trong các tế bào thực vật có thể tích hợp vào nhiễm sắc thể và truyền cho thế hệ sau như một thành phần di truyền bình thường. Khi nhập gen thực vật có thể trở thành một kỹ thuật y học sử dụng cho việc chữa bệnh di truyền.

Tài liệu tham khảo/ bổ sung

1. **Võ Thị Thanh Lan.** 2002. Sinh học phân tử. NXB Giáo dục Hà Nội, Hà Nội.
 2. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD.** 2002. Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. Garland Publishing, Inc. New York, USA.
 3. **Cantor CR and Smith CL.** 1999. Genomics. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.
 4. **Dale JW and Von Schantz M.** 2002. From Gene to Genome. John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex, UK.
 5. **Lewin B.** 2000. Gene VII. Oxford University Press, Oxford, UK.
 6. **Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL and Darnell J.** 2004. Molecular Cell Biology. 5th ed. WH Freeman and Company, New York, USA.
 7. **Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M and Loscik R.** 2004. Molecular Biology of the Gene. The Benjamin Cummings/Cold Spring Harbor Laboratory Press, San Francisco, CA, USA.
 8. **Weaver RF.** 2003. Molecular Biology. 2nd ed. McGraw-Hill Company Inc. New York, USA.
-

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

¹DNA là polymer của các chuỗi liên tiếp nhau sao trong mỗi genome.

²DNA không polymer của các chuỗi duy nhất: chỉ có một bản sao trong genome nhân bản.

Chương 3

Cấu trúc và chức năng của gen

I. Định nghĩa gen

Chúng ta có thể tìm qua những mục chính trong lịch sử nghiên cứu về gen như sau:

Mendel (1865) là người đầu tiên đưa ra khái niệm **nhân tố di truyền**. Johansen (1909) đã xuất phát từ gen (từ **genos**, nghĩa là sản sinh, nguồn gốc) để chỉ nhân tố di truyền xác định một tính trạng nào đó. Sau đó, Morgan trong những năm 1920 đã chứng minh khái niệm về gen, khẳng định nó nằm trên nhiễm sắc thể và chỉ một một locus nhất định, gen là đơn vị chức năng xác định một tính trạng.

Vào những năm 1940, Beadle và Tatum đã chứng minh gen kiểm tra các phản ứng hóa sinh và nêu giả thuyết **một gen - một enzyme**. Tuy nhiên, trình tự hemoglobin là một protein như một chuỗi polypeptide do hai gen xác định, do đó giả thuyết trên thực tế là **một gen - một polypeptide**.

Vào những năm 1950, DNA (deoxyribonucleic acid) đã chứng minh là vật chất di truyền. Mô hình **cấu trúc DNA** của Watson và Crick đã đưa ra và **lý thuyết trung tâm** (central dogma) ra đời. Gen được xem là một đoạn DNA trên nhiễm sắc thể mã hóa cho một polypeptide hay RNA.

Cuối những năm 1970, việc phát hiện ra gen gián đoạn sinh vật eukaryote cho thấy có những đoạn DNA không mã hóa cho các amino acid trên phân tử protein. Vì thế, khái niệm về gen lại có những thay đổi: Gen là một đoạn DNA mã hóa cho việc tạo ra một polypeptide, nó bao gồm các phần phía trước là vùng 5' không dịch mã (5' untranslated) hay còn gọi là vùng thượng nguồn (upstream) và phía sau là vùng 3' không dịch mã (3' untranslated) hay còn gọi là vùng hạ nguồn (downstream) của vùng mã hóa cho protein, và bao gồm các đoạn không mã hóa (intron) xen giữa các đoạn mã hóa (exon).

Hiện nay, có thể định nghĩa gen một cách tổng quát như sau: Gen là đơn vị chức năng của bộ máy di truyền chỉ một một locus nhất định trên nhiễm sắc thể và xác định một tính trạng nhất định. Các gen là những đơn vị vật chất di truyền mã hóa cho những sản phẩm riêng lẻ như các mRNA để sử dụng trực tiếp cho tổng hợp các enzyme, các protein cấu trúc hay các chuỗi polypeptide để tổng hợp protein có hoạt tính sinh học. Ngoài ra, gen còn mã hóa cho các tRNA, rRNA và snRNA...

Bảng 3.1. Tóm tắt lịch sử nghiên cứu về di truyền học

Mốc thời gian	Năm	Các sự kiện chính
1850	1865	Gen là các nhân tố hạt
	1871	Khám phá ra nucleic acid
1900	1903	Nhiễm sắc thể là các đơn vị di truyền
	1910	Gen nằm trên nhiễm sắc thể
	1913	Nhiễm sắc thể là các dãy sắp xếp mạch thẳng của gen
	1927	Đột biến là những thay đổi vật lý của gen
	1931	Sự tái tổ hợp xuất hiện bởi hiện tượng vắt chéo
	1944	DNA là vật liệu di truyền
	1945	Gen mã hóa cho protein
1950	1951	Trình tự protein đầu tiên
	1953	DNA có dạng xoắn kép
	1958	DNA tái bản theo phương thức bán bảo thủ
	1961	Mã di truyền là bộ ba
	1977	Các gen của sinh vật eukaryote bị gián đoạn
	1977	DNA có thể được phân tích trình tự
2000	1995	Genome của vi khuẩn được phân tích trình tự
	2001	Genome người được phân tích trình tự

II. Lý thuyết trung tâm

1. Sự xác định di truyền cấu trúc bộ mã của protein

Cấu trúc không gian của chuỗi polypeptide được xác định bởi trình tự sắp xếp của các amino acid trong cấu trúc bộ mã. Như vậy, mặc dù có nhiều cấu trúc không gian khác nhau, nhưng cấu trúc bộ mã của trình tự sắp xếp các amino acid chi phối toàn bộ các mức cấu trúc khác. Vì vậy, việc xác định di truyền phân tử protein trở nên rất quan trọng đối với việc nghiên cứu tính sinh học quy định tính di truyền của cấu trúc bộ mã là

2. Các enzyme mất hoạt tính do đột biến

Nhiều nghiên cứu cho thấy, việc mất hoạt tính enzyme nhiều khi không phải do vắng mặt của enzyme, mà chỉ do các biến đổi trên phân tử (modification). Có trường hợp đột biến dẫn đến những thay đổi tinh vi, enzyme vẫn có hoạt tính nhưng số biểu hiện khác nhau thay đổi ít ỏi. Chẳng hạn:

Trong nấm mốc *Neurospora crassa*, enzyme tyrosinase do gen *T* xác định, xúc tác cho phản ứng chuyển hóa tyrosine thành dihydroxyphenylalanine. Allele T^+ của dòng hoang dã sản xuất tyrosinase có hoạt tính bình thường và cần 60°C. Một đột biến T^S sản xuất tyrosinase có hoạt tính bình thường, nhưng lại mất hoạt tính 60°C.

Như vậy, trong các trường hợp, đột biến của một gen không làm biến mất enzyme mà chỉ biến đổi cấu trúc dẫn đến thay đổi hoạt tính. Các đột biến của cùng một gen có thể gây ra những biến đổi khác nhau trên enzyme. Các hiện tượng đó chỉ chứng tỏ rằng cấu trúc của enzyme chịu sự kiểm soát trực tiếp của gen.

3. Bản chất các biến đổi di truyền của protein

Bản chất đó chính là quan hệ gen-một polypeptide.

Như đã nêu trên, ngày nay khám phá ngày càng nhiều gen tạo ra hemoglobin (Hb) khi biến đổi sản tạo ra những hemoglobin bất thường do sai hỏng các chuỗi polypeptide hoặc (Bảng 3.2 và 3.3) và gây ra các bệnh di truyền.

Bảng 3.2. Các loại hemoglobin chuỗi polypeptide

Thứ tự amino acid	1	2	16	57	58	68	116	141
Tên amino acid	Val	Leu	Lys	Glu	His	Asp	Glu	Arg
Loại hemoglobin	<i>Hb I</i>							
	<i>Hb Norfolk</i>							
	<i>Hb M Boston</i>							
	<i>Hb B Philadelphia</i>							
	<i>Hb O Indonesia</i>							

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Trong hình này, tất cả các amino acid có thể sai lệch. Trong bảng liệt kê trên ta thấy các đột biến trong tổng hợp Hb bất thường đó là thay đổi một amino acid này bằng một amino acid khác.

Bảng 3.3. Các loại hemoglobin chuỗi polypeptide

Thứ tự amino acid	1	2	3	6	26	67	121	146
Tên amino acid	Val	His	Leu	Glu	Glu	Val	Glu	His
Loại hemoglobin								
<i>Hb S</i>				Val				
<i>Hb C</i>				Lys				
<i>Hb E</i>					Lys			
<i>Hb M Minvauki</i>							Glu	
<i>Hb O Ả Rập</i>								Lys

Qua hai chuỗi polypeptide và chúng ta thấy có một số dạng hemoglobin bất thường. Trên mỗi chuỗi, trình bày những amino acid đã thay đổi đột biến. Sự thay đổi vị trí của amino acid trong chuỗi polypeptide. Mỗi hemoglobin bất thường có thể có một hoặc nhiều cùng tên (nếu có) của nó để tìm thấy.

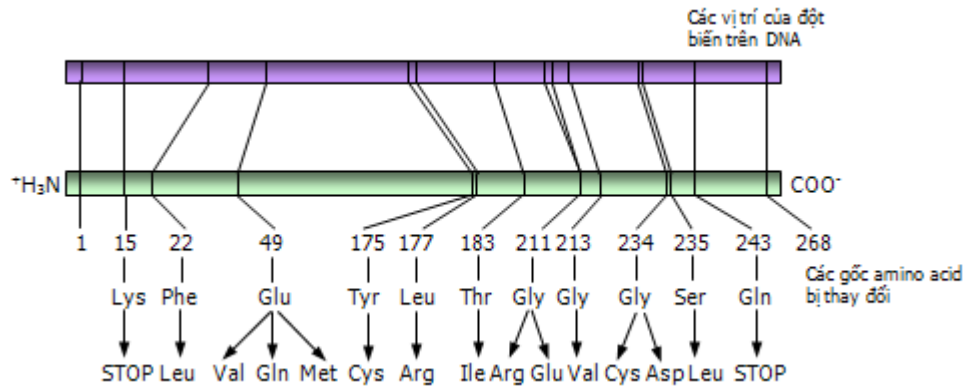
Đột biến của biểu hiện bất thường thay đổi vị trí của một amino acid này bằng một amino acid khác.

4. Sự liên quan giữa gen-tổng hợp polypeptide

4.1. Đột biến tryptophan synthetase-sự tổng hợp gen và chuỗi polypeptide

Nghiên cứu trên enzyme tryptophan synthetase xúc tác cho phản ứng tổng hợp tryptophan của *E. coli* cho thấy nó có hai đột biến x và y ra trên cùng một gen mã hóa cho tryptophan synthetase.

Thậm chí tái tổ hợp trong gen (nguyên tắc là gen các vị trí càng xa nhau trên nhiễm sắc thể càng dễ tái tổ hợp), nghiên cứu thấy rằng các đột biến đó có tính chất khác nhau, và tính cách tổ chức riêng biệt của chúng khác nhau của đột biến đã xác định. Vị trí đột biến trên nhiễm sắc thể tương ứng với vị trí của amino acid trên chuỗi polypeptide. Như vậy, có thể cho rằng có sự tổng hợp gen và chuỗi polypeptide (Hình 3.1).



Hình 3.1. T ng quan ng tuy n tính gi a gen và enzyme tryptophan synthetase c a *E. coli* thông qua các v trí t bi n và các g c amino acid b thay i

Nhi u d ng t bi n c a tryptophan synthetase ã c t o ra. B ng c ch tái t h p, nh ng kho ng cách t ng i gi a nh ng i m khác nhau c a t bi n ã c xác nh. S n ph m protein c a m i d ng t bi n ã c phân tích, và nh ng thay i các amino acid khác c ng c xác nh. Ng i ta ã tìm th y m i t ng quan hoàn toàn gi a nh ng kho ng cách c a các t bi n c tìm th y trên gen v i kho ng cách c a amino acid b thay i trong phân t protein.

4.2. t bi n

4.2.1. Khái ni m

M t gen (DNA) có 4 lo i base và m t phân t protein có 20 lo i amino acid¹, nh ng gi a chúng có m i t ng quan nh th nào. u tiên, ng i ta cho r ng m t base qui nh m t amino acid, nh ng nh ng tính toán cho th y không h p lý. Vì ch có 4 base trong DNA và 20 amino acid trong protein, cho nên m i codon ph i ch a ít nh t 3 base. Hai base c ng không th làm thành m t codon b i vì ch có $4^2 = 16$ c p h p lý c a 4 base. Nh ng 3 base th b i vì s có $4^3 = 64$ b ba h p lý. Vì s l ng b ba h p lý l n h n 20, cho nên s có tr ng h p m t vài codon ch nh cùng m t amino acid. Ví d : UCU, UCC, UCA, UCG, AGU và AGC u cùng mã hóa cho serine.

T ó, ng i ta a ra khái ni m mã di truy n (tín hi u di truy n). Mã di truy n cho phép c th t trên DNA b i t th t trên chu i polypeptide. Mã di truy n không m h , có ngh a v i m t trình t ch ng h n ATA ta b i t nó ghi mã cho m t amino acid gì, và c ng th y r ng có nhi u mã di truy n xác nh cho m t amino acid (B ng 3.4).

4.2.2. t bi n i m

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Là một biến chất ngẫu nhiên, nói rõ hơn đó là một base. Khi thay thế một base trên DNA sẽ tạo ra sự thay thế một amino acid (Hình 3.2).

Đột biến diễn ra trên DNA và sao chép trên mRNA trong phiên mã, rồi trên protein trong dịch mã.

Bảng 3.4. Mã di truyền chung

Vị trí thứ nhất	Vị trí thứ hai				Vị trí thứ ba
	U	C	A	G	
U	Phe (F)	Ser (S)	Tyr (Y)	Cys (C)	U
U	Phe (F)	Ser (S)	Tyr (Y)	Cys (C)	C
U	Leu (L)	Ser (S)	STOP	STOP	A
U	Leu (L)	Ser (S)	STOP	Trp (W)	G
C	Leu (L)	Pro (P)	His (H)	Arg (R)	U
C	Leu (L)	Pro (P)	His (H)	Arg (R)	C
C	Leu (L)	Pro (P)	Gln (Q)	Arg (R)	A
C	Leu (L)	Pro (P)	Gln (Q)	Arg (R)	G
A	Ile (I)	Thr (T)	Asn (N)	Ser (S)	U
A	Ile (I)	Thr (T)	Asn (N)	Ser (S)	C
A	Ile (I)	Thr (T)	Lys (K)	Arg (R)	A
A	Met (M)	Thr (T)	Lys (K)	Arg (R)	G
G	Val (V)	Ala (A)	Asp (D)	Gly (G)	U
G	Val (V)	Ala (A)	Asp (D)	Gly (G)	C
G	Val (V)	Ala (A)	Glu (E)	Gly (G)	A
G	Val (V)	Ala (A)	Glu (E)	Gly (G)	G

Chú thích

Những nucleotide mã (codon) được đọc theo chiều 5'→3'.

STOP: codon kết thúc (còn gọi là vô nghĩa).

Đột biến điểm có các dạng sau:

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- **t bi n sai ngh a.** Thay i m t amino acid trong protein, có thể dẫn đến m t trong ba k t qu sau:

+ Không h u qu nào c , vì amino acid không n m trong v trí ho t ng ho c không có vai trò trong c u trúc enzyme.

+ Có bi n i nh chu i polypeptide s t o ra tính m n c m y u v i nhi t, làm gi m s n nh chu i polypeptide.

+ M t h n ho t tính enzyme n u úng ngay v trí ho t ng c a enzyme ó.

- **t bi n vô ngh a.** Thay i m t base. N u ó là m t codon vô ngh a s làm ng ng kéo dài (t ng h p) chu i polypeptide v trí amino acid này. T c là n u codon này n m u s không có chu i polypeptide ho t ng.

- **t bi n acridine ho c t bi n d ch khung.** t bi n này do ch t acridine màu da cam t o ra (ho c còn g i là t bi n d ch khung, frameshift, do thêm vào ho c b t i m t base) (Hình 3.2 E và D). Nh v y, m t t bi n trên khung c khi thêm vào (C) ho c m t i (A) th ng s d n n xu t h i n m t **codon stop** làm ng ng chu i polypeptide và enzyme s không có ho t tính.

4.2.3. t bi n kì m hãm

n nay, ng i ta nh n th y m i sai l ch trong vi c t ng h p protein n u có u x y ra t DNA, còn quá trình di n ra t RNA n polypeptide luôn luôn úng. Nghiên c u m t vài ki u protein t bi n ta th y:

- **t bi n sai ngh a.** Làm xu t h i n m t b t th ng trong trình t amino acid. K t qu protein m t ho t tính. Ho t tính này có th c ph c h i, ho c do m t t bi n ng c cho l i protein c u trúc ban u.

- **t bi n vô ngh a.** Làm m t i m t ph n chu i polypeptide, ph n còn l i không có ho t tính, và ho t tính này có th có l i c nh t bi n trong m t codon ã b t bi n.

Thông th ng, nh ng gen kì m hãm t bi n vô ngh a không n m g n v trí c a t bi n y. ó là nh ng gen làm bi n i h th ng d ch mã khi t ng h p protein.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

A	AUG	ACU	CGG	AAG	UCA	CUA	ACG	AUU	AGG	CUU	UAC	...
	Met	Thr	Arg	Lys	Ser	Leu	Thr	Ileu	Arg	Leu	Tyr	...
B	AUG	ACU	<u>AGG</u>	AAG	UCA	CUA	ACG	AUU	AGG	CUU	UAC	...
	Met	Thr	Pro	Lys	Ser	Leu	Thr	Ileu	Arg	Leu	Tyr	...
C	AUG	ACU	CGG	AAG	<u>UGA</u>	CUA	ACG	AUU	AGG	CUU	UAC	...
	Met	Thr	Arg	Lys	Kết thúc							
D	AUG	ACU	CGG	<u>ACA</u>	GUG	ACU	AAC	GAU	<u>UAG</u>	GCU	UUA	...
	Met	Thr	Arg	Thr	Val	Thr	Asp	Asp	Kết thúc			
E	AUG	ACU	CGG	AGU	GAC	<u>UAA</u>	CGA	UUA	GGC	UUU	AC	...
	Met	Thr	Arg	Ser	His	Kết thúc						

Hình 3.2. Các dạng đột biến

A: trình tự các codon và các amino acid tự nhiên.

B: thay thế một base (C thành A) làm thay thế amino acid (Arg thành Pro) gây nên đột biến sai nghĩa.

C: thay thế một base (C thành G) sinh ra một codon vô nghĩa (UGA).

D: thêm một base (C) gây nên đột biến acridine hoặc đột biến d ch khung, có sự d i khung c.

E: mất một base (A), gây nên đột biến acridine, ch m d t c.

5. Lý thuyết trung tâm của sinh học phân tử

Tổng hợp protein trong tế bào có các đặc điểm sau:

- Các phân tử thông tin nucleic acid và protein được tổng hợp theo khuôn.

Tổng hợp theo khuôn rất chính xác và ít cần enzyme. Tuy nhiên, cần có vào hàng loạt tính chất hóa học các protein không thể làm khuôn mẫu cho sự tổng hợp của chính chúng.

Vì vậy, khuôn mẫu tổng hợp nên protein không phải là protein.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Sinh tổng hợp protein tách rời vì không gian vật chất chứa DNA. Nghiên cứu cho thấy tổng hợp protein có thể xảy ra khi không có mặt DNA. Sự kiện này thể hiện rõ ràng nhất ở sinh vật nhân eukaryote. Trong sinh vật nhân eukaryote, hầu như toàn bộ DNA tập trung chủ yếu trong nhân, còn tổng hợp protein chủ yếu diễn ra ở bào chất. Tảo xanh nhân bào *Acetabularia* khi bị cắt mất phần chứa nhân vẫn tổng hợp protein và sống vài tháng như sinh vật nhân sơ. Rõ ràng, nơi chứa DNA mang thông tin di truyền và chỉ sinh tổng hợp protein tách rời nhau về không gian.

- DNA không phải là khuôn mẫu trực tiếp tổng hợp protein, do đó phải có chất trung gian chuyển thông tin từ DNA ra bào chất và làm khuôn tổng hợp protein. Chất đó phải có mặt trong nhân và bào chất vì sự liên hệ giữa nhân và bào chất để tổng hợp protein.

- Chất trung gian đó chính là RNA như các điểm sau:

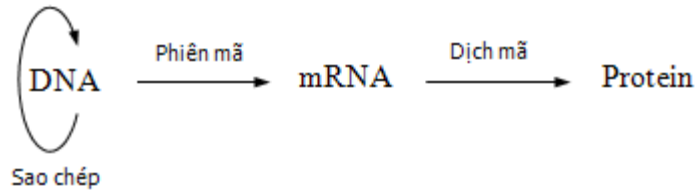
+ RNA tổng hợp ngay trong nhân có chứa DNA, sau đó nó đi vào bào chất cho tổng hợp protein.

+ Sinh vật nhân eukaryote giàu RNA tổng hợp protein như sau.

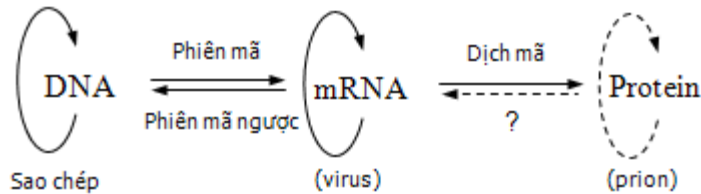
+ Về mặt di truyền hóa học RNA giống DNA: chuỗi polyribo-nucleotide thành các nucleotide A, G, C và uracil (U). Nó có thể mang thông tin từ DNA qua bất cứ bước nào.

Nói chung, trong tế bào không thể tìm thấy chất nào khác ngoài RNA có thể đóng vai trò trung gian cho tổng hợp protein. Mối quan hệ này chính là thông tin di truyền từ DNA qua RNA đến protein và được biểu diễn như hình 3.3. Mối quan hệ này còn được gọi là **lý thuyết trung tâm (central dogma)**, được Crick đề ra từ năm 1956 và nay vẫn còn đúng.

Vào năm 1970, người ta đã phát hiện quá trình phiên mã ngược từ RNA tổng hợp nên DNA nhờ enzyme reverse transcriptase. Hiện nay, virus sao chép (tổng hợp) RNA trên khuôn mẫu RNA cũng đã được chứng minh như ở virus. Ngoài ra, thông tin từ protein cũng có thể truyền sang protein (prion của bệnh bò điên). Riêng dòng thông tin từ protein ngược về mRNA/DNA thì chưa thể tìm thấy (Hình 3.4).



Hình 3.3. Lý thuyết trung tâm của Crick



Hình 3.4. Những bổ sung mới vào lý thuyết trung tâm của Crick

6. DNA và mã di truyền

Chúng ta đã biết có sự liên quan giữa tính chất của DNA và phân tử protein, từ đó dần dần đoán rằng trình tự các amino acid trên phân tử protein sẽ mã hóa bằng nhóm các nucleotide trên phân tử DNA. Có tất cả 4 loại base, nếu các base có nhóm ôxi thì 2 nucleotide mã hóa cho một loại amino acid thì tất cả chỉ có 16 khả năng, không cho 20 loại amino acid. Như vậy, nếu mã hóa (codon) phải gồm 3 nucleotide (xem phần 4.2).

Vấn đề tiếp theo là xác định chính xác các codon nào mã hóa cho từng amino acid. Nirenberg và Matthaei đã sử dụng enzyme tổng hợp nhân tạo RNA. Khi dùng chỉ một loại nucleotide là U nên nhân tạo RNA là poly(U), nếu dùng A nên nhân tạo poly(A).

Năm 1961, Nirenberg và Matthaei đã dùng poly(U) thay cho khuôn mẫu mRNA tổng hợp protein trong hệ thống vô bào (có amino acid, enzyme tổng hợp protein, nhưng không có DNA...), sản phẩm thu được là chuỗi polypeptide polyphenylalanine chứa một loại amino acid là phenylalanine. Điều đó chứng tỏ codon UUU mã hóa cho phenylalanine. Đây là codon đầu tiên được xác định. Sau đó, họ cũng chứng minh rằng AAA mã hóa cho lysine, GGG cho glycine và CCC cho proline.

Năm 1964, Khorana tìm ra phương pháp tổng hợp mRNA nhân tạo với trình tự lặp lại (như AAG AAG AAG...) và nhận ra quy tắc xếp các vị trí còn lại rõ ràng.

Bảng mã di truyền (Bảng 3.4) cho thấy trong 64 codon, có 3 codon UAA, UAG, UGA không mã hóa cho amino acid nào gọi là vô nghĩa (non-sense), trong đó là codon kết thúc (termination) để dừng chuỗi polypeptide.

Mã di truyền có tính suy biến (degeneration) tức một amino acid có nhiều codon mã hóa, chỉ methionine và tryptophane chỉ có một codon (từng lần là ATG và TGG). Các codon đồng nghĩa tất cả mã hóa cho cùng một amino acid thì có hai base

Trao đổi trực tuyến: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

ưu tiên gì không nhau, nhưng khác nhau cái thứ ba. Ví dụ: CCU, CCC, CCA và CCG tất cả đều mã hóa cho proline. Trên thực tế, U và C luôn luôn tương ứng không nhau về thứ tự ba, còn A và G tương ứng không nhau trong 14 trên 16 trường hợp.

Trở lại với bộ mã di truyền phổ biến (universal) của toàn bộ thế giới sinh vật có chung bộ mã di truyền.

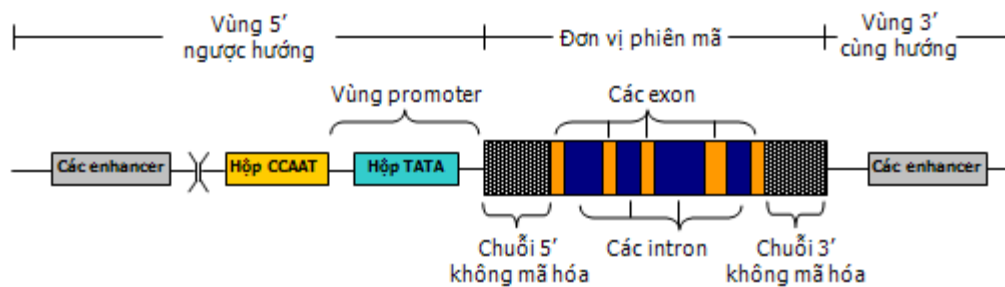
III. Cấu trúc và chức năng của gen

Khi nghiên cứu các quy luật di truyền Mendel và học thuyết di truyền nhiễm sắc thể, gen được quan niệm như một đơn vị trên nhiễm sắc thể, và là đơn vị chức năng xác định tính trạng, và là đơn vị tái bản, và là đơn vị tái tổ hợp. Cùng với sự phát triển của di truyền học, khái niệm về gen được cụ thể hóa thêm, cấu trúc và chức năng của gen được chi tiết hơn.

1. Cấu trúc gen

Một gen thường được xem gồm có hai phần, phần mang mã di truyền được phiên mã sang phân tử mRNA và phần DNA làm nhiệm vụ điều khiển hoạt động của gen (Hình 3.5). Cấu trúc của gen khác nhau giữa sinh vật prokaryote và eukaryote. Tuy nhiên, gen eukaryote còn có cấu trúc phức tạp liên quan đến các cơ chế kiểm soát khác nhau về điều khiển hoạt động của gen.

Cấu trúc một gen điển hình nói chung đều có promoter, vị trí RNA polymerase hoạt động khi phiên mã. Đôi khi nằm xa gen, có thể thay các enhancer (vùng tăng cường) hoặc silencer (vùng ức chế) có vai trò liên quan đến quá trình phiên mã. Chiều dài của một gen thay đổi tùy theo số lượng và chiều dài của các intron chứa trong nó.



Hình 3.5. Cấu trúc chung của một gen

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

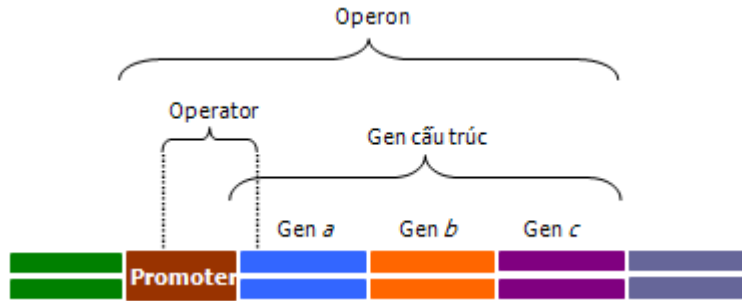
Vùng DNA mang mã di truyền sẽ được phiên mã sang phân tử mRNA. Quá trình này thực hiện theo chiều 5' → 3' trên sợi mRNA đang được tổng hợp. Không phải mọi phân tử mRNA đều được dịch mã sang phân tử protein. Hai đầu 5' và 3' của phân tử mRNA gồm nhiều nucleotide không được dịch mã mà liên quan đến tính bền vững của phân tử mRNA hoặc tham gia kiểm soát quá trình dịch mã. Hai đầu này gọi là vùng không được dịch mã 5' và 3' (untranslated region). Vùng không được dịch mã 5' nằm trước khởi đầu dịch mã (3 nucleotide AUG mã hóa cho methionine - đầu tiên của chuỗi polypeptide) và vùng không được dịch mã 3' nằm sau kết thúc dịch mã (stop codon có thể là UAA, UGA và UAG). Do tế bào prokaryote không có cấu trúc nhân nên quá trình phiên mã (tổng hợp mRNA) và dịch mã (tổng hợp protein) xảy ra đồng thời. Còn phân tử mRNA của eukaryote được phiên mã trong nhân, sau đó phải cắt bỏ intron và gán các exon lại, chèn thêm vào đầu 5' và 3' trước khi vận chuyển ra ngoài tế bào để dùng làm khuôn mẫu tổng hợp protein.

Hoạt động của một gen được đánh giá thông qua quá trình phiên mã (tổng hợp mRNA) và quá trình dịch mã (tổng hợp protein). Hoạt động này được kiểm soát chặt chẽ bởi các cơ chế khác nhau ở mỗi giai đoạn, như bắt đầu và kết thúc phiên mã, quá trình biến đổi mRNA, quy định tính bền vững và kiểm tra lỗi thông tin di truyền trên các phân tử này... Do cấu trúc phức tạp của các gen prokaryote khác với gen eukaryote nên sự phức tạp giữa các cơ chế điều khiển mang tính chất riêng biệt cho từng loại genome.

Các gen prokaryote thường sắp xếp nối tiếp nhau và chung sử dụng khi cần chung một promoter, tức là chúng được phiên mã sang cùng một phân tử mRNA. Cấu trúc này gọi là operon. Như vậy, một operon gồm hai hay nhiều gen nằm cạnh nhau trên một nhiễm sắc thể. Thông thường, đó là các gen cùng tham gia vào một con đường chuyển hóa, ví dụ như các gen mã hóa cho các enzyme cần thiết cho quá trình chuyển hóa glucose.

Do có chung promoter điều khiển cho mọi gen nằm trong một operon cho nên chỉ có một loại phân tử mRNA được tổng hợp từ một operon (mang thông tin di truyền của tất cả các gen nằm trong đó). Nói cách khác, quá trình phiên mã của các gen trong một operon xảy ra đồng thời và phân tử mRNA được tổng hợp cho operon gọi là mRNA-polycistron.

Tuy nhiên, điều cần ghi nhớ là quá trình dịch mã trên các phân tử mRNA-polycistron xảy ra hoàn toàn độc lập với nhau. Mỗi một đơn vị mã gen trên phân tử này đều có vị trí bám của ribosome, có mã bắt đầu và kết thúc tổng hợp chuỗi polypeptide riêng biệt. Do đó, các tổng hợp các protein trên các phân tử mRNA-polycistron hoàn toàn khác nhau (Hình 3.6).



Hình 3.6. Cấu trúc operon trong genome vi khuẩn. Một operon là một đơn vị phiên mã bao gồm một chuỗi các gen cấu trúc (structural genes), một promoter và một operator.

2. Sự phân chia nội bộ của gen

Khái niệm locus của các biến dị cấu trúc của gen trên nhiễm sắc thể, là vị trí của tất cả các allele của dãy allele. Bản thân nhiễm sắc thể allele cho thấy gen có cấu trúc tổ hợp, sự biến dị của gen có thể dẫn đến sự xuất hiện của các allele khác nhau.

2.1. Hiện tượng allele gen

Theo quan niệm cổ điển gen là đơn vị tái tổ hợp. Nếu cá thể mang hai allele lặn a_1/a_2 của một dãy allele sẽ tạo thành hai loại giao tử là a_1 và a_2 , lai phân tích với bố mẹ mang hợp tử lặn sẽ cho kết quả hình thái biến dị a_1 và a_2 mà không có dạng tái tổ hợp hoang dã. Ví dụ:

Bố mẹ	a_1/a_2	×	a_1/a_1
Giao tử	a_1 và a_2		a_1
Các con lai	a_1/a_1 và a_2/a_1 - cả hai đều là kiểu hình đột biến		

Tuy nhiên, nếu thí nghiệm cho thấy sự xuất hiện của các thể thí nghiệm lên 10.000 hoặc 100.000, thì có thể phát hiện có dạng gen kiểu hình hoang dã do tái tổ hợp.

Ví dụ: Trong hợp tử locus một quatrôm ruồi giấm, có 18 allele. Khi tiến hành các thí nghiệm lên nhiễm khuẩn, người ta phát hiện các allele xếp thành 3 nhóm A, B và C. Các allele của cùng một nhóm, khi lai lẫn nhau, không cho kết quả hình thái tái tổ hợp hoang dã mà bình thường, mà chỉ có kết quả hình một quatrôm. Nhưng lai allele của nhóm này với allele của nhóm khác sẽ có xuất hiện kiểu hình hoang dã do tái tổ hợp. Hiện tượng này được gọi là allele gen.

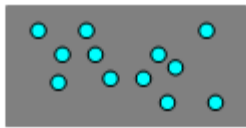
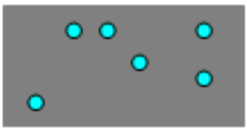
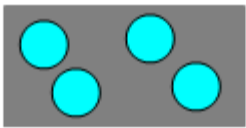

Hiện tượng allele gen cho thấy gen phân chia nội bộ một tái tổ hợp, có thể xảy ra tái tổ hợp giữa các phần trong gen. Lúc này, hiện tượng allele gen được coi là trong hợp tử, nhưng khi tiến hành thí nghiệm lên nhiễm khuẩn thì rõ ràng đó là hiện tượng

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

phân bố. Nó có tìm thấy nhiều loại khác nhau như nấm men *S. cerevisiae*, ngô, bắp, chuột, bacteriophage...

2.2. Locus *rII* của bacteriophage T₄

Nghiên cứu chi tiết về các đột biến *rII* của bacteriophage T₄ đã làm sáng tỏ hơn về cấu trúc gen. Bacteriophage T₄ dạng hoang dã *r*⁺ có khả năng xâm nhiễm đồng thời hai chủng *E. coli* B và K, trong khi các đột biến *rII* chỉ xâm nhiễm chủng B mà không xâm nhiễm chủng K (Hình 3.7).

	Chủng vi khuẩn <i>E. coli</i>	
	B	K
Dạng hoang dã	 Vết tan (plaque) nhỏ	 Vết tan nhỏ
Đột biến <i>rII</i>	 Vết tan lớn	 Không có vết tan

Hình 3.7. Kiểu hình của các đột biến *rII* của phage T₄

Benzer (1955) đã thu được vài nghìn đột biến *rII* có ngẫu nhiên sắp xếp với nhau. Ông cho lai các đột biến này với nhau và chuyển vào sản xuất hiện các dạng tái tổ hợp hoang dã *r*⁺ mà lập bản các vị trí đột biến (mutation sites).

Trước thí nghiệm của ông, *rII* được coi là một locus. Tuy nhiên, thí nghiệm của ông đã cho thấy các đột biến xếp thành hai nhóm *rIIA* và *rIIB*. Lai các đột biến *rIIA* × *rIIB* sẽ có *r*⁺, ngược lại *rIIA* × *rIIA* và *rIIB* × *rIIB* thì kiểu hình đột biến là *r*.

Cho đến nay, chúng ta nhận ra một gen là một đoạn trên kiểu hình đột biến và vị trí trên bản của nó. Bacteriophage là một mô hình di truyền đơn giản (genome của *E. coli* dài khoảng 4.600.000 bp, trong khi bacteriophage T₄ là 165.000 bp và bacteriophage lambda là 46.500 bp), chúng có thể sinh sản rất nhanh (10¹⁰ hoặc hơn trong một giờ) và dễ dàng phân tích. Các thí nghiệm về chức năng vị trí đột biến *rII* của T₄ được thí nghiệm dựa trên các số sau:

- Các gen có một phạm vi và ranh giới hạn chế.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Các gen có thể chia cắt, có thể có sự tái tổ hợp giữa hai allele trong một gen.

- Hoạt động của gen có thể phân tích bằng phân tích bổ sung.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, gen có thể phân chia nhỏ về mặt vật lý. Các operon *rIIA* và *rIIB* cũng là cistron, nên vẫn còn nguyên vẹn một bộ khung xâm nhiễm chủng K. Thuộc tính cistron thực chất là gen, ngày nay nó chỉ có tính chất lịch sử, ít có sự đột biến. Theo quan niệm hiện nay, *rIIA* và *rIIB* là hai locus. Hai khái niệm mới của ra là muton- đơn vị tái tổ hợp và recon- đơn vị tái tổ hợp.

Benzer đã tìm thấy 2.000 đơn vị tái tổ hợp trên operon và nghiên cứu, chúng phân bố không đều nhau, có những điểm trung tâm tái tổ hợp. Chiều dài gen khoảng 900 nucleotide. Đơn vị tái tổ hợp muton này tương đương với 900/2.000. Số tái tổ hợp ghi nhận có thể thấp hơn so với thực tế nên muton có thể tương đương với một cặp nucleotide. Ngược lại với recon có thể tương đương với một cặp nucleotide.

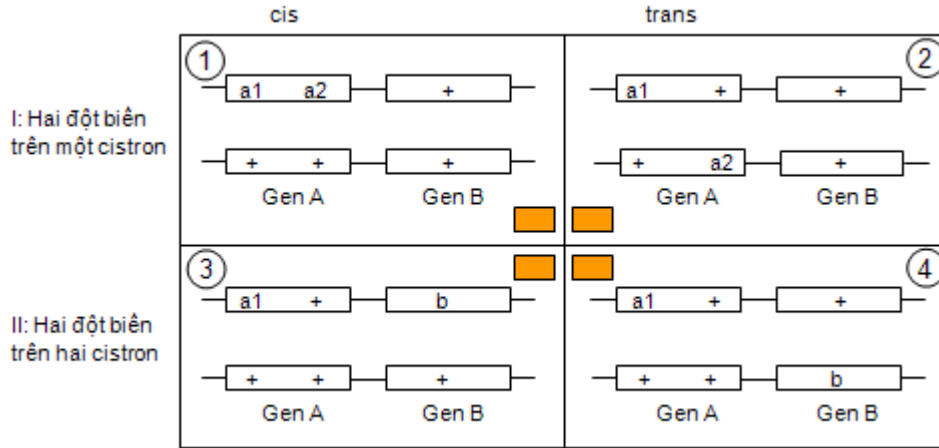
Tóm lại, gen là đơn vị chức năng, có thể chia nhỏ bằng các đơn vị tái tổ hợp.

3. Thí nghiệm về sự đồng allele

Mục đích nghiên cứu cấu trúc bên trong một gen, phải tìm hiểu những allele của gen đó. Những tái tổ hợp có kiểu hình giống nhau nhưng không allele với nhau. Thí nghiệm về sự đồng allele cũng đã được xác định xem hai tái tổ hợp có allele với nhau không. Đây chính là thí nghiệm mà Benzer dùng để lập bản đồ locus *rII*.

Thí nghiệm này còn cũng là thí nghiệm bổ sung (complementary test) vì nó cho biết sự sai lệch chức năng của hai tái tổ hợp bổ sung có bù trừ cho nhau hay không.

Phương pháp này cũng cũng là thí nghiệm đồng-lực (*cis-trans* test). Sự đồng lực này là vì phép thí nghiệm này so sánh kiểu hình của các gen tái tổ hợp hai vị trí khác nhau trên nhiễm sắc thể tương đương. Vị trí lực (*trans*) các tái tổ hợp nằm trên hai nhiễm sắc thể, còn vị trí đồng (*cis*) các tái tổ hợp nằm trên cùng một nhiễm sắc thể. Trường hợp sai lệch hai gen khác nhau nên có thể bổ sung được, còn trường hợp sai lệch cùng một gen không bù trừ được sự đột biến kiểu hình tái tổ hợp.

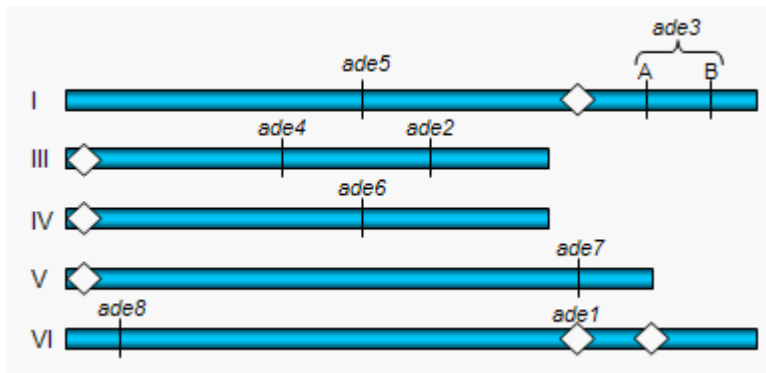


Hình 3.8. Thí nghiệm về tính trội của allele. I: có kiểu hình trội do sai hỏng cùng một gen nên không bù trừ. II: có kiểu hình hoang dã do sai hỏng khác gen nên bù trừ cho nhau.

4. Gen là đơn vị chức năng nhỏ nhất

Thí nghiệm về tính trội của allele có thể thực hiện dễ dàng trên các vi sinh vật vì các đột biến hóa sinh, thường là các đột biến khuyết dưỡng (auxotroph mutant: một chất dinh dưỡng nào đó). Ví dụ: nấm men *Neurospora crassa* có nhu cầu dinh dưỡng adenine (Ade^-). Các đột biến này dễ phát hiện vì có khuẩn lạc màu trắng. Có hai dạng đột biến Ade_x và Ade_y , nếu đột biến Ade_x/Ade_y có kiểu hình đột biến trắng là cho khuẩn lạc màu trắng, thì Ade_x và Ade_y là hai allele của một gen. Thí nghiệm về tính trội của allele cho thấy các đột biến Ade^- *N. crassa* tạo thành 9 nhóm. Nếu có một gen thì có 9 gen dinh dưỡng adenine loài nấm men này: $ade_1, ade_2, ade_3...$ trong đó ade_3 có hai locus liên kết nhau là ade_3A và ade_3B (Hình 3.9).

Qua nghiên cứu các gen sản xuất adenine người ta nhận thấy quá trình tổng hợp adenine có liên quan đến 9 nhóm đột biến của gen này hoặc gen kia, và đều cùng có một kết quả là một chất dinh dưỡng adenine. Như vậy, khái niệm gen không chỉ đơn thuần là đơn vị chức năng nhỏ nhất, mà gen là đơn vị chức năng nhỏ nhất, khi mà tra một giai đoạn nào đó của chu trình. Nếu bị sai hỏng thì di truyền làm sai hỏng chức năng đó sản xuất thì một chất dinh dưỡng adenine.



Hình 3.9. Vị trí các gen *ade* trên các nhiễm sắc thể của nấm *Neurospora crassa*

Tài liệu tham khảo/ bổ sung

1. Huỳnh Thùy Dung. 1998. Sinh học phân tử. NXB Giáo dục, Hà Nội.
2. Phạm Thành Hùng. 2003. Di truyền học. NXB Giáo dục, Hà Nội.
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. 2002. Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. Garland Publishing, Inc. New York, USA.
4. Lewin B. 2000. Gene VII. Oxford University Press, Oxford, UK.
5. Pierce BA. 2003. Genetics: A Conceptual Approach. W.H. Freeman & Co. New York, USA.
6. Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW and Weiner AM. 2004. Molecular Biology of the Gene. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California, USA.

¹Hai mươi amino acid được tìm thấy trong các phân tử protein là: Alanine (Ala), Arginine (Arg), Asparagine (Asn), Aspartic acid (Asp), Cysteine (Cys), Glutamic acid (Glu), Glutamine (Gln), Glycine (Gly), Histidine (His), Isoleucine (Ile), Leucine (Leu), Lysine (Lys), Methionine (Met), Phenylalanine (Phe), Proline (Pro), Serine (Ser), Threonine (Thr), Tryptophan (Trp), Tyrosine (Tyr) và Valine (Val).

Chương 4

Tái bản DNA

I. Chứng minh tái bản DNA theo cách bán bảo thủ

1. Cách tái bản bán bảo thủ

1.1. Cách tái bản prokaryote

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Cơ chế bán bảo thủ (semiconservative replication). Tái bản bán bảo thủ nghĩa là trong hai chuỗi con của các phân tử DNA bao gồm có:

- Một chuỗi DNA cũ (tồn tại trong hai chuỗi của DNA mẹ).
- Một chuỗi DNA mới (mới tổng hợp).

Mỗi lần tái bản đều có sự tách rời của hai chuỗi DNA mẹ, ngay khi mỗi chuỗi mẹ tiến hành sao chép cho một chuỗi con, chuỗi này sau đó liên kết với chuỗi mẹ.

Vị trí mở xoắn kép và tổng hợp DNA mới cùng một lúc trên DNA gốc là chạc ba tái bản (replication fork) do cấu trúc của vùng tái bản có hình chữ Y. Sự tổng hợp DNA mới ngược chiều với vị trí mở xoắn DNA cũ.

1.2. Cơ chế tái bản eukaryote

Sự tái bản tế bào eukaryote phức tạp hơn so với tế bào prokaryote nhưng cơ chế của sự tái bản eukaryote cũng tương tự như prokaryote và tiến hành theo các nguyên tắc:

- Hai hướng.
- B sung, liên song song, theo chiều $5' \rightarrow 3'$.
- Không liên tục trong hai chuỗi.
- Cần nguyên RNA primer.

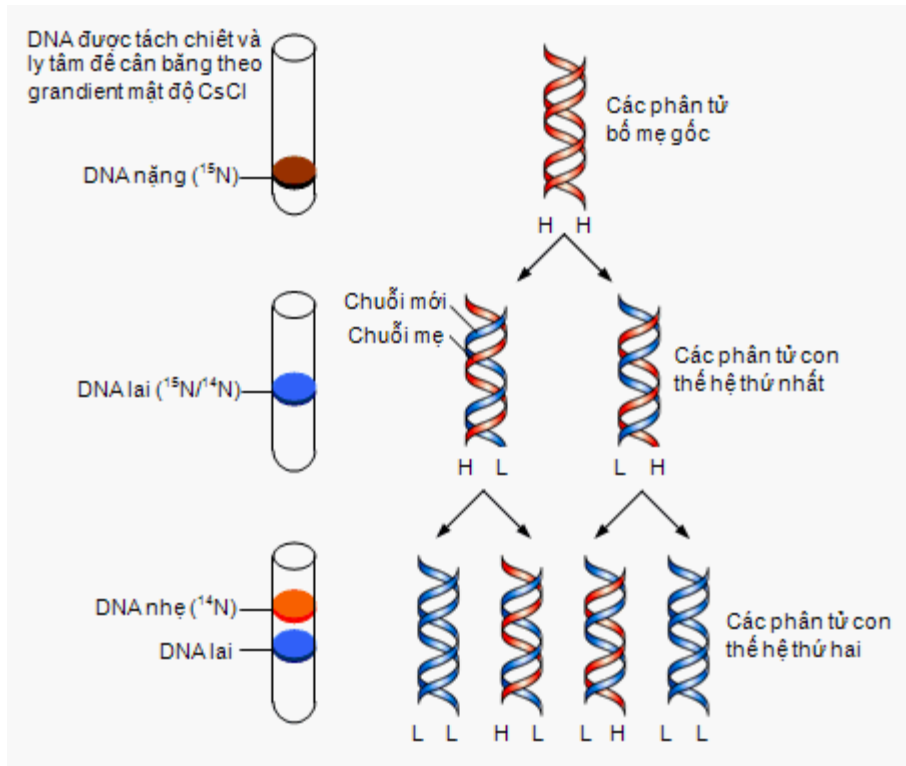
Tuy nhiên, có một số điểm khác nhau sau:

- Trong khi prokaryote chỉ có một điểm khởi đầu, thì sự tái bản eukaryote bắt đầu cùng một lúc nhiều điểm khởi đầu. Điều này là cần thiết do DNA của eukaryote có chiều dài rất lớn.

- Vận tốc phát triển của chạc ba tái bản eukaryote (khoảng 50 nucleotide/s) chậm hơn 1/10 so với *E. coli*.

2. Thí nghiệm của Meselson và Stahl

Những thí nghiệm của Meselson và Stahl (1957) đã chứng minh lý thuyết tái bản DNA theo kiểu bán bảo thủ (Hình 4.1). Các tác giả trên đã nuôi cấy *E. coli* trong môi trường trong môi trường chứa $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ làm nguồn cung cấp nitrogen duy nhất. Bằng cách này, DNA của tế bào có ^{15}N (^{15}N là một chất phóng xạ nặng hơn chất phóng xạ thông thường ^{14}N). Một thời gian nhất định (thời gian 0), các tác giả này đã chuyển nuôi cấy vào môi trường chứa $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$. Tiếp theo, sau một khoảng thời gian nhất định, họ phân tích DNA chiết xuất vì khu vực phân bố theo gradient CsCl.



Hình 4.1. Minh họa tái bản bán bảo thủ. Sơ đồ trình bày sự hình thành các sợi DNA sau 0, 1, và 2 vòng sao chép. H: chuỗi nặng (^{15}N), L: chuỗi nhẹ (^{14}N).

Kết quả thực nghiệm cho thấy:

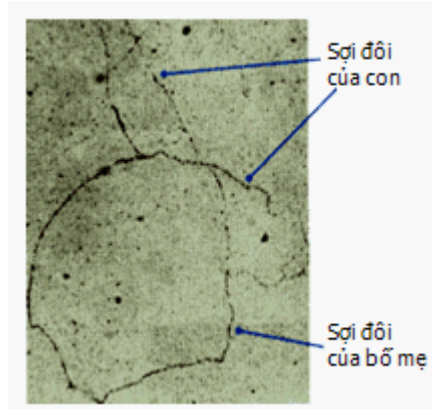
- Thời điểm 0: chỉ có một phân tử tổng hợp vi DNA nặng ^{15}N .
- Sau một thế hệ trong môi trường chứa ^{14}N : nhng phân tử DNA gồm một chuỗi nặng ^{15}N (chủ yếu) và một chuỗi nhẹ ^{14}N (mới tổng hợp).
- Sau hai thế hệ trong môi trường chứa ^{14}N : có hai phân tử lai (gồm một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ) và hai phân tử gốc gồm hai chuỗi nhẹ không có chuỗi nặng.

II. Mô hình tái bản DNA-chức năng tái bản

1. Mô hình tái bản

Mô hình tái bản được nghiên cứu trên thí nghiệm sử dụng vi khuẩn *E. coli*, DNA có dạng mạch vòng sợi (Hình 4.2). Kết quả tái bản DNA phi tháo xoắn ra ngoài môi trường nuôi cấy và những xu hướng chức năng tái bản (Hình 4.3).

Thí nghiệm của Cairns. Sử dụng nucleotide đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ trong môi trường nuôi cấy phân chia, ta sẽ biết được trình tự tái bản do hướng của chuỗi DNA mới hình thành.

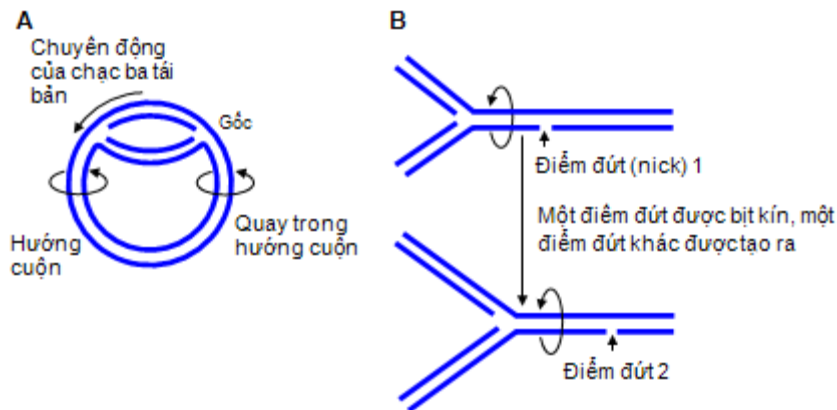


Hình 4.2. DNA đang mọc vòng sợi đôi. Chiều dài thốt 1,6 mm ($4,7 \times 10^6$ bp).

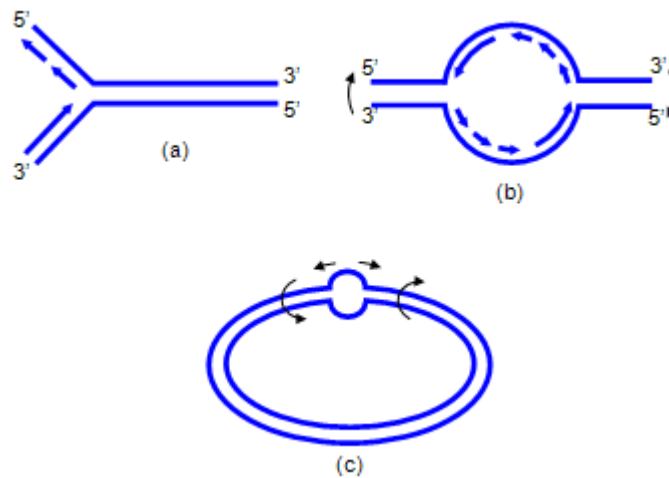
2. Chức năng tái bản

Hình 4.4 mô tả cấu trúc của chức năng tái bản. Nhờ vào phương pháp phóng xạ như ghi, người ta nhận thấy sự tái bản theo hai hướng (bidirectional synthesis).

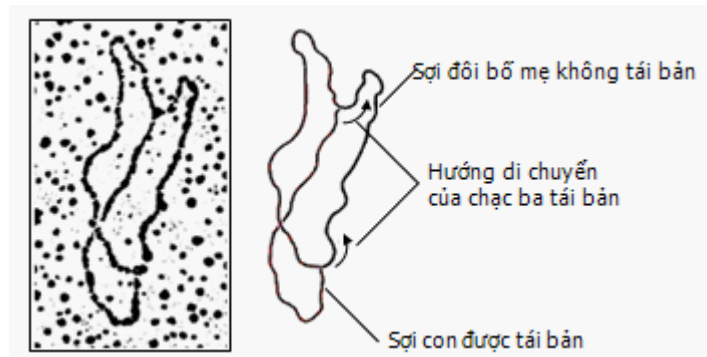
Người thí nghiệm chứng minh rằng vi khuẩn *E. coli* (prokaryote) có duy nhất một điểm gốc tái bản, đó là điểm mà hai chuỗi xoắn kép của DNA mới tách ra, từng hướng về hai chức năng tái bản phát triển ngược chiều nhau. Chuỗi DNA sau khi tách ra sẽ dùng làm khuôn mẫu cho sự tổng hợp DNA mới (Hình 4.5).



Hình 4.3. Sự tái bản và phân tách DNA sợi đôi mọc vòng của *E. coli*. A: sự chuyển động không cuộn lại của các nhánh trong quá trình tái bản, không có các vị trí quay tự do, gây ra sự cuộn lại quá chặt của phân tử không tái bản. B: chức năng của nick ở phía trước của chạc ba tái bản cho phép sự quay xảy ra.

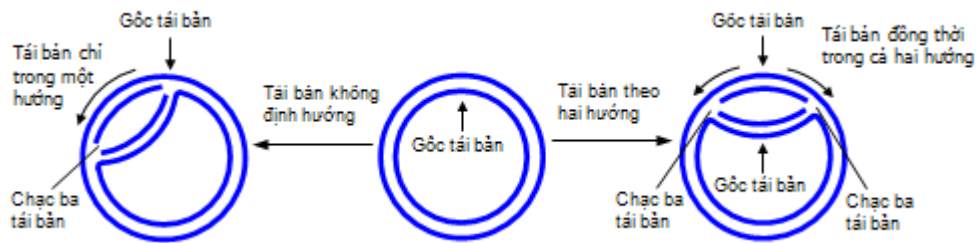


Hình 4.4. Sơ đồ cấu trúc của các chuỗi ba tái bản. (a): Chuỗi ba trình bày sợi ch (leading strand) được tổng hợp liên tục và sợi th (lagging strand) được tổng hợp gián đoạn. (b): Chuỗi ba ôi, phân bố trong hệ thống tái bản DNA của genome. (c): Các hình ảnh hình học của tái bản DNA, mô tả tên gọi của chuỗi chuyển động mã hóa của chuỗi ba, mô tả dài và cong chuỗi quay vòng DNA nên thì t quanh các chuỗi ba.



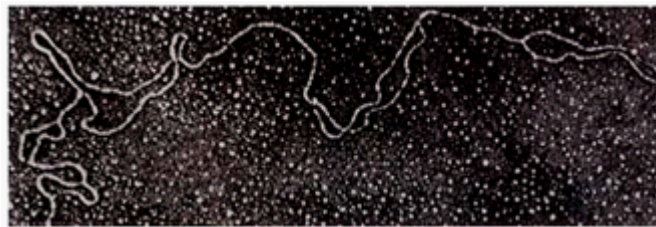
Hình 4.5. Hình ảnh hiển vi điện tử. Phân tử DNA mạch vòng như của *E. coli* có chiều dài thực tế 0,01 mm (3.000 bp) tái bản bằng kỹ thuật. Các phân tử DNA bố mẹ và con trình bày trong hình vẽ.

Hình 4.6 so sánh sự khác nhau giữa tái bản DNA không nhúng và tái bản theo hai hướng. Trong tái bản không nhúng, chỉ có một chuỗi ba tái bản. Trong khi tái bản theo hai hướng yêu cầu hai chuỗi ba tái bản. Mô tả cong chuỗi hướng chuyển động của các chuỗi ba. Hệ thống DNA tái bản theo hai hướng.

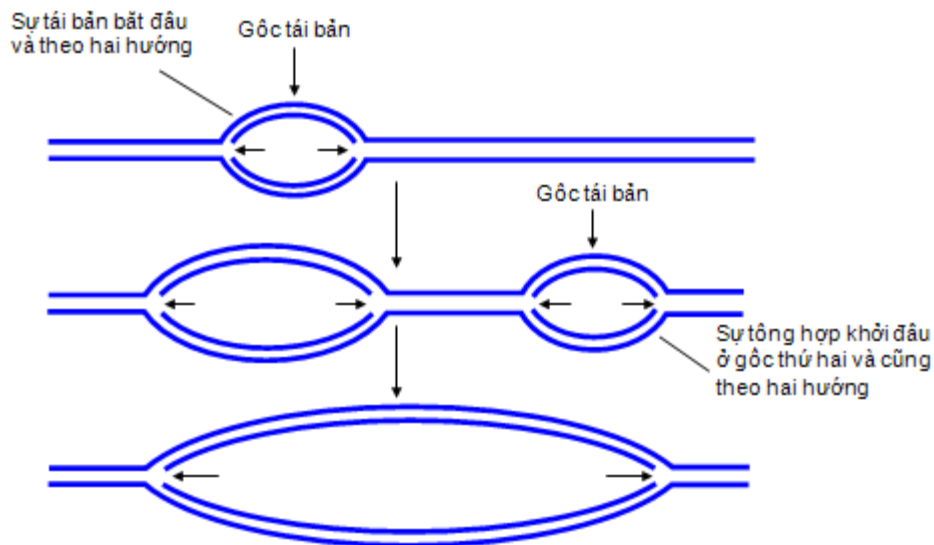


Hình 4.6. Tái b n DNA không nh h ng và theo hai h ng

Hình 4.7 và 4.8 mô t ph ng th c h p nh t các vòng tái b n DNA ru i gi m (*D. melanogaster*). Quá trình tái b n di n ra ng th i trên hàng ch c ngàn v trí khác nhau c a phân t DNA và t o thành các vòng tái b n, các vòng tái b n sau ó s m r ng theo hai h ng cu i cùng h p nh t v i nhau t o thành hai phân t DNA.



Hình 4.7. Hình nh d i kính hi n vi i n t c a m t o n nucleotide ru i gi m. Phân t DNA s i ôi dài 30 kb cho th y có 7 vòng tái b n.

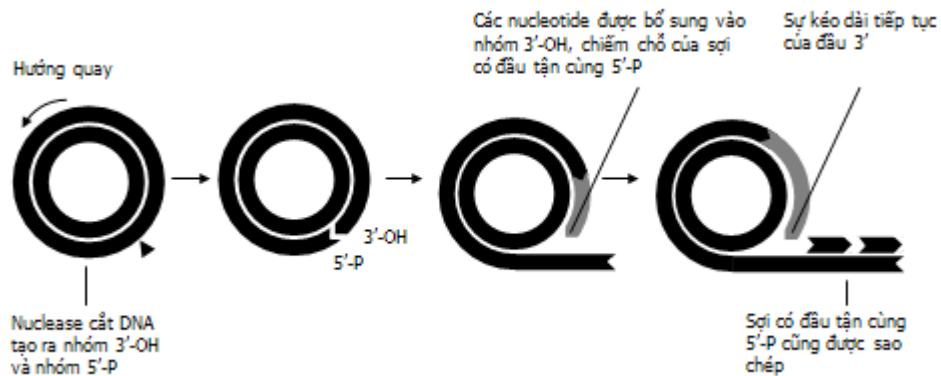


Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Hình 4.8. Phương thức hình thành các vòng tái bản DNA của ruồi giấm. Hai giai đoạn tái bản được trình bày trên hình vẽ, các mũi tên nhỏ chỉ hướng chuyển động của các chuỗi ba tái bản.

3. Tái bản DNA theo vòng tròn quay

Trong họ bacteriophage (thực khuẩn thể) có một chi đặc biệt là một phân tử DNA mạch thẳng ngắn sợi, khi ta chuyển chúng vào vi khuẩn thì các đầu dính kết DNA (*cos*) của nó gắn liền theo đường vòng tròn. Sự dính kết liên tiếp này là do hoạt động của enzyme DNA ligase giúp tạo liên kết chéo. Khi đó, sự tái bản DNA tiến hành theo chiều vòng tròn quay (Hình 4.9).



Hình 4.9. Tái bản vòng tròn quay bacteriophage λ . DNA mạch thẳng ngắn sợi có màu nhạt. Sự thay thế các tái bản trong các vòng tròn.

III. Bản chất xoắn của DNA-Các giai đoạn của tái bản

Hình 4.10 mô tả toàn bộ quá trình tái bản DNA. Quá trình này trải qua ba giai đoạn chính sau:

1. Khởi đầu

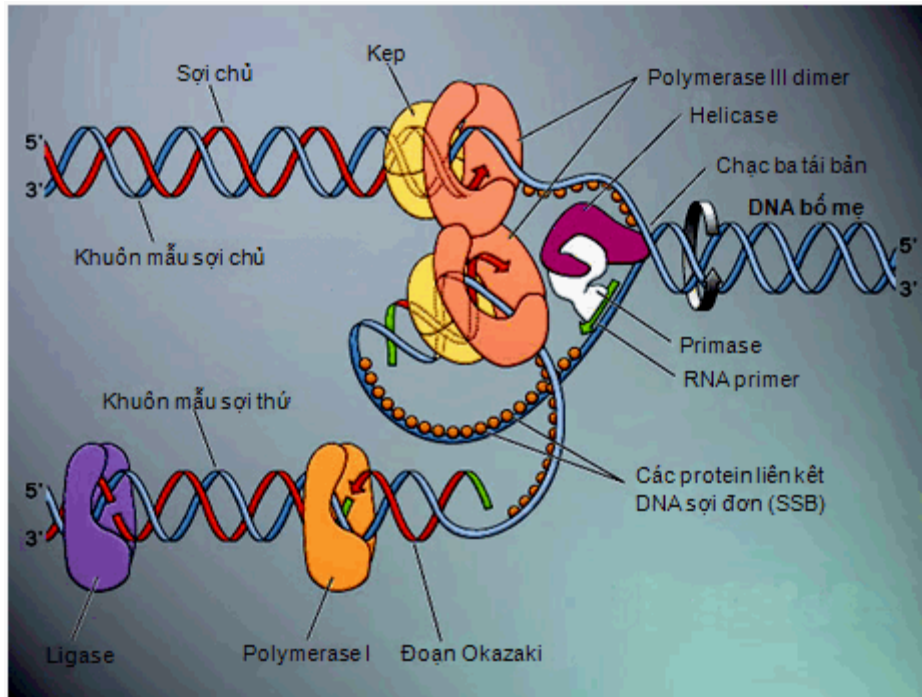
Trước tiên ta thấy quá trình khởi đầu của hai sợi DNA cũ thì tất cả có mặt enzyme rất quan trọng đó là helicase (còn gọi là enzyme khởi đầu).

Chẳng hạn, trên phân tử *E. coli* chỉ có một gốc tái bản (ký hiệu là *ori C*) dài 245 bp. Có ít nhất 8 enzyme hoặc protein tham gia vào giai đoạn khởi đầu của tái bản. Nhóm enzyme-protein này khởi đầu DNA gốc *ori C* và thiết lập một phức hợp tiền khởi đầu (prepriming complex) chuẩn bị cho những pha tiếp theo của giai đoạn sau.

Một phức hợp khoảng 20 protein Dna A tích tụ tại vùng của *ori C* bắt đầu cho quá trình khởi đầu và khởi đầu sự tái bản. Phần này cần ATP và một protein gì đó như histone của vi khuẩn (HU). Tiếp đó, protein Dna C giúp protein Dna B gắn vào vùng *ori C*, Dna B chính là helicase sẽ khởi đầu DNA theo hai hướng tạo ra hai

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

chức năng tái bản. Các phân tử protein liên kết sợi đơn (single stranded binding protein, protein SSB) gắn vào chuỗi đơn DNA để ngăn chặn chuỗi đơn này. Enzyme gyrase (DNA topoisomerase II) làm xoắn tiếp theo siêu xoắn trái (-). Enzyme primase (protein Dna G) sẽ xúc tác tổng hợp RNA primer gắn vào khuôn mẫu DNA.



2. Kéo dài-Tổng hợp chuỗi Okazaki

Giai đoạn kéo dài bao gồm sự tổng hợp cùng một lúc hai chuỗi DNA. Một chuỗi được tái bản cùng hướng phát triển của chạc ba sao liên tục (sợi chủ), còn chuỗi kia sẽ không liên tục bao gồm các đoạn Okazaki (sợi thứ). Các nucleotide gắn vào đầu 3' tự do, và kéo dài chuỗi ra như enzyme DNA polymerase III theo chiều 5'→3'. Trong giai đoạn này, nhiều enzyme đã tham gia vào sự tổng hợp hai chuỗi DNA để thực hiện tái bản. DNA helicase tiếp tục tách hai chuỗi DNA mẹ, DNA gyrase làm xoắn, protein SSB ngăn chặn chuỗi DNA mẹ để không tách ra, DNA ligase gắn các đoạn Okazaki trên sợi thứ.

Sinh tổng hợp DNA trong tế bào cùng một lúc diễn ra trên rất nhiều vị trí (20.000-60.000) suốt chiều dài khổng lồ của DNA khuôn mẫu. Tại các vị trí đó, enzyme helicase giúp DNA chuyển từ dạng siêu xoắn sang dạng dẫn (hai sợi DNA tách ra) với tốc độ 10 μm/giây. Với tốc độ này, helicase có thể chỉ yêu cầu suốt chiều dài chuỗi DNA trong một tế bào cây ung thư (DNA dài tổng cộng khoảng 9 m) phải mất hàng triệu năm. Trong thực tế, công việc này chỉ mất khoảng 15-40 giây.

Chuỗi DNA xoắn kép như vậy sẽ tách rời các vị trí xoắn và sinh tổng hợp, hình thành các chạc ba. Ở chạc ba, hai chuỗi DNA mẹ chỉ cần được sửa chữa để

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

khuôn mẫu cùng một lúc. Trên một chuỗi, sinh tổng hợp sẽ diễn ra theo chiều từ 5'→3' cùng chiều với chiều phát triển của các tái bản. Trên sợi còn lại, sinh tổng hợp vẫn diễn ra theo chiều từ 5'→3' nhưng ngược chiều với chiều phát triển của các tái bản, và chính vì thế các đoạn ngắn khoảng 1.000 nucleotide (đoạn Okazaki). Trong khi di chuyển trên quãng, enzyme primase sẽ tổng hợp những đoạn RNA primer ngắn (11±1 nucleotide) để DNA có thể tiếp nhận DNA polymerase III. Khi đoạn Okazaki hoàn thành, RNA primer sẽ tách ra nhờ DNA polymerase I (hoạt tính exonuclease 5'→3') và được thay thế bởi DNA của mạch gốc cùng enzyme. Các khe hở còn lại giữa các đoạn Okazaki sẽ được DNA ligase gắn và DNA trở lại dạng chuỗi xoắn kép: một phân tử DNA mới được hình thành (Hình 4.11).

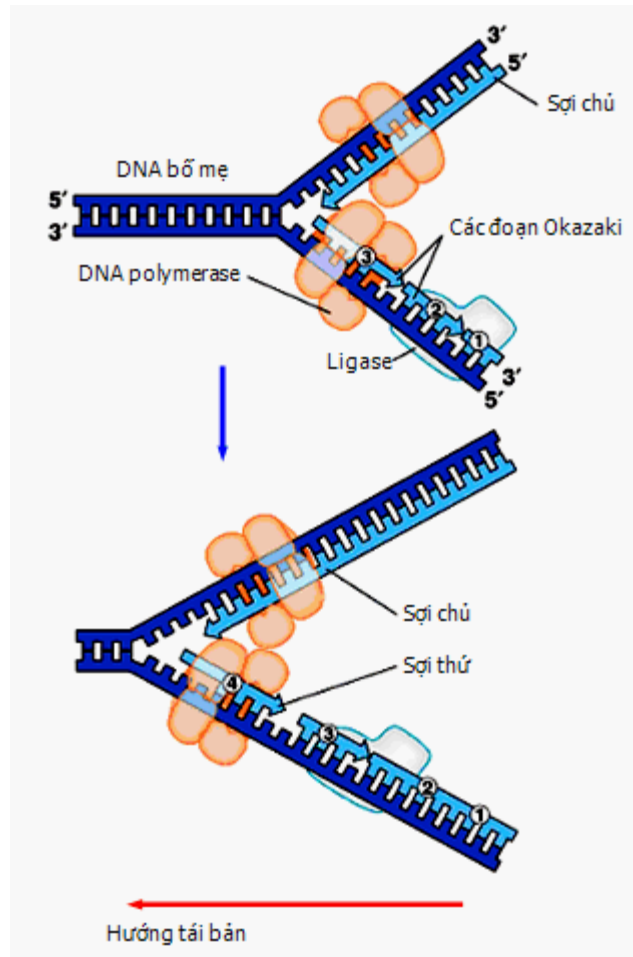
3. Kết thúc

Cuối cùng, hai chuỗi tái bản gặp nhau phía đi ngược nhau để hình thành vòng của *E. coli*. Ngay tại vị trí nút thắt của vòng phân tử này. Có thể hoạt động của một loại DNA topoisomerase là cần thiết để tách hai phân tử DNA vòng đã kết hợp. Quá trình phân đôi hai phân tử DNA trong tế bào con khi phân chia tế bào cũng chính là kết quả của quá trình này.

IV. Khái niệm mồi

Tái bản DNA chỉ xảy ra khi có sự khởi đầu mồi. Thành mồi (primer) là một đoạn RNA ngắn gắn trên chuỗi DNA.

Quan sát các chuỗi tái bản thấy DNA polymerase gắn nhóm phosphate vào đầu 3'-OH tự do. Tuy nhiên, lúc đầu chuỗi chưa có đầu 3'-OH tự do, do đó ngay khi bắt đầu tái bản enzyme RNA polymerase (enzyme primase) sẽ hoạt động để tạo nên một đoạn mồi ngắn có đầu 3'-OH tự do, nhờ đó DNA polymerase mới bắt đầu hoạt động tái bản.

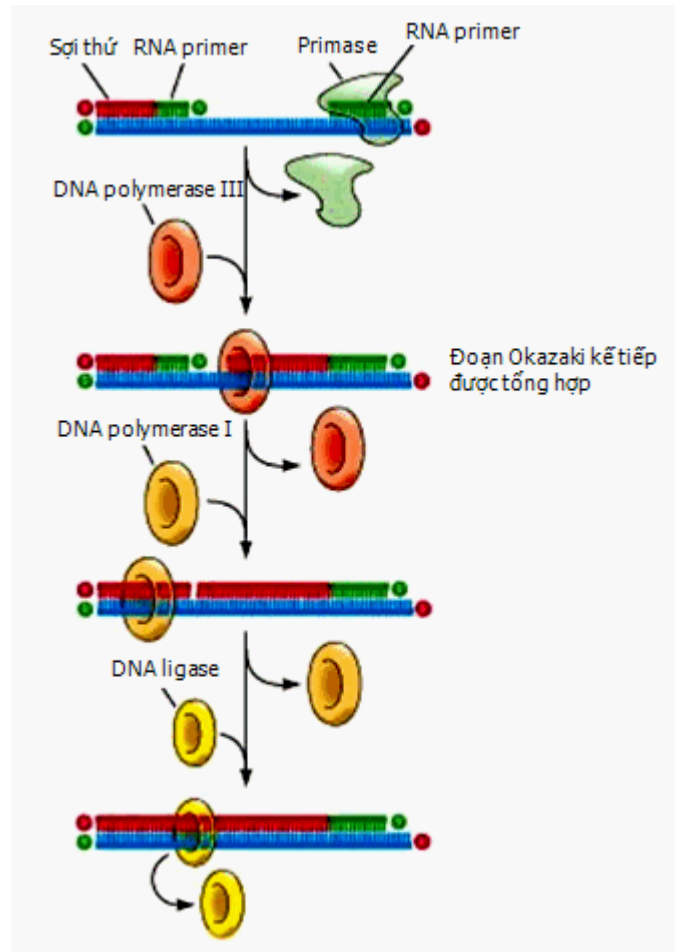


Hình 4.11. Hai sợi DNA mới được tổng hợp theo hai chiều khác nhau

Nghiên cứu tái bản bacteriophage M13 (DNA mắt xích vòng). Giả sử DNA (+) (M13) là sợi (+). Tới sợi (+) tạo ra đường tái bản (-), sợi (-) này sử dụng làm khuôn tạo ra sợi (+) khác.

DNA polymerase không hoạt động, nếu không có mồi ghép vào sợi (+) ở đầu tiên. Enzyme RNA polymerase tổng hợp mồi bằng cách bổ sung một số nucleotide vào vị trí khởi đầu tái bản, do đó ở 3'-OH tự do. RNA polymerase bao gồm các tiểu đơn vị α_2 , β , β' và ω . Chất kháng sinh rifampicin có tác dụng ức chế tiểu đơn vị β , khi có RNA polymerase sẽ bị ức chế và M13 không có khả năng tái bản. Như vậy, chính RNA polymerase giữ vai trò khởi đầu sau đó DNA polymerase mới bắt đầu hoạt động tái bản. Vì vậy, đầu tiên phải có mồi tổng hợp với DNA bằng liên kết cộng hóa trị, và mồi này do RNA polymerase tổng hợp nên.

Tiếp theo, mồi RNA sẽ bị DNA polymerase (khác với DNA polymerase tái bản trên). DNA polymerase này bắt đầu gắn các nucleotide vào đầu 3'-OH tự do, và sau cùng enzyme DNA ligase nối các đoạn tái bản này lại (Hình 4.12).



Hình 4.12. Tổng hợp các đoạn Okazaki. Quá trình này đòi hỏi sự gắn kết, kéo dài, loại bỏ RNA, làm đầy các khoảng trống và hàn các đầu. Primase tổng hợp đoạn mồi RNA, DNA polymerase III kéo dài đoạn mồi RNA thành đoạn Okazaki ngắn, DNA polymerase I sử dụng mã di truyền để thay thế đoạn mồi RNA bằng DNA, và cuối cùng DNA ligase hàn đầu.

Như vậy, vì cần tái bản DNA cần các enzyme sau:

- Helicase: mở xoắn tách sợi DNA đang xoắn.
- SSB: gắn trên DNA để sợi luôn luôn tình trạng mở.
- RNA polymerase (primase): tác động hình thành đoạn mồi RNA.
- DNA polymerase I: loại bỏ đoạn mồi RNA.
- DNA polymerase III (khác với loại trên) tác động tổng hợp DNA bằng cách kéo dài đoạn mồi RNA.
- DNA ligase: gắn các đoạn Okazaki lại thành phần.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

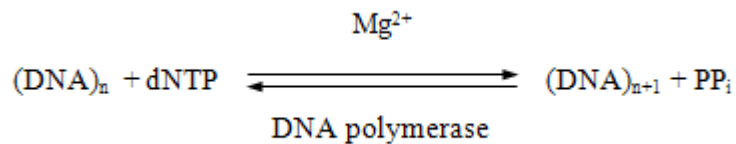
Từ các nghiên cứu về tái bản DNA của bacteriophage M13, người ta đã đưa ra sự giải thích về sự biến đổi DNA của M13 thành dạng sao chép tái bản (RF).

Và quan sát trên các bản sao phát triển, ta có thể theo dõi các tái bản liên tục và không liên tục của các đơn DNA mới bổ sung cho sợi DNA khuôn mẫu.

V. Enzyme tái bản

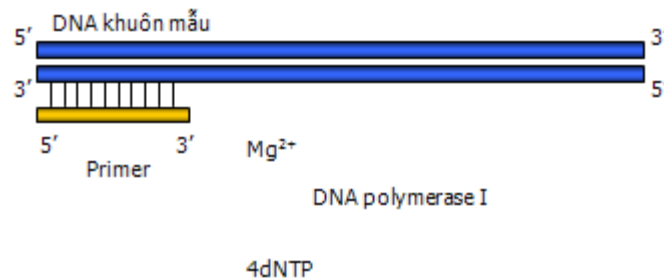
1. DNA polymerase

Đây là enzyme chịu trách nhiệm tái bản, chịu trách nhiệm tổng hợp hai chuỗi DNA mới. Có ba loại DNA polymerase khác nhau, các ký hiệu là I, II và III. Chức năng và vai trò của các enzyme DNA polymerase cũng rất khác nhau.



1.1. DNA polymerase I

Do Kornberg phát hiện năm 1955. DNA polymerase I của *E. coli* mang chuỗi polypeptide có khối lượng phân tử là 109.000 Da và có ba hoạt tính riêng biệt. Nhiệm vụ chính của DNA polymerase I là xúc tác cho quá trình lắp ráp các dNTP thành các mạch mới vào đầu 3' tận của các đơn mạch đang gắn trên DNA khuôn mẫu. Kết quả là sợi DNA mới sẽ dài dần về phía đầu 3' (Hình 4.13).



Hình 4.13. Các thành phần cần thiết cho sinh tổng hợp DNA

DNA polymerase I của *E. coli* còn có hoạt tính exonuclease (hoạt tính cắt các chuỗi nucleotide các đầu tận của DNA) 3' → 5' xúc tác cho sự thoái hóa bậc thang từ đầu 3'

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

các DNA sợi đôi và sợi đơn khi không có dNTPs. Trong trường hợp có dNTPs, hoạt tính exonuclease trên sợi đôi sẽ ức chế hoạt tính polymerase. Trong quá trình tổng hợp DNA, hoạt tính exonuclease thể hiện chức năng sửa chữa bằng cách cắt bỏ những nucleotide lắp ráp sai.

Ngoài ra, enzyme này còn có hoạt tính exonuclease 5'→3' xúc tác cho sự chuyển các nucleotide từ đầu 5' của mạch và bổ sung các nucleotide từ đầu 3' tạo ra chuyển mạch của mạch theo DNA.

1.2. DNA polymerase II và DNA polymerase III

Khi đó, enzyme DNA polymerase I sẽ xem như giữ vai trò chủ yếu trực tiếp trong tái bản DNA. Nhưng sau đó, người ta quan sát thấy *E. coli* tái bản không có DNA polymerase I mà vẫn có sự tái bản, và phát hiện rằng chính DNA polymerase III giữ vai trò tái bản DNA. Nghiên cứu tính chất và so sánh ba loại enzyme trên người ta nhận thấy DNA polymerase III mới là enzyme thực sự chịu trách nhiệm tổng hợp DNA. Trong khi đó DNA polymerase I chỉ có vai trò loại bỏ RNA mới như các đầu 5'→3' và thay vào chỗ RNA mới bằng DNA khác, còn DNA polymerase II chỉ ảnh hưởng, có lẽ nó tham gia vào quá trình sửa chữa (thay mới một đoạn DNA hỏng bằng một đoạn DNA bình thường) hoặc thay thế DNA polymerase I khi có khó khăn trong tổng hợp DNA.

Với các làm việc, các DNA polymerase rất khác nhau. Trong một giây, DNA polymerase I gắn được 10 dNTP trong khi DNA polymerase II chỉ gắn được 0,5 dNTP và DNA polymerase III gắn được tới 150 dNTP.

2. Các topoisomer và DNA topoisomerase

2.1. Topoisomer

Giống có hai phân tử DNA mạch vòng có cùng trình tự nucleotide. Nhưng hai phân tử này có thể có số vòng (linking number-Lk) khác nhau trong phân tử. Số vòng này có thể hiểu là số lần các mạch DNA quấn xung quanh mạch khác. Nhưng trường hợp này chúng ta gọi là topoisomer. Topoisomer có các dạng sau:

2.1.1. Dạng lỏng lẻo (relaxed DNA)

Dạng này sẽ có các xoắn kép là tối thiểu. Đó là dạng cấu trúc bình thường của phân tử.

2.1.2. Dạng siêu xoắn (supercoiled DNA)

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Trục của xoắn kép có thể cuộn xung quanh mình tạo thành một siêu xoắn. Có hai dạng siêu xoắn sau:

- **Siêu xoắn dương (+)**. Siêu xoắn dương, xoắn kép xoắn cùng chiều (xoắn phải) tạo thành dạng siêu xoắn dương (positive supercoil).

- **Siêu xoắn âm (-)**. Siêu xoắn âm, xoắn kép xoắn theo chiều ngược lại (chiều trái) tạo thành dạng siêu xoắn âm (negative supercoil).

Phần lớn những phân tử DNA trong tế bào đều có dạng siêu xoắn âm.

2.2. DNA topoisomerase

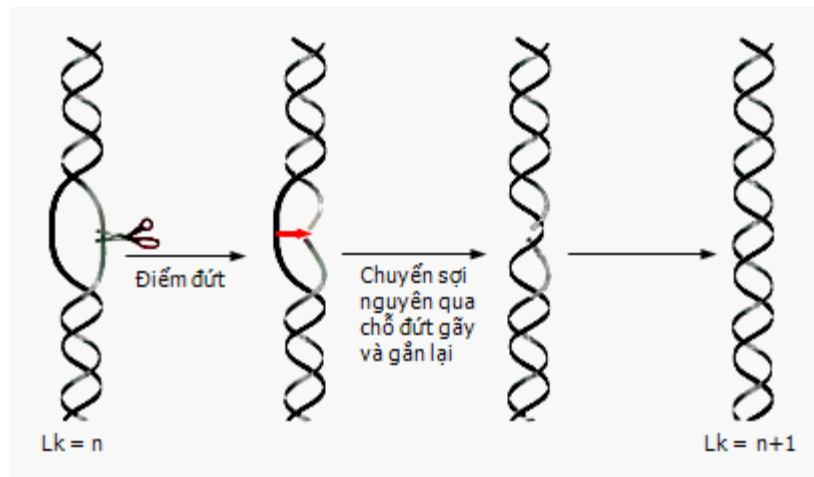
Enzyme DNA topoisomerase (là một enzyme nuclease thực hiện chức năng) có tác dụng thay đổi số liên kết của DNA. Các DNA topoisomerase có tác dụng thêm vào hoặc loại bỏ các dạng siêu xoắn trong phân tử DNA xoắn kép. Có hai loại DNA topoisomerase sau:

2.2.1. DNA topoisomerase I

DNA topoisomerase I tồn tại ở cả prokaryote lẫn eukaryote và có tác dụng sau:

- Cắt một chuỗi DNA và tháo một vòng xoắn sau vị trí cắt.

- Nối lại chuỗi DNA đã bị cắt bởi liên kết phosphodiester mới. DNA sau khi tái tạo lại có cấu trúc lỏng lẻo hơn (Hình 4.14).



Hình 4.14. Chức năng của topoisomerase I. Enzyme cắt một sợi DNA siêu xoắn, chuyển sợi nguyên vẹn qua chỗ đứt gãy, sau đó hàn chỗ đứt gãy lại. Quá trình này tăng số liên kết lên 1.

2.2.2. DNA topoisomerase II

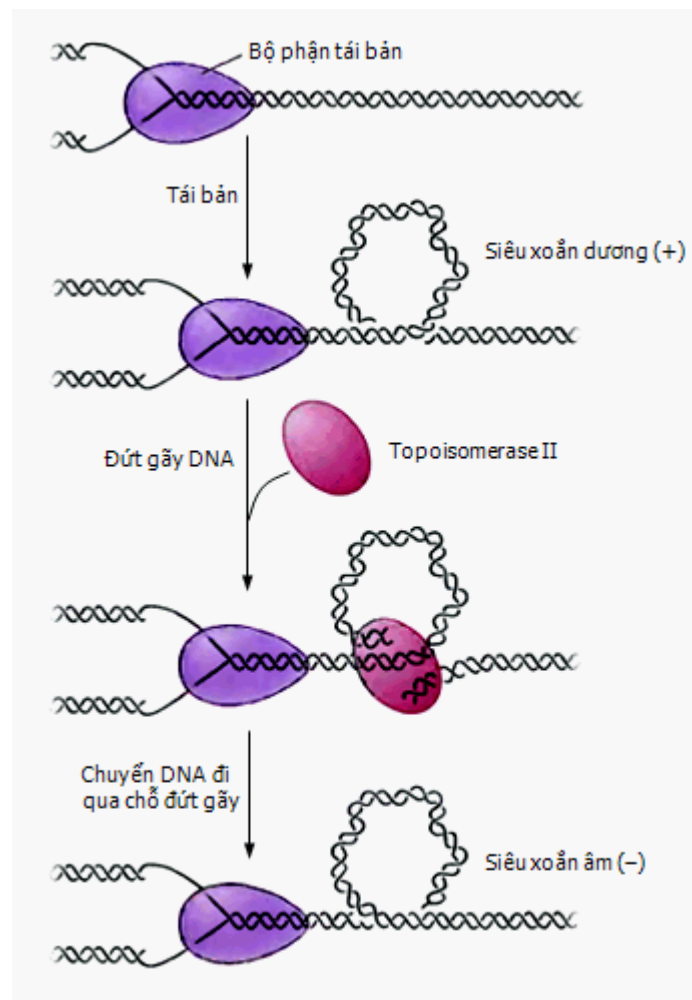
prokaryote, DNA topoisomerase II có tên là DNA gyrase. DNA topoisomerase II có tác dụng cắt một chuỗi DNA, có tác dụng xoắn lại siêu xoắn, tạo ra siêu xoắn trái (-) của chuỗi DNA xoắn kép (Hình 4.15). Phản ứng này cần 1 ATP.

eukaryote, DNA topoisomerase II cũng có tìm thấy những ít nghiên cứu.

3. Helicase và protein SSB

3.1. Helicase

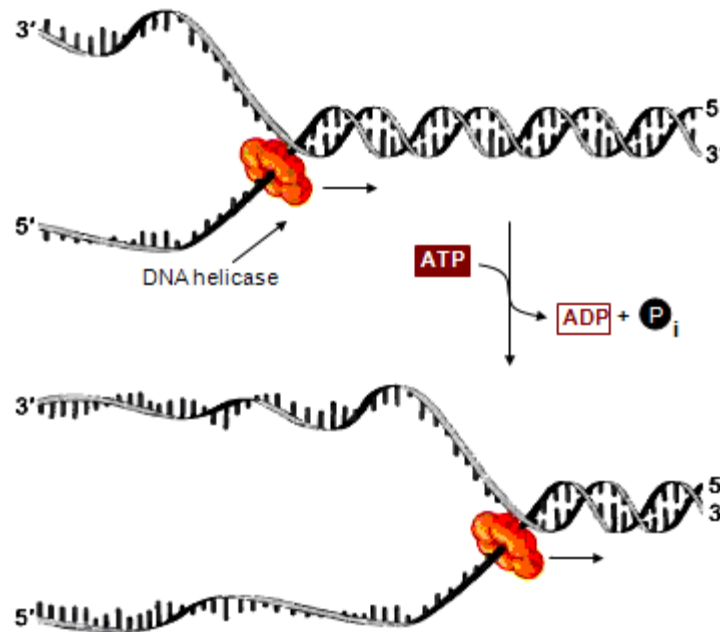
Enzyme helicase (còn có tên là enzyme deroulase) có nhiệm vụ giúp chuỗi DNA tách siêu xoắn sang dạng dẫn thành hai sợi riêng biệt cách các liên kết hydrogen giữa những base bổ sung. Dạng cấu trúc này cần thiết cho các oon trên chuỗi DNA mà có nhu cầu sinh tổng hợp. Phản ứng này cần có mặt của ATP (Hình 4.16).



Hình 4.15. Hoạt động của topoisomerase II tách ba sao chép

3.2. Protein SSB

Các protein SSB liên kết với DNA sợi đơn không liên kết với DNA sợi đôi. Chúng có cấu trúc giống như các chốt phích trong ổ đòng phân tử xuất phát từ chúng có khả năng phá vỡ sợi đơn của các cấu trúc cục bộ bên trong sợi nucleotide; tăng nhanh sự tái cấu trúc của các polynucleotide bất kỳ và tăng hoạt tính của các DNA polymerase bằng cách loại bỏ các cấu trúc cục bộ bên trong sợi là nguyên nhân của các enzyme này (Hình 4.17). Về mặt chức năng, các protein SSB trở thành các chốt phích hữu ích trong xác định trình tự DNA.

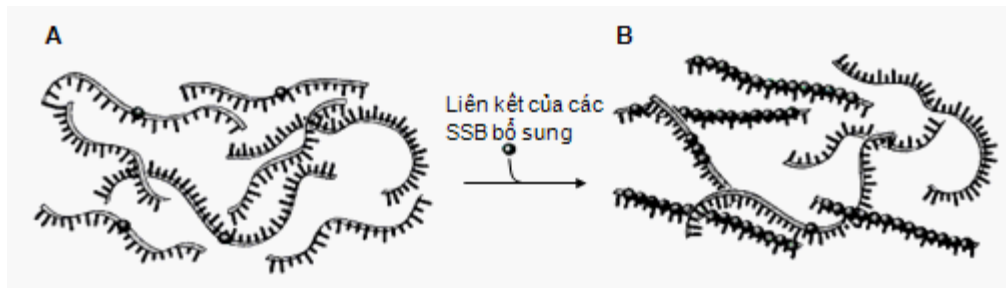
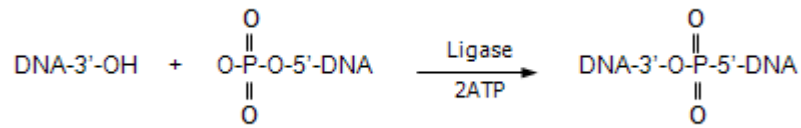


Hình 4.16. Hoạt động của enzyme helicase. DNA helicase tách rời hai sợi của chuỗi xoắn kép. Khi ATP được bổ sung vào DNA helicase liên kết với sợi đơn, thì helicase di chuyển và phân tách các xác định trên DNA sợi đơn. Phân tách này là DNA helicase liên kết với khuôn mẫu sợi trên chuỗi ba tái bản.

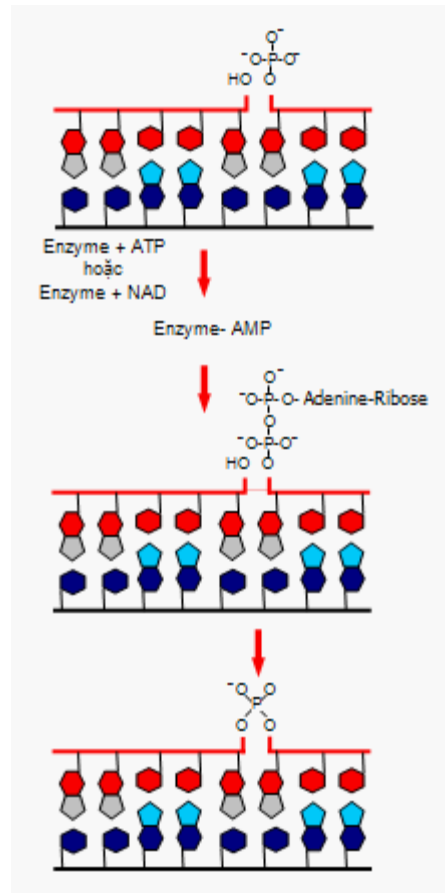
4. DNA ligase

Có nhiệm vụ nối hai đầu 3'-OH và 5'-PO₄ của hai đoạn DNA rời thành một đơn liên tục. Một phân tử cần hai phân tử năng lượng là 2ATP (đối với eukaryote) hoặc NAD⁺ (đối với vi khuẩn).

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html



Hình 4.17. Liên kết của protein SSB lên DNA sợi đơn. Một lượng nhỏ của SSB liên kết với 4 trong 9 phân tử DNA sợi đơn. Khi bổ sung thêm protein SSB, nó sẽ liên kết với các protein SSB đã liên kết trước. Chỉ sau khi protein SSB bao bọc hoàn toàn các phân tử DNA sợi đơn ban đầu, thì nó mới tiếp tục liên kết với các phân tử DNA sợi đơn khác.



Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Hình 4.18. DNA ligase hàn các i m t gi a các nucleotide g n nhau

Các i m c a DNA ligase là không làm vi c v i các s i DNA n (single strand) mà chỉ hàn n i các o n DNA d ng chu i xo n kép. Khi n i DNA, có th g p 2 tr ng h p: u so le- u dính (protruding ends-cohesive ends) ho c u b ng (blunt ends). Tr ng h p u so le, các nucleotide n m trên ph n so le c a hai o n DNA ph i t ng ng thì DNA polymerase m i ho t ng c.

Tài li u tham kh o/ c thêm

1. **Ph m Thành H** . 2003. Di truy n h c. *NXB Giáo d c*, Hà N i.
2. **Lê c Trình**. 2001. Sinh h c phân t c a t bào. *NXB Khoa h c và K thu t*, Hà N i.
3. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD**. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd ed. *Garland Publishing, Inc.* New York, USA.
4. **Karp G**. 2002. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. 3rd ed. *John Wiley & Sons, Inc.* New York, USA.
5. **Lewin B**. 2000. *Gene VII*. *Oxford University Press*, Oxford, UK.
6. **Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL and Darnell J**. 2004. *Molecular Cell Biology*. 5th ed. *Freeman and Company*, New York, USA.
7. **Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW and Weiner AM**. 2004. *Molecular Biology of the Gene*. *The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.* California, USA.
8. **Weaver RF**. 2003. *Molecular Biology*. 2nd ed. *McGraw-Hill Company*, New York, USA.

Ch ng 5

Phiên mã

Phiên mã là quá trình t ng h p RNA t khuôn m u DNA. Quá trình này v ph ng di n hóa h c và enzyme r t gi ng v i quá trình tái b n DNA. C hai u liên quan n các enzyme t ng h p m t chu i nucleic acid m i b sung v i khuôn m u DNA. T t nhiên, hai quá trình này có nh ng khác bi t quan tr ng, mà áng chú ý nh t là chu i m i trong quá trình phiên mã c t o thành t các ribonucleotide thay vì các deoxyribonucleotide. Các nguyên t c c b n c a quá trình phiên mã c thi t l p d a vào nghiên c u trên prokaryote (*E. coli*) nh ng d ng nh các nguyên t c này c ng có tính ph bi n cho c eukaryote. Tuy nhiên, do s khác bi t v c u trúc genome và h

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

thông enzyme nên sự phiên mã ở prokaryote và eukaryote cũng có những đặc trưng nhất định.

I. Các đặc điểm cơ bản của quá trình phiên mã

1. Sự phiên mã tổng hợp RNA dựa trên khuôn mẫu DNA

Các ribonucleotide mới tiếp tục RNA được xác định dựa trên nguyên tắc bổ sung với các nucleotide trên DNA khuôn mẫu. Khi sự bắt cặp chính xác xảy ra, ribonucleotide tiếp theo sẽ liên kết ngay hóa trị với chuỗi RNA đang hình thành nhờ phản ứng có enzyme xúc tác. Như vậy, sự nhân bản phiên mã sẽ kéo dài từng ribonucleotide mới và bổ sung chính xác với sự DNA để dùng làm khuôn mẫu.

Quá trình phiên mã dù có tính chính xác cao nhưng vẫn kém hơn nhiều so với quá trình tái bản DNA (tỉ lệ mắc lỗi là 1/10.000 nucleotide so với 1/10.000.000 trong tái bản). Đó là do sự thiếu hụt cơ chế sửa sai hiệu quả, mặc dù trong quá trình tổng hợp RNA cũng có hai dạng sửa sai nhất định. Tuy nhiên, vì các RNA được phiên mã không bao giờ được sao chép lại nên các sai sót xảy ra không ảnh hưởng đến việc truyền tải thông tin cho thế hệ sau.

2. Sự phiên mã là một phản ứng enzyme

Những enzyme chịu trách nhiệm cho quá trình phiên mã ở tế bào prokaryote và eukaryote chủ yếu là RNA polymerase phụ thuộc DNA (DNA-dependent RNA polymerase), gọi tắt là RNA polymerase.

RNA polymerase xúc tác hình thành các liên kết phospho-diester giữa các ribonucleotide thành một chuỗi liên tục. Enzyme dịch chuyển từng bước dọc theo DNA khuôn mẫu và kéo dài chuỗi RNA theo hướng từ 5' → 3', nghĩa là các ribonucleotide được thêm vào đầu 3' của chuỗi RNA đang hình thành. Các chất cung cấp năng lượng cho phản ứng RNA là ATP, GTP, CTP và UTP. Cũng giống như trong sự tái bản DNA, năng lượng cho phản ứng được cung cấp từ sự thủy phân các liên kết giàu năng lượng của các chất nói trên.

3. Sự phiên mã chuyên biệt của các mARN và tổng hợp ribosome

Số lượng vùng nào được phiên mã không phụ thuộc vào gen. Một vùng phiên mã riêng biệt bao gồm một hoặc nhiều gen, có những trình tự DNA đặc biệt để nhận biết và kích thích phiên mã.

Ở vùng khởi đầu của phiên mã, có thể có một hoặc nhiều trình tự đặc biệt của ribosome RNA được tổng hợp. Sự tổng hợp phân tử RNA sau đó bắt đầu khi phân tử RNA trở nên hoàn chỉnh. Trong vòng mARN, trong vòng mARN có thể tổng hợp các phân tử phân tử RNA (ở eukaryote).

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Số lượng vùng nào phiên mã và mức phiên mã đều có sự khác biệt. Vì vậy, trong những tế bào khác nhau hoặc trong cùng một tế bào những nhóm tế bào khác nhau sẽ có những nhóm gen khác nhau để phiên mã.

4. Chọn một trong hai sự kiện phân tách DNA để dùng làm khuôn mẫu

Việc gắn của RNA polymerase vào promoter của gen sẽ quyết định vị trí của chuỗi nào trong hai sự kiện của DNA làm khuôn mẫu. Promoter, ngoài việc mang vị trí gắn của RNA polymerase còn chứa những thông tin xác định sự kiện nào trong hai sự kiện của DNA để phiên mã và xác định vị trí bắt đầu phiên mã.

5. Sự phiên mã có thể phát không liên tục

RNA polymerase có thể khởi đầu sự tổng hợp RNA trên khuôn mẫu DNA mà không liên tục như DNA polymerase. Điều này đòi hỏi ribonucleotide đầu tiên của mang năng lượng vị trí bắt đầu phiên mã phải gắn liền với DNA khuôn mẫu trong khi ribonucleotide tiếp theo của sản phẩm tổng hợp rời rạc.

II. Các giai đoạn của quá trình phiên mã

RNA polymerase tiến hành quá trình phiên mã một gen thông qua nhiều bước và được chia thành ba giai đoạn: khởi đầu, kéo dài, và kết thúc.

1. Giai đoạn khởi đầu

Đầu tiên, RNA polymerase gắn với promoter của gen (cùng với các yếu tố khởi đầu) để tạo thành phức hợp promoter-polymerase. Một khi phức hợp hình thành, phức hợp này sẽ có sự thay đổi cấu trúc cần thiết cho việc tiến hành giai đoạn khởi đầu.

Giai đoạn khởi đầu bao gồm các bước như sau:

1.1. Phức hợp đóng (closed complex)

Khi RNA polymerase và các yếu tố khởi đầu gắn với promoter thì phức hợp tạo thành trạng thái đóng. Trong trạng thái này, DNA vẫn là chuỗi kép và enzyme gắn vào một phía của vòng xoắn.

1.2. Phức hợp mở (open complex)

Lúc này DNA xung quanh vị trí bắt đầu phiên mã sẽ mở xoắn và liên kết giữa các cặp base bị bung bở. Hai sợi DNA với chiều dài khoảng 14 bp xung quanh vị trí bắt đầu phiên mã tách rời nhau ra và tạo nên vòng phiên mã. Việc mở DNA sẽ giải phóng sự khởi đầu khuôn mẫu. Hai nucleotide đầu tiên của mang năng lượng vị trí bắt đầu đã được hoạt hóa, chúng xếp hàng trên khuôn mẫu và gắn liền với nhau. RNA polymerase bắt đầu chuyển

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

đchđc theo s i khuôn m u, m xo n phía tr c v trí trùng h p và tái g n hai s i DNA phía sau. B ng cách này, các ribonucleotide ti p theo c g n vào chu i RNA ang phát tri n. o n RNA ban u v i s l ng ribonucleotide ít h n 10 s b lo i b và enzyme b t u t ng h p l i.

1.3. Ph c h p tam nguyên b n (stable ternary complex)

M t khi enzyme i c kho ng h n 10 bp, nó c xem là “thoát” kh i promoter. Lúc này m t ph c h p g m ba thành ph n là enzyme, DNA và RNA c hình thành và quá trình phiên mã chuy n sang giai o n kéo dài.

2. Giai o n kéo dài

M t khi RNA polymerase t ng h p c m t o n RNA kho ng 10 base, nó chuy n sang giai o n kéo dài. S chuy n giai o n này òi h i nh ng bi n i h n n a v c u hình c a RNA polymerase làm cho nó càng gi ch t khuôn m u h n n a. Trong quá trình kéo dài, enzyme này th c hi n m t lo t nhi u nhi m v r t quan tr ng ngoài vi c t ng h p RNA. Nó m xo n DNA tr c m t và tái g n DNA phía sau, nó tách đ n chu i RNA ang hình thành ra kh i khuôn m u khi ang di chuy n đ c theo gen, và nó còn th c hi n ch c n ng c s a sai (quá trình tái b n DNA, các ch c n ng này do nhi u enzyme khác nhau th c hi n).

3. Giai o n k t thúc

Khi RNA polymerase phiên mã h t chi u dài c a gen (ho c các gen), nó đ ng l i và gi i phóng s n ph m RNA. Trong m t s t bào, có nh ng trình t c hi u thúc y giai o n k t thúc. Trong m t s t bào khác, ng i ta v n ch a rõ y u t nào i u khi n enzyme ng ng phiên mã và gi i phóng RNA kh i khuôn m u.

III. Phiên mã prokaryote

1. Enzyme RNA polymerase prokaryote

T bào prokaryote ch ch a m t lo i RNA polymerase. Enzyme này c c u t o b i n m tí u n v , g m hai tí u n v và các tí u n v , ' , . Các tí u n v này liên k t v i nhau t o thành enzyme lõi.

Ng i ta làm thí nghi m tinh s ch enzyme lõi t t bào vi khu n r i cho vào dung đ ch ch a DNA vi khu n và ribonucleotide thì enzyme s g n v i DNA và t ng h p RNA. Tuy nhiên, RNA thu c trong thí nghi m này không gi ng v i RNA trong t bào vì enzyme ã g n vào các v trí không thích h p trên DNA. N u cho thêm m t lo i polypeptide tinh s ch c gi i là y u t tr c khi enzyme g n v i DNA thì s phiên mã s b t u t i nh ng v trí chính xác nh trong t bào.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Việc gắn yếu tố vào enzyme lỗi làm tăng ái lực của enzyme với vị trí khởi động trên DNA, đồng thời làm giảm ái lực với các vùng khác. Khi enzyme lỗi gắn thêm yếu tố sẽ trở thành dạng holoenzyme.

2. Promoter của gen prokaryote

Promoter của gen vi khuẩn nằm ngay trước vị trí khởi đầu phiên mã. Bằng cách phân tích các trình tự DNA này của một số loài động vật, người ta nhận thấy có hai đoạn ngắn tương tự nhau giữa gen này và gen khác, mỗi đoạn gồm sáu nucleotide. Đoạn thứ nhất nằm cách vị trí khởi đầu khoảng 35 bp, là số bội số của trình tự TTGACA. Đoạn thứ hai nằm cách vị trí khởi đầu khoảng 10 bp, là số bội số của trình tự TATAAT. Chúng ta gọi đây là vùng -35 và vùng -10 (hay Pribnow).

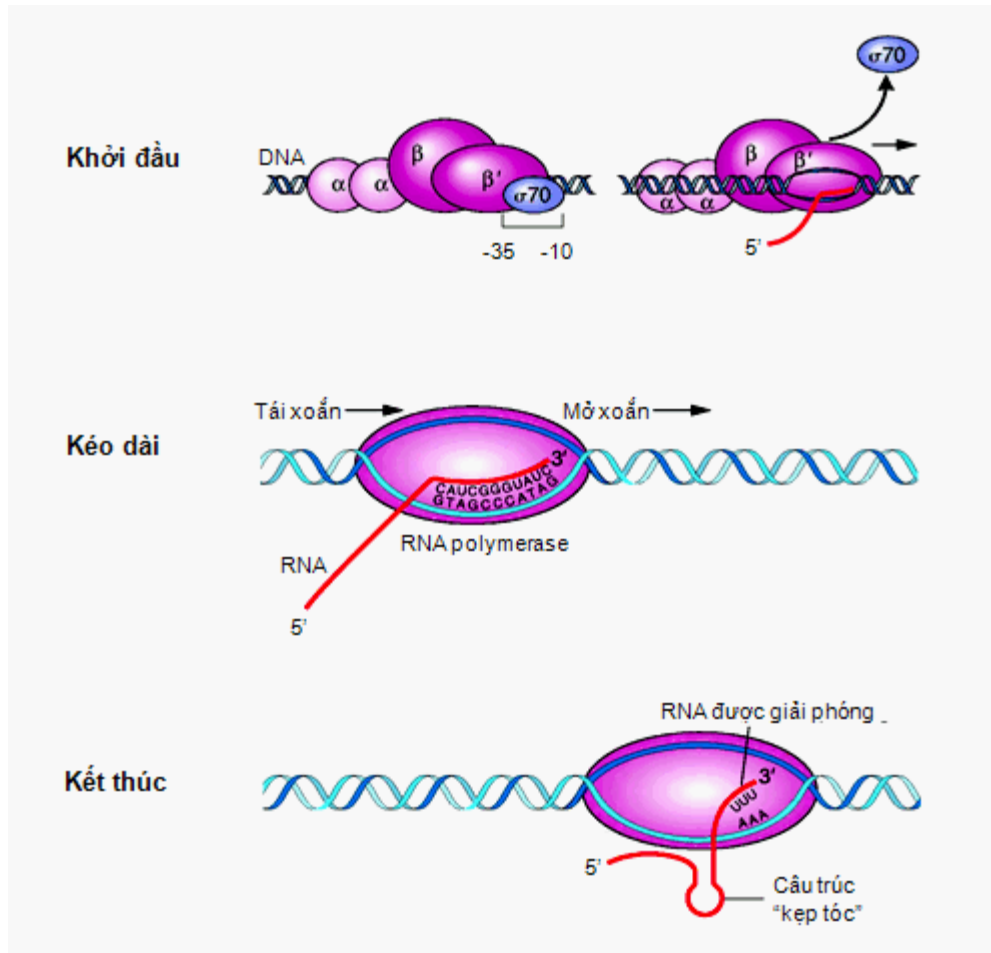
Đối với các promoter mạnh (ví dụ gen mã hóa rRNA), người ta còn tìm thấy yếu tố UP làm tăng sự gắn của RNA polymerase vào DNA. Có một số promoter thì có vùng -35 và thay bằng yếu tố -10 mạnh mẽ, bao gồm vùng -10 thuần túy và thêm một đoạn ngắn ở 5' của nó (ví dụ gen *gal* của *E. coli*).

Yếu tố nhận dạng các vùng -35 và -10 hoặc yếu tố -10 mạnh mẽ nhận các cấu trúc đặc biệt của chúng. Riêng yếu tố UP không nhận dạng bất kỳ cấu trúc nào ở vùng đầu C của nó cùng với đuôi, gọi là CTD (carboxyl terminal domain).

3. Vai trò của enzyme RNA polymerase và promoter trong quá trình phiên mã

Khi khởi đầu phiên mã, RNA polymerase gắn với DNA ở vùng -35 một cách lỏng lẻo để thành phức hợp đóng. Sau đó, enzyme gắn vào promoter chặt chẽ và phức hợp chuyển sang trạng thái mở. Một vùng DNA đặc biệt mở ra hai vị trí -11 và +3, nghĩa là bao gồm cả vị trí bắt đầu phiên mã +1. Sự uốn DNA làm khuôn mẫu để bắt đầu sinh tổng hợp RNA.

Một khi RNA polymerase tổng hợp được 10 nucleotide (sau lần khởi đầu) thì yếu tố rời khỏi enzyme và có thể gắn vào promoter khác khi bắt đầu quá trình phiên mã mới. Sự tách rời yếu tố cho phép hình thành một kênh thoát mà thông qua đó phân tử RNA đã tổng hợp rời khỏi enzyme và được kéo dài (Hình 5.1).



Hình 5.1. Các giai o n phiên mã prokaryote

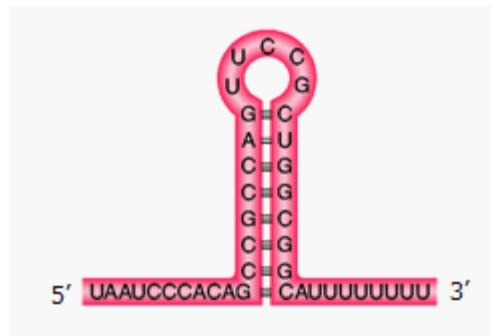
4. Tín hi u k t thúc

Tín hi u k t thúc là nh ng trình t trên DNA có vai trò thúc y s tách RNA polymerase ra kh i DNA và gi i phóng chu i RNA m i c t ng h p. Vì khu n, có hai lo i tín hi u k t thúc là tín hi u k t thúc không ph thu c Rho và tín hi u k t thúc ph thu c Rho.

4.1. Tín hi u k t thúc không ph thu c Rho

ó là m t c u trúc c bi t bao g m hai trình t i x ng b sung nhau giàu GC, tí p theo sau là m t lo t 8 adenine (chúng s c phiên mã thành 8 uracil). Nh ng trình t này không nh h ng n RNA polymerase cho n sau khi chúng c phiên mã. Khi ó các trình t i x ng b sung trên RNA s b t c p v i nhau và t o nên c u trúc hình chi c k p tóc (Hình 5.2). C u trúc k p tóc này ã phá v ph c h p kéo dài ho c b ng cách thúc y m kênh thoát cho RNA trên RNA polymerase ho c b ng cách phá v m i t ng tác RNA-khuôn m u DNA

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html



Cấu trúc bậc hai này cho thấy khi nó được tổng hợp theo sau bởi một loạt U. Khi tiếp tục cấu trúc bậc hai hình thành, chuỗi RNA đang phát triển vẫn còn gắn trên khuôn mẫu bằng các liên kết giũa A-U. Vì liên kết A-U yếu hơn G-C nên chúng dễ dàng bị phá vỡ bởi hiệu quả của cấu trúc bậc hai, và vì thế RNA dễ dàng được giải phóng.

4.2. Tính hiệu quả phụ thuộc Rho

Tính hiệu quả này là một thành phần của RNA mà mục đích là để điều chỉnh hiệu quả của Rho. Yếu tố Rho là một protein hình nhện (*E. coli* có khối lượng phân tử khoảng 50 kDa) gồm sáu tiểu đơn vị gắn với nhau. Yếu tố này có hoạt tính ATPase: khi gắn vào sản phẩm phiên mã, nó sẽ đẩy ngược lại sự tiến bộ của phân tử ATP kéo RNA ra khỏi khuôn mẫu và polymerase.

Yếu tố Rho hiệu quả khi phân tử RNA có một tính hiệu quả. Tính hiệu quả là tính hiệu quả của trình tự vị trí nó gắn, đó là một đoạn khoảng 40 nucleotide mà không gắn liền thành cấu trúc bậc hai, chúng thường giàu C. Tính hiệu quả thứ hai là yếu tố Rho gắn vào vị trí khởi đầu của phiên mã nào đang được dịch mã (nghĩa là một sản phẩm đang gắn ribosome). Vì vậy, phiên mã và dịch mã có thể song hành chặt chẽ: dịch mã khi bắt đầu ngay trên RNA đang được tổng hợp khi RNA bắt đầu rời khỏi RNA polymerase. Vì vậy Rho chỉ kích thích những sản phẩm phiên mã quá muộn cùng cả gen hoặc operon.

IV. Quá trình phiên mã ở eukaryote

1. Cấu trúc gen ở eukaryote

Cấu trúc một gen mã hóa cho protein của eukaryote bao gồm các vùng sau:

1.1. Vùng 5' khởi đầu của gen

Vùng này bao gồm các trình tự nucleotide điều hòa của gen và hoạt hóa sản phẩm phiên mã, bao gồm:

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- **Promoter.** Là trình tự nằm ở 5' không dịch mã của gen có chức năng xác định vị trí bắt đầu phiên mã, kiểm soát sự tổng hợp mRNA và đôi khi có tính đặc hiệu mô (tissue-specific). Promoter có thể dài từ vài nghìn bp. Vùng này thường chứa trình tự bảo vệ gọi là hộp TATA nằm cách vị trí phiên mã khoảng 25-30 bp. Hộp này giúp xác định chính xác vị trí bắt đầu phiên mã. Ngoài ra, còn có hộp CCAAT nằm cách vị trí bắt đầu phiên mã khoảng 75-80 bp. Hộp này ít phổ biến hơn hộp TATA, nó có chức năng tăng cường hiệu quả phiên mã. Một số gen "quần áo" mã hóa cho các enzyme liên quan đến các tế bào thực vật thì có hai hộp này và promoter rất giàu GC. Ngoài ra, còn có các thành phần khác.

- **V trí gen vùng đặc hiệu mô.** Là trình tự DNA tương tác với protein đặc hiệu mô để điều chỉnh sự tổng hợp protein đặc hiệu của mô.

- **V trí gen vùng tăng cường phiên mã (enhancer).** Cũng gọi là gen tăng cường, là trình tự DNA có liên quan với các tác nhân hoạt hóa kích thích phiên mã của các gen khác, chúng có thể tác động qua một khoảng cách xa và có thể tác động theo hai phía (từ 5' hoặc 3' tùy ý).

1.2. Vùng đặc hiệu phiên mã

Bao gồm các exon và intron nằm xen kẽ. Đây là một đặc điểm phân biệt với gen của prokaryote. Các exon và intron của phiên mã thường có các exon là dịch mã. Các intron có bắt đầu bằng GT và kết thúc bằng AG. Các intron chỉ chiếm phần lớn trong mRNA và chúng sẽ bị loại bỏ khi RNA mới được tổng hợp, còn các exon nối với nhau tạo nên mRNA hoàn chỉnh (mature mRNA).

Hai đầu của vùng đặc hiệu phiên mã (coding region) còn có vùng 5' không dịch mã (5' untranslated region) và vùng 3' không dịch mã (3' untranslated region). Vùng 5' không dịch mã có tính đặc hiệu vị trí bắt đầu phiên mã cho nên codon khởi đầu ATG. Vùng 3' không dịch mã bắt đầu từ codon kết thúc và vị trí gắn đuôi poly(A).

1.3. Vùng 3' không dịch mã

Chức năng của nó, một số gen vùng này mang các trình tự điều hòa chuyên biệt.

2. Enzyme RNA polymerase của eukaryote

Tế bào eukaryote có ba loại RNA polymerase là RNA polymerase I (pol I), RNA polymerase II (pol II), và RNA polymerase III (pol III). Trong đó, RNA polymerase II đảm nhiệm việc phiên mã cho hầu hết các gen, chủ yếu là gen mã hóa cho protein. RNA polymerase I phiên mã các gen liên quan đến rRNA lớn và RNA polymerase III phiên mã các gen tRNA, một số gen RNA kích thước nhỏ của nhân (small nuclear, snRNA) và RNA 5S. Các RNA polymerase của eukaryote cũng bao gồm nhiều

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

tử nhân v, trong đó có những tử nhân v tổng hợp tử nhân v các tử nhân v trong enzyme của vi khuẩn.

Bảng 5.1. Các tử nhân v của RNA polymerase

Prokaryote		Eukaryote		
Vi khuẩn	Archaea	RNA pol I	RNA pol II	RNA pol III
β'	A'/A''	RPA1	RPB1	RPC1
β	B	RPA2	RPB2	RPC2
α'	D	RPC5	RPB3	RPC5
α''	L	RPC9	RPB11	RPC9
ω	K	RPB6	RPB6	RPB6
	(+6)	(+9)	(+7)	(+11)

3. Các yếu tố giúp RNA polymerase khi phiên mã

Trong khi RNA polymerase của prokaryote chỉ cần thêm một yếu tố khi phiên mã thì RNA polymerase của eukaryote phức tạp hơn nhiều yếu tố khác, các yếu tố này cũng là các yếu tố phiên mã tổng quát. Mặt khác, khi phiên mã eukaryote còn phải tìm vị trí khởi đầu các DNA đóng gói trong nucleosome và các dạng cao hơn của cấu trúc chromatin. Vì vậy cần phải có nhiều yếu tố khác thêm vào giúp khi quá trình phiên mã.

3.1. Vai trò của các yếu tố phiên mã tổng quát

Các yếu tố phiên mã tổng quát giúp RNA polymerase vào đúng vị trí trên promoter, giúp tách hai sợi của DNA ra phiên mã cơ bản, và giải phóng RNA polymerase khi promoter mất khi phiên mã đã kết thúc xong đi vào giai đoạn kéo dài.

Các yếu tố này cũng là “tổng quát” vì chúng gắn trên tất cả các promoter của số dạng của RNA polymerase II. Do đó, chúng cũng vì tất cả là TFII (transcription factor for polymerase II), bao gồm TFIIA, TFIIB...

Như mô tả trên, nhiều promoter của eukaryote chứa hộp TATA. Hộp này cũng nhận dạng vị trí tử nhân v của TFIID là TBP (TATA binding protein: protein gắn TATA). Phức hợp TBP-DNA tạo nên một cái nòng thu hút các TFII khác và RNA polymerase đến promoter. *In vitro*, các yếu tố phiên mã tổng quát khác gắn vào promoter theo thứ tự sau: TFIIA, TFIIB, TFIIF cùng RNA polymerase II, TFIIE và TFIIH. Sau đó, vùng promoter cũng mở xoắn. Khác với vi khuẩn, số mở xoắn này cũng có năng lượng cung cấp từ sự thủy phân ATP như TFIIH (yếu tố này có hoạt tính giải xoắn helicase).

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Sau đó công xy ra hiện tượng khi sử dụng sinh vật prokaryote cho nên khi có sự biến đổi về cấu trúc hình dạng của RNA polymerase II khi promoter và đi vào giai đoạn kéo dài. Tuy nhiên, đây có một bước mà không tìm thấy ở prokaryote đó là sự gắn thêm các gốc phosphate vào đuôi của RNA polymerase (đuôi này còn gọi là CTD: carboxyl terminal domain). Sự phosphoryl hóa này cũng xúc tác bởi TFIIH như hoạt tính protein kinase của nó (Hình 5.3).

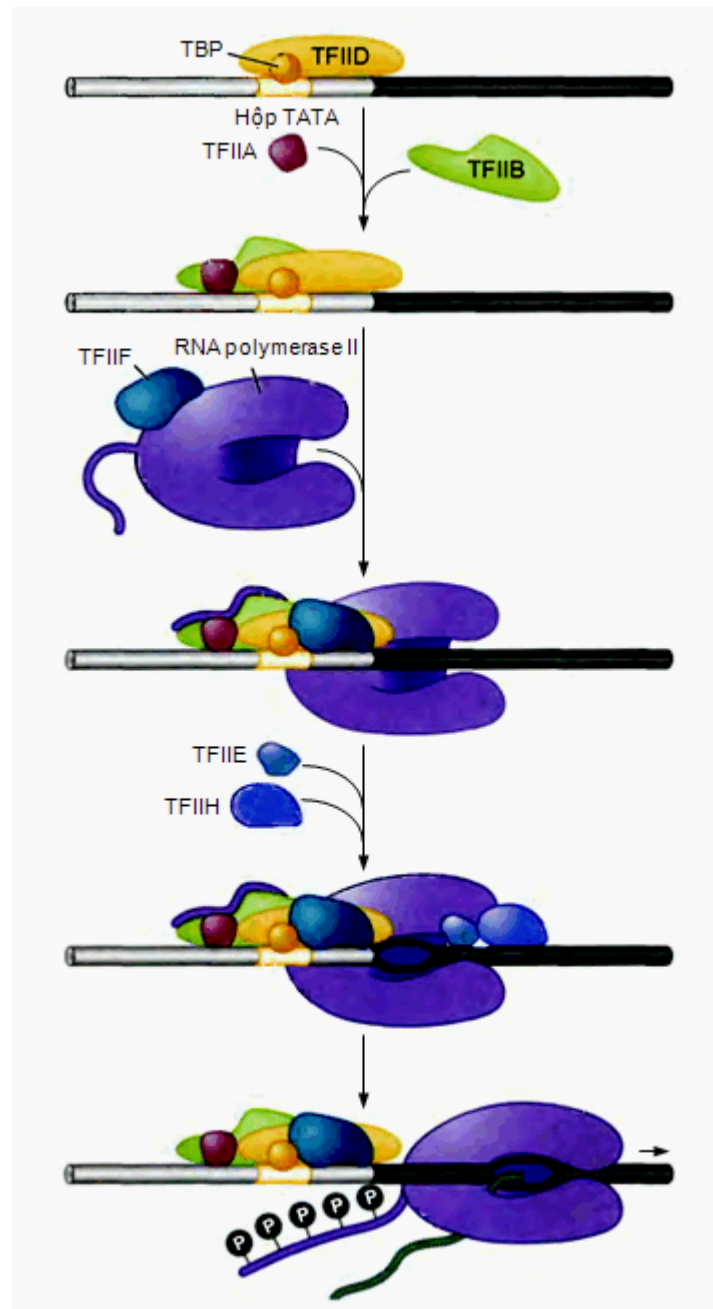
3.2. Vai trò của các tác nhân hoạt hóa, phức hợp trung gian và enzyme biến đổi chromatin.

Ngoài các yếu tố phiên mã tổng quát, RNA polymerase II còn cần sự hỗ trợ của các yếu tố khác (Hình 5.4).

Đầu tiên, cần có các tác nhân hoạt hóa phiên mã (transcriptional activator) gắn vào các trình tự đặc hiệu trên DNA (các enhancer) để giúp định vị RNA polymerase II ở vị trí bắt đầu phiên mã. Sự giúp đỡ này cần thiết cho RNA polymerase II và các yếu tố phiên mã tổng quát vượt qua trở ngại khi gắn vào DNA để đóng gói trong chromatin.

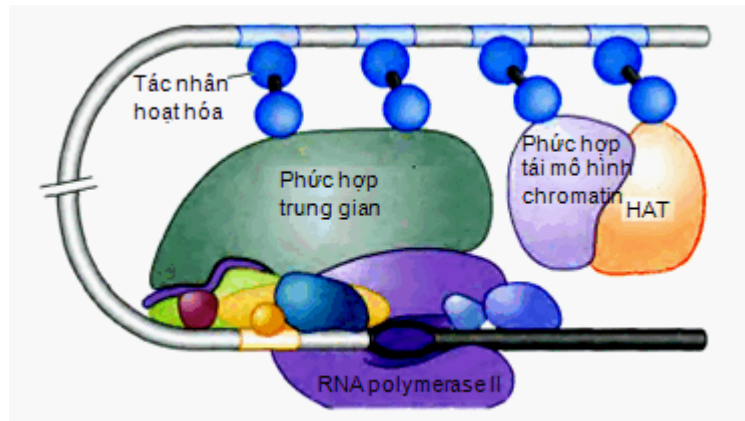
Tiếp theo, sự khởi đầu phiên mã *in vivo* còn cần sự hiện diện của các protein tạo thành phức hợp trung gian (mediator complex). Phức hợp này cho phép tác nhân hoạt hóa tác động lên RNA polymerase II và các yếu tố phiên mã tổng quát.

Cuối cùng, sự phiên mã còn cần các enzyme biến đổi chromatin, bao gồm phức hợp tái tổ chức mô hình chromatin (chromatin remodeling complex) và enzyme histone acetylase. Cả hai có tác động giúp cho bộ máy khởi đầu phiên mã có thể gắn vào DNA trong chromatin một cách dễ dàng.



Hình 5.3. Các yếu tố phiên mã tổng quát giúp khởi đầu phiên mã

Như vậy, có rất nhiều protein gắn vào promoter khi bắt đầu phiên mã eukaryote. Tất cả các protein này thay đổi ở vị trí các gen khác nhau. Tất cả, một số có thể gắn với nhau xa DNA rồi cùng mang DNA đi đúng chỗ. Ví dụ: phức hợp trung gian, RNA polymerase II, và một số yếu tố phiên mã tổng quát có thể gắn với nhau trong nhân rồi cùng mang DNA.



Hình 5.4. Các tác nhân hoạt hóa, phức hợp trung gian và các thành phần của nucleosome trong phiên mã

4. Các yếu tố kích thích RNA polymerase II hoạt động trong giai đoạn kéo dài

Một khi RNA polymerase II bắt đầu chuyển sang giai đoạn kéo dài thì các yếu tố khởi đầu cơ bản như yếu tố phiên mã tổng quát và phức hợp trung gian. Thay vào đó, các yếu tố kích thích giai đoạn kéo dài sẽ thu hút nó, bao gồm TFIIS và hSPT5. Ngoài ra, còn có các yếu tố khác sẽ chuyển đổi phức hợp cho quá trình phiên mã RNA mới tiếp theo.

Giai đoạn kéo dài trong phiên mã sẽ song hành chặt chẽ với các bước phiên mã RNA mới tiếp theo. Như đã phân tích trên, có một bước quan trọng diễn ra khi chuyển từ giai đoạn khởi đầu sang kéo dài là sự phosphoryl hóa đuôi CTD của RNA polymerase II. Sự phosphoryl hóa này không chỉ giúp RNA polymerase II thoát khỏi các protein vướng víu ở phiên mã mà còn cho phép các protein khác liên kết với đuôi giúp quá trình kéo dài phân tử RNA và phiên mã RNA tiếp theo.

5. Quá trình phiên mã của các RNA mới tiếp theo

Trong eukaryote, sự phiên mã chủ yếu là bước đầu tiên trong một loạt các bước bao gồm các bước phiên mã hai của mRNA tiếp theo và loại bỏ các intron để tạo thành mRNA hoàn chỉnh.

5.1. Sự gắn vào đầu 5'

Ngay khi RNA polymerase II vừa mới tạo ra khoảng 25 ribonucleotide của RNA, đầu 5' của phân tử RNA này sẽ được phiên mã bằng cách gắn thêm một cái m là guanine có phiên mã hóa học. Phần này sẽ được thực hiện bởi ba loại enzyme là:

- Phosphatase có tác dụng loại bỏ một gốc phosphate khỏi đầu 5' của RNA mới sinh.
- Guanylyl transferase gắn GMP bằng liên kết 5' đến 5' thay vì 5' đến 3' vào đầu 5' của RNA đang tiếp theo.
- Methyl transferase gắn nhóm methyl vào guanosine (Hình 5.5).

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Trong nhân, một nhóm vitamin phức hợp protein đặc biệt là CBC (CAP-binding complex: phức hợp protein) giúp RNA thoát khỏi tế bào và di chuyển ra ngoài. Một số còn có vai trò quan trọng trong quá trình dịch mã mRNA trong bào tương.

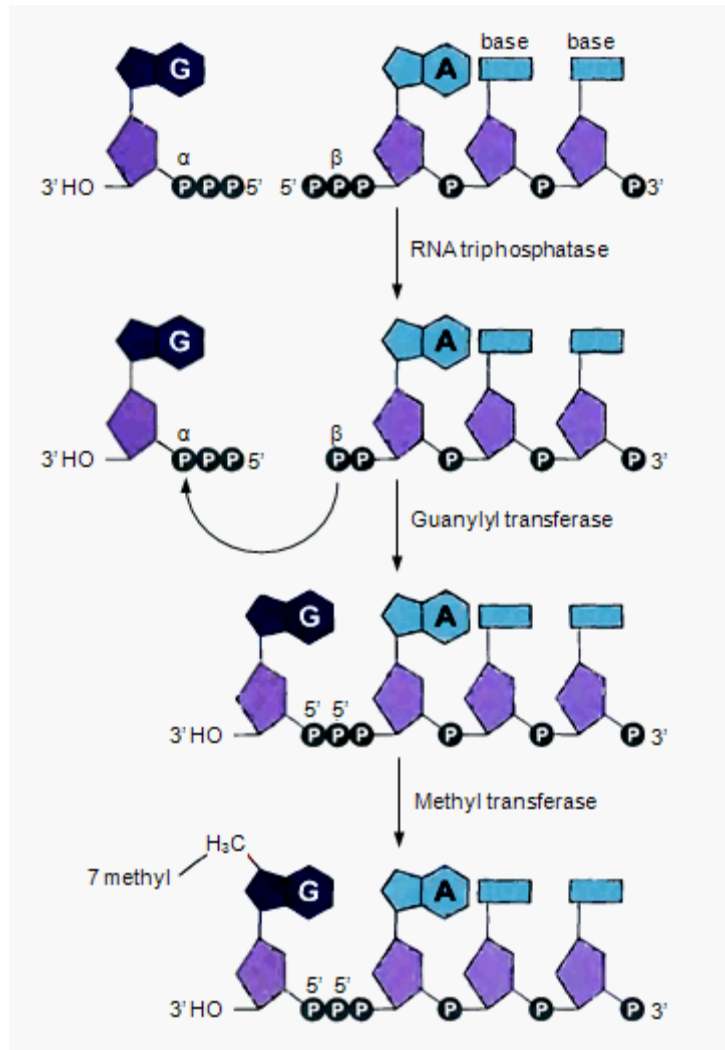
5.2. Sự gắn đuôi poly(A) vào đầu 3' và kích thích phiên mã

Sự gắn đuôi poly(A) vào đầu 3' đặc biệt liên kết với sự kích thích phiên mã. Các enzyme cần thiết cho các quá trình này tập trung trên đuôi CTD của RNA polymerase II, bao gồm CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor: yếu tố đặc hiệu tách RNA và gắn đuôi poly(A)) và CstF (cleavage stimulation factor: yếu tố kích thích tách RNA).

Khi RNA polymerase di chuyển đến cuối gen, nó gặp những trình tự đặc hiệu (đặc biệt là tín hiệu poly(A)). Trình tự này kích thích phiên mã thành RNA, thúc đẩy chuyển CPSF và CstF gắn vào đầu RNA này. Sau đó các protein khác tập trung xung quanh để tách rời RNA và gắn đuôi poly(A).

Sự gắn đuôi đặc biệt của enzyme poly(A) polymerase (PAP). Enzyme này thêm khoảng vài chục đến 200-250 adenine vào đầu 3' của RNA đã tách ra. Enzyme PAP sử dụng ATP làm chất và hoạt động giống RNA polymerase, tuy nhiên không có khuôn mẫu. Ngày nay vẫn chưa rõ yếu tố nào quyết định chiều dài của đuôi nhưng quá trình này có liên quan đến các protein gắn với đuôi poly(A).

Sau khi RNA đã tách ra và gắn đuôi poly(A), RNA polymerase vẫn chưa kết thúc phiên mã ngay. Nó còn tiếp tục di chuyển dọc theo khuôn mẫu và tạo ra một phân tử RNA thứ hai có thể dài hàng trăm nucleotide trước khi kết thúc. Sau đó, RNA polymerase đã tách ra khỏi khuôn mẫu, giải phóng RNA mới và RNA này sẽ bị giải phóng.



Hình 5.5. Ph n ng g n m vào u 5' c a RNA

5.3. Quá trình c t n i gen (splicing)

ây là quá trình lo i b các intron và n i các exon l i v i nhau. Quá trình này c th c hi n ph n l n b i các RNA thay vì protein.

Các phân t RNA này t ng i ng n (d i 200 nucleotide) c g i là snRNA. Có n m lo i liên quan n d ng c t n i chính là U1, U2, U4, U5 và U6. M i snRNA c k t h p v i nhi u protein h ình thành snRNP.

Có ba trình t n m trên intron óng vai trò quan tr ng trong quá trình c t n i là: v trí c t n i u 5', v trí phân nhánh là m t trình t ãiàu các pyrimidine bao quanh m t nucleotide adenine g n u 3', và v trí c t n i u 3'.

u tiên, v trí c t n i u 5' c nh n d ng b i U1 snRNP b ng s b t c p các base b sung. V trí phân nhánh c ng c nh n d ng b i BBP (branch-point binding protein: protein g n v trí phân nhánh) và U2AF. U2 snRNP n thay th BBP (nh

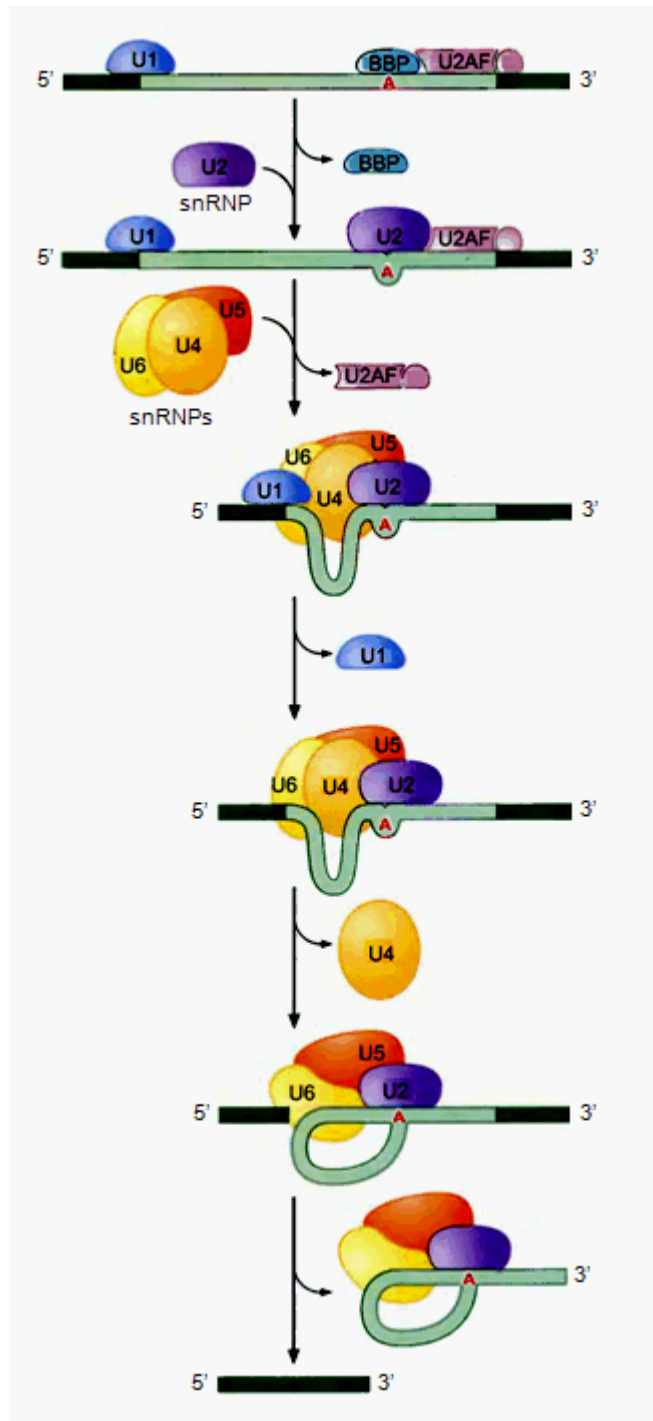
Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

U2AF giúp). Số base p base giữa U2 snRNA và vị trí phân nhánh làm th a ra m t g c A không b t c p và s n sàng ph n ng v i v trí 5'. Sau ó U4 và U6 snRNP cùng U5 snRNP n g n v i ph c h p trên.

D ng U1 r i kh i ph c h p và U6 th ch U1 t i v trí c t n i u 5'. U4 c gi i phóng U6 t ng tác v i U2. i u này làm cho v trí c t n i u 5' và v trí phân nhánh c t k nhau và t o i u ki n cho ph n ng c t n i x y ra. Nucleotide adenine c hi u v trí phân nhánh t n công và c t intron v trí u 5'. ng th i có m t liên k t ng hóa tr x y ra gi a A v trí phân nhánh và u 5' c a intron t o nên m t c u trúc hình thòng l ng. u 3' c a exon tr c n i v i u 5' c a exon k ti p và thòng l ng intron c gi i phóng (Hình 5.6).

V. Phiên mã ng c

Phiên mã ng c là quá trình t ng h p DNA d a trên khuôn m u RNA. Quá trình này c xúc tác b i m t lo i enzyme c bi t g i là enzyme phiên mã ng c (RT: reverse transcriptase). Enzyme này có c ho t tính DNA polymerase và ho t tính RNase H. C ng gi ng nh DNA polymerase trong quá trình tái b n DNA, enzyme phiên mã ng c òi h i ph i có primer (m i) c bi t t ng h p nên DNA m i.



Hình 5.6. Quá trình cắt nối gen

Enzyme phiên mã ngược của các phát hiện liên quan đến retrovirus. Sau khi các retrovirus đi vào tế bào vật chủ, genome của RNA của nó sẽ được phiên mã ngược thành

Trao đổi trực tuyến: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

DNA sợi, rị tích h p vào DNA c a v t ch . Quá trình phiên mã ng c này khá ph c t p, ng i ta có th tóm t t thành 10 b c nh sau:

- B c 1: M t tRNA c a t bào có tính c hi u v i retrovirus óng vai trò primer kh i phát quá trình phiên mã ng c. Primer lai v i vùng b sung trên genome c a RNA c a retrovirus g i là v trí g n primer (PBS: primer-binding site).

- B c 2: M t o n DNA c kéo dài t tRNA có trình t b sung v i trình t c a genome RNA c a retrovirus.

- B c 3: Trình t R u 5' và U5 c a virus b lo i b b i RNase H.

- B c 4: i khuôn m u l n th nh t (first template exchange) còn c g i là “nh y” l n m t: DNA n lai v i trình t R còn l i u 3'.

- B c 5: M t s i DNA c kéo dài t u 3'.

- B c 6: H u h t RNA virus b lo i b b i RNase H.

- B c 7: S i DNA th hai c kéo dài t RNA còn l i c a virus.

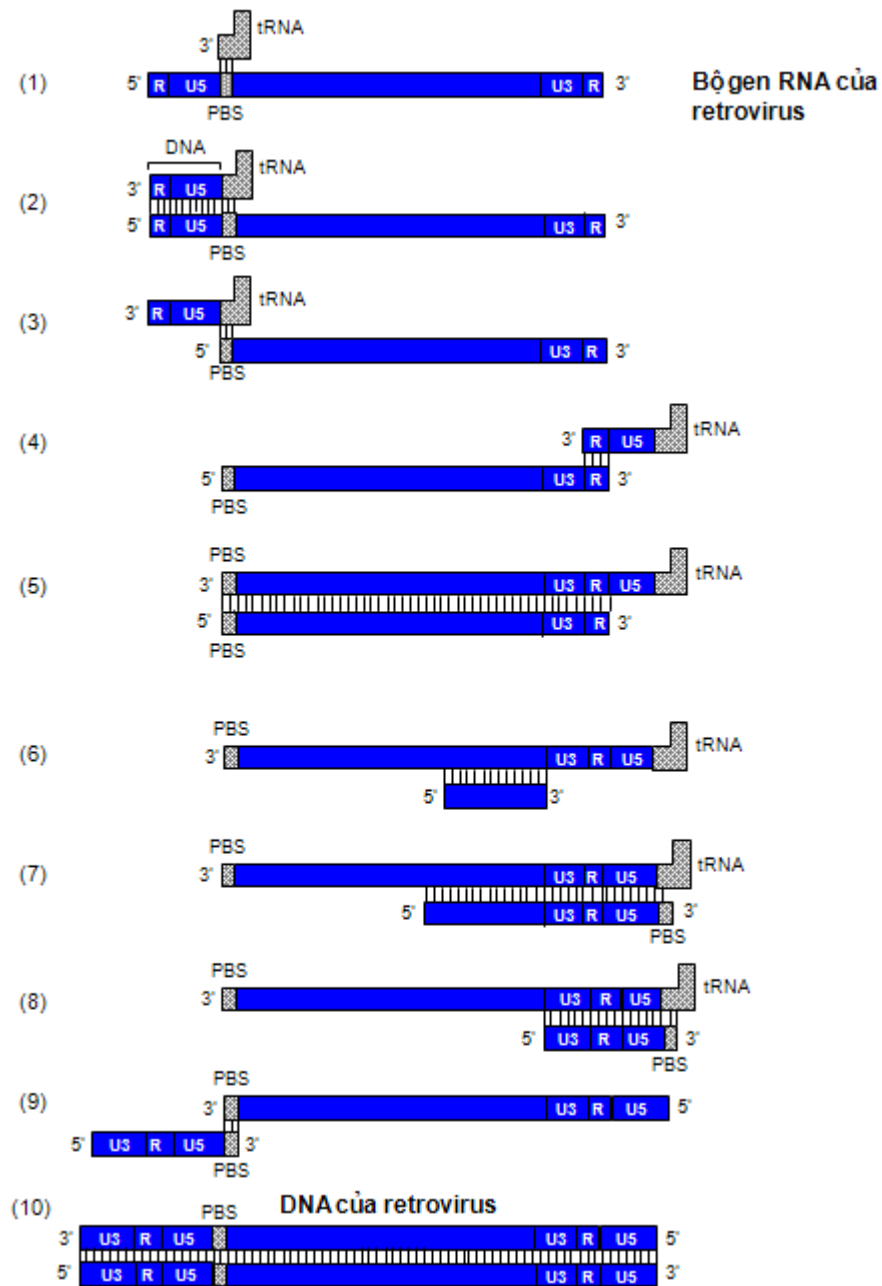
- B c 8: C tRNA và ph n RNA còn l i c a virus b lo i b b i RNase H.

- B c 9: i khuôn m u l n th hai (“nh y” l n hai): vùng PBS c a s i DNA th hai n lai v i vùng PBS c a s i th nh t.

- B c 10: Kéo dài c hai s i DNA.

R là nh ng trình t l p l i trên genome c a retrovirus (u 5' và 3'), U5 và U3 là nh ng vùng mã hóa cho nh ng tín hi u tích h p u 5' và 3' (Hình 5.7).

Ngày nay, ng i ta c ng phát hi n enzyme phiên mã ng c các virus ng v t khác nh hepadnavirus, và các virus th c v t nh caulimovirus. T t c chúng c g i là retrovirus. Ngoài ra, ng i ta còn phát hi n ho t tính enzyme phiên mã ng c m t s dòng c a myxobacteria và *E. coli*. Enzyme phiên mã ng c ã tr thành m t công c không th thi u trong sinh h c phân t . Nó giúp các nghiên c u viên phiên mã ng c mRNA c a t bào thành cDNA (complementary DNA), r i sau ó có th khu ch i, t o dòng và bi u hi n b ng các ph ng pháp c bi t. S phát hi n enzyme phiên mã ng c nhi u lo i virus và c bi t là m t s vi khu n c ng có ý ngh a quan tr ng trong v i c nghiên c u s t i n hóa c a h th ng sinh gi i.



Hình 5.7. Quá trình phiên mã ngược của retrovirus

Tài liệu tham khảo/ c thêm

1. Huỳnh Thành Đạt. 1998. Sinh học phân tử. NXB Giáo dục, Hà Nội.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. 2002. Molecular Biology of the Cell. 4th ed. Garland Science Publishing, Inc. New York, USA.

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

3. **Flint SJ.** 2000. Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. *ASM Press*, Washington, USA.

4. **Gelehrter TD, Collins FS and Ginsburg D.** 1998. Principles of Medical Genetics. 2nd ed. *Williams & Wilkins Company*, Baltimore, USA.

5. **Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Gelbart WM, Suzuki DT and Miller JH.** 2005. An Introduction to Genetic Analysis. *WH Freeman & Co.* New York, USA.

6. **Karp G.** 2002. Cell and Molecular Biology. *John Wiley & Sons, Inc.* New York, USA.

7. **Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M and Losick R.** 2004. Molecular Biology of the Gene. *Pearson Education, Inc./Benjamin Cummings Publishing*, San Francisco, USA.

Ch ng 6

D ch mã

D ch mã là quá trình các thông tin di truyền ch a trong các trình t nucleotide c a mRNA c s d ng t o ra các chu i amino acid trong protein. S t ng h p m t protein riêng l òi h i s tham gia c a h n 100 protein và RNA. B máy d ch mã bao g m b n thành ph n quan tr ng là mRNA, tRNA, aminoacyl tRNA synthetase và ribosome. Các mRNA là khuôn m u cho quá trình d ch mã. D ch mã là m t trong nh ng quá trình có tính b o th cao và chi m nhi u n ng l ng c a t bào. Tuy nhiên, do c u trúc khác nhau gi a mRNA c a prokaryote và eukaryote nên quá trình d ch mã c a chúng c ng có nh ng i m khác bi t quan tr ng.

I. Mã di truyền

1. Các codon

Do ch có b n lo i nucleotide khác nhau trong mRNA và có n 20 lo i amino acid trong protein nên s d ch mã không th c th c hi n theo ki u t ng ng m t nucleotide-m t amino acid c. Chu i nucleotide c a m t gen thông qua trung gian mRNA c d ch mã thành chu i amino acid c a protein theo nh ng quy lu t c g i là mã di truyền.

Ng i ta ã gi i mã toàn b các amino acid vào nh ng n m u c a th p k 1960. M i amino acid c mã hóa b i ba nucleotide liên ti p trên DNA (ho c RNA t ng ng), b ba nucleotide này c g i là m t codon. V i 4 lo i nucleotide khác nhau s có $4^3 = 64$ codon khác nhau c phân bi t b i thành ph n và tr t t c a các nucleotide. Trong s này có 3 codon k t thúc (stop codon) là UAA, UAG và UGA có nhi m v báo hi u ch m d t vi c t ng h p chu i polypeptide. Trong 61 mã còn l i có nhi u codon cùng mã hóa cho m t amino acid (B ng 3.4-Ch ng 3).

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Mã di truyền có tính ngẫu nhiên cho toàn bộ sinh giới từ m t s ngo il i v i các codon ty th . DNA c a bào quan này có m t s codon mã hóa cho các amino acid khác v i ngh a c a các codon này trên DNA trong nhân. Ví d :

- UGA mã hóa cho tryptophan thay vì báo hi u ch m d t vi c t ng h p protein.
- AGA và AGG không mã hóa cho arginine mà báo hi u ch m d t t ng h p protein.
- AUA mã hóa cho methionine thay vì mã hóa cho isoleucine.

2. Các quy t c chi ph i mã di truy n

Có ba quy t c i u khi n s s p x p và s d ng các codon trên mRNA là:

- Các codon c c theo h ng 5' 3'. Vì v y chu i mã hóa cho dipeptide NH₂-Thr-Arg-COOH c vi t là 5'-ACGCGA-3'.
- Các codon không ch ng lên nhau và vùng d ch mã c a mRNA không ch a các kho ng tr ng.
- Thông tin c d ch mã theo m t khung c (reading frame) c nh. V m t nguyên t c, cùng m t trình t RNA có th có ba khung c khác nhau. Tuy nhiên, trên th c t ch có m t trong ba khung c này ch a thông tin th c s , chính codon kh i u ã xác nh khung c úng cho m i trình t mRNA.

II. Các ribosome

Ribosome là b máy i phân t i u khi n s t ng h p protein. Nó c c u t o b i ít nh t là 3 phân t RNA và trên 50 protein khác nhau¹ v i kh i l ng phân t là 2,5 MDa (megadalton) i v i ribosome c a prokaryote và 4,2 MDa i v i ribosome c a eukaryote.

1. Thành ph n c u t o c a ribosome

M i ribosome bao g m m t ti u n v l n và m t ti u n v nh . Ti u n v l n ch a trung tâm peptidyl transferase ch u trách nhi m cho vi c hình thành các c u n i peptide. Ti u n v nh ch a trung tâm gi i mã, là n i các tRNA ã c g n amino acid c và gi i mã các codon. Ngoài ra còn có trung tâm g n các y u t ti u n v l n.

Theo quy c, các ti u n v c t tên theo t c l ng c a chúng d i l c ly tâm. n v o t c l ng là Svedberg (tên c a nhà phát minh máy siêu ly tâm) và c vi t t t là S. Ribosome c a prokaryote là ribosome 70S, trong ó ti u n v l n là 50S và ti u n v nh là 30S. Ribosome c a eukaryote là 80S, v i ti u n v l n là 60S và ti u n v nh là 40S.

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

M i t i u n v u c c u t o b i các RNA ribosome (rRNA) và các protein ribosome. n v Svedberg l i c s d ng phân bi t các rRNA (B ng 6.1).

Trong quá trình d ch mã, t i u n v l n và t i u n v nh c a m i ribosome liên k t v i nhau và v i mRNA. Sau m i vòng t ng h p protein, chúng l i r i nhau ra.

B ng 6.1. Các thành ph n c u t o c a ribosome

Các thành phần cấu tạo	Prokaryote		Eukaryote	
	Tiểu đơn vị lớn (50S)	Tiểu đơn vị nhỏ (30S)	Tiểu đơn vị lớn (60S)	Tiểu đơn vị nhỏ (40S)
rRNA	5S rRNA (120 Nu) 23S rRNA (2900 Nu)	16S rRNA (1540 Nu)	5,8S rRNA (160 Nu) 5S rRNA (120 Nu) 28S rRNA (4700 Nu)	18S rRNA (1900 Nu)
Protein	34 protein	21 protein	49 protein	33 protein

2. Khái ni m polyribosome

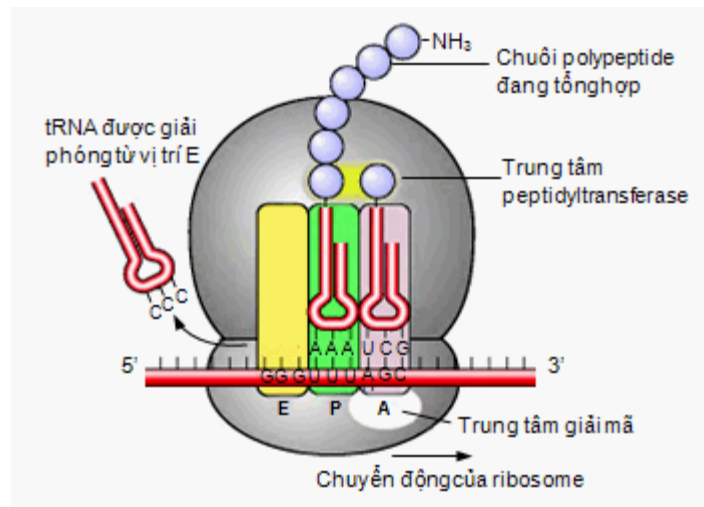
M c dù m t ribosome ch có th t ng h p m t polypeptide t i m t th i i m, nh ng m i mRNA có th c d ch mã ng th i b i nhi u ribosome. M t mRNA mang nhi u ribosome c xem là polyribosome hay polysome. M i ribosome n c t i p xúc v i kho ng 30 nucleotide, nh ng do kích th c l n c a ribosome nên m t cho phép trên mRNA là 80 nucleotide cho m i ribosome.

3. Các v trí g n tRNA trên ribosome

Trên ribosome ch a ba v trí g n tRNA là v trí A, P và E. Trong ó:

- A là v trí g n aminoacyl-tRNA (tRNA có mang amino acid).
- P là v trí g n peptidyl-tRNA (tRNA có mang chu i polypeptide).
- E (exit) là v trí g n tRNA mà c phóng thích sau khi chu i polypeptide c chuy n sang aminoacyl-tRNA.

M i v trí g n tRNA c hình thành t i giao di n gi a t i u n v l n và t i u n v nh . B ng cách này, các tRNA c g n vào có th b t ngang qua kho ng cách gi a trung tâm peptidyl transferase c a t i u n v l n và trung tâm gi i mã c a t i u n v nh . u 3' c a tRNA c n m g n t i u n v l n và vòng i mã g n t i u n v nh .



Hình 6.1. Các thành phần chức năng của ribosome

4. Các kênh của ribosome

Ó là các kênh cho phép mRNA đi vào và đi ra khỏi ribosome, và kênh cho phép chuỗi polypeptide mới sinh đi ra khỏi ribosome.

mRNA đi vào và đi ra khỏi trung tâm giải mã của ribosome thông qua hai kênh hẹp. Trong đó, kênh vào có chức năng cho RNA không bị tắc nghẽn qua. Chức năng này đảm bảo cho mRNA tiếp cận được trung tâm giải mã, bằng cách loại bỏ bất kỳ tác nhân cản trở nào.

Một kênh xuyên qua trung tâm thoát cho chuỗi polypeptide mới được tổng hợp. Kích thước của kênh ảnh hưởng đến sự gắn kết của các chuỗi polypeptide đang tổng hợp. Vì vậy, protein chỉ có thể hình thành cấu trúc bậc ba sau khi nó được giải phóng khỏi ribosome.

III. Sự hình thành aminoacyl-tRNA

1. Bện chuỗi amino acid vào tRNA

Quá trình gắn amino acid vào tRNA là quá trình hình thành một liên kết acyl giữa nhóm carboxyl của amino acid và nhóm 2'- hoặc 3'-OH của adenine ở vị trí 3' của tRNA. Liên kết này được xem là một liên kết giàu năng lượng. Năng lượng giải phóng ra khi liên kết bị phá vỡ giúp hình thành chuỗi peptide liên kết amino acid với chuỗi polypeptide đang tổng hợp.

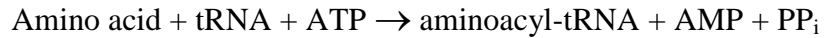
2. Sự hình thành và gắn amino acid vào tRNA

Sự hình thành và gắn amino acid vào tRNA thực hiện bởi một enzyme gọi là aminoacyl-tRNA synthetase.

Quá trình này diễn ra như sau: đầu tiên, amino acid được adenyl hóa bằng cách phản ứng với ATP, kết quả tạo thành amino acid có gắn adenylic acid qua chuỗi ester giàu năng lượng giữa nhóm COOH của amino acid và nhóm phosphoryl của AMP, đồng thời giải phóng ra pyrophosphate. Sau đó, amino acid được adenyl hóa này (vẫn gắn với synthetase) phản ứng với tRNA. Phản ứng này chuyển amino acid đến vị trí 3' của tRNA gắn với nhóm OH, đồng thời giải phóng AMP.

Phản ứng tổng hợp của quá trình này như sau:

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html



3. Tính đặc hiệu của aminoacyl-tRNA synthetase

Hầu hết các tế bào đều có một enzyme synthetase riêng biệt chịu trách nhiệm cho việc gắn một amino acid vào một tRNA tương ứng (nhỏ vậy có tới 20 synthetase). Tuy nhiên, nhiều vi khuẩn có đến 20 synthetase. Trong trường hợp này, cùng một synthetase chịu trách nhiệm cho hơn một loại amino acid.

Số lượng di n amino acid chính xác là dựa vào kích thước, số tích điện và các R khác nhau của các amino acid. Số lượng di n tRNA dựa vào các trình tự nucleotide khác nhau của tRNA. Một sai sót trong quá trình gắn amino acid vào tRNA tương ứng là khá thấp.

4. Phân loại aminoacyl-tRNA synthetase

Có hai loại tRNA synthetase.

- Loại I bao gồm các synthetase gắn các amino acid như Glu, Gln, Arg, Cys, Met, Val, Ile, Leu, Tyr, Trp vào nhóm 2'-OH.

- Loại II gồm các synthetase gắn các amino acid như Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, His, Asp, Asn, Lys, Phe vào nhóm 3'-OH.

IV. Các giai đoạn của quá trình dịch mã

Quá trình dịch mã bắt đầu bằng sự gắn của mRNA và một tRNA khởi đầu vào tiểu đơn vị nhỏ của ribosome. Phân tử tiểu đơn vị nhỏ mRNA thu hút tiểu đơn vị lớn nên ribosome nguyên vẹn vào mRNA để kẹp giữa hai tiểu đơn vị. Sự tương hợp protein bắt đầu từ các codon khởi đầu ở 5' của mRNA và tiến dần về phía 3'. Khi ribosome dịch mã từ codon này sang codon khác, một tRNA mang amino acid kết thúc gắn vào trung tâm gập mã và trung tâm peptidyl transferase của ribosome. Khi ribosome gặp codon kết thúc thì quá trình tương hợp chuỗi polypeptide kết thúc. Chuỗi này được giải phóng, hai tiểu đơn vị của ribosome rời nhau ra và sẵn sàng gắn mRNA mới để thực hiện một chu trình tương hợp protein mới. Quá trình dịch mã được chia thành ba giai đoạn là khởi đầu, kéo dài và kết thúc.

1. Giai đoạn khởi đầu

1.1. prokaryote

1.1.1. Các yếu tố khởi đầu (IF: initiation factor)

Có các yếu tố khởi đầu xúc tác cho tiểu đơn vị nhỏ trong việc hình thành phức hợp khởi đầu. Đó là IF1, IF2, IF3. Một yếu tố khởi đầu có tác động như sau:

- IF1 giúp tiểu đơn vị nhỏ gắn vào mRNA và ngăn chặn các tRNA gắn vào vùng thụ cảm trí A trên tiểu đơn vị nhỏ.

- IF2 là một protein gắn và thủy phân GTP. IF2 thúc đẩy sự liên kết giữa fMet-tRNA_i^{fMet} và tiểu đơn vị nhỏ, ngăn chặn những aminoacyl-tRNA khác gắn vào tiểu đơn vị nhỏ.

- IF3 ngăn chặn tiểu đơn vị nhỏ tái liên kết với tiểu đơn vị lớn và gắn với các tRNA mang amino acid. IF3 gắn vào tiểu đơn vị nhỏ vào cuống vòng dịch mã trục, nó giúp tách ribosome 70S thành tiểu đơn vị lớn và tiểu đơn vị nhỏ.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Khi ti u n v nh ã c g n ba y u t kh i u, nó s g n tRNA kh i u và mRNA. S g n hai RNA này là hoàn toàn c l p v i nhau.

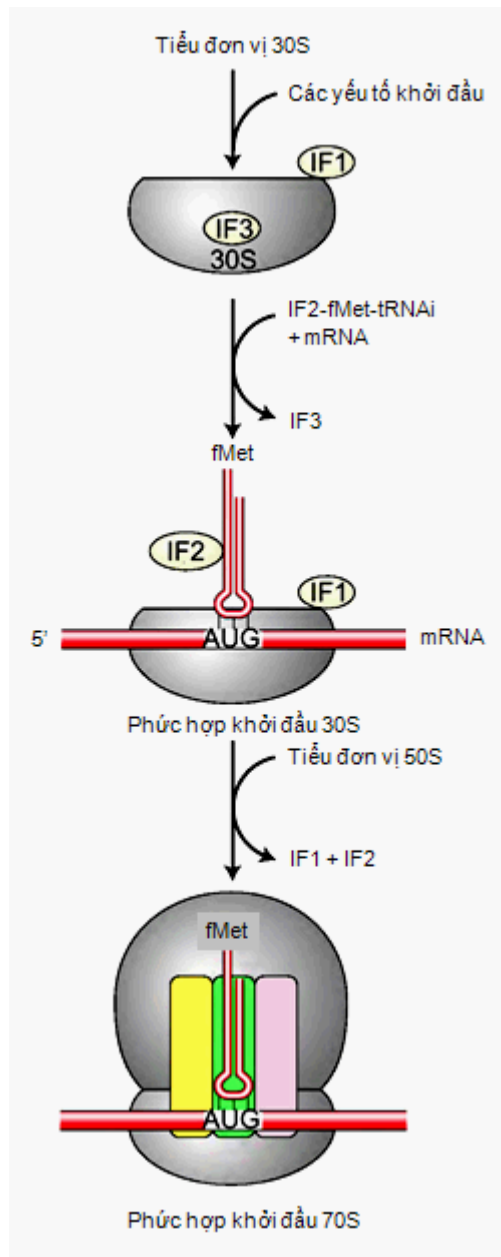
1.1.2. B c 1: Ti u n v nh g n vào codon kh i u

S liên k t gi a ti u n v nh v i mRNA c th c hi n thông qua s b t c p base b sung gi a v trí g n ribosome và rRNA 16S. Các mRNA c a vi khu n có m t trình t nucleotide c hi u g i là trình t Shine-Dalgarno (SD) g m 5-10 nucleotide tr c codon kh i u. Trình t này b sung v i m t trình t nucleotide g n u 3' c a rRNA 16S. Ti u n v nh c t trên mRNA sao cho codon kh i u c t úng vào v trí P m t khi ti u n v l n g n vào ph c h p.

1.1.3. B c 2: tRNA u tiên có mang methionine bi n i n g n tr c ti p v i ti u n v nh

M t tRNA c bi t c g i là tRNA kh i u n g n tr c ti p v i v trí P (không qua v trí A). tRNA này có anticodon (b ba i mã) có th b t c p v i AUG ho c GUG. Tuy nhiên tRNA này không mang methionine c ng nh valine mà mang m t d ng bi n i c a methionine g i là N-formyl methionine. tRNA kh i u này c g i là fMet-tRNA_i^{fMet}.

Trong ho c sau quá trình t ng h p polypeptide, g c formyl c lo i b b i enzyme deformylase. Ngoài ra, aminopeptidase s lo i b methionine c ng nh m t ho c hai amino acid k ti p u chu i polypeptide.



Hình 6.2. Kh i u d ch mã prokaryote

1.1.4. B c 3: Hình thành ph c h p kh i u 70S

B c g n thêm ti u n v l n t o thành ph c h p kh i u 70S di n ra nh sau: khi codon kh i u và fMet-tRNA_i^{fMet} b t c p v i nhau, ti u n v nh thay i hình d ng làm gi i phóng IF3. S v ng m t IF3 cho phép ti u n v l n g n vào ti u n v nh ang mang các thành ph n trên. Nh có ti u n v l n g n vào, ho t tính GTPase c a IF2-GTP c kích thích th y phân GTP. IF2-GDP t o thành có á l c th p i v i ribosome và tRNA kh i u d n s gi i phóng IF2-GDP c ng nh IF1. Nh v y ph c h p kh i u cu i cùng c t o thành bao g m ribosome 70S c g n t i codon

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

khí u c a mRNA, và i fMet-tRNA_i^{fMet} t i v trí P, còn v trí A ang tr ng. Ph c h p này s n sàng ti p nh n m t tRNA mang amino acid vào v trí A b t u t ng h p polypeptide (Hình 6.2).

1.2. Eukaryote

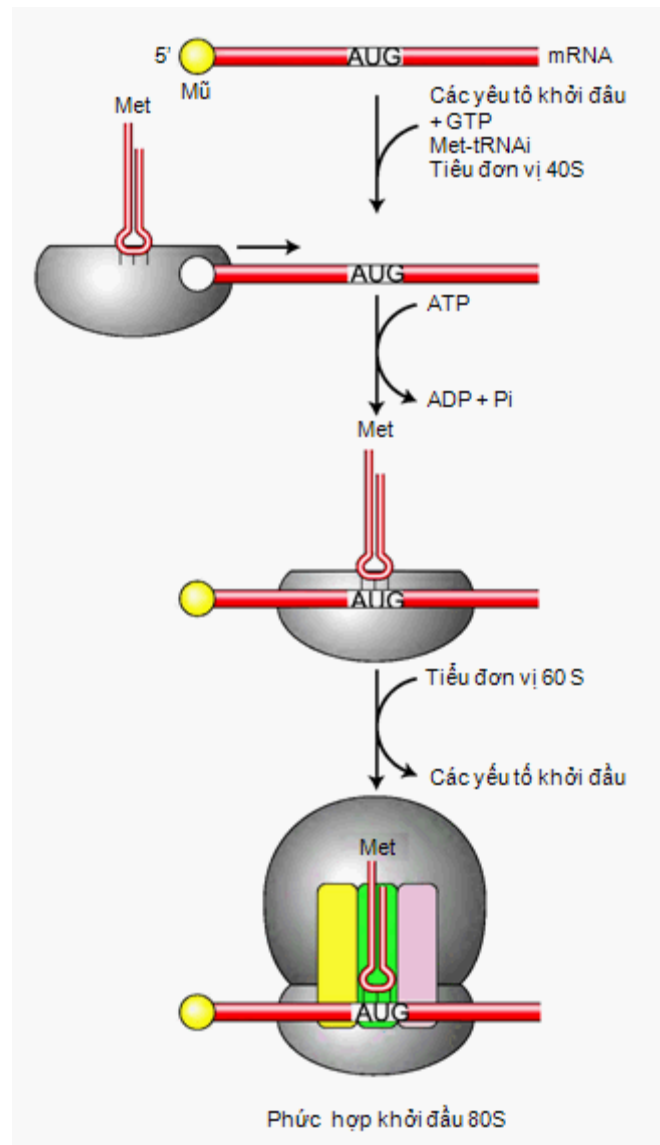
1.2.1. B c 1: S h ình thành ph c h p ti n kh i u 43S

Giai o n kh i u òi h i s h tr c a h n 30 protein khác nhau, m c dù eukaryote c ng có nh ng y u t kh i u t ng ng v i prokaryote. Các y u t kh i u này c ký hi u là eIF.

Khi ribosome c a eukaryote hoàn thành m t chu trình d ch mã, nó tách r i ra thành ti u n v l n và ti u n v nh t do thông qua tác ng c a các y u t eIF3 và eIF1A (t ng t v i IF3 prokaryote). Hai protein g n GTP là eIF2 và eIF5B làm trung gian thu hút tRNA kh i u ã g n methionine (ch không ph i N-formyl methionine nh prokaryote) n ti u n v nh . Chính y u t eIF5B-GTP là t ng ng v i IF2-GTP c a prokaryote. Y u t này liên k t v i ti u n v nh theo ph ng th c ph thu c eIF1A. R i eIF5B-GTP giúp thu hút ph c h p eIF2-GTP và Met-tRNA_i^{Met} n ti u n v nh . Hai protein g n GTP này cùng nhau a Met-tRNA_i^{Met} vào vùng thu c v trí P c a ti u n v nh . K t qu , hình thành ph c h p ti n kh i u 43S.

1.2.2. B c 2: S nh n d ng m 5' c a mRNA

Quá trình này c th c hi n thông qua eIF4F. Y u t này có ba ti u n v , m t ti u n v g n vào m 5', hai ti u n v khác g n v i RNA. Ph c h p này l i c g n v i eIF4B làm ho t hóa m t enzyme RNA helicase c a m t trong nh ng ti u n v c a eIF4F. Helicase này tháo xo n t t c các c u trúc b c hai c hình thành u t n cùng c a mRNA. Ph c h p eIF4F/B và mRNA l i thu hút ph c h p ti n kh i u 43S n thông qua t ng tác gi a eIF4F và eIF3.



Hình 6.3. Khởi đầu dịch mã eukaryote

1.2.3. Bước 3: Tiểu đơn vị nhỏ tìm thấy codon khởi đầu bằng cách quét xuôi dòng từ 5' của mRNA và sẽ hình thành phức hợp khởi đầu 80S

Một khi gắn vào 5' của mRNA, tiểu đơn vị nhỏ và các yếu tố liên kết với nó di chuyển dọc theo mRNA theo hướng 5' → 3' cho đến khi gặp trình tự 5'-AUG-3' đầu tiên mà nó nhận định là codon khởi đầu. Codon nhận định bằng sự bắt cặp base bổ sung giữa anticodon (bộ ba mã) của tRNA khởi đầu và codon khởi đầu. Sự bắt cặp này thúc đẩy phóng thích eIF2 và eIF3 cho phép tiểu đơn vị lớn gắn vào tiểu đơn vị nhỏ. Sự gắn này dẫn đến phóng thích các yếu tố khởi đầu còn lại thông qua sự thủy phân GTP dưới tác động của eIF5B. Cuối cùng, Met-tRNA_i^{Met} gắn vào vị trí P của phức hợp khởi đầu 80S. Lúc này, ribosome trong trạng thái sẵn sàng tiếp nhận aminoacyl-tRNA vào vị trí A (Hình 6.3).

1.2.4. Nhảy yut khi u d ch mã gi mRNA eukaryote d ng vòng

Ngoài vi c g n vào u 5' c a mRNA, các y ut kh i u còn liên k t ch t ch v i u 3' thông qua uôi poly(A). i u này c th c hi n b i s t ng tác gi a eIF4F và protein g n poly(A) b c bên ngoài uôi poly(A). Vi c tìm th y các y ut kh i u d ch mã có vai trò "vòng hóa" mRNA theo ph ng th c ph thu c uôi poly(A) ã gi i thích c quan sát tr c ây là m t khi ribosome k t thúc s d ch mã m t mRNA mà c vòng hóa thông qua uôi poly(A) thì ribosome m i c phóng thích này là ribosome lý t ng tái kh i u d ch mã trên cùng mRNA.

2. Giai o n kéo dài

2.1. B c 1: Aminoacyl-tRNA c a n v trí A nh y ut kéo dài EF-Tu

M t khi tRNA ã g n amino acid thì EF-Tu n g n vào u 3' c a aminoacyl-tRNA. EF-Tu ch có th g n v i aminoacyl-tRNA khi nó liên k t v i GTP. EF-Tu-GTP a aminoacyl-tRNA vào v trí A c a ribosome. Ch ph c h p aminoacyl-tRNA-EF-Tu-GTP nào có anticodon b sung v i codon c a mRNA t i v trí A thì m i c gi l i trên ribosome. Sau ó, EF-Tu t ng tác v i trung tâm g n y ut c a ribosome n m trên ti u n v l n và th y phân GTP, r i EF-Tu c phóng thích kh i tRNA và ribosome, aminoacyl-tRNA n m l i t i v trí A.

2.2. B c 2: Hình thành c u n i peptide

Aminoacyl-tRNA t i v trí A c quay vào trung tâm peptidyl transferase và c u n i peptide c hình thành. Ph n ng này c xúc tác b i peptidyl transferase, ngày nay nó c xác nh là rRNA, c bi t là rRNA 23S c a ti u n v l n. Vì v y, peptidyl transferase còn c g i là ribozyme.

Trong quá trình hình thành c u n i peptide, c u n i gi a amino acid và tRNA v trí A không b phá v . u 3' c a c hai tRNA c a n g n nhau và nhóm amine c a amino acid v trí A t n công nhóm carboxyl c a amino acid v trí P. K t qu là tRNA v trí A mang m t dipeptide, trong khi tRNA v trí P ã b kh acyl.

Sau ó x y ra s chuy n d ch (xem b c 3): peptidyl-tRNA (ang mang dipeptide) chuy n sang v trí P, và v trí A s n sàng ti p nh n m t aminoacyl-tRNA m i. C u n i peptide ti p theo c hình thành theo cách gi ng h t trên, trong ó nhóm amine c a amino acid m i liên k t v i nhóm carboxyl u C t n cùng c a chu i polypeptide ang t ng h p. Th c ch t, ây là quá trình chuy n chu i polypeptide ang t ng h p t peptidyl-tRNA v trí P sang aminoacyl-tRNA v trí A. Vì v y, ph n ng t o c u n i peptide c g i là ph n ng peptidyl transferase.

Nh v y, chu i polypeptide c t ng h p theo chi u t u N n u C.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

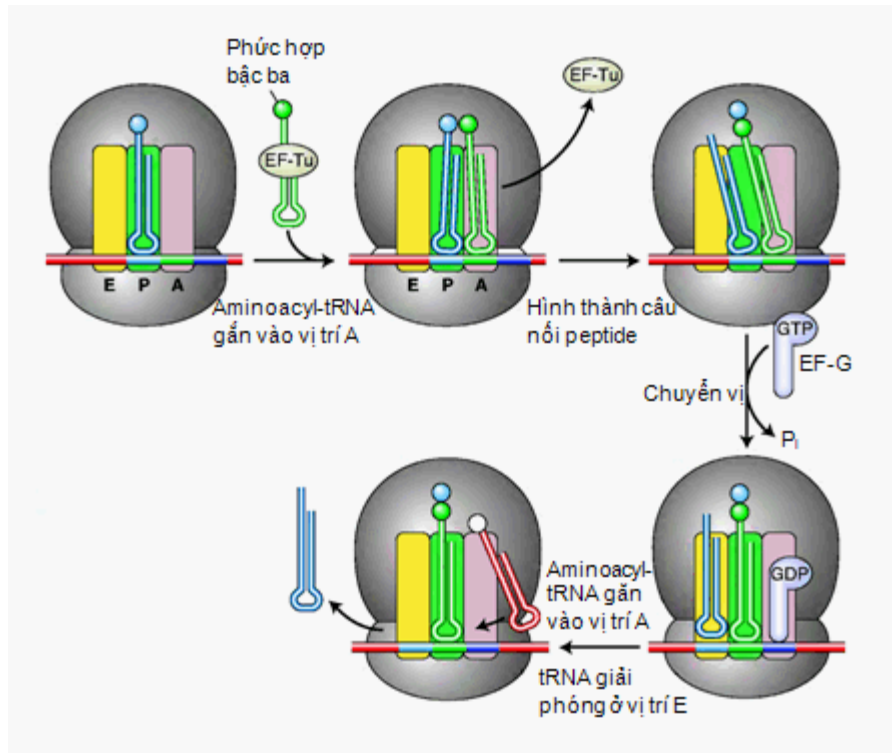
Trong quá trình này, không có sự thủy phân nucleoside triphosphate. Năng lượng cung cấp từ sự phá vỡ liên kết acyl giàu năng lượng gắn liền với chuỗi polypeptide đang tăng trưởng và tRNA.

2.3. Bước 3: Sự chuyển dịch (translocation)

Một khi phản ứng peptidyl transferase xảy ra thì tRNA trong vị trí P không gắn với amino acid nữa, và chuỗi polypeptide đang hình thành gắn liền kết với tRNA trong vị trí A. Một vòng kéo dài polypeptide mới xảy ra, tRNA ở vị trí P rời khỏi vị trí E và tRNA ở vị trí A chuyển đến vị trí P. Đồng thời, mRNA phải di chuyển qua 3 nucleotide của ribosome tiếp xúc với codon tiếp theo. Như vậy sự di chuyển này cũng là sự chuyển dịch.

Bước đầu tiên trong chuyển dịch song hành với phản ứng peptidyl transferase. Khi chuỗi peptide gắn chuyển sang tRNA ở vị trí A, đầu 3' của tRNA này hướng vào vùng vị trí P của tiểu đơn vị lớn, trong khi đầu anticodon vẫn còn nằm ở vị trí A. Tiếp theo, tRNA ở vị trí P (mà không còn gắn chuỗi polypeptide nữa) nằm ở vị trí E của tiểu đơn vị lớn và vị trí P của tiểu đơn vị nhỏ.

hoàn thành sự chuyển dịch phải có sự tác động của một yếu tố kéo dài gọi là EF-G. EF-G gắn vào ribosome khi gắn liền kết với GTP. Sau khi phản ứng peptidyl transferase xảy ra, sự thay đổi vị trí của tRNA ở vị trí A ảnh hưởng đến vị trí gắn cho EF-G. Khi EF-G-GTP gắn vào vị trí này, nó tiếp xúc với trung tâm gắn yếu tố và kích thích thủy phân GTP. Sự thủy phân này làm thay đổi hình dạng của EF-G-GDP và cho phép nó rời đi tiểu đơn vị nhỏ thúc đẩy sự chuyển dịch của tRNA ở vị trí A. Khi sự chuyển dịch hoàn thành, cấu trúc của ribosome giảm đáng kể về vị trí EF-G-GDP, điều này cho phép yếu tố kéo dài tiếp tục phóng thích khỏi ribosome. Cùng với việc tRNA ở vị trí A chuyển đến vị trí P, tRNA ở vị trí P chuyển đến vị trí E và mRNA dịch chuyển ba nucleotide. Tiếp theo, tRNA tiếp tục phóng thích khỏi ribosome (Hình 6.4).



Hình 6.4. Kéo dài d ch mã

2.4. Các y u t kéo dài có g n GDP (EF-Tu-GDP và EF-G-GDP) c i GDP thành GTP tr c khi tham gia vào vòng kéo dài m i

EF-Tu và EF-G là nh ng protein xúc tác mà ch c s d ng m t l n i v i m t vòng kéo dài bao g m a tRNA vào ribosome, hình thành c u n i peptide, và chuy n d ch. Sau khi GTP c th y phân, hai protein trên ph i gi i phóng GDP và g n v i m t GTP m i.

i v i EF-G, do GDP có á l c th p v i EF-G h n GTP nên GDP nhanh chóng c gi i phóng và GTP m i c g n vào.

i v i EF-Tu, c n có s tham gia c a y u t hoán i GTP g i là EF-Ts. Sau khi EF-Tu-GDP c phóng thích kh i ribosome, EF-Ts c g n vào EF-Tu và th ch c a GDP. Sau ó GTP n g n vào ph c h p EF-Tu-EF-Ts. Ph c h p sau cùng c tách thành EF-Ts t do và EF-Tu-GTP.

3. Giai o n k t thúc

3.1. Các y u t gi i phóng k t thúc d ch mã

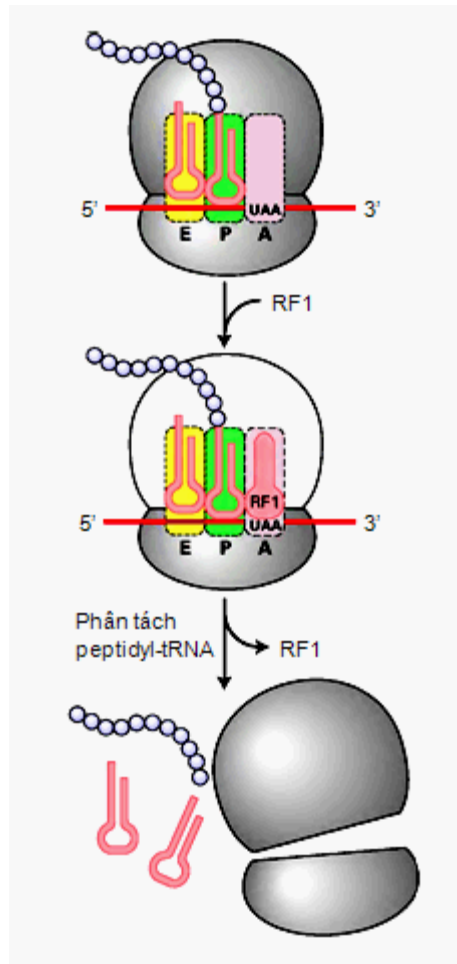
Chu k g n aminoacyl-tRNA c a ribosome, s hình thành c u n i peptide, và s chuy n d ch x y ra liên t c cho n khi m t trong ba codon k t thúc vào v trí A. Các codon này c nh n đi n b i các y u t gi i phóng (RF: release factor) (Hình 6.5).

Có hai lo i y u t gi i phóng:

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Các yếu tố giải phóng loại I nhận diện codon kết thúc và thúc đẩy sự phân tách chuỗi polypeptide khỏi peptidyl-tRNA tại vị trí P. Prokaryote có hai yếu tố giải phóng loại I là RF1 và RF2, trong đó RF1 nhận diện codon kết thúc UAG và RF2 nhận diện UGA, còn UAA được nhận diện bởi cả RF1 và RF2. Eukaryote chỉ có một yếu tố giải phóng loại I là eRF1 nhận diện cả ba loại codon kết thúc.

- Các yếu tố giải phóng loại II kích thích sự tách yếu tố giải phóng loại I ra khỏi ribosome sau khi chuỗi polypeptide được giải phóng. Chỉ có một yếu tố giải phóng loại II, có gọi là RF3 prokaryote và eRF3 eukaryote. Yếu tố giải phóng loại II cần liên kết với GTP.



Hình 6.5. Kết thúc dịch mã

3.2. Sự hoán đổi GDP/GTP và thủy phân GTP liên quan khi hoạt động của yếu tố giải phóng loại II

Yếu tố giải phóng loại II là một protein gắn GTP nhưng có ái lực với GDP cao hơn GTP. Vì vậy, phần lớn RF3 có gắn với GDP. RF3-GDP gắn với ribosome theo một

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

phóng thích polypeptide. Sau khi yếu tố giải phóng loại I kích thích sự phóng thích chuỗi polypeptide, xảy ra một sự thay đổi hình dạng ribosome, và yếu tố giải phóng loại I kích thích RF3 chuyển GDP thành GTP. Sự gắn GTP vào RF3 dẫn đến sự hình thành một tác nhân ái lực cao với ribosome và yếu tố giải phóng loại I rời khỏi ribosome. Sự thay đổi này cho phép RF3 liên kết với trung tâm gắn yếu tố thoát khỏi vị trí E. Sự gắn tác nhân này kích thích thủy phân GTP. Vì không còn yếu tố loại I nữa nên RF3-GDP có ái lực thấp với ribosome và bị phóng thích ra ngoài.

3.3. Sự quay vòng của ribosome

Sau khi phóng thích chuỗi polypeptide và các yếu tố giải phóng, ribosome vẫn còn gắn với mRNA cùng với hai tRNA tại vị trí P và vị trí E. Ribosome tham gia vào quá trình tổng hợp polypeptide mới, tRNA và mRNA phải rời khỏi ribosome và hai tiểu đơn vị của ribosome phải rời nhau ra. Tiếp theo những sự kiện này xảy ra sự quay vòng ribosome (ribosome recycling).

Ở prokaryote, có một yếu tố gọi là yếu tố quay vòng ribosome (RRF: ribosome recycling factor). RRF gắn vào vị trí A, nó bắt chước tRNA. RRF lôi kéo EF-G ra khỏi ribosome và EF-G kích thích giải phóng những tRNA tại vị trí P và E. Sau đó, EF-G và RRF cùng phóng thích khỏi ribosome cùng với mRNA. IF3 có thể tham gia vào sự giải phóng mRNA nhưng nó cần cho sự tách rời hai tiểu đơn vị của ribosome. Kết quả là một tiểu đơn vị như IF3 và tiểu đơn vị lớn tự do. Ribosome bây giờ có thể tham gia vào vòng dịch mã mới.

V. Các nhân tố ức chế dịch mã

Quá trình dịch mã bao gồm một chuỗi các bước và tuân theo một quy tắc là không có một bước nào có thể xảy ra khi bước trước nó chưa hoàn thành. Tuy nhiên, nếu một yếu tố nào đó trong chuỗi mã là một chuỗi ngẫu nhiên có một bước không hoàn thành thì toàn bộ quá trình phải bị ngừng lại. Vì vậy, dịch mã thường là một mục tiêu tác động của nhiều loại kháng sinh và các chất (Bảng 6.2).

Khoảng 40% các loại kháng sinh là những yếu tố ức chế dịch mã. Các kháng sinh này tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh vì họ có thể ngăn chặn sự tổng hợp protein của vi khuẩn. Tuy nhiên, vì khuynh hướng không nhận biết sự khác biệt giữa dịch mã của eukaryote, do quá trình dịch mã của vi khuẩn và eukaryote có những điểm khác nhau có ý nghĩa, ví dụ ribosome khác nhau về kích thước và các thành phần. Nhiều kháng sinh gắn chọn lọc với ribosome của vi khuẩn và ức chế nhiều bước trong dịch mã nhưng không nhận biết sự khác biệt giữa dịch mã của eukaryote. Ví dụ tetracycline gắn vào vị trí A của ribosome vi khuẩn và ức chế sự gắn vào của các aminoacyl-tRNA nhưng không hiệu quả trên ribosome của eukaryote. Những kháng sinh khác nhau thì ức chế các bước khác nhau trong quá trình dịch mã nên chúng thường được sử dụng nghiên cứu sự hoạt động của bộ máy dịch mã, đặc biệt là

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

puromycin. Do cấu trúc ba chi u c a puromycin giống với u 3' c a aminoacyl-tRNA nên nó có thể gắn vào vị trí A và chèn vào đây c a các aminoacyl-tRNA.

Bảng 6.2. Sơ đồ đích mã c a m t s kháng sinh và c t

Kháng sinh Độc tố	Tế bào đích	Đích ở mức phân tử	Hậu quả
Tetracycline	Prokaryote	Vị trí A/30S	Ức chế gắn tRNA vào A
Hygromycin B	Prokaryote Eukaryote	Gắn vị trí A/30S	Ngăn cản chuyển dịch của tRNA từ A sang P
Paromycin	Prokaryote	Vị trí tương tác codon-anticodon/30S	Giảm tính chọn lọc của sự bắt cặp base giữa codon và anticodon
Chloramphenicol	Prokaryote	Trung tâm peptidyl transferase/50S	Ngăn cản đưa tRNA tại A vào phản ứng peptidyl transferase chính xác
Puromycin	Prokaryote Eukaryote	Vị trí A/tiểu đơn vị lớn	Kết thúc sớm sự tổng hợp polypeptide
Erythromycin	Prokaryote	Kênh thoát peptide/50S	Ức chế chuỗi polypeptide đi ra khỏi ribosome
Fusidic acid	Prokaryote	EF-G	Ngăn cản phóng thích EF-G-GDP khỏi ribosome

Thiostrepton	Prokaryote	Trung tâm gắn yếu tố /50S	Ảnh hưởng sự gắn của IF2 và EF-G với trung tâm này
Kirromycin		EF-Tu	Ngăn cản thay đổi hình dạng liên quan thủy phân GTP, phóng thích EF-Tu
Ricin, α -Sarcin	Prokaryote Eukaryote	Biến đổi hóa học RNA trung tâm gắn yếu tố	Ngăn cản sự hoạt hóa các yếu tố dịch mã GTPase
Diphtheria	Eukaryote	Biến đổi hóa học EF-Tu	Ức chế chức năng EF-Tu
Cycloheximide	Eukaryote	Trung tâm peptidyl transferase/60S	Ức chế hoạt tính peptidyl transferase

Cuối peptide có thể hình thành giả puromycin tại vị trí A và chuỗi polypeptide tại vị trí P. Tuy nhiên, puromycin không gắn vào vị trí P nên sẽ chuyển dịch không xảy ra và chuỗi polypeptide gắn puromycin rời khỏi ribosome dù quá trình tổng hợp đã kết thúc. Do cấu trúc của tRNA là tương tự nhau nên puromycin có thể dịch mã ở vi khuẩn và tế bào eukaryote, nhưng nó tiêu diệt tế bào vi khuẩn cùng với vi khuẩn. Thông thường, puromycin cũng có dùng để ức chế sự phát triển của nấm men.

Tài liệu tham khảo/ thêm

1. **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P.** 2002. Molecular Biology of the Cell. 4th ed. *Garland Science Publishing, Inc.* New York, USA.
2. **Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Gelbart WM, Suzuki DT and Miller JH.** 2005. An Introduction to Genetic Analysis. *WH Freeman & Co.* New York, USA.
3. **John LB, Carey JC, Bamshad MJ and White RL.** 2003. Medical Genetics. *Mosby Publishing,* Missouri, USA.
4. **Karp G.** 2002. Cell and Molecular Biology. *John Wiley & Sons, Inc.* New York, USA.
5. **Pierce BA.** 2003. Genetics: A Conceptual Approach. *WH Freeman & Co.* New York, USA.
6. **Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M and Losick R.** 2004. Molecular Biology of the Gene. *Pearson Education, Inc./Benjamin Cummings Publishing,* San Francisco, USA.

¹Chính xác là từ 3-4 phân tử RNA và từ 55-82 protein.

Chương 7

Sai lệch và đột biến DNA

Trên phân tử DNA có thể xuất hiện nhiều biến dị do sai lệch trong quá trình trao đổi chất, do các tác nhân gây đột biến vật lý và hóa học của môi trường. Tuy nhiên, genome luôn có tần suất cao nhất các đột biến sai lệch và đột biến DNA. DNA là phân tử duy nhất, mà khi biến dị hay bị phá hủy vẫn có khả năng tái sinh thành tế bào. Các đột biến sai lệch rất đa dạng và có hiệu quả cao. Ba quá trình bao gồm sửa sai, tái bản và tái tổ hợp DNA liên quan chặt chẽ với nhau. Đây cũng là một minh chứng về sự phù hợp chặt chẽ giữa cấu trúc và chức năng.

I. Khái quát về các đột biến sai lệch

Hầu hết các đột biến trên phân tử DNA thường được khắc phục bằng hai phương thức chính:

- Sửa chữa trực tiếp (direct reversal repair), hoặc:
- Cắt bỏ sai lệch và sửa chữa lại bằng cách dùng trình tự bổ sung (damage excision and repair using complementary sequence).

Sai lệch trực tiếp thường liên quan đến hai loại sai lệch trên phân tử DNA do tia tử ngoại gây ra là: cyclobutane-pyrimidine dimer (CPDs) và pyrimidine (6-4) pyrimidone (6-4 PPs). Hai loại sai lệch này đều làm biến dạng cấu trúc xoắn của DNA. CPDs và 6-4 PPs được nhận biết và sửa chữa bởi enzyme photolyase. Enzyme này sử dụng năng lượng ánh sáng để chuyển đổi ngược lại các liên kết hóa học nucleotide trở lại dạng bình thường. Phần sai lệch của DNA bằng photolyase xảy ra trong rất nhiều sinh vật prokaryote và eukaryote. Tuy nhiên, quá trình này không thể xảy ra ở tất cả các loài thực vật có vú. Người ta cũng đã phát hiện một số loài photolyase khác.

Đối với sai lệch của DNA được sửa chữa bằng phương thức thứ hai. Cơ chế này phụ thuộc vào thông tin di truyền chứa đựng trong hai sợi của DNA. Khi trình tự nucleotide trên một sợi bị thay đổi thì sợi thứ hai (liên kết bổ sung với sợi thứ nhất) sẽ dùng làm khuôn mẫu để sửa chữa những sai lệch đó. Một số cơ chế sửa chữa như sau:

- Hầu hết những sai lệch nhận biết các trình tự DNA không thích hợp với các cặp base khuôn và thay thế chúng.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Hệ thống sửa chữa cắt bỏ (excision-repair system) loại bỏ một đoạn DNA ở vị trí sai hỏng và sau đó thay thế nó.

- Hệ thống sửa chữa tái tổ hợp (recombinant-repair system) sử dụng phage để tái tổ hợp thay thế vùng sai hỏng.

Các hệ thống sửa chữa enzyme phức tạp như máy tái bản của nó, đều có cho thấy tầm quan trọng của chúng trong việc sửa chữa tế bào. Khi hệ thống sửa chữa phức tạp mà sai hỏng của DNA, thì không có một thụ thể nào xảy ra. Nhưng một tế bào có thể tồn tại lâu khi DNA bị hỏng.

Hình 7.1 tóm tắt một số cách sửa chữa DNA như sau:

- Một vài enzyme phức tạp trực tiếp các loại sai hỏng của DNA.

- Một số phage sử dụng các cách cắt bỏ base, sử dụng các cách cắt bỏ nucleotide, và sử dụng ghép đôi lệch, tất cả các cách này của chúng thể hiện bằng cách loại bỏ và thay thế nguyên tử.

- Các hệ thống chuyển đổi có thể tái tổ hợp tồn tại mà không bị sai hỏng thay thế cho một số lỗi sai hỏng.

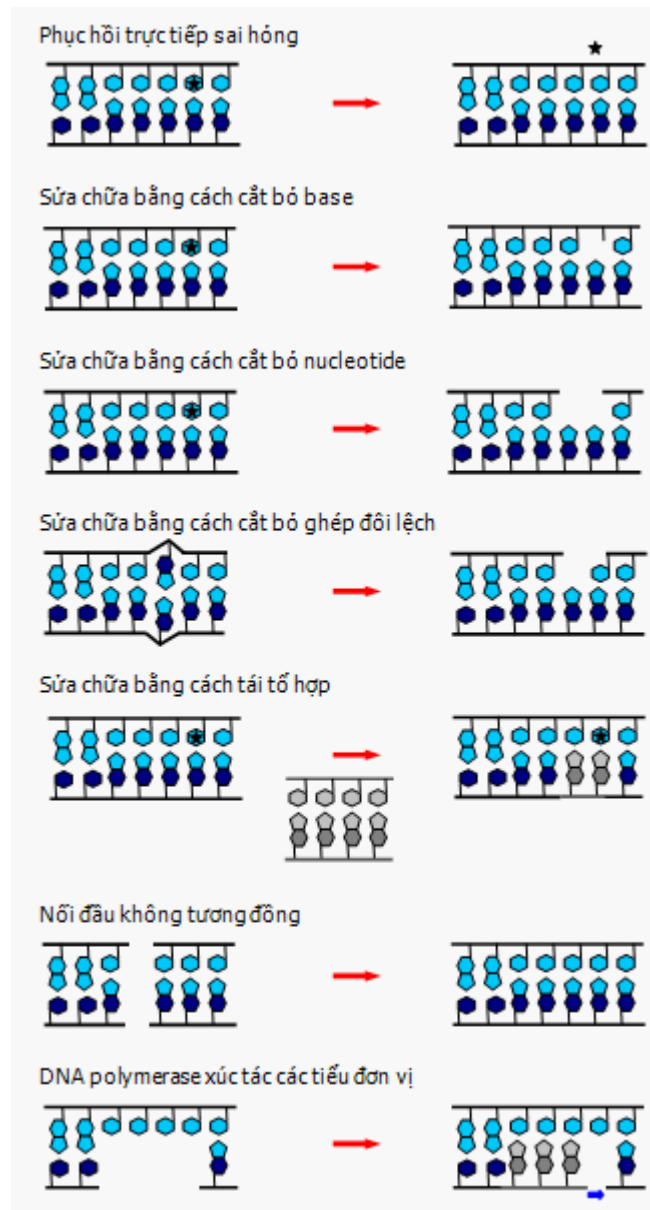
- Phage thể hiện không thể ngăn chặn các virus lỗi hỏng.

- Một số DNA polymerase khác nhau cần thiết trong việc tổng hợp lại các đoạn DNA thay thế.

1. Các biến dị xảy ra trên phân tử DNA

Trên DNA có thể xảy ra các biến dị tự nhiên như sau:

- Gãy hay đứt mạch. Phân tử DNA có chiều ngang rất mảnh, bản thân nó lại thường xuyên cuộn xoắn và giãn xoắn nên dễ xảy ra đứt gãy một số. Tuy nhiên, khi ngưng tụ cùng lúc hai sợi thì khi gặp nhiệt độ.



Hình 7.1. Ví dụ về các cơ chế sửa chữa sai hỏng của DNA

- Base bất thường này làm base thường không bắt cặp. Do đó tác động của nó có thể xảy ra quá trình khử purine (depurination) do thủy phân liên kết N-glycosyl.

- Các nhóm methyl vào base liên kết hóa trị làm thay đổi tính chất như trình tự methyl hóa (các nhóm CH_3 vào methyl base).

- Bất thường base này thành methyl base khác làm bắt cặp sai. Ví dụ: quá trình khử amine (desamination) của cytosine biến nó thành uracil.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Các base có thể tồn tại hai dạng keto và enol nên có thể dẫn đến bất cặp sai. Ví dụ: dạng enol của cytosine có thể bắt cặp với adenine.

- Tạo các thymine dimer.

- Liên kết chéo giữa các mạch (interstrand crosslink).

Trên đây là các biến dị tự nhiên, nếu có tác động của các tác nhân gây đột biến các biến dị sẽ xảy ra nhiều hơn.

2. Khái quát các cơ chế sửa chữa đột biến

Số nguyên vẹn của phân tử DNA mang thông tin di truyền có ý nghĩa sống còn đối với tế bào, nhất là tế bào prokaryote. Tế bào vi khuẩn, có khoảng 50% DNA không bắt cặp với thymine sau khi tái bản khoảng 100 triệu lần. Số lượng cao của DNA tế bào có nghĩa hàng loạt các cơ chế bảo vệ số nguyên vẹn và sửa chữa ngay lập tức bắt sai hỏng nào xảy ra.

Các hệ thống sửa chữa đột biến và có hiệu quả rất cao ở *E. coli*. Có khoảng 100 locus tham gia trực tiếp hoặc gián tiếp vào việc bảo vệ DNA và sửa chữa.

Chỉ với DNA, tế bào phải vượt trội hơn so với hệ thống thông tin di truyền. Nếu như sửa chữa bắt xảy ra khi phân bào, thì các cơ chế sửa chữa phải hoạt động liên tục. Tái bản các thành viên của hệ thống bảo vệ các lỗi tế bào và trong môi trường nhân đôi DNA. Trong khi đó, sai hỏng xảy ra rất thường xuyên, nên các cơ chế sửa chữa nhiều và với số lượng gen tham gia lớn hơn. Hơn nữa, các cơ chế di truyền cần bản sửa chữa, tái tổ hợp DNA đều có sự tham gia của các cơ chế sửa chữa và ngăn ngừa sửa chữa tái bản và tái tổ hợp.

3. Biến dị làm tăng tần suất biến

Nếu các cơ chế sửa chữa nên bình thường DNA tế bào có thể vượt trội hơn, thì sẽ thay thế base có tần số 10^{-9} - 10^{-10} . Tuy nhiên, ngày nay đã phát hiện ra các dòng tế bào biến dị tự nhiên tần suất cao hơn, chúng được gọi là mutator (nhân tố gây đột biến). Trong nghiên cứu, các kiểu hình mutator liên quan đến sai hỏng trong hệ thống sửa chữa. Ở *E. coli*, các locus mutator *mutH*, *mutL*, *mutU* và *mutS* tác động lên các thành phần của hệ thống sửa chữa do ghép đôi lệch (mismatch-repair) sau tái bản nên đã làm cho tần suất biến dị tự nhiên tăng cao.

Ngoài mutator, sự sai hỏng làm tăng tính nhạy cảm với tia tử ngoại (ultraviolet) và tăng sai hỏng khi tái tổ hợp.

II. Các kiểu sửa chữa

1. Quang tái hoạt hóa

Sửa chữa trực tiếp bằng quang tái hoạt hóa (photoreactivation) ít khi gặp, nó bao gồm sự phân hủy liên kết cộng hóa trị giữa các nucleotide bị biến đổi thành các sai hỏng và quá trình này xảy ra ngoài sáng. Quang tái hoạt hóa của các pyrimidine dimers, trong đó có hại cho các liên kết hóa trị của phân tử enzyme phụ thuộc ánh sáng (light-dependent enzyme), là một ví dụ điển hình (Hình 7.2). Hệ thống sửa chữa này phổ biến trong tự nhiên, và đặc biệt quan trọng ở thực vật. Trong *E. coli*, nó phụ thuộc vào sản phẩm của một gen (*phr*) mã hóa cho một enzyme đặc biệt là photolyase.

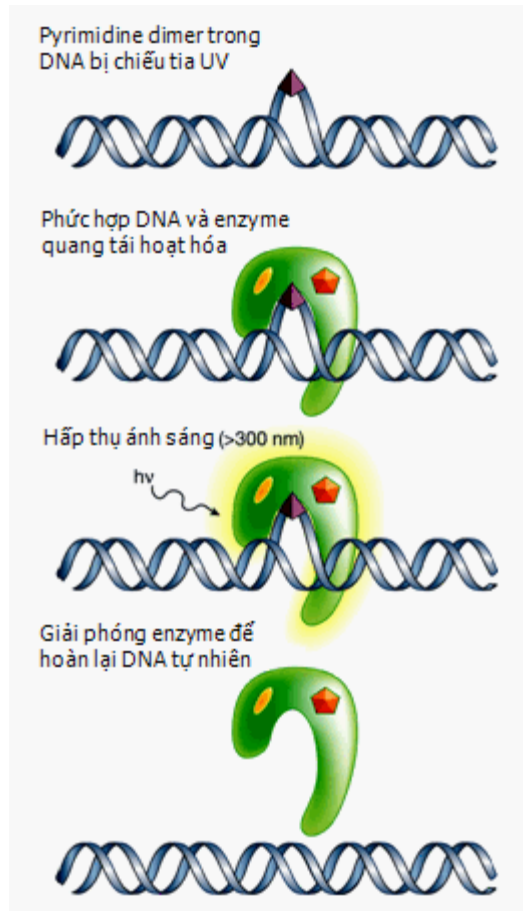
Sau khi xảy ra tia tử ngoại gây đột biến, nếu chiếu ánh sáng thì phân tử sai hỏng sẽ phân hủy. Hệ thống này đặc biệt là quang tái hoạt hóa. Năng lượng của ánh sáng khả kiến (từ 300 đến 600 nm) hoạt hóa photolyase (gen *phr* ở *E. coli*) cắt các vòng cyclobutyl pyrimidine dimer (thường là thymine dimer).

Enzyme này hoạt động trong các tế bào nhiều loài khác nhau. Vào ban ngày, các sinh vật thực vật chịu tác động của ánh sáng, nên cơ chế quang tái hoạt hóa (quang phân hủy) có vai trò quan trọng trong sửa chữa sai DNA. Ví dụ: *Mycoplasma*, sinh vật nhân sơ hiện nay, chỉ có vài trăm gen nhưng một trong số đó mã hóa enzyme cho quang tái hoạt hóa.

2. Sửa chữa ghép đôi lệch

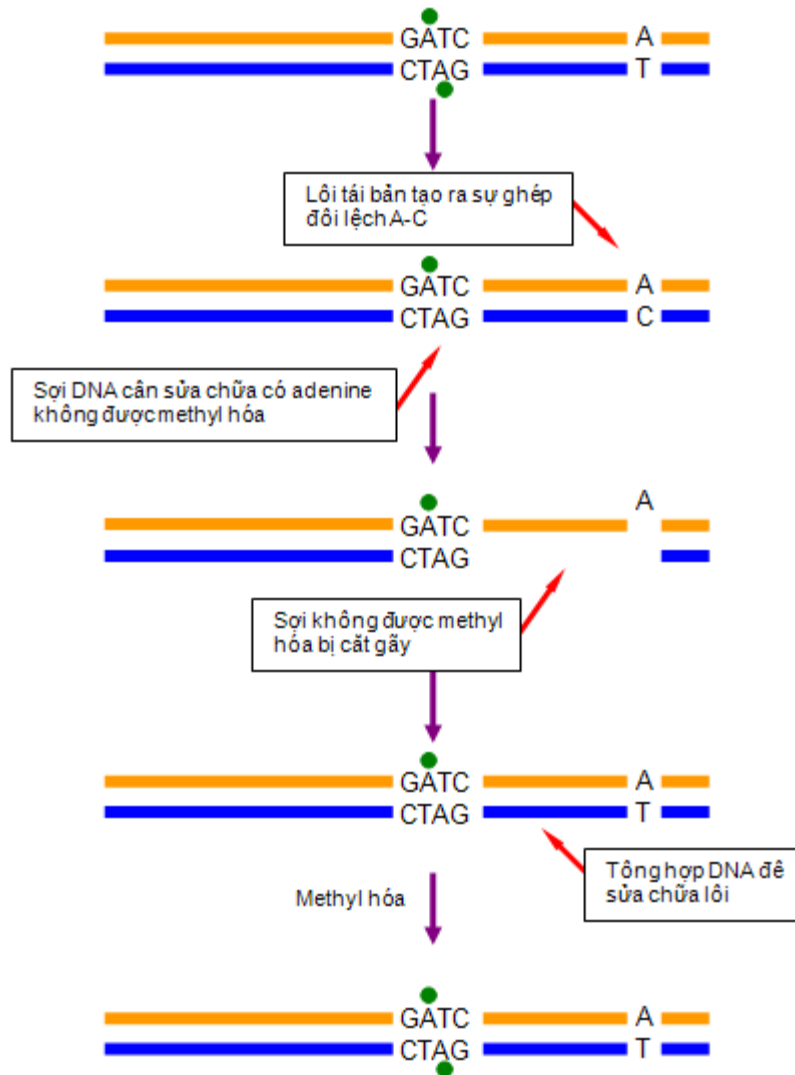
Sửa chữa ghép đôi lệch (mismatch-repair) giữa các sợi DNA là một trong những cơ chế chính của hệ thống sửa chữa sai. Sửa chữa ghép đôi lệch đặc biệt hành động khi phát hiện trên DNA các base không khớp nhau mà không bắt cặp thích hợp. Các ghép đôi lệch tăng lên trong suốt quá trình tái bản của sửa chữa bằng cách phân biệt giữa các sợi mẹ và sợi con. Sửa chữa trình tự của các sợi con bằng cách phân biệt giữa các sợi mẹ và sợi con dựa trên sự khác biệt của các base, là một kỹ thuật gọi là khử amin (deamination).

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html



Hình 7.2. Quang tái hoạt hóa

Ghép đôi l ch th ng c s a sai b ng ph ng th c s a ch a c t b , c kh i u b ng m t enzyme nh n bi t m t base sai h ng th c s ho c có s thay i chi u h ng không gian (spatial path) c a DNA.



Hình 7.3. Sự sửa chữa ghép đôi lệch trong tái bản

Sinh vật và sự sửa chữa các sai lệch do bất cặp base sai trên DNA được phát hiện ở *E. coli*, nấm men và tế bào động vật có vú. Vì khuẩn *E. coli*, có ba hệ thống enzyme khác nhau để sửa chữa các sai lệch bằng cách:

- Loại bỏ sai trong tái bản (errors in replication).
- Loại bỏ ghép đôi lệch bên trong các đơn trung gian tái tổ hợp (mismatch within recombinant intermediates).
- Loại bỏ thymine cacp GT trong trình tự 5-methylcytosine bằng nhóm amine (NH₂) thành thymine.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

3. Sửa chữa

Có hai loại hệ thống sửa chữa, đó là:

- Hệ thống sửa chữa base (base excision repair) loại bỏ trực tiếp base sai hỏng và thay thế nó trong DNA. Ví dụ điển hình là enzyme DNA uracil glycolase, loại bỏ các uracil không cặp (mispaires) với các guanine.

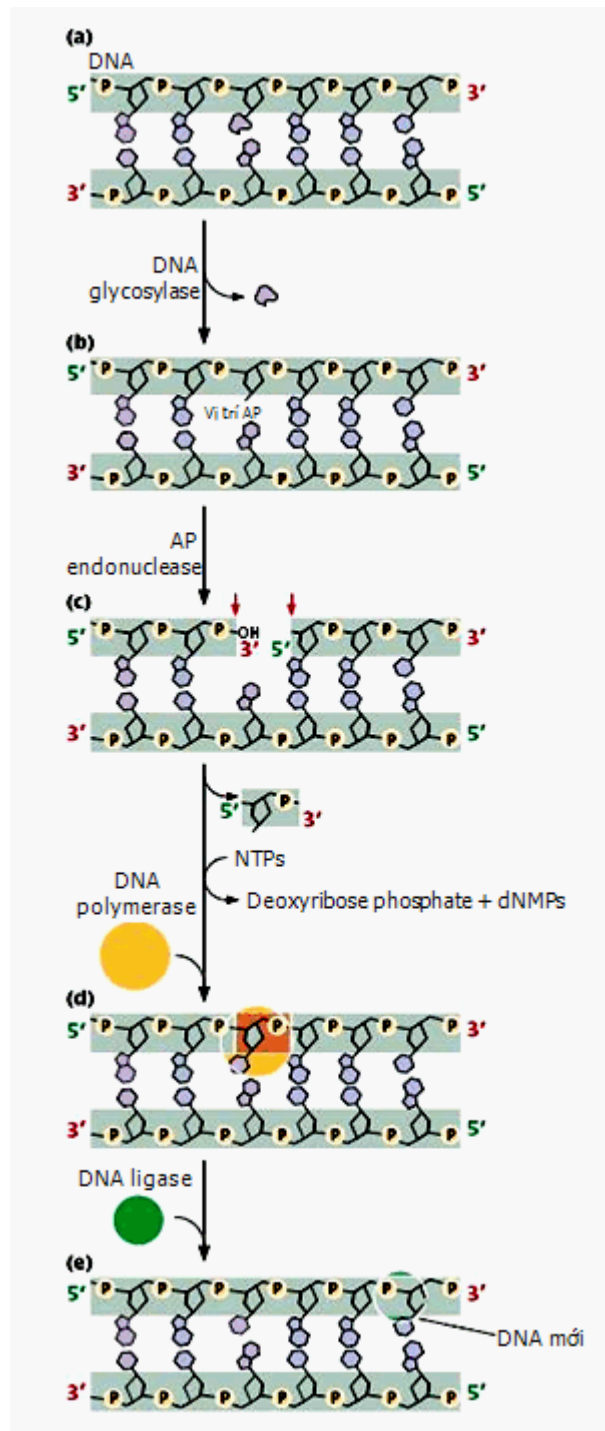
- Hệ thống sửa chữa nucleotide (nucleotide excision repair) cắt bỏ một trình tự bao gồm các base sai hỏng; sau đó một đoạn DNA mới được tổng hợp thay thế các nguyên liệu bị cắt bỏ. Các hệ thống này phổ biến ở hầu hết sinh vật.

3.1. Cắt bỏ base

Vì có loại bỏ chỉ sai lệch thể hiện như một hoặc vài enzyme *N*-glycosylase. *N*-glycosylase nhận biết base bị biến đổi hay một gốc amine hoặc bị biến đổi cấu trúc xoắn do sai lệch tạo ra và thủy phân liên kết *N*-glycosylic giữa base với đường và pentose. Liên kết được tạo ra do các DNA polymerase làm yếu liên kết vào khuôn mẫu bổ sung đi và ligase nối liền chúng (Hình 7.4).

3.2. Cắt bỏ nucleotide

Vì có cắt bỏ một vùng cố định thymine dimer (do UV) hoặc vùng liên kết chéo giữa các sợi, thể hiện như incision nuclease (nuclease tác động trên DNA) như phức hợp Uvr ABC của *E. coli*, phức hợp này cắt các đoạn 12-13 nucleotide từ chuỗi DNA. Thủy phân thể hiện liên kết phosphodiester thymine ở đầu 5' của chuỗi hỏng và phía 3' là liên kết thymine hay n-methyl.



Hình 7.4. Ph ng th c c t b base

C u trúc s i kép b sung cho nhau c a DNA cho phép, n u thông tin b m t do c t b sai h ng trên m t s i có th chép l i c nh d a vào s i n b sung kia. Tuy nhiên, m t s sai h ng liên quan cùng lúc c hai s i c ng có th c s a ch a nh vào

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

một số nucleotide thường gặp nhất là adenine và thymine trong genome. Sự mất một hay xen một nucleotide, hay liên kết chéo giữa các sợi DNA có thể xảy ra do các sai sót thay thế một nucleotide bằng một nucleotide khác. Những sai sót này có thể được sửa chữa bởi các enzyme như DNA polymerase và DNA ligase hay tái tổ hợp (Hình 7.5).

4. Các sai sót trong việc ghép cặp base

Các sai sót trong việc ghép cặp base (proofreading for base-pair matching) xảy ra trong quá trình tổng hợp DNA. Sự ghép cặp của DNA polymerase đảm bảo cho sự chính xác của tái bản. Trước khi thực hiện phản ứng polymer hóa nucleotide, nucleotide triphosphate mới được ghép cặp với base bổ sung trên sợi khuôn mẫu. Nếu xảy ra sai sót, DNA polymerase sẽ loại bỏ nucleotide ghép cặp sai.

Thông thường, trước khi nucleotide mới được ghép vào, enzyme dò tìm các sai sót để loại bỏ chúng không ghép cặp thì sẽ thực hiện phản ứng polymer hóa theo chiều ngược lại. Các nucleotide ở vị trí 3' ghép cặp sai sẽ bị loại bỏ bởi hoạt tính exonuclease 3'→5' của DNA polymerase. Khi xảy ra sai sót, quá trình polymer hóa mới tiếp tục.

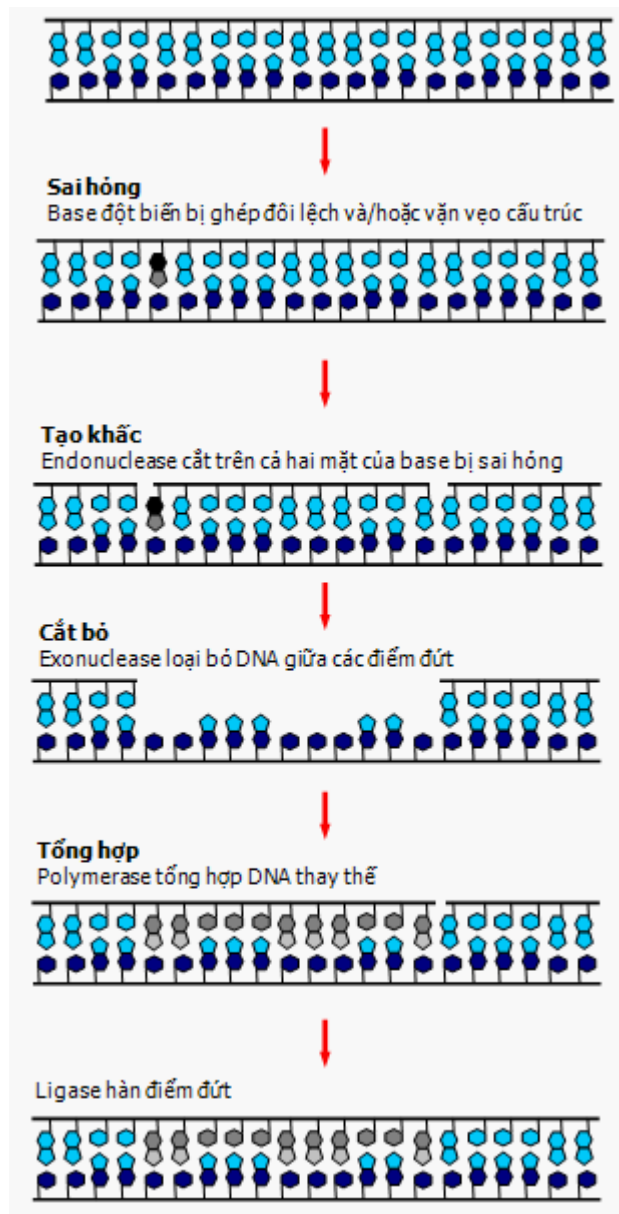
Hoạt tính sửa chữa các sai sót trong việc ghép cặp base là một tính năng của nhiều DNA polymerase để đảm bảo cho sự kéo dài chính xác của sợi đang tổng hợp. Tuy nhiên, trong trường hợp cần thiết, DNA polymerase có thể bỏ qua các sai sót và chép tiếp như các sai sót tái bản "error prone" (xem mục 6).

5. Các hình thức sửa chữa tái tổ hợp

Các vị trí có sai sót, xảy ra trong một phân tử con (daughter molecule), sẽ được sửa chữa bằng các cơ chế khác nhau. Một cơ chế là sửa chữa sai sót bằng cách lấp đầy khoảng trống (gap) trên sợi đang tổng hợp.

Khi DNA polymerase gặp thymine dimer hay một sai sót khác trên sợi DNA khuôn mẫu, có hai khả năng xảy ra:

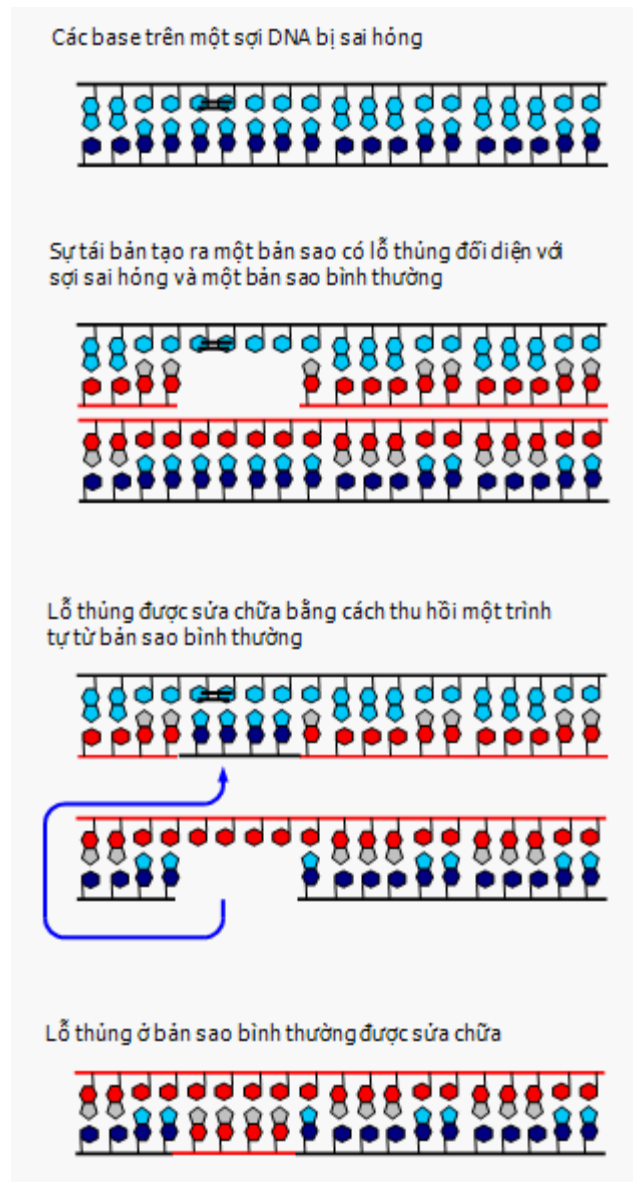
- Polymerase tiếp tục tổng hợp theo khuôn mẫu do tái tổ hợp và vượt qua các sai sót.



Hình 7.5. Cắt bỏ nucleotide. Sản phẩm và cắt bỏ một đoạn DNA có (các) base sai hỏng.

- Polymerase di chuyển và hủy bỏ khoảng 1.000 nucleotide phía xuôi (downstream); chuỗi ngắn gián đoạn clip và visibung tổng hợp chị em (sister duplex) do tái hợp.

Trong cả hai trường hợp, chuỗi sai lệch vẫn còn và cắt bỏ sau đó bị sửa sai trực tiếp hay cắt bỏ.



Hình 7.6. Sửa sai nh: tái tổ hợp và tái bản

6. Hệ thống SOS

Hệ thống SOS (chứa khoảng 30 gen không liên kết và thường bị ức chế bởi protein LexA) sẽ hoạt động khi tế bào bị các tác nhân gây đột biến tự nhiên như sai hỏng trên DNA. Trong trường hợp DNA bị hỏng nghiêm trọng, hệ thống SOS sẽ chuyển đổi thành một hệ thống "error-prone".

Ở vi khuẩn *E. coli* người ta đã quan sát thấy sự phá hủy DNA làm mất khoảng 20 gen của hệ thống SOS, các kinase kiểm soát âm tính của LexA (LexA repressor).

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Trong trường hợp có nhiều sai hỏng liên tiếp, LexA bị kích thích, thay đổi cấu hình, mất chức năng và mất hoạt tính ức chế. Lúc đó các gen của hệ thống SOS được cảm ứng. Nếu quá trình sửa sai thực hiện không kịp thì tế bào phải chấp nhận hoặc bị tử vong chết.

Protein RecA khi gặp hệ thống SOS như sau:

- Hệ thống SOS là trình tự DNA (operator) dài khoảng 20 bp có nhiều vị trí liên kết protein của chuỗi ức chế LexA.

- Sai hỏng của DNA làm cho RecA khi gặp trình tự SOS, chia các gen mã hóa cho nhiều enzyme sửa chữa.

- RecA hoạt hóa hoạt tính tự phân giải của LexA.

- LexA ngừng chặn hệ thống SOS, nhờ trình tự phân giải của nó đã hoạt hóa các gen của hệ thống này.

6.1. Sửa chữa theo cơ chế “error-prone”

Phân tử DNA có thể bị sai hỏng ngẫu nhiên khi bị chiếu tia tử ngoại hoặc khi chịu tác động của các tác nhân gây ung thư (carcinogens). Lúc đó, không phải chỉ một số phân tử DNA bị hỏng mà cả hai sợi đều bị đứt gãy và mất đi một số nucleotide. Thông tin di truyền của nó hỏng hoàn toàn nên không có sự khuôn mẫu sửa chữa theo các cơ chế thông thường. Trong trường hợp này, tế bào còn lại một giải pháp duy nhất là ngừng ngừng sống sót đó là sửa chữa DNA một cách ngẫu nhiên với lỗi sai sót (tỷ lệ) cao như dù sao vẫn duy trì sự sống. Đây chính là cơ chế sửa chữa DNA “error-prone” (còn có thể xem như là sự phát sinh tế bào SOS). Như vậy, sửa chữa DNA theo cơ chế này có thể là một trong những nguyên nhân tạo nên tính đa dạng của DNA.

Khi phân tử DNA bị tử vong, một số protein đặc biệt làm nhiệm vụ điều chỉnh quá trình tổng hợp DNA sửa chữa theo các cơ chế khác nhau. Bởi vì nếu tế bào tiếp tục phân chia (tức là DNA tiếp tục nhân lên) thì tỷ lệ tử vong cao sẽ xuất hiện khi số tế bào sống sót giảm xuống.

Một số trường hợp sai hỏng của chuỗi base được gọi là error-prone:

- DNA kết hợp với các base không bổ sung trên sợi con (bắt cặp sai).

- DNA bị sai hỏng không có sửa chữa do DNA polymerase III bị giải phóng trong suốt quá trình tái bản.

DNA polymerase V (được mã hóa bởi gen *umuD* và *umuC* của *E. coli*), hoặc DNA polymerase IV (được mã hóa bởi gen *dinB* của *E. coli*) được cảm ứng trong hệ thống SOS, tổng hợp một số bổ sung cho sợi DNA bị hỏng. DNA polymerase V là một phức hợp của hai protein tiểu đơn vị UmuD' và một protein tiểu đơn vị UmuC (Trong quá trình sửa chữa “error-prone”, protein RecA, hoạt động như một co-protease, gián tiếp xúc tác cắt protein UmuD thành một đơn vị có hoạt tính, UmuD'). DNA polymerase IV

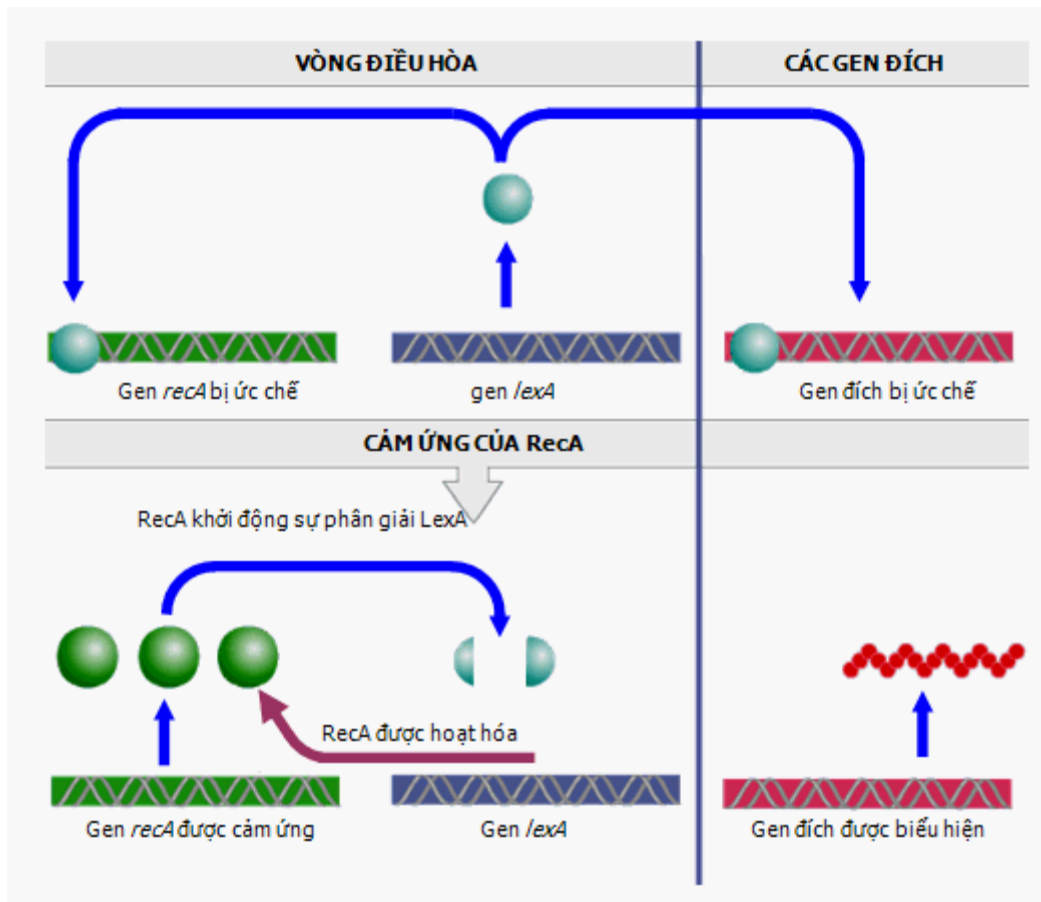
Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

và V là một phần của một họ lớn, bao gồm các DNA polymerase là những enzyme cần thiết trong sửa chữa DNA bị sai hỏng do chúng có hoạt tính polymerase.

Các protein tương tự như UmuD (thực tế là UmuD') và UmuC có khả năng gắn các nucleotide vào sợi DNA bị đứt gãy không tận cùng ở khuôn mẫu. Như vậy, chúng có thể thực hiện hoạt tính của exonuclease 3'→5' của DNA polymerase hoặc chính chúng là một loại DNA polymerase đặc biệt (DNA polymerase V). Khi đột biến xảy ra trên gen mã hóa cho UmuD và UmuC, các tế bào vi khuẩn sẽ sống sót ít hơn tế bào bình thường dưới tác động của tia tia t gamma. Một vài plasmid mang gen *mucA* và *mucB*, tương ứng với gen *umuD* và gen *umuC*, khi đưa vào trong vi khuẩn làm tăng tính kháng với tia tia t gamma. Ngoài ra, khi có hai sợi DNA duy nhất bị nhiễm trong genome còn có ít nhất một bản sao gen *hns* hoặc *hnh*, lúc đó *hns* hoặc *hnh* có thể ức chế trao đổi chéo dùng bản sao làm khuôn mẫu.

6.2. Protein LexA

Hoạt tính của RecA gây ra sự phân giải sản phẩm protein của gen *lexA*. LexA là một protein nhỏ (22 kDa) khác nhau trong các tế bào không bắt buộc, nghĩa là nó có chức năng như một chất ức chế của operon. Phân giải phân giải là không thể xuyên; LexA có hoạt tính protease mà ngược lại hóa bởi RecA. Khi RecA hoạt hóa, nó sẽ gây ra phân giải phân giải của LexA làm bất hoạt chức năng của LexA, và cảm ứng phiên mã của operon mà nó liên kết. Phân giải này được minh họa trong hình 7.7.



Hình 7.7. LexA và RecA có quan hệ với kháng thu n ngh ch. Protein LexA ức chế nhiều gen có các chức năng sửa chữa, *recA* và *lexA*. Hoạt tính của RecA dẫn đến phân giải protein LexA và cảm ứng tất cả các gen này.

Các gen đích của protein ức chế LexA có nhiều chức năng sửa chữa. Một số gen SOS này chỉ hoạt động các tế bào bị tổn thương. Như gen khác hoạt động các tế bào không bị tổn thương, nhưng mức biểu hiện của chúng lên như sự phân giải của LexA. Sau khi phân giải LexA, gen có thể biểu hiện từ promoter thay thế giống như promoter ưu tiên.

Protein LexA ức chế các gen đích của nó bằng cách liên kết với một đoạn DNA dài 20 bp đặc biệt là hộp SOS, bao gồm một trình tự liên kết (consensus sequence: 5'-CTGTN₈ACAG-3') với 8 vị trí bảo toàn tuyệt đối (N₈). Giống như các operator khác, các hộp SOS xếp chồng lên các promoter tương ứng. locus *lexA*, vị trí của các chuỗi sinh, có hai hộp SOS khác nhau.

6.3. Protein RecA

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Sự cần thiết trực tiếp của protein RecA trong sự tái tổ hợp là một trong những hoạt tính của nó. Nó có thể xúc tiến hóa bất kỳ các sai lầm làm sai hỏng DNA hoặc các sai sót bất thường trong *E. coli*. Điều này giúp nó khiếm khuyết chức năng thay thế khi hình thành các protein SOS, yếu tố cần thiết cho sự biểu hiện của nhiễm sắc thể mà các sản phẩm của chúng có các chức năng sửa chữa. Các hoạt tính kép này của protein RecA làm cho nó ít bị tổn thương bởi tia UV trong sự sửa chữa các tế bào bị biến đổi *recA* là do mất chức năng trao đổi sợi DNA của RecA hay là do mất vài chức năng khác mà sự cảm ứng của nó phải thu nạp vào hoạt tính protease.

Sự sai hỏng xuất hiện có thể do chiếu tia UV (hầu hết trong các trường hợp nghiên cứu) hoặc do các nhân tố liên kết chéo hoặc sự alkyl hóa (alkylation). Sự tái tổ hợp do mất sự phong phú của thymine (deprivation) thymine, bổ sung thêm thymine, hoặc các đột biến trong một số gen *dna*, có cùng hiệu quả.

Ưu tiên là hoạt tính RecA bị sai hỏng. Chúng ta không biết hiệu quả mối quan hệ giữa sự sai hỏng và sự thay đổi trong hoạt tính RecA. Một biến đổi của các trường hợp sai hỏng có thể cảm ứng protein SOS. Hiện nay, người ta thiên về ý kiến cho rằng RecA xúc tiến hóa bất kỳ một số chất trung gian trong chuyển hóa DNA.

Tín hiệu cảm ứng có thể chia thành phân tử nhỏ phóng thích từ DNA; hoặc nó có thể là một vài cấu trúc kết cấu thành trong chính DNA. Điều kiện *in vitro*, hoạt tính của RecA đòi hỏi có mặt của DNA sợi đơn và ATP. Vì thế, một vài tín hiệu có thể hiện diện trong vùng sợi đơn một vị trí sai hỏng. Sự tương tác của nó với RecA là nhanh: protein SOS xảy ra trong một vài phút xử lý sai hỏng.

Tóm tắt. RecA và LexA là các mục tiêu chung trong hệ SOS: RecA khiếm khuyết chức năng phân giải của LexA, nhân tố ức chế *recA* và chính nó. Vì thế, protein SOS tạo ra sự khuếch đại của hai protein RecA và chất ức chế LexA. Kết quả là không còn mâu thuẫn như lúc đầu tiên.

Vì chức năng của biểu hiện của protein RecA cần thiết cho vai trò trực tiếp của nó trong các phản ứng sửa chữa tái tổ hợp. Về sự cảm ứng, nồng độ của RecA tăng lên 50 lần so với nồng độ ban đầu của nó khoảng 1.200 phân tử/tế bào. Nồng độ các tế bào cảm ứng có nghĩa là có RecA mà một lượng protein LexA bị phân giải.

III. Bỏ DNA: Hệ thống cắt hạn chế (R)-Biến đổi (M)

Ngoài các hệ thống sửa chữa, tế bào còn có hệ thống bỏ DNA. Các vị trí có hệ thống biến đổi hạn chế DNA I, đó là: hệ thống cắt hạn chế -biến đổi (restriction-modification system) hiện diện trong nhiều loài vi khuẩn, trong đó DNA bị biến đổi bởi các enzyme cảm ứng.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Sự biến dị xảy ra nhằm mục đích bảo vệ DNA chống lại sự phân hủy enzyme (cắt bỏ) bởi các endonuclease của chính chúng. Sự biến dị bao gồm một kỹ thuật ngăn chặn quá trình methyl hóa các gốc nucleotide trong DNA. Bằng cách dùng S-adenosylmethionine như là một chất cho, các enzyme methyl hóa (methylase) sẽ hoạt động trên DNA sợi đôi (dsDNA). Các vị trí mà nó có sự biến dị cũng chính là vị trí của các enzyme hạn chế (restriction enzyme, RE) tác động, tuy nhiên các enzyme hạn chế không cắt DNA trong các vị trí đã biến dị này mà tạo ra hai sợi DNA.

Các vi sinh vật prokaryote lẫn eukaryote đều có các enzyme methyl hóa gắn nhóm CH_3 lên những vị trí nhất định trên phân tử DNA. Các enzyme này có tính đặc hiệu cao chuyên hóa cho từng dòng vi khuẩn, vì thế DNA của mỗi dòng vi khuẩn chỉ được methyl hóa lên những vị trí đặc biệt nhất định. Như vậy, mỗi vi khuẩn đều đặn phân bố các vị trí gắn nhóm methyl hóa lên phân tử DNA ngoại lai (foreign DNA) (ví dụ: DNA của bacteriophage) xâm nhập vào trong tế bào. Các enzyme cắt bỏ hạn chế là một loại endonuclease của mỗi dòng vi khuẩn (xem chương 9), không cắt DNA của chúng vì đã được methyl hóa lên những vị trí nhất định mà chỉ cắt DNA ngoại lai (của bacteriophage) do chúng không được methyl hóa lên những vị trí nhất định.

Các chất chẹn sự biến dị của DNA của nó một cách đặc hiệu và cắt bỏ hạn chế (restriction) các phân tử DNA không được ảnh hưởng. Hệ thống R-M ngăn chặn DNA ngoại lai không có hoạt động gen của nó ngay khi có thể thích nghi tái tổ hợp.

Hệ thống R-M có hai tính chất cơ bản:

- Hoạt tính restriction (cắt bỏ hạn chế) đặc hiệu chống sự xâm nhập của DNA ngoại lai.

- Hoạt tính bảo vệ DNA của bản thân nó.

Hệ thống R-M lần đầu tiên được phát hiện khi nghiên cứu hiện tượng nhiễm bacteriophage vào *E. coli*. Sự biến dị thường là methyl hóa nhóm 6-NH_2 của adenine lên trình tự nucleotide đặc hiệu trong hệ thống ký hiệu II, C5 của cytosine được methyl hóa. Cắt bỏ hạn chế đặc hiệu do các hệ thống endonuclease. Chúng nhận biết các vị trí đặc hiệu ít nhất một sợi DNA không biến dị. Endonuclease cắt sợi nhiễm trùng và sau đó các đơn vị nucleotide khác.

Phần lớn các DNA biến dị có các tính di truyền không ổn định. Sự methyl hóa thường mất qua tái bản trong tế bào con.

Các nghiên cứu cho thấy rằng *E. coli* B có 3 gen liên kết với nhau mã hóa cho 3 sản phẩm khuếch tán: các polypeptide phục vụ cho sự cắt bỏ hạn chế, cho sự biến dị và tạo sự chẹn sự xâm nhập của nhiễm trùng.

DNA sợi kép nhận được sự biến dị và cắt bỏ hạn chế. Các bacteriophage sợi đơn như M13 và ϕ X174 ít bị tác động hơn. Sự biến dị của một sợi DNA nhiễm trùng nhiễm DNA1. Do vậy, DNA tái bản bán bảo tồn được bảo vệ bởi methyl hóa sợi đơn.

1. Các methylase của R-M

Methylase là enzyme có hoạt tính xúc tác gắn methyl vào một phân tử, ví dụ: DNA methyltransferase có chức năng methyl hóa các gốc C trong DNA.

Enzyme methylase tạo ra một cặp adenine methyl hóa (hoặc cytosine) có vị trí xoắn chéo nhau. Các methylase có liên quan chặt chẽ với các kiểu cắt hạn chế.

- **Kiểu I.** Các RE có thể tiến hành cắt hai sợi bên trái và cắt hạn chế. Một RE kiểu I bao gồm ba tiểu đơn vị khác nhau (R, M và S) chịu trách nhiệm riêng biệt cho việc cắt hạn chế, bên trái và nhận biết trình tự. Ví dụ: *EcoB* và *EcoK* (từ *E. coli* chủng B và K), các trình tự nhận biết của hai enzyme này là TGA(N)₈TGCT và với *EcoB* và AAC(N)-₆GTGC và với *EcoK* (trong đó N là một trong bốn loại nucleotide). Nếu vị trí nhận biết không được methyl hóa trong một sợi, thì enzyme RE sẽ methyl hóa sợi đó, nhận diện hai sợi đều không được methyl hóa thì enzyme RE sẽ cắt DNA (cần có ATP). Phân tử cắt xuất hiện một vị trí không cắt khi >1000 bp tính từ trình tự nhận biết; rõ ràng là enzyme duy trì liên kết với vị trí nhận biết của nó, và DNA sẽ di chuyển qua một vị trí khác trên enzyme hàng tiếp theo vị trí cắt hạn chế.

- **Kiểu II.** Các RE là đồng chung nhất trong vị trí; chúng chỉ thể hiện phân cắt hạn chế - còn sợi bên trái thì tiến hành bằng một enzyme riêng biệt. Trình tự nhận biết cho hoạt động của các enzyme này là các trình tự palindrome ngắn (ví dụ: *EcoRI* nhận biết GAATTC) và thể hiện phân cắt (không cần ATP) trong hoặc gần kề vị trí nhận biết. Một vài RE kiểu II cắt cả hai sợi cùng vị trí tạo ra đầu dính, trong khi các RE khác lại tạo ra đầu dính. Các RE kiểu II là công cụ hữu ích trong công nghệ DNA tái tổ hợp.

- **Kiểu III.** Các RE này tương tự các enzyme kiểu I. Một RE kiểu III có hai tiểu đơn vị; nó nhận biết một trình tự xoắn chéo, và tạo ra một đầu solo (cần có ATP) với khoảng 24-26 bp so với vị trí nhận biết. Ví dụ enzyme *EcoPI*, cắt mã hóa bởi prophage của bacteriophage P1.

2. Adenine và cytosine methyltransferase của *E. coli*

S methyl hóa A và C thể hiện rõ ràng ở tất cả các loài DNA. Ở prokaryote (kể cả các bacteriophage và plasmid), vai trò chính là phân hủy DNA ngoại lai. Vai trò phụ là phân biệt DNA bản địa với sự xâm nhập của trình tự trong phạm vi các chuỗi tế bào sai. Ở prokaryote, các sinh vật không có hệ thống cắt hạn chế, vai trò chủ yếu của methyl hóa có lẽ là sự hòa bình của gen.

Bên cạnh các methylase của hệ thống R-M, còn có các methyltransferase khác của *E. coli*. Các nucleotide được methyl hóa không gắn trực tiếp vào DNA. Các methylase

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

chuyển nhóm methyl từ S-adenosine methionine sang adenine và cytosine nằm ngay kề nhau trên DNA.

3. S methyl hóa DNA của eukaryote

S methyl DNA của eukaryote có nhiều điểm khác với prokaryote:

- Base baze đặc trưng của eukaryote là 5-methylcytosine. Nguyên vật có vú, chỉ có 5-methylcytosine là base baze đặc trưng, trong đó 90% là trình tự CpG.

- Do chức năng biệt hóa thành R-M của eukaryote nên nguyên nhân cho rằng có sự methyl hóa không góp phần vào việc xâm nhập của DNA ngoại lai.

S methyl hóa của DNA nguyên vật có vú góp phần vào sự điều hòa biểu hiện của gen và biệt hóa tế bào. Các nghiên cứu cho thấy có sự tương quan thuận giữa methyl hóa thực (hypermethylation) với hoạt tính của gen và ngược lại giữa sự methyl hóa mức độ thấp của gen. Sự vắng mặt của các nhóm methyl trên DNA của ruồi giấm chứng tỏ rằng sinh vật lưỡng bội biệt hóa cao có thể hoạt động không cần sự methyl hóa.

S methyl hóa nguyên vật có vú có thể đóng vai trò:

- Thay đổi trạng thái của DNA và chức năng của repressor và operator.

- S methyl hóa được truyền theo dòng tế bào soma.

- Methyl hóa có thể khác nhau giữa các mô.

- 5-azacytidine, chất tương tự của cytidine, tác động làm tế bào nguyên bào sợi (fibroblast) biệt hóa thành tế bào cơ, có lẽ do ức chế sự methyl hóa DNA và hoạt động của gen tương ứng.

Tài liệu tham khảo/ bổ sung

1. Phạm Thành Hùng. 2003. Di truyền học. NXB Giáo dục, Hà Nội.

2. Võ Thị Thanh Lan. 2002. Sinh học phân tử. NXB Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Hà Nội.

3. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. 2002. Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. Garland Publishing, Inc. New York, USA.

4. Lewin B. 2000. Gene VII. Oxford University Press, Oxford, UK.

5. Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW and Weiner AM. 2004. Molecular Biology of the Gene. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California, USA.

6. Weaver RF. 2003. Molecular Biology. 2nd ed. McGraw-Hill Company, New York, USA.

Chương 8

Điều hòa biểu hiện gen

Như chúng ta đã biết ba quá trình thiết yếu cho sự tồn tại của tế bào, đó là: tái bản, phiên mã và dịch mã. Tuy nhiên, tế bào không thể tồn tại được trong môi trường chung quanh. Như vậy, sự sống sinh vật luôn luôn cần được điều hòa để thích nghi với môi trường bên ngoài. Có thể tồn tại thích nghi? Chúng ta sẽ nghiên cứu các phương thức điều hòa đó, tức là các cơ chế điều hòa biểu hiện của gen ở các sinh vật prokaryote và eukaryote.

Sự biểu hiện của các gen chịu sự kiểm soát của các cơ chế điều hòa. Các cơ chế này giữ vai trò rất quan trọng cho các hoạt động sống, áp dụng những biến đổi của môi trường bên trong và bên ngoài của tế bào. Điều hòa biểu hiện của các tế bào prokaryote và eukaryote cũng có sự khác nhau đáng kể. Về điều hòa ở các sinh vật khác nhau và liên quan đến từng giai đoạn phát triển. Theo quan niệm về operon, các gen điều hòa (regulatory gene) giữ vai trò quan trọng trong việc đóng và mở các gen cấu trúc (structural gene) có thể biểu hiện tổng hợp protein đúng lúc, đúng nơi theo nhu cầu của tế bào.

Trong môi trường, tất cả các gen đều không hoạt động đồng thời. Ví dụ: tế bào *E. coli* có khoảng 10^7 phân tử protein gồm 3.000 loại khác nhau. Nếu loại protein có 500.000 phân tử, tuy nhiên mỗi loại khác nhau chỉ có khoảng 10 phân tử. Như vậy, không phải loại protein nào cũng có tổng hợp với số lượng lớn như nhau và tế bào phải có những cơ chế tổng hợp protein một cách tỉ mỉ và hợp lý nhất.

Một số gen hoạt động theo kiểu xuyên suốt liên tục, một số khác chỉ biểu hiện ở những giai đoạn nhất định trong chu trình sống và có thể chỉ hoạt động trong điều kiện môi trường không bình thường. Một số protein cần tổng hợp với số lượng lớn, một số khác chỉ cần có một phân tử. Do vậy, hoạt tính của gen điều hòa biểu hiện khác nhau có liên quan mật thiết trong việc sử dụng nguồn năng lượng của tế bào.

I. Các hình thức điều hòa

duy trì cân bằng (homeostasis) và sự phát triển của các sinh vật, các sinh vật đã có các cơ chế điều hòa khác nhau. Các kiểu điều hòa ở các sinh vật biểu hiện của các gen.

1. Điều hòa thích nghi

Một số amíp (ameba) biểu hiện sự thay đổi hình thái và sinh lý của tế bào để thích nghi với các điều kiện môi trường khác nhau. Khi các amíp được cho vào nước, chúng chuyển

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

đồng amip sang đồng có lông bì. Khi môi trường thi u dinh dưỡng chúng có thể chuyển thành các đồng t ng t nh bì u bì.

Vi khuẩn trong môi trường dinh dưỡng t i thi u có kh n ng t ng h p amino acid. Nhưng khi bổ sung amino acid vào môi trường nuôi, vi khuẩn sẽ ng t ng h p amino acid. Lúc ngu n amino acid t ngoài bổ sung vào ã h t, t bào vi khuẩn l i t t ng h p l i amino acid cho b n thân.

Các bì n i nêu trên là thu n ngh ch, ch ng t s thay i ch c n ng ãy không ph i do bì n d di truy n. Các hi n t ng trên còn cho th y vì c xu t hi n hay bì n m t các c u trúc m i không làm nh h ng n ti m n ng di truy n s n có. Có th cho r ng, có tr ng h p m t s gen ho t ng, nh ng c ng có tr ng h p m t s gen ng ng bì u hi n. Các hi n t ng c c p trên u do c ch i u hòa thích nghi (adaptive regulation) chi ph i.

2. Hoạt động điều hòa các gen

Khi bacteriophage xâm nhiễm vi khuẩn, DNA của nó lúc u s tái b n, sau ó các protein khác nhau m i c t ng h p nên t o thành v . Nh v y, có các gen “s m” t o ra enzyme tái b n DNA và các gen “mu n” xác nh các thành ph n v protein. i u ó ch ng t có c ch i u hòa ch c n ng c a gen di n ra theo m t trình t nghiêm ng t. ãy là ki u i u hòa n i ti p (sequential regulation). Hoạt động n i ti p c a các gen còn th hi n rõ trong quá trình phát triển cá th c a các sinh v t eukaryote a bào.

3. Biệt hóa tế bào

Nhi u sinh v t b c cao nh con ng i ch a nhi u t t bào b t ngu n t m th p t do phân chia nguyên nhiễm. T m th p t ban u n khi tr ng thành, c th ng i có kho ng 200 lo i t bào khác nhau. M i lo i t bào ch bì u hi n m t ph n thông tin c a mình. Quá trình chuyên môn hóa ch c n ng c a t bào c g i là s bì t hóa hay phân hóa (differentiation).

Tuy có s bì t hóa, nh ng t bào v n gi nguyên v n kh n ng di truy n c a mình. M t ví d r t rõ là nuôi c y mô t bào th c v t (plant tissue and cell culture): ng i ta có th nuôi c y m t ph n mô phân sinh trong môi trường dinh dưỡng t ng h p cho n khi chúng phát triển thành cây *in vitro* hoàn ch nh (plantlet), các cây này sau ó c a ra tr ng trong i u ki n t nhiên và ã ra hoa k t qu .

4. Khái quát về điều hòa prokaryote và eukaryote

Có s khác nhau áng k gi a prokaryote và eukaryote trong i u hòa bì u hi n c a gen. Các t bào eukaryote có c u t o ph c t p h n nhi u nên c ch i u hòa c ng ph c t p h n prokaryote.

prokaryote, m c ích c a s i u hòa bì u hi n gen là nh m i u ch nh h enzyme cho phù h p v i các tác nhân dinh dưỡng và lý hóa c a môi trường, m b o

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

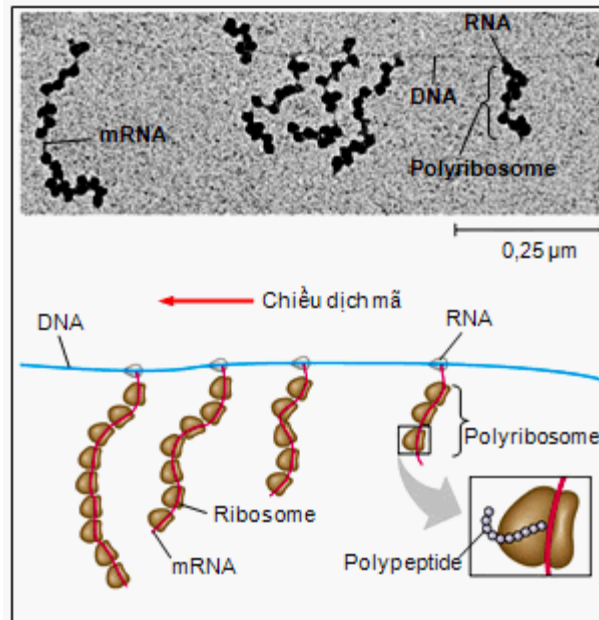
Các hai yêu cầu chính của tế bào là sinh trưởng và sinh sản. Sự hòa nhập rất linh hoạt và có tính thuận nghịch. Ở eukaryote, do tế bào không tiếp xúc trực tiếp với môi trường, nên sự hòa nhập này không còn nhằm mục đích tiếp xúc với các biến đổi ngoại bào. Sự hòa nhập ở eukaryote hàng năm vì chuyên biệt hóa tế bào vào từng cấu trúc và chức năng riêng và vì thế không mang tính thuận nghịch.

Ba thành phần chính của sự hòa nhập biểu hiện gen là: 1) Tín hiệu gây ra đáp ứng làm thay đổi biểu hiện gen; 2) Giai đoạn thực hiện sự hòa nhập trong quá trình tái bản nhân tế bào; và 3) Cơ chế phân tích của sự hòa nhập biểu hiện gen.

4.1. Sự biểu hiện của gen ở prokaryote

Bộ máy di truyền của sinh vật prokaryote là một DNA mạch vòng chứa tất cả thông tin di truyền cần thiết cho tế bào sống (Hình 8.1).

Chu trình tế bào ngắn và không có sự biệt hóa tế bào. Vì thế, hoạt động của các gen của tế bào hòa do các nhu cầu của tế bào khi cần thiết. Tác động của các nhân tố môi trường làm thay đổi mức độ phiên mã, dịch mã thông qua protein hay có hiệu quả làm giảm đi.



Hình 8.1. Sự biểu hiện của gen ở prokaryote

4.2. Sự biểu hiện của gen ở eukaryote

Khác với prokaryote, nhiễm sắc thể của eukaryote có cấu trúc phức tạp. Ngay trên cấu trúc nhiễm sắc thể có sự tham gia của các protein histone có vai trò hòa nhập

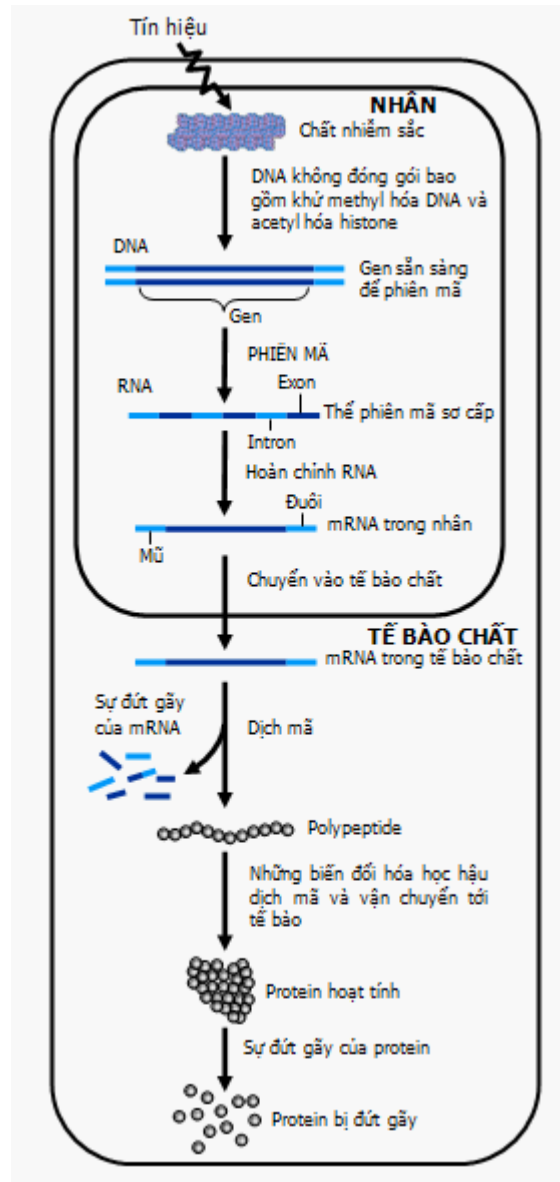
Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

hiện của gen. Sự điều hòa biểu hiện gen eukaryote phức tạp hơn so với prokaryote và qua nhiều giai đoạn như: phiên mã, biến đổi phiên mã, mRNA rời nhân ra tế bào chất, dịch mã và biến đổi dịch mã (Hình 8.2).

Ngoài ra, các eukaryote có các tế bào và mô tế bào có biểu hiện riêng không phải do, mà chịu sự biệt hóa theo các chức năng chuyên biệt trong mối quan hệ hài hòa với các tế bào.

Các vi khuẩn thường phân bố trong môi trường và biểu hiện gen thụ động, như có gen lactose thì mô operon phân hủy, khi hết gen thì operon đóng lại. Trong khi đó, các tế bào eukaryote có những con đường biệt hóa khác nhau và sự chuyên hóa là những thông tin xuyên suốt trong suốt đời sống cá thể. Ngoài sự biệt hóa tế bào, các tế bào eukaryote tế bào còn trải qua quá trình phát triển cá thể với nhiều giai đoạn phức tạp nối tiếp nhau, trong đó có những gen chỉ biểu hiện trước và sau đó thì dừng lại.

Tất cả những gì nêu trên cho thấy sự điều hòa biểu hiện của gen eukaryote phức tạp hơn nhiều, mà hiện nay là các biệt hóa của prokaryote.



Hình 8.2. Sự biểu hiện gen eukaryote

II. Các cơ chế điều hòa

Các cơ chế điều hòa sự biểu hiện của gen có thể tác động một hay nhiều mức khác nhau. Sự điều hòa có thể xảy ra ở mức gen bằng sự kiểm soát thời gian và tốc độ phiên mã. Các cơ chế khác có thể hoạt động ngay lúc dịch mã hoặc sau dịch mã.

1. Một số cơ chế điều hòa

Ngay trên chất nhiễm sắc có thể thấy các kiểu sau:

- DNase cắt mở các vùng trên genome làm tháo xoắn các gen biểu hiện. Hai vùng chính là các vùng nhạy cảm (sensible) và siêu nhạy cảm (hypersensible).

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Các vùng nhạy cảm có liên quan đến các gen có hoạt tính cao và nhạy gen đã qua biểu hiện r (nh các gen hoạt động phôi). Các vùng siêu nhạy cảm liên quan đến các gen có hoạt tính rất cao (nh các gen histone).

- DNA Z (DNA trái) là đơn cấu trúc siêu xoắn có thể liên quan đến đóng m gen.

- Methyl hóa các base. Các prokaryotes methyl hóa có thể thể hiện ở vị trí A và C, còn eukaryotes methyl hóa chủ yếu ở vị trí th 5. Methyl hóa làm gen ngừng hoạt động. Ví dụ: nhiễm sắc thể X bất hoạt động ở thu c lo i siêu methyl hóa. Nói chung, sự thay đổi cấu hình (reconfiguration) có thể ảnh hưởng đến biểu hiện của gen.

2. M c phiên mã

Đây là sự hòa nhập hình thành trình tự phân tử của các gen. Khi sự hòa nhập này thường gặp trong sự hòa nhập di truyền, cũng như các quá trình biệt hóa tế bào.

- Sự tác động của các trình tự cis (gần kề, liên kết) nằm trên cùng mạch DNA như enhancer (vùng tăng cường) làm tăng sự phiên mã.

- Sự hòa nhập của các nhân tố trans (cách quãng, xa) do các nhân tố không nằm cùng trên một mạch DNA.

- Chọn lựa promoter thích hợp.

- Sự suy yếu/suy thoái.

3. M c hậu phiên mã

Sự hòa nhập có thể biểu hiện một số tác động lên mRNA, chúng ta sẽ gặp trình tự phân tử trên khi mRNA bắt đầu các intron và g n các exon liên tiếp nhau để tạo thành mRNA hoàn chỉnh (RNA processing). Như vậy, các hình thức như hình ảnh hoàn chỉnh của mRNA có thể kiểm tra gián tiếp biểu hiện của gen tổng hợp. Các mRNA của eukaryote còn có những đơn không mã hóa liên quan tới thời gian tồn tại và ra khỏi nhân vào tế bào chất.

- Splicing khác nhau.

- Sự methyl hóa polyadenine khác nhau (polyadenylation).

- Sự biến đổi trên phân tử mRNA.

- Bán chu kỳ phân hủy của mRNA.

- Sự tồn tại của các RNA trong tế bào.

4. M c dịch mã

Sự biểu hiện của các nhân tố khởi đầu IF (initiation factor). Là các protein kết hợp với tiểu đơn vị của ribosome vào giai đoạn khởi đầu của quá trình dịch mã.

5. Mối liên hệ giữa mã di truyền và tính hoạt động của protein

Đây có sự liên hệ giữa mã di truyền và tính hoạt động của protein. Sau khi mạch polypeptide được tổng hợp, các protein nhiều khi phải trải qua các biến đổi thứ cấp trước khi biểu hiện hoạt tính (chức năng). Ví dụ: trypsin là enzyme phân giải protein trong dạ dày chó có hoạt tính sau khi chuyển từ tiền thân của nó (pro-enzyme không có hoạt tính) bằng cách cắt bỏ một số amino acid khỏi mạch polypeptide.

Các protein có thể chịu những biến đổi lý hóa như sự gắn các enzyme vitamin, sự gắn nhóm chức có thể làm thay đổi cấu trúc không gian của chúng dẫn đến mất hoạt tính.

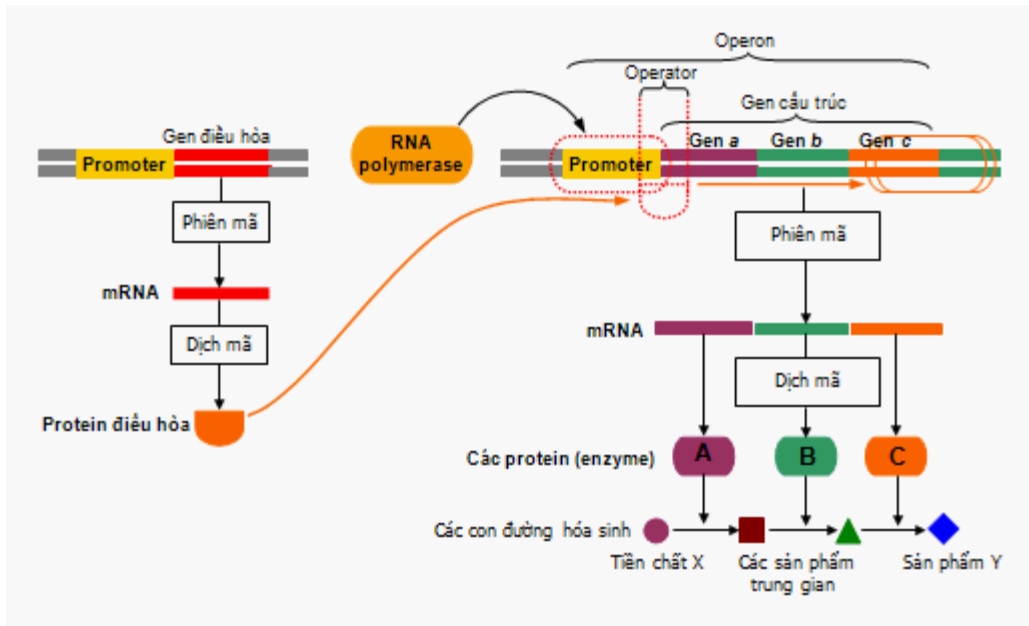
- Các quá trình glycosylation, phosphorylation... tức là gắn thêm các nhóm chức như hydroxyl, phosphor... protein có hoạt tính/chức năng sinh học.

- Peptide tín hiệu là một chuỗi khoảng 20 amino acid nằm gần phía đầu N của polypeptide, có vai trò gắn polypeptide và ribosome đang tổng hợp mạch này với màng lưới nội sinh chất. Trong bộ máy Golgi, polypeptide được phóng thích ra ngoài.

- Sự phóng thích ra protein có chức năng sinh học từ mạch polypeptide, như từ pro-insulin thành insulin.

III. Điều hòa biểu hiện gen ở prokaryote

Các gen mã hóa phiên mã tạo RNA, đặc biệt là các gen cấu trúc. Các protein được mã hóa từ mRNA có thể là enzyme hoặc không phải enzyme. Trong số các protein không phải enzyme có các protein điều hòa (regulatory protein), chúng tác động lên các trình tự DNA để kiểm soát hoạt tính phiên mã của các gen cấu trúc. Các gen tổng hợp các protein điều hòa đặc biệt là các gen điều hòa (regulatory gen). Phía trước mỗi gen cấu trúc (hoặc một nhóm gen) có một trình tự promoter, nơi RNA polymerase nhận biết (Hình 8.3). Cơ chế điều hòa ở prokaryote chủ yếu được thể hiện thông qua operon. Đây là khái niệm chủ yếu ở prokaryote.



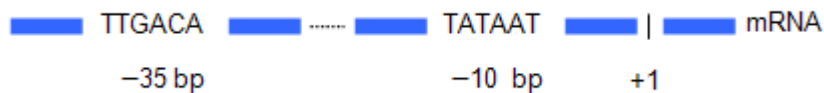
Hình 8.3. Ph ơng th ứ chung i u hòa bi u hi n gen prokaryote

1. C ấu trúc c ủa promoter

Th ức ch ức c ủa kh ả s ự phiên mã là quan h ệ tr ực ti ếp gi ữa RNA polymerase và promoter. Khi RNA polymerase g ắn vào promoter, nó s ự phiên mã t ạo phân t ử RNA.

Ph ần l ớn promoter *E. coli* v ẫn c ần b ản có cùng c ấu trúc:

N ếu base u tiên c ủa phiên mã thành mRNA (luôn là purine, th ường là adenine) c ủa ách s ố +1, thì t ất c ả các base phía 5' hay "phía tr ớc" so v ới nó không c ần phiên mã là s ố tr ợ (-). Ngay phía tr ớc +1 có 6 base th ường v ị trình t ừ TATAAT xung quanh -10, và trình t ừ TTGACA (trình t ừ liên ng-consensus sequence) xung quanh -35. C ả hai trình t ừ ph ối h ợp nhau cho phép RNA polymerase g ắn vào và kh ả s ự d ịch mã, trình t ừ -35 t ạo i u ki ện u tiên cho v ị c ần vào.



2. C ấu trúc c ủa operon

Operon là n ếu phiên mã g ồm ít nh ất m ột promoter và mRNA b ắt ti ếp theo mã hóa cho các trình t ừ c ủa m ột hay nhi ều chu ỗi polypeptide. Tuy nhiên, operon có th ể có m ột hay nhi ều i u hòa khác v ị promoter. Các gen không ch ứa i u hòa do tác ụng môi tr ường, t ạo s ản phẩm th ường xuyên, c ần g ần là các gen c ấu trúc. S ố l ượng s ản phẩm c ủa các gen này có th ể dao ụng ph ụ thu c vào ái l ực t ụng i ả c ả các

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

promoter của chúng là vị trí RNA polymerase. Các promoter có ái lực mạnh (strong promoter) tạo ra nhiều sản phẩm của gen hơn các promoter có ái lực yếu. Các gen mà sản phẩm protein của chúng cần tiếp xúc với các nhân tố môi trường, thường chỉ biểu hiện khi cần thiết hay nhiều protein biểu hiện hòa. Trình tự DNA bên trong operon, nơi mà protein cần gắn vào, cũng gọi là operator (điểm biểu hiện). Vì cần protein cần gắn lên operator nên cần sự phiên mã của tất cả các gen cấu trúc trên cùng một operon. Sự kiểm soát này xảy ra ở vị trí gen gọi là kiểm soát âm. Các operon của vi khuẩn thường tạo ra các mRNA của gen, như mRNA của eukaryote chỉ một gen.

Các protein cần thiết cho biểu hiện gen cũng gọi là chất hoạt hóa. Chúng có thể gắn với các điểm khởi sản xuất bên trong của promoter của operon hay điểm tiếp xúc hoặc có thể gắn như trình tự xa operon. Vì cần của protein biểu hiện hòa vào điểm khởi (initiator) hay enhancer, kích thích sự phiên mã của các gen cấu trúc, cũng gọi là các kiểm soát dương. Sự kích thích các gen biểu hiện hòa phần nào có thể là tất cả phân tử tín hiệu như đường, amino acid hoặc các phân tử liên quan như các phức hợp hormone steroid và các protein thụ thể (receptor). Chúng làm cho gen phiên mã cũng gọi là chất cảm ứng, có tác dụng ngược với chất kìm hãm. Các gen cảm ứng thường tham gia vào các phản ứng thoái hóa (catabolic reaction), như phân hủy các polysaccharide thành đường. Các gen cấu trúc thường tham gia vào các phản ứng biểu hiện để tổng hợp các phân tử amino acid từ các tiền chất nitrogen.

3. Biểu hiện hòa thoái hóa: Kiểm soát âm-cảm ứng

Trong thoái hóa, các chất thực tế phân hủy để dùng trong quá trình sinh học các chất cần thiết cho quá trình tiếp xúc. Chất biểu hiện hòa này là sản phẩm của chất (ví dụ lactose) để tiếp xúc với các enzyme phân hủy.

Ví dụ điển hình cho tiếp xúc này là operon lactose của *E. coli*. β -galactosidase là enzyme có chức năng phân hủy. Chức năng đầu tiên của nó là thoái hóa lactose thành glucose và galactose. Chức năng thứ hai của nó là chuyển liên kết 1-4 của glucose và galactose thành liên kết 1-5 của allolactose. Bình thường enzyme này không hiện diện nồng độ cao trong tế bào, khi vắng mặt lactose trong môi trường. Ngay sau khi cho lactose vào môi trường nuôi khi không có glucose, enzyme này bắt đầu tạo ra. Sự vận chuyển lactose xuyên qua màng tế bào có hiệu quả nhờ protein vận chuyển galactoside permease. Protein cần xuất hiện với nồng độ cao khi có lactose trong môi trường.

Sự biểu hiện hòa của operon lactose còn phụ thuộc vào nồng độ glucose trong môi trường. Nồng độ glucose này là kiểm soát ngược bên trong tế bào của phân tử cyclic AMP (cyclic adenosine monophosphate), là chất bắt nguồn từ ATP và làm tín hiệu báo động cho tế bào. Tế bào có xu hướng sử dụng glucose hơn là lactose làm nguồn carbon vì glucose có biểu hiện để tiếp xúc cung cấp carbon và tạo năng lượng. Các enzyme biểu hiện để glucose thu được từ cấu trúc và tế bào tiếp xúc với sự vận chuyển

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

glucose. Khi nồng độ glucose cao, tế bào phosphoryl hóa glucose thành glucose-6-phosphate (G6P) và cAMP. Vì nồng độ cAMP trong tế bào tăng lên hàng loạt khi nồng độ lactose, dẫn đến sự phiên mã các gen cấu trúc của operon lactose.

3.1. Cấu trúc của operon lactose

Hệ thống lactose (lactose system) bình thường (Hình 8.4) gồm có gen điều hòa (*i* hoặc *R*) và operon mang trình tự promoter (*P*) locus operator (*O*) và ba gen cấu trúc cho β -galactosidase (*Z*), permease (*Y*) và transacetylase (*A*). Nhiễm sắc thể của các locus này đã được phát hiện.

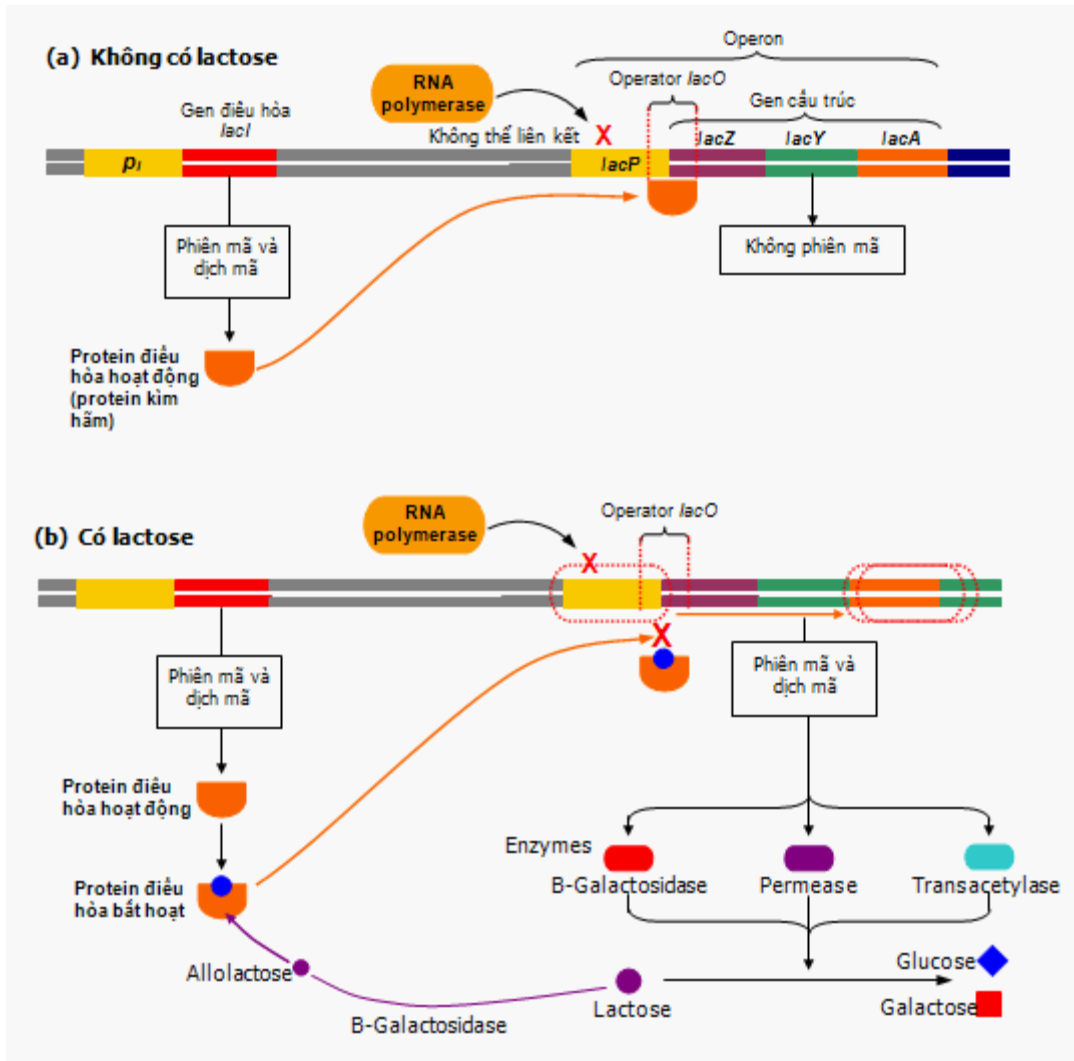
3.2. Hoạt động của hệ thống

- **điều kiện có lactose.** Lactose được chuyển vào tế bào rhy vì chỉ có vài phân tử permease làm việc. Khi vào trong tế bào, một số lactose (liên kết β -1,4) được chuyển thành allolactose (liên kết β -1,6) nhờ β -galactosidase. Allolactose là chất ức chế, nó gắn vào protein kìm hãm và gây biến đổi cấu trúc hình thể phức hợp allolactose-repressor. Phức hợp này mất khả năng gắn operator. Lúc này operon được mở, RNA polymerase bắt đầu phiên mã các gen cấu trúc. Toàn bộ nhiễm sắc thể được minh họa trên hình 8.4b.

- **điều kiện không có lactose.** Gen điều hòa của operon thường xuyên tổng hợp protein kìm hãm (repressor protein) một cách liên tục, vì nó có promoter ít hiệu quả. Sự tổng hợp các protein này bị tác động ngược lại bởi lactose trong tế bào. Ngược lại, promoter bình thường của operon lac gắn với RNA polymerase rất có hiệu quả. Khi không có lactose, protein điều hòa hoạt động (active regulator protein) còn lại là protein kìm hãm gắn vào promoter hay “chặn” trình tự operator vì protein kìm hãm chỉ mở operon này. Như vậy, sự phiên mã của tất cả các gen cấu trúc của operon lac bị đình trệ (Hình 8.4a).

Do sự liên kết permease tăng, nên lactose vào tế bào với số lượng lớn và được phân hủy bởi β -galactosidase. Khi lactose được sử dụng hết, các protein kìm hãm gắn trở lại vào operator làm operon đóng; sự phiên mã các gen cấu trúc bị đình trệ.

Bản thân gen điều hòa *lacI* chỉ có một promoter (P_i) và gen cấu trúc của protein kìm hãm. Promoter này yếu, khi các protein kìm hãm có sẵn trong tế bào, nó bị các protein này gắn vào làm đình trệ phiên mã.



Hình 8.4. Operon lactose và ho t ng c a nó

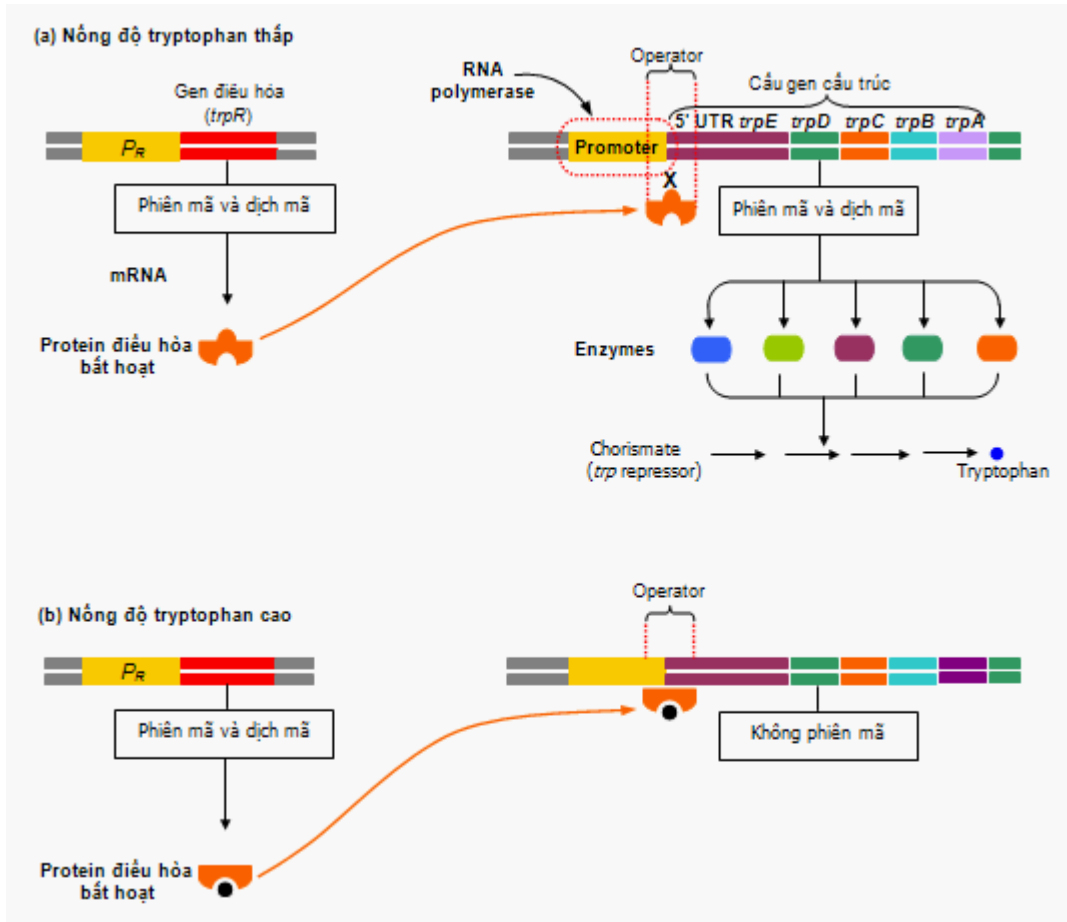
4. i u hòa bi n d ng: Kì m soát âm- c ch

Bi n d ng (anabolism) là quá trình t ng h p nên các ch t c n thi t cho t bào. Ví d t ng h p các amino acid.

Quá trình t ng h p tryptophan b t u t t i n ch t tryptophan là chorismic acid, tr i qua 5 giai o n k t i p do enzyme xúc tác. H th ng t ng h p amino acid tryptophan E. coli là ví d i n hình v operon b kì m soát âm.

4.1. C u trúc và ho t ng

H th ng tryptophan c ng có c u trúc t ng t h th ng lactose g m gen i u hòa trpR và operon tryptophan (promoter, operator và 5 gen c u trúc). Các gen c u trúc xác nh 5 enzyme c x p theo th t t ng ng v i ch c n ng xúc tác theo trình t các ph n ng c a chu i bi n d ng tryptophan (Hình 8.5).



Hình 8.5. Operon tryptophan

S khác nhau c n b n v i h th ng lactose là gen i u hòa. Gen i u hòa c a h th ng tryptophan t ng h p th ng xuyên aporepressor protein, là ch t tìm hãm mà riêng nó không có ho t tính. Khi tryptophan đ th a nó tr thành ch t corepressor (ng tìm hãm) và k t h p v i aporepressor thành ph c h p tìm hãm (holorepressor) có ho t tính. Ph c h p này g n vào operator c a operon tryptophan (*trp*) làm đ ng phiên mã các gen c u trúc. Khi n ng tryptophan th p, nó tách kh i ph c h p tìm hãm và aporepressor m t ho t tính. Lúc này các operator l i c m và RNA polymerase đ ch mã 5 gen c u trúc t ng h p 5 enzyme t o tryptophan (Hình 8.5). S i u hòa ki u này còn g i là i u hòa c ch ng c (retro-inhibition) do s n ph m cu i cùng có m i liên h ng c (feed-back).

Nh v y, ho t ng c a h th ng này ng c l i v i h th ng lactose: khi có tryptophan thì operon b óng, thì u tryptophan thì gen c m .

4.2. S suy y u (attenuation)

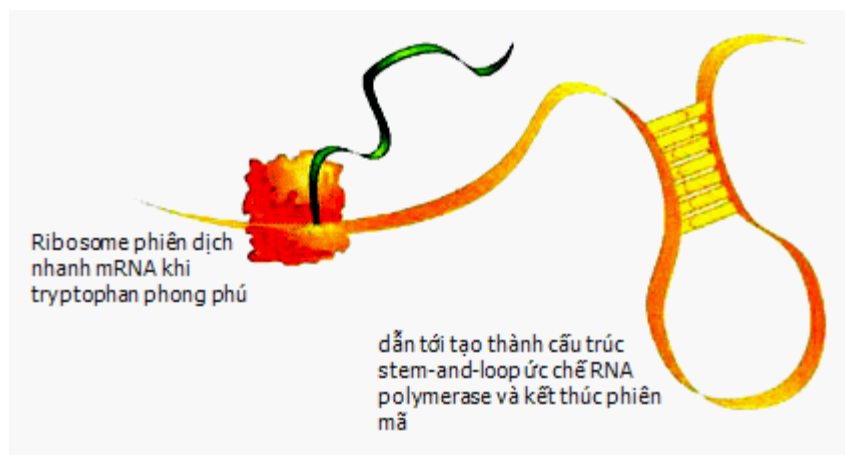
Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Ki u i u hòa th hai c phát hi n operon tryptophan c g i là s suy y u. u 5' c a mRNA a gen (polycistronic) c a operon này có 5 enzyme. o n này c g i là trình t leader (trình t ch huy). M t ph n c a trình t này c phiên mã t o leader peptide g m 14 amino acid, mà ch c n ng n nay ch a rõ.

C ch ki m tra mà ó s t ng h p mRNA c b t u nh ng k t thúc s m v i chi u dài mRNA ng n h n c g i là s suy y u. Ví d : các t bào *E. coli* ang t ng tr ng trong môi tr ng thi u m t amino acid nào ó, nh ng ch a các enzyme c n có cho s t ng h p c a t t c 20 amino acid c n thi t t o ra protein. Khi thêm m t amino acid (tryptophan) vào môi tr ng s làm gi m áng k s t ng h p c a các enzyme c n cho s t o amino acid ó. Ph n ng này có tính thích ng và duy trì các ngu n enzyme không còn c n n a khi s n ph m cu i cùng c a chu i sinh t ng h p (tryptophan) ang có trong t bào (c ch ng c).

Operon tryptophan có ph ng th c i u hòa ho t ng gen th hai, hoàn toàn c l p v i h th ng repressor-operator (ch t tìm hãm o n i u hành). operon tryptophan, s t ng h p mRNA b t u t 161 base tr c codon kh i s c a *trpE*, enzyme c u trúc u tiên c phiên mã. t bi n do m t o n DNA ngay phía tr c *trpE*, gi i phóng *trpE* kh i s tìm hãm c a ph c h p represser-operator. Các t bi n này làm t ng m c

bi u hi n c a c operon lên g p sáu l n. Tinh s ch các DNA c phiên mã *in vitro* cho th y ph n l n mRNA k t thúc ngay base 139 và không bao gi t t i *trpE*. ây, có s tìm hãm phiên mã ngay tr c gen c u trúc và khi m t nó s bi u hi n c a gen có hi u qu h n. o n dài c a mRNA n m tr c *trpE* c g i là leader (*trpL*) và o n tìm hãm phiên mã c g i là attenuator (*trpA*, ch không ph i *trpA*). Cu i cùng, quan sát cho th y s suy y u dao ng theo n ng c a tryptophan th p, nhi u phân t mRNA c t o ra h n qua attenuator và toàn b operon c phiên mã. S suy y u là m t ph ng th c khác ki m soát s bi u hi n c a gen.



Hình 8.6. S suy y u x y ra khi c u trúc th c p c bi t t o thành trong mRNA. mRNA c trình bày ây là t trình t leader c a operon *trp*. N u tryptophan trong t bào phong phú

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

và trình tự leader có phiên dịch nhanh, thì mRNA sẽ tạo thành cấu trúc thân và quai (stem-and-loop) hoạt động như là một tín hiệu kích thích phiên mã.

Cơ chế suy yếu thể hiện sự kết hợp giữa phiên mã và dịch mã. RNA polymerase bắt đầu phiên mã các gen mã hóa cho các enzyme sinh tổng hợp tryptophan. Ví dụ: khi hàm lượng tryptophan thấp thì ttiim (trên RNA mới tổng hợp) gọi là attenuator và dừng phiên mã tại đây.

Attenuator có chức năng như một kích thích khi tryptophan hàm lượng thấp. Sự phiên mã dừng khi trình tự leader gặp attenuator. Nếu có tryptophan trong tế bào, sẽ dịch mã các codon thể hiện, và phiên mã và dịch mã thể hiện hoàn chỉnh cho đến lúc RNA polymerase gặp ttiim attenuator, thì kích thích sự phiên mã. Khi không có tryptophan, dịch mã dừng và phần leader của mRNA cuộn lại sao cho attenuator không thể hiện chức năng, trong trường hợp này sẽ tổng hợp các mRNA toàn vẹn cho operon tryptophan để tạo ra. Vì sự hàm lượng thấp của các enzyme đó, tryptophan tích lũy và sẽ lắng đọng trong tế bào. Attenuator là dạng tinh thể của các chuỗi, liên kết hòa hoạt động gen, tạo ra các chuỗi cho tổng hợp amino acid trong tế bào.

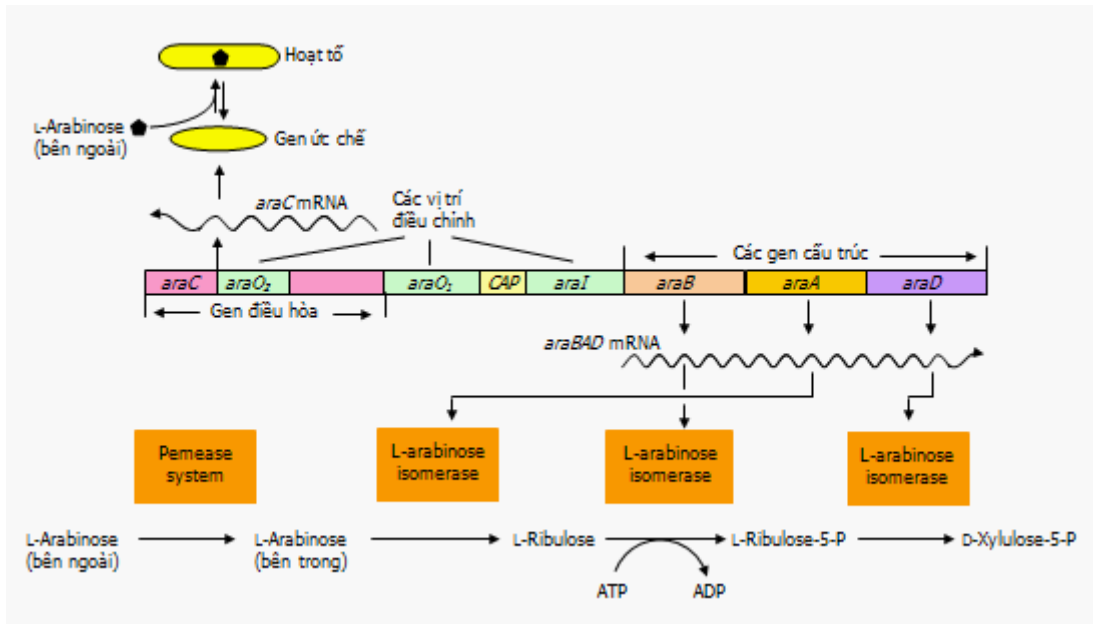
Cơ chế repressor liên kết với hòa thể hình tryptophan, trong khi đó hình thể ức chế attenuation kiểm soát nồng độ tryptophan một cách tinh tế. Sự suy yếu của operon *Trp* có nghĩa là giảm vận chuyển các amino acid như histidine và leucine.

5. Kiểm soát đường và carbon

Cơ chế liên kết với đường, carbon tìm thấy operon arabinose của *E. coli*. Arabinose là chất lỏng, carbon ba enzyme (cần mã hóa bởi các gen *araB*, *araA* và *araD*) cho sự biến đổi. Hai gen khác nằm xa operon góp phần đưa arabinose vào tế bào. Gen liên kết với *araC* nằm gần các gen *B*, *A* và *D*. Sản phẩm của gen *araC* là protein tìm kiếm các operon khi không có đường arabinose.

Tuy nhiên, khi có đường arabinose trong tế bào, nó gắn với repressor (protein *araC*) hình thành nên phức hợp activator (hoạt động) để thu hút RNA polymerase.

Trên thực tế, các nghiên cứu cho thấy các cơ chế liên kết này rất phức tạp. Ví dụ: cAMP và protein hoạt hóa thoái hóa (catabolite gene activator protein) còn có vai trò là CRP (cyclic AMP receptor protein-protein tương tác với cAMP) tham gia vào sự liên kết của thể hình arabinose.



Hình 8.7. Operon arabinose của *E. coli*

IV. Điều hòa hoạt tính của eukaryote

Các cơ chế điều hòa eukaryote có thể xảy ra 5-6 mức khác nhau (xem mục II). Trong phần này chúng ta sẽ thêm một số cơ chế của điều hòa hoạt tính gen eukaryote:

- Các operon của prokaryote, các gen điều hòa và các promoter thường nằm gần nhau, nhưng eukaryote các gen điều hòa ít khi nằm gần các promoter do chúng bị kiểm soát.

- Các enhancer là những trình tự nằm trên một phân tử với các promoter có thể có hàng trăm cặp base phía trước hoặc phía sau promoter mà chúng kích thích.

- Trình tự điều hòa 5' phía trước có promoter eukaryote thường rất dài, có khi hàng chục kilobase (kb).

- Có nhiều kiểu điều hòa dùng các nhân tố có tác dụng từ xa (*trans*) là các protein.

Sự phiên mã có thể bị kích thích bởi các tín hiệu khác nhau. Sự điều hòa hoạt tính gen prokaryote phần lớn áp dụng cho các tín hiệu bên trong.

1. Các promoter

Trong tất cả các vị trí, các promoter của eukaryote cũng nằm phía trước điểm xuất phát của mRNA và có những trình tự đặc biệt trong tiến hóa. Hộp TATA, như hộp cho RNA polymerase bắt đầu phiên mã, nằm khoảng 25-30 basepair (bp) trước vị trí có vút, và 60-120 nucleotit. Hộp TATA hoạt động có hiệu quả cùng với hai trình tự nằm phía trước khoảng 40 bp là CCAAT và 110 bp là trình tự giàu GC.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Sự thay thế hộp TATA làm gì mà tế bào phiên mã. Hiểu được các tế bào phiên mã có những thay thế các trình tự base trong promoter, các thay thế base ngoài hộp TATA và các trình tự phía trước không gây hiểu lầm về vị trí của tế bào phiên mã, trong khi đó các thay thế những yếu tố nêu trên làm gì mà ảnh hưởng đến tế bào phiên mã. Khác với promoter của prokaryote, các promoter của eukaryote không có những tín hiệu mà tế bào phiên mã sử dụng RNA polymerase khi phiên mã *in vitro*. Hộp TATA và các trình tự phía trước phải liên kết với các protein hòa tan, và chính các protein này gắn với các yếu tố khác trên chúng và hoạt hóa sự phiên mã.

2. Các enhancer

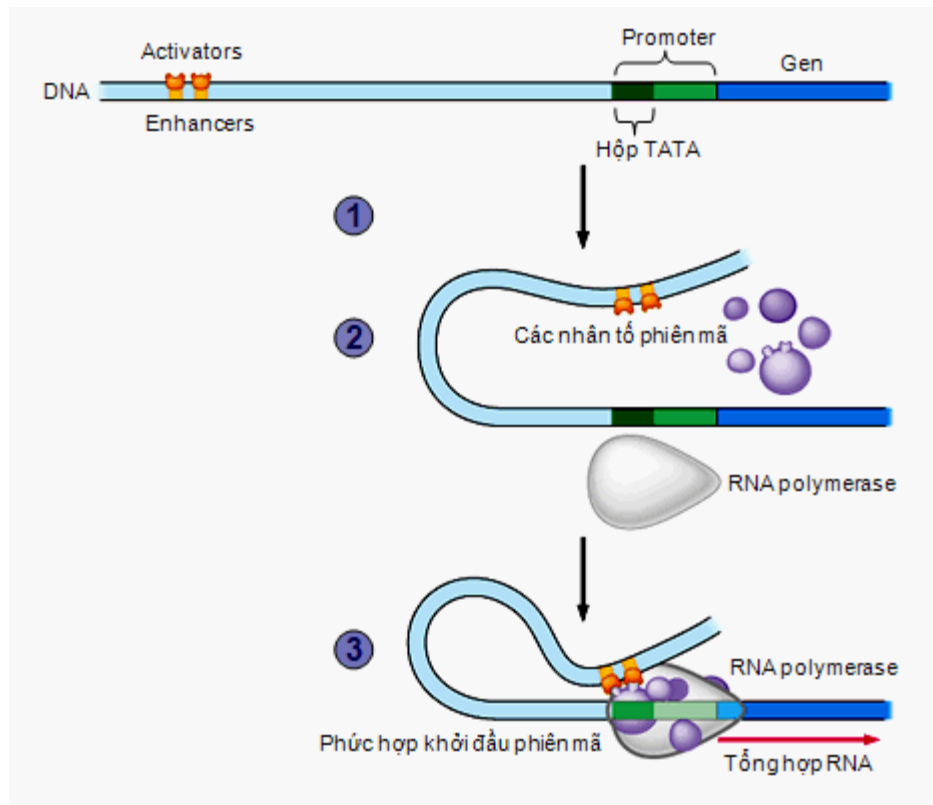
Enhancer là các trình tự có tác dụng *cis* (liên kết), chúng tăng cường tế bào phiên mã ảnh hưởng đến các promoter nằm ngay trên cùng một phân tử DNA. Tính đặc hiệu của các enhancer là chúng có khả năng thể hiện một cách hiểu lầm khi một khoảng cách rất xa, có khi lên vài nghìn cặp base. Ngoài ra, chúng có hoạt động chèn vào bất kỳ hướng nào, dù phía trước hay phía sau promoter.

Xét trên một góc độ nào đó, các enhancer tương tự promoter. Chính vì vậy, chúng có thể thúc đẩy các trình tự có tác dụng *cis* như những tín hiệu tác động từ xa (*trans*) (Hình 8.8).

3. Các protein là nhân tố có tác dụng *trans*

Một vài protein, như những tín hiệu CCAAT, đã xác nhận tế bào phiên mã có ví dụ. Các nhân tố này có thể phân biệt giữa các nhân tố của các phân tử CCAAT. Các hộp GC liên kết với các nhân tố khác. Các ví dụ về các tác dụng *trans* (*trans-acting factor*) đã tìm thấy ở men và động vật có vú. Các nhân tố *trans* có các vị trí chung là gồm hai vùng cấu trúc và chức năng chính:

- Vùng gắn nhân tố *trans* vào DNA.
- Vùng tác dụng lên sự phiên mã.
Những ví dụ của nhân tố *trans* có bốn kiểu tác dụng như:
 - “ngón tay kẽm” (zinc-finger)
 - “xoắn-vòng-xoắn” (helix-turn-helix)
 - “xoắn-nút-xoắn” (helix-loop-helix)
 - “dây kéo leucine” (leucine-zipper) (Hình 8.9).



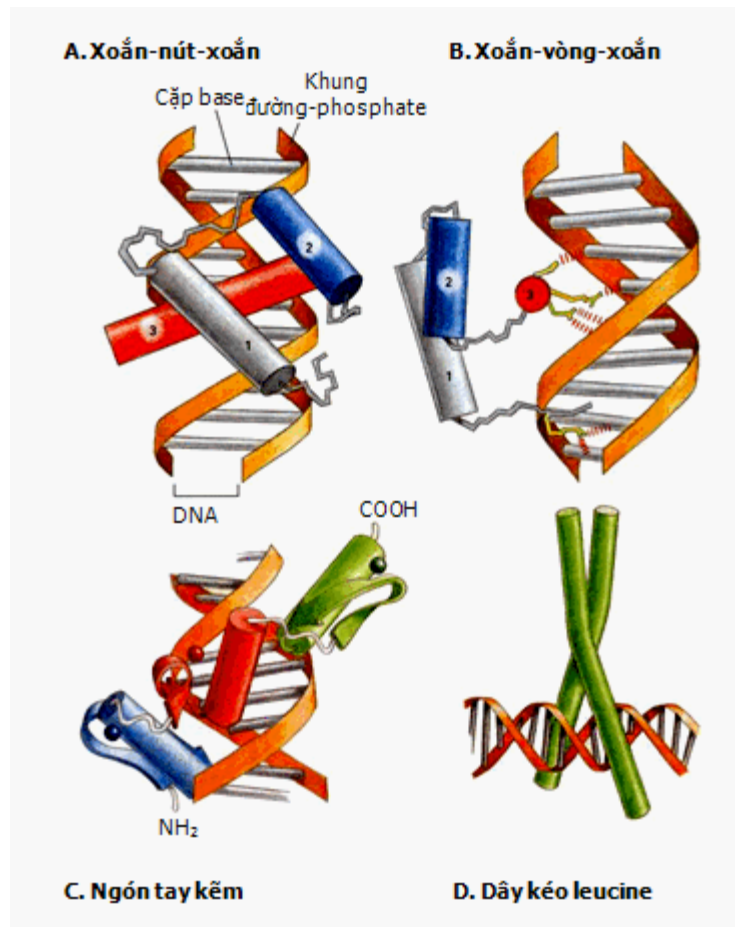
Hình 8.8. Enhancer của DNA eukaryote

c tính chung của các cấu trúc này là chúng luôn luôn gắn lên các trình tự cis dimer (gồm hai dimer).

Trình tự cis và nhân tố trans thường có các tác động đặc hiệu do những liên kết yếu hình thành giữa các phân tử của nhân tố trans với các base của trình tự cis. Ví dụ, trình tự hormone steroid với các enhancer.

Nhiều protein có tác động trans tham gia vào tiến trình phát triển của cơ thể ruồi giấm, chúng có vai trò chủ yếu trong xác định số lượng các oenotype của ruồi.

Như vậy, các gen eukaryote có thể hóa bằng hai trình tự DNA có tác động cis là promoter và enhancer, chúng nhận biết các nhân tố protein có tác động trans, các nhân tố trans cho phép RNA polymerase khởi sự phiên mã và thực hiện phiên mã tiếp theo.



Hình 8.9. Các kiểu tác động của nhân tố trans

4. Hormone

Ví dụ rõ nhất về các chất điều hòa nội tiết ảnh hưởng đến tính gen là hormone. Đó là những chất tạo ra do một loại tế bào có hiệu quả trên các tế bào khác. Các hormone thường xuyên chuyển đến các phần của cơ thể những chất tác động trên các tế bào có các receptor tương ứng.

Sự tác động của hormone vào receptor gây ra tín hiệu tác động trên các vùng cụ thể trên các DNA, gây hoạt hóa gen hoặc tắt nhóm gen tương ứng.

Các hormone có thể kích thích phiên mã bất kỳ một trong các cách sau:

- Hormone có thể làm cho DNA tách khỏi histone và tạo điều kiện cho RNA polymerase bắt đầu phiên mã.
- Có thể làm chất cảm ứng (inducer) gây bắt đầu phân tử receptor.
- Có thể gắn trực tiếp vào DNA để hiệu quả thu hút lại cho vị trí của RNA polymerase hoặc protein là nhân tố phiên mã (protein transcription factor).

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Có thể hoạt hóa effector protein làm thành phần hợp gen DNA và kích thích gen RNA polymerase.

- Có thể gen vi protein tổ hợp hoạt hóa kích thích gen RNA polymerase.

5. Kiểm soát các chất điều hòa gen trong nhân

Một số nhóm phân tử hiện diện rất nhiều trong môi trường bào eukaryote, như các histone, các chất ức chế máy dịch mã, các phức hợp màng... Vài chất này có chức năng khác nhau về mặt chức năng duy trì sự ổn định của chúng trong tế bào. Các chất này có thể bao gồm:

- Sự phiên mã liên tục và lặp lại trong tế bào.

- Sự lặp lại các gen.

- Sự khuếch đại ngoài nhiễm sắc thể các trình tự gen cụ thể.

5.1. Sự phong phú

Các gen mã hóa cho rRNA và tRNA đã được nghiên cứu kỹ. Phần lớn lại nằm gần DNA-RNA cho thấy nhiễm sắc thể của *Xenopus* có vùng tổ chức hạch nhân (nucleolus organizer) chứa 450 bản sao của DNA mã hóa cho 18S và 28S rRNA. Ngược lại, trong nhân có 20.000 bản sao của các gen mã hóa cho 5S rRNA và các gen này không nằm trong vùng tổ chức hạch nhân.

Các gen mã hóa cho histone cũng có vị trí nằm gần sao chép hàng trăm lần.

Sự phong phú của các gen nêu trên mô phỏng sự ổn định cần thiết cho dịch mã khi phát triển hệ thống phân tử protein vào lúc cần thiết.

5.2. Sự khuếch đại gen

Một ví dụ về sự khuếch đại gen trong nhân là các chất phình (puff) của nhiễm sắc thể khổng lồ hay đa bội (polytene chromosome) tùy thuộc vào giai đoạn của chu kỳ phát triển này, DNA nguyên nhiễm sắc (euchromatic) của khuếch đại khoảng vài nghìn lần.

Trong nhân tế bào trưởng thành của *Xenopus*, có hàng trăm nhân con ngoài nhiễm sắc thể (extrachromosome nucleoli) với kích thước khác nhau, mỗi nhân con chứa các vòng tròn rDNA kích thước khác nhau, mà vai trò của chúng nay đã rõ. Các DNA vòng tròn này sản sinh nhiều rRNA một cách lặp lại.

V. Sự biệt hóa tế bào

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

1. Các tế bào bị biến tính mang thông tin gì về nhau

Các sinh vật bậc cao có cùng nguồn gốc, có thể trở thành genome nhiều loại tế bào khác nhau. Các tế bào này được tạo ra từ một thể phôi ban đầu, nhưng đã qua quá trình biến tính trở thành các tế bào có các chức năng khác nhau. Tuy nhiên, thực nghiệm xác định rằng số lượng nhiễm sắc thể, số lượng DNA và chỉ số $(A+T)/(G+C)$ của các tế bào thuộc các mô khác nhau của cùng một thể phôi giống nhau. Số dòng kế thừa lại DNA cho thấy DNA của cùng một thể phôi khác nhau của cùng một thể phôi không bị biến tính trong quá trình biến tính, chúng có thể tái hợp (renaturation) với nhau.

Thí nghiệm ghép nhân tế bào ruồi chèn vào tế bào trứng hươu nhàn (do chi phối tế bào) cho thấy 1% tế bào ghép nhân phát triển thành trứng thành. Điều này chứng tỏ tế bào ruồi tuy đã biến tính nhưng vẫn giữ nguyên vẹn thông tin di truyền tổ tiên trứng thành.

Tóm lại, số lượng DNA của các tế bào biến tính và bản gốc giống với các thể phôi ban đầu và chứa nguyên vẹn thông tin di truyền phát triển thành cá thể nguyên vẹn.

2. Các tế bào biến tính ảnh hưởng đến các nhóm protein khác nhau

Hiện tượng khác nhau giữa các tế bào biến tính, cần xét như sau:

- Thứ nhất, nhiều quá trình là chung cho tất cả các tế bào nên có nhiều protein giống nhau. Nhưng protein này gồm số lượng nhiều, dễ phân tích nhận biết các protein cấu trúc của thành tế bào và nhiễm sắc thể; một số protein bản địa của các bào quan (lưới nội sinh chất, bộ máy Golgi, các ribosome...). Nhiều protein có số lượng không nhiều như các enzyme khác nhau, tham gia vào các phản ứng trung tâm của quá trình trao đổi chất, điều hòa điều khiển nhau tất cả các hoạt động tế bào.

- Thứ hai, một số protein có số lượng phong phú một số tế bào chuyên hóa mà việc phát hiện chúng cần có thể nghiệm riêng. Ví dụ, hemoglobin chỉ có thể phát hiện ở tế bào máu.

- Thứ ba, như hơn 2.000 loại protein có số lượng dồi dào để so sánh giữa các hoạt động tế bào biến tính của cùng một thể phôi sinh vật với nhau bằng điện di hai chiều polyacrylamide, thì một số khác biệt đáng kể được tìm thấy. Dù so sánh giữa hai dòng tế bào nuôi cấy (như các dòng tế bào cừu và thỏ kinh) hay giữa các tế bào của cùng một mô của chuột (như gan và phổi), thì số các protein được phát hiện ở một thể phôi hai loại tế bào và vị trí thể phôi có thể khác nhau đến 10^5 ; chỉ có vài trăm protein hiện diện với số lượng khác nhau đáng kể hai hoạt động tế bào.

Các nghiên cứu cho thấy các tế bào eukaryote bậc cao thể phôi 10.000-20.000 protein khác nhau. Phần lớn chúng có số lượng rất ít và khó phát hiện. Nếu các protein hiếm (minor protein) này khác nhau giữa các tế bào với mức độ thể phôi các protein di

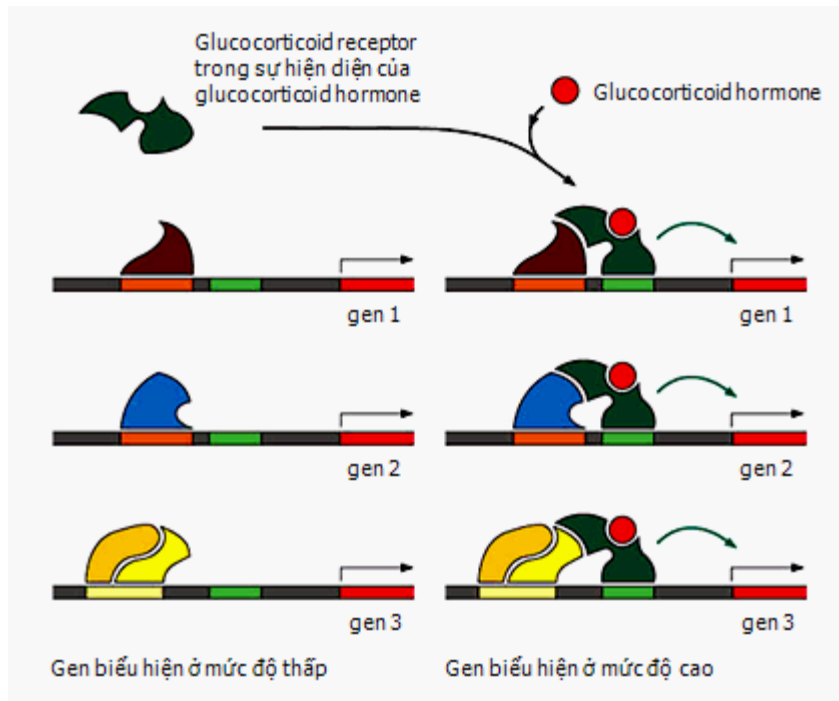
Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

đào, thì chỉ một số lượng nhỏ của chúng cần được tạo nên bởi các biệt chuyên hóa làm thay đổi hình thái và sinh lý của tế bào.

Tế bào có thể thay đổi sự biểu hiện gen của chúng để đáp lại tín hiệu từ bên ngoài.

Phần lớn các tế bào chuyên hóa của sinh vật đa bào có khả năng thay đổi phần biểu hiện của gen để đáp lại tác động bên ngoài. Ví dụ: nếu tế bào bị tác động bởi glucocorticoid hormone, thì sẽ tổng hợp một số protein chuyên biệt nhất định (Hình 8.10). Glucocorticoid được phóng thích ra khi bị đói bụng hay hoạt động mạnh và báo hiệu cho gan tổng hợp glucose, amino acid hay các phân tử khác nhau. Các protein, được tạo ra do các enzyme cụ thể như tyrosine aminotransferase hỗ trợ biến tyrosine thành glucose. Khi hormone không còn nữa, sẽ tổng hợp các protein này giảm xuống mức bình thường.

Các loại tế bào khác nhau phản ứng với glucocorticoid bằng những cách khác nhau. Ví dụ tế bào mỡ, sẽ tổng hợp tyrosine transferase giảm, trong khi ở một số loại tế bào khác hoàn toàn không có phản ứng với glucocorticoid. Các ví dụ này minh họa cho tính chung của biệt hóa là các kiểu tế bào biệt hóa khác nhau thường phản ứng lại cùng một tín hiệu từ bên ngoài bằng những cách khác nhau. Trên cơ sở đó, mỗi kiểu tế bào biệt hóa có một tính năng riêng biệt xuyên suốt. Các tính chất đó phản ánh sự biểu hiện lâu bền của các nhóm gen khác nhau.



Hình 8.10. Tác động của glucocorticoid làm tăng mức biểu hiện của gen

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Như vậy, các tế bào biệt hóa chứa đựng một phần thông tin. Nhiễm sắc thể bào chuyên hóa tổng hợp chủ yếu một số protein, ngoài các protein cấu trúc và protein cấu trúc để điều chỉnh cho các quá trình sinh lý bình thường. Ví dụ: tế bào cơ tổng hợp nhiều myosin, một protein quan trọng trong cơ, hay tế bào biểu bì (epithelial) tổng hợp nhiều keratine. Như vậy, cùng một chuỗi thông tin di truyền giống nhau, nhiễm sắc thể bào biệt hóa chứa đựng một phần thông tin: tổng hợp chủ yếu một số loại protein.

3. Sự điều hòa mức phiên mã là nguyên nhân của các sai khác giữa các tế bào biệt hóa

Nếu những sự biệt hóa giữa các kiểu tế bào khác nhau phụ thuộc vào các gen chuyên biệt mà tế bào biểu hiện, thì sự kiểm soát biểu hiện gen thực hiện như thế nào?

Giả thuyết chấp nhận hiện nay là trong các tế bào biệt hóa một số gen phiên mã, còn có các gen khác thì không. Không có sự kiện nào mâu thuẫn với giả thuyết này và nó giải thích hợp lý những tình trạng biệt hóa của các tế bào. Ở vi khuẩn, sự kiểm soát phiên mã có tầm quan trọng hàng đầu, vì chức năng của nó là để điều chỉnh không đồng đều các chất trung gian.

Việc phát hiện các gen điều hòa và các gen đóng hay mở giúp hiểu rõ sự điều hòa quá trình phát triển cá thể và biệt hóa tế bào. Genome của tế bào người có số lượng DNA nhiều hơn gấp 1.000 lần so với genome của vi khuẩn. Tuy nhiên, số lượng gen cấu trúc người chỉ lớn hơn 10 lần số gen cấu trúc vi khuẩn. Điều này cho thấy nhiều gen người tham gia vào các chức năng điều hòa.

Tóm lại, genome của tế bào chứa các trình tự nucleotide của DNA thông tin tạo ra hàng nghìn các protein và phân tử RNA khác nhau. Tế bào biểu hiện những hình thức nhóm gen của nó và các kiểu tế bào biệt hóa khác nhau sinh ra từ tế bào gốc sinh ra do các nhóm gen khác nhau có sự biểu hiện không giống nhau. Hơn nữa, các tế bào có thể thay đổi trình tự biểu hiện các gen của chúng để đáp lại những thay đổi của môi trường, các tín hiệu từ các tế bào khác. Mặc dù tất cả các bộ gen trong sự biểu hiện của gen vi khuẩn đều điều hòa, nhưng ở vi khuẩn các gen vì các khi sự phiên mã là sự kiểm soát quan trọng nhất.

Tài liệu tham khảo/ thêm

1. **Phạm Thành Hải**. 2003. Di truyền học. NXB Giáo dục, Hà Nội.
2. **Lê Đức Trình**. 2001. Sinh học phân tử tế bào. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
3. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD**. 2002. Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. Garland Publishing, Inc. New York, USA.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

4. **Karp G.** 2002. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. 3rd ed. *John Wiley & Sons, Inc.* New York, USA.

5. **Lewin B.** 2000. Gene VII. *Oxford University Press*, Oxford, UK.

6. **Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL and Darnell J.** 2004. Molecular Cell Biology. 5th ed. *Freeman and Company*, New York, USA.

7. **Walker JM and Rapley R.** 2000. Molecular Biology and Biotechnology. *Chapman & Hall Limited*, London, UK.

8. **Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW and Weiner AM.** 2004. Molecular Biology of the Gene. *The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.* California, USA.

9. **Weaver RF.** 2003. Molecular Biology. 2nd ed. *McGraw-Hill Company*, New York, USA

Chương 9

Công nghệ DNA tái tổ hợp

I. Mục

Vào năm 1973, một nhóm các nhà khoa học đã tạo ra các thể sinh vật đầu tiên với các phân tử DNA tái tổ hợp. Theo đó, Cohen (H. Stanford, M) và Boyer (H. California, M) cùng các cộng sự đã đưa các mảnh DNA từ một plasmid này vào một plasmid khác, tạo ra một plasmid hoàn toàn mới, plasmid tái tổ hợp. Sau đó, họ đưa plasmid tái tổ hợp vào trong các tế bào *E. coli*. Trong một thời gian ngắn, các tác giả này đã dùng các phương pháp giống nhau để đưa các gen từ hai loài vi khuẩn khác nhau, chuyển chúng vào vi khuẩn. Các thí nghiệm này ảnh hưởng trực tiếp đến sự phát triển của công nghệ vô cùng quan trọng trong lịch sử nghiên cứu khoa học của nhân loại.

Công nghệ DNA tái tổ hợp là một tập hợp các kỹ thuật phân tử như: phân lập, biến nạp và nghiên cứu các phân tử DNA. Thuật ngữ tái tổ hợp được dùng thông thường để chỉ đến việc đưa các phân tử DNA từ hai nguồn xa nhau. Ví dụ: các gen từ hai loài vi khuẩn khác nhau có thể được liên kết lại, hoặc một gen người có thể được đưa vào nhiễm sắc thể vi khuẩn. Công nghệ DNA tái tổ hợp (còn gọi là công nghệ di truyền, công nghệ gen hay kỹ thuật gen...) hiện nay bao gồm một mảng lớn các kỹ thuật phân tử được dùng để phân tích, biến nạp và tái tổ hợp như mô hình trình tự DNA.

1. Tác động của công nghệ DNA tái tổ hợp

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Công nghệ DNA tái tổ hợp đã biến đổi sâu sắc phương thức nghiên cứu gen. Trước đây, thông tin về cấu trúc và chức năng của gen thường được bằng cách kiểm tra biểu hiện kiểu hình của chúng, nhưng những kỹ thuật mới đã tạo ra khả năng tách các trình tự nucleotide. Trước đây, các nhà di truyền phải chờ đợi sự xuất hiện các đột biến tự nhiên hoặc cố gắng phân tích hiệu quả của sai khác di truyền, ngày nay họ có thể tạo ra đột biến các nhiễm sắc thể một cách chính xác và xem chúng thay đổi kiểu hình như thế nào.

Công nghệ DNA tái tổ hợp cũng cung cấp các thông tin về cấu trúc và chức năng của gen và đã thay đổi nhiều khái niệm cơ bản của di truyền học. Ví dụ: trong khi mã di truyền được xem là bất biến, thì bây giờ chúng ta còn biết rằng các mã không phổ biến được tìm thấy trong DNA ty thể. Trước đây, chúng ta nghĩ rằng chức năng của các gen eukaryote giống với prokaryote, nhưng bây giờ chúng ta biết rằng nhiều gen eukaryote bị gián đoạn bởi các intron. Ngày nay, chúng ta đã biết về nhiều quá trình tái bản, phiên mã, dịch mã, biến đổi RNA (RNA processing) và nhập hòa gen thông qua việc sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp DNA. Các kỹ thuật này cũng được dùng trong nhiều lĩnh vực khác, bao gồm hóa sinh học, vi sinh vật học, sinh học phát triển, sinh học thần kinh, tiến hóa và sinh thái học.

Công nghệ DNA tái tổ hợp cũng được dùng để tạo ra nhiều sản phẩm thương mại, chẳng hạn như thuốc, hormone, enzyme và các giống cây trồng-vật nuôi. Một nền công nghiệp hoàn toàn mới, công nghiệp công nghệ sinh học, đã phát triển chung quanh việc sử dụng các kỹ thuật này để tạo ra các sản phẩm mới. Trong y học, các kỹ thuật tái tổ hợp DNA được dùng để tìm kiếm các ứng dụng, chẩn đoán các bệnh di truyền và nhiễm trùng, sản xuất thuốc và nhập các rclone di truyền.

2. Làm việc với các phân tử

Kỹ thuật gen cho thấy một loạt các hiệu ứng, mở ra các phương thức nghiên cứu mới (mà trước đây có thể không thể) giống như là hiện nhiên. Vì vậy cơ bản đó là các gen có kích thước quá nhỏ và có hàng ngàn gen trong một tế bào. Thông chí, khi quan sát trên kính hiển vi hiển vi, thì DNA xuất hiện như là một sợi dây bé xíu, các nucleotide riêng rẽ không thể thấy, và không có một dấu hiệu nào về các đường nét vật lý chi tiết và kết thúc của một gen.

Trong hình ảnh này, chúng ta hãy xem xét một ví dụ về trình tự di truyền phân tử như sau: Giả sử rằng chúng ta muốn phân lập một gen cụ thể của người và nhập nó vào trong vi khuẩn sản xuất một loại protein người đã mã hóa. Vì vậy đầu tiên là tìm kiếm gen mong muốn. Genome người chứa khoảng 3,3 tỷ cặp base của DNA. Giả sử gen mà chúng ta muốn phân lập dài 3.000 bp. Như vậy, gen đích của chúng ta chỉ chiếm một phần nhỏ của genome; vì thế tìm kiếm gen của chúng ta trong một genome sẽ như thế là khó khăn hơn rất nhiều so với việc tìm kiếm

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

một cây kim trong một ống centrifuge. Nhưng thực tế, nếu chúng ta có thể nhúng gen, thì chúng ta sẽ tách nó ra khỏi genome như thế nào? Không có forcept như chúng ta làm với DNA nhân, và cũng không có một cái kéo cùn nào như chúng ta tra khỏi genome một đoạn gen riêng biệt.

Nếu chúng ta thành công trong việc cắt gen và phân lập gen mong muốn, thì bước tiếp theo chúng ta cần đưa nó vào trong tế bào vi khuẩn. Các đoạn DNA mảnh thường sẽ bị thoái biến nhanh bởi vi khuẩn; vì thế gen phải được chèn vào trong một đoạn DNA khác. Nó cũng phải được tái bản thành công hoặc nó sẽ không được phân chia tiếp khi tế bào phân chia.

Nếu chúng ta chuyển gen vào vi khuẩn thành công trong một đoạn DNA khác, chúng ta vẫn còn phải tìm kiếm một gen để phiên mã và dịch mã. Sự biểu hiện của gen là một quá trình phức tạp đòi hỏi nhiều các trình tự DNA khác nhau bên ngoài gen. Tất cả những trình tự này phải hiện diện trong các vùng các vị trí thích hợp của chúng để sản xuất protein.

Cuối cùng, các phương pháp sử dụng phân lập và chuyển gen có hiệu quả vô cùng thấp, trong hàng triệu tế bào chỉ có một vài cho các phương pháp này, chỉ có một vài tế bào có thể chuyển thành công và biểu hiện gen của người. Vì thế, chúng ta phải tìm kiếm nhiều tế bào vi khuẩn phát hiện một vài tế bào mang DNA tái tổ hợp.

Trên đây, các vấn đề này dường như là không vượt qua được. Nhưng ngày nay, các kỹ thuật phân tử được phát triển khác biệt chúng, và các gen người được chuyển dễ dàng vào các tế bào vi khuẩn và đó chính là sự biểu hiện của chúng.

II. Endonuclease hạn chế

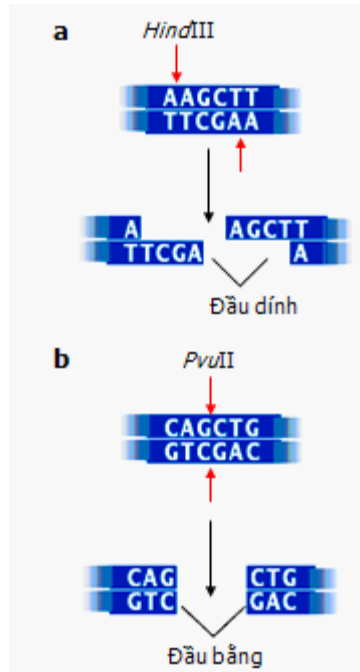
Trong tự nhiên, các enzyme endonuclease hạn chế (restriction endonuclease, RE), gọi tắt là enzyme hạn chế, hiện diện trong hầu hết các tế bào vi khuẩn cũng như các DNA ngoại lai tiếp nhận bởi máy tổng hợp protein của tế bào. DNA của chính chúng sẽ có bảo vệ khỏi tác động của enzyme hạn chế nhờ sự có mặt của các enzyme nội bào có thể methyl hóa (methylation) các nucleotide cụ thể, vì thế các nucleotide này không còn nhận biết bởi các enzyme hạn chế.

Việc phát hiện ra các enzyme hạn chế của vi khuẩn cắt DNA như trình tự cụ thể, đã giúp cho việc thao tác gen dễ dàng hơn, do nó có thể giám sát độ dài của các phân tử DNA thành một tập hợp bao gồm các đoạn ngắn hơn. Hiện nay, các enzyme hạn chế được phân lập từ các sinh vật prokaryote.

Một enzyme hạn chế chỉ nhận biết và cắt một trình tự DNA cụ thể thường chứa bốn hoặc sáu cặp nucleotide. Ví dụ enzyme *EcoRI* tách chiết từ *E. coli* cắt trình tự GAATTC, enzyme *BalI* của *Brevibacterium albidum* cắt trình tự TGGCCA. Có hơn 900

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

enzyme hạn chế khác nhau có tính đặc hiệu khoảng 250 chủng vi sinh vật. Các enzyme hạn chế cắt các phân tử DNA sợi đôi theo hai cách khác nhau (Hình 9.1):



Hình 9.1. Hai kiểu cắt của enzyme hạn chế. (a) tạo ra đầu dính, và (b) tạo ra đầu bằng.

- Cắt trên một vị trí xác định tạo ra các phân tử dính (đầu dính).

- Cắt trên hai vị trí nằm xa nhau quanh một vòng xác định tạo ra phân tử dính (đầu dính).

Vì một enzyme hạn chế chỉ nhận biết một trình tự duy nhất, cho nên sự vị trí cắt trên một phân tử DNA đặc biệt thường là nhất. Các phân tử DNA được cắt bởi enzyme hạn chế có thể phân tách theo kích thước bằng kỹ thuật agarose gel điện di. Do sự tồn tại của các phân tử trong các các thể, cho nên DNA vi khuẩn, DNA thực vật và DNA động vật có cấu trúc phức tạp nhau về cấu trúc. Vì thế, một phân tử DNA tự nhiên thường có thể dễ dàng tích tụ và phân tích DNA của một sinh vật khác. Sự tồn tại này cũng phù hợp với plasmid, nhân di truyền ngoài nhân của vi khuẩn trong môi trường vi khuẩn khác nhau. Chúng là những phân tử DNA mạch vòng đóng sợi đôi dùng làm vector mang các phân tử DNA ngoại lai dùng trong kỹ thuật tái tổ hợp DNA.

Giống như *Eco*RI, nhiều enzyme hạn chế khác tạo ra các phân tử DNA với 5' lồi (protruding). Một số enzyme hạn chế (ví dụ: *Pst*I) tạo ra các phân tử DNA có 3' lồi. Một số enzyme hạn chế khác (ví dụ: *Bal*I) cắt trực tiếp tạo ra các phân tử DNA mang đầu bằng (blunt) (Hình 9.1).

Bảng 9.1. Trình tự nhận biết của các enzyme hạn chế

Enzyme	Nguồn vi sinh vật	Trình tự nhận biết	Loại đầu
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'-G GATCC-3' 3'-CCTAG G-5'	Dính
<i>Bgl</i> II	<i>Bacillus globigii</i>	5'-A GATCT-3' 3'-TCTAG A-5'	Dính
<i>Cof</i> I	<i>Clostridium formicoaceticum</i>	5'-G CGC-3' 3'-CGC G-5'	Dính
<i>Dra</i> I	<i>Deinococcus radiophilus</i>	5'-TTT AAA-3' 3'-AAA TTT-5'	Bằng
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i>	5'-G AATTC-3' 3'-CTTAA C-5'	Dính
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegypticus</i>	5'-GG CC-3' 3'-CC GG-5'	Bằng
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'-A AGCTT-3' 3'-TTCGA A-5'	Dính
<i>Hpa</i> II	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	5'-C CGG-3' 3'-GGC C-5'	Dính
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i>	5'-CTGCA G-3' 3'-G ACGTC-5'	Dính
<i>Pvu</i> II	<i>Protrus vulgaris</i>	5'-CAG CTG-3' 3'-GTC GAC-5'	Bằng
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i>	5'-CCC GGG-3' 3'-GGG CCC-5'	Bằng
<i>Xma</i> I	<i>Xanthomonas malvacearum</i>	5'-C CCGGG-3' 3'-GGGCC C-5'	Dính

1. Các loại enzyme hạn chế

Có hai kiểu khác nhau: kiểu dính và kiểu không dính, bằng cách dùng enzyme DNA ligase của bacteriophage T4 có thể gắn các đầu dính lại với nhau, tuy nhiên trong hợp chất không dính thì không thể gắn lại được.

Ví dụ: Hình 9.2 minh họa về các đầu dính của enzyme *Hind*III.

2. Isochizomer

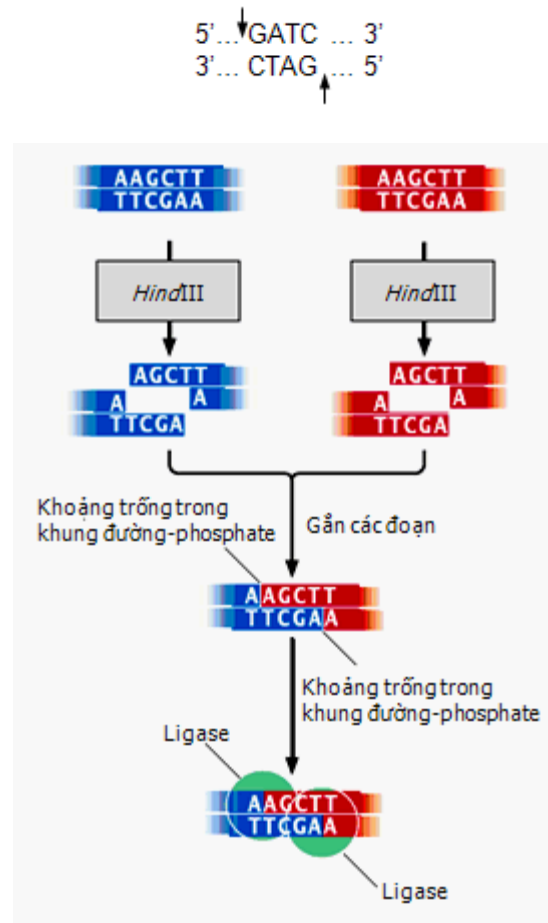
Nói chung, các RE khác nhau nhận biết các trình tự khác nhau (Bảng 9.1), tuy nhiên cũng có một số trường hợp cho thấy có những enzyme có phân loại tương tự nhau khác nhau như liệt kê trong một trình tự, các enzyme đó có thể là

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

isochizomer. Hơn nữa, một vài enzyme nhận biết các chuỗi tetranucleotide mà trong một số trường hợp các tetranucleotide này lại xuất hiện trong các chuỗi hexanucleotide của các enzyme khác.

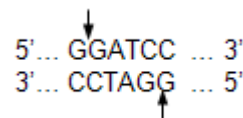
Ví dụ :

- *MboI* và *Sau3A* nhận biết trình tự :



Hình 9.2. Gắn các đầu dính

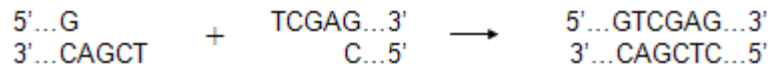
- Trong khi đó *BamHI* nhận biết trình tự :



Trong một vài trường hợp cácendonucleoranh một enzyme hạn chế này khi gắn với các endonucleoranh một enzyme hạn chế khác sẽ hình thành các thể lai mà các enzyme bám không nhận biết được. Ví dụ : *SalI* cắt trình tự (G↓TCGAC) và *XhoI* cắt trình tự (C↓TCGAG), các trình tự sinh ra này sẽ gắn với nhau tạo thành

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

th lai (hybrid) mà các vị trí cắt hạn chế của chúng không thể nhận biết bởi các enzyme *SalI* và *XhoI*:



III. Phương thức tạo dòng

Các phương thức cổ bản của kỹ thuật DNA tái tổ hợp là: (1) Gắn một đoạn DNA vào một phân tử DNA (như là vector) có thể tái bản, và (2) cung cấp môi trường cho phép sao chép phân tử DNA đã cấy.

Có ba nhóm vector sử dụng phương pháp tạo dòng các đoạn DNA ngoại lai và tái bản (sao chép) trong *E. coli*; đó là plasmid, bacteriophage λ và cosmid. Tất cả những vector này phải có một số tính chất cần thiết sau:

- Chúng có khả năng tái bản trong *E. coli*.
- Mang các gen chỉ thị chọn lọc để dàng phân biệt và tinh sạch vector của tái tổ hợp với các dòng khác.
- Chúng có các vùng DNA không cần thiết cho sự sinh sản trong vi khuẩn, vì thế DNA ngoại lai có thể cấy vào trong các vùng này.
- Chúng có thể biến nạp vào tế bào vật chủ một cách dễ dàng.

1. Plasmid vector

Plasmid là các thông tin di truyền ngoài nhân có trong nhiều loài vi khuẩn khác nhau. Chúng là những phân tử DNA mạch vòng, siêu, kích thước từ $1 - \geq 200$ kb, có khả năng sao chép tự nhiên độc lập trong tế bào. Các plasmid có thể mang một số gen của vi khuẩn và các gen này có thể biểu hiện ra protein.

DNA của plasmid có thể dễ dàng phân lập từ nuôi cấy vi khuẩn chứa plasmid bằng cách bổ sung chất tẩy (như là sodium dodecyl sulfate-SDS) và ly tâm siêu sinh tan (lysate)¹. Phương pháp nhiễm sắc thể vi khuẩn, liên hệ plasmid nhiễm, sử dụng ống nghiệm ở các ống ly tâm, plasmid siêu xoắn và các nhiễm sắc thể mảnh thường gặp lại trong nhiễm. Plasmid siêu xoắn mật độ thấp được phân tách bằng ly tâm sau khi xử lý với CsCl và EtBr.

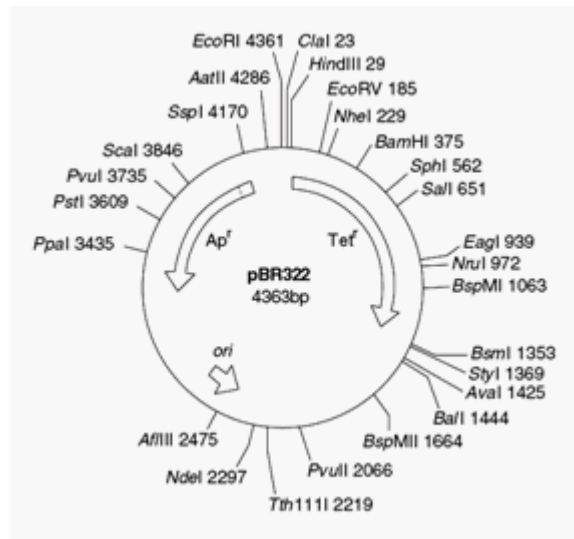
Plasmid mang các gen mã hóa cho các enzyme thường có lợi cho vi khuẩn vật chủ. Các plasmid có thể mang các kiểu hình khác nhau như: kháng kháng sinh, sản xuất kháng sinh, phân hủy các hợp chất hữu cơ phức tạp, sản xuất các enzyme hạn chế và enzyme biến đổi (modification enzymes).

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Các plasmid có thể chuyển vào trong vi khuẩn sau khi vi khuẩn tiếp xúc lý tế bào có thể cho thể m qua nh tế thể i v i các phân tử DNA nh . Quá trình này c biệt nh là s biệt n n p (transformation). Vi khuẩn c biệt n n p thành công có thể c ch n l c d a trên ki u hình m i mà chúng nh n c t plasmid, ch ng h n kh n ng kháng các kháng sinh.

M t s plasmid hi n di n trong tế bào có s b n sao th p, m t ho c m t vài b n sao trên tế bào, do DNA c a plasmid ch sao chép m t ho c hai l n tr c khi tế bào phân chia. Tuy nhiên, các plasmid khác t n t i m t s b n sao l n h n (10 t i 100 b n sao trên m t tế bào) do DNA tái b n l p l i cho n khi tế c s b n sao thích h p. Các plasmid có s b n sao l n c g i là plasmid d ng xo n l ng l o (relaxed plasmid), và ây là m t trong nh ng tính ch th u ích c a vector tế o dòng.

Hình 9.3 trình bày m t trong các plasmid vector th h th hai d ng xo n l ng l o, pBR322, dài 4.363 bp, vector này ch a hai gen kháng kháng sinh là ampicillin (Amp) và tetracycline (Tet). S th t c a các nucleotide trên vector c b t u v i v trí EcoRI n: T u tiên trong chu i GAATTC c quy c là nucleotide th nh t. Các s th t sau ó c ti p t c quanh phân tử vector theo h ng t gen kháng tetracycline t i gen kháng ampicillin.

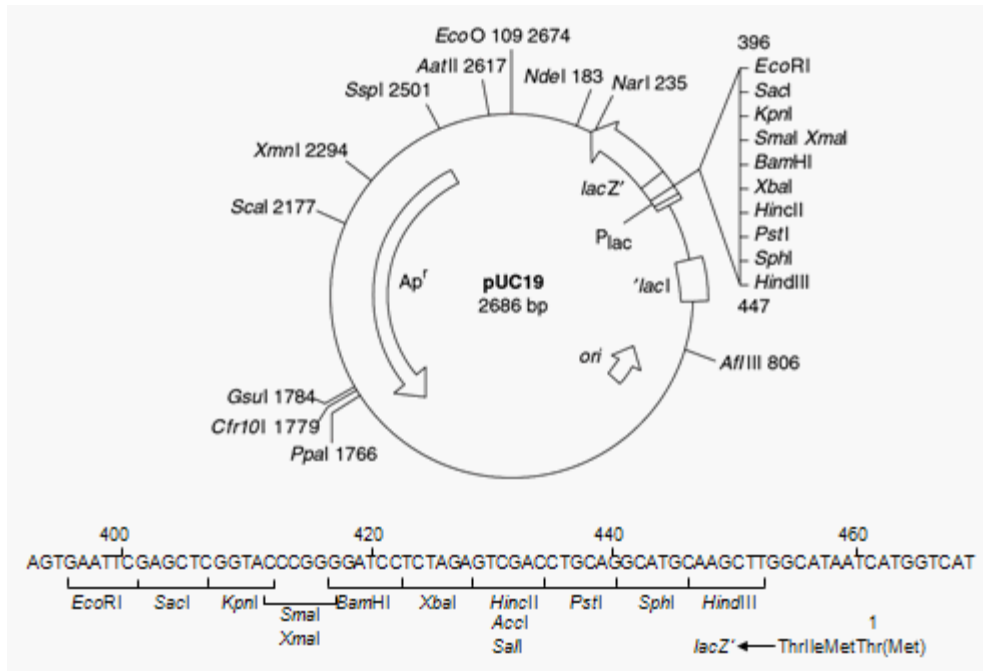


Hình 9.3. Plasmid vector pBR322. Ap^r (hay Amp^r) và Tet^r: gen kháng ampicillin và tetracycline, ori: trình tự khởi đầu sao chép, và m t s vị trí nh n bi t cho các RE.

Hình 9.4. trình bày m t lo i plasmid vector th h th ba là pUC19, ây là lo i vector tế o dòng c tr ng, Nó mang vùng tế o dòng (multiple cloning sites) hay còn g i là vùng a n i (polylinker), vùng kh i u sao chép (ori), và hai gen ch th (gen kháng ampicillin và gen lacZ'). Ampicillin là lo i kháng sinh gi t ch t tế bào vi khuẩn, nh ng nh ng vi khuẩn nào ch a vector pUC19 s kháng l i lo i kháng sinh này. Gen lacZ' mã

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

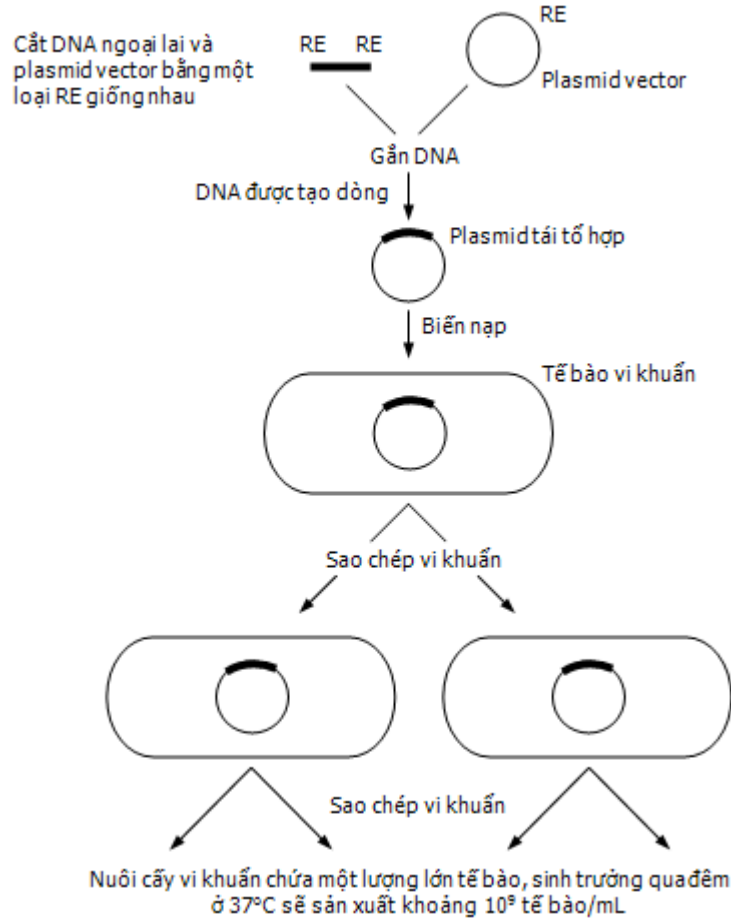
hóa enzyme -galactosidase, bình thường enzyme này cắt lactose sản xuất ra glucose và galactose. Enzyme này cắt X-gal tạo ra một chất màu xanh; khi X-gal được bổ sung vào môi trường, các khuẩn lạc vi khuẩn chứa pUC19 sẽ có màu xanh và dễ dàng nhận biết. Vùng polylinker của vector pUC19 là tập hợp một số vị trí nhận biết của các enzyme hạn chế cho phép gắn vào DNA ngoại lai vào plasmid.



Hình 9.4. Plasmid vector t o dòng c tr ng pUC19. Mang các v trí c th n ch n trong vùng t o dòng, vùng kh i u sao chép (*ori*), và hai gen ch th (gen Ap^r và gen *lacZ'*).

Plasmid có thể cắt một vị trí xác định bằng enzyme hạn chế. Vì thế, các đoạn cắt ra có thể tạo vòng bằng cách kết hợp các đầu dính bổ sung. Hơn nữa, các đoạn cắt ra bởi một enzyme cụ thể hoặc trên một phân tử DNA sẽ có đầu dính (đầu dính) vì chúng có thể cùng một enzyme hoặc trên một phân tử DNA khác. Vì thế, các đoạn hai phân tử DNA khác nhau, thậm chí khác nhau có thể kết hợp bằng các liên kết hydrogen thuận nghịch khi các đoạn này kết nối lại.

Nếu sử dụng các gen liên tiếp sau khi bắt cặp, thì các đoạn kết hợp sẽ hình thành và ngược lại, sử dụng các đoạn này sẽ thúc đẩy hình thành enzyme DNA ligase (còn gọi là polynucleotide ligase) liên kết các phân tử tái tổ hợp bằng cách tạo liên kết phosphodiester giữa nhóm 5'-PO₄ của polynucleotide này với nhóm 3'-OH của polynucleotide khác.



Hình 9.5. Ph ng th c c b n t o dòng gen trong vi khu n *E. coli*

Hình 9.5 trình bày toàn b ph ng th c s n xu t DNA tái t h p (t o dòng gen). Plasmid c c t các v trí xác nh b ng enzyme h n ch . DNA c a m t genome ngo i lai c c t b i cùng m t lo i enzyme, m t s o n trong ó có th có gen quan tâm. Plasmid và các o n c a genome c ph i tr n và k t h p nh enzyme DNA ligase. Các plasmid tái t h p c bi n n p vào vi khu n b ng ng nuôi c y plasmid và vi khu n.

2. Bacteriophage λ vector

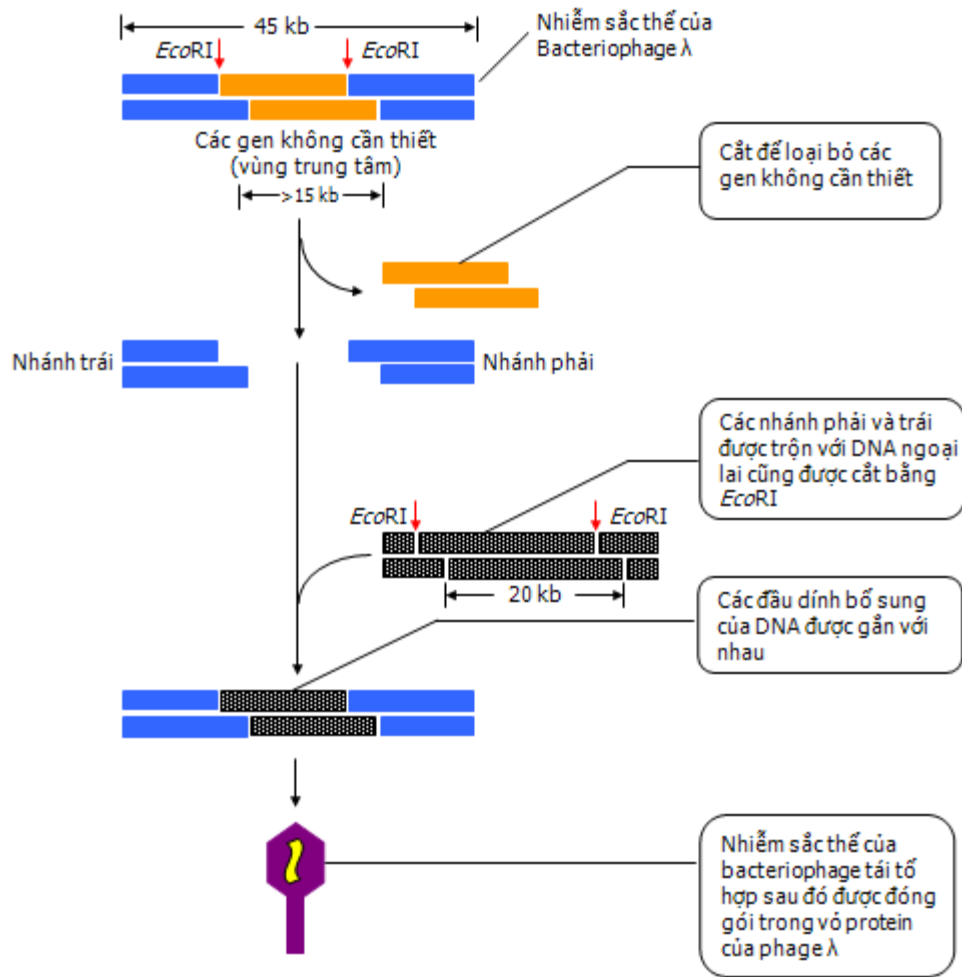
Các bacteriophage có nhi u u i m khi c s d ng làm vector t o dòng. Vector đ c s d ng r ng rãi nh t là bacteriophage λ gây nhi m vào t bào *E. coli*. M t trong nh ng u i m chính c a phage λ là có hi u qu chuy n DNA vào trong t bào vi khu n cao. u i m th hai là m t ph n ba c a genome phage λ là không c n thi t cho s xâm nhi m và sinh s n c a nó trong t bào v t ch , không có nh ng gen này, m t tí u th λ

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Việc chuyển thành công DNA của nó vào vi khuẩn và sinh sản. Các gen không cần thiết này, khoảng >15 kb, có thể thay thế bằng một đoạn DNA ngoại lai khoảng 15-23 kb. Ưu điểm thứ ba là DNA sợi không đóng gói trong vỏ λ trừ khi nó dài từ 40-50 kb; vì thế các đoạn DNA ngoại lai không bao giờ chuyển vào tế bào trừ khi chúng được chèn vào trong genome phage λ, vì vậy khi cần thiết một bộ đoạn DNA ngoại lai sẽ được tái bản sau khi nó vào trong tế bào vật chủ.

Các gen cần thiết của genome phage λ được nhúng trong một cụm. Các chèn của phage λ, cũng giống như là vector thay thế, đã được biên dịch truy tìm vị trí RE duy nhất cho *EcoRI* (chèn phage λ trên hình minh họa EMBL 3 có ba vị trí cho các RE: *EcoRI*, *BamHI* và *SalI*) trên một mô hình khác của các gen không cần thiết (Hình 9.6). Vì thế, có thể loại bỏ các gen không cần thiết bằng *EcoRI*. DNA ngoại lai được cắt bằng *EcoRI* sẽ có đầu dính bổ sung cho đầu của các đoạn DNA của phage λ cần thiết (nhánh trái và phải), có thể kết nối bằng DNA ligase. Genome của phage λ có các đoạn sợi ngắn được gọi là các vị trí *cos* cần cho sự đóng gói DNA trong đầu của phage. Genome tái tổ hợp của phage λ sau đó có thể đóng gói trong vỏ protein và được bổ sung vào trong *E. coli*. Các phage λ gây ra sự xâm nhiễm DNA tái tổ hợp của chúng vào trong tế bào vật chủ, nơi nó sẽ được tái bản. Chỉ các đoạn DNA có kích thước thích hợp và mang các gen cần thiết được đóng gói trong các vỏ của phage, cung cấp một hệ thống chọn lọc tốt cho các vector tái tổ hợp.

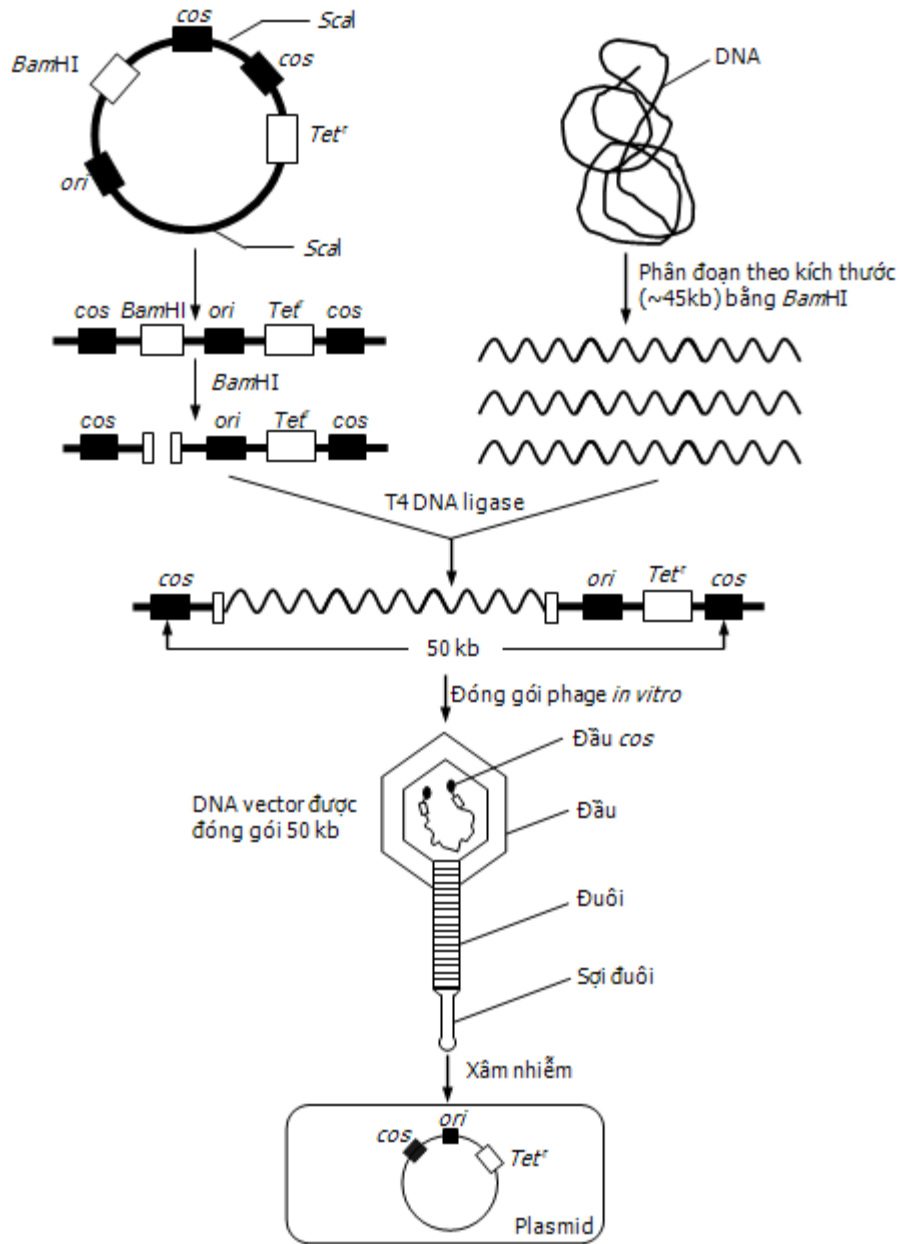
Trào i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html



Hình 9.6. Bacteriophage là một vector tốt để đưa gen vào tế bào

3. Cosmid vector

Các vector phage λ chỉ có thể mang các đoạn DNA có kích thước khoảng 15-23 kb. Tuy nhiên, các cosmid vector lại mang các đoạn DNA có kích thước lớn hơn nhiều, khoảng 45 kb.



Hình 9.7. Tạo dòng trong cosmid. Hai vị trí *cos* gần vị trí cắt của *ScaI* và *Bam*HI. DNA nguồn cắt bởi *Bam*HI phân đoạn có kích thước khoảng 45 kb. Phân đoạn plasmid DNA cắt bởi *Bam*HI và *ScaI*. Hai mảnh DNA này kết nối vào nhau và kết nối bằng T4 DNA ligase. Sau khi kết nối xong, những phân đoạn này được đóng gói trong phần đuôi của phage λ , và những phân tử có thể lây nhiễm sẽ kết nối thành plasmid sau khi tái nuôi.

Cosmid là các plasmid nhúng mang các vị trí *cos* của phage; chúng có thể đóng gói trong virus và chuyển vào vi khuẩn như sự xâm nhiễm của virus. Do tất cả các gen virus, ngoại trừ các vị trí *cos*, là không có, nên cosmid có thể mang các đoạn DNA ngoại lai lớn hơn hai lần các đoạn mà phage λ vector có thể mang. Các cosmid

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

vector có các thành phần sau: (1) một điểm khởi đầu sao chép của plasmid (*ori*); (2) một số các vị trí cắt hạn chế; (3) một hoặc nhiều các gen chèn chọn lọc; và (4) các vị trí *cos* cho phép đóng gói DNA trong đầu của phage.

DNA ngoại lai được chèn vào trong cosmid trong cùng một phản ứng thực thể với plasmid: cosmid và DNA ngoại lai được cắt bởi cùng một RE tạo ra các đầu b sung (đuôi dính), và chúng được liên kết với nhau bằng DNA ligase. Các cosmid tái tổ hợp được phân lập trong vial, và các tiểu thể phage được sử dụng để xâm nhiễm vào tế bào vi khuẩn, do đó cosmid sẽ tái bản như một plasmid. Bảng 9.2 so sánh các tính chất của các vector plasmid, phage λ và cosmid.

Bảng 9.2. So sánh các vector plasmid, phage λ và cosmid

Vector tạo dòng	Kích thước DNA có thể được tạo dòng	Phương pháp sinh sản	Phương pháp chuyển vào vi khuẩn
Plasmid	Khoảng 10 kb	Tái bản plasmid	Biến nạp
Phage λ	Khoảng 20 kb	Sinh sản phage	Xâm nhiễm phage
Cosmid	Khoảng 45 kb	Sinh sản plasmid	Xâm nhiễm phage

4. Kỹ thuật cDNA

Kỹ thuật cDNA (complementary DNA) là tổng hợp các đoạn DNA bổ sung (cDNA) bắt đầu từ mRNA của một phân tử trong tế bào sinh vật. Sử dụng kỹ thuật cDNA có hai ưu điểm sau:

- Các dòng cDNA chứa trình tự mã hóa liên tục của một gen. Nhiễm sắc thể eukaryote là gián đoạn, có chứa nhiều đoạn intron. Sau khi cắt mRNA tiền thân (pre-mRNA) và nối lại, các đoạn intron sẽ bị loại bỏ và mRNA hoàn chỉnh (mature mRNA) có trình tự mã hóa liên tục để cắt thành. Do cDNA được cắt thành khuôn mẫu mRNA hoàn chỉnh nên các dòng cDNA có thể tổng hợp protein cần thiết vì sẽ không còn mong muốn.

- Nhiễm protein được tổng hợp vì sẽ không còn do nhiễm sắc thể chuyên hóa và nhúng vào trong các tế bào này mRNA của protein đó sẽ có thể rất cao và kỹ thuật cDNA được tạo ra từ các tế bào này sẽ có nhiều cDNA mã hóa cho các protein tương ứng. Sử dụng cDNA của một vài loại nào đó sẽ làm giảm thiểu đáng kể việc xác định dòng mong muốn từ kỹ thuật gen.

Phương pháp tổng hợp gen từ mRNA ngày càng được phát triển, nó kết hợp với các phương pháp khác của sinh học phân tử cho phép ứng dụng trong nhiều lĩnh vực.

Xây dựng một kỹ thuật cDNA bao gồm những bước chính sau:

- Tinh sạch mRNA từ RNA tổng hợp của một phản ứng sinh vật.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Tổng hợp sản phẩm cDNA thành một khuôn mẫu mRNA nhờ enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase).

- Gây bất hoạt tính (ức chế) thoái mRNA-cDNA phá hủy sản phẩm mRNA bằng RNase H của *E. coli*. Tổng hợp sản phẩm cDNA thành hai đầu khuôn mẫu sản phẩm cDNA thành một đầu nhờ enzyme DNA polymerase với primer là vòng lặp ngược của nó thu được phân tử cDNA sợi đơn.

- Cắt vòng lặp ngược bằng enzyme nuclease S1 và dùng enzyme Klenow sao chép hai đầu sản phẩm cDNA thành đầu kép.

- Gắn các nối nối (linker) vào hai đầu sản phẩm cDNA sợi đơn trước khi tó đòng trong vector thích hợp xây dựng thành sản phẩm cDNA.

5. Thành phần genomics DNA

Thành phần genomics DNA là một tập hợp các nối DNA cùng đi đến cho một genome nguyên vẹn (học nguyên vẹn) của cá thể mà DNA có bản chất nguyên tử. Các thành phần được chọn lọc hoặc sàng lọc theo các phương pháp khác nhau nhằm phân lập một (hoặc các) trình tự nucleotide quan tâm cụ thể, hoặc xác định vị trí và thời gian của các trình tự trong genome mà đó là thành phần xây dựng (physical mapping).

Xây dựng một thành phần genomics DNA bao gồm bản gốc chính: Cắt DNA, gắn DNA vào vector, đóng gói các đòng tái tổ hợp trong vỏ protein của virus làm bản trung gian trước khi xâm nhập vào tế bào vật chủ, và chuyển nucleotide vào tế bào vật chủ.

Thành phần genomics DNA có nhiều ứng dụng, chẳng hạn lập bản vật lý (physical mapping) của DNA và xác định các gen gây bệnh hoặc các chuỗi DNA quan tâm cho những phân tích khác.

Sản xuất ra các đòng mang các nối chèn DNA khác nhau như gắn lên nhau có nhiều thuận lợi và thành phần có thể sử dụng trong quá trình chromosome walking. Chromosome walking thường được thực hiện với thành phần của cosmid, phage lambda hoặc YAC².

Các thành phần genomics DNA cần cần thiết cho việc xác định các gen gây bệnh bằng cách tó đòng chức năng (functional cloning). Theo hướng này, thông tin về chức năng của gen được khai thác phân lập gen mong muốn từ thành phần. Một oligonucleotide có trình tự dựa trên chuỗi amino acid trình tự phân tử dùng như là một probe (mẫu dò) phân lập đòng cDNA bằng cách sàng lọc thành phần cDNA. Đòng cDNA này sau đó có thể dùng sàng lọc thành phần genome nhằm phân lập các đòng genomics DNA và cho phép khảo sát cụ thể của chuỗi genomics hoàn chỉnh.

IV. Biểu hiện gen ngoại lai trong vi khuẩn

Trao đổi trực tuyến: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Vấn đề lý thuyết, kỹ thuật DNA tái tổ hợp cho phép chèn bất kỳ một gen nào đó từ một sinh vật này vào một sinh vật khác. Vấn đề quan trọng là làm sao gen ngoại lai có thể biểu hiện trong tế bào vật chủ.

Biểu hiện tất cả các gen ngoại lai trong *E. coli* phụ thuộc vào bản vị của gen ngoại lai vào trong vector biểu hiện (thường là plasmid). Các vector biểu hiện là vector có thể mang các gen ngoại lai mong muốn cho phép thực hiện sự phiên mã của các bản sao của nó ở dòng và sản xuất mã các mRNA của chúng trong *E. coli*. Vector này phải có các cấu trúc cần thiết sau:

- Các trình tự mã hóa gen chèn (marker) để theo dõi sự duy trì vector trong tế bào.
- Một promoter kiểm soát phiên mã (ví dụ: *lac*, *trp* hoặc *tac*) cho phép sản xuất một lượng lớn mRNA từ các gen của nó ở dòng.
- Các trình tự kiểm soát dịch mã như vùng liên kết ribosome để bố trí thích hợp và codon khởi đầu AUG.
- Một polylinker để chèn gen ngoại lai vào trong một vị trí chính xác về promoter.

Chỉ khi các cấu trúc yêu cầu như vậy, các vector biểu hiện mang gen ngoại lai mới có thể biến nạp vào chủng *E. coli* thích hợp. Nếu gen ngoại lai không nhận được promoter và vị trí kích thích phiên mã, thì nó sẽ không được phiên mã.

1. Các protein nguyên thủy tái tổ hợp

Các protein nguyên thủy (native protein) có thể được sản xuất trong *E. coli* bằng cách sử dụng promoter mạnh và một vùng liên kết ribosome (ribosome binding sites-RBS) hiệu quả. Ở vi khuẩn gen prokaryote có RBS mạnh chèn cùng cấp một promoter là. Trong khi đó, ở vi khuẩn một gen eukaryote (hoặc một gen prokaryote về vị trí RBS yếu) cần phải cùng cấp promoter lẫn RBS.

1.1. Biểu hiện của gen prokaryote-Promoter

Để bắt đầu khi biểu hiện các protein của eukaryote trong vi khuẩn là chọn một vector biểu hiện mang promoter mạnh của prokaryote. Các promoter thích hợp nhất cho biểu hiện của gen ngoại lai *E. coli* là những promoter có khả năng ức chế mạnh mẽ. Một hình thức là promoter (lai) *trp-lac*.

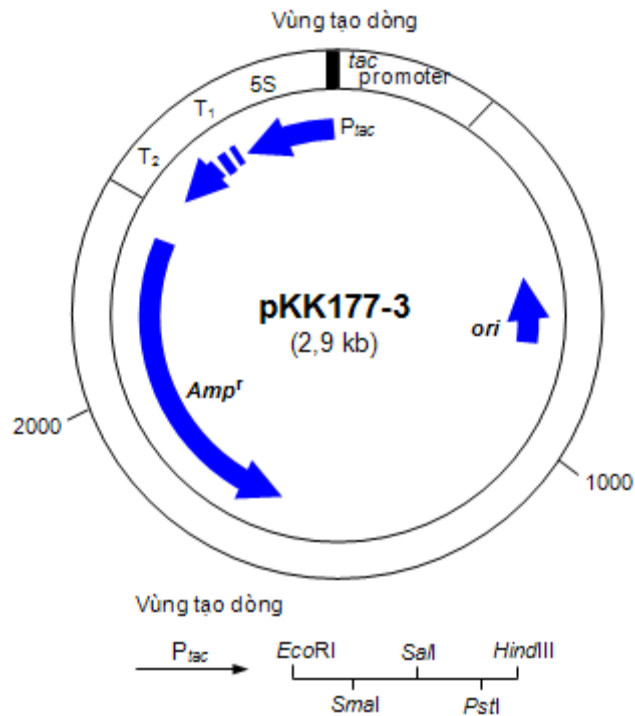
Promoter *trp-lac* còn gọi là promoter *tac* (một dạng promoter lai giữa promoter *trp* và promoter *lac*) đã được sử dụng thành công để sản xuất một lượng lớn protein trong *E. coli* (Hình 9.8). Promoter *trp* chỉ ức chế bởi gen ức chế *trp* và có thể được cảm ứng bởi sự bổ sung của 3-indolyacetic acid (3-IAA) vào môi trường hoặc bằng cách thí nghiệm tryptophan. Trong khi đó, promoter *lac* chỉ ức chế bởi gen ức chế *lac* và vì thế có thể được cảm ứng bằng sự bổ sung nhân tạo cảm ứng isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn. Cùng với promoter (lai) *trp-lac* mang operon *trp-35*

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

c gắn vào vùng *lac-10* và operator *lac* của chuỗi nhả gen *lac* (*lac* repressor).

1.2. Biểu hiện của gen eukaryote-Promoter và vùng liên kết ribosome

Có một số biểu hiện cao của gen ngoại lai trong *E. coli*, không những phải sử dụng các promoter mạnh sản xuất một lượng lớn mRNA mà còn sử dụng các RBS mạnh để thúc đẩy mRNA dịch mã một cách có hiệu quả. Trong *E. coli*, RBS bao gồm một mã khởi đầu AUG và một trình tự nucleotide ngay cạnh codon khởi đầu. Trình tự này có gọi là chuỗi Shine-Dalgarno (SD) giàu A-G, bổ sung cho đầu 3' của 16S rRNA của *E. coli*. Liên kết của ribosome với mRNA có khi được thực hiện bằng cách bắt cặp giữa chuỗi SD trong mRNA và trình tự đầu 3' của 16S rRNA.



Hình 9.8. Vector pKK177-3. pKK177-3 là một *tac* vector chứa vùng tạo dòng gen ngoại lai cùng hướng với promoter *tac*. Cùng hướng với vùng này là *rrnB* mang gen 5S của *E. coli* và hai nhân tố thúc đẩy phiên mã T_1 và T_2 .

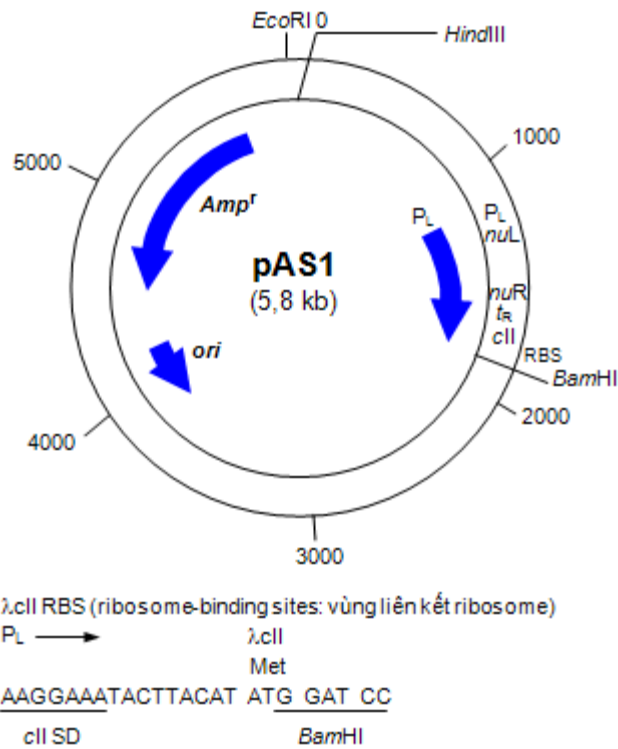
Hiệu suất dịch mã của mRNA chủ yếu chỉ phụ thuộc vào các yếu tố sau:

- Mức độ bổ sung giữa chuỗi SD và đầu 3' của 16S rRNA.
- Không gian và khả năng tiếp xúc của chuỗi DNA nhằm giữa chuỗi SD và codon AUG.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- Nucleotide theo sau AUG như hình sẽ liên kết ribosome.

Đưa codon ATG vào trong gen để tạo dòng và duy trì RBS của vi khuẩn bằng cách dùng vector pAS1 (Hình 9.9). Vector pAS1 mang promoter P_L và RBS của gen cII của bacteriophage λ , codon khởi đầu ATG để dùng hợp trình tự và phiên mã hóa của amino của gen eukaryote mục tiêu. Cách làm này có thể hữu ích vì có thể dùng cách gắn chuỗi SD của vi khuẩn và codon khởi đầu ATG của gen eukaryote có chức năng khởi đầu của gen. Một bản DNA có gen promoter và chuỗi SD sau đó sẽ được biến nạp vào các chủng *E. coli* thích hợp. Sàng lọc thì biến nạp thu các khuẩn lạc có mức phiên mã cao.



Hình 9.9. Vector pAS1. Vector pAS1 là một plasmid dài khoảng 5,8 kb mang promoter P_L của bacteriophage λ và vị trí thích hợp duy nhất *Bam*HI như vậy codon khởi đầu ATG của gen *cII* của bacteriophage λ .

2. Các protein dung hợp tái tổ hợp

2.1. Protein dung hợp

Protein dung hợp còn gọi là protein lai hoặc mã hóa bởi một gen lai (fusion gene) do sự dung hợp *in vitro* các gen khác nhau. Vì vậy, protein dung hợp sẽ mang trình tự amino acid của hai protein khác biệt. Các protein dung hợp được xây dựng cho các

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

mặc khác nhau. Sản phẩm gen có thể hiện bằng cách giải mã hóa các gen có ở dòng gen mutant cùng 3' của gen *lacZ*. Protein dung hợp có những ưu điểm chính sau:

- Protein dung hợp thường sản xuất với hàm lượng lớn do sự khởi đầu phiên mã và dịch mã dễ dàng khi bắt đầu các trình tự tiêu chuẩn của *E. coli*.

- Dung hợp các trình tự ngoại lai với các gen của *E. coli* thường cho kết quả các sản phẩm phân hủy các protein ngoại lai nguyên vẹn.

2.2. Vector biểu hiện các gen dung hợp với gen *lacZ*

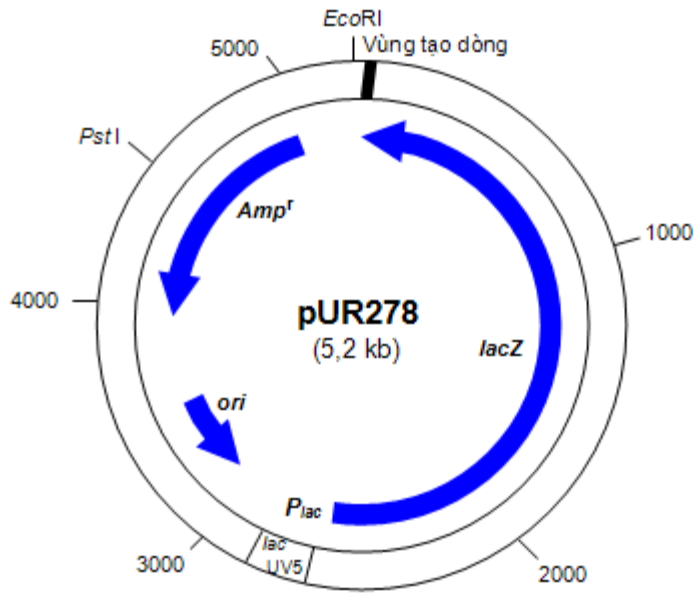
Một số hệ thống vector có phát triển biểu hiện các gen dung hợp với gen *lacZ*, hiện hình là các vector hợp UR (Hình 9.10). Chọn vector và vị trí thích hợp và chúng ta có thể tiến hành dung hợp cho hệ thống gen có ở dòng.

2.3. Phát hiện các protein dung hợp

Gen vector plasmid (ví dụ: pUR) thích hợp với đoạn DNA ngoại lai tạo ra một sản phẩm dung hợp trong khung gen. Bắt đầu các vector này vào *E. coli*. Kiểm tra các khuẩn lạc riêng biệt mang đoạn DNA ngoại lai mong muốn bằng cách tách chiết DNA của vector plasmid, sau đó cắt bằng enzyme thích hợp và tiến hành kiểm tra trên agarose gel. Sàng lọc các khuẩn lạc sản xuất protein dung hợp.

2.4. Tách chiết các protein dung hợp sản xuất kháng thể

Protein dung hợp có thể tách chiết theo một số cách: dùng dịch chiết urea, sử dụng kỹ thuật aminophenylthiogalactoside, tiến hành sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) hoặc phương pháp khác. Kỹ thuật nổi bật là SDS-PAGE, nhuộm gel và phát hiện bằng protein miễn dịch, sau đó cắt bằng này ra khỏi gel, ông không nghiên cứu thành bản. Bản này sử dụng thêm vào thí nghiệm sản xuất kháng thể.



Vùng tạo dòng

	→	<i>lacZ</i>					
pUR278	TGT CAA AAA GGG GAT CCG TCG ACT CTA GAA AGC TTATCG ATG						
		<i>Bam</i> HI	<i>Sal</i> I	<i>Xba</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Cla</i> I	
pUR288	TGT CGG GGATCC GTC GAC TCTAGAAAG CTT ATC GAT GAT						
		<i>Bam</i> HI	<i>Sal</i> I	<i>Xba</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Cla</i> I	
pUR289	TGT CAG GGG ATC CGT CGA CTC TAG AAA GCT TAT CGATGA						
		<i>Bam</i> HI	<i>Sal</i> I	<i>Xba</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Cla</i> I	
pUR290	TGT CAA AAA GGG GAT CCG TCG ACC TGC AGC CAA GCT TAT CGA TGA						
		<i>Bam</i> HI	<i>Sal</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Cla</i> I	
pUR291	TGT CGG GGATCC GTC GAC CTG CAG CCA AGC TTATCG ATG						
		<i>Bam</i> HI	<i>Sal</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Cla</i> I	
pUR292	TGT CAG GGG ATC CGT CGA CCT GCA GCC AAG CTT ATC GAT						
		<i>Bam</i> HI	<i>Sal</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Cla</i> I	

Hình 9.10. Các vector h pUR. Đây là các vector dùng h p v i gen *lacZ*, có các v trí t o dòng *Bam*HI, *Sal*I, *Pst*I, *Xba*I, *Hind*III và *Cla*I u 3' c a gen *lacZ*. S chèn vào c a o n DNA ngo i lai (cDNA) trong các v trí t o dòng thích h p cho phép s n xu t protein dung h p c a β -galactosidase ho t ng v i chu i peptide c mã hóa b i DNA ngo i lai.

3. Xác nh m c bi u hi n c a gen c t o dòng

Nói chung, có ba cách th ng c dùng xác nh m c bi u hi n protein ngo i lai c a gen c t o dòng:

- i n đi polyacrylamide gel có SDS xác nh protein có kích th c thích h p c s n xu t m c cao trong các t bào mang vector bi u hi n. Thông th ng, protein quan tâm có th quan sát b ng cách nhu m gel v i Coomassie Brilliant Blue ho c b ng $AgNO_3$. N u không th y có b ng protein m i khi dùng các thu c nhu m này, thì ánh d u s trao i ch t v i 100 μ Ci c a [35 S]Met ho c [35 S]Cys trên 1 mL d ch nuôi

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

5 phút. Sau đó, sử dụng kỹ thuật SDS-PAGE hoặc phóng xạ để ghi có thể phát hiện các protein quan tâm.

- Phân tích Western blot bằng cách dùng các kháng thể liên kết đặc hiệu với protein quan tâm để gắn kết lên màng nitrocellulose sau khi thực hiện điện di SDS-polyacrylamide gel.

- Nếu cần biểu hiện thì nên dùng gen *lacZ* cùng với gen cần biểu hiện. Như vậy, nếu sử dụng phiên mã hoặc dịch mã nhân bản biểu hiện thì thay thế trong hệ thống biểu hiện có thể kiểm soát bằng cách thay thế trong hoạt tính của β -galactosidase.

Phân tích Western blot

- Kỹ thuật SDS-PAGE

Là kỹ thuật điện di trên polyacrylamide gel với sự có mặt của SDS cho phép phân tách các phân tử protein có khối lượng khác nhau. SDS có tính âm điện và có khả năng liên kết với mạch peptide. Như vậy, sự liên kết của SDS tác động lên protein để làm biến tính phân tử protein và điện tích của SDS bám vào có thể làm biến tính phân tử protein nào cũng chuyển trong điện trường để phân tách. Do đó, bằng phương pháp điện di, có thể phân tách riêng biệt các phân tử protein có khối lượng phân tử khác nhau.

- Phân loại kháng nguyên-kháng thể

Phân loại kháng nguyên-kháng thể có tính đặc hiệu rất cao. Vì vậy, có thể áp dụng phân loại này để phát hiện sự có mặt và tính sạch protein. Kháng thể (antibody) được sản xuất khi đưa kháng nguyên vào hệ thống thí nghiệm (thử, chuột...) và các tính sạch tế bào máu ngay sau khi gây nhiễm. Như vậy, cách này là như kháng thể đa dòng (polyclonal antibodies-do các tế bào lympho khác nhau tiết ra), do đó chúng có khả năng nhận biết tất cả kháng nguyên. Ngược lại, kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies) chỉ tác động với một kháng nguyên nhất định.

Kháng thể đặc hiệu gắn enzyme (hoặc bằng cách phát huỳnh quang) để phát hiện protein đặc hiệu (thường gắn kết/chuyển lên màng nitrocellulose sau khi chuyển điện di SDS, và cuối cùng thông qua kỹ thuật Western blot (hoặc immunoblot) (Hình 9.11). Sau khi protein trên màng liên kết với kháng thể thì gắn kết enzyme (alkaline phosphatase, horseradish peroxidase...) thì phản ứng này sẽ liên kết với chất tạo màu. Sự hiện diện của protein ngoại lai (sản phẩm dịch mã của gen ngoại lai chuyển vào tế bào vật chủ) sẽ phát hiện như sự xuất hiện màu của phản ứng lại.

Sự phân bố của protein đặc hiệu trong tế bào và mô cũng có thể phát hiện bằng kỹ thuật lai *in situ* (*in situ* hybridization) với nguyên tắc tương tự Western blot. Ngoài ra, kháng thể đặc hiệu để phát hiện protein đặc hiệu bằng kỹ thuật miễn dịch

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

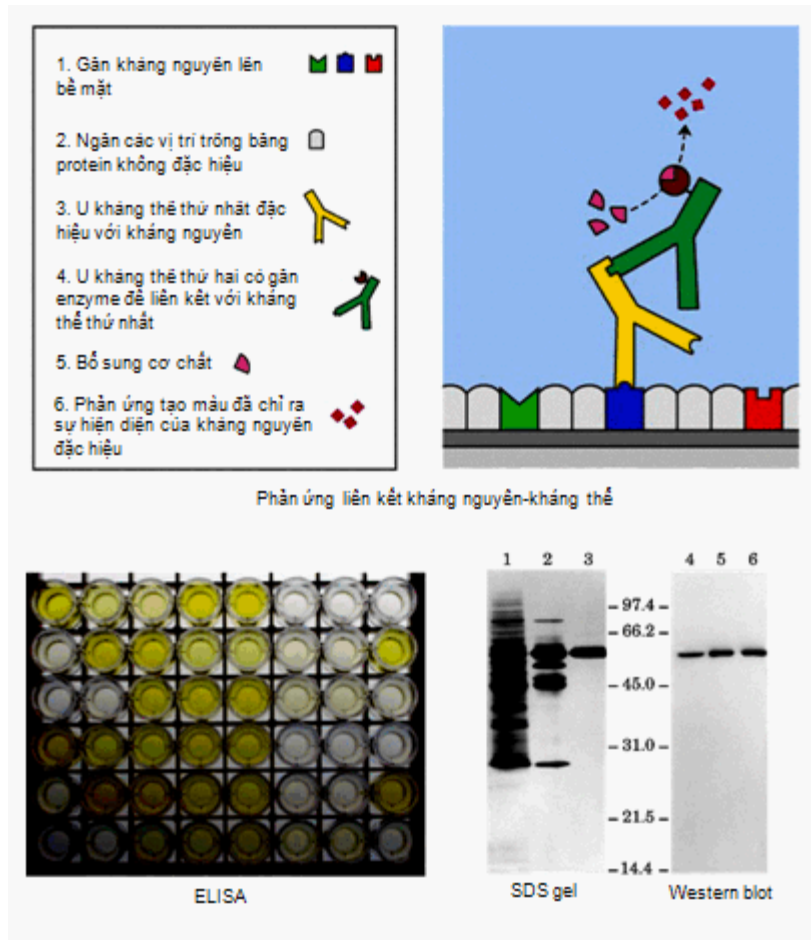
hoạt động ký ái lực (affinity chromatography). Kháng thể đánh dấu được dùng như là kháng nguyên trong kỹ thuật xét nghiệm hình thái miễn dịch liên kết enzyme (enzyme-linked immunosorbent assay) gọi tắt là ELISA (Hình 9.11).

V. Phương pháp phát hiện dòng vi khuẩn có DNA tái tổ hợp

1. Lai khuẩn lạc và vết tan

DNA tái tổ hợp trong plasmid hoặc YAC sẽ sản xuất ra các khuẩn lạc khi các nuôi cấy bin n p được dàn mỏng trên agar chứa môi trường sinh trưởng và nuôi cấy dưới ánh sáng tử ngoại thích hợp. Các bacteriophage sinh sản bào bì chúng xâm nhiễm và sản xuất ra các plaque (vết tan) có dạng hình tròn chu vi khoảng 2-3 mm có màu sáng trên thảm vi khuẩn (bacterial lawn) của lớp agar mỏng (trong trường hợp này người ta thường dùng agar có hai lớp: lớp agar mỏng có nồng độ agar thấp bacteriophage dễ sinh sản bào bì vi khuẩn, và lớp agar dày có nồng độ agar cao hơn).

Các vector, như mô tả trên, thường chứa gen cho phép chuyển đổi nhiễm sắc thể bào bì thành mang vector (th bin n p). Các chất này thường là gen kháng kháng sinh và các bào bì bin n p sinh trưởng trên môi trường chứa kháng sinh tương ứng.



Hình 9.11. Kỹ thuật Western blot và ELISA dựa trên phản ứng liên kết kháng nguyên-kháng thể

Ngoài ra, các vector còn chứa các gen chỉ thị bổ sung phân biệt các tế bào biến nạp chứa vào chèn của DNA ngoại lai vào các tế bào chứa các vector tái tổ hợp. Ví dụ: gen *lacZ* mã hóa enzyme β -galactosidase.

Một dòng (clone) chứa các chuỗi DNA quan tâm có thể xác nhận lại khuynh hướng của nó. Một lần nữa khuynh hướng biến nạp có thể chuyển lên màng nitrocellulose hoặc nylon bằng cách phủ (overlay) màng này lên trên agar. DNA biến tính và chuyển trên màng bằng đun nóng (baking) hoặc chiếu tia cực tím (UV-crosslinking), và sau đó lai trong môi trường chứa probe đã đánh dấu phóng xạ có trình tự bổ sung một phần của chuỗi để xác nhận. Ví dụ: Có thể một oligonucleotide tổng hợp nhân tạo, có nguồn gốc từ gen DNA tổng hợp, cDNA hoặc trình tự protein hoặc sản phẩm PCR. Trong một vài trường hợp, probe có thể thi thoảng dựa trên trình tự từ nguồn gen tổng hợp của các loài khác và thường lai với các trình tự khác. Các probe thường được in trên phim X-quang. Theo hình ảnh của phim (sau khi rửa) so sánh với agarose, sau đó sẽ có khả năng phát hiện các khuynh hướng của các khuynh hướng lai dòng tính tổng hợp trên phim X-quang.

2. Sàng lọc thể vi nhân gen bằng PCR

PCR (polymerase chain reaction) cũng có thể được dùng sàng lọc các thể vi nhân genomic DNA hoặc cDNA được xây dựng trong các plasmid vector hoặc bacteriophage vector. Ưu điểm chính của sàng lọc bằng PCR so với sàng lọc dựa trên lai truyền thống là ít tốn thời gian hơn. Sàng lọc bằng PCR có thể được thực hiện trong 3-4 giờ trong khi đó nó có thể mất vài ngày trước khi phát hiện bằng kỹ thuật lai phân tử (molecular hybridization). Kỹ thuật sàng lọc bằng PCR thường chỉ thực hiện kích thích các phân tử DNA để tạo dòng nhân là trình tự của phân tử, tuy nhiên các primer PCR được trình tự cho phân tử DNA ngoại lai cũng có thể được sử dụng. Ưu điểm này cho phép khảo sát chính xác hơn về vị trí của các dòng thể vi nhân cDNA và genomic DNA.

Nguyên tắc của PCR

PCR là một kỹ thuật sử dụng phổ biến trong công nghệ sinh học hiện đại và đã đóng góp rất lớn cho những tiến bộ về sinh học phân tử, ảnh hưởng trực tiếp vào cùng quan trọng trong việc khám phá ra các enzyme như chaperon và kỹ thuật Southern blot.

Kỹ thuật PCR dựa trên cơ sở phản ứng mở rộng primer như enzyme Taq polymerase khuếch đại *in vitro* các nucleic acid được trình tự. PCR cho phép khuếch đại theo hàm mũ lên hàng triệu lần các phân tử DNA có chiều dài khoảng 200-3.000 bp. Phân tử DNA được khuếch đại (DNA đích) được nhân đi nhân lại bằng primer được trình tự (oligonucleotide) thường có chiều dài khoảng 20 nucleotide.

Taq polymerase là một loại enzyme DNA polymerase chịu nhiệt (có nguồn gốc chịu nhiệt cao *Thermus aquaticus*) sử dụng tổng hợp các phân tử DNA mới trong môi trường có 4 loại deoxyribonucleotide (dATP, dCTP, dGTP và dTTP) và hai primer, trên cơ sở khuôn mẫu của phân tử DNA như thể nhân để bắt đầu cho chuỗi bắt đầu trình tự. Các phân tử DNA mới hình thành liên tục sử dụng làm khuôn mẫu. Sau mỗi chu kỳ, số lượng phân tử DNA mới trên cơ sở nhân lên gấp đôi, như vậy có thể số lượng tách ra, phân tích trình tự hoặc tạo dòng... Primer bên trái tác động trên sợi DNA 3'-5' được gọi là primer thuận (forward primer-ký hiệu là F). Primer bên phải tác động trên sợi DNA 5'-3' được gọi là primer ngược (reverse primer-ký hiệu là R).

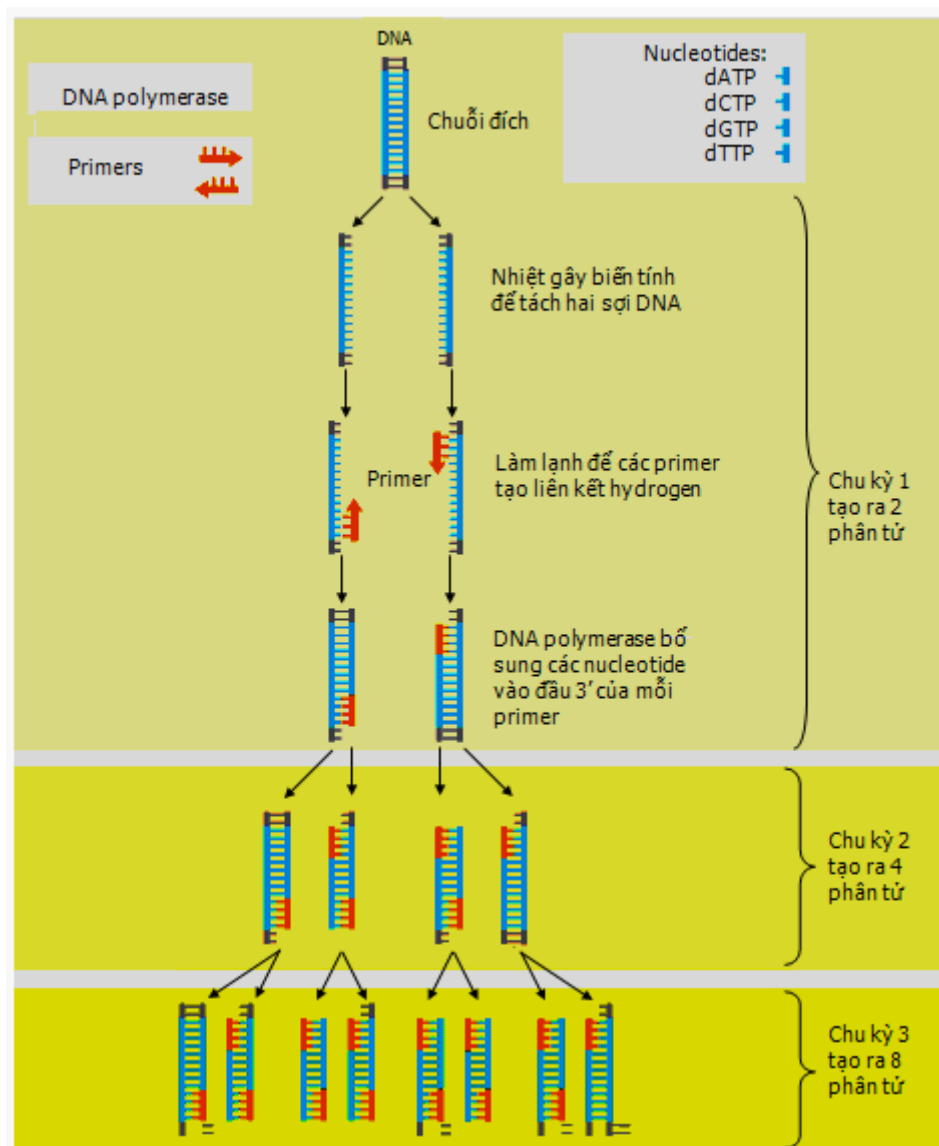
Nguyên tắc của PCR được trình bày trong hình 9.12. Theo đó, chu kỳ thực hiện hai Taq polymerase bắt đầu tạo ra các phân tử DNA có chiều dài xác định. Các primer thường là một oligonucleotide tổng hợp (synthetic oligonucleotide) có khoảng 10-20 nucleotide hoặc dài hơn. Nếu bắt đầu trình tự của phân tử gen cần khuếch đại thì có thể tổng hợp nhân tạo các primer tổng hợp thích hợp PCR và tách chúng ra bằng kỹ thuật điện di. PCR thường tiến hành khoảng 25-35 chu kỳ, qua đó từ 10^{-6} µg DNA ban đầu có thể khuếch đại (amplification) lên tới trên 1 µg (khoảng 2 kb). Mỗi chu kỳ PCR bao gồm ba giai đoạn có nhiệt độ khác nhau:

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

- *Gây biến tính (denaturation)* $90-95^{\circ}\text{C}$. Trong giai đoạn biến tính phân tử DNA khuôn mẫu được xoắn kép tách thành hai sợi đơn (single strands).

- *Liên kết primer (annealing)* $40-65^{\circ}\text{C}$. Trong giai đoạn này các primer gắn vào các vị trí có trình tự tương ứng DNA khuôn mẫu. Các liên kết ion tạo thành một tổ hợp (các primer gắn khớp chính xác) và trên các phân tử DNA sợi đơn đó (khuôn mẫu và primer) enzyme Taq polymerase có thể bắt đầu quá trình sao chép khuôn mẫu.

- *Kéo dài phân tử (extension)* $70-72^{\circ}\text{C}$. Đây là khoảng nhiệt độ thích hợp cho Taq polymerase tiến hành tổng hợp DNA bắt đầu từ các vị trí có primer theo chiều $5' \rightarrow 3'$.



Hình 9.12. Sơ đồ phản ứng chuỗi DNA polymerase (PCR)

3. Sàng lọc các thể vi nhân cDNA bằng các probe khác nhau

Sàng lọc thể vi nhân cDNA bằng cách lai nucleic acid là phương pháp cơ sở để sàng lọc và sàng lọc tin cậy nhất để tìm kiếm các dòng quan tâm. Sàng lọc bằng phương pháp lai nucleic acid cho phép phân tích đồng thời nhiều dòng và nhanh, không đòi hỏi các dòng cDNA phải hoàn chỉnh và sản phẩm kết hợp trong tế bào vật chủ phải có hoạt tính sinh học hoặc kháng nguyên. Hiện nay, các kỹ thuật tái nucleic acid đã được biểu hiện. Điều này cho phép phát triển một số lượng lớn các kỹ thuật khác nhau có thể sử dụng các probe của nucleic acid có các chiều dài và các vị trí khác nhau.

- **Các probe tổng hợp.** Các probe tổng hợp chứa ít nhất một phần của chuỗi nucleic acid chính xác của dòng cDNA quan tâm. Chúng được dùng trong nhiều trường hợp khác nhau, ví dụ: khi một dòng bản gốc của cDNA hiện có các đoạn phân mảnh một dòng hoàn chỉnh thể vi nhân cDNA. Thông thường, một bộ sưu tập một hoặc nhiều của các dòng hiện có được phân lập, ánh xạ phóng xạ *in vitro* và dùng để thử nghiệm. Lại với các probe tổng hợp thì việc tiến hành để các kỹ nghiệm.

- **Các probe tổng hợp tổng hợp.** Các probe tổng hợp tổng hợp được dùng để phát hiện các dòng cDNA có quan hệ hàng, nhưng không giống nhau hoàn toàn, với các trình tự của probe.

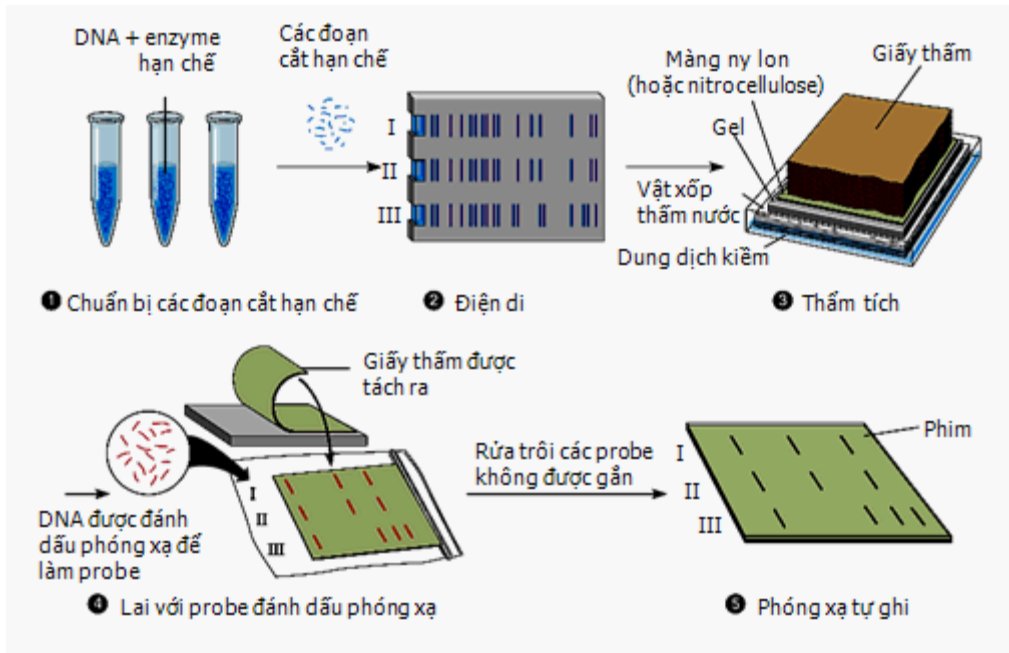
- **Các probe oligonucleotide nhân tạo.** Các probe oligonucleotide nhân tạo là các vùng dNTP của trình tự xác định kết hợp *in vitro*. Trình tự của các probe này được suy luận, bằng cách dùng mã di truyền, từ các vùng gen của chuỗi amino acid đã biểu hiện của protein quan tâm. Do sự thoái biến của mã di truyền³, chuỗi amino acid xuất có thể không được trình tự chính xác bởi các oligonucleotide nhân tạo đoán cho trình tự. Mặc dù, trong một số trường hợp, trình tự các amino acid giống nhau có thể được trình tự bởi nhiều oligonucleotide khác nhau.

4. Phân tích genomic DNA bằng phương pháp lai Southern

Việc phát hiện và xác định các chuỗi nucleic acid được trình tự là công việc thường xuyên trong nghiên cứu sinh học phân tử. Nguyên tắc của kỹ thuật này là đưa vào sự lai phân tử, để các kỹ thuật thích hợp hai chuỗi nucleic acid nhân tạo thành một phân tử lai. Phân tử lai phải được đưa vào một trường hợp của hai chuỗi nucleotide. Việc tạo thành phân tử sợi đôi như thể xảy ra chủ yếu thông qua liên kết hydrogen giữa các base guanosine với cytosine, và adenosine với thymidine. Thành phần và sự phân bố của các base không giống nhau ở các phân tử nucleic acid cho kết quả các tính chất khác nhau, vì thế liên kết hydrogen (hỗ trợ phân tử giữa các base tổng hợp) khi được ghép cặp thích hợp sẽ cung cấp một công cụ có giá trị xác định các chuỗi liên quan hoặc ngược lại với chuỗi nucleic acid quan tâm (probe).

Trong s các k thu t khác nhau s d ng lai phân t phân tích nucleic acid, thì k thu t c s d ng ph bi n nh t là lai m u dò nucleic acid c ánh d u v i nucleic acid ích c c nh trên m t v t r n, c tr ng là màng nitrocellulose ho c nylon.

Trình t c a k thu t lai Southern blot bao g m các b c sau: phân tách các o n c t h n ch c a DNA h gen b ng i n di agarose gel, chuy n DNA t agarose gel lên màng lai, lai các m u dò c ánh d u ng v phóng x v i các nucleic acid c c nh trên màng lai (Hình 9.13).



Hình 9.13. Sơ đồ của kỹ thuật lai Southern blot. Các m u DNA ích và genomic DNA (A) và (B) trong ví dụ này c c t b ng *EcoRI* và c phân o n b ng i n di trên agarose gel. DNA c a plasmid mang o n chèn DNA dùng làm m u dò (C) c ng c c t b ng *EcoRI* và i n di nh là m t ích ng d ng tính.

Các thí nghiệm lai trên màng thường c ti n hành b ng cách ánh d u probe b ng ^{32}P (m c dù các ng v phóng x khác nh ^{35}S c ng có th c s d ng). Ph n ng lai c a Southern òi h i ho t tính c hi u c a probe t i thi u ph i là 10^9 dpm/ μg , m c dù ho t tính 10^8 dpm/ μg có th c xem nh là ch p nh n c trong các ng d ng c n c ng l c th p. Các ph ng pháp không dùng ng v phóng x (ví d : digoxigenin-dUTP) ngày càng c s d ng ph bi n h n m c dù nh y c a chúng là không l n. Nh ng các k thu t không dùng ng v phóng x an toàn h n cho nghiên c u viên, t o ra các probe có th c b o qu n trong th i gian dài tr c khi dùng và k t qu phát hi n các tín hi u lai nhanh h n.

VI. Các ng d ng c a công nghệ DNA tái t h p

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Công nghệ DNA tái tổ hợp hiện nay có rất nhiều ứng dụng trong nông nghiệp. Các ứng dụng này bao gồm sản xuất dược phẩm và các loại hóa chất khác, các vi khuẩn công nghệ, các cây trồng nông nghiệp quan trọng, và các vật nuôi gia súc bị nhiễm di truyền... Kỹ thuật này cũng sẽ đóng vai trò quan trọng trong các xét nghiệm y khoa và (trong một vài trường hợp) sàng lọc di truyền để tìm kiếm các khiếm khuyết di truyền. Hàng trăm công ty hiện nay đang công bố phát triển các sản phẩm thông qua kỹ thuật di truyền các cơ thể sống. Dưới đây là các ứng dụng chính của công nghệ DNA tái tổ hợp.

1. Ứng dụng trong dược phẩm

Sản phẩm thương mại đầu tiên được phát triển bằng công nghệ DNA tái tổ hợp là các dược phẩm dùng trong điều trị các bệnh và các rối loạn di truyền. Năm 1979, Tập đoàn Eli Lilly bắt đầu sản xuất thương mại insulin người bằng công nghệ DNA tái tổ hợp. Trước thời điểm này, tất cả insulin dùng trong điều trị bệnh tiểu đường được tách chiết từ tuyến tụy của các vật nuôi cho thịt. Mặc dù nguồn insulin này có tác dụng tốt cho nhu cầu điều trị bệnh tiểu đường, nhưng nó vẫn không phải là insulin người, và một số người đã dị ứng qua các phản ứng phụ với protein ngoại lai. Gen insulin người sau đó đã được chèn vào plasmid và chuyển vào vi khuẩn sản xuất insulin người. Các dược phẩm được sản xuất thông qua công nghệ DNA tái tổ hợp bao gồm: hormone sinh trưởng người (cho trẻ em mắc bệnh còi), nhân tố tổ hợp huyết (chữa bệnh khó đông máu), hoạt tố plasminogen mô (dùng để hòa tan các huyết khối trong bệnh nhồi máu cơ tim), interferon, interleukin, DNA vaccine...

2. Các vi khuẩn công nghệ

Các vi khuẩn có vai trò quan trọng trong các quá trình công nghiệp, bao gồm sản xuất ethanol từ các nguyên liệu thực vật, lọc khoáng tự nhiên, xử lý nước thải và các loại chất thải khác. Các vi khuẩn được sử dụng trong các quá trình này được biến đổi di truyền bằng công nghệ DNA tái tổ hợp sao cho chúng có thể hoạt động hiệu quả hơn. Các chủng vi khuẩn mới hữu ích được tích lũy từ thiên nhiên này đang được phát triển phân hủy các hóa chất độc hại và các chất gây ô nhiễm, tăng cường thu giữ nitơ, tăng nitrogen cho cây trồng, và ức chế sinh trưởng của các vi khuẩn và virus gây bệnh.

3. Các sản phẩm nông nghiệp

Công nghệ DNA tái tổ hợp cũng có một vai trò quan trọng trong sản xuất nông nghiệp, nơi mà hiện nay nó được dùng để tạo ra các cây trồng và vật nuôi mang các đặc tính có giá trị. Trong nhu cầu này, các nhà nghiên cứu thực vật đã tiến hành nghiên cứu về vật chủ nhiễm bệnh virus thực vật sau đó sử dụng kháng thể để tìm kiếm các chủng mang tính miễn dịch. Vì vậy, các nhà di truyền học đã tạo ra tính kháng virus trong cây trồng bằng

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

cách chuyển các gen về protein của virus vào tế bào thực vật. Cây bí (squash) bị nhiễm di truyền có tên là Freedom II, mang các gen của virus 2 gây bệnh khảm dưa hấu (watermelon mosaic virus 2) và virus gây bệnh khảm màu vàng cây zucchini (zucchini yellow mosaic virus) chống sự nhiễm trùng virus.

Một hướng khác của biến đổi di truyền đó là tính kháng sâu (pest) thực vật nhằm giảm sự phụ thuộc vào các thuốc trừ sâu hóa học. Một protein từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* đã giới thiệu một cách chọn lọc các ưu trùng của các sâu bọ côn trùng như nhện, nhện li không gây hại cho sản phẩm của các nông vật hoang dã, ngũ cốc và các loài côn trùng khác. Gen của một phân loại vi khuẩn, liên kết với promoter hoạt động sau đó được chuyển vào trong ngô, cà chua, khoai tây và bông. Gen này đã sản xuất một protein diệt côn trùng trong cây, và sâu bọ mất khi ăn cây ăn được.

Công nghệ DNA tái tổ hợp cũng đã cho phép phát triển tính kháng chống di truyền thực vật. Một vấn đề quan trọng trong nông nghiệp là thiếu hụt dinh dưỡng, ánh sáng và chất dinh dưỡng cho cây trồng. Mặc dù chống di truyền có tác động gì đó đối với, nhưng chúng cũng có thể gây nguy hiểm cho cây trồng. Các gen cung cấp tính kháng cho nhiều loại thực vật đã được chuyển vào cà chua, dưa, bông, cây cải bắp và các cây trồng thực phẩm khác. Khi nông ruồng có cạnh tranh các cây trồng này được phun thuốc diệt cỏ, thì cần phải giới thiệu các cây trồng biến đổi di truyền để không bị ảnh hưởng. Năm 1999, đã có hơn 21 triệu ha cây trồng biến đổi di truyền và 11 triệu ha cây ngô chuyển gen được trồng trên thế giới.

Công nghệ DNA tái tổ hợp cũng được ứng dụng cho các vật nuôi. Ví dụ: gen sản xuất hormone sinh trưởng của phân loại gia súc và một ổ đòng trong *E. coli*, các vi khuẩn này sản xuất một loại hormone sinh trưởng của bò, yếu tố liên quan đến sản xuất sữa. Các nông vật chuyển gen được phát triển mang gen mã hóa cho các sản phẩm đặc biệt. Ví dụ: một gen người mã hóa cho nhân tố VIII (hình thành huyết) liên kết với vùng điều hòa của gen sản xuất -lactoglobulin của sữa, một protein trong sữa. Gen dung hợp được thêm vào phô mai, tạo ra một con cừu chuyển gen có khả năng sản xuất trong sữa của nó nhân tố đông máu của người. Một phương pháp khác để dùng chuyển gen α_1 -antitrysin, một protein dùng để ức chế nhân khí thể di truyền (hereditary emphysema), vào trong cừu. Cừu cái mang gen này sản xuất rấ nhiều α_1 -antitrysin khoảng 15g trong 1 lít sữa của chúng.

4. Thuốc oligonucleotide

Một ứng dụng công nghệ DNA tái tổ hợp trong thực tiễn gần đây đó là phát triển các thuốc oligonucleotide có trình tự phân tử DNA hoặc RNA nhân tạo ngắn có thể dùng để ức chế nhân. Các antisense oligonucleotide bổ sung cho các RNA không mong muốn, như là RNA của virus. Khi được bổ sung vào tế bào, thì các antisense DNA này liên kết với mRNA của virus và ức chế sự dịch mã của chúng.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Các DNA oligonucleotide sẽ liên kết chặt chẽ với các trình tự DNA khác, tạo thành một phân tử triplex DNA. Sự tạo thành triplex DNA cần sự liên kết của RNA polymerase và các protein khác cần cho sự phiên mã. Các oligonucleotide khác là các ribozyme, các phân tử RNA mà chức năng là các enzyme. Những phức hợp này liên kết với các phân tử mRNA đích và kết chúng thành từng đoạn, phá hủy khuôn mã hóa protein của chúng. Một số thuốc oligonucleotide đã sẵn sàng thử nghiệm trong điều trị bệnh AIDS và ung thư.

5. Liệu pháp gen

Điều trị liệu bệnh di truyền, bệnh do đột biến gen người ta phân thành cấy ghép tế bào gốc và liệu pháp gen, một hướng chữa bệnh gen liên quan với các kỹ thuật tiên tiến trong lĩnh vực công nghệ sinh học hiện nay như các vi thao tác gen, sửa chữa thay thế gen...

Liệu pháp gen (gene therapy) thực chất là phương pháp chữa bệnh bằng gen. Có nhiều khái niệm khác nhau về liệu pháp gen, nhưng cách hiểu chung nhất là tập hợp các biện pháp sử dụng các gen cần thiết (còn gọi là gen trị liệu) nhằm mục đích chữa bệnh cho con người.

Trong đó, gen trị liệu có thể là:

- Các gen hoạt động bình thường (gen lành) có thể đưa vào tế bào thay thế gen hỏng, gen mất chức năng, khôi phục hoạt động bình thường của tế bào và sản xuất các chất.

- Là những gen có khả năng mã hóa một protein đích, khi đưa vào tế bào sẽ có thể tạo nên các loại protein đích. Các loại protein đích có thể chuyển hóa các chất gen khác trong tế bào, kìm hãm khả năng phân chia của tế bào hoặc gây chết các tế bào bất thường.

- Những gen khi đưa vào tế bào hoạt động như thể với các gen bệnh (gen bất lợi trong tế bào) làm hạn chế tác động của gen bệnh hoặc ức chế, bù đắp cho các gen bệnh.

- Gen trị liệu còn là các gen bất hoạt đưa vào tế bào thay thế cho một gen lành nào đó, nhằm hạn chế sản phẩm không cần thiết của gen lành hoặc tạo ra cho tế bào một trạng thái mới, có tác động ngăn ngừa bệnh tật.

- Gen trị liệu có thể là những đoạn oligonucleotide có tác động kìm hãm hoạt động của gen bệnh, bất lợi trong tế bào.

6. Chọn lọc bệnh nhân cấy ghép

Bằng kỹ thuật hiện đại, kết hợp những thí nghiệm phân tích máu bệnh nhân cấy ghép, người ta có thể chọn lọc bệnh nhân cấy ghép khi sinh (vì enzyme hiện có khả năng phân biệt các gen bất lợi với gen bình thường). Các đoạn DNA cần tra, cần phân tách qua phương pháp in situ, đem lại với các mẫu dò DNA hoặc RNA đã đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ ^{32}P hoặc huỳnh quang. Những phóng xạ tự ghi hoặc tín hiệu huỳnh quang cho ta

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

thực các phân tử DNA tái lai với các mẫu dò. Các phân tử này được tách ra nghiên cứu và xác nhận bằng hình ảnh bằng enzyme hạn chế, vì mỗi phân tử di truyền có những vị trí dành cho enzyme hạn chế.

Ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử trong lĩnh vực này có nhiều thuận lợi như các phương pháp kinh điển. Thứ nhất, có thể rút ngắn các thời gian như ứng dụng kỹ thuật PCR, chẩn đoán bệnh HIV-1, dùng phương pháp PCR chẩn đoán bệnh sốt rét, nuôi cấy các phân tử sinh học phân tử. Thứ hai, vì các tác nhân gây bệnh khó nuôi cấy hay không thể nuôi cấy thì kỹ thuật sinh học phân tử là giải pháp duy nhất, chẳng hạn *Chlamydia*, *Brucella*, viêm gan B,... Thứ ba, việc tổng hợp gen dùng làm probe để nghiên cứu sự xuất hiện kháng thể, hoặc sử dụng probe để phát hiện các kiểu huyết thanh (serotype) của tác nhân gây bệnh, điều mà chẩn đoán kháng thể không thể làm được. Cuối cùng, sự xuất hiện của các phân tử (quan sát dưới kính hiển vi, nuôi cấy trên môi trường, miễn dịch học...) thì hình thành chẩn đoán sinh học phân tử chính xác hơn kỹ thuật (lai phân tử hoặc PCR).

Ứng dụng các tác nhân là virus, các kỹ thuật lai phân tử và PCR cho phép chẩn đoán nhiều nhóm như papillomavirus, HBV, HIV. Các kỹ thuật lai phân tử còn cho phép xác định vị trí virus trên lát cắt sinh thiết.

Ứng dụng các tác nhân vi khuẩn, cũng có nhiều kỹ thuật chẩn đoán sinh học phân tử thông minh như: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium pneumoniae*, *Salmonella*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*...

Ứng dụng các tác nhân ký sinh trùng, ứng dụng cũng đã thành công trong chẩn đoán *Plasmodium*, *Schistosoma*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Leishmania*... bằng lai phân tử. Phương pháp PCR còn cho phép phát hiện tác nhân ngay trong vật trung gian truyền bệnh.

7. DNA fingerprinting

Sở dĩ các trình tự DNA nhận dạng mẫu người, cũng gọi là DNA fingerprinting, là một công cụ rất mạnh mẽ để khảo sát tội phạm và các ứng dụng pháp lý khác.

Trong một ứng dụng thực tế, DNA fingerprinting có thể được sử dụng để xác định một số nghi ngờ về hình ảnh của người gây án. Mẫu DNA của máu, tóc, tinh dịch hoặc mô của các thủ phạm bị nghi ngờ. Nếu mẫu là rất nhỏ, phương pháp PCR có thể được sử dụng để khuếch đại DNA, sẵn sàng cho việc kiểm tra. Các mẫu DNA bổ sung được thu thập từ những nghi can khác.

Một mẫu DNA được cắt với một hoặc nhiều RE, và kết quả các phân tử DNA được phân tách bằng điện di. Các phân tử trên gel được biến tính và chuyển lên màng nitrocellulose bằng phương pháp Southern (blot). Một hoặc nhiều probe (được đánh dấu phóng xạ) sau đó được lai với màng nitrocellulose và được phát hiện bằng phương pháp phóng xạ tự phát. Khi sử dụng các trình tự DNA mẫu được thu thập bị nghi ngờ sau đó được so sánh với các trình tự DNA của những nghi can.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Các probe được dùng trong DNA fingerprinting phát hiện các vùng thay đổi cao của genome, vì thế chỉ DNA từ hai người sản xuất chính xác cùng một kiểu bệnh là rất thấp. Khi một số probe được dùng trong phân tích, thì xác suất mà hai người có cùng một tập hợp các kiểu bệnh như không có (trừ khi họ là các anh em sinh đôi cùng trứng).

Muốn khám phá những hiện tượng và nghi can có thể cung cấp bằng chứng rằng nghi can có một tập hiện tượng vấn.

Probe được dùng phổ biến nhất trong DNA fingerprinting bổ sung cho các trình tự lặp lại ngắn được tìm thấy rải rác trong genome người. Con người khác nhau rất nhiều về số lượng bản sao của các trình tự lặp lại này; vì vậy, các dạng hình này được gọi là số lượng biến thiên của các đơn vị lặp lại (VNTRs).

DNA fingerprinting cũng cung cấp thông tin về mối quan hệ huyết thống và các nguồn khác. Ví dụ: DNA fingerprinting được dùng xác nhận một số mẫu vi khuẩn gây bệnh than (anthrax) gây bệnh bùng nổ gần đây khác trong năm 2001 tại các là một nguồn.

8. *Lpbn gen*

Một đóng góp có ý nghĩa của công nghệ DNA tái tổ hợp là cung cấp một loạt các marker (chức năng) di truyền được dùng trong *lpbn gen*. Một nhóm trong số các marker được dùng trong *lpbn gen* đó là restriction fragment length polymorphism (RFLP). RFLP là một biến dị đa hình trong các kiểu của các đơn DNA được tạo ra khi phân cắt DNA bằng cùng một enzyme hạn chế. Nếu DNA từ hai người cắt bằng cùng một enzyme và kiểu của các đơn DNA khác nhau được tạo ra, thì hai người này phải có sự khác nhau về các trình tự DNA của họ. Những sự khác nhau này được di truyền và có thể được dùng trong *lpbn gen*, để phát hiện những người mà trong đó có sự khác nhau về allele được dùng trong *lpbn gen* các gen thông thường.

Theo truyền thống, *lpbn gen* được dựa vào việc sử dụng các sai khác di truyền tạo ra những sai khác kiểu hình có thể quan sát được. Đáng tiếc là do những tính trạng biến dị của gen và môi trường, nên số lượng các tính trạng có các sai khác di truyền nên thích hợp cho việc sử dụng *lpbn gen* bị giới hạn. RFLP cung cấp một số lượng lớn các marker di truyền có thể được dùng trong *lpbn gen* của sinh vật.

Tài liệu tham khảo/ thêm

1. Dale JW and Von Schantz M. 2002. From Gene to Genome. *John Wiley & Sons, Ltd.* West Sussex, UK.

2. Erlich HA. 1989. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. *Stockton Press*, New York, USA.

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

3. Glick BR and Pasternak JJ. 2003. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. 3rd ed. ASM Press, USA.

4. Lewin B. 2000. Gene VII. Oxford University Press, Oxford, UK.

5. Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J. 1989. Molecular Cloning-A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.

6. Primrose SB, Twyman R and Old RW. 2001. Principles of Gene Manipulation. 6th ed. Blackwell Science, Oxford, UK.

7. Rapley R and Walker JM. 1998. Molecular Biotechnology Handbook. Humana Press Inc. New Jersey, USA.

8. Surzycki S. 2000. Basic Techniques in Molecular Biology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.

9. Walker JM and Rapley R. 2000. Molecular Biology and Biotechnology. Chapman & Hall Limited, London, UK.

¹Ch t t y làm bi n i b m t t bào gi i phóng các thành ph n t bào ra môi tr ãng bên ngoài.

²YAC (yeast artificial chromosome): Nhi m s c th nhân t o c a n m men.

³S thoái bi n (suy bi n) c a mã di truy n (degeneracy): Bình th ãng có th có 64 t h p b ba mã hóa khác nhau c a 4 nucleotide trong khi ó ch có 20 amino acid ph bi n và m t amino acid l i có th có nhi u b ba mã hóa.

Ph l c

M t s thu t ãng c b n

Adenine (A). M t trong b n nitrogen base có trong thành ph n c a DNA và RNA, b t c p v i thymine (T) trên DNA và v i uracil (U) trên RNA. Adenine c ãng có trong thành ph n c a m t s coenzyme.

Adenosine diphosphate (ADP). M t ribonucleoside 5'-diphosphate c c u t o t adenine, ãng ribose (5C) và hai g c phosphate. ADP có tác d ãng nh n phosphate trong chu trình n ãng l ãng c a t bào.

Adenosine triphosphate (ATP). M t ribonucleoside 5'-triphosphate c c u t o t adenine, ãng ribose (5C) và ba g c phosphate. ATP là phân t ch a n ãng l ãng hóa h c chính c a t bào, ch y u c t p h p trong ty th (mitochondria) và l p th (chloroplast). Các g c phosphate c a ATP có mang các liên k t khi b th y phân s phóng thích m t n ãng l ãng t do l n. N ãng l ãng c a quá trình hô h p ho c quang h p c s d ãng t o thành ATP t ADP. Sau ó, ATP c bi n ãng c tr l i thành

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

ADP ở những vùng khác nhau của tế bào, nên luôn phóng thích ra các dùng để sử dụng khi cần các phản ứng hóa sinh trong tế bào. Đôi khi cũng xảy ra sự thủy phân tiếp ADP thành những AMP (adenosine monophosphate) phóng thích nên luôn sử dụng.

Allele. Một trong những dạng khác nhau của một gen chỉ một một locus xác định trên nhiễm sắc thể. Các allele khác nhau của một gen có trình tự các nucleotide khác nhau, cùng liên quan đến một tính trạng của tế bào hoặc cơ thể. Ví dụ: trong thí nghiệm lai của Hà Lan của Mendel, màu vàng và màu xanh của hạt đậu là hai allele của gen quy định màu sắc hạt. Cá thể dị hợp là những hợp tử của một gen khi hai allele có gì khác nhau, và dị hợp là đồng hợp tử khi hai allele có khác nhau. Những trạng thái đồng hợp tử (allele trội) thường là những allele trội còn allele lặn. Allele quy định những trạng thái bình thường là trội, trong khi các allele đột biến thường là lặn.

Amber codon. Là một trong ba codon (mã ba UAG) kết thúc một trình tự của mRNA trong sinh tổng hợp protein.

Amino acid. Là một phân tử mang một gốc amine ($-NH_3$) và một gốc carboxyl ($-COOH$) liên kết với cùng một nguyên tử carbon. Amino acid là những đơn vị cấu tạo của chuỗi polypeptide. Có 20 amino acid khác nhau trên các chuỗi polypeptide có trong tự nhiên. Trình tự sắp xếp của các amino acid trên chuỗi polypeptide quyết định cấu trúc và chức năng của polypeptide và protein mà nó tạo thành.

Aminoacyl-tRNA (aminoacyl-tRNA). Một ester giữa aminoacyl và tRNA tổng hợp của amino acid.

AMP vòng (cyclic AMP, cAMP). Là một phân tử AMP mà trong đó gốc phosphate liên kết với vị trí 3' và 5' của đường ribose. cAMP là thông tin thứ hai trong tế bào. Sự tạo thành cAMP (xúc tác bởi enzyme adenylate cyclase) kích thích những phản ứng hormone.

Ampicillin (Amp). Chất kháng sinh bán tổng hợp được dùng trong môi trường chọn lọc chọn các tế bào mang đột biến khuyết đoạn hoặc chọn dòng tế bào (tái tổ hợp) mang plasmid DNA của tế bào.

Antisense. Trình tự không mã hóa của một phân tử DNA sợi đơn. Chuỗi ngược (chuỗi ngược chiều) bổ sung với mRNA và làm khuôn mẫu cho sự tổng hợp mRNA.

Antisense molecule. Là một phân tử gắn kết với DNA hoặc mRNA làm dừng quá trình phiên mã hoặc dịch mã. Những phân tử này có nguồn gốc từ DNA và RNA.

Át ch (epistasis). Tác động tổng hợp giữa các gen khi một gen che lấp biểu hiện kiểu hình của một gen không allele với nó.

ATP-ase. Enzyme thủy phân ATP thành ADP và phosphate, thường phát hiện và sử dụng năng lượng.

ATP-synthetase. Enzyme tổng hợp ATP từ ADP và phosphate trong quá trình phosphoryl oxy hóa (oxidative phosphorylation) màng trong của ty thể.

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Baculovirus. Lo i virus c bi t gây nhi m các t bào côn trùng và t o ra các th vùi l n trong các t bào b nhi m.

B n c t h n ch (restriction map). Trình t các v trí nh n bi t (recognition sites) c a t t c các enzyme h n ch (restriction enzyme hay restriction endonuclease, RE) trên m t phân t DNA.

B n di truy n (genetic map). S v trình t s p x p c a các c ut di truy n và kho ng cách t ng i gi a chúng trên nhi m s c th (eukaryote) ho c trên s i DNA (prokaryote). N u các c ut ó là các gen trên nhi m s c th và kho ng cách gi a chúng c xác nh b ng t n s trao i chéo thì ó là b n nhi m s c th hay b n liên k t gen. N u các c ut là các i m b t bi n bên trong gen và kho ng cách gi a chúng c ng c xác nh b ng t n s trao i chéo gi a các i m nói trên thì ó là b n gen. N u các c ut di truy n là các i m có th b c t b i enzyme h n ch trên phân t DNA thì g i là b n c t h n ch (restriction map). Xem b n c t h n ch .

Baz ng ng (analog base). Ch t hóa h c có c u trúc phân t r t gi ng các base bình th ng c a DNA. Chúng có th thay th các nitrogen base bình th ng trong DNA và ho t ng nh m t tác nhân t bi n. Trong l n sao chép ti p theo c a DNA, base ng ng có th b t c p sai v i m t base bình th ng, t o nên t bi n i m. Ví d : base ng ng c a adenine (A) là 2-aminopurine (AP) có th g n vào DNA v trí c a adenine; trong l n sao chép ti p ó có th b t c p v i cytosine (C), trong l n sao chép ti p theo n a C k t c p v i guanine (G). Nh v y ã đi n ra s thay th c p A-T b ng c p G-C.

Baz nit (nitrogen base). Lo i phân t c ut o nên nucleic acid (DNA và RNA). Các nitrogen base có trong nucleic acid là adenine, guanine, cytosine và thymine (trong phân t DNA) ho c uracil (trong phân t RNA). Trình t s p x p c a chúng d c theo phân t nucleic acid ã t o nên thông tin di truy n c a c th sinh v t.

B t c p b sung (complementary base pairing). S k t h p thành t ng ôi gi a các nitrogen base n m trên hai m ch n c a chu i xo n kép DNA-DNA, DNA-RNA ho c RNA-RNA thông qua các m i liên k t hydrogen. S b t c p ó mang tính c hi u: guanine b t c p v i cytosine, còn adenine b t c p v i thymine trên DNA ho c uracil trên RNA.

Bi n i h u d ch mã (post-translational modification). S thay i các liên k t hóa tr x y ra trong chu i polypeptide, sau khi chu i polypeptide tách kh i ribosome và tr c khi tr thành protein ho t ng th c s .

Bi n i mRNA (mRNA processing). Quá trình t o thành mRNA hoàn ch nh (mature mRNA) ho t ng ch c n ng t s n ph m phiên mã s c p là mRNA ti n thân ch a hoàn ch nh (pre-mRNA). Trong quá trình này các o n intron b lo i b và các o n exon c n i l i v i nhau.

Bi n n p (transformation). Là quá trình truy n DNA ngo i lai vào m t t bào nh n, ch ng h n sphaeroplast ho c protoplast, và có th h p nh t trong nhi m s c th nh

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

là tái tổ hợp tế bào nguyên sinh hoặc các bào tử trong môi trường sao chép tự trị (autonomous replicon). Sự nhân bản có thể xuất hiện trong các vi khuẩn tự nhiên như vi khuẩn (ví dụ: *Bacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria* và *Streptococcus*), nấm men và vi khuẩn (ví dụ: *E. coli*) và các thực thể sinh vật eukaryotes nhân bản cũng có thể xuất hiện như một bào "thể" của DNA bằng các phương pháp nhân tạo như: hóa nhân bản, nhân bản...

Biến tính (denaturation). Là hiện tượng chuyển đổi dạng mạch kép sang dạng mạch đơn của DNA và RNA thông do nhiệt gây nên. Biến tính của protein là hiện tượng chuyển đổi cấu hình không gian thành dạng không gian.

Biểu hiện của gen (gene expression). Là các quá trình phiên mã (transcription) và dịch mã (translation) của một gen tạo ra sản phẩm protein của nó.

Bộ khung (backbone). Thuộc về cấu trúc chuỗi xoắn của khung phosphate trong phân tử DNA mạch kép.

Cảm ứng (induction). Liên quan đến kích thích hoạt động của enzyme (sản phẩm của gen) vì khi có mặt chất (substrate) của các enzyme này trong môi trường. Khi sử dụng cho khái niệm hòa tan biểu hiện của gen, thì có nghĩa là sự kích thích quá trình phiên mã do tác động của một chất cảm ứng (inducer) và protein hòa tan. Ví dụ: trong hệ operon lac của *E. coli*, lactose đóng vai trò chất cảm ứng có tác động lên operon các gen trong operon hoạt động (phiên mã và dịch mã).

CAP (catabolite gene activator protein). Protein hoạt hóa gen dị hóa. Một protein hòa tan của vi khuẩn, kiểm soát sự khởi đầu phiên mã các gen sản xuất các enzyme cần thiết cho một tế bào, có thể sử dụng như "thể" khác khi không có mặt của glucose.

Cặp bazơ (base pair, bp). Là liên kết A-T hoặc C-G trên một phân tử DNA mạch kép, và là đơn vị đo chiều dài của một phân tử DNA.

Cấu trúc bậc một (primary structure). Bao gồm trình tự các amino acid và những cầu nối disulfide trong chuỗi hoặc giữa các chuỗi polypeptide. Trong hệ nucleic acid, đó là trình tự của các nucleotide trên một chuỗi DNA hoặc RNA của nó và với nhau như liên kết phosphodiester.

Cấu trúc bậc hai (secondary structure). Là sự liên hệ giữa amino acid tương ứng (ở đầu N) và tương ứng (ở đầu C) của một phân tử protein. Cũng như vậy, trên một trình tự nucleic acid là sự liên hệ giữa nucleotide tương ứng (ở đầu 5') và tương ứng (ở đầu 3') của một chuỗi DNA.

Cấu trúc bậc ba (tertiary structure). Cấu trúc ba chiều đặc trưng của phân tử protein hoặc chuỗi polynucleotide.

Cấu trúc bậc bốn (quaternary structure). Cấu trúc ba chiều của một protein có nhiều tiểu đơn vị (subunit), theo kiểu mà những tiểu đơn vị kết hợp với nhau.

Cầu disulfide (disulfide bridge). Liên kết cộng hóa trị tạo thành giữa hai chuỗi polypeptide qua trung gian của một gốc cysteine.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Chức năng sao chép (replication fork). Cấu trúc hình chữ Y hình thành khi phân tử DNA mạch kép dẫn xoắn lại ra hai sợi làm khuôn mẫu cho tổng hợp DNA (s tái bản).

Chất cảm ứng (inducer). Một hợp chất hóa học hoặc một tác nhân của môi trường có tác động xúc tiến quá trình phiên mã operon của vi khuẩn hoặc các phân tử có tác động ngược lại ngăn cản các enzyme trong trao đổi chất.

Chất dị nhiễm sắc (heterochromatin). Bao gồm các vùng của hệ gen thường xuyên trong trạng thái cô đặc và không bị ức chế di truyền. Trạng thái này có thể vô hiệu hoặc bất hoạt.

Chất nhiễm sắc (chromatin). Hợp chất DNA và protein trong nhân giai đoạn giữa của quá trình phân bào. Trong giai đoạn này không thể phân biệt trạng thái riêng lẻ. Tên gọi này bắt nguồn từ phản ứng với các màu nhuộm đặc trưng cho DNA của hợp chất.

Chất nhiễm sắc thường (euchromatin). Chất nhiễm sắc chứa nhiều gen đang phiên mã.

Chất ức chế (repressor). Sản phẩm protein của một gen ức chế nằm trong thành phần operon, có tác động bám vào vùng điều khiển của operon làm đóng operon lại, do đó quá trình phiên mã không bắt đầu và tắt các gen cấu trúc (gen mã hóa) trong operon xuống. Ví dụ: gen lacI.

Chromosome walking. Kỹ thuật này dùng lặp lại nhiễm sắc thể để tiếp cận các đoạn DNA chồng lấn lên nhau (overlapping). Bắt đầu từ một điểm trong đó các đoạn DNA nối liền nhau. Một đoạn DNA mang một gen đã biết sẽ lai chéo và sử dụng như một probe để tìm kiếm (ví dụ: bằng cách lai khuếch đại) các đoạn khác, là các đoạn chồng lấn lên nhau chứa cùng một gen. Sau đó, trình tự nucleotide của các đoạn này sẽ được phân tích và nhúng để xác định các đoạn của nhiễm sắc thể. Thông thường, bản đồ của một vùng cụ thể sẽ được xây dựng dần dần.

Chu trình sinh tan (lytic cycle). Một kiểu chu trình sống của thực khuẩn thể (bacteriophage) khi nó xâm nhiễm vi khuẩn, ngay khi nhận các host sống và sinh tổng hợp các gen của nó và sinh ra các bacteriophage thế hệ con, chui ra khỏi tế bào vi khuẩn sau khi phá vỡ tế bào.

Chu trình tiềm tan (lysogenic cycle). Là hiện tượng hệ gen của bacteriophage ẩn đi trong trạng thái tiềm tan và không sinh tan trong tế bào vật chủ sống của nó. Các tế bào vật chủ có thể tiếp tục sinh trưởng và phân chia, và sao chép của hệ gen bacteriophage (prophage) tích hợp với nhiễm sắc thể vật chủ sao cho khi tế bào phân chia thì prophage cũng chuyển vào trong hai tế bào con. Prophage chỉ duy trì bằng cách hợp nhất trong nhiễm sắc thể vật chủ (ví dụ: bacteriophage λ , bacteriophage 105) hoặc như là một plasmid bên ngoài nhiễm sắc thể (ví dụ: ϕ 80).

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

bacteriophage P1 và bacteriophage F116). Tế bào vật chủ có thể hoặc không thể biểu hiện ra một kiểu hình bất kỳ.

Chuỗi contig (contiguous sequence). Một đoạn trình tự dài liên tục hình thành từ một số các đơn phân liên tiếp chồng lên nhau (overlapping).

Chuỗi khảm (concatemer). Phân tử DNA bao gồm nhiều đơn cá biệt nối với nhau thông qua các đầu dính.

Chuỗi mã hóa (coding sequence). Đơn phân tử DNA mang mã di truyền xác định phiên mã thành mRNA và sau đó dịch mã thành chuỗi polypeptide.

Chuyển gen (transgenic). Quá trình chuyển một đoạn DNA ngoại lai (foreign DNA) bằng các kỹ thuật khác nhau (*Agrobacterium*, vi tiêm, biến gen, xung điện...) vào một tế bào vật chủ (ví dụ sinh vật, động vật hoặc thực vật).

Cistron. Thuật ngữ cũ, là một đơn vị của DNA tương ứng với một gen mã hóa một chuỗi polypeptide hoặc một phân tử RNA.

Cordycepin. Là 3' deoxyadenosine, một chất tương tự của polyadenine hóa (polyadenylation) của RNA.

Corepressor. Là một phân tử nhỏ kích hoạt sự tìm kiếm gen trong khi giải mã bằng cách gắn chặt với một protein điều hòa.

Cosmid. Vector lai (hybrid vector) được cấu thành từ các đơn trình tự của plasmid và các vị trí *cos* (đầu dính) của bacteriophage.

Cytosine (C). Base pyrimidine có trong DNA. Trên DNA mặt cặp cytosine bắt cặp với một base purine là guanine (G).

D-loop. Vùng DNA ty thể nhân đôi có một đơn phân RNA bắt cặp vào thay thế phần mặt nhân DNA nguyên thủy này.

Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP). Tiền chất để được triphosphoryl hóa ("nâng lên cao") cần thiết cho quá trình tổng hợp DNA. Nó ký hiệu cho một trong bốn nitrogen base (A, G, T hoặc C).

Deoxyribonuclease (DNase). Loại enzyme nuclease thủy phân (phân hủy) DNA sợi đôi hoặc DNA sợi đơn.

Deoxyribonucleic acid (DNA). DNA là đại phân tử sinh học có cấu trúc xoắn đôi, tồn tại chủ yếu trong nhân tế bào, trên các nhiễm sắc thể, mang thông tin di truyền của sinh vật. Phân tử DNA gồm hai chuỗi polynucleotide, chuỗi xoắn quanh chuỗi kia tạo nên chuỗi xoắn kép. Trong các nucleotide, theo chiều dọc các gốc phosphate nối xen kẽ với các phân tử đường deoxyribose tạo nên bộ khung bên ngoài của chuỗi xoắn kép, theo chiều ngang mỗi phân tử đường kết hợp với một trong bốn nitrogen base: adenine, guanine, cytosine hoặc thymine.

DNA không trực tiếp thể hiện chức năng sinh học mà gián tiếp qua protein do nó mã hóa. DNA tạo RNA, RNA tạo protein. RNA cũng là acid nhân (nucleic acid). Nó có

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

thành phần cấu tạo khác gì với DNA, ngoài trình tự các thymine (T) trong DNA còn thay thế bằng các uracil (U), và RNA được tổng hợp không phải được xoắn kép như DNA.

Quá trình sao mã di truyền xảy ra trong DNA để tổng hợp protein gọi là sao phiên mã (transcription) tạo ra RNA mang thông tin di truyền là mRNA (messenger RNA). mRNA kết hợp với các thành phần trong tế bào là ribosome để tạo ra protein trong quá trình dịch mã (translation). Quá trình trên được gọi là quá trình sinh học cơ bản.

Năm 1962, Watson (Mỹ) và Crick (Anh) đã chia sẻ Giải Nobel với Wilkins (Anh) vì phát minh ra cấu trúc không gian của DNA và ý nghĩa của nó trong việc truyền thông tin di truyền. Trước đây là Franklin, người đã có những đóng góp đáng kể cho phát minh này mà tiếc là cô đã qua đời. Theo quy định thì Giải Nobel không được phép tặng cho người đã qua đời.

Deoxyribose. Phân tử đường có trong thành phần của DNA.

D polymer (heteropolymer). Một polymer bao gồm các loại monomer khác nhau. Phân tử protein và nucleic acid là dị polymer.

Dị chủng (heterologous). Các trình tự gen không giống nhau hoàn toàn mà chỉ giống nhau một phần nào đó.

Dịch chuyển nick (nick translation). Phương pháp đánh dấu DNA bằng phóng xạ [α - 32 P]dCTP nhờ enzyme DNA polymerase I của *E. coli*.

Dịch mã (translation). Tổng hợp protein trên khuôn mRNA. Quá trình chuyển thông tin di truyền trong trình tự base của mRNA sang trình tự amino acid của chuỗi polypeptide trong tế bào còn gọi là quá trình sinh tổng hợp protein.

Dịch mã gián đoạn (hybrid-arrested translation). Kỹ thuật mà trong đó sao mã của một phân tử mRNA bị dừng (trong hệ thống sao mã *in vitro*) bằng cách sử dụng sự hình thành phức hợp của mRNA với một phân tử RNA (antisense RNA) hoặc DNA (ví dụ: cDNA) bổ sung.

Dịch mã ngược (reverse translation). Là kỹ thuật phân lập các gen như khi nào chúng trong vị trí lai với một oligonucleotide nào đó, oligonucleotide này sẽ chuyển ngược cách đọc của mã nucleic acid thành oligonucleotide mã hóa của protein bị dừng.

Dideoxynucleotide triphosphate (ddNTP). Một phân tử dNTP dùng để ức chế tổng hợp chuỗi DNA trong các thí nghiệm xác định trình tự gen (sequencing).

Dimer. Là một phân tử được tạo ra từ hai phân tử đồng phân như khi hai phân tử thì gặp đôi so với phân tử nguyên thủy.

DNA bổ sung (complementary DNA, cDNA). DNA được tổng hợp trên khuôn mẫu mRNA như quá trình sao phiên mã ngược (reverse transcription). Do vậy, nó có trình tự ngược với các nucleotide bổ sung với trình tự các nucleotide trên mRNA. Ví dụ: trên mRNA trình tự là UUGAAG thì trên các DNA bổ sung sẽ có trình tự ngược lại là AACTTC. DNA bổ sung được tổng hợp tự nhiên trong chu trình sống của virus mang vật chất di truyền là RNA. Ví dụ: HIV, virus cúm và các retrovirus nói chung. DNA bổ sung

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

c t ng h p nhân t o trong các phòng thí nghi m xây d ng th vi n cDNA (cDNA library).

DNA cu n ng c (foldback DNA). DNA có các o n xuôi ng c gi ng nhau (palindrome) ho c các o n l p l i o ng c (inverted repeats) nên có th nhanh chóng g n k t tr l i sau khi chu i xo n kép DNA bi n tính.

DNA khuôn m u (template DNA). S i DNA mà trình t các nucleotide c a nó c dùng làm khuôn m u t ng h p nên s i DNA m i trong quá trình tái b n (sao chép) ho c khu ch i DNA (PCR) ho c t ng h p nên s i RNA m i trong quá trình phiên mã.

DNA polymerase. Enzyme t ng h p b n sao DNA trên khuôn m u DNA b ng cách xúc tác ph n ng g n t ng nucleotide riêng bi t vào u chu i DNA ang c t ng h p. N m 1959, hai nhà khoa h c ng i M là Kornberg và Ochoa ã c nh n Gi i Nobel v nh ng nghiê n c u ã làm sáng t c ch c b n c a quá trình sao chép DNA liên quan n DNA polymerase I.

DNA replicase. Ph c h p enzyme và protein c hi u, c n thi t cho s tái b n DNA.

DNA siêu xo n (supercoiled DNA). DNA xo n l i trên b n thân nó, th ng là k t qu c a s g p khúc, m xo n ho c xo n l i c a chu i xo n kép DNA.

DNA v tinh (satellite DNA). Là nh ng o n DNA mang các trình t l p l i n i ti p có thành ph n khác v i tr s trung bình c a DNA h gen. DNA v tinh t o thành b ng theo gradient t tr ng và d dàng phân bi t v i b ng c a ph n l n DNA h gen do DNA v tinh có t tr ng nh h n. B n sao c a DNA v tinh l p l i hàng tri u l n trong h gen, t p trung ch y u vùng tâm ng và hai u c a nhi m s c th .

Dòng (clone). T p h p các t bào ho c phân t gi ng h t nhau cùng b t ngu n t m t t bào hay phân t ban u.

Dòng phôi (germ line). Các t bào có ch c n ng sinh s n, t ó sinh ra tr ng và tinh bào.

Dot blot. Là k thu t trong ó các v t tròn nh (ho c các i m) có ch a nucleic acid c t lên màng nitrocellulose ho c nylon lai v i o n m i DNA có ánh d u ng v phóng x .

a cistron (polycistronic). Phân t RNA mã hóa nhi u ch c n ng. Nhi u operon vi khu n c bi u hi n thông qua các mRNA a cistron.

a hình dài các o n c t h n ch (restriction fragment length polymorphism, RFLP). Tính a hình chỉ u dài các o n c t h n ch ch các sai bi t di truy n v trí nh n bi t c a các enzyme h n ch (ch ng h n nh do s thay i m t nucleotide) d n n s sai bi t trong chỉ u dài c a các o n hình thành t ph n ng c t

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

hình ch DNA và cùng một enzyme. RFLP thường dùng để phân tích các di truyền và các marker di truyền bất thường.

đơn phân tử (macromolecule). Một phân tử có khối lượng khoảng vài nghìn tới vài triệu.

đánh dấu đầu (end labelling). Bổ sung phân tử phóng xạ vào đầu của một polynucleotide như enzyme T4 polynucleotide kinase.

đuôi (blunt end). Các đầu của DNA sợi đôi không có các đầu 3' hoặc 5' (protruding ends).

đỉnh (cohesive ends hoặc sticky ends). Các đầu của phân tử DNA có các trình tự bổ sung ngắn có thể dính kết lại với nhau. Các đầu dính thường do các enzyme hình thành.

đuôi C (C terminus). Nhóm carboxyl (COOH) thường ở vị trí cuối của một phân tử protein hoặc chuỗi polypeptide.

đuôi N (N terminus). Nhóm amine (NH₂) thường ở vị trí đầu của một phân tử protein hoặc chuỗi polypeptide. Tất cả các polypeptide đều có đầu N này, nhưng carboxyl cuối.

đứt (nick). Đứt gãy một sợi trên DNA sợi đôi.

điểm nóng (hot spot). Vị trí của gen có xu hướng bị biến đổi nhiều hơn so với các vị trí khác trên phân tử DNA.

đi trên gel (gel electrophoresis). Kỹ thuật dùng để phân tách các phân tử nucleic acid hoặc protein dựa vào sự di chuyển của chúng trên giá thể agarose hoặc polyacrylamide dưới ảnh hưởng của điện trường. Sự di chuyển của các phân tử này phụ thuộc vào điện tích, kích thước và khối lượng phân tử của nucleic acid hoặc protein trong dung môi và nồng độ chất dùng làm giá thể.

điều hòa hoạt động gen (gene operation regulation). Điều kiện sinh học ảnh hưởng đến các gen trong quá trình phát triển cá thể, mở đường cho các gen hoạt động thì ức chế, và do vậy quá trình phát triển cá thể diễn ra bình thường. Mô hình operon của Monod và Jacob là cơ chế điều hòa hoạt động gen điển hình.

đánh dấu (capping). Nhóm nucleotide guanine (G) thường được methyl hóa (cái “m”) vào đầu 5' của phân tử mRNA tiền thân (pre-mRNA) sinh vật eukaryote, cái “m” sau đó gắn liền với phân tử mRNA hoàn chỉnh (mature mRNA).

độc nhất (unique sequence). Các đoạn DNA chỉ có một hoặc một vài bản sao trong hệ gen.

đoạn Klenow (Klenow fragment). Còn gọi là đoạn I của DNA polymerase I. Đây là một đoạn của DNA polymerase I (khối lượng phân tử 76.000) của *E. coli* đã bị mất hoạt tính exonuclease 5'→3'.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

o n l p l i o n g c (inverted repeats). Hai o n DNA ng nh t, trên hai h ng ng c nhau cùng m t phân t . S l p l i nh v y s t o ra hi n t ng palindrome.

o n l p l i cùng chi u (direct repeats). Là nh ng chu i mã di truy n ng nh t i di n cho m t ho c hai b n sao theo cùng m t h ng c a m t phân t DNA.

o n Okazaki (Okazaki fragment). Các o n DNA s i n t ng i ng n l n l t c t ng h p trong quá trình sao chép (tái b n) DNA theo ki u gián o n d c theo m t trong hai s i khuôn, trong khi d c theo s i khuôn kia thì m ch DNA m i c t ng h p liên t c. Sau ó, các o n Okazaki c n i l i n v i nhau b ng các m i liên k t ng hóa tr nh enzyme ligase.

o n x p (nested fragments). M t lo t các o n nucleic acid có chi u dài ch khác nhau m t ho c m t vài nucleotide.

o n xuôi ng c gi ng nhau (palindrome). o n DNA m ch kép có trình t s p x p các base trên hai m ch n gi ng h t nhau n u cùng c c theo m t chi u (ch ng h n 5'→3'). Ví d : các o n nh n bi t c a enzyme h n ch .

óng d u (replica plating). Ph ng pháp chuy n nguyên m u các khu n l c ho c v t tan t m t a th ch g c sang a th ch m i b ng cách dùng màng nylon (ví d : màng Hybond-N+) v a khít áp lên m t th ch c a a g c d i nh l y các t bào trong các khu n l c (colony) ho c v t tan (plaque) c a a g c, r i a màng này áp lên m t th ch m i.

n cistron (monocistron). M i mRNA monocistron ch mã hóa cho m t protein eukaryote.

n v phiên mã (transcriptional unit). o n DNA mã hóa cho phân t RNA, b t u t i m kh i u phiên mã n i m k t thúc phiên mã, nó có th dài h n m t gen.

n v sao chép (replicon). o n DNA b t u t i m kh i u sao chép kéo dài v hai phía t i hai i m k t thúc sao chép.

n v tái t h p (recon). o n DNA c a gen có chi u dài ng n s trao i chéo không th di n ra bên trong nó c n a. Hi n nay, c bi t ó là m t c p nucleotide.

c tính (virulence). Kh n ng c a các bacteriophage gây tan t bào vi khu n ch khi chúng xâm nhi m vào.

i mã (anticodon). Là m t o n g m ba nucleotide trên tRNA b t c p v i c m mã (codon) trên mRNA theo nguyên t c b sung.

ng polymer (homopolymer). M t polymer ch bao g m m t lo i monomer, ch ng h n nh polyphenylalanine (protein) ho c polyadenine (nucleic acid).

t bi n (mutation). Bi n i trong trình t các base c a DNA. Có th c gây nên b i chèn o n, m t o n ho c có các base b s a i.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

t bi n d ch khung (frameshift mutation). t bi n làm m t ho c thêm m t c p base trong gen d n t i h u qu làm d ch khung d c bình th ng c a mRNA i m t nucleotide. Do v y, làm thay i toàn b thông tin di truy n o n gen b t u t i m x y ra t bi n n cu i gen.

t bi n ng hoán (transition mutation). Ki u t bi n thay th m t c p base purine-pyrimidine này b ng m t c p base purine-pyrimidine khác t i m t i m trên DNA. Ví d : thay c p GC b ng c p AT ho c ng c l i.

t bi n gen (gene mutation). Còn g i là t bi n i m, x y ra do nh ng bi n i c a t ng nucleotide nh : m t, thêm hay thay i v trí c a nucleotide trên phân t DNA. Là nguyên nhân c a s hình thành protein không bình th ng. Ph n l n t bi n là có h i nh ng chúng v n th ng c gi l i trong qu n th vì th ng là l n và do ó có th c duy trì trong ki u gen mà không nh h ng n s c s ng c a sinh v t. T c t bi n t nhiên th p, nh ng t n s t bi n có th t ng nh các tác nhân nh phóng x ion hóa và các hóa ch t gây t bi n gây ra.

t bi n khuy t đ ng (auxotrophic mutation). Còn g i là t bi n hóa sinh. t bi n làm m t kh n ng t ng h p m t ch t c n thi t cho s sinh tr ng c a t bào.

t bi n l rò (leaky mutation). t bi n ch làm gi m ho t tính enzyme mà không làm m t h n ho t tính ó.

t bi n ng c (reverse mutation hay reversion). Còn g i là h i bi n. t bi n x y ra theo chi u t đ ng t bi n tr v đ ng bình th ng, có tác đ ng ph c h i trình t nucleotide ban u.

t bi n nh m ngh a (missense mutation). t bi n gen khi m t c p base trong b ba (codon) b thay th b i m t base khác, d n n s thay th amino acid v trí t ng ng trên chu i polypeptide b ng m t amino acid khác.

t bi n c ch (suppressor mutation). t bi n x y ra m t v trí trên DNA có tác đ ng lo i b hoàn toàn ho c t ng ph n h u qu c a t bi n ban u ã x y ra m t v trí khác.

t bi n vô ngh a (nonsense mutation). t bi n gen khi m t base trên DNA b thay th b ng m t base khác làm cho b ba t ng ng trên mRNA t ch xác nh m t amino acid chuy n thành b ba vô ngh a (không xác nh amino acid nào), mang tín hi u ch m đ t quá trình d ch mã. Ví d : amber codon (t bi n amber, amber mutation) hay ochre codon (t bi n ochre, ochre mutation). K t qu là chu i polypeptide ch c t ng h p n b ba x y ra t bi n vô ngh a thì d ng l i.

ôi polyA (polyA tail). o n trình t dài 50-200 nucleotide adenine c b sung vào u 3' c a h u h t các mRNA eukaryote sau khi phiên mã.

E. coli (Escherichia coli). Vi khu n th ng có trong ru t non c a ng v t có x ng s ng. *E. coli* c coi nh sinh v t m u cho vì c nghiên c u ho t ng c a t bào. ây là vi khu n Gram âm có kích th c genome kho ng 4×10^6 base-pair. Các quá trình

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

biểu hiện gen (phiên mã và dịch mã) liên quan với nhau, sinh ra sản phẩm mRNA để tổng hợp protein và được sử dụng ngay cho quá trình dịch mã. Không có hiện tượng biểu hiện sau dịch mã (post-translation). Ví dụ, *E. coli* được xem là một trong những tế bào vi khuẩn đầu tiên nghiên cứu. Rất nhiều thí nghiệm đột biến dòng gen đang được thực hiện hàng ngày tại các phòng thí nghiệm sử dụng *E. coli* làm vật chủ vì nhiều chủng khác nhau về mặt di truyền và cho những ứng dụng cụ thể.

Endopeptidase. Enzyme xúc tác cắt liên kết peptide trong chuỗi polypeptide.

Endonuclease. Là enzyme nuclease cắt bên trong phân tử nucleic acid, ngược với exonuclease là enzyme phân giải DNA từ một đầu hoặc cả hai đầu. Nuclease thủy phân liên kết phosphodiester giữa các nucleotide của một phân tử nucleic acid. Các nuclease có thể chỉ hoạt động với DNA (deoxyribonuclease) hoặc chỉ hoạt động với RNA (ribonuclease).

Enzyme. Chất xúc tác sinh học, là các phân tử sinh học có bản chất protein đóng vai trò chất xúc tác cho các phản ứng biểu hiện hóa sinh.

Enzyme biến đổi phân tử (isomerase). Enzyme xúc tác cho sự chuyển hóa một hợp chất thành một dạng phân tử khác.

Enzyme nối DNA (DNA ligase). Enzyme dùng để nối các phân tử DNA với nhau bằng cách tạo ra liên kết phosphodiester giữa nhóm 5'-phosphate và nhóm 3'-hydroxyl trong quá trình tái bản hoặc sửa chữa DNA.

Enzyme hạn chế (restriction enzyme, RE). Loại endonuclease có khả năng cắt DNA tại những vị trí nhất định mà chúng nhận biết. Enzyme hạn chế được phát hiện vào năm 1970, chúng tồn tại trong tế bào vi khuẩn, có tác dụng cắt DNA ngoi lại (ví dụ: DNA của phage) tại những vị trí xác định, tiêu diệt DNA này. Cho đến nay hơn 900 enzyme hạn chế đã được tìm thấy. Các enzyme hạn chế được sử dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm thao tác gen như những "chiếc kéo" cắt DNA tại những vị trí cụ thể. Vị trí cắt phụ thuộc vào loại enzyme hạn chế nào đó.

Năm 1978, Arber (Thầy S), Nathans (M) và Smith (M) đã nhận giải Nobel khi phát minh ra enzyme hạn chế và những ứng dụng của chúng giúp quy định những vấn đề quan trọng của di truyền học phân tử. Các enzyme này là những "chiếc kéo phân tử" có thể cắt DNA thành những đoạn xác định, làm ra một thế kỷ phát triển mới của sinh học hiện đại-Thực tế thao tác gen.

Enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase). DNA polymerase phụ thuộc RNA (RNA-dependent DNA polymerase) có trong các RNA virus (retrovirus) để tổng hợp cDNA trong giai đoạn *in vitro*.

Enzyme toàn phần (holoenzyme). Enzyme hoạt động gồm tất cả các tiểu đơn vị cần thiết, các nhóm ngoi và những cofactor.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Episome. Nhân tố di truyền có trong vi khuẩn, có khả năng tự sao chép trong tế bào chủ, nhưng đôi khi có thể xen vào nhiễm sắc thể chính của vi khuẩn và sao chép ngược lại về nhiễm sắc thể.

Exon. Các đoạn DNA trong gen có chức năng phiên mã. Exon tồn tại ở sinh vật prokaryote và eukaryote. Riêng sinh vật eukaryote các exon nằm xen kẽ với các đoạn intron. Các intron chiếm tới 90% tổng DNA của tế bào eukaryote và không có chức năng phiên mã.

Eukaryote. Sinh vật có tế bào mang nhân điển hình (nhân thật) nghĩa là nhân bao bọc bởi màng nhân và tham gia vào hai cách phân bào quan trọng là nguyên phân và giảm phân.

Exonuclease. Loại enzyme nuclease chỉ tác động vào đầu tận cùng của phân tử nucleic acid, cắt ra từng nucleotide một theo thời gian. Chúng có thể chuyển hóa theo đầu 5' hoặc 3' của sợi DNA.

Ex vivo. Thu thập dùng cho các thí nghiệm thể hiện trên tế bào nuôi cấy, các tế bào này sau đó sẽ cấy vào mô thể sống.

β -galactosidase. Enzyme chuyển mã hóa bởi gen *lacZ*. Enzyme này thủy phân lactose thành glucose và galactose.

Gây đột biến nhắm mục tiêu oligonucleotide (oligonucleotide-directed mutagenesis). Còn gọi là gây đột biến nhắm mục tiêu (site-directed mutagenesis), là quá trình tạo ra đột biến xác định trên DNA bằng cách sử dụng một oligonucleotide tổng hợp (primer) có một vài vị trí trong trình tự nucleotide.

Gel chậm (gel retardation). Phương pháp xác định vị trí bám của protein trên các đoạn DNA, dựa vào di chuyển chậm của chúng so với DNA không bám protein bám trong các thí nghiệm điện di trên gel.

Gen (gene). Là đơn vị di truyền, yếu tố quyết định tính trạng cụ thể. Thông tin di truyền của các gen được mã hóa trong DNA quyết định tính biểu hiện của loài và của cá thể. DNA là một chuỗi bao gồm các đơn vị nucleotide, có bốn loại nucleotide mang bazơ nitrogen khác nhau là adenine (A), guanine (G), cytosine (C), và thymine (T). Trình tự các nucleotide của một gen xác định một polypeptide hoặc một RNA. Gen có khả năng biểu hiện. Các gen chỉ xuất hiện một lần theo nhiễm sắc thể trong nhân tế bào. Mỗi gen chỉ mã hóa một vị trí xác định trên nhiễm sắc thể gọi là locus. Gen có thể tồn tại nhiều dạng gọi là các allele. Các gen biểu hiện thông qua các sản phẩm do chúng sinh ra là RNA (trong quá trình phiên mã) và protein (trong quá trình dịch mã).

Gen cấu trúc (structural gene) hay gen mã hóa (coding gene). Là trình tự mã hóa sản phẩm protein.

Gen chỉ thị (reporter gene). Là một gen mã hóa mà sản phẩm của nó được sử dụng trong thí nghiệm một cách dễ dàng (ví dụ chloramphenicol acetyltransferase), nó có thể dễ dàng

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

vị b t c m t promoter nào sao cho s bi u hi n c a gen này c dùng th nghi m ch c n ng c a promoter.

Gen i u hòa (regulatory gene). M t gen mà s n ph m protein c a nó tham gia vào s i u hòa bi u hi n c a m t gen khác. Ví d : gen mã hóa m t protein kìm hãm.

Gen gây ch t (death gene). Gen làm ch t cá th m t giai o n nào ó trong quá trình phát tri n c a chúng.

Gen nh y (transposon). Là m t o n DNA nh có c u trúc c bi t nên có kh n ng di chuy n t m t v trí này n m t v trí khác trên phân t DNA hay t m t nhi m s c th này sang m t nhi m s c th khác trong t bào l ng b i. Gen nh y ch chuy n n nh ng v trí xác nh trong h gen. Trong nhi u tr ng h p gen nh y có th gây t bi n t i v trí nó di chuy n n. Gen nh y có th dùng làm ph ng ti n gây t bi n nh h ng. Th ng các gen này mang tính kháng kháng sinh giúp vi khu n thích nghi nhanh v i thu c kháng sinh.

N m 1983, McClintock (M) ã nh n Gi i Nobel nh khám phá ra các nhân t di truy n v n ng (gen nh y) trên i t ng cây ngô.

Gen c ch (repressor gene). Có hai ch c n ng: (1) Là m t gen i u hòa (regulator) mà s n ph m c a nó là m t protein có tác đ ng c ch ho t ng phiên mã c a m t operon. (2) Là m t gen ph c h i (suppressor) ki u hình ban u c a t bi n trong m t gen khác.

Ghép ôi l ch (mismatch). S ghép ôi không úng v i quy lu t b sung gi a các nucleotide thu c hai s i n DNA trong m ch kép.

Ghép exon hay splicing (RNA). Quá trình c t b nh ng intron và n i các exon c a s n ph m phiên mã ban u (ti n thân mRNA) t o thành mRNA hoàn ch nh (mature mRNA). Quá trình bi n i này x y ra trong nhân t bào.

Gi thuy t m t gen-m t enzyme (one gene-one enzyme hypothesis). Gi thuy t đ a trên các công trình c a Beadle và Tatum v di truy n h c hóa sinh, theo ó m i gen ki m soát s t ng h p m t enzyme.

Gi m phân (meiosis). S phân bào tr i qua hai giai o n c a m t t bào l ng b i (2n) đ n n s hình thành các giao t n b i (1n) ho c các bào t h u tính mang m t n a v t ch t di truy n c a t bào l ng b i ban u.

Gi m phân I (meiosis I). L n phân chia th nh t c a gi m phân làm gi m s l ng nhi m s c th i m t n a và t o ra các t h p nhi m s c th m i. L n phân chia này g m b n giai o n: pha u, pha gi a, pha sau và pha cu i.

Gi m phân II (meiosis II). L n phân chia th hai c a gi m phân đ n n s phân tách các nhi m s c t và hoàn thành quá trình gi m phân nói chung.

G c tái b n (origin, ori). Trình t nucleotide ho c v trí trên DNA mà ó b t u s tái b n (sao chép).

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Guanine (G). Một trong năm nitrogen base có trong thành phần của DNA và RNA, bắt cặp với cytosine (C) trong chuỗi xoắn kép nh ba liên kết hydrogen.

Helicase. Enzyme xúc tác việc tháo xoắn của chuỗi xoắn kép DNA trong quá trình sao chép *E. coli*.

H gen hay b gen (genome). Là tập hợp các gen có trong một tế bào nhân bội eukaryote, trong một tế bào prokaryote hoặc trong một virus. H gen chứa toàn bộ DNA của cá thể, ví dụ: h gen người chứa DNA dài khoảng 1,6 m nhưng chỉ rỗng khoảng 5 phần trăm. Người, s DNA nói trên được chia làm 46 phần có độ dài ngắn khác nhau gọi là nhiễm sắc thể (chromosome), là tập hợp DNA được nén chặt nên kích thước ngắn kính chỉ còn 3-4 phần triệu mét. Tuy nhiên về mặt vật lý, nhiễm sắc thể người có gần 3 tỷ cặp nucleotide. Số sắp xếp của chúng quy định nên bản chất sinh học của cá thể.

Hội đồng glucose (glucose effect). Hội đồng khi hoạt tính của operon cảm ứng vì khi nào có một glucose khi khi hội đồng chỉ định của một operon.

Histone. Nhóm protein kiềm tính trong phức hợp với DNA các nhiễm sắc thể eukaryote và đóng vai trò quan trọng về mặt cấu trúc của nhiễm sắc thể.

Hoán chuyển gen (gene conversion). Sự hoán chuyển gen là sự thay đổi một phần của chuỗi xoắn kép DNA giúp nó bổ sung bằng một phần khác biệt về vị trí nào mà nó đã mất một cặp nucleotide.

Hoạt tính đặc hiệu (specific activity). Là hoạt độ phóng xạ trên một đơn vị nguyên tử, chẳng hạn: một đơn vị dò (probe) ánh xạ phóng xạ có thể có hoạt tính đặc hiệu 106 l n m/phút trên microgram. Hoạt tính đặc hiệu của enzyme được xác định bằng hoạt độ của enzyme.

Hội đồng (renaturation). Sự tái kết hợp của hai mạch DNA bổ sung của một phân tử DNA mạch kép.

Hộp CAAT (CAAT box). Một DNA nằm ngay cách 80 nucleotide phía trên phiên mã khoảng 75 nucleotide hạ dòng sinh vật eukaryote. Đây là một trong những hộp điều khiển của RNA polymerase.

Hộp Goldberg-Hogness (Goldberg-Hogness box) hay hộp Hogness (Hogness box) hay hộp TATA (TATA box). Một DNA có trong các promoter eukaryote thường là hộp Pribnow có trong các sinh vật prokaryote, nằm cách vị trí bắt đầu phiên mã khoảng 30 nucleotide, được coi là operator sinh vật eukaryote, có trình tự phân biệt của si bên là TATAAAT.

Hộp Pribnow (Pribnow box). Một phần của promoter trong các h gen prokaryote, nằm cách phía trên vị trí bắt đầu phiên mã 10 nucleotide. Trình tự của si bên này là TATAAAT.

Trao đổi trực tuyến: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

In d u DNA (DNA fingerprinting) hay in d u di truy n (genetic fingerprinting). Là ph ng pháp dùng các m u dò phóng x ho c dùng k thu t PCR nh n d ng các b ng DNA có các o n l p l i v i t n s cao. B n m u hình các b ng DNA là duy nh t i v i m i cá th , và do v y có th dùng xác nh c tr ng cá th ho c quan h huy t th ng.

In d u chân DNA (DNA footprinting). Ph ng pháp nh n d ng các vùng DNA mà các protein i u hòa bám vào.

Intron. Nh ng o n DNA nh sinh v t eukaryote không mang thông tin mã hóa amino acid, phân b r i rác d c theo phân t DNA. Sau khi thông tin t DNA c phiên mã sang mRNA thì các intron trên mRNA b c t b , các o n mRNA còn l i g m toàn các exon c n i l i v i nhau và chuy n n ribosome dùng làm khuôn m u cho quá trình d ch mã. Intron không th y có sinh v t prokaryote.

In vitro và in vivo. Là thu t ng mô t thí nghi m trong ng nghi m (*in vitro*) và trong c th (*in vivo*). Cùng v i s phát tri n ng d ng c a máy tính, hi n nay các nhà khoa h c còn ti n hành thí nghi m mô ph ng b ng computer. Quá trình này g i là thí nghi m *in silico*.

Isozymes hay isoenzymes. Nhóm các enzyme cùng xúc tác m t ph n ng nh ng khác nhau v c u trúc s c p ho c t c i n di, thu t ng allozymes c ng có ý ngh a t ng t .

Kéo dài o n m i (primer extension). S t ng h p m t b n sao nucleic acid b t u t o n m i. c s d ng ánh d u phóng x o n DNA làm m u dò ho c khu ch i m t o n DNA b ng k thu t PCR.

Kho ng cách b n (map distance). S trao i chéo trung bình x y ra gi a hai locus gen trên nhi m s c th ho c trên s i DNA.

Khu ch i (amplification). S s n xu t nhi u b n sao c a m t trình t DNA.

Khung c m (open reading frame, ORF). Là m t trình t mã hóa chu i polypeptide c b t u v i mã kh i u (initiator codon) và k t thúc b ng m t mã d ng (stop codon). M t khung c m b ng n ch n n u m t stop codon c nh v g n v i mã kh i u. M c dù v lý thuy t mã di truy n c xây d ng d a trên b ba nucleotide do ó s có ba khung c có th có trên m i s i DNA, tuy nhiên trong th c t khung c chính xác c xác nh b i m t i m b t u c nh.

Khu y t o n (deletion, deficiency). t bi n nhi m s c th d n n làm m t m t o n v t ch t di truy n và thông tin di truy n ch a trong nó r i kh i nhi m s c th .

Ki u gen (genotype). C u trúc di truy n c a c th . Hi n tr ng c a cá th (ki u hình) ph thu c vào quan h tr i-l n gi a các allele trong ki u gen và vào m i t ng tác gi a ki u gen và môi tr ng.

Ki u hình (phenotype). Ngo i hình c a m t sinh v t, là k t qu t ng tác gi a ki u gen v i môi tr ng. Nhi u gen có trong ki u gen nh ng không bi u hi n ra ki u

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

hình vì chúng bao che khu vực các allele trội. Những sinh vật có cùng kiểu gen có thể có các kiểu hình rất khác nhau trong những môi trường khác nhau. Kiểu hình cá thể không phải allele lặn là kiểu hình lặn.

Kiểu hoang dã (wild type). Dùng để chỉ kiểu hình của một gen trong quần thể hoang dã. Allele kiểu hoang dã được ký hiệu bằng một chữ in hoa hoặc thêm dấu cộng sau chữ viết thường, ví dụ: A hay a⁺. Allele kiểu hoang dã thường là trội và cho kiểu hình bình thường.

Kiểu nhân (karyotype). Bộ nhiễm sắc thể của một loài vật sống, kích thước và hình thái xác định của các nhiễm sắc thể. Mỗi loài có một bộ nhiễm sắc thể riêng của nó. Các loài khác nhau có kiểu nhân khác nhau.

Kilobase (kb). 1000 base (hoặc cặp base), được dùng như đơn vị đo lường xác định chiều dài của các phân tử DNA hoặc RNA.

Kinase. Các enzyme xúc tác phản ứng phosphoryl hóa một phân tử như ATP.

Lai (hybridization). Ghép các phân tử nucleic acid tách biệt lại với nhau thông qua các mối liên kết hydrogen giữa các base bổ sung.

Lai khuẩn lạc (colony hybridization). Kỹ thuật lai *in situ* xác định vị khuẩn mang vector khảm (chimeric vector) mà DNA của vector này tương ứng với một đoạn mã hóa của bất kỳ nào đó.

Lai phân tử (molecular hybridization). Quá trình trong đó hai mạch nucleic acid bổ sung (A-T, G-C) bắt cặp hình thành nên một mạch kép. Đây là một kỹ thuật hữu ích phát hiện một trình tự nucleotide chuyên biệt.

Lai tại chỗ (in situ hybridization). Quá trình bắt cặp giữa một đoạn (là một trình tự DNA sợi đơn hay RNA) với DNA của tế bào để xác định trên lam kính.

Lập bản đồ hạn chế (restriction mapping). Kỹ thuật dùng để xác định vị trí các điểm cắt hạn chế trên phân tử DNA.

Liên kết peptide (peptide bond). Mối liên kết liên kết hóa trị trong chuỗi polypeptide, nối nhóm α -carboxyl của một amino acid với nhóm α -amine của một amino acid kế tiếp.

Liên kết phosphodiester (phosphodiester bond). Một phân tử chứa hai alcohol, ester hóa với một phân tử phosphoric acid làm cầu nối giữa chúng với nhau. Ví dụ: chuỗi polynucleotide của chuỗi liên kết 5'→3' phosphodiester giữa hai nucleotide cạnh nhau.

Linker. Một oligonucleotide ngắn có hai đầu dính, chứa một hoặc nhiều vị trí cắt hạn chế cho phép nối cDNA sợi đơn với các plasmid vector hoặc bacteriophage λ vector. cDNA sợi đơn được cắt ở các vị trí với DNA polymerase của bacteriophage T4 hoặc DNA polymerase I của *E. coli* tương ứng. Các linker sau khi gắn với hai đầu dính của cDNA nhờ DNA ligase sẽ kết nối thành một chuỗi liên kết.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

vị hai đầu của vector. Phần gắn gen vào cDNA có mang linker hai đầu vị vector cũng xúc tác như DNA ligase.

Locus. Vị trí mà gen nằm trên nhiễm sắc thể.

LTR (long-terminated repeat). Là một đoạn mã lặp lại ở hai đầu của một retroviral DNA.

Lysosome. Một bào quan có màng bao bọc trong tế bào chất của sinh vật eukaryote. Lysosome chứa nhiều enzyme thủy phân.

Lý thuyết trung tâm (central dogma). Thuyết cho rằng thông tin di truyền theo một chiều từ DNA đến RNA và đến protein.

Mapping and sequencing gene. Lập bản đồ gen và xác định trình tự các nucleotide.

Mã di truyền (codon). Nhóm ba nucleotide không nhau (bộ ba) trên phân tử mRNA xác định một amino acid trên chuỗi polypeptide, hoặc là tín hiệu kết thúc việc tổng hợp polypeptide.

Mã thoái hóa (degenerate codon). Mã di truyền mà một amino acid được quy định bởi ba bazơ nitrogen base, chứ không phải chỉ ba. Thoái hóa là vì có nhiều mã di truyền mã cho cùng một amino acid.

Mã vô nghĩa (nonsense codon) hay mã dừng (stop codon). Là codon mà quá trình dịch mã dừng lại (không kết thúc chuỗi polypeptide). Có tất cả ba codon vô nghĩa và các tên gọi là amber (UAG), ochre (UAA) và opal (UGA)

Maturation. Quá trình trong đó các mRNA và các phiên mã trải qua một số biến đổi hóa học trở thành mRNA hoàn chỉnh sẵn sàng làm khuôn mẫu cho việc tổng hợp protein.

Máy đếm nhấp nháy (scintillation counter). Máy dùng để xác định hoạt tính phóng xạ trong một mẫu thí nghiệm.

Mũi dò DNA (DNA probe). Một đoạn RNA hay DNA chuyên biệt để đánh dấu bằng phóng xạ hay bằng hóa chất (chất phát huỳnh quang hoặc enzyme), dùng để tìm kiếm trình tự nucleic acid nhất định thông qua kỹ thuật lai phân tử (xem Northern blot, Southern blot...)

Monomer. Là các phân tử đơn lẻ, có thể liên kết với các phân tử đơn lẻ khác để hình thành nên phân tử lớn hơn (polymer). Ví dụ: các nucleotide là các monomer của nucleic acid và các amino acid là monomer của protein.

Mô hình sao chép DNA. Mô hình sao chép DNA mà theo đó hai sợi DNA bản mẫu được giải nguyên và làm khuôn tổng hợp chuỗi xoắn kép mới (con).

Mũi (primer). Một trình tự DNA hay RNA ngắn, bắt cặp với một mạch của DNA khuôn mẫu và có mang một đầu 3'-OH tự do giúp DNA polymerase bắt đầu tổng hợp một chuỗi DNA mới.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

M ch p (cap). M t nucleotide bi n i, 7-methyl guanine, g n vào u 5' c a base u tiên m i chu i mRNA ngay khi b t u phiên mã. M c n thi t cho s hoàn ch nh, s n nh và s d ch mã c a mRNA.

Ngo i t bào (exocytosis). Hi n t ng phóng thích v t ch t n i bào ra ngoài t bào.

Nguyên d ng (prototroph). Các t bào có th m c trên môi tr ng không c n b sung thêm ch t dinh d ng.

Nguyên phân (mitosis). Tái b n các nhi m s c th trong t bào sinh d ng eukaryote. S phân chia nh ng t bào eukaryote kéo theo s phân chia nhân g i là mitosis. Quá trình phân chia t bào qua n m giai o n (prophase, prometaphase, metaphase, anaphase và telophase), sau ó m t t bào c phân chia và t o ra hai t bào có tính ch t di truy n gi ng v i t bào m .

Nhân t (housekeeping factor). Là m t nhân t kh i u có b n ch t enzyme c a sinh v t prokaryote, nó là m t ph n c a RNA polymerase g n v i các v trí promoter trên DNA trong quá trình phiên mã. Các nhân t khác nhau c ho t hóa trong ph n ng v i các i u ki n môi tr ng khác nhau. M i phân t RNA polymerase có chính xác m t nhân t ti u n v . Vi khu n *E. coli* có b y nhân t , trong khi các lo i vi khu n khác có s l ng các nhân t r t khác nhau.

Nhân t gi i tính (fertility factor, F). Là nhân t di truy n vi khu n xác nh gi i tính “ c” ho c “cái” c a chúng. *E. coli*, nhân t h u th ký hi u là F xác nh gi i tính “ c”. Khi trong t bào không có nhân t F thì ó là t bào “cái”, ký hi u là F⁻. Khi nhân t F ính vào nhi m s c th thì ó là t bào “siêu c” ký hi u là Hfr.

Nhân t kéo dài (elongation factor, EF). Protein c hi u tham gia vào vi c a các phân t aminoacyl-tRNA n ribosome cho amino acid trong ph c h phân t nói trên có th g n vào chu i polypeptide ang c t ng h p.

Nhân t k t thúc (termination factor). Y u t protein trong cytosol c n thi t cho vi c gi i phóng chu i polypeptide ã hoàn thành trên ribosome (c ng g i là release factors-RF).

Nhân t kh i u (initiation factor). prokaryote vi t t t là IF, còn eukaryote là eIF. Là các protein k t h p v i ti u n v c a ribosome vào giai o n kh i ng c a quá trình d ch mã.

Nhân t Rho (Rho factor). M t protein có vai trò k t thúc s t ng h p m t s mRNA.

Nhi m s c th (chromosome). M t thành ph n c a t bào, bao g m các protein và m t phân t DNA c nh t. DNA ch a nhi u gen, có ch c n ng d tr và truy n thông tin di truy n. S l ng nhi m s c th trong m t t bào có th thay i t l (vi khu n) cho t i trên 100, nh ng không thay i m t loài nh t nh (ví d : 46 i v i ng i).

Nhi m s c th th ng (autosome). T t c nhi m s c th tr nh ng nhi m s c th gi i tính ho c nhi m s c th c a ty th .

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Nhiễm sắc thể (chromatide). Hai chuỗi song song và gắn nhau, nối với nhau bởi phần tâm centromer nhiễm sắc thể đang nhân đôi, thành thành này tồn tại cho đến khi bắt đầu phân chia (anaphase).

Northern blot. Kỹ thuật chuyển và chuyển RNA từ formaldehyde agarose gel (sau khi tách phân tử bằng điện di) lên màng lai bằng nylon hoặc nitrocellulose để lai với mẫu dò (probe) được đánh dấu bằng phóng xạ [α - 32 P]dCTP hoặc digoxigenin-dUTP. Tín hiệu xuất hiện sau đó được phát hiện trên phim X-quang (trình hình ảnh [α - 32 P]dCTP) hoặc trên màng lai (trình hình ảnh digoxigenin-dUTP).

Nhiễm bào (endocytosis). Sự xâm nhập của chất ngoại bào vào trong tế bào.

Nuclease S1. Enzyme thủy phân DNA sợi đơn.

Nucleic acids. Nhóm polynucleotide sinh học thiên nhiên, trong đó nhóm nucleotide kết hợp với nhau bằng liên kết phosphodiester thành trình tự DNA hoặc RNA riêng biệt.

Nucleolar organizer. Là vùng mang gen mã hóa cho rRNA centromer.

Nucleolus. Là một vùng đặc biệt của nhân, cấu tạo do sự gập lại của gen rRNA.

Nucleoside. Một hợp chất gồm một base purine hoặc pyrimidine kết hợp với đường hóa trị với một phân tử đường pentose.

Nucleosome. Đơn vị cấu trúc của nhiễm sắc thể, gồm một đơn vị DNA có kích thước khoảng 200 bp quấn bao quanh một lõi tập hợp 8 protein histone.

Nucleotide. Một nucleoside phosphoryl hóa với một trong những hydroxyl của pentose. Phân tử đóng vai trò cấu trúc của DNA và RNA, gồm ba phần: đường pentose (ribose trong RNA, deoxyribose trong DNA), nitrogen base và gốc phosphate.

Nucleolytic. Phân tử thủy phân một liên kết phosphodiester trong một nucleic acid.

Nuclease Bal 31. Một loại enzyme exonuclease thủy phân cả hai sợi của phân tử DNA cùng một lúc.

Oligo. Từ phổ biến có nghĩa là “m ngắn”, ví dụ: oligonucleotide (polynucleotide) có một ngắn nucleotide hoặc oligopeptide (polypeptide) có một ngắn peptide.

Oligo(dT)-cellulose. Một đơn vị nối các gốc deoxythymidine liên kết với các chất cellulose, sử dụng để tinh sạch mRNA eukaryote.

Oligomer. Thuộc chung chung một đơn vị các monomer.

Oligonucleotide. Một đơn vị các monomer là nucleotide, thường từ 20-30 nucleotide.

Operon. Nhóm các gen vị trí chứa sự điều khiển chung của một gen điều hòa. Cấu trúc operon bao gồm: 1) Nhóm gen cấu trúc mà hoạt động của chúng chứa sự điều khiển chung, 2) Gen điều hòa sản sinh ra protein điều hòa, 3) Vùng điều khiển (operator) và

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

trình tự khởi động (promoter) chủ yếu là các protein inducible. Protein inducible có tác động bám vào vùng khởi động làm cho nó bị "đóng", do vậy nhóm gen cấu trúc ngừng hoạt động. Khi trong môi trường xuất hiện chất ức chế các gen cấu trúc thì chất này bắt đầu hoạt động protein inducible khi nó không bám vào vùng khởi động, vùng khởi động "mở" và nhóm gen cấu trúc lại hoạt động.

Operon repressible (repressible operons). Các operon sinh tổng hợp chủ yếu amino acid bậc hai khi mặt chất (ví dụ: chủ yếu amino acid ó) đưa vào môi trường.

Orche codon. Chủ yếu kết thúc bằng codon UAA.

Opal codon. Chủ yếu kết thúc bằng codon UGA.

Ôn hòa (temperate). Trạng thái tiềm ẩn của các bacteriophage tế bào vật chủ.

α -peptide. Mặt phân của protein β -galactosidase, mã hóa bởi gen *lacZ*.

Periplasm. Phần ngoại bào tế bào gram âm giữa lớp màng ngoài và màng trong của vi khuẩn.

Peroxisome. Bào quan có trong tế bào chất eukaryote chứa enzyme xúc tác cho sự thoái hóa và phân hủy peroxide (H_2O_2).

Phage. Virus tế bào bacteriophage (thực khuẩn thể), là loại virus xâm nhiễm và sinh sản bên trong vi khuẩn. Phage thực vật có vỏ bọc protein, phần bao gồm phần đầu có hình chóp nón chứa nucleic acid (DNA hoặc RNA) và đuôi mà qua đó nucleic acid xâm nhập vào vi khuẩn chủ. Sau quá trình nhân lên của nucleic acid của phage, tế bào vi khuẩn chủ thực vật bị tan rã. Loại phage luôn luôn làm tan tế bào vi khuẩn khi chúng xâm nhiễm vi khuẩn gọi là phage lytic. Ví dụ: phage T4. Ngược lại, còn có phage ôn hòa, khi xâm nhiễm vi khuẩn nó gây nên trạng thái tiềm ẩn, nghĩa là hệ gen của phage gắn vào nhiễm sắc thể vi khuẩn và sao chép cùng với nhiễm sắc thể. Hệ gen của phage trạng thái tiềm ẩn gọi là prophage.

Phagemid. Là một loại plasmid vector có mang các gen trình tự của phage.

Phản ứng chuỗi polymerase (polymerase chain reaction, PCR). Phương pháp dùng trong phòng thí nghiệm để khuếch đại các phân tử DNA đặc biệt lên hàng triệu lần trong vòng vài giờ thông qua 20-30 chu kỳ nhiệt, mỗi chu kỳ bao gồm ba bước nhiệt: biến tính 90-95°C, bắt cặp và kéo dài 40-65°C hoặc hơn và tổng hợp mạch mới nhờ DNA polymerase chịu nhiệt (Taq polymerase) 70-72°C. PCR có ứng dụng rộng rãi trong chẩn đoán y học, phân tích sản phẩm sinh học, chọn lọc và trong nghiên cứu khác.

Nhà khoa học Mỹ (Tiến sĩ Mullis) người phát minh ra kỹ thuật PCR đã nhận giải Nobel năm 1993. Cùng chia sẻ Giải Nobel với Mullis là Smith (Canada) do có những đóng góp mang tính nền tảng cho việc gây đột biến nhân tạo, dựa trên các oligonucleotide và việc phát triển chúng trong các nghiên cứu protein.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Phản ứng t p trung (condensation reaction). Là phản ứng trong đó các unit amino acid hình thành và liên kết với nhau để tạo thành chuỗi polypeptide.

Phản ứng thủy phân (hydrolysis). Phản ứng trong đó liên kết peptide bị phá vỡ khi có sự tham gia của nước.

Phát sinh đột biến (mutagenesis). Quá trình tạo ra đột biến trong DNA.

Phân tích trình tự gen (gene sequencing). Là kỹ thuật xác định trình tự theo cấu trúc bậc phân tử của chuỗi các nucleotide trong phân tử nucleic acid. Phân tích trình tự của DNA có các phương pháp hóa học của Maxam-Gilbert và phương pháp enzyme của Sanger. Trong những năm gần đây, một số phương pháp xác định trình tự mini sinh tự động bằng máy tính đã xuất hiện. Bên cạnh kỹ thuật thông thường sử dụng các polyacrylamide gel phân ly các phân tử DNA có độ dài khác nhau, các kỹ thuật mới liên quan đến phát hiện huỳnh quang của các nucleotide cũng đã được áp dụng, phân tích trình tự DNA bằng kỹ thuật này, sử dụng mao dẫn hoặc lai với các oligonucleotide cũng đang được phát triển. Năm 1980, Sanger (Anh) và Gilbert (Mỹ) đã được trao giải Nobel do đã có những đóng góp quan trọng về phương pháp xác định trình tự các nucleotide trong phân tử DNA. Đóng góp này là một bước tiến quan trọng trong sinh học phân tử, là nguyên lý của tất cả các máy xác định trình tự DNA tự động hiện nay trên khắp thế giới.

Phân tử (telomere). Đơn vị, phân tử của nhiễm sắc thể ở sinh vật eukaryote, bao gồm những trình tự DNA ngắn lặp lại nhiều lần.

Phân tử (centromere). Phân tử có thể thấy trên nhiễm sắc thể kép, đó là nơi hai nhiễm sắc thể dính vào nhau.

Phiên mã (transcription). Quá trình tổng hợp mRNA từ khuôn mẫu DNA.

Phiên mã ngược (reverse transcription). Quá trình tổng hợp DNA từ khuôn mẫu mRNA nhờ enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase).

Phóng xạ tự ghi (autoradiography). Kỹ thuật phát hiện các phân tử có dấu phóng xạ thông qua hiện tượng nhiễu xạ của các phân tử này trên phim X-quang.

Phosphoryl hóa (phosphorylation). Phản ứng tạo thành một dẫn xuất phosphate của một phân tử sinh học để tác động xúc tác của một enzyme.

Phosphatase kiềm (alkaline phosphatase). Enzyme loại bỏ các nhóm 5'-phosphate từ các phân tử DNA và loại bỏ các nhóm 5'-hydroxyl.

Phối tử (ligand). Một phân tử hoặc một ion kết hợp với một protein, ví dụ: hormone có thể kết hợp với thụ thể (receptor) để kích hoạt nó.

Plasmid. Là DNA vi khuẩn có cấu trúc mạch vòng kép, nằm trong tế bào chủ và ngoài nhân, có khả năng sao chép độc lập với nhiễm sắc thể của tế bào. Trước đây sinh vật prokaryote và eukaryote. Ngày nay, các plasmid thích nghi nhân tạo cũng đang được sử dụng như là các vector dùng trong các kỹ thuật di truyền và biotechnology.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Polynucleotide. Trình tự liên kết của nucleotide nối nhau hóa trị với nhau, trong đó vị trí 3' của pentose của một trong những nucleotide liên kết với vị trí 5' của pentose của nucleotide tiếp theo.

Polypeptide. Một chuỗi dài những amino acid nối nhau bằng những liên kết peptide.

Polysome (polyribosome). Cấu trúc gồm nhiều ribosome kết hợp với mRNA trong quá trình dịch mã. Những polysome tồn tại trong tế bào chất, tổng hợp những protein nội bào. Những polysome kết hợp với màng ngoài của lưới nội sinh chất, tổng hợp những protein dùng cho sự tổng hợp màng hoặc các bào tử ra ngoài.

Primase (protein Dna G). Là một dạng của RNA polymerase và là sản phẩm của gen Dna G. Trong vị trí, primase liên kết với DNA helicase tạo thành một phức hợp gọi là primosome. Primase xúc tác hóa bất kỳ DNA helicase nào nó sẽ tổng hợp một RNA primer ngắn $n \approx 11 \pm 1$ nucleotide, enzyme DNA polymerase sẽ kéo dài RNA primer bằng cách bổ sung các nucleotide mới. Vì thế, primase là một nhân tố quan trọng trong tái bản DNA bởi vì nếu không có nó DNA polymerase không thể khởi đầu sự tổng hợp mới của DNA mới.

Prokaryote. Sinh vật nhân bào không có nhân tế bào định hình, DNA nằm trong tế bào chất không có màng bao bọc, không có nguyên phân và giảm phân; di truyền hình là vị trí.

Prophage. Phage ôn hòa xâm nhập vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn tế bào. Nó sao chép ngược lại vị trí nhiễm sắc thể của tế bào vi khuẩn.

Protein. Một phân tử lớn gồm một hoặc nhiều chuỗi polypeptide, một chuỗi có một trình tự amino acid và một khối lượng phân tử xác định. Protein là hợp chất quan trọng bậc nhất về mặt sinh học. Về cấu trúc, protein là phân tử mạch dài gồm các đơn vị cấu trúc nhỏ là các amino acid nối với nhau qua một liên kết peptide. Khối lượng phân tử của protein từ vài nghìn đến vài triệu. Có khoảng 20 loại amino acid. Các loại protein phức tạp hơn có liên kết thêm với các nhóm bổ sung.

Protein dung hợp (fusion protein). Là một protein tái tổ hợp lai được mã hóa bởi một gen lai (fusion gene) do sự dung hợp *in vitro* các gen khác nhau trên plasmid vector và sau đó bị nạp vào vi sinh vật chủ (chẳng hạn *E. coli*). Vì vậy, protein dung hợp sẽ mang trình tự amino acid của hai protein khác biệt kết hợp với nhau trên một vector biểu hiện.

Protein không histone (non-histone). Protein acid liên kết với DNA trong các nhiễm sắc thể eukaryote. Còn gọi là protein không kiềm.

Protein nguyên thủy (native protein). Là một protein tái tổ hợp được mã hóa bởi một gen ngoại lai (foreign gene) trong vi sinh vật chủ. Khác với protein dung hợp, protein nguyên thủy kết hợp với nhau mà nó chỉ không phải là một vector.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Protein sợi (fibrous protein). Những protein không tan, có chức năng bảo vệ hoặc cấu trúc, chẳng hạn như chuỗi polypeptide có cấu trúc bậc hai.

Purine. Một hợp chất đ vòng, kim, có nitrogen, là thành phần của những nucleotide và nucleic acid. Purine chứa một nhân pyrimidine kết hợp với một nhân imidazol.

Purmycin. Một loại kháng sinh có tác dụng ức chế sự tổng hợp polypeptide bằng cách gắn vào chuỗi polypeptide, cạnh tranh với aminoacyl-tRNA gắn lên vị trí của ribosome, và ngăn chặn sự kết thúc sớm của chuỗi polypeptide.

Pyrimidine. Một nitrogen base đ vòng có trong các nucleotide và nucleic acid.

Pyrophosphate. Phân tử hình thành bởi hai gốc phosphate nối với nhau bằng liên kết anhydride.

Pyrophosphatase. Enzyme thủy phân một pyrophosphate thành hai phân tử orthophosphate.

Quá trình phân tách và tinh sạch xuôi (downstream processing). Giai đoạn tinh sạch các sản phẩm của một quá trình sinh học (bioprocessing). Các kỹ thuật thường sử dụng trong bước này là ly tâm, siêu lọc hoặc sắc ký.

Quang tái hoạt hóa (photoreactivation, light repair). Một cách sửa chữa các pyrimidine dimer. Các dimer bị biến đổi tiếp nhận năng lượng từ ánh sáng để tạo thành bình thường bằng cách sóng 320-370 nm.

Quang hợp (photosynthesis). Quá trình sử dụng năng lượng ánh sáng để tạo thành carbohydrate từ CO₂ và một tác nhân khử.

Replisome. Một phức hợp enzyme có tác dụng khi tổng hợp lại bản DNA của ba tái bản.

Retroposon. Loại transposon hoạt động dưới dạng RNA; trích DNA của phiên mã thành RNA, RNA này sau đó phiên mã ngược thành DNA và gắn xen vào một vị trí mới trên hệ gen.

Retrovirus. Là loại virus RNA chứa enzyme reverse transcriptase và sinh sản dưới dạng DNA mạch kép. Chúng có khả năng xâm nhiễm tế bào vật chủ cao. Khi xâm nhiễm nó có khả năng gắn hệ gen của virus với hệ gen của tế bào vật chủ, là cơ sở thiết kế các vector liệu pháp gen hiện đại.

Ribonuclease. Enzyme xúc tác phân hủy phân tử RNA bằng cách cắt các mối liên kết phosphodiester trên RNA.

Ribonucleic acid (RNA). Thường là phân tử phân mảnh của các nucleotide có cấu trúc cơ bản là ribonucleotide. Về mặt hóa học RNA rất giống với DNA. RNA là vật chất di truyền của một số virus và là các phân tử trung gian trong quá trình tổng hợp protein mà thông tin về trình tự amino acid của chúng đã được mã hóa trong DNA.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Ribonucleotide. Đơn vị cấu trúc cơ bản của RNA, gồm ba thành phần: đường ribose, nitrogen base và nhóm phosphate.

Ribosome. Là cấu quan trọng khi kết hợp với mRNA tạo ra bộ máy tổng hợp protein. Trong tế bào thực vật có hàng nghìn ribosome, ribosome của mitochondria cũng có mặt trong nhân và mitorria. Mitochondria có mang chuỗi protein và rRNA (trong đó rRNA là thành phần chủ yếu chiếm khoảng 65%) có kích thước khác nhau. Nguyên tắc tổng hợp ribosome trong ty thể, cũng có sự tổng hợp một số protein ty thể.

Ribozyme. Là một RNA có hoạt tính xúc tác phản ứng hóa học giống như enzyme.

RNA bổ sung (complementary RNA). RNA sinh ra bằng cách phiên mã từ khuôn mẫu sử dụng DNA làm mẫu.

RNA kích thước nhỏ nhân (small nuclear RNA, snRNA). Ngoài mRNA, tRNA và rRNA, tế bào eukaryote còn chứa nhiều phân tử RNA kích thước nhỏ nhân (chiếm khoảng <1%) tham gia vào ghép nối các exon.

RNA ligase. Enzyme nối các đoạn RNA với nhau sau khi các intron được cắt bỏ khi tiến hành tổng hợp mRNA (pre-mRNA) các sinh vật eukaryote, tạo ra mRNA hoàn chỉnh sẵn sàng tham gia vào quá trình dịch mã diễn ra trên ribosome.

RNA polymerase. Còn gọi là RNA polymerase phụ thuộc DNA (DNA-dependent RNA polymerase), xúc tác việc tổng hợp RNA trên khuôn mẫu DNA trong quá trình phiên mã.

RNA ribosome (ribosomal RNA, rRNA). Là thành phần cơ bản của ribosome, đóng vai trò xúc tác và cấu trúc trong tổng hợp protein. Tùy theo hình thức rRNA cũng chia thành nhiều loại: eukaryote có rRNA 28S; 18S; 5,8S và 5S; còn các rRNA của *E. coli* có ba loại: 23S, 16S và 5S. rRNA chiếm nhiều nhất trong bộ ba loại RNA (khoảng 80% tổng số RNA tế bào), tiếp theo là tRNA khoảng 16%, mRNA chỉ khoảng 2%. Ngoài ra, tế bào sinh vật eukaryote còn chứa nhiều phân tử RNA kích thước nhỏ nhân (small nuclear, snRNA) chiếm khoảng <1% tham gia vào ghép nối các exon.

RNase. Enzyme thủy phân RNA.

RNA thông tin (messenger RNA, mRNA). Một loại RNA được phiên mã từ một trình tự DNA. mRNA truyền thông tin di truyền từ nhiễm sắc thể tới ribosome để tổng hợp protein. Trong quá trình tổng hợp mRNA, các chuỗi xoắn kép DNA được dùng làm khuôn mẫu, dựa theo nó các nucleotide của mRNA bổ sung ngược chiều thành hàng, nối với nhau tạo nên một polynucleotide giống hệt chuỗi DNA không làm khuôn mẫu ngoại trừ thymine được thay bằng uracil. Quá trình này gọi là phiên mã và phân tử mRNA mang mã di truyền được dùng để tổng hợp nên chuỗi hình thành protein trên ribosome.

RNA vận chuyển (transfer RNA, tRNA). Loại RNA mang các amino acid đến ribosome và sắp xếp chúng dựa theo phân tử mRNA để lắp ráp nên chuỗi. Vì vậy, các amino acid nối với nhau bằng liên kết peptide tạo thành phân tử protein. Mỗi amino acid có

Trao đổi trực tuyến: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

một phân tử RNA vận chuyển riêng với ba vị trí và nhận vận các amino acid để sắp xếp theo trật tự của các nitrogen base trên mRNA trong quá trình dịch mã.

10 sequence. Là đoạn mã hóa có tác dụng liên kết TATAATG tập trung khoảng 10 bp trước khởi đầu của một gen của vi khuẩn.

35 sequence. Là đoạn mã hóa tập trung khoảng 35 bp trước khởi đầu của một gen của vi khuẩn.

Sản phẩm phiên mã sơ cấp (primary transcript). Sản phẩm phiên mã ban đầu của các gen eukaryote còn gọi là mRNA tiền thân (pre-mRNA), thường có kích thước lớn. Nó phải trải qua xử lý (splicing) để tạo ra phân tử mRNA hoàn chỉnh (mature mRNA) dùng cho dịch mã.

Sàng lọc (screening). Kỹ thuật nhận dạng một dòng DNA trong một thư viện gen (genomic library) hoặc thư viện cDNA (cDNA library) bằng một phương pháp lai máu dò có đánh dấu [α - 32 P]dCTP với các vectơ (trình hợp dùng bacteriophage làm vector để dòng và cho xâm nhiễm vào vi khuẩn *E. coli*) hoặc khuẩn lạc (dùng plasmid làm vector để dòng) của các thể vi khuẩn trên màng nylon hoặc nitrocellulose. Tín hiệu lai được phát hiện bằng phóng xạ ghi trên phim X-quang.

Sinh học phân tử (molecular biology). Khoa học nghiên cứu các hiện tượng sinh học phân tử. Lĩnh vực khoa học trụ cột này là liên kết giữa các khoa học kinh điển như di truyền học, hóa sinh học, tế bào học, vật lý học, hóa học hữu cơ và hóa lý. Theo cách hiểu hiện nay, sinh học phân tử là khoa học nghiên cứu các gen và hoạt động của chúng trong phân tử, bao gồm phiên mã, dịch mã, sao chép, tái tổ hợp và chuyển gen...

Sinh tổng hợp protein (protein synthesis). Phản ứng hóa học diễn ra trên ribosome để nên các phân tử protein từ các amino acid trên cơ sở thông tin di truyền nhận được trong nhân tế bào thông qua mRNA.

Somatotropin. Đây là loại hormone biệt, thường tiết ra trong não để vận chuyển và giải phóng vào máu. Somatostatin có vai trò điều hòa hormone sinh trưởng và insulin đi vào máu, kiểm soát tổng hợp hai loại hormone này. Hiện nay, hormone này đã được sản xuất bằng công nghệ DNA tái tổ hợp để chữa bệnh lùn trẻ em do thiếu somatotropin.

Southern blot. Kỹ thuật chuyển và chuyển DNA đã biến tính agarose gel (sau khi phân đoạn bằng điện di) lên màng lai bằng nylon hay nitrocellulose để lai với máu dò (probe) có đánh dấu bằng phóng xạ [α - 32 P]dCTP hoặc digoxigenin-dUTP. Tín hiệu lai sau đó được phát hiện trên phim X-quang (trình hợp [α - 32 P]dCTP) hoặc trên màng lai (trình hợp digoxigenin-dUTP).

Số bản sao (copy number). (1) Số các phân tử plasmid có trong một tế bào vi khuẩn. (2) Số lượng các bản sao của một gen trong hệ gen của một sinh vật.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

S phóng xạ tự ghi (autoradiogram). Hình ảnh sinh ra trên phim X-quang do sự phát xạ của các hạt phóng xạ.

Sợi dẫn (leading strand). Chuỗi DNA trong quá trình tái bản có hướng đi cùng chiều với hướng di chuyển của các đầu tái bản.

Sợi có nghĩa (sense strand). Sợi này trong chuỗi xoắn kép DNA có dùng làm khuôn mẫu tổng hợp mRNA trong quá trình phiên mã. Sợi DNA thứ hai không có dùng làm khuôn mẫu phiên mã gọi là sợi vô nghĩa (antisense strand).

Sợi trễ (lagging strand). Chuỗi DNA trong quá trình tái bản có hướng đi ngược chiều với hướng di chuyển của các đầu tái bản.

Suppressor. Có hai loại: (1) Extragenic-thì là một gen mã hóa một tRNA bất bình có trên codon bất bình, theo nghĩa của codon trước. (2) Intragenic-là bất bình có tính chất bù đắp phần chèn khung mã trước sau khi đã có sự chuyển dịch khung.

Sửa chữa cắt bỏ (excision repair, dark repair). Quá trình sửa chữa các pyrimidine dimer trên DNA (do tia tử ngoại sinh ra) bằng cách cắt bỏ các dimer và tổng hợp phần DNA mới thay thế nào đó đi tác động của các enzyme đặc hiệu mà không cần ánh sáng.

Tác nhân đột biến (mutation factor). Bất kỳ tác nhân vật lý hoặc hóa học nào làm tăng đáng kể số đột biến so với số đột biến tự nhiên thì đều xem là tác nhân đột biến. Các tác nhân đột biến thông dụng là các tia phóng xạ như tia X, tia gamma, tia tử ngoại; các hóa chất như các gốc nitơ của các nitrogen base, nitrogen acid, hydroxylamine, acridin...

Tái bản (replication). Sự sao chép vật chất di truyền trong chu trình phân bào hoặc sự tổng hợp DNA của phage khi phage sinh sản trong tế bào vi khuẩn.

Tái bản DNA kiểu bán bảo toàn (semiconservative DNA replication). Quá trình sao chép DNA mà hai sợi cha mẹ dẫn xoắn và có dùng làm khuôn mẫu tổng hợp hai sợi mới. Khi sao chép xong thì mỗi chuỗi xoắn kép con gồm một sợi cũ và một sợi mới.

Tái bản DNA kiểu gián đoạn (discontinuous DNA replication). Sự tổng hợp DNA thành những đoạn ngắn, sau đó nối liền nhau thành chuỗi polynucleotide dài.

Tái bản DNA kiểu nửa gián đoạn (semidiscontinuous DNA replication). Sự tổng hợp DNA liên tục trên một sợi khuôn mẫu trong hai sợi của DNA mẹ kép; còn trên sợi khuôn mẫu kia, DNA có tổng hợp thành những đoạn ngắn gọi là đoạn Okazaki, sau đó nối chúng nối liền nhau nhờ ligase thành chuỗi polynucleotide dài.

Tái bản hai hướng (bidirectional replication). Sự tái bản theo hai hướng ngược chiều nhau.

Tái tổ hợp (recombination). Quá trình mà trong đó nhiễm sắc thể hay phân tử DNA trao đổi các phần tử gen với nhau theo một trật tự nhất định. Quá trình này có thể xảy ra trong tế bào sinh (qua sự trao đổi chéo trong phân bào giảm nhiễm) hay trong sinh vật nhân thực các enzyme có tác dụng tái tổ hợp DNA.

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

T o dòng (cloning). Còn g i là nhân dòng, tách dòng hay dòng hóa, là s s n sinh nhi u b n sao c a m t phân t DNA, th ng là phân t DNA tái t h p trong plasmid vector, b ng cách sao chép phân t ó trong m t v t ch thích h p ch ng h n vi khu n *E. coli*.

T n s l p l i (repetition frequency). Là s l n sao chép c a m t o n mã hóa nào ó có trong h gen n b i, t ng ng v i l trong tr ng h p nonrepetitive DNA và l n h n 2 trong tr ng h p repetitive DNA.

Terminal transferase. Enzyme b sung các g c nucleotide vào u 3' c a oligonucleotide ho c polynucleotide.

T bào b ch huy t (B lymphocyte). Là nh ng t bào có ch c n ng t ng h p các kháng th .

T bào Hfr (high frequency recombination cell). T bào gi i tính c *E. coli*, có mang nhân t F g n li n v i nhi m s c th vi khu n. Khi nhân t F thúc y s t i p h p c a t bào Hfr v i t bào cái (F⁻) thì các gen c a vi khu n c truy n sang t bào cái v i t n s cao.

T bào m m phôi (embryonic stem cell). T bào phôi ch a bi t hóa, a th chu t, có th c nuôi c y trong m t th i gian dài mà v n gi c tính a th , ngh a là kh n ng bi t hóa theo nhi u h ng phát tri n thành các t bào khác nhau nh : t bào c tim, t bào th n kinh, t bào gan...

Th bi n n p (transformant). T bào ho c sinh v t nh n c gen c a m t sinh v t khác trong quá trình bi n n p và bi u hi n ch c n ng c a gen ó ra ki u hình.

Th a hình (polymorphism). Mô t s có m t ng th i c a qu n th trong h gen bi u hi n bi n đ có tính ch t allele, có th quan sát trên các allele t o ra các ki u hình khác nhau, ho c s thay i c a DNA nh h ng n ki u c t h n ch (restriction patterns).

Th t bi n (mutant). Sinh v t (ho c gen) mang t bi n di truy n.

Th kh m (mosaic). Phôi ho c c th có các t bào mang các h gen không gi ng nhau.

Th nhân (nucleosome). C u trúc c s c a các nhi m s c th eukaryote g m DNA bao quanh m t lõi histone. Th nhân có đ ng h t, quan sát th y đ i kính hi n vi i n t .

Th tái t h p (recombinant). Các cá th ho c t bào mang các t h p gen khác v i cha m c a chúng do các quá trình tái t h p di truy n sinh ra.

Thông tin di truy n (genetic information). Thông tin c l u tr trong các phân t DNA c a sinh v t đ ng trình t s p x p c a b n nucleotide ký hi u là A, T, C và G óng vai trò nh nh ng “ch cái” c a “ngôn ng ” di truy n. Trong ngôn ng này, m i t ch có ba ch cái g i là m t b ba. Ngh a c a m i t là m t amino acid có m t trên phân t protein t ng ng. M i “câu” c a ngôn ng di truy n là m t gen ch a ng thông tin

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

di truyền nhằm mục đích chuyển gen vào. Mục đích này là để tính sinh lý, hình thái hay cấu trúc của sinh vật. Do cách sao chép theo khuôn mẫu của DNA mà thông tin di truyền được truyền chính xác từ thế hệ này sang thế hệ kia như không thay đổi.

Thụ thể (receptor). Protein màng, một phần nằm trong màng tế bào, có khả năng gắn kết với phân tử (ligand) nằm ngoài tế bào màng kết quả là gây ra một biến đổi hóa học trong tế bào chất.

Thuốc thiếu nhi (orphan drug). Là thuốc đặc biệt (và một số khác) cho phép dùng thử trong một vài năm (M là 7 năm) để chẩn đoán bệnh hiếm gặp. Hormone phát triển và erythropoietin được sản xuất nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp từ các thuốc thiếu nhi nói trên.

Thư viện cDNA (cDNA library). Tập hợp các dòng DNA tái tổ hợp mRNA của một tế bào hoặc mô cụ thể trong bacteriophage vector, sử dụng cho thông tin di truyền mà các tế bào đó biểu hiện.

Thư viện gen (genomic library). Tập hợp tất cả các đoạn DNA tái tổ hợp phần gen của một chủng genome trong bacteriophage vector, sử dụng để chọn lọc cho toàn bộ thông tin di truyền của một loài gen.

Thymine (T). Base loại pyrimidine có trong DNA nhưng không có trong RNA. Trong mạch kép DNA thymine bắt cặp với adenine (A).

Tính trạng (trait). Một đặc điểm hoặc tính chất bên ngoài của các cá thể sinh vật.

Tính trạng đa gen (polygenic trait). Tính trạng được xác định bởi nhiều tác nhân di truyền, chẳng hạn như màu mắt người.

Topoisomerases. Nhóm enzyme xúc tác sự thay đổi hình dạng siêu xoắn âm hoặc dương của chuỗi DNA xoắn kép vòng.

Trao đổi chất (metabolism). Còn gọi là quá trình chuyển hóa, là toàn bộ những thay đổi trong tế bào sống của những phân tử hữu cơ như xúc tác bởi những enzyme. Sự chuyển hóa bao gồm các quá trình tổng hợp và phân giải.

Trình tự dẫn đầu (leader sequence). Một trong ba phần chủ yếu của một phân tử mRNA. Trình tự này nằm ở đầu 5' của mRNA và mang thông tin về ribosome và các protein để biểu hiện bản thân của quá trình tổng hợp polypeptide, trình tự dẫn đầu không được dịch mã thành trình tự các amino acid.

Trình tự điều hòa (regulatory sequence). Một trình tự của DNA tham gia vào quá trình điều hòa của gen. Ví dụ: trình tự promoter hoặc operator.

Trình tự chèn (insertion sequence, IS). Có vị trí, kích thước nhỏ và thường nằm trong transposon, chỉ mang gen cần cho sự gắn kết của chính nó.

Trình tự điều khiển (operator). Đoạn DNA ngắn nằm ở operon, kiểm soát promoter để mà protein đặc biệt có thể bám vào, có tác dụng "mở" hoặc "đóng" operon cho các gen cấu trúc trong operon hoạt động hoặc ngừng hoạt động.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Trình tự khởi động (promoter). Trình tự nucleotide đặc hiệu nằm trong thành phần operon, có chức năng giúp hòa hợp trình tự của operon, nơi RNA polymerase bám vào bắt đầu quá trình phiên mã. Trình tự đặc trưng của promoter có khoảng 20-200 nitrogen base.

Trình tự lặp lại (repetitive sequence). Các trình tự base có nhiều bản sao cùng một lúc trên phân tử DNA. Có bốn loại trình tự lặp lại: trình tự lặp lại đơn (có một bản sao), trình tự lặp lại đơn (có từ 1 đến 10 bản sao), trình tự lặp lại trung bình (có từ 10 đến vài trăm bản sao) và trình tự lặp lại cao (có từ vài triệu đến vài tỷ bản sao).

Trình tự lặp lại ngược chiều (inverted repeat sequence). Một đoạn ngắn của DNA có lặp lại, thường các đoạn dài hơn, có hình dạng ngược chiều.

Trình tự lặp lại xuôi chiều (direct repeat sequence). Trên DNA gồm một dãy các trình tự nucleotide có lặp lại theo cùng một chiều.

Trình tự đồng thuận (consensus sequence). Trên trình tự thay đổi trong họ các motif của một yếu tố điều khiển và có bản vẽ chung, ví dụ hộp CAAT.

Trình tự Shine-Dalgarno (Shine Dalgarno sequence, SD). Còn gọi là vùng liên kết ribosome (RBS), là một phần của trình tự nucleotide ở đầu 5' của mRNA prokaryote có thể kết hợp bổ sung cặp base với đầu 3' của 16S rRNA, dùng làm tín hiệu cho sự khởi đầu dịch mã.

Trình tự tăng cường (enhancer). Trình tự nucleotide dạng *cis* làm tăng cường phiên mã của promoter trong gen eukaryote. Nó có thể nằm cách promoter hàng ngàn cặp base và hoạt động theo cách hai hướng bất kể vị trí nào so với promoter.

Tương đồng (homologous). (1) Nói về các nhiễm sắc thể đồng vị trong các sinh vật lưỡng bội. (2) Dùng mô tả các trình tự DNA giống nhau một cách tự nhiên; tuy nhiên, phần trọng tâm nghiên cứu các mối liên quan đôi khi chỉ tương đối.

Ty thể (mitochondria). Bào quan có màng bao bọc, nằm trong tế bào chất của các sinh vật eukaryote. Ty thể chứa nhiều enzyme cần thiết cho chu trình citric acid, vận chuyển electron và quá trình phosphoryl oxy hóa.

Giãn nhiệt (annealing). Dùng để xác định các cặp khuôn mẫu DNA sẵn có và primer (mồi) để tổng hợp nên một sợi DNA bổ sung bằng cách sử dụng các dNTP có trong môi trường kéo dài primer như sự xúc tác của enzyme Taq DNA polymerase (trong kỹ thuật PCR) hoặc DNA polymerase I (trong tổng hợp cDNA).

Ức chế amber (amber suppressor). Là các gen đột biến (mã hóa cho tRNA) mà những anticodons của nó sẽ kích hoạt có thể nhận UAG codon cũng như các codon khác.

Vật chủ (host). Tế bào dùng để nhân các phân tử DNA lên nhiều lần.

Vector. Là các phân tử DNA có sẵn trong tế bào và bị sử dụng gen, và nhân bản chúng trong tế bào vật chủ (*E. coli* hoặc nấm men). Có ba nhóm vector chính gồm: (1) Nhóm plasmid, (2) Nhóm phage/phagemid, và (3) Nhóm nhiễm sắc thể nhân tạo.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

(artificial chromosome: BAC, YAC...). Ý tưởng về vector chuyển gen bắt nguồn từ các plasmid của vi khuẩn. Vector chuyển gen là các phân tử DNA có khả năng tái sinh, tồn tại ổn định trong tế bào và mang theo các gen cần chuyển.

Vector biểu hiện (expression vector). Là vector có thể mang các gen ngoại lai mong muốn cho phép thực hiện sản phẩm mã của các bản sao của nó trong tế bào và sản xuất các mRNA của chúng trong tế bào vật chủ, ví dụ: *E. coli*. Biểu hiện các gen ngoại lai trong *E. coli* phụ thuộc vào bản sao của nó vào trong vector biểu hiện (thường là plasmid). Vector này phải có các cấu trúc cần thiết sau: (1) Các trình tự mã hóa gen chọn lọc (selectable marker) để duy trì vector trong tế bào. (2) Một promoter kiểm soát phiên mã cho phép sản xuất một lượng lớn mRNA của các gen cần tái sinh. (3) Các trình tự kiểm soát dịch mã như vùng liên kết ribosome để bắt đầu dịch mã và codon khởi đầu ATG. (4) Một polylinker để các gen ngoại lai vào trong một hướng chính xác về promoter.

Vector tái sinh (cloning vector). Phân tử DNA mạch kép có khả năng tái sinh sao chép trong tế bào vật chủ. Có thể gắn vào phân tử này một hoặc một vài phân tử DNA khác nguồn gốc nên phân tử DNA tái sinh phải dùng nhân dòng.

Vector thay thế (replacement vector hay substitution vector). Là một bacteriophage vector mà có các trình tự tái sinh sao chép thành các sao chép, do vậy phân tử của gen mới mà các trình tự này có thể thay thế bản sao của DNA chèn.

Vết tan (plaque). Vòng tròn trong suốt xuất hiện trên bề mặt của các vi khuẩn mọc trên môi trường thạch, do sự tan vỡ của tế bào vi khuẩn do sự xâm nhiễm và sinh sản của bacteriophage.

Vết trổ (cos site). Vùng tái sinh sao chép khi các đầu dính của DNA phage gặp nhau.

Virus. Phân tử nucleic acid (DNA hoặc RNA) nằm trong một vỏ bọc protein, có khả năng gây nhiễm và tái bản bên trong tế bào vật chủ của nó, tạo ra nhiều virus, lan truyền từ tế bào này sang tế bào khác. Virus là đơn bào không có cấu trúc tế bào, có khả năng xâm nhập vào các tế bào sống xác định và sinh sản bên trong các tế bào đó. Giống như tất cả sinh vật khác, virus có bộ máy di truyền của riêng mình, mã hóa vì cấu trúc của các hạt virus và các chức năng có trong tế bào vật chủ. Như vậy, virus là sinh vật ký sinh nội bào. Virus phân bố khắp nơi trong tự nhiên, xâm nhập vào tất cả các nhóm sinh vật. Người ta đã biết khoảng 500 loại virus xâm nhập vào máu nóng, 300 loại xâm nhập thực vật bậc cao. Một số khi uống nước và người có thể do virus. Virus tồn tại hai dạng: dạng nghỉ hay ngoại bào và dạng sinh sản hay nội bào. Kích thước của các hạt virus từ 15-350 nm, chiều dài của một số loại virus có thể tới 2000 nm. Phần lớn virus chỉ nhìn thấy được qua kính hiển vi điện tử. Chưa mang thông tin di truyền của virus là nucleic acid: DNA hoặc RNA. Vì vậy, có thể phân virus thành hai loại: loại mang DNA và loại mang RNA.

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

Vi tiêm (microinjection). Kỹ thuật đưa DNA vào nhân hoặc vào tế bào chất của tế bào động vật và thực vật. Đây là kỹ thuật sử dụng phễu vi trong công nghệ tế bào động vật (animal cell biotechnology), nó đòi hỏi thiết bị thao tác (micromanipulator) chính xác, kỹ năng thao tác cao và sự kiên nhẫn của kỹ thuật viên.

VNTR (variable number of tandem repeats). Còn gọi là lặp đơn bội, chỉ các vùng lặp lại của trình tự DNA. Số lần lặp lại thay đổi theo cá thể nên mang tính đa allele rất cao.

Vòng kẹp tóc (hairpin loop). Vùng chuỗi bổ sung tạo nên các cặp base tạo thành xoắn kép, có dùng làm mồi (primer) cho quá trình tổng hợp ngược DNA thứ hai.

Vốn gen (gene pool). Toàn bộ thông tin di truyền có trong tất cả các gen của một quần thể tự nhiên.

Vùng xuôi dòng (downstream). Vị trí của một trình tự nào đó nằm phía dưới 3' của gen hoặc một gen quan tâm.

Vùng đa liên kết (polylinker hay polycloning sites). Một trình tự DNA mạch kép có thể nhận vào các mang mạch đơn của các enzyme hạn chế. Trình tự này có gắn vào các vector dùng trong kỹ thuật tạo dòng gen (như vùng tạo dòng).

Vùng liên kết ribosome (ribosome binding sites, RBS). Vùng trên phân tử mRNA giúp cho nó bám vào ribosome trong quá trình dịch mã (xem trình tự Shine-Dalgarno).

Vùng nhân (nucleoid). Một vùng trong tế bào vi khuẩn tập trung vật chất di truyền.

Vùng ngược dòng (upstream region). Vị trí của một trình tự nucleotide nào đó nằm phía trên 5' của phân tử DNA so với gen quan tâm.

Vùng siêu biến (hypervariable region, HVR). Vùng trong gen bao gồm một số lặp lại của trình tự lặp lại và có dùng để xác định cá thể (xem in d u dĩ truy n).

Vùng tạo dòng (multiple cloning sites, MCS). Một DNA ngắn trong một vector thích hợp (ví dụ: các nhóm pUC, pGEM, pBluescript...) có chứa các vị trí nhận biết cho một số enzyme cắt hạn chế thông dụng, có thể kết nối DNA ngoi lại vào đây (xem vùng đa liên kết).

Western blot. Kỹ thuật phân tích protein dựa trên nguyên lý liên kết kháng nguyên-kháng thể phát hiện protein đích có bản chất kháng nguyên (thường có thể tích lên màng nitrocellulose sau khi chuyển đi SDS-PAGE, và nhuộm). Sau khi protein trên màng lai với kháng thể thích hợp và tiếp theo là kháng thể thứ hai có gắn dấu enzyme (alkaline phosphatase hoặc horse-radish peroxidase...) thì phản ứng này sẽ liên kết với chất tạo màu. Sản phẩm của protein ngoi lại (sản

Trao đổi trực tuyến tại: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

phẩm d ch mã c a gen ngo i lai c chuy n vào t bào v t ch) s c phát hi n nh s xu t hi n màu c a ph n ng lai.

Xo n alpha (helix α). C u trúc xo n c a chu i polypeptide, th ng là quay ph i, v i s l ng t i a liên k t trong chu i, m t trong nh ng c u trúc b c hai ph bi n c a protein c tìm th y keratin.

Xo n kép (double helix). C u trúc ba chi u t nhiên c a hai chu i DNA b sung, i song và xo n v i nhau.

YAC (Yeast artificial chromosome). Nhi m s c th nhân t o c a n m men, c dùng làm vector t o dòng nh ng o n DNA có kích th c r t l n trong n m men.

Y u t ngoài nhi m s c th (extrachromosomal element). Phân t DNA không ph i là thành ph n c a nhi m s c th t bào v t ch .

Y u t tác ng cis (cis-acting element). o n trình t DNA ch bi u hi n hi u qu trên chính phân t DNA mà nó tác ng. Ví d : h p CAAT là m t ph n t tác ng cis i v i quá trình phiên mã các sinh v t eukaryote.

Y u t tác ng trans (trans-acting element). Y u t di truy n có th bi u hi n hi u qu mà không c n n m trên cùng m t phân t v i o n trình t ích. Th ng y u t ó mã hóa cho m t s n ph m protein (có th là m t enzyme hay m t protein i u hòa) và s n ph m này có th khu ch tán n i m tác ng.

Tài li u tham kh o/ c thêm

1. Ban T i n-NXB Khoa h c và K thu t. 2002. T i n Bách khoa Sinh h c. *NXB Khoa h c và K thu t*, Hà N i.

2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. *Garland Science Publishing, Inc.* New York, USA.

3. Karp G. 2002. *Cell and Molecular Biology*. *John Wiley & Sons, Inc.* New York, USA.

4. Lawrence E. 1995. *Henderson's Dictionary of Biological Terms*. 7th ed. *Longman Group Ltd.* Singapore.

5. Singleton P and Sainsbury D. 2001. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. 3rd ed. *John Wiley & Sons, Ltd.* UK.

6. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M and Losick R. 2004. *Molecular Biology of the Gene*. *Pearson Education, Inc./Benjamin Cummings Publishing*, San Francisco, USA.

Trao i tr c tuy n t i: http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html

www.mientayvn.com

Dịch tiếng anh chuyên ngành khoa học tự nhiên và kĩ thuật.

Dịch các bài giảng trong chương trình học liệu mở của học viện MIT, Yale.

Tìm và dịch tài liệu phục vụ cho sinh viên làm seminar, luận văn.

Tại sao mọi thứ đều miễn phí và chuyên nghiệp ???

Trao i tr c tuy n t i:

http://www.mientayvn.com/chat_box_sinh.html