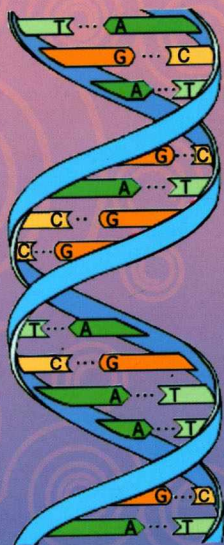


100

100

100



PGS. TS. NGUYỄN NHƯ HIỀN

CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TẬP MỘT

SINH HỌC PHÂN TỬ VÀ TẾ BÀO - CƠ SỞ KHOA HỌC CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC

(Dùng cho sinh viên ĐH, CĐ chuyên và không chuyên ngành CNSH,
giáo viên và học sinh THPT)

(Tái bản lần thứ tư)

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC VIỆT NAM

Lời nói đầu

Thế kỷ XXI là thế kỷ của nền kinh tế trí thức. Trong mỗi sản phẩm chúng ta dùng hàng ngày, từ vật đơn giản nhất như bao bì gói xôi, gói bánh... cho đến phức tạp nhất như chiếc điện thoại di động... đều chứa hàm lượng chất xám tổng hợp trí thức của nhân loại thuộc rất nhiều thế hệ kế tiếp nhau.

Công nghệ Sinh học là một trong những ngành công nghệ mũi nhọn của nền kinh tế trí thức, nó không chỉ liên quan đến việc cải tạo thế giới sống mà liên quan đến sự tồn vong của cả nhân loại. Chúng ta hãy tưởng tượng một ngày nào đó dịch bệnh do virus, vi khuẩn biến đổi gen sẽ nhanh chóng lan tràn do sự giao lưu toàn cầu về sản phẩm chăn nuôi (ví dụ dịch cúm gia cầm) không thể kiểm soát, thì nhân loại sẽ bị tiêu diệt hàng loạt kể cả nước nghèo cũng như nước giàu. Công nghệ Sinh học đang đứng trước một trọng trách nặng nề là bảo vệ vốn gen của loài người trước hiểm họa tấn công của nạn ô nhiễm môi trường và dịch bệnh. Hy vọng rằng trong thế kỷ XXI, trên cơ sở của công nghệ nhân bản vô tính và công nghệ tế bào gốc, các nhà sản xuất sẽ cung cấp lương thực, thực phẩm từ các nhà máy không thông qua chăn nuôi và trồng trọt.

Không có tri thức về Sinh học phân tử sẽ không có công nghệ sinh học. Cuốn sách này nhằm cung cấp cho các sinh viên các trường Cao đẳng, Đại học, cũng như học sinh các trường Trung học phổ thông và những ai làm Công nghệ Sinh học những kiến thức cơ bản nhất về Sinh học phân tử và Sinh học tế bào, là 2 lĩnh vực khoa học nền của Công nghệ Sinh học.

Ngày nay Sinh học phân tử và Sinh học tế bào đã đi sâu nghiên cứu những vấn đề vô cùng sâu và rộng không thể giới thiệu đầy đủ trong một cuốn sách. Trong cuốn sách này tác giả chỉ đề cập đến những vấn đề cơ bản nhất, khái quát nhất ở mức độ nhập môn làm cơ sở cho độc giả có thể nghiên cứu sâu hơn vào các lĩnh vực mà mình quan tâm.

Cuốn sách gồm 3 phần : Sinh học phân tử, Sinh học tế bào và cơ sở phân tử và tế bào của Công nghệ gen và Công nghệ tế bào. Với trình độ có hạn chắc chắn rằng cuốn sách còn nhiều thiếu sót và chưa đáp ứng được đầy đủ mong muốn của độc giả. Tác giả hy vọng nhận được nhiều đóng góp của độc giả để có thể hoàn thiện hơn cho những lần xuất bản sau.

TÁC GIẢ

MỤC LỤC

Lời nói đầu	3		
Phần mở đầu. CÔNG NGHỆ SINH HỌC LÀ GÌ ?			
I. Công nghệ sinh học (CNSH) là một ngành sản xuất	7	2.3. Các gen rARN và tARN	55
1.1. Khái niệm về CNSH	7	2.4. Các gen đơn bản và gen đa bản	55
1.2. Sự ra đời và phát triển của CNSH	7	2.5. Các gen nhảy	59
1.3. Lợi ích của CNSH	8	III. Hệ gen. Tổ chức của hệ gen	59
II. Giới thiệu một số ngành nghề CNSH	10	3.1. Độ lớn của hệ gen	59
2.1. Các ngành nghề CNSH	10	3.2. Đặc tính tổ chức của hệ gen	63
2.2. CNSH và đạo đức sinh học	11	IV. Mã di truyền và sự tái bản mã	64
Phần một. SỰ RA ĐỜI VÀ PHÁT TRIỂN CỦA SINH HỌC PHÂN TỬ		4.1. Mã di truyền	64
<i>Chương 1. CÁC ĐẠI PHÂN TỬ SINH HỌC VÀ VAI TRÒ CỦA CHÚNG TRONG CƠ THỂ SỐNG</i>		4.2. Sự tái bản của ADN	66
I. Protein	13	V. Từ ADN đến ARN đến protein - sự biểu hiện thông tin di truyền	70
1.1. Cấu trúc và chức năng của protein	13	5.1. Sự phiên mã	70
1.2. Enzym- chất xúc tác sinh học	19	5.2. Sự dịch mã	72
1.3. Hoocmon- chất điều chỉnh	22	VI. Điều hoà hoạt động của gen	74
1.4. Hoocmon ở thực vật.		6.1. Điều hoà hoạt động của gen ở sinh vật nhân sơ	74
Các phytohoocmon	34	6.2. Điều hoà hoạt động của gen ở sinh vật nhân chuẩn	76
II. Axit nucleic	48	VII. Tiến hóa của hệ gen	81
2.1. Cấu trúc của axit nucleic	48	7.1. Đối với virut và Procaryota	81
2.2. Axit nucleic- vật chất mang thông tin di truyền	49	7.2. Đối với Eucaryota	81
2.3. Hai loại axit nucleic	50	<i>Chương 3. DI TRUYỀN VÀ BIẾN DỊ</i>	
2.4. Mô hình cấu trúc của ADN	51	I. Các loại biến dị	83
<i>Chương 2. KHÁI NIỆM VỀ GEN VÀ HỆ GEN</i>		1.1. Thường biến	83
I. Khái niệm về gen	53	1.2. Biến dị di truyền	83
II. Cấu trúc của gen	54	II. Đột biến gen	84
2.1. Các gen cấu trúc	54	2.1. Đột biến gen có thể là đột biến soma hay đột biến mầm	85
2.2. Các gen điều chỉnh	55	2.2. Đột biến gen là ngẫu nhiên hoặc cảm ứng	85

2.3. Đột biến là quá trình ngẫu nhiên không mang tính thích nghi	85	4.1. Màng sinh chất	108
2.4. Đột biến là quá trình thuận nghịch	86	4.2. Chức năng của màng sinh chất	111
2.5. Hậu quả kiểu hình của đột biến gen	86	4.3. Sự phân hoá của màng sinh chất	119
2.6. Đa số các đột biến đều có hại và lặn	87	4.4. Lớp thành vỏ glycocalix	120
2.7. Đột biến gây chết có điều kiện	88	4.5. Tế bào chất và các bào quan	121
2.8. Cơ sở phân tử của đột biến gen	89	4.6. Cấu trúc hiển vi và siêu hiển vi của nhân	131
III. Đột biến tái tổ hợp	89	<i>Chương 5. NHIỄM SẮC THỂ CỦA TẾ BÀO - TỔ CHỨC CHỨA ADN</i>	
3.1. Khái niệm đột biến tái tổ hợp	89	I. Cấu trúc nhiễm sắc thể	133
3.2. Mô hình phân tử của sự trao đổi chéo gen	90	1.1. Kỹ thuật nghiên cứu nhiễm sắc thể. Kiểu nhân	133
3.3. ADN tái tổ hợp	91	1.2. Hình thái nhiễm sắc thể	134
3.4. Kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Công nghệ di truyền	92	1.3. Cấu trúc hiển vi của nhiễm sắc thể	135
IV. Biến dị di truyền trong quần thể	94	1.4. Cấu trúc siêu vi của nhiễm sắc thể	139
4.1. Vốn gen của quần thể	94	II. Học thuyết nhiễm sắc thể của di truyền	141
4.2. Phân tích vốn gen. Công thức Hardy-Weinberg	95	2.1. Thí nghiệm của T. Morgan	141
4.3. Tiến hoá vi mô	96	2.2. Thí nghiệm của C. B. Bridges	143
Phần hai. SINH HỌC TẾ BÀO		2.3. Cơ sở nhiễm sắc thể của các quy luật Mendel	143
<i>Chương 4. TẾ BÀO - ĐƠN VỊ TỔ CHỨC CƠ BẢN CỦA CƠ THỂ SỐNG</i>		III. Đột biến nhiễm sắc thể	144
I. Tế bào nhân sơ và tế bào nhân chuẩn	99	3.1. Đột biến số lượng nhiễm sắc thể	145
1.1. Học thuyết tế bào	99	3.2. Đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể	152
1.2. Các dạng tồn tại của tế bào	100	3.3. Các nhân tố gây đột biến nhiễm sắc thể	157
II. Virut - dạng sống không có cấu tạo tế bào	103	<i>Chương 6. CHU KỲ SỐNG CỦA TẾ BÀO</i>	
2.1. Cấu tạo của virut	103	I. Các pha của chu kỳ sống	158
2.2. Virut suy giảm miễn dịch ở người (HIV)	105	1.1. Giai kỳ	158
III. Tầm quan trọng của vi khuẩn và virut trong CNSH	107	1.2. Phân bào	160
3.1. Sự lên men	107	II. Điều chỉnh chu kỳ tế bào ở cơ thể đa bào	161
3.2. Xử lý nước thải	107	2.1. Hệ thống trung tâm phát động các quá trình cần thiết của chu kỳ	161
3.3. Phòng trừ sinh học	107	2.2. Hệ thống điều chỉnh chu kỳ - phức hệ các protein- kinaza	162
3.4. Vi sinh vật học công nghiệp	108	2.3. Chu kỳ của tế bào phôi sớm.	163
IV. Mô hình cấu trúc và chức năng của tế bào	108	2.4. Điều chỉnh chu kỳ tế bào ở nấm men	166

2.5. Điều chỉnh chu kỳ tế bào ở động vật có vú	171	2.4. So sánh phân bào nguyên nhiễm với phân bào giảm nhiễm	190
<i>Chương 7. PHÂN BÀO NGUYÊN NHIỄM</i>		2.5. Nhiễm sắc thể chồi bóng đèn	191
I. Đặc điểm của phân bào nguyên nhiễm (PBNN)	180	III. Vai trò của phân bào giảm nhiễm	191
1.1. Đối với Prokaryota	180	3.1. Phân bào giảm nhiễm - tạo giao tử	191
1.2. Đối với Eukaryota	180	3.2. Ý nghĩa tiến hóa của phân bào giảm nhiễm	192
II. Các kỳ của phân bào	180	Phần ba. SINH HỌC PHÂN TỬ VÀ TẾ BÀO ĐỐI VỚI CÔNG NGHỆ SINH HỌC	
2.1. Tiền kỳ	182	<i>Chương 9. TỪ KỸ THUẬT GEN ĐẾN CÔNG NGHỆ SINH HỌC</i>	
2.2. Trung kỳ sớm	182	I. Từ sinh học phân tử đến kỹ thuật gen	193
2.3. Trung kỳ	182	1.1. Kỹ thuật ADN tái tổ hợp	193
2.4. Hậu kỳ	183	1.2. Từ kỹ thuật gen đến công nghệ gen	195
2.5. Mạt kỳ	183	II. Những ứng dụng của công nghệ di truyền	198
2.6. Phân chia tế bào chất	183	2.1. Công nghệ di truyền trong việc bảo vệ sức khỏe con người	199
2.7. Thời gian của các kỳ và sự điều chỉnh phân bào	183	2.2. Công nghệ di truyền trong sản xuất nông nghiệp	202
III. Vai trò của phân bào nguyên nhiễm	185	<i>Chương 10. TỪ KỸ THUẬT NUÔI CẤY TẾ BÀO ĐẾN CÔNG NGHỆ TẾ BÀO</i>	
3.1. Phân bào và sinh trưởng	185	I. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào in vitro	207
3.2. Phân bào và sinh sản	185	1.1. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật	207
<i>Chương 8. PHÂN BÀO GIẢM NHIỄM</i>		1.2. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào thực vật	216
I. Sinh sản vô tính và sinh sản hữu tính	186	II. Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào trong công nghệ tế bào	219
1.1. Sinh sản vô tính	186	2.1. Công nghệ tế bào động vật	219
1.2. Sinh sản hữu tính	186	2.2. Công nghệ tế bào thực vật	224
II. Sơ đồ chung của phân bào giảm nhiễm	187	Tài liệu tham khảo	227
2.1. Sơ đồ chung	187		
2.2. Phân bào giảm nhiễm I	187		
2.3. Phân bào giảm nhiễm II	190		

CÔNG NGHỆ SINH HỌC LÀ GÌ ?

I - CÔNG NGHỆ SINH HỌC (CNSH) LÀ MỘT NGÀNH SẢN XUẤT

1.1. Khái niệm về CNSH

Có nhiều định nghĩa về CNSH nhưng đứng trên quan điểm thực tiễn sản xuất thì CNSH là "ngành sản xuất theo quy mô công nghiệp sử dụng các đối tượng là vật chất sống (cấp độ phân tử, tế bào, cơ thể, hệ sinh thái) để sản xuất ra các thành phẩm hàng hóa phục vụ lợi ích của con người và xã hội loài người".

1.2. Sự ra đời và phát triển của CNSH

Ra đời vào những năm 80 của thế kỷ XX, CNSH đã nhanh chóng trở thành ngành công nghệ mũi nhọn trong nền kinh tế trí thức.

Nền kinh tế trí thức dựa trên nền tảng sản xuất các sản phẩm, công cụ và dịch vụ là thành phẩm của lao động chất xám (trí thức) (với hàm lượng trên 70%). CNSH được xem là công nghệ mũi nhọn của nền kinh tế trí thức (cùng với công nghệ thông tin, công nghệ vật liệu mới và công nghệ tự động hóa...), bởi vì các công nghệ này được hình thành và phát triển trên nền tảng của những tri thức, những hiểu biết sâu sắc và khách quan các hiện tượng, các quy luật của thế giới sống trong đó có con người, nó có tác động to lớn trong việc con người tiến tới làm chủ tự nhiên và xã hội, đó cũng là đối tượng của ngành khoa học : *Sinh học hiện đại* mà tiền thân của nó là *Sinh học phân tử*.

Sinh học phân tử ra đời từ những năm 1953, thời điểm công bố công trình của Watson và Crick về mô hình cấu trúc phân tử của ADN - vật chất tạo nên các gen - đơn vị mang thông tin di truyền. Trên cơ sở nghiên cứu gen, nghiên cứu mã di truyền, cơ chế truyền đạt thông tin di truyền từ gen (ADN) → Protein (công cụ của sự sống) → Tính trạng (thực thể tồn tại của sự sống), nghiên cứu mối tương quan của hệ thống sống với môi trường tự nhiên và xã hội, Sinh học phân tử đã phát triển nhanh chóng và ngày nay đã trở thành Sinh học hiện đại, khi mà Sinh học phân tử là cơ sở để phát triển CNSH và CNSH lại trở thành cơ sở để phát triển Sinh học phân tử.

Không hiểu biết về gen, về mã di truyền, về phiên mã, dịch mã, không thể có công nghệ gen. Không hiểu biết mối tương quan giữa gen và protein, và với môi trường ở cấp độ tế bào, mô, cơ quan và cơ thể, không thể có công nghệ protein - enzyme, công nghệ tế bào, công nghệ nhân bản vô tính. Không có hiểu biết sâu sắc mối tương tác phức tạp đa chiều giữa hệ thống sống với môi trường, cái mà ta thường gọi là Sinh thái học, con người không thể cải thiện được môi trường sống của mình (công nghệ môi trường chống ô nhiễm và bảo vệ tài nguyên), cũng như tự cải tạo mình và cải tạo xã hội loài người.

Để biện minh cho hàm lượng tri thức thâm nhập trong CNSH ở mức độ nào, ta hãy xem xét một vài dẫn liệu sau đây : Tại sao các nhà kỹ thuật di truyền lại có thể thực hiện cấy chuyển gen người vào vi khuẩn *E.coli* để sản xuất các dược phẩm quý như HGH chữa cho em Kathy 10 tuổi khỏi bệnh lùn, đem lại hạnh phúc khôn tả cho gia đình em ? Tại sao ông Wilmut sử dụng nhân tế bào tuyến vú cừu giống Dorset để cấy ghép vào trứng cừu giống Blackface đã bị mất nhân và đã nhân bản vô tính thành công cừu Dolly làm cho thế giới phải kinh ngạc ? Với tri thức nào mà các nhà liệu pháp gen đã chữa trị cho em bé gái 4 tuổi bị bệnh SCID (severe combined immunodeficiency disease - bệnh thiếu hụt miễn dịch nguy kịch) thập tử nhất sinh ?

Với cơ sở phân tử nào mà các nhà công nghệ gen có thể tạo được giống cá hồi lớn gấp hàng chục lần cá hồi bình thường ? Các nhà chọn giống lúa tạo được giống lúa hạt to có nhiều màu sắc tự nhiên đẹp (vàng, xanh, hồng...), rất bổ dưỡng chứa nhiều β -caroten, tăng cường tính hấp thụ sắt cho cơ thể khi ăn gạo của giống lúa này ?

Chỉ có tri thức về Sinh học phân tử mới có thể trả lời được các câu hỏi trên đây và thực hiện được các công nghệ đã nêu trên đây.

1.3. Lợi ích của CNSH

Để cho dễ hiểu chúng ta có thể dẫn vài ví dụ sau đây :

- Trên thế giới có đến hàng chục triệu người bị bệnh tiểu đường, hàng ngày họ phải tiêm thuốc *insulin* để giảm lượng đường trong máu. Trước năm 1982, các hãng dược phẩm điều chế *insulin* từ tụy tạng lợn hoặc bò với giá thành rất cao, hơn nữa thuốc thường gây nên dị ứng cho 5% bệnh nhân. Từ năm 1982, sử dụng công nghệ di truyền (chuyển *gen-insulin* người vào vi khuẩn *E.coli* để vi khuẩn sản xuất *insulin* hàng loạt), các hãng dược phẩm đã sản xuất *insulin* theo quy mô công nghiệp, do đó làm hạ giá thành thuốc *insulin* hàng trăm lần, cung cấp đủ nhu cầu cho các bệnh nhân bị tiểu đường và không hề gây nên phản ứng phụ.

- Các nhà trồng cây thường sử dụng phương pháp lai giống hoặc phương pháp chiết, ghép... để tạo ra các giống cây tốt, nhưng không đáp ứng được nhu cầu về cây giống ngày càng nhiều của nền nông nghiệp tiên tiến. Các nhà CNSH đã sử dụng công nghệ sản xuất cây giống bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật *in vitro* (công nghệ vi nhân giống), kết hợp với công nghệ chuyển gen đã sản xuất được theo quy mô công nghiệp các giống cây rừng, cây ăn quả, cây rau, cây cảnh với số lượng nhiều nhất, trong thời gian nhanh nhất. Ví dụ, từ mô phân sinh một mầm củ khoai tây, qua 8 tháng nhân giống *in vitro* có thể sản xuất một lượng củ giống đủ cung cấp cho 40 hecta gieo trồng, hoặc từ một mẫu lá cây cọ dầu, qua một năm nhân giống vô tính có thể sản xuất được 5 triệu cây con đồng nhất có tính kháng bệnh cao, cho năng suất tới 6 tấn dầu trên một hecta, nhiều hơn hàng chục lần so với hướng dương, đậu tương hoặc lạc. Bằng công nghệ vi nhân giống *in vitro*, từ một đoạn cành hồng, trong một năm có thể sản xuất trên 400.000 cây giống cho hoa đẹp, đáp ứng nhu cầu của người chơi hoa và đặc biệt đã tạo ra được những màu hoa chưa hề có trong thiên nhiên như hồng tím, hồng đen.

- Bằng công nghệ chuyển gen, người ta đã sản xuất được nhiều giống cá cảnh chưa hề có trong thiên nhiên như cá vàng phát sáng, cá sọc ngũ sắc bán với giá đắt hàng trăm lần so với cá cảnh bình thường.

Cuộc sống con người càng ngày càng văn minh hiện đại nhưng cũng kéo theo các hậu quả nguy hiểm, đặc biệt là nạn ô nhiễm môi trường. CNSH đã giải quyết vấn đề ô nhiễm bởi các rác thải hữu cơ (phân, rác hữu cơ) bằng công nghệ khí sinh học (biogas) một cách có ích nhất, đem lại cuộc sống văn minh và tiện lợi cho nền nông nghiệp và nông dân toàn thế giới, đặc biệt là các nước đang phát triển như Trung Quốc, Ấn Độ, Việt Nam... Ở nông thôn, chúng ta phải sống chung với rác rưởi, phân gà, phân lợn, phân trâu bò, phân người hôi thối, ruồi nhặng, giun sán phát triển, kéo theo bao bệnh tật..., nấu ăn không có chất đốt, mùa màng thiếu phân bón.... Công nghệ khí sinh học đúng là "Ông Bụt" đã đem lại hạnh phúc cho nông dân. Chỉ cần xây một bể khí sinh học là chúng ta đã dọn sạch môi trường bẩn thỉu, có khí gas để đun sủi, có phân hữu cơ an toàn để bón cho cây trồng, thu nhập tăng cao, đời sống cải thiện, con em chúng ta hết bệnh...

Cái lợi rõ ràng nhất của CNSH thể hiện ở mức độ tăng trưởng giá trị hàng hóa trong những năm gần đây. Chúng ta hãy xem các thống kê về giá trị sản lượng của một số sản phẩm của CNSH trên thị trường thế giới : năm 1998 đạt khoảng 40 - 60 tỷ USD, năm 2001 đạt khoảng 215 tỷ USD và dự kiến đến năm 2010 sẽ đạt trên 1000 tỷ USD. Ngay từ bây giờ, nhiều công ty CNSH dám bỏ ra hàng trăm triệu đến hàng tỷ USD để đầu tư vào CNSH.

CNSH không chỉ đem lại lợi nhuận cao cho nhà sản xuất mà còn đóng góp vào công cuộc khai thác và sử dụng tối ưu nhất các tài nguyên và nguồn lực của đất nước, phục vụ phát triển sản xuất, nâng cao chất lượng đời sống của nhân dân, xây dựng nền sản xuất công nông nghiệp sinh thái bền vững, làm cho đời sống của con người càng no ấm, đất nước càng ngày càng giàu mạnh, tươi đẹp.

Bạn có thể thắc mắc, để làm CNSH phải đầu tư nhiều vốn và chỉ dành cho các nước giàu có, các nhà sản xuất lăm tiến nhiều của ! Còn con nhà nghèo thì làm CNSH thế nào được ! Xin thưa, điều đó đúng vì đầu tư vào CNSH tuy lợi nhuận cao nhưng khá tốn kém. Nhật Bản, Singapo đầu tư cho CNSH hàng tỷ USD và lôi kéo các nhà CNSH tài giỏi của Châu Á (trong đó có Việt Nam) đến làm việc với lương rất cao. Thế nhưng, CNSH không là của riêng ai. Nước nghèo, người nghèo vẫn làm được CNSH và vẫn thu được lợi nhuận cao. Đất nước Việt Nam ta thuộc loại nghèo của thế giới, nhưng để thoát khỏi nghèo khổ lại càng cần làm CNSH hơn ai hết. Người Việt Nam chúng ta có lòng yêu nước, yêu dân tộc, ham học, ham tìm hiểu, cần cù lao động, có nhiều sáng tạo, dám nghĩ dám làm. Đất nước Việt Nam có tài nguyên thiên nhiên phong phú và đa dạng, tiềm ẩn nhiều hiện tượng và quy luật biến đổi kỳ diệu. Chắc chắn rằng người Việt Nam có thể làm CNSH chính trên mảnh đất thân yêu của mình và sẽ thu được lợi nhuận to lớn. Những năm gần đây, nhiều gia đình nông dân đã bỏ ra khoảng chục triệu đồng để chăn nuôi, kết hợp làm bể biogas đã thu lợi tới 50 - 100 triệu đồng/năm và đã cải thiện được đời sống rõ rệt. Nhiều nông dân chưa học hết phổ thông đã dám ứng dụng CNSH vào nghề trồng lúa, trồng ngô, trồng hoa, nuôi cá, nuôi tôm... thu được lợi nhuận to lớn.

Tuy chưa được đầu tư nhiều, nhưng nhiều ngành CNSH cao như công nghệ chuyển gen, công nghệ dấu ấn ADN, công nghệ vi nhân giống cây trồng, cây hoa, công nghệ thụ tinh trong ống nghiệm... đã được ứng dụng tại nước ta và bước đầu đã có kết quả đáng khích lệ.

CNSH ngày càng phát triển, các kỹ thuật cũng như quy trình công nghệ ngày càng hoàn thiện, số lượng và chất lượng ngày càng cao, lợi nhuận ngày càng nhiều, cạnh tranh giữa các quốc gia và công ty càng gay gắt... Nhưng CNSH chỉ có thể phát triển được trên cơ sở khoa học Sinh học hiện đại mà cốt lõi vẫn là Sinh học phân tử. Những chương sách sau đây sẽ trang bị cho các bạn những kiến thức tối thiểu và cơ bản nhất về Sinh học phân tử và Sinh học tế bào.

II - GIỚI THIỆU MỘT SỐ NGÀNH NGHỀ CNSH

2.1. Các ngành nghề CNSH

Hiện nay CNSH đã phát triển và trở thành ngành công nghệ liên quan đến hầu như tất cả các ngành sản xuất hàng hóa và dịch vụ của đời sống xã hội, từ nông, lâm, ngư nghiệp đến y dược, công nghiệp chế biến bảo quản lương thực, thực phẩm, công nghiệp hóa - mỹ phẩm, công nghiệp vi tính, công nghiệp bảo vệ, làm sạch môi trường... cho đến pháp y, giáo dục cũng như xã hội - đạo đức học. Vì vậy thật khó có thể phân loại ngành nghề CNSH. Bảng sau đây chỉ ra một số hướng phục vụ của CNSH (được xem như hướng nghiệp về CNSH) :

Lĩnh vực	Ứng dụng
Nông, lâm, ngư nghiệp	Công nghệ tạo chủng vi sinh vật mới có ích. Công nghiệp lên men để sản xuất các chế phẩm. Công nghệ sản xuất giống cây trồng, vật nuôi chống chịu bệnh, thích nghi với các điều kiện sinh thái và cho năng suất cao.
Y dược	Công nghệ sản xuất vacxin, kháng sinh, kháng thể đơn dòng, các thuốc phòng và chữa bệnh. Liệu pháp gen và liệu pháp thay thế tế bào và mô. Sử dụng các bộ cảm biến sinh học, các chip sinh học để phân tích y tế và chẩn đoán bệnh.
Công nghiệp thực phẩm	Công nghệ sản xuất các loại thực phẩm mới có giá trị dinh dưỡng cao, có giá trị thuốc - dinh dưỡng, các chất bổ sung (các vitamin, các axit amin...). Công nghệ sản xuất protein đơn bào, các loại enzym.
Kiểm soát môi trường	Sử dụng các công nghệ xử lý, chế biến rác và phế thải. Công nghệ kiểm soát và dự đoán tình trạng ô nhiễm. Bảo tồn các hệ sinh thái tự nhiên và nhân tạo.
Năng lượng	Công nghệ biogas. Sản xuất ethanol, hydro làm nhiên liệu. Pin mặt trời.
Công nghiệp hóa chất	Công nghệ sản xuất các axit hữu cơ. Sản xuất các hóa chất làm vật liệu. Sản xuất các chất tẩy rửa. Sản xuất phân bón, thuốc trừ sâu sinh học...

2.2. CNSH và đạo đức sinh học

Tại sao lại đặt vấn đề đạo đức trong lĩnh vực CNSH ? Ta thường nghe nói đến đạo đức y tế bởi vì y tế là ngành nghề đụng chạm đến con người. Người thầy thuốc có đạo đức y tế là người "thầy thuốc như mẹ hiền", biết lấy tính mệnh của người bệnh làm quý, hết lòng hết sức cứu chữa người bệnh, không vì tiền tài lợi lộc mà vi phạm đạo đức y tế.

CNSH là ngành sản xuất lấy đối tượng cơ thể sống, trong đó có con người để xử lý chế biến tạo nên các thành phẩm, nhằm mục đích phục vụ cho cuộc sống của con người và cả xã hội loài người. Như vậy, bản chất của CNSH đã mang tính đạo đức sâu sắc. Nhưng trong quá trình phát triển CNSH, do nhiều lý do khác nhau như nóng vội, vì lợi nhuận cá nhân, cục bộ, vì mưu đồ đen tối chống nhân loại của các thế lực phản động... nhiều vấn đề đạo đức của CNSH đã được đặt ra và trở thành đề tài quan tâm của các nhà khoa học, của các nhà sản xuất, các chính phủ và toàn nhân loại. Những vấn đề như : lương thực, thực phẩm chuyển gen có độc hại hay không ? Cây con chuyển gen có gây mất cân bằng hệ sinh thái tự nhiên hay không ? Sinh con trong ống nghiệm, nhân bản vô tính người, liệu pháp gen có vi phạm đạo đức xã hội không ? Đề cập đến vấn đề này, nhiều nhà khoa học có uy tín cho rằng, con người trong quá trình nghiên cứu thế giới, nghiên cứu bản thân sẽ phát hiện ra nhiều quá trình, nhiều quy luật mới và không ngừng ứng dụng các kiến thức đó vào các lĩnh vực sản xuất và đời sống để cải tạo thế giới, cải tạo bản thân, nhằm mục đích phục vụ cho lợi ích của toàn thể xã hội loài người. Trong quá trình nghiên cứu và sản xuất không tránh khỏi rủi ro, tác hại, nhưng con người với trí thông minh, với phương thức quản lý tốt sẽ đề ra nhiều biện pháp hữu hiệu để ngăn chặn mặt có hại và phát huy mặt có lợi. Bản thân các thành tựu khoa học là vô hại, nó chỉ trở thành có hại hay có lợi là khi được sử dụng với mục đích nào ? Năng lượng vật lý, năng lượng hóa học cũng như năng lượng sinh học bản chất là vô hại ; nhưng đem ứng dụng làm bom nguyên tử, làm bom napan, bom vi trùng để tiêu diệt hàng loạt người là vô đạo đức, là có hại, nhưng nếu đem ứng dụng vào mục đích hòa bình sản xuất ra của cải vật chất để cải thiện cuộc sống của con người thì sẽ là có lợi và có đạo đức. Nhiều thành tựu của CNSH được áp dụng trong xã hội đã làm đảo lộn nhiều quan niệm, quy pháp truyền thống của xã hội. Sinh con trong ống nghiệm có đến 3 - 4 thành viên tham gia (thay vì chỉ có vợ và chồng) thì em bé sinh ra là con ai ? Cấy ghép gen, cấy ghép tế bào và cơ quan của người này cho người khác bằng công nghệ gen, công nghệ tế bào gốc, bằng nhân bản vô tính thì anh còn là anh ? Và anh là ai trước pháp luật ? Đó cũng là những vấn đề thuộc đạo đức sinh học.

Nhiều nhà sản xuất lợi dụng CNSH để tạo nên các sản phẩm chuyển gen không qua kiểm soát, tạo nên các cơ quan từ nhân bản vô tính người để trục lợi cá nhân, sản xuất các bom vi trùng để làm chiến tranh giết người hàng loạt... như vậy họ đã vi

phạm đạo đức chống lại loài người và dư luận xã hội lên án họ, đấu tranh chống và nghiêm cấm các hoạt động của họ. Cũng vì vậy, các hoạt động sản xuất có liên quan đến CNSH cần được kiểm soát bởi pháp chế nhà nước và bởi dư luận, để bảo đảm độ an toàn cho xã hội. Đó cũng là điều mà các nhà nghiên cứu, các nhà sản xuất và kinh doanh về lĩnh vực CNSH cần quan tâm.

Trong những năm 70 của thế kỷ XX, kỹ thuật di truyền ra đời, xã hội đã lên tiếng cảnh báo về nguy cơ "chiến tranh vũ khí gen", năm 1975, hơn 140 nhà di truyền học đã họp hội nghị tại Aisilomar (Caloformia - Mỹ) nhất trí đề ra nhiều quy pháp hành nghề để bảo đảm an toàn và đạo đức cho công nghệ di truyền.

Ngày nay khi xã hội cảnh báo nguy hại về đạo đức trong nhân bản vô tính người thì nhiều nước và Liên hiệp quốc đã nghiêm cấm nhân bản vô tính người với mục đích sinh sản, nghĩa là chỉ cho phép tiến hành nhân bản vô tính các tế bào, mô, cơ quan với mục đích y tế có kiểm soát chặt chẽ, còn nhân bản sản sinh ra con người toàn diện bị nghiêm cấm.

SỰ RA ĐỜI VÀ PHÁT TRIỂN CỦA SINH HỌC PHÂN TỬ

Chương I

CÁC ĐẠI PHÂN TỬ SINH HỌC VÀ VAI TRÒ CỦA CHÚNG TRONG CƠ THỂ SỐNG

Thuật ngữ Sinh học phân tử đã được F. Astbury đề nghị từ những năm 1945, nhưng Sinh học phân tử chỉ được thực sự khai sinh vào năm 1953, năm công bố công trình của J. Watson và F. Crick về mô hình cấu trúc sợi xoắn kép ADN. ADN là vật chất mang thông tin di truyền và thông qua protein quyết định toàn bộ đặc tính cấu trúc và chức năng của cơ thể sống. ADN và protein là những đại phân tử sinh học quan trọng bậc nhất đối với cơ thể sống.

Để có thể hiểu được các hiện tượng, các quy luật của sự sống và để áp dụng các kiến thức của Sinh học phân tử vào trong các ngành CNSH, trước tiên ta cần tìm hiểu về cấu trúc, chức năng của các đại phân tử sinh học, về mối tương quan giữa chúng trong hoạt động sống ở tất cả các cấp độ tổ chức : từ phân tử, tế bào đến cơ thể và quần thể.

Nửa sau của thế kỷ XX, Sinh học phân tử đã đạt nhiều thành tựu xuất sắc trong nghiên cứu gen (gene) và hệ gen (genome) cả về kiến thức cũng như kỹ thuật xử lý thao tác : ra đời khoa học về gen hay *Gen học* (Genomic). Nhưng để làm sáng tỏ quá trình từ Protein → Tính trạng thì kiến thức của Genomic chưa đủ mà cần phải nghiên cứu protein (protein) và hệ protein (proteome) cả về cấu trúc và chức năng tương tác trong hệ cũng như với môi trường sống cụ thể. Đó là đối tượng của một ngành khoa học mới, được gọi là khoa học về hệ protein hay *Protein học* (Proteomic). Kết hợp giữa Gen học với Protein học và Tin học (Informatic) đã ra đời khoa *Sinh tin học* (Bioinformatic) và sẽ là khoa học mũi nhọn của Sinh học của thế kỷ XXI.

I - PROTEIN

1.1. Cấu trúc và chức năng của protein

Vào năm 1838, nhà hóa học người Hà Lan Johan Mulder đã thấy rõ vai trò quan trọng của protein đối với cơ thể cho nên đã đặt cho nó cái tên "*Protein*" xuất phát từ thuật ngữ "*Proteios* có nghĩa là : tôi là đầu tiên". Vào cuối thế kỷ XIX, F. Engels nhà triết học duy vật biện chứng lỗi lạc đã đánh giá vai trò của protein bằng định đề : "*Sống là phương thức tồn tại của các thể protein, ở đâu có sự trao đổi chất của protein thì ở đấy có sự sống*".

Protein là những chất trùng hợp sinh học thuộc loại các đại phân tử (macromolecule) có khối lượng phân tử rất lớn, đạt tới hàng nghìn và hàng chục nghìn dalton (Da). Chúng chiếm khối lượng 80% khối lượng khô của tế bào. Chúng có cấu tạo rất phức tạp và có vai trò quyết định trong cơ thể sống. Protein là vật liệu xây dựng nên tế bào và mô. Protein là cơ sở phân tử của tất cả hoạt động sống của cơ thể. Bảng sau đây cho ta một khái niệm khái quát về chức năng đa dạng của protein trong cơ thể sống (bảng 1.1).

Bảng 1.1. Chức năng của protein trong cơ thể

Loại protein	Chức năng	Ví dụ
Protein cấu trúc	Cấu trúc, nâng đỡ.	Collagen và elastin tạo nên cấu trúc sợi rất bền của mô liên kết, dây chằng, gân. Keratin tạo cấu trúc chắc của da, lông, móng. Protein tơ nhện, tơ tằm tạo nên độ bền vững của mạng nhện, vỏ kén.
Protein enzym	Xúc tác sinh học : tăng nhanh, chọn lọc các phản ứng sinh hóa.	Các enzym thủy phân trong dạ dày phân giải thức ăn : amilaza phân giải tinh bột, pepxin phân giải protein, lipaza phân giải lipid.
Protein hoocmon	Điều hòa các hoạt động sinh lý.	Insulin và glucagon do đảo tụy tiết ra có tác dụng điều hòa hàm lượng glucozo trong máu động vật có xương sống.
Protein vận chuyển	Vận chuyển các chất.	Hemoglobin chứa trong hồng cầu động vật có xương sống, có vai trò vận chuyển ôxy từ phổi qua dòng máu đến các tế bào.
Protein vận động	Vận động.	Actin, miozin có vai trò vận động cơ. Tubulin có vai trò vận động lông, roi.
Protein bảo vệ	Bảo vệ cơ thể chống bệnh tật.	Interferon chống virut. Kháng thể chống vi khuẩn gây bệnh.
Protein thụ quan	Cảm nhận, đáp ứng các kích thích của môi trường.	Thụ quan màng của tế bào thần kinh nhận biết các tín hiệu hóa học do các tế bào thần kinh khác tiết ra (chất trung gian thần kinh) và dẫn truyền tín hiệu.
Protein dự trữ	Dự trữ nguồn axit amin.	Ovalbumin lòng trắng trứng là nguồn cung cấp axit amin cho phôi phát triển. Casein trong sữa mẹ là nguồn cung cấp axit amin cho con. Trong hạt cây có chứa nguồn protein dự trữ cần cho hạt nảy mầm.

Ngày nay Sinh học phân tử đã khẳng định tất cả hoạt động sống bình thường và bệnh tật đều có cơ sở protein của nó. Tất cả hoạt động sống như trao đổi chất, sinh trưởng phát triển, sinh sản, cảm ứng thích nghi với môi trường... đều có cơ sở protein. Bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm có cơ sở protein : do sai lệch trong *hemoglobin*. Bệnh ung thư có cơ sở protein : do sai lệch trong các protein có liên quan đến việc điều chỉnh chu trình tế bào và liên kết tế bào. Bệnh bò điên, cừu điên có cơ sở protein : do sai lệch trong phân tử protein *prion*. Các nhà chẩn đoán ung thư đã sử dụng chỉ tiêu α -fetoprotein để chẩn đoán sớm ung thư gan. Để chẩn đoán bệnh nhiễm khuẩn, nhiễm virus có thể xét nghiệm qua sự có mặt *kháng thể* (protein) đặc hiệu trong máu...

Để có thể hiểu được chức năng đa dạng của protein, cần tìm hiểu cấu trúc của phân tử protein.

Protein có đến 4 cấp cấu trúc :

1.1.1. Cấu trúc bậc 1 - các axit amin

Protein là chất trùng hợp (polime) được cấu tạo từ nhiều đơn hợp (monome) là các *axit amin*. Trong cơ thể sống, người ta đã phát hiện được rất nhiều loại axit amin, nhưng chỉ có 20 loại axit amin là đơn phân cấu tạo nên protein (xem bảng 1.2).

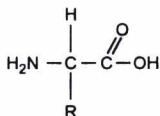
Bảng 1.2. Các axit amin và tính chất của chúng

Tên axit amin	Viết tắt	Tính chất
Glixin (glycine)	Gly	Không phân cực, kỵ nước
Alanin (Alanine)	Ala	Không phân cực, kỵ nước
Valin (Valine)	Val	Không phân cực, kỵ nước
Loxin (Leucine)	Leu	Không phân cực, kỵ nước
Izôloxin (Isoleucine)	Ile	Không phân cực, kỵ nước
Mêtionin (Methionine)	Met	Không phân cực, kỵ nước
Phênilalanin (Phenylalanine)	Phe	Không phân cực, kỵ nước
Tryptophan (Tryptophan)	Trp	Không phân cực, kỵ nước
Prôlin (Proline)	Pro	Không phân cực, kỵ nước
Xêrin (Serine)	Ser	Phân cực, ưa nước
Trênonin (Treonine)	Thr	Phân cực, ưa nước
Xistein (Cysteine)	Cys	Phân cực, ưa nước
Tirozin (Tyrosine)	Tyr	Phân cực, ưa nước
Axparagin (Asparagine)	Asn	Phân cực, ưa nước
Glutamin (Glutamine)	Gln	Phân cực, ưa nước
Axit axpactic (Acid aspartic)	Asp	Tích điện (axit)
Axit glutamic (Acid glutamic)	Glu	Tích điện (axit)
Lizin (Lysine)	Lys	Tích điện (bazo)
Acginin (Arginine)	Arg	Tích điện (bazo)
Hixtidin (Histidine)	His	Tích điện (bazo)

Về phương diện dinh dưỡng học, người ta thường phân biệt loại *axit amin thay thế* và *axit amin không thay thế*. Khi chúng ta ăn nhiều loại thức ăn đậm (protein) thực vật hay động vật, protein sẽ được tiêu hóa và phân giải thành các loại axit amin ở trong dạ dày và ruột non, và chúng được hấp thụ vào cơ thể để sử dụng như là nguyên liệu khởi đầu xây dựng nên các loại protein đặc thù cho cơ thể chúng ta. Để xây dựng được đủ loại protein (ước tính có đến 100.000 loại) phục vụ cho hoạt động sống của cơ thể, cần có đủ 20 loại axit amin. Các axit amin thay thế là những axit amin mà cơ thể chúng ta có thể tự tổng hợp được, còn các axit amin không thay thế là các axit amin mà cơ thể chúng ta không thể tổng hợp được mà phải thu nhận từ thức ăn. Đó là các axit amin sau : valin, loxin, mêtionin, tryptophan, trêonin, hixtidin, lizin... Thức ăn động vật (thịt, trứng, sữa...) có giá trị dinh dưỡng cao vì chứa nhiều axit amin không thay thế. Thức ăn thực vật có giá trị dinh dưỡng thấp vì chứa ít loại axit amin không thay thế. Đối với tuổi đang trưởng thành, nên ăn đủ thức ăn động vật, không nên ăn chay vì có thể dẫn tới bị suy dinh dưỡng. Ngày nay nhờ công nghệ biến đổi gen, người ta đã tạo được nhiều giống cây lương thực chứa nhiều loại axit amin không thay thế (ví dụ, ngô giàu lizin...).

Axit amin là phân tử được cấu tạo gồm C, H, O, N, trong đó nguyên tử C là cái khung trung tâm liên kết với 4 nhóm phân tử khác nhau, trong đó có 3 nhóm giống nhau cho tất cả các axit amin (nhóm - NH₂ gọi là *nhóm amin* ; nhóm -COOH gọi là *nhóm cacboxin* ; và -H), còn nhóm thứ 4 (gốc -R) là nhóm khác nhau ở các axit amin khác nhau. Ví dụ, gốc R của glixin là -H, của alanin là -CH₃, của valin là -CH₃- CH- CH₃, v.v....

Công thức chung của axit amin là :

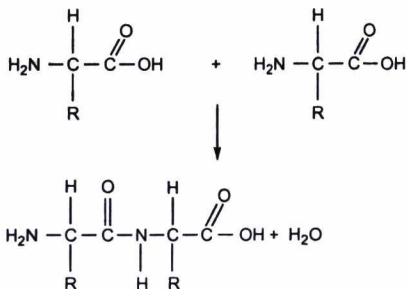


Gốc R quy định tính chất hoá học khác biệt giữa các axit amin (có thể là axit, bazơ, phân cực hoặc không phân cực - xem bảng trên), đồng thời chúng cũng quy định nên đặc tính cấu tạo và chức năng của phân tử protein khi chúng tham gia vào thành phần của protein đó. Ví dụ, trong enzym những nhóm gốc R đặc thù quy định nên trung tâm hoạt tính, là vùng mà ở đó enzym liên kết tạm thời với phân tử cơ chất mà chúng xúc tác phản ứng.

Các axit amin liên kết với nhau theo tuyến tính tạo nên chuỗi dài nhờ các liên kết peptit (hình 1.1).

Liên kết peptit (-CO-NH-) là liên kết đồng hóa trị, được thành lập giữa nhóm amin của axit amin này với nhóm cacboxin của axit amin bên cạnh.

Phản ứng tổng hợp trên thường được gọi là phản ứng trùng hợp mất nước, bởi vì khi 2 axit amin liên kết với nhau sẽ giải thoát phân



Hình 1.1. Liên kết peptit được thành lập giữa 2 axit amin

từ H_2O . Nếu có hai axit amin liên kết với nhau - tạo nên chất *dipeptit*, nếu là ba axit amin - *tripeptit*, nếu số axit amin không nhiều (dưới 10) - được gọi là *oligopeptit*, còn số axit amin trong chuỗi rất nhiều (hàng chục, hàng trăm) - được gọi là *polipeptit*. Protein có thể gồm một hoặc nhiều chuỗi polipeptit.

Số lượng, thành phần và trình tự sắp xếp của các axit amin trong chuỗi polipeptit - thể hiện cấu trúc bậc 1 của protein. Chuỗi polipeptit có hướng từ trái sang phải bắt đầu từ gốc amin - NH_2 của axit amin đầu tiên và kết thúc ở gốc cacboxin - $COOH$ của axit amin cuối cùng.

Cấu trúc bậc 1 của protein quy định nên tính đặc thù của phân tử protein, đồng thời quy định nên cấu trúc không gian của protein, có nghĩa là quy định chức năng của protein. Nếu trong chuỗi polipeptit có sự mất hoặc thừa hoặc thay đổi trình tự (dù chỉ một axit amin) sẽ dẫn tới thay đổi tính đặc thù và chức năng của protein. Trong chuỗi polipeptit có chứa các axit amin đặc thù quy định vùng hoạt tính chức năng đặc thù của protein như trung tâm hoạt tính của enzym (liên kết với cơ chất), trung tâm nhận biết các phân tử khác nhau (vùng nhận biết hoocmon của thụ quan), vùng liên kết với ADN, vùng chứa địa chỉ nơi mà protein cần được vận chuyển đến (ty thể, lizoxom, màng sinh chất, nhân, xuất ra ngoài tế bào...).

Nhiều đột biến gen dẫn đến làm sai lệch trong chuỗi polipeptit nhất là sai lệch trong các vùng chức năng của protein đều gây nên nguy hại cho cơ thể. Ví dụ : bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm là do axit glutamic (axit amin tích điện, axit) ở vị trí số 6 bị thay thế bởi valin (axit kỵ nước) trong chuỗi β của hemoglobin dẫn tới làm thay đổi tính năng của hemoglobin trong việc chuyên chở oxy, dẫn tới làm thay đổi hình dạng hồng cầu (trở thành hình lưỡi liềm) và gây ra bệnh thiếu máu.

1.1.2. Cấu trúc bậc 2 - Xoắn α và gấp β (hình 1.2)

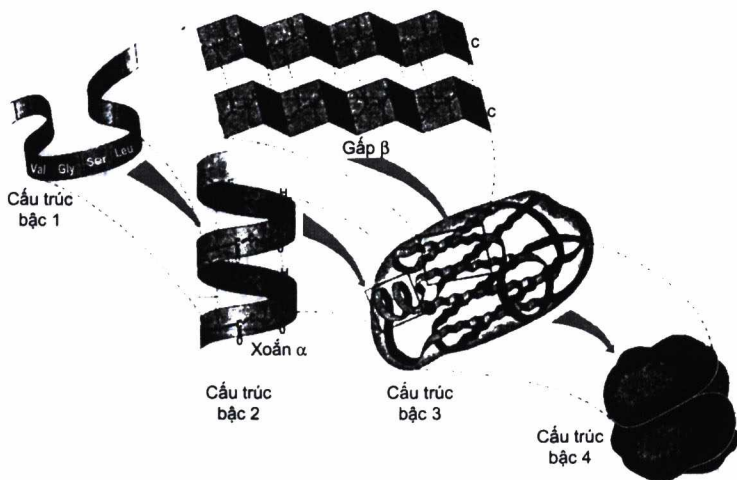
Các chuỗi polipeptit không phải là một mạch thẳng mà chúng có thể ở dạng xoắn α hoặc gấp khúc β , đó là cấu trúc bậc 2 của protein. Các liên kết hydro đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì các cấu trúc bậc 2 của chuỗi polipeptit. Sự biến đổi trong cấu trúc bậc 2 của protein gây ảnh hưởng đến hoạt tính chức năng của protein. Một chuỗi polipeptit có thể chứa cả xoắn α và gấp β . Cấu trúc bậc 2 là dạng trung gian chuyển tiếp để chuỗi polipeptit hình thành cấp cấu trúc phức tạp hơn, đó là cấu trúc bậc 3.

1.1.3. Cấu trúc bậc 3 và bậc 4 (hình 1.2)

Chuỗi polipeptit ở dạng xoắn hoặc gấp khúc có thể cuộn lại theo nhiều cách tạo nên thù hình không gian - được gọi là cấu trúc bậc 3 (cấu trúc 3D) của protein. Cấu trúc 3D của protein quy định nên hoạt tính chức năng của protein. Cấu trúc 3D được tạo nên bởi các liên kết yếu như liên kết ion, liên kết kỵ nước hoặc bởi các liên kết disunphit (giữa 2 axit amin có chứa sunphua). Khi có tác động của nhiệt, độ pH hoặc hoá chất độc sẽ dẫn tới làm thay đổi thù hình 3D của protein (được gọi là sự biến tính của protein), sẽ dẫn tới việc huỷ hoại chức năng của chúng và từ đó dẫn tới trạng thái sinh lý bệnh. Một ví dụ điển hình là phân tử prion lành có cấu trúc 3D gồm 3 chuỗi α và 2 chuỗi β nhưng khi một chuỗi α biến thành chuỗi β , chúng bị biến đổi cấu hình và là nguyên nhân gây nên bệnh bò điên xố não. Phân tử protein biến đổi là do sự đột biến trong gen mã hóa cho prion gây nên, nhưng khi prion đã bị biến đổi, chúng chống chịu được với các enzym phân giải và tác nhân tiệt trùng, hơn

nữa chúng có thể gây biến đổi các prion lành thành prion bệnh, vì vậy chúng trở thành phân tử gây truyền nhiễm bệnh.

Khi protein được cấu tạo gồm 2 chuỗi polipeptit trở lên thì protein đó có cấu trúc bậc 4. Ví dụ : hemoglobin có đến 2 chuỗi α và 2 chuỗi β .



Hình 1.2. Cấu trúc bậc 1, 2, 3 và bậc 4 của phân tử protein

Khi mới được tổng hợp, protein ở dạng chuỗi polipeptit sau đó chúng sẽ hình thành cấu trúc không gian đặc trưng nhờ một loại protein đặc biệt được gọi là *chaperon* và được chuyên chở đến các địa chỉ cần thiết như bào quan, nhân, màng sinh chất hay xuất ra ngoài tế bào để thực thi chức năng của chúng.

Tùy theo cấu trúc bậc 3 và bậc 4 người ta phân biệt : protein cấu chiếm đa số và thực hiện nhiều chức năng sinh lý quan trọng trong tế bào (albumin, globulin, enzym, histon...), và protein sợi thường tạo nên các mô nâng đỡ bền chắc (collagen, keratin...).

Trong tế bào, nhiều protein khi thực hiện chức năng cấu trúc hoặc sinh lý thường liên kết với các phân tử hữu cơ khác tạo nên các phân tử phức tạp hơn như liên kết với lipid (lipoprotein), với glucit (glycoprotein), với axit nucleic (nucleoprotein), với phân tử sắc tố (chromoprotein).

Trong tế bào protein luôn được tổng hợp, phân giải và thay thế. Tất cả protein đều được tổng hợp trên ribosome theo bộ mã của mRNA (là phiên mã của gen mã hóa cho protein đó), khi chúng không còn được sử dụng hoặc bị sai lệch, chúng sẽ bị phân giải bằng nhiều phương thức : bằng các enzym tự do trong tế bào chất và trong dịch nhân, bằng phức hợp *proteasom* hoặc trong các bào quan (mạng lưới nội chất, lysosome).

Proteasom (proteasome) là cấu trúc hình ống, trong đó có chứa các enzym *protease* phân giải protein. Nhiều protein có chứa các axit amin đặc thù liên kết với một loại protein đặc thù là *ubiquitin*. Ubiquitin sẽ dẫn dắt protein cần phân giải đến *proteasom* và chúng sẽ bị

phân giải ở đó. Nhiều protein được đưa vào *lizoxom* và được thủy phân ở đây. Các sản phẩm phân giải của protein là các axit amin, chúng cũng là nguồn cung cấp axit amin cho cơ thể.

Trong tế bào, nhiều dạng protein tuy có cấu trúc bậc 1 gần tương tự nhau nhưng có thù hình khác nhau và thực hiện cùng một loại chức năng sinh lý, được gọi là các *protein đồng dạng* (isoformes) hay còn gọi là *isoenzym*. Các protein đồng dạng thường tập hợp thành từng *họ protein*. Ví dụ, họ protein chaperon, họ protein immunoglobulin...

Tập hợp tất cả protein trong một cơ thể được gọi là *hệ protein* (proteome). Mỗi một protein có thể chỉ là một chuỗi polipeptit hoặc gồm nhiều polipeptit. Mỗi chuỗi polipeptit thường được mã hóa bởi một gen (nói chính xác hơn bởi một loại mARN). Các họ protein được mã hóa bởi các họ gen. Người ta đã xác định được là ở Eucaryota có khoảng 4000 đến 10000 họ protein, trong đó có 3000 họ protein chủ yếu, và có khoảng 1000 họ tương đồng với Procaryota. Người ta ước tính trong cơ thể người có khoảng 80000 - 100000 loại protein được mã hóa bởi khoảng 32000 gen. Cũng vì có sự tương đồng và đa hình về protein qua quá trình tiến hóa mà các nhà phân loại học phân tử có thể sử dụng phương pháp so sánh tính đa hình của protein (ví dụ của hemoglobin) để xác lập cây phát sinh chủng loại của các loài.

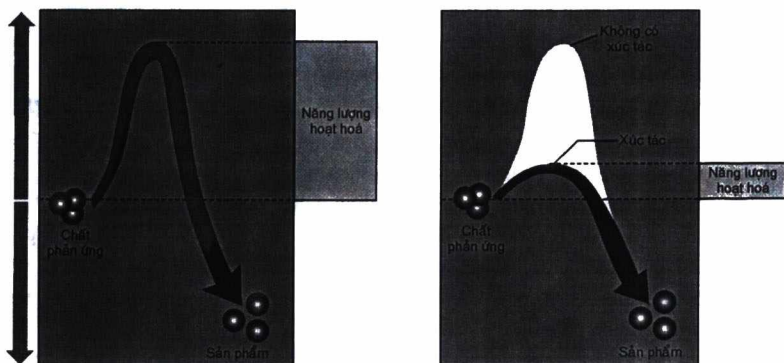
Trên cơ sở hiểu biết cấu trúc bậc 1 và cấu trúc không gian của protein cùng cơ chế hoạt động của protein trong tế bào, CNSH có thể thiết kế protein (bằng công nghệ tin sinh học) và chế xuất các sản phẩm protein khác nhau để sử dụng trong nhiều ngành công nghiệp như công nghiệp dược phẩm, công nghiệp thực phẩm, công nghiệp tẩy giặt... Ta hãy xem xét một số protein đóng vai trò quan trọng trong cơ thể sống.

1.2. Enzym - chất xúc tác sinh học

Enzym - là những protein đóng vai trò chất xúc tác - có tác động tăng cường tốc độ các phản ứng hoá học bằng cách trực tiếp tương tác với các chất tham gia phản ứng, trong đó chúng không hề bị biến đổi thành phần, vì vậy enzym được sử dụng nhiều lần.

Ta hãy xem xét xem bằng cách gì mà enzym có thể tăng nhanh tốc độ của phản ứng hóa học. Ta đều biết rằng các phản ứng hóa học trong điều kiện ngẫu nhiên sẽ diễn ra vô cùng chậm chạp đến nỗi hình như không nhận thấy được. Ví dụ, ta để dung dịch saccarozơ (đường ăn) trong nhà hàng năm mà không hề bị thủy phân thành glucozơ. Nhưng nếu như ta cho thêm vào dung dịch một tí enzym *saccaraza* thì tất cả saccarozơ sẽ phân giải thành glucozơ chỉ trong vòng một giây. Theo quy luật nhiệt động học, để phản ứng hóa học được xảy ra thì cần có sự chuyển đổi năng lượng giữa tập hợp phân tử với môi trường xung quanh. Các phân tử tham gia phản ứng cần hấp thụ năng lượng từ môi trường xung quanh để bẻ gãy các liên kết tạo thành phân tử sản phẩm. Năng lượng khởi nguyên phát động phản ứng là năng lượng cần thiết để bẻ gãy liên kết của các phân tử tham gia phản ứng - được gọi là *năng lượng hoạt hóa* (thường được ký hiệu là E_A). Trong tự nhiên ở điều kiện bình thường, năng lượng hoạt hóa được cung cấp bởi năng lượng của môi trường ở dạng nhiệt năng. Để phản ứng có thể xảy ra nhanh chóng cần tăng nhiệt độ môi trường (đun nóng). Nhưng đối với cơ thể sống, nếu tăng nhiệt độ lên cao sẽ giết chết tế bào, vì vậy tế bào cần

có enzyme để thực hiện các phản ứng hóa học trong điều kiện nhiệt độ bình thường của cơ thể ($37^{\circ} - 40^{\circ}\text{C}$). Như vậy enzyme có tác dụng làm giảm mức năng lượng hoạt hóa của phản ứng (hình 1.3).



Hình 1.3. Enzyme làm giảm năng lượng hoạt hóa

Enzyme có bản chất là protein, vì vậy chúng có thù hình không gian xác định và thù hình này có thể biến đổi tùy điều kiện. Enzyme (E) xúc tác các phản ứng bằng cách đầu tiên liên kết với cơ chất (chất tham gia phản ứng - S) ở vùng *trung tâm hoạt tính* (catalytic center- active site) tạo nên phức hợp tạm thời (E+S), tiếp theo các liên kết giữa các chất tham gia phản ứng bị bẻ gãy hoặc được thành lập và cuối cùng các sản phẩm (P) được hình thành, enzyme được giải phóng và được tái sử dụng (hình 1.4).

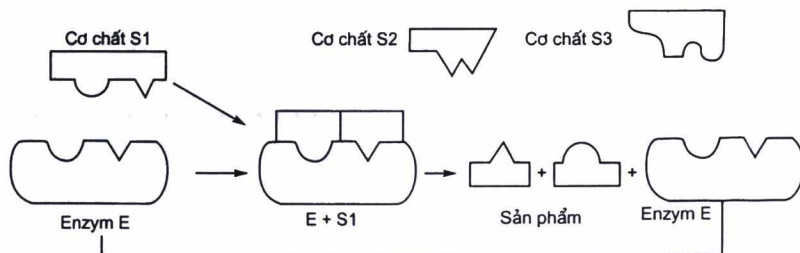
Enzyme (E) + cơ chất (S)



Phức hệ Enzyme - cơ chất (E + S)



Enzyme (E) + sản phẩm (P)



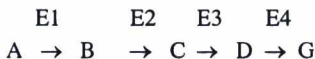
Hình 1.4. Sơ đồ về cơ chế tác động của enzyme

Enzym E chỉ xúc tác cho cơ chất S1 vì hình thù của S1 là phù hợp với hình thù của trung tâm hoạt tính của E, do đó phức hệ E+S1 được tạo thành. Thực ra cơ chế tác động của enzym phức tạp và đa dạng hơn nhiều. Hình thù của trung tâm hoạt tính của enzym có thể biến đổi nhờ một trung tâm khác của enzym được gọi là trung tâm điều chỉnh (allosteric site), đến lượt mình trung tâm điều chỉnh được điều chỉnh bởi các nhân tố nội bào và ngoại bào. Kiểu điều chỉnh như vậy được gọi là điều chỉnh dị hình không gian (allosteric regulation). Bằng cách điều chỉnh linh hoạt như vậy nên enzym hoạt động đáp ứng với mọi yêu cầu của tế bào và cơ thể trong những điều kiện sống thay đổi.

Enzym là chất xúc tác có tính đặc thù đối với các phân tử và phản ứng nhất định. Vì vậy trong cơ thể người có đến hàng nghìn phản ứng sẽ có đến hàng nghìn loại nhóm enzym đặc thù khác nhau.

Nhiều loại enzym đóng vai trò điều chỉnh hoạt tính của các protein hoặc các enzym khác. Ví dụ điển hình là các enzym kinaza và photphataza. Chúng điều chỉnh hoạt tính của các protein bằng cách photphorin hóa (gắn photpho nhờ kinaza) hoặc giải photpho (tách photpho nhờ photphataza).

Enzym không có khả năng phát động các phản ứng, chúng chỉ có tác động tăng nhanh tốc độ phản ứng. Tuy vậy chúng đóng vai trò rất quan trọng vì có chúng thì các quá trình sinh lý mới xảy ra đủ nhanh để có thể đáp ứng kịp thời các thay đổi của môi trường sống. Enzym thường không hoạt động riêng lẻ mà liên kết hoạt động trong một dãy phản ứng trao đổi chất.



Chúng hoạt động liên hợp và được điều chỉnh theo mối liên hệ ngược (feed back), sản phẩm của phản ứng trước có thể kích thích hoặc ức chế hoạt động của enzym của phản ứng sau đó. Sự thiếu hụt hoặc sai lệch trong hoạt động của enzym trong dãy sẽ gây nên các sai lệch trong hoạt động trao đổi chất và dẫn đến các bệnh về trao đổi chất. Ví dụ, các bệnh ancapton niệu, pheninxeto niệu.

Nhiều enzym ngoài cấu phần protein còn có các cấu phần khác tham gia được gọi là cofactor. Cofactor có thể là các chất vô cơ như các ion (kẽm, sắt, đồng...) hoặc chất hữu cơ (thường được gọi là coenzym) như các vitamin. Từ đây ta cũng thấy được tầm quan trọng của các ion vô cơ cũng như của vitamin đối với cơ thể sống.

Người ta đặt tên và phân loại các enzym bằng cách thêm đuôi -aza vào tên gọi các cơ chất hoặc phản ứng mà chúng xúc tác. Ví dụ : enzym phân giải protein được gọi là proteaza. Enzym xúc tác các phản ứng thủy phân - gọi là hydrolaza.

Nhiều nhân tố như độ pH, nhiệt độ, các chất độc, nồng độ cơ chất v.v... đều có ảnh hưởng đến hoạt tính của enzym. Đa số enzym hoạt động trong điều kiện tối ưu về độ pH (thường là pH = 7), về nhiệt độ (thường là 40°C). Tuy nhiên có nhiều trường hợp đặc biệt,

ví dụ, enzym pepxin trong dạ dày hoạt động trong điều kiện pH axit ($\text{pH} = 2$), các vi khuẩn chịu nhiệt có enzym hoạt động được trong điều kiện nhiệt độ rất cao (100°C) hoặc rất thấp (0°C).

Trong cơ thể enzym được phân bố tự do trong tế bào chất (ví dụ các enzym của quá trình đường phân), trong dịch nhân (ví dụ các enzym tái bản mã, phiên mã...), hoặc định vị trong màng sinh chất (ví dụ adenincyclaza), trong các bào quan (ví dụ enzym thủy phân trong lizoxom, các enzym của chu trình Krebs trong ty thể) hoặc được chế xuất ra ngoài tế bào (ví dụ amilaza trong nước bọt, pepxin, tripxin trong dạ dày...).

1.3. Hoocmon – chất điều chỉnh

1.3.1. Tính chất và vai trò của hoocmon

Hoocmon (hormone) (từ tiếng Hi Lạp *hormaein* có nghĩa là *kích thích*) là những chất hóa học do tế bào hoặc cơ quan tiết ra trong dịch cơ thể thực vật và động vật (trong dịch mô hoặc dòng máu) có tác dụng điều hòa hoạt động của *tế bào đích* tức là các tế bào của các mô bị tác động bởi hoocmon. Những tế bào khác với tế bào đích sẽ trợ với hoocmon, vì vậy tác động của hoocmon có tính đặc trưng. Hoocmon là tác nhân điều hòa rất hiệu quả vì với một hàm lượng rất bé có thể gây tác động lớn, vì vậy sự biến động không đáng kể về nồng độ hoocmon vẫn có thể gây hậu quả xấu cho cơ thể. Đóng vai trò chất điều chỉnh chủ yếu là protein nhưng các hợp chất hữu cơ khác như lipid, nucleôtit và dẫn xuất của chúng vẫn được cơ thể sử dụng như chất điều chỉnh, vì vậy ở đây ta xem xét hoocmon với nghĩa rộng hơn vì chúng có vai trò quan trọng trong CNSH, đặc biệt là đối với CNSH thực vật.

Trong cơ thể động vật, hoocmon thường được các tế bào nội tiết chế tiết ra. Các tế bào nội tiết thường tập trung thành tuyến nội tiết (endocrine glands). Các tuyến tiết trong cơ thể động vật thường có 2 loại là : *tuyến ngoại tiết* (exocrine glands) là loại tuyến có ống tiết và chất tiết (mồ hôi, dịch nhầy, enzym...) được tiết ra ngoài cơ thể hoặc vào các xoang trong cơ thể (xoang miệng, dạ dày...), *tuyến nội tiết* là tuyến không có ống tiết và chất tiết (hoocmon) được tiết thẳng vào dịch cơ thể. Tuyến tụy chứa cả 2 loại tuyến tiết : phần ngoại tiết chế tiết các enzym và các ion bicarbonat theo ống tụy vào ruột non, còn phần nội tiết là *đảo tụy* gồm các tế bào tiết hoocmon *insulin* và *glucagon* trực tiếp vào dòng máu.

Hiện nay người ta đã biết được trong cơ thể người có đến 50 loại hoocmon, chúng cũng hoạt động tương tự như ở các động vật có xương sống khác. Về bản chất hóa học, người ta chia hoocmon thành 2 nhóm : hoocmon thuộc steroid và hoocmon thuộc axit amin. Nhóm hoocmon steroid là các hoocmon sinh dục (oestrogen, testosteron...) xuất xứ từ cholesterol. Nhóm hoocmon axit amin là các hoocmon được chế biến từ axit amin, từ peptit, từ oligopeptit, từ protein hoặc glicoprotein. Bảng 1.3 sau đây cho ta danh sách một số tuyến nội tiết, các hoocmon, bản chất hóa học và tác động của chúng ở động vật có xương sống :

Bảng 1.3. Các hoocmon ở động vật có xương sống

Tuyến	Hoocmon	Bản chất hóa học	Tác động chính	Được điều chỉnh bởi
Dưới đồi	Hoocmon giải phóng (RH). Hoocmon ức chế (IH).		Kích thích thụ trước tuyến yên. Ức chế thụ trước tuyến yên.	
Tuyến yên Phần sau	Ôxytocin Hoocmon chống bài niệu (ADH)	Peptit Peptit	Kích thích co dạ con, Kích thích tuyến vú Duy trì nước bởi thận	Thần kinh Cân bằng nước/muối. Hoocmon dưới đồi
Phần trước	Hoocmon sinh trưởng (GH)	Protein	Kích thích sinh trưởng (xương) và chuyển hóa	Hoocmon dưới đồi
	Prolactin	Protein	Kích thích sinh sữa và tiết sữa	Hoocmon dưới đồi
	Hoocmon kích bào noãn (FSH)	Glicoprotein	Kích thích sinh trứng và sinh tinh trùng	Hoocmon dưới đồi
	Hoocmon lutein (LH)	Glicoprotein	Kích hoạt buồng trứng và tinh hoàn	Hoocmon dưới đồi. Tiroxin trong máu
	Hoocmon kích giáp (TSH) Hoocmon kích tuyến trên thận (ACTH)	Glicoprotein Peptit	Kích hoạt tuyến giáp Kích hoạt vỏ trên thận tiết glucocorticoit	Glucocorticoit Hoocmon dưới đồi.
Tuyến giáp	Triiodotiroxin (T3) và Tiroxin (T4)	Amin	Kích thích duy trì quá trình trao đổi chất	TSH
	Canxitonin	Peptit	Giảm canxi trong máu	Canxi trong máu
Tuyến cận giáp	Hoocmon cận giáp (PTH)	Peptit	Tăng canxi trong máu	Canxi trong máu

Tuyến tụy	Insulin	Protein	Giảm glucozơ trong máu	Glucozơ trong máu
	Glucagon	Protein	Tăng glucozơ trong máu	Glucozơ trong máu
Tuyến trên thận (miền tủy)	Epinephrin (adrenalin) và Norepinephrin (noradrenalin)	Amin	Tăng glucozơ trong máu. Tăng hoạt động trao đổi chất.	Hệ thần kinh
Tuyến trên thận (miền vỏ)	Glucocorticoit (cortison, cortisol)	Steroid	Cơ cơ thành mạch	ACTH
	Mineralocorticoit (Aldosteron)	Steroid	Tăng glucozơ trong máu Tái hấp thu Na^+ và thải K^+ trong thận	K^+ trong máu
Tinh hoàn	Androgen (testosteron)	Steroid	Duy trì tạo tinh. Phát triển duy trì tính trạng thứ cấp sinh dục đực.	FSH và LH
Buồng trứng	Östrogen	Steroid	Kích thích phát triển niêm mạc dạ con. Phát triển và duy trì tính trạng thứ cấp sinh dục cái.	FSH và LH
	Progesteron	Steroid	Kích thích phát triển niêm mạc dạ con.	FSH và LH
Nhau thai	Hoocmon nhau thai (HCG)	Glicoprotein	Duy trì thể vàng tiết progesteron	Östrogen và progesteron.
Tuyến tùng	Melatonin	Amin	Điều hòa chu kỳ sinh học	Chu kỳ sáng/tối
Tuyến ức	Timozin	Peptit	Kích thích phát triển tế bào limpho T	Chưa rõ

Ngoài các chất hoocmon, cơ thể động vật còn sử dụng nhiều loại chất hóa học khác nhau làm chất điều chỉnh, ví dụ như *pheromon* và *chất điều hòa tại chỗ* (chất trung gian thần kinh, nhân tố sinh trưởng, prostagladin).

Pheromon là tín hiệu hóa học có chức năng giống như hoocmon, chỉ khác ở chỗ chúng tác động như tín hiệu thông tin giữa các cá thể cùng loài trong quần thể, vì vậy người ta phân loại các pheromon theo chức năng : chất quyến rũ, chất đánh dấu, chất báo động v.v... Pheromon là những phân tử bay hơi có thể khuếch tán trong không khí và tác động đến đồng loại với lượng rất ít. Chất pheromon *bombicon* của bướm cái tiết ra có thể khuếch tán trong không khí xa hàng nhiều km và với nồng độ chỉ 1 mol so với 10^7 mol các khí khác cũng đã có tác dụng quyến rũ bướm đực. Kiến tiết ra các chất đánh dấu trên đường đi để hướng dẫn đồng loại con đường dẫn đến nơi có thức ăn (cũng vì vậy khi ta bôi một ít chất độc hoặc chất khác mùi vào đường kiến đi chúng sẽ bị đánh lạc hướng).

Chất trung gian thần kinh (neurotransmitters) có bản chất là chất dẫn xuất của axit amin, là axit amin hoặc oligopeptit... do các nơron trước xinap tiết ra có tác dụng kích thích nơron sau xinap dẫn truyền xung động.

Các *nhân tố sinh trưởng* thường có bản chất peptit hoặc protein, là những chất điều hòa sự sinh trưởng của tế bào và sự phát triển của mô. Ví dụ, nhân tố sinh trưởng biểu bì (EGF - epidermal growth factor) có tác dụng kích thích sự phân bào và phát triển biểu bì. Nhân tố sinh trưởng thần kinh (NGF - nerve growth factor) có tác dụng kích thích sự phát triển tế bào thần kinh, bạch cầu, tế bào sợi...

Prostaglandin là axit béo đã bị biến đổi do nhiều loại tế bào tiết vào dịch mô và có tác dụng điều hòa hoạt động của tế bào bên cạnh bằng nhiều cách như :

Prostaglandin do nhau thai tiết ra có tác dụng kích thích hệ cơ dạ con giúp cho sự dễ con dễ dàng, nhiều prostaglandin kích thích hiện tượng viêm và sốt cũng như đau là để báo động cơ thể chống lại nguy hiểm (chất aspirin có tác dụng giảm đau, giảm sốt là do chúng ức chế sự tổng hợp prostaglandin).

1.3.2. Cơ chế tác động của hoocmon

- Hoocmon có tác động đặc trưng : phân tử hoocmon có cấu hình đặc thù, do đó được tế bào đích nhận biết thông qua protein thụ quan (receptor) có trong màng sinh chất hoặc trong tế bào chất. Khi nhận được tín hiệu, tế bào đích sẽ đáp ứng lại. Những tế bào khác không phải tế bào đích không có thụ quan tương ứng sẽ không nhận được tín hiệu và không có đáp ứng.

- Các hoocmon hoạt động trong mối tương tác lẫn nhau theo nguyên tắc mối liên hệ ngược. Ví dụ, insulin và glucagon phối hợp hoạt động để điều hòa lượng đường trong máu bằng cách insulin làm giảm còn glucagon làm tăng lượng đường trong máu tùy thuộc vào nồng độ đường giới hạn trong máu (xem sơ đồ sau) :

Glucagon → tăng glucozơ → tiết insulin → giảm glucozơ → tiết



- Ta hãy xem xét cơ chế tác động của 2 loại hoocmon điển hình : hoocmon protein và hoocmon steroid.

a) Hoocmon protein (hình 1.5 A)

Các hoocmon protein thường được các thụ quan màng nhận biết và liên kết đặc thù với hoocmon và thông qua chất thông tin thứ 2 (hoocmon được xem là chất thông tin thứ 1) để điều chỉnh các phản ứng và quá trình hoạt động của tế bào.

Chúng ta hãy xem ví dụ sau đây : nếu ta tiêm hoocmon kích hoạt sắc tố (MSH) vào trong dịch mô dưới da ếch thì da ếch trở nên đen thẫm bởi vì MSH đã kích thích sự phân bố các hạt melanin ra ngoại vi tế bào biểu bì da. Nhưng nếu ta tiêm MSH vào bên trong tế bào

biểu bì da thì không có tác dụng. Tại sao ? Người ta đã chứng minh rằng, muốn MSH có tác động thì đầu tiên MSH phải được thụ quan màng của tế bào biểu bì nhận biết và liên kết với chúng. Phức hợp hormone - thụ quan sẽ phát động phản ứng sinh ra chất thông tin thứ 2 (chất truyền đạt thông tin). Một trong những chất thông tin thứ 2 phổ biến nhất và được nghiên cứu nhiều nhất là AMP vòng.

W. Sutherland đã nghiên cứu cơ chế này (ông được giải Nobel năm 1971) khi thí nghiệm tác động của hormone epinephrin (adrenalin) kích thích sự phân giải glycogen thành glucosơ trong tế bào gan và tế bào cơ theo sơ đồ sau đây :

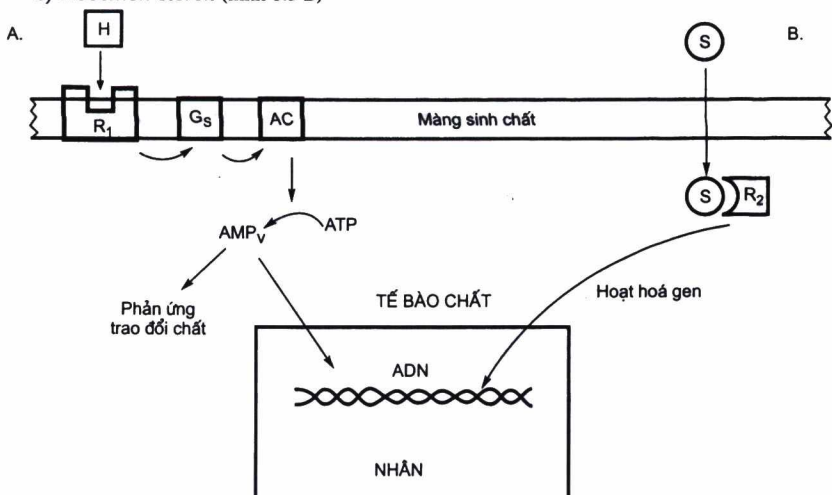
Epinephrin $\rightarrow$ liên kết với thụ quan màng $\rightarrow$ hoạt hóa protein Gs (có trong màng) $\rightarrow$ hoạt hóa adenylcyclaza $\rightarrow$ ATP $\rightarrow$ AMP vòng $\rightarrow$ hoạt hóa protein kinaza $\rightarrow$ hoạt hóa phosphorinkinaza $\rightarrow$ hoạt hóa glycogen phosphorilaza $\rightarrow$ glycogen $\rightarrow$ glucosơ.

Nếu ta dùng 1 phân tử epinephrin, qua nhiều chuỗi phản ứng sẽ sinh ra 10^3 phân tử AMP vòng và 10^7 phân tử glucosơ. Như vậy, nhờ thông qua phân tử thông tin thứ 2 mà thông tin đã được khuếch đại lên hàng chục triệu lần.

Ngày nay, nhiều nghiên cứu cho thấy AMP vòng là chất truyền đạt thông tin khá phổ biến cho nhiều loại hormone và tác động của chúng rất đa dạng. Chúng có tác động kích thích hoặc ức chế nhiều quá trình sinh lý quan trọng của nhiều loại tế bào khác nhau. AMP vòng khi liên kết với protein còn có vai trò hoạt hóa gen.

Ngoài AMP vòng, các nhà nghiên cứu còn phát hiện nhiều chất truyền đạt thông tin thứ 2 khác nhau như inositol triphosphat (IP), ion canxi (Ca^{2+}), oxit nitơ (NO)... Một trong tác động sinh lý quan trọng của NO là làm giãn mạch và tan cục máu trong mạch máu, do đó được áp dụng để điều chế thuốc Viagra (có chứa NO) có tác dụng cường dương, hoặc thuốc Nitroglycerin chống đột quỵ tim mạch.

b) Hormone steroid (hình 1.5 B)



Hình 1.5. Cơ chế tác động của hormone

A. Hormone protein ; B. Hormone steroid ;
H- Hormone protein ; R1- Thụ quan màng ; Gs-Protein G cảm ứng ; AC- Adenylcyclaza ;
S - Hormone steroid ; R2. Thụ quan tế bào chất.

Các hoocmon steroid tác động khác với hoocmon protein, chúng là chất hòa tan trong lipid nên chúng dễ dàng xâm nhập vào trong tế bào đích và liên kết đặc thù với thụ quan protein ở trong tế bào chất. Phức hệ hoocmon - protein này sẽ được vận chuyển vào nhân và sẽ liên kết với vùng điều chỉnh của ADN, qua đó kích hoạt hoặc ức chế hoạt động của gen tương ứng. Ví dụ, estrogen khi xâm nhập vào tế bào của ống dẫn trứng của gà mái để sẽ kích hoạt các gen mã hóa cho ovalbumin và do đó ovalbumin được tổng hợp và được dự trữ trong lòng trắng trứng, cần thiết cho sự phát triển phôi gà...

1.3.3. Vai trò của hoocmon ở động vật không xương sống

a) Hoocmon điều hòa nội cân bằng

Đối với nhiều động vật không xương sống, hoocmon đóng vai trò duy trì nội cân bằng (homeostasis) – bằng cách điều chỉnh cân bằng nước. Ngoài ra hoocmon còn có vai trò quan trọng trong sinh trưởng và phát triển của nhiều động vật như thủy tức, thân mềm, và nhất là chân khớp. Ví dụ, đối với thủy tức, một loại hoocmon kích thích sự sinh trưởng và nảy chồi (sinh sản vô tính) nhưng lại ức chế sinh sản hữu tính. Đối với ốc sên biển *Aplysia*, một loại hoocmon peptit do tế bào neuron tiết ra có tác dụng kích thích đẻ hàng ngàn trứng nhưng đồng thời hạn chế con vật ăn và vận chuyển (để đẻ được nhiều trứng).

b) Các hoocmon biến thái và lột xác

Chân khớp là bọn động vật không xương sống có mức độ tiến hóa cao nhất. Tất cả bọn Chân khớp đều có hệ nội tiết phát triển và hoocmon đóng vai trò quan trọng trong điều hòa trao đổi chất, duy trì cân bằng nước, điều hòa vận chuyển sắc tố ở vỏ và mắt cũng như điều hòa sinh trưởng và phát triển. Giáp xác và côn trùng thường có vỏ cứng bao bọc. Trong quá trình sinh trưởng và phát triển của chúng có xảy ra hiện tượng lột xác và biến thái. Nhiều hoocmon đóng vai trò chủ đạo trong các quá trình đó. Ta hãy xem xét một ví dụ.

Ecdixon là một hoocmon steroid có vai trò trong lột xác và biến thái của sâu bọ.

Ecdixon do đôi tuyến trước ngực tiết ra và có tác dụng kích thích lột xác, đồng thời kích thích sâu phát triển thành con trưởng thành (bọ, bướm...). Tác động của ecdixon cũng tương tự như các hoocmon steroid ở động vật có xương sống, chúng có tác động hoạt hóa các gen đặc thù mã hóa các protein cần cho lột xác và biến thái. Nhiều thực nghiệm trên ruồi quả đã chứng minh rằng, ecdixon có tác dụng kích thích hoạt hóa các gen thể hiện ở chỗ kích thích hình thành các búp và búi trong nhện sắc thể đa sợi của tế bào tuyến nước bọt của dòi để chúng biến thành nhộng. Các búp này là vùng mà ở đó các gen đang phiên mã và dịch mã.

Sự chế tiết hoocmon ecdixon được kiểm soát bởi một loại hoocmon khác, đó là *hoocmon não* (BH), là peptit được não tiết ra có tác dụng kích thích tuyến trước ngực chế tiết ra ecdixon. Đến lượt mình, mức cân bằng hoạt động của ecdixon và hoocmon não lại được kiểm soát bởi một loại hoocmon thứ 3 là *hoocmon juvenin* do một đôi tuyến corpora allata nằm phía sau não tiết ra. Juvenin có tác dụng kìm hãm để duy trì trạng thái ấu trùng, với một lượng juvenin vừa phải thì ấu trùng (sâu, dòi...) mới biến thành nhộng được và nhộng sẽ biến thành con trưởng thành. (Người ta đã tổng hợp được thuốc tương tự juvenin và sử dụng chúng như là thuốc diệt sâu bọ vì chúng ức chế biến thái của sâu bọ).

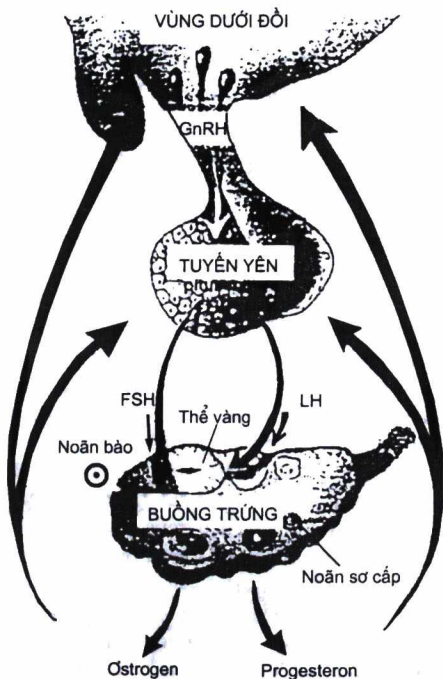
Qua ví dụ trên đây ta thấy rõ hoạt động của hoocmon luôn liên quan chặt chẽ với thần kinh, điều này cũng thể hiện đối với động vật có xương sống, chúng ta xem xét một số ví dụ sau đây.

1.3.4. Vai trò của hoocmon trong sự sinh trưởng của động vật có xương sống

a) Mối tương quan giữa dưới đồi (Hypothalamus) và tuyến yên (Hypophysis)

- Dưới đồi thuộc hệ thần kinh trung ương (não bộ) đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh, phối hợp giữa hoạt động của hệ nội tiết và hệ thần kinh ở động vật có xương sống. Dưới đồi thu nhận các thông tin từ các phần của cơ thể cũng như từ não để điều hòa hoạt động của hệ nội tiết cho phù hợp với thay đổi của môi trường sống. Ví dụ, ở đa số động vật có xương sống, hệ thần kinh cảm giác thu nhận và truyền đạt các thay đổi về thời tiết và khí hậu cho dưới đồi, từ đây phát động giải phóng các hoocmon có vai trò phát động sự kết đôi và sinh sản.

Dưới đồi chế tiết và giải phóng nhiều loại hoocmon được gọi là *hoocmon giải phóng* (RH-releasing hoormones) hoặc *hoocmon ức chế* (IH-inhibiting hoormones) bởi vì chúng có tác dụng kích thích hoặc ức chế sự hoạt động chế tiết hoocmon của tuyến nội tiết chủ đạo là tuyến yên.



Hình 1.6. Mối tương quan giữa dưới đồi và tuyến yên

- Tuyến yên là một tuyến nội tiết - thần kinh nằm ngay dưới đáy não, liền với dưới đồi (hình 1.6) tiết ra nhiều loại hoocmon có tác dụng điều hòa nhiều hoạt động sống của cơ thể một cách trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua các tuyến nội tiết khác của cơ thể như tuyến giáp, tuyến trên thận, tinh hoàn, buồng trứng...

- Dưới đồi chứa 2 loại tế bào thần kinh - tiết :

+ Một loại tế bào chế tiết ra 2 loại hoocmon là hoocmon giải phóng (RH) và hoocmon ức chế (IH), 2 loại hoocmon này theo dòng máu chuyển đến thùy trước tuyến yên và kiểm soát sự tiết hoocmon của thùy trước tuyến yên.

+ Một loại tế bào khác của dưới đồi tổng hợp hoocmon chống bài niệu (ADH) và oxitoxin, hai loại hoocmon này được chuyển theo sợi thần kinh vào thùy sau tuyến yên và được tích trữ ở đây, khi cần tiết chúng sẽ được tiết vào máu.

b) Các hoocmon của tuyến yên tác động điều hòa sinh trưởng

Dưới sự kiểm soát của dưới đồi, tuyến yên, đặc biệt là thùy trước tuyến yên đã tiết nhiều loại hoocmon có tác dụng điều hòa trực tiếp hoặc gián tiếp đến quá trình sinh trưởng của cơ thể.

Quá trình sinh trưởng của cơ thể gồm rất nhiều giai đoạn, qua đó cơ thể tăng khối lượng các cấu thành của mình theo thời gian : từ phân tử, tế bào, mô và cơ quan thông qua sự trao đổi chất, sự phân bào, sự biệt hóa tế bào hình thành các mô và cơ quan khác nhau. Tất cả các quá trình trên đây đều được kiểm soát bởi hoocmon trực tiếp hoặc gián tiếp theo nhiều cấp độ. Ta hãy xem xét một số loại hoocmon đó.

- Hoocmon sinh trưởng (Growth hormone- GH) :

Hoocmon GH (còn có tên gọi là somatotropin) là protein chứa 200 axit amin có tác dụng lên nhiều loại mô trực tiếp hoặc gián tiếp qua trao đổi chất :

GH kích thích sự sinh trưởng bằng cách trực tiếp kích thích sự sản sinh các nhân tố sinh trưởng. Ví dụ GH kích thích các tế bào gan sản sinh ra nhân tố sinh trưởng tương tự insulin (insulinlike growth factors-IGF), IGF được tiết vào máu sẽ kích thích phát triển xương và sụn. Nếu thiếu GH sự sinh trưởng của xương bị đình chỉ, nhưng nếu con vật được tiêm bổ sung GH thì sự sinh trưởng sẽ được khôi phục. Nhiều sai lệch sinh trưởng ở người có liên quan đến GH (ở người GH được gọi là HGH do từ Human growth hormone). Nếu cơ thể sản sinh quá nhiều GH, trong quá trình phát triển sẽ gây nên bệnh khổng lồ, còn ở giai đoạn trưởng thành, lượng GH nhiều sẽ gây sinh trưởng bất thường tại các xương đầu, bàn tay, bàn chân. Trong giai đoạn thiếu nhi, nếu thiếu GH sẽ gây nên bệnh lùn. Trước đây người ta chữa trị bệnh lùn cho trẻ em bằng GH chiết xuất từ tuyến yên tử thi hoặc từ tuyến yên động vật. Ngày nay nhờ tiến bộ của công nghệ di truyền, các hãng dược phẩm đã sản xuất GH người bằng công nghệ chuyển gen để chữa trị bệnh lùn cho trẻ em và phát triển cơ bắp cho các nhà thể thao chuyên nghiệp.

- Hoocmon prolactin (PRL) :

Prolactin là protein tương tự như GH nhưng tác động khác với GH. Prolactin có tác động rất khác nhau ở các động vật có xương sống khác nhau. Ví dụ đối với động vật có vú, PRL kích thích phát triển tuyến vú và kích thích tiết sữa. Đối với chim, PRL có tác dụng điều hòa chuyển hóa lipid và điều hòa sinh sản, còn đối với Lưỡng cư chúng kích thích sinh trưởng của nòng nọc. Đối với cá, PRL có vai trò điều hòa cân bằng nước và muối.

c) Hoocmon tuyến giáp và cạnh giáp tham gia điều hòa sinh trưởng

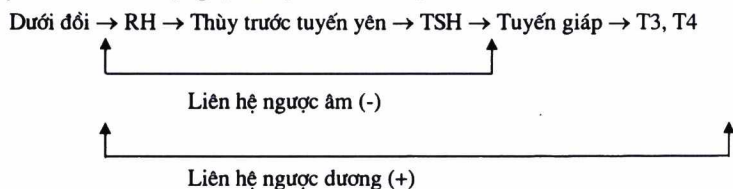
- *Tyroxin* (thyroxine-T₄) và *Triiodotyroxin* (triiodothyroxine-T₃) là 2 hoocmon do tuyến giáp tiết ra, chúng khác nhau ở chỗ T₃ chứa 3 phân tử iot còn T₄ chứa 4 phân tử iot, nhưng chúng có tác động tương tự đối với tế bào đích.

Đối với lưỡng cư, hoocmon tuyến giáp có vai trò quan trọng trong sự biến thái từ nòng nọc thành ếch. Đối với người, hoocmon tuyến giáp có vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng và phát triển. Nhiều trường hợp bệnh lý di truyền như bệnh đần là có liên quan đến sai lệch trong hoạt động của tuyến giáp dẫn đến làm chậm phát triển xương và hệ thần kinh. Những sai lệch này thường được chữa trị bằng hoocmon tuyến giáp ở giai đoạn sớm từ khi mới sinh. Nhiều nghiên cứu trên động vật đã chứng minh rằng, hoocmon tuyến giáp là cần thiết cho sự tạo xương và sự mọc nhánh của tế bào thần kinh trong giai đoạn phát triển phôi.

Đối với động vật có vú, các hormone tuyến giáp đóng vai trò quan trọng trong chuyển hóa năng lượng, tăng cao hiệu suất sử dụng oxy và trao đổi chất của tế bào. Một lượng quá nhiều hoặc quá ít các hormone này trong máu đều gây ảnh hưởng sai lệch trong trao đổi chất. Ví dụ ở người, tiết quá nhiều hormone tuyến giáp (được gọi là cường giáp) dẫn đến các triệu chứng như sốt cao, toát mồ hôi, giảm cân, dễ bị kích động, huyết áp cao. Trái lại trong trường hợp thiếu năng tuyến giáp sẽ dẫn đến bệnh đần ở trẻ em, còn ở người lớn thể hiện các triệu chứng như tăng cân, hôn mê...

Trong trường hợp khác, khi thiếu hormone tuyến giáp dẫn đến phì đại tuyến giáp (được gọi là bướu cổ), thường là do thiếu iot trong dinh dưỡng.

Sự chế tiết các hormone tuyến giáp chịu sự kiểm soát của dưới đồi và tuyến yên theo nguyên tắc mối liên hệ ngược âm (xem sơ đồ sau) :



Tuyến giáp ở động vật có vú còn tiết ra *canxitonin* là một peptit có tác dụng duy trì cân bằng canxi trong máu.

- Hormone tuyến cận giáp (parathyroid hormone-PTH).

Tuyến cận giáp tiết ra 4 loại hormone có tác dụng phối hợp với canxitonin của tuyến giáp, điều hòa nội cân bằng canxi trong dòng máu. Các PTH có tác dụng tăng cao nồng độ canxi, còn canxitonin có tác dụng trái lại : giảm thấp nồng độ canxi, chúng phối hợp hoạt động theo nguyên tắc mối liên hệ ngược âm.

PTH làm tăng nồng độ canxi trong máu bằng cách :

- + Kích thích xương giải phóng canxi.
- + Kích thích thận tăng cường tái hấp thu canxi.
- + Kích thích ruột tăng cường hấp thu canxi.

Trái lại canxitonin làm giảm nồng độ canxi trong máu bằng cách ngược lại :

- + Kích thích xương tích trữ canxi.
- + Làm giảm tái hấp thu canxi của thận.
- + Làm giảm hấp thu canxi của ruột.

Nồng độ canxi luôn được giữ ổn định ở mức 10mg/100ml. Sự tăng hay giảm nồng độ canxi trong máu là nhân tố điều chỉnh hoạt động của tuyến giáp và cận giáp theo mối liên hệ ngược âm.

Vitamin D được tổng hợp ở da dưới tác động của ánh sáng rồi theo máu đến các mô (thận, gan...) và được chuyển thành dạng hoạt tính cần thiết cho hoạt động của PTH, và như vậy vitamin D tham gia vào duy trì cân bằng canxi trong cơ thể.

d) Hoocmon tuyến tụy : Insulin và glucagon

Insulin (do các tế bào α) và glucagon (do các tế bào β) là 2 hoocmon do đảo tụy tiết ra, có tác dụng đối lập trong việc duy trì nồng độ glucosơ ổn định trong máu, do đó gây ảnh hưởng lên sinh trưởng và phát triển của cơ thể, bởi vì glucosơ là nhiên liệu chủ yếu cho hô hấp tế bào để tạo năng lượng ATP, đồng thời glucosơ là nguồn nguyên liệu quan trọng cung cấp bộ xương cacbon để tổng hợp các chất hữu cơ khác. Đối với cơ thể người, cân bằng trao đổi chất được duy trì khi nồng độ glucosơ trong máu đạt ngưỡng 90mg/100ml. Trường hợp glucosơ trong máu cao hơn ngưỡng này (ví dụ sau bữa ăn no), insulin được tiết ra và tác dụng làm giảm nồng độ glucosơ. Trái lại nếu nồng độ glucosơ giảm thấp hơn ngưỡng thì glucagon được tiết ra và tác động làm tăng nồng độ glucosơ. Bằng phương thức hoạt động theo mối liên hệ ngược âm, hai hoocmon insulin và glucagon điều hòa nồng độ glucosơ trong máu ổn định.

- Thật ra insulin và glucagon phối hợp hoạt động để duy trì nồng độ glucosơ ổn định thông qua nhiều cơ chế phức tạp. Ta hãy xét xem cơ chế đó.

+ Insulin có tác động làm giảm glucosơ trong máu bằng cách kích thích tất cả các tế bào của cơ thể (trừ tế bào não) tăng cường sử dụng glucosơ. Đồng thời insulin làm giảm sự phân giải glicogen trong gan và ức chế sự chuyển hóa các axit amin và axit béo thành đường.

+ Glucagon có tác động làm tăng glucosơ trong máu bằng cách kích thích tế bào gan tăng cường phân giải glicogen thành glucosơ, tăng cường chuyển hóa axit amin, axit béo thành glucosơ để cung cấp cho máu.

Sự cân bằng glucosơ trong máu có vai trò quan trọng trong trao đổi chất của cơ thể. Nếu sự cân bằng này bị trục trặc sẽ dẫn tới nhiều hậu quả nghiêm trọng. Ví dụ, bệnh tiểu đường có nguyên nhân trong sai lệch nội tiết do thiếu hụt insulin, hoặc do tế bào đích mất khả năng đáp ứng với insulin. Kết quả là làm tăng cao nồng độ glucosơ trong máu - cao đến nỗi mà thận bài tiết ra glucosơ, vì vậy glucosơ có mặt trong nước tiểu là một trong các thử nghiệm chẩn đoán bệnh tiểu đường. Người mắc bệnh tiểu đường không thể sử dụng glucosơ như là nguồn nhiên liệu chủ yếu, do đó phải sử dụng lipid làm nguồn nhiên liệu chính, vì vậy trong trường hợp bị tiểu đường nặng thì các sản phẩm axit do phân giải lipid sẽ tích lũy lại trong máu, gây nhiều nguy hiểm cho bệnh nhân.

- Ngày nay người ta phân biệt hai dạng tiểu đường :

+ Tiểu đường tip I (còn gọi là tiểu đường phụ thuộc insulin), là dạng sai lệch tự miễn dịch dẫn đến đảo tụy mất khả năng chế tiết insulin thể hiện từ thời còn trẻ. Phương thức chữa trị là phải tiêm insulin hàng ngày.

+ Tiểu đường tip II (còn gọi là tiểu đường không phụ thuộc insulin) là do cơ thể thiếu hụt insulin và thông thường nhất là do thụ quan insulin của tế bào đích bị sai lệch, do đó không có khả năng trả lời đáp ứng với insulin. Tiểu đường tip II thường xuất hiện sau tuổi 40 và tăng theo tuổi già. Trên 90% người bị bệnh tiểu đường thuộc tip II. Các liệu pháp về chế độ ăn, sinh hoạt, tập thể dục, dưỡng sinh có thể hạn chế bệnh phát triển.

e) Hoocmon tuyến trên thận

Tuyến trên thận tiết ra nhiều loại hoocmon có nhiều tác dụng khác nhau, trong đó có nhiều hoocmon ảnh hưởng gián tiếp đến sinh trưởng và phát triển của cơ thể. Hai hoocmon

epinephrin và *noepinephrin* do phần tủy trên thận tiết ra có tác dụng tăng cường chuyển hóa năng lượng, từ đó tăng cao trao đổi chất cơ bản. Chúng cũng có tác dụng tăng cao phân giải glicogen trong gan và cơ xương, do đó làm tăng cao nồng độ glucôzơ trong máu.

Hoocmon *glucocorticoit* do phần vỏ trên thận tiết ra có tác dụng tăng cường chuyển hóa năng lượng, đặc biệt là chuyển hóa glucôzơ. Glucocorticoit tăng cường sự tổng hợp glucôzơ từ các nguyên liệu không phải là cacbonhydrat (ví dụ protein trong cơ), do đó tăng thêm nguồn nhiên liệu glucôzơ cho tế bào.

1.3.5. Vai trò của hoocmon trong sự sinh sản của động vật

Sự sinh sản hữu tính ở động vật bao gồm nhiều quá trình như : sự tạo giao tử đực và giao tử cái đơn bội, sự thụ tinh tạo hợp tử lưỡng bội, sự phát triển và biệt hóa giới tính đực cái, sự tìm gặp kết đôi...Tất cả quá trình trên đều chịu sự kiểm soát của hoocmon. Ta hãy xem xét một số hoocmon chính và tác động của chúng.

a) Đối với con đực

Hoocmon chính tác động lên con đực là các *androgen*, trong đó *testosteron* là quan trọng nhất. Androgen là steroid do các tế bào kẽ của tinh hoàn tiết ra có tác động trực tiếp đến sự hình thành các tính trạng sinh dục nguyên sinh (phân hóa cơ quan sinh dục đực như tinh hoàn tạo tinh trùng, tuyến và ống tinh, cơ quan giao cấu...) và tính trạng sinh dục thứ sinh (tính trạng hình thái phân biệt đực cái như hình dạng cơ thể, tiếng hót, màu sắc, có sừng, có râu...). Androgen cũng tác động lên tập tính sinh dục của con đực như tập tính quyến rũ con cái, tập tính đấu tranh giành con cái, tập tính giao cấu... Sự chế tiết androgen cũng như sự tạo tinh của tinh hoàn chịu sự kiểm soát bởi các hoocmon của dưới đồi và tuyến yên (của FSH và LH).

b) Đối với con cái

Đối với con cái sự điều hòa của hoocmon đối với quá trình sinh sản rất phức tạp và khác với con đực.

Khác với con đực - sự tạo tinh xảy ra liên tục, thì ở con cái sự tạo trứng và rụng trứng diễn ra theo chu kỳ được gọi là *chu kỳ sinh sản*. Ở các động vật khác nhau, chu kỳ sinh sản diễn ra không giống nhau. Ví dụ ở người và khỉ thường có *chu kỳ kinh nguyệt*, còn ở các động vật có vú khác có *chu kỳ động dục*.

Đối với động vật có vú, phối làm tổ và phát triển trong dạ con nên hai chu kỳ này giống nhau ở chỗ, khi trứng rụng thì lớp niêm mạc dạ con biến đổi dày lên, tích nhiều mạch máu chuẩn bị cho phối làm tổ. Nhưng hai chu kỳ này khác nhau ở chỗ : đối với chu kỳ kinh nguyệt thì nếu phối không làm tổ (trứng không thụ tinh) lớp niêm mạc dạ con bị bong, mạch máu bị vỡ và chảy máu được gọi là kinh nguyệt ; còn đối với chu kỳ động dục thì lớp niêm mạc dạ con được dạ con tái hấp thu, không gây ra chảy máu.

Những động vật có chu kỳ động dục thì tập tính sinh dục thay đổi theo chu kỳ và các điều kiện môi trường như mùa, khí hậu gây nhiều ảnh hưởng đến chu kỳ. Tập tính giao cấu thường chỉ xảy ra trong chu kỳ động dục, tức là thời kỳ trứng rụng. Thời gian này được gọi là thời kỳ động dục. Chu kỳ động dục thay đổi tùy loài động vật, ví dụ, đối với chuột cống là 5 ngày, đối với chó, gấu là nửa năm đến một năm...

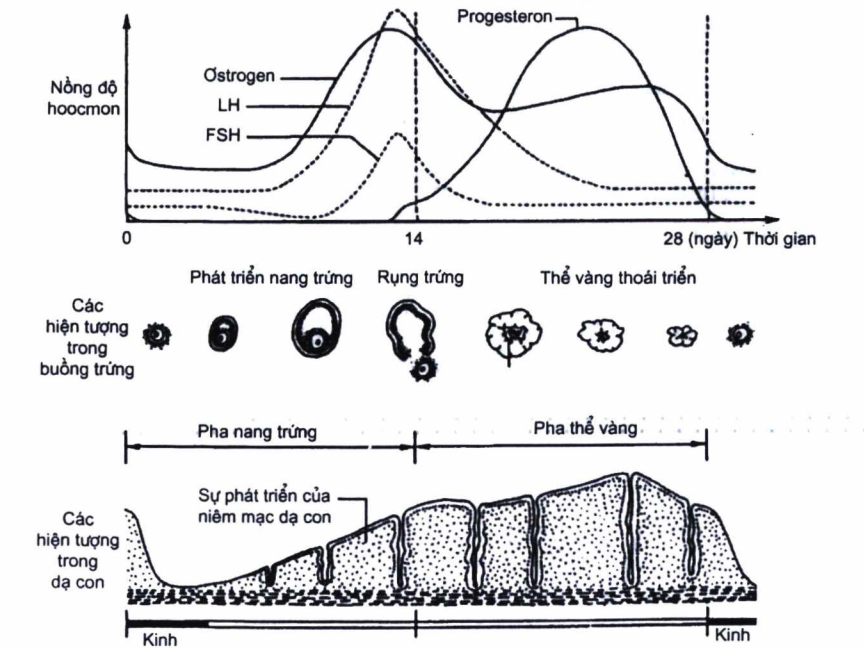
Người và khỉ cao thay bằng chu kỳ động dục có chu kỳ kinh nguyệt thường kéo dài 28 ngày (trung bình) đối với phụ nữ. Qua chu kỳ kinh nguyệt, sự sinh trưởng phát triển và rụng trứng được diễn ra trong buồng trứng (được gọi là chu kỳ buồng trứng), đồng thời có sự biến đổi trong niêm mạc dạ con (được gọi là chu kỳ dạ con). Chu kỳ buồng trứng và chu kỳ dạ con đều được kiểm soát bởi nhiều hoocmon.

Ta hãy xem xét các hoocmon có tác dụng điều hòa chu kỳ kinh nguyệt ra sao để sự sinh sản xảy ra bình thường (hình 1.7).

- Hoocmon FSH và LH :

FSH là hoocmon kích bao noãn (follicle-stimulating hoormone) và LH là hormone tạo thể vàng (luteinizing hormone) là những hoocmon do thùy trước tuyến yên tiết ra dưới sự kiểm soát của hoocmon giải phóng kích dục tố (gonadotropin-releasing hormone-GnRH) do dưới đồi tiết ra.

FSH có tác động kích thích nang trứng (bao noãn) phát triển. LH phối hợp với FSH làm chín trứng, nhưng tác động chủ yếu của LH là làm rụng trứng khỏi nang trứng và tạo thể vàng. Thời gian chín trứng và rụng trứng kéo dài 14 ngày khi nồng độ FSH và LH đạt cao nhất (trước rụng trứng vài ngày) (hình 1.7). Thời gian này được gọi là *pha nang trứng*. Tiếp theo pha nang trứng là *pha thể vàng* kéo dài 14 ngày trong đó thể vàng bị thoái triển. Trong pha này nồng độ FSH và LH giảm dần. Sự tăng cao hay giảm nồng độ FSH và LH trong chu kỳ được điều tiết bởi các hoocmon khác đó là *östrogen* và *progesteron*.



Hình 1.7. Sơ đồ các hiện tượng trong chu kỳ kinh nguyệt ở phụ nữ

- Östrogen và progesteron :

+ Hai hoocmon này thường được gọi là hoocmon sinh dục nữ, đều là steroid. Trong pha nang trứng, khi nang trứng phát triển, các tế bào nang trứng tiết ra östrogen và nồng độ tăng dần cùng với sự tăng nồng độ FSH và LH. Nồng độ östrogen cao có tác động ức chế dưới đồi tiết GnRH và từ đó ức chế tuyến yên tiết FSH và LH (mối liên hệ ngược âm), do đó nồng độ FSH và LH giảm dần.

+ Trong pha thể vàng, khi thể vàng hình thành, nó biến thành mô nội tiết và tiết ra progesteron. Progesteron bổ sung cùng östrogen ức chế dưới đồi và tuyến yên.

+ Östrogen và progesteron còn có tác dụng kích thích sự biến đổi của lớp niêm mạc dạ con, làm cho lớp niêm mạc dày lên, phát triển mạng mạch máu để chuẩn bị đón phôi làm tổ.

* Nếu trứng không được thụ tinh tức là sẽ không có phôi làm tổ, lớp niêm mạc dạ con bong ra, mạch máu bị đứt vỡ và bị xuất huyết (có kinh) diễn ra ở ngày thứ 28 cuối chu kỳ và kéo dài trong vài ngày. Thể vàng bị thoái hóa sẽ không có progesteron, trứng chưa phát triển sẽ không có östrogen, do đó dưới đồi và tuyến yên hoạt động tiết ra FSH và LH, như vậy một chu kỳ kinh nguyệt mới được bắt đầu.

* Trường hợp trứng được thụ tinh và phôi làm tổ trong dạ con thì thể vàng được duy trì tiếp tục tiết ra progesteron là nhờ một hoocmon khác-kích dục tổ nhau thai (human chorionic gonadotropine-HCG) do nhau thai tiết ra. Cũng vì vậy mà khi đã có thai thì sự chín trứng và rụng trứng bị ức chế. (Để chẩn đoán có thai nhanh người ta thường dùng thử nghiệm về sự có mặt của HCG trong máu).

+ Ngoài ra, östrogen còn có vai trò trong sự phát triển các tính trạng sinh dục thứ sinh ở con cái. Östrogen kích thích sự tích lũy mỡ ở vùng ngực, hông, tăng cường giữ nước, trao đổi canxi, kích thích phát triển vú và điều hòa các tập tính sinh dục.

1.4. Hoocmon ở thực vật - các phytohoocmon

Các chất điều chỉnh có trong cơ thể thực vật được gọi là phytohoocmon (các chất hoocmon thực vật) (xem bảng 1.4).

Phytohoocmon là các chất hữu cơ bản chất khác nhau do tế bào thực vật tiết ra với một lượng rất nhỏ, có tác động điều tiết các hoạt động sinh lý, bảo đảm bảo cho sự sinh trưởng và phát triển của cây.

Các phytohoocmon điều chỉnh sự sinh trưởng phân thành 2 nhóm :

- Nhóm các chất kích thích, gồm :

+ Auxin, gibberelin : có tác động kéo dài tế bào.

+ Xytokinin : có vai trò trong phân chia tế bào.

- Nhóm các chất kìm hãm, gồm :

+ Axit abscisic : tác dụng làm rụng lá.

+ Etylen : hoocmon dạng khí có tác dụng điều chỉnh sinh trưởng.

+ Chất làm chậm sinh trưởng và chất diệt cỏ.

Bảng 1.4. Phân loại các chất điều chỉnh sinh trưởng của thực vật

Phytohormon tự nhiên	Chất điều chỉnh sinh trưởng nhân tạo
<i>A. Chất kích thích sinh trưởng (stimulator)</i> Auxin : AIA : axit β indol axêtic IAN : β indolyl axêtônitril APA : axit phenyl axêtic Giberelin : A₁, A₂, A₃ ... A₅₄	Auxin tổng hợp (auxinoit) : 100.000 chất AIB : axit β indol butyric αANA : axit α - naphtylaxêtic 2,4D : axit 2,4 diclophenôxyaxêtic 2,4,5T : axit 2,4,5 triclophenôxyaxetic ACMP : axit 4-clo- 2metylphenôxy axetic
Xytokinin : zeatin, zeatin ribôzil, AOP	Xytokinin tổng hợp : kinetin. BA : benzyl adenin PBA : tetrahydropiranyl benzyl adenin
<i>B. Chất ức chế sinh trưởng (inhibitor)</i> AAB : axit absixic Các chất phenol	Chất kìm hãm (retardant) MH : malêin hydrazid CCC : clocolinclorit ATIB : axit 2, 3,5 triiod benzôic
<i>C. Etylen : chất điều chỉnh sinh trưởng dạng khí</i>	ACEP : axit 2 - clo etyl photphoric

1.4.1. Auxin

- Có 3 dạng auxin chính : auxin a, auxin b, và heteroauxin (AIA).

- Tất cả thực vật bậc cao, thực vật bậc thấp và một số vi khuẩn đều có AIA. Cây dừa có hàm lượng auxin cao : 6 mg/1kg tươi. Auxin được tổng hợp trước hết ở mô phân sinh, ở lá và lá mầm. Mô dự trữ của hạt và hạt phấn có rất nhiều auxin. Đặc biệt auxin có rất nhiều ở bao lá mầm cây hoà thảo. Từ 10.000 bao lá mầm của lúa tiểu mạch có thể chiết xuất 1mg auxin.

AIA được tổng hợp chủ yếu ở đỉnh chồi ngọn và từ đó vận chuyển xuống dưới tốc độ 5 - 15mm/giờ. Sự vận chuyển có tính phân cực nghiêm ngặt, tức là vận chuyển hướng gốc. Chính vì vậy mà càng xa ngọn, hàm lượng auxin càng giảm dần tạo nên một gradien nồng độ giảm dần từ đỉnh ngọn xuống gốc cây. Các lá non, phôi hạt, trọng tầng cũng có tính chất tương tự. Sự tổng hợp auxin từ tryptophan diễn ra thường xuyên và được xúc tác bởi hàng loạt enzym.

- Sự phân giải auxin cũng là quá trình quan trọng để điều chỉnh lượng auxin có trong cây. Sau khi tác động sinh trưởng, auxin có thể bị phân giải thành dạng không có hoạt tính, hay trong trường hợp dư thừa, hàm lượng auxin cao có thể phân giải (do AIA oxydaza) biến đổi thành metylen oxit không có hoạt tính. Quá trình này diễn ra rất mạnh, đặc biệt ở rễ. Auxin có thể mất hoạt tính do quá trình quang ôxy hoá.

Trong cây, auxin có thể ở dạng tự do khi hoạt động hoặc ở dạng liên kết khi không hoạt động. AIA liên kết trong cây chủ yếu với glucit (tạo nên indolaxetyl-inôsit) hoặc liên kết với axit amin (AIA - aspartat ; AIA - glyxin ; AIA - alanin ...). Vai trò của AIA liên kết là dự trữ để làm giàu lượng AIA trong cây, tránh tác dụng của AIA oxydaza, tham gia một phần vào dạng vận chuyển.

- Cơ chế tác động của auxin : Tính chất tác động đối lập của auxin là phụ thuộc vào nồng độ. Nếu nồng độ quá ngưỡng thì nó có tác dụng ức chế sinh trưởng. Giải thích hiện tượng này là sự liên kết giữa auxin với một hệ thống enzym (hay một chất nhận nào đó) : nhiều phân tử auxin liên kết lên một chất nhận, có sự cạnh tranh với các điểm tiếp cận. Do đó các phân tử auxin tự ức chế tác động kích thích của nhau.

Đối với các bộ phận của cây cũng như các giai đoạn phát triển của cây, việc thử nghiệm để tìm nồng độ tối thích cho hoạt tính của auxin có ý nghĩa quan trọng trong thực tiễn sản xuất.

Cơ chế tác dụng của auxin rất phức tạp, cần phải tìm hiểu nghiên cứu kỹ để có thể ứng dụng có kết quả trong CNSH cây trồng : auxin có ảnh hưởng to lớn đến các tính chất vật lý như ngưỡng nhiệt ngưng tụ, độ nhớt của protein, thúc đẩy tốc độ hút nước và chất khoáng. Auxin có tác động rõ rệt đối với quá trình hô hấp và trao đổi năng lượng (xử lý auxin với nồng độ từ 5^{-5} - 10^{-5} M, sau 15 - 30 phút hàm lượng ATP trong thân tăng lên gấp 2 lần). Auxin còn có ảnh hưởng đến trao đổi axit nucleic. Auxin có tác dụng nhiều mặt lên quá trình sinh trưởng của tế bào, hoạt động của tầng phát sinh, sự hình thành rễ, hiện tượng ưu thế ngọn, tính hướng của cơ quan, sự ra hoa, tạo quả và hình thành quả không hạt.

- Tác động sinh lý của auxin : Auxin kích thích sự trương giãn của tế bào, đặc biệt theo chiều ngang, làm tế bào lớn lên : AIA gây ra sự giảm độ pH trong thành tế bào, hoạt hoá enzym phân giải các polisaccarit, làm cho liên kết giữa các sợi xenlulozơ lỏng lẻo, làm cho thành tế bào giãn ra dưới tác dụng áp suất thẩm thấu của không bào trung tâm.

Ngoài ra auxin cũng kích thích sự tổng hợp các hợp phần cấu trúc thành tế bào (xenlulozơ, pectin, hemixenlulozơ ...).

Sinh trưởng của tế bào và mô được kích thích trong điều kiện pH thấp (pH = 5), ta gọi đó là hiện tượng "sinh trưởng axit". Chính ion H^{+} đã hoạt hoá enzym phân giải các cầu nối ngang polisacarit giữa các sợi xenlulozơ với nhau, làm cho các sợi xenlulozơ tách rời nhau và dễ trượt lên nhau. Dưới ảnh hưởng của sức trương tế bào do không bào hút nước vào, mà các sợi xenlulozơ đã mất liên kết, trượt lên nhau làm cho thành tế bào giãn ra. Vai trò auxin là gây nên sự giảm pH của thành tế bào bằng cách hoạt hoá bơm proton (H^{+}) nằm trên màng sinh chất ; khi có AIA, bơm proton chuyển H^{+} từ trong tế bào vào thành tế bào (độ pH từ 6 - 7 giảm xuống 4).

Để tế bào sinh trưởng được thì song song với sự giãn thành tế bào còn xảy ra sự tổng hợp mới các cấu trúc tế bào. Người ta cho rằng, chính auxin có vai trò hoạt hoá gen để tổng hợp nên các enzym cần thiết cho sự tổng hợp các hợp phần đó.

- Auxin có tác động đến tính hướng động (hướng quang và hướng đất) :

Bằng cách sử dụng nguyên tử đánh dấu, cho biết AIA được phân bố nhiều hơn ở phần khuất ánh sáng cũng như phần dưới của cơ quan nằm ngang, gây nên sự sinh trưởng không đều ở hai phía của cơ quan. Có 2 nguyên nhân :

+ Khi bị kích thích, sự vận chuyển phân cực của auxin bị ức chế.

+ Có sự tồn tại một điện thế trong cơ quan đó : auxin trong cây thường bị ion hoá (AIA), do đó sự phân bố điện dương nhiều hơn.

- Auxin gây hiện tượng ưu thế ngọn :

Hiện tượng ưu thế ngọn là hiện tượng phổ biến trong cây. Khi chồi ngọn và rễ chính sinh trưởng sẽ ức chế sinh trưởng của chồi bên và rễ phụ và ngược lại. Đó là do lượng AIA được hình thành trên ngọn cao hơn và được vận chuyển xuống dưới. Trên con đường đi xuống, nó đã ức chế sinh trưởng chồi bên. Nếu cắt đỉnh ngọn, tức là làm giảm hàm lượng auxin nội sinh sẽ kích thích chồi bên sinh trưởng. Tác dụng của xytokinin ngược lại, (làm yếu ưu thế ngọn) kích thích chồi bên sinh trưởng. Do đó mức độ của ưu thế ngọn phụ thuộc về tỷ lệ giữa auxin/xytokinin. Càng gần chồi ngọn, tỷ lệ này càng cao và ưu thế chồi ngọn càng mạnh mẽ.

- Auxin kích thích sự ra rễ : Tác động hình thành rễ, đặc biệt là rễ phụ, hiệu quả của auxin khá đặc trưng (giảm cành, chiết cành). Thường gồm 3 giai đoạn :

+ Phân hoá tế bào ở vùng tầng phát sinh.

+ Xuất hiện mầm rễ.

+ Mầm rễ phát triển thành rễ phụ, xuyên qua vỏ ra ngoài rễ.

Sự phân hoá tế bào cần lượng auxin khá cao. Đó là lượng auxin nội sinh và auxin bổ sung từ bên ngoài. Kỹ thuật nuôi cấy mô và nhân giống vô tính cần thiết bổ sung auxin với một liều lượng thích hợp nhằm kích thích sự đâm rễ (AIB và ANA ở nồng độ 4000 - 6000ppm ngâm 3 - 5 giây với nồng độ 50 - 100ppm ngâm cành chiết lâu 24 giờ).

- Auxin kích thích sự hình thành quả và tạo quả không hạt :

Phôi hạt (phát triển từ hợp tử) là nơi tổng hợp auxin sẽ khuếch tán vào bầu nhụy và kích thích bầu nhụy lớn lên thành quả. Quả chỉ được hình thành khi có sự thụ tinh. Bổ sung thêm auxin cho hoa dùng 2,4D : 5 - 10ppm, ANA : 20 - 30ppm, 4 CPA : 15ppm cho cà chua làm tăng hoặc thay thế lượng auxin nội sinh trong phôi, do đó có thể không cần quá trình thụ phấn, thụ tinh mà bầu vẫn lớn lên và tạo thành quả. Đó là lý do để giải thích sự hình thành quả không qua thụ tinh và quả không có hạt.

- Auxin kích thích sự chuyển động của chất nguyên sinh, làm tăng sự di chuyển chất nguyên sinh trong trao đổi chất, kích thích các quá trình sinh tổng hợp và ức chế sự phân giải hợp chất cacbon sẽ thúc đẩy các quá trình sinh lý (quang hợp, hô hấp, hấp thụ và vận chuyển nước, muối khoáng và chất hữu cơ trong cây).

- Auxin kìm hãm sự rụng lá, hoa, quả : Auxin ức chế sự hình thành tầng rời ở cuống lá, hoa, quả là nơi khá nhạy cảm với các chất ức chế sinh trưởng. Phun auxin lên lá, hoa, quả (phun α ANA : 10ppm cho nho ; 20ppm cho táo hay 2,4D 8 - 16ppm cho nụ hoa nho) sẽ tránh được sự rụng sớm lá, hoa và quả non, tạo cho năng suất được ổn định và nâng cao.

1.4.2. Giberelin. Giberelin là nhóm phytohormon được phát hiện sau auxin khi nghiên cứu "bệnh lúa von" do nấm gây bệnh *Gibberella fujikuroi*, được Kurosawa (Nhật Bản) phân lập từ 1926 và Yabuta (1934). Axit giberelic ở lúa von có công thức hoá học $C_{19}H_{22}O_6$ gọi là Giberelin A_3 có hoạt tính mạnh nhất.

Ngày nay đã có trên 50 loại giberelin $GA_1, GA_2, \dots GA_{52}$. GA được tổng hợp trong phôi đang sinh trưởng, trong các cơ quan đang sinh trưởng (lá non, rễ non, quả non). Từ 100000 búp non cây hướng dương có thể thu 1mg GA_3 . GA vận chuyển không phân cực như auxin. Tốc độ vận chuyển qua nhu mô đạt từ 5 - 20mm/giờ, tương đương với vận chuyển chất đồng hoá khác. Sự vận chuyển cần tiêu tốn năng lượng. Mạch libe là con đường vận chuyển chính của giberelin và auxin từ lá xuống. Trong tế bào thì lục lạp là bào quan tổng hợp GA mạnh nhất.

GA được tổng hợp từ geranyl - geraniol (20C) tới mevalonat, qua một số phản ứng mà chất trung gian quan trọng nhất là axit kaurenic, cơ sở của sự tổng hợp giberelin, với enzym và ATP, NADPH₂ là sản phẩm sẵn có trong lục lạp.

GA trong cây cũng có dạng tự do và liên kết với glucosơ và protein. Khác với auxin, GA khá bền vững ; khả năng phân giải rất ít.

- Cơ chế tổng hợp và tác động của GA : GA được tổng hợp vào ngày thứ hai của sự nảy mầm ở phôi hạt. GA được giải thoát từ phôi, khuếch tán qua nội nhũ tới lớp aloron để kích thích sự hình thành và giải phóng enzym thủy phân trong aloron. Sau đó enzym được khuếch tán vào nội nhũ để thủy phân các chất đa phân tử thành đơn phân tử kích thích sự nảy mầm của phôi. Các tế bào aloron là tế bào sống không phân chia, có chức năng đặc trưng là hình thành và giải phóng các enzym tiêu hoá khối nội nhũ của hạt.

GA cảm ứng hoạt hóa gen mã hóa cho enzym α -amilaza và các enzym thủy phân khác. Ngoài tác dụng hoạt hóa gen, GA còn kích thích các enzym xâm nhập vào nội nhũ. Chính nhờ tác dụng mở gen mà GA có vai trò quan trọng trong sự phân chia tế bào, sự kéo dài tế bào, sự phân hoá hoa (chất florigen là hoocmon kích thích ra hoa là tập hợp giberelin và antêzin).

GA làm tế bào kéo dài, lớn lên - liên quan với cơ chế hoạt động của bơm proton và giãn nở của thành tế bào (như auxin).

- Hiệu quả sinh lý của Giberelin :

Giberelin với nồng độ thích hợp (thường là $10^{-6}M/l$) có tác dụng sinh lý nhiều mặt : Kích thích sự phân chia và kéo dài tế bào, kích thích ra hoa, tạo quả. Đặc biệt làm cây cao vống lên rõ rệt. Tuy nhiên giberelin và auxin có hoạt tính khác nhau. Chẳng hạn GA không ảnh hưởng đến sự rụng lá, rụng quả, sự rũ xuống của cành bên, nhưng lại kích thích kéo dài thân và kích thích sự ra hoa.

+ GA kích thích thân mọc cao, dài : GA có hiệu quả sinh học rõ rệt nhất là làm thân mọc cao, dài ra, các lóng (ở họ hoà thảo) vươn dài ra : phun GA 10 - 100ppm, 3 lần, 2-4 tuần/lần làm cho mía dài dõng ra, sản lượng đường tăng 20 - 30%. Đó là do GA có tác động lên tế bào theo chiều dọc, làm tăng nhanh sự sinh trưởng dinh dưỡng, tăng sinh khối của cây (với nồng độ 20 - 50ppm). Tăng hiệu suất xơ và chất lượng sợi ở cây đay, cây lanh ; ở nho phun nồng độ 5 - 40ppm, tùy giống, năng suất tăng gấp 2 lần.

- GA có tác động rõ rệt đối với các đột biến lùn : Các đột biến lùn ở đậu, ngô ... có chiều cao chỉ bằng 20% chiều cao cây bình thường, là các đột biến đơn giản dẫn đến có khi thiếu một vài gen chịu trách nhiệm cho tổng hợp GA, do đó ở các đột biến này hàm lượng GA rất ít hay không có. Bổ sung lượng GA cần thiết làm cho cây phát triển có độ cao bình thường. Hiệu quả sinh lý này rất nhạy cảm, nên được dùng để xác định xem lượng GA có trong cây nhiều, ít, hay không có (biện pháp thử nghiệm).

GA kích thích sự nảy mầm của hạt, củ và thân ngầm :

GA phá vỡ trạng thái ngủ nghỉ. Trong trường hợp này, GA đã kích thích sự tổng hợp và hoạt tính amilaza và enzym thủy phân như proteaza ...

GA đã phân giải tinh bột thành đường tạo nguyên liệu và năng lượng cho quá trình nảy mầm. Thêm 1-3mg GA/l kg đại mạch làm cho hạt nảy mầm sớm hơn 1 - 2 ngày (dùng trong sản xuất bia).

Xử lý GA thúc đẩy enzym xenlulaza, hemixenlulaza phá vỡ trạng thái nghỉ, ngủ của hạt, củ, cần hành (dùng cho hạt đào, mận, mầm khoai tây) : phun GA 2ppm kết hợp xông hơi, có thể làm khoai tây sau thu hoạch đạt tỷ lệ nảy mầm > 90% trong 5 - 7 ngày.

- GA kích thích ra hoa và tạo quả sớm, quả không hạt. Thuyết hoocmon ra hoa (florigen) có mặt gibberelin GA kích thích sự ra hoa của cây dài ngày, có thể ra hoa trong điều kiện ngày ngắn, làm tăng hiệu quả xuân hoá, biến cây 2 năm thành 1 năm. GA kết hợp với t° thấp ($4 - 10^{\circ}\text{C}$) phá sự ngủ nghỉ, kích thích ra hoa sớm cho xà lách, su hào, cải lấy hạt. GA có tác động đến cơ quan giới tính : ức chế sự phát triển hoa cái và kích thích sự phát triển hoa đực.

Trong sự sinh trưởng của quả, GA có vai trò như auxin, làm tăng kích thước quả, tạo quả không hạt (nho dùng GA_3 5-20ppm, táo : 400ppm). Hiệu quả rõ rệt khi phối hợp GA với auxin (ở táo dùng 250ppm GA_3 + 10ppm auxin). (Giberelin có tác động làm cho tổng hợp auxin được tăng cường, hạn chế sự phân giải auxin). Phun 1-20ppm GA lên nụ hoa, quả non để phòng hoa quả không rụng.

- GA tác động tới các quá trình trao đổi chất : như quang hợp, hô hấp, trao đổi nitơ và photpho, trao đổi axit nucleic, hoạt tính enzym α -amilaza, proteaza, enzym thủy phân (đặc biệt là β - amilaza trong sản xuất bia, bánh kẹo).

GA ảnh hưởng tới thành phần hoá học, số lượng và kích thước quả, hạt (xử lý GA làm tăng lượng đường trong quả nho).

GA thúc đẩy sự sinh trưởng cây gỗ non và tạo thành cành mới.

Trong CNSH cây trồng, để cho tác động của GA lên sinh trưởng và phát triển của cây phát huy hết hiệu quả, ngoài việc sử dụng đúng liều lượng thích hợp, thì cần cung cấp đầy đủ chất dinh dưỡng cho cây.

1.4.3. Xytokinin

Là hoocmon có tác động kích thích sự phân chia tế bào. Năm 1963, Letham và Miller tách chiết được xytokinin đầu tiên ở hạt ngô và đặt tên là zeatin. Về sau xytokinin được phát hiện ở hầu hết các mô và cơ quan thực vật. Trong "sữa phôi" của phôi một số loài cây (dừa) chứa 1,3 - diphenylurê thuộc xytokinin. Các cơ quan non (chồi, lá non, quả non, tầng phát sinh, mô sẹo, hạt và quả cũng chứa xytokinin, trong 10ml dịch cây nho chứa 0,5 - 1,0 μ l xytokinin. Đầu chóp rễ chính và rễ phụ là trung tâm tổng hợp xytokinin, từ đó nó được vận chuyển lên phía trên theo mạch gỗ với dòng thoát hơi nước. Các chất xytokinin nhân tạo phun lên lá di chuyển khó khăn hơn vì không vận chuyển theo mô mềm. Tuy nhiên cũng có sự vận chuyển hướng gốc. Trong cây xytokinin ở dạng tự do hay liên kết và bị phân giải bởi các enzym.

a) Cấu trúc : Phần lớn xytokinin là dẫn xuất của adenin.

Xytokinin mất hoạt tính do việc hình thành glucozit : liên kết 6-amino bị tách ra, tiếp theo bằng phản ứng oxy hoá hoặc chuyển hoá adenin gây nên sự mất hoạt tính. Sự thay

thể ở vòng adenin làm biến đổi hoạt tính sinh học, nhưng có 200 dẫn xuất của urê như cloro-phenyl phenylurê có hoạt tính mạnh như xytokinin.

b) Cơ chế tác động : Xytokinin tác động kích thích quá trình phân chia tế bào, kích thích hình thành cơ quan mới, ngăn chặn sự hoá già của cây ở mức độ phân tử và tế bào.

Xytokinin kiểm tra sự tổng hợp protein từ giai đoạn dịch mã, vì vậy khi thiếu xytokinin thì tế bào không phân chia được mặc dầu ADN có thể được tiếp tục tổng hợp nhưng quá trình tổng hợp protein không xảy ra. Xytokinin ngăn chặn sự hoá già có liên quan đến khả năng ngăn chặn sự phân huỷ protein, axit nucleic và diệp lục.

c) Hiệu quả sinh lý của xytokinin

- Các chức năng khác nhau ở mức độ tế bào :

Xytokinin kích thích sự phân chia tế bào với sự hiện diện của auxin. Nó thúc đẩy sự lớn lên của tế bào nhưng khác auxin, nó thúc đẩy sự tổng hợp protein.

- Vai trò của xytokinin ở mức độ cơ thể :

+ Xytokinin kích thích sự tạo mới các chồi và loại bỏ kìm hãm sự ngủ của chồi, trong khi đó hạn chế sự phát triển của rễ.

+ Thúc đẩy sự phá thời kỳ ngủ của các hạt (rau diếp, thuốc lá, cỏ chia ba ...) và một số mầm (nhô ...) làm cho sự nảy mầm được dễ dàng.

+ Xúc tiến sự phát triển các chồi hoa ở một số loài cây trong điều kiện quang chu kỳ không thuận lợi.

+ Xytokinin và ethrel, kích thích (ở nồng độ 50 - 750ppm) sự hình thành hoa cái.

+ Kích thích sự chuyển hoá các tiền lập thể thành lục lập, làm chậm sự phân huỷ diệp lục, làm chậm sự hoá già của lá.

- Xytokinin tác động tới sinh trưởng tế bào.

- Xytokinin cần thiết cho sự phân chia của tất cả tế bào thực vật :

+ Các mô của cây một lá mầm, cây hạt trần và các cây họ dương xỉ rất khó trồng nhưng cho thêm sữa dừa hay kinêtin sẽ làm cho tế bào kéo dài, phát triển và tăng kích thước.

+ Tác động của xytokinin tới sự phân chia tế bào, quan sát được ở vi khuẩn (*Escherichia coli*) và nguyên sinh động vật.

+ Tác động của xytokinin thấy rõ ở 2 giai đoạn phân chia tế bào : xytokinin làm tăng hàm lượng ADN và giai đoạn phân chia thành 2 tế bào mới.

Xytokinin có thể làm tăng kích thước của tế bào. Ở rễ và thân, các xytokinin kìm hãm sự kéo dài theo chiều dọc nhưng kích thích sự mở rộng kích thước theo chiều ngang và bề dày của cơ quan các loại củ cải.

Xytokinin kích thích sự tổng hợp protein, tham dự vào ARN, bảo đảm cho sự gắn các axit amin vào chuỗi polipeptit.

- Xytokinin kích thích tạo thành cơ quan mới :

Trên những đoạn thân thuốc lá trong môi trường nuôi cấy mô, hiệu quả ức chế của AIA 5.10^{-8} g/ml (hay $1.4.10^{-7}$ M) đối với sự tạo chồi mới có thể được cân bằng nếu thêm adenin

với nồng độ cao ($7.5.10^{-5}$ g/ml). Kích thích tạo thành rễ mới khi sử dụng liều lượng cân bằng giữa auxin và xytokinin (2.0^{-6} g/ml AIA và 2.10^{-8} g/ml kinêtin). Đối với sự tạo chồi mới thì tỷ lệ trên là đối với kinêtin và auxin. Người ta thấy một sự đối kháng giữa auxin là hoocmon tạo rễ và xytokinin là hoocmon quy định tạo cành mới. Người ta xác định một tỷ lệ 10^{-6} g/ml kinêtin và 3.10^{-8} g/ml auxin cho sự tạo cành mới (tỷ lệ 35 và 1 đối với 2 chất), nhưng nếu dùng adenin thì sử dụng tỷ lệ 1500 và 1. Tác động của xytokinin đối với sự tạo rễ mới, nói chung là tác động ức chế, trừ trường hợp sử dụng với nồng độ thấp thì có tác động dương tính một cách gián tiếp qua sự phân bào và sự phân hoá tế bào.

1.4.4. Các chất ức chế sinh trưởng (inhibitors)

Trong quá trình sinh trưởng và phát triển, hai nhân tố đối lập kích thích và kìm hãm đồng thời tác động bảo đảm tính cân bằng, điều hoà sự trao đổi chất và các quá trình sinh lý ở thực vật diễn ra bình thường. Thuộc về các chất ức chế sự sinh trưởng có: axit absixic, êtylen, các hợp chất phenol, các chất gây ức chế, chất diệt cỏ.

a) *Axit absixic* (AAB, ABA, còn được gọi là chất gây ngủ, hoocmon của tai nạn).

Năm 1953, Osborne tìm thấy chất làm rụng lá (absixin), sau đó do tác động làm ngủ, nghỉ các chồi nên đặt tên là chất gây ngủ (dormin). Năm 1968 Addicott đặt tên là axit absixic. Nó được tách chiết từ cơ quan đang ngủ nghỉ hay sắp rụng ở nhiều thực vật bậc cao, dương xỉ, rêu, mộc tặc, lá và quả bông, lá đậu.

- Đặc điểm : AAB được sinh tổng hợp bắt nguồn từ nhiều phần tử cùng terpenoit của phân tử carotenoit đặc biệt là violaxantin. Sinh tổng hợp AAB tiến hành một cách nhanh chóng khi cây và lá gặp nạn (hạn, úng, đói chất dinh dưỡng, bị bệnh hay bị tổn thương ...). Sự tăng nhanh làm lượng AAB có liên quan đến sự tạo mới AAB, một phần là do sự chuyển đổi từ dạng liên kết thành dạng tự do.

Cơ chế của tác động AAB được giải thích là trong lúc tế bào ở trạng thái ngủ, nghỉ thì các hoạt động tổng hợp axit nucleic (ADN), protein và enzym bị ức chế. Khi xử lý GA (là chất đối kháng với AAB) hay xử lý bằng nhiệt độ thấp, làm cho lượng GA nội sinh tăng lên sẽ giảm tác động ức chế của AAB lên hệ thống đó, quá trình sinh trưởng và phát triển do đó mà được tiếp diễn. Tác động của AAB lên quá trình sinh trưởng là :

+ Làm biến đổi diện thể màng tế bào, điều tiết sự vận chuyển ion K^{+} qua màng, liên quan đến sự đóng mở của khí khổng. Khí khổng đóng khi lượng AAB nhiều.

+ Ức chế sự tổng hợp ARN do đó ức chế tổng hợp protein. Hiệu quả này ngược lại với hiệu quả hoạt hóa gen của GA và các hoocmon khác.

- Vai trò sinh lý của axit absixic : AAB là một chất ức chế mạnh mẽ sinh trưởng, nhưng với nồng độ cao không gây độc cho cây.

+ Vai trò chủ yếu là kìm hãm sự sinh trưởng và phát triển. Đó là chất đối nghịch với GA, làm chậm sinh trưởng của cành, của các lông làm chúng không dài lên được.

AAB gây nên trạng thái ngủ của chồi (ở cây lá rụng, cây họ cam quýt, khoai tây, begonia) của hạt (rau diếp, hoà thảo, rau cần ...).

AAB là một trong các chất kìm hãm thấm vào chóp rễ, tham gia vào các hoạt động hướng đất của rễ.

Ở các cây ngày ngắn lượng AAB cao là dấu hiệu gây nên sự ngủ của các phần vỏ hạt hay sự ngủ của chồi vào mùa thu, nó kích thích sự tạo củ cây ngày ngắn.

+ AAB làm lỗ khí đóng (với nồng độ $10^{-7}M$ sau 3 phút xử lý). Trong trường hợp thiếu nước, chỉ sau vài phút, hàm lượng của AAB tăng lên một cách nhảy cẫng, gấp đến 40 lần trị số ban đầu sau 4 giờ. Nếu lá lại có nước, lượng AAB hạ thấp xuống trị số khởi đầu.

AAB là hoocmon có vai trò điều chỉnh sự đóng mở lỗ khí khổng, có liên quan tới sự vận động nhanh chóng của ion K^+ .

AAB hoạt hóa kênh K^+ làm mất K^+ , nên sức trương nước của tế bào giảm làm khí khổng đóng lại.

+ AAB được xem là hoocmon thích ứng với tai nạn, khi cây phải chống lại các điều kiện bất lợi như hạn hán, thời tiết xấu lỗ khí đóng, rụng lá, cơ quan đi vào cuộc sống tiềm ẩn (ngủ, nghỉ). Ví dụ : cây phải biến đổi tăng nhanh hàm lượng AAB để thích ứng với điều kiện thiếu nước của môi trường đó (lỗ khí đóng lại, giảm sự thoát hơi nước).

+ AAB được xem là một phytohoocmon của sự hoá già. Mức độ hoá già của cơ quan và của cây gắn liền với sự tăng hàm lượng AAB. Khi hình thành cơ quan sinh sản và cơ quan dự trữ cũng là giai đoạn tổng hợp và tích lũy AAB nhiều nhất và tốc độ hoá già cũng tăng theo.

b) Êtylen ($CH_2 = CH_2$)

- Tính chất

+ Là một loại phytohoocmon ở dạng khí, có tác động kích thích sự chín của quả (hoocmon của sự chín), nó có trong tất cả các mô của cây với một lượng nhỏ. Do tác dụng làm rụng lá, hoa nên êtylen được xếp vào chất kìm hãm sinh trưởng.

Êtylen có nhiều ở quả đang chuẩn bị chín, mô bị bệnh, mô đang hoá già... Mêtionin là chất tiền thân của êtylen. Ở quả xanh không có sự chuyển đổi này.

Đối với C_2H_4 , nồng độ 0,01 là có tác động sinh lý. Một nửa của tác động tối đa là 0,1ppm ; nồng độ bão hoà 10ppm. Đối với prôpylen có tác động kìm hãm 100 lần kém thua (đối với thân đậu) và 500 lần kém thua (đối với lá chồi búp cà chua) so với êtylen.

+ Sự sản sinh êtylen trong thực vật diễn ra rất phổ biến :

Ở quả táo, lê, đào, chuối, dưa hấu trong quá trình chín, một lượng lớn C_2H_4 thoát ra, trừ cam quýt. Lượng thoát ra từ 0,001 - 0,5mol/kg/giờ nghĩa là chừng 0,03 - 15mg/kg/ngày. (1 lit $CH_2 = CH_2$ có khối lượng là 1,25g). Sự thoát êtylen mạnh khi chín và sau đó giảm sút.

Sự thoát êtylen tăng theo nhiệt độ tới $20^\circ C$ như hầu hết ở các hiện tượng sinh lý. Nó sút kém dần ở hạt nảy mầm (rau diếp, hạt hoà thảo), ở hành tỏi, ở hoa (hoa lan, hoa dâu tây) và ở lá già.

Auxin và 2,4D, axit naptalen axêtic kích thích rõ rệt sự thải êtylen. Các va chạm, cắt, gãy thúc đẩy và làm tăng nhanh sự sinh thoát êtylen (các mảnh cắt khoai tây, chuối, dưa hấu), sự xếp chồng dưa hấu, va chạm, ngay cả khi không va chạm (cam, quýt).

- *Vai trò sinh lý của êtylen* : Với nồng độ 0,01 - 10ppm trong không khí, tác dụng sinh lý của êtylen lên nhiều mặt.

+ Làm tăng nhanh quá trình chín ở quả. Các quả táo chín ương thúc đẩy sự chín của chuối khi để cạnh nhau. Muốn cho quả chín chậm (bảo quản có tính thương mại), tức hạn

chế lượng C_2H_4 thải ra bằng cách nhặt riêng các quả chín, hay hạ thấp nhiệt độ và giảm độ thoáng khí bảo quản.

Dùng ethrel (sản sinh ra êtylen) 500 - 5000ppm phun cho quả trước thu hoạch 4 tuần lễ sẽ làm cho quả chín đồng loạt trước 2 tuần. Dùng với nồng độ 500 - 1000ppm, ethrel kích thích chín của các loại quả. Muốn kích thích sự ra hoa tạo quả trái vụ, ngoài các auxin hay dùng (2,4D, α ANA : 5-25ppm) phun lên quả, còn dùng đất đèn (C_2Ca) thả trên nón dứa, khi gặp mưa đất đèn giải phóng C_2H_4 làm quả chín đồng loạt, ý nghĩa kinh tế khá cao, có thể tăng thêm vụ. Ethrel và β - hydroxyethylhydrazin là các sản phẩm dùng kích thích sự ra hoa trái vụ. Ethrel và xytokinin kích thích sự hình thành hoa cái. Với nồng độ 50 - 250ppm phun trên bầu bí, hoa cái xuất hiện khá phổ biến.

+ Làm rụng lá, quả do êtylen. Êtylen là hoocmon chín nên gây rụng. Khi lá già hàm lượng êtylen tăng cao, trong khi đó auxin (kìm hãm sự rụng lá) thì hạ thấp xuống. Êtylen chỉ kìm hãm sự phân bào ở vùng có tầng rời, kích thích sự tổng hợp của enzym xenlulaza và pectinaza, làm tăng sự già của tế bào. Vì vậy sự rụng lá, quả lệ thuộc vào tỷ lệ auxin/êtylen. Nếu tỷ lệ này thấp thì gây rụng ; ngược lại tỷ lệ cao ngăn ngừa chống rụng. Muốn chống rụng, phun thêm auxin cho hoa, quả.

+ Ức chế pha kéo dài của tế bào (đặc biệt ở rễ). Sự phát triển của mầm khoai tây bị kìm hãm bởi êtylen. Trong quá trình chín của quả (táo, lê), êtylen sản sinh ra sẽ làm chậm sự sinh trưởng của mầm các thân củ.

Trong nhiều trường hợp, êtylen kích thích sự xuất hiện rễ phụ ở cành giâm (xử lý kết hợp auxin và êtylen cho kết quả cao hơn xử lý riêng rẽ), ức chế sự phát triển chồi bên, tham dự vào sự vận chuyển phân cực của auxin, can dự vào tính hướng đất của cây : êtylen làm chậm vận động quay về phía đất của cơ quan nằm ngang, kích thích sự sinh trưởng ở mặt trên của cơ quan đó. Ta gọi đó là "tính hướng đất kép" (cây đậu, chồi non : lá quay xuống phía dưới) dùng để xác định lượng êtylen trong cây.

+ Êtylen có tác động đánh thức sự ngủ của một số hạt, kích thích sự ra hoa của cây ngày ngắn.

Xác định vai trò sinh lý của êtylen cho thấy : trong quá trình chín của quả, tính thấm của màng tế bào trong thịt quả thay đổi dẫn đến sự giải thoát các enzym mới có liên quan đến hô hấp, biến đổi pH, độ mềm của thành tế bào ... gây nên hiệu quả quan trọng kích thích sự tổng hợp của enzym, tham gia vào quá trình chín của quả (thay đổi sản phẩm, mùi, vị ...). Về tác dụng tương hỗ giữa êtylen và auxin, người ta cho rằng auxin đã kích thích sự hình thành êtylen trong các bộ phận của cây. Auxin chỉ có vai trò kích thích khi ở nồng độ thấp, còn ở nồng độ cao nó lại gây ức chế. Auxin bản thân nó không gây ức chế trực tiếp mà tạo điều kiện cho êtylen tổng hợp mạnh trong mô, để êtylen gây ra hiệu quả ức chế sinh trưởng. Trong trường hợp êtylen kích thích sự rụng lá, quả là do nó kích thích sự tổng hợp enzym xenlulaza phân huỷ thành tế bào.

1.4.5. Các phytochrôm

a) Cấu trúc và đặc tính của phytochrôm

Phytochrôm là một crômoprotein có khối lượng phân tử 120000- 240000 dalton với một cấu trúc chất nhị trùng hợp (dimer). Hàm lượng trong cây thường rất thấp 10^{-10} - $10^{-8}M$.

Có mặt ở thực vật có màu xanh (ở nấm không có). Trong cây nó có ở mô phân sinh đang ở thời kỳ sinh trưởng mạnh, cũng có ở thân và ở rễ.

Ở cây 2 lá mầm (ví dụ ở thân đậu non), phytochrom có ở chồi mầm và ở vùng uốn cong của trụ trên lá mầm.

Ở cây 1 lá mầm có ở gần chóp bao lá mầm của các cây úa vàng (lúa mì, đại mạch, ngô), ở đó hàm lượng cao hơn cả, hay ở các mắt của cuống lá.

Phytochrom là một sắc tố - enzyme của quang chu kỳ, tồn tại trong tối ở 2 dạng P_{660} và P_{730} . Hai dạng này có thể chuyển đổi cho nhau tùy điều kiện nhiệt độ và chiếu sáng.

b) Chức năng của phytochrom

Phytochrom có vai trò nhiều mặt tới sinh trưởng và ra hoa, sự nảy mầm, sự tổng hợp diệp lục và sắc tố, chuyển động của lá và lục lạp, các tiến triển của nhiều hoạt động sinh lý khác.

- Tác động lên sự ra hoa và sinh trưởng :

+ Sự ra hoa có liên quan với nhiều vai trò của hoạt tính nhanh nhạy của phytochrom và những biến đổi tính nhạy cảm của cây đối với ánh sáng theo thời gian. Nó kìm hãm sự tạo hoa của cây ngày ngắn.

+ Chức năng của phytochrom còn thể hiện rõ rệt ở cây ngày dài hay cây ngày ngắn.

* Đối với cây ngày ngắn : chiếu ánh sáng đỏ làm gián đoạn giai đoạn tối, sẽ kìm hãm sự ra hoa. Đó chính là P_{730} - chất kìm hãm.

* Đối với cây ngày dài : P_{730} có tác động kích thích sự ra hoa vào thời gian tối (nếu thời gian tối không quá dài) và thời gian sáng (nếu thời gian sáng không quá dài).

+ Phytochrom có tác động đến sinh trưởng của thân : quan sát rõ ở cây úa vàng. Cây xanh cần thiết thu nhận trong 24 giờ một thời gian sáng để thực hiện quang hợp (gọi là giai đoạn dinh dưỡng ánh sáng) và một thời gian tối. Như vậy là phytochrom có tác động vào thời gian sáng và cả thời gian tối. Bắt đầu thời gian tối, nếu chiếu lâu ánh sáng đỏ xa (660 - 700nm) sẽ kích thích mạnh sự kéo dài các lông. Nếu thiếu ánh sáng đỏ xa, cây sẽ úa vàng, thân kéo dài, lá bé, nghèo diệp lục.

Ánh sáng đỏ (có tác dụng ngược với ánh sáng đỏ xa) kìm hãm sự sinh trưởng phôi của hoà thảo, của trụ dưới lá mầm của mù tạc và lông của cây mầm.

Phytochrom kích thích sinh trưởng lá mầm và lá non cây hai lá mầm (nhưng kìm hãm lá cây một lá mầm).

- Tác động của phytochrom tới sự nảy mầm :

Các hạt giống nhạy cảm với ánh sáng chịu sự kiểm soát của phytochrom. Sự chuyển hoá từ $P_{660} \rightarrow P_{730}$ đã kích thích sự thức dậy của hạt nảy mầm. Nó đòi hỏi một ít năng lượng và ít nước và có thể thực hiện trên hạt "khô", tức là trước lúc hạt trương phồng.

+ Một số hạt trung tính với ánh sáng (cà chua, dưa chuột ...) : nhiệt độ nâng cao ($t^{\circ} = 30^{\circ}\text{C}$) có thể gây nên nhu cầu về ánh sáng. Thêm một vài chất ức chế (như cumarin) hay ánh sáng đỏ xa sẽ kìm hãm sự nảy mầm.

+ Những hạt bị ánh sáng kìm hãm sự nảy mầm, ánh sáng đỏ xa có thể làm cho hạt nảy mầm trong tối ; ánh sáng đỏ đã tác động sự hình thành mạnh mẽ ánh sáng đỏ xa gây nên sự ngủ thứ cấp.

Tác động của ánh sáng đỏ xa có thể đo được sau 1 giờ để hạt trong tối : đã làm cho 80% số hạt được nảy mầm (nếu để 4 giờ trong tối).

+ Dung dịch gibberelin 5, 10 hay 20 μ g/l kích thích sự nảy mầm của các quả bắp rau diếp, ngay cả trong tối, hiệu quả tỷ lệ với liều lượng sử dụng, tác dụng phối hợp giữa P₇₃₀ và gibberelin 5 μ g/l cho biết kết quả tốt theo thời gian chiếu P₇₃₀.

Kết quả cho thấy tác động phối hợp và tác động thúc đẩy của P₇₃₀ và gibberelin, sau 1 giờ để trong tối (độ nảy mầm được 71% so với 15% đối chứng).

+ Tác động quang kim hãm sự nảy mầm trong khi chiếu sáng lâu.

Sự nảy mầm có thể bị kim hãm khi chiếu sáng lâu với ánh sáng đỏ xa và xanh (480nm).

Khi ngâm nước một cách đầy đủ, tác động kim hãm hạt nảy mầm của P₇₃₀ có một trạng thái mới. Chỉ ở pha ngâm nước thì sự nảy mầm của hạt mới bị kim hãm bởi ánh sáng. Trong điều kiện chiếu sáng lâu bằng tia đỏ xa (hay xanh) hàm lượng, tỷ lệ của P₇₃₀ trở nên thấp so với mức bình thường trong tối và chính nó đã cản trở sự nảy mầm.

Tác động của nhiệt độ cao có cùng hiệu quả : nó thúc đẩy sự phân huỷ P₇₃₀ theo chiều hướng của sự nâng cao nhiệt độ. Chẳng hạn hạt rau diếp ở 30°C trong tối không nảy mầm nhưng ở 20-22°C thì tỷ lệ hạt nảy mầm đạt 50% ; ở 5°C tỷ lệ lớn hơn, đạt 66%.

+ Nhiều tác giả đã chứng minh sự hiện diện của phytochrom kích thích sự kéo dài của trụ dưới lá mầm (là nơi tổng hợp antôxyan) ở ánh sáng đỏ xa và ở ánh sáng xanh. Phản ứng này gọi là sự không thích đáng của "năng lượng cao".

– Ở thực vật, sự kéo dài của thân, có thể thu được khi chiếu lâu ánh sáng đỏ xa.

– Quang kích thích sự nở hoa ở cây ngày dài :

Nhiều cây ngày dài có thể nở hoa nếu sự chiếu sáng đầy đủ và lâu.

Một sự phối hợp chiếu sáng kép và lâu dài (660 và 730nm đồng thời) sẽ cho hiệu quả cao hơn.

– Tác động của phytochrom đối với tổng hợp sắc tố và enzym :

+ Với diệp lục a : sự tổng hợp ở giai đoạn 1, từ protochlorophyll phải thông qua phytochrom :

Ngay từ các phút chiếu sáng đầu tiên có sự chuyển hoá từ tiền diệp lục thành diệp lục, bắt đầu từ điểm 0 có sự tăng diệp lục nhanh chóng.

Trong 3 giờ, sự tổng hợp diệp lục chậm dần.

Tổng hợp diệp lục tăng lên và ổn định trong nhiều giờ.

Như vậy là chiếu trước ánh sáng đỏ cho cây trong một thời gian ngắn (3 giờ) cho thấy tác dụng của P₆₆₀ có hiệu quả tới tổng hợp diệp lục a ngay sau khi chiếu. Hơn thế, sự tổng hợp axit nucleic ở cây úa vàng có vai trò của ánh sáng thông qua phytochrom. Sự tổng hợp các sắc tố antoxyan, flavôn, carotenôit, các betaxyanin cũng có vai trò của phytochrom.

+ Phytochrom còn có tác dụng tích cực tới chuyển động của lá cây họ đậu (cây trinh nữ) và sự giải phóng oxy trong quang hợp.

+ Phytochrom có ảnh hưởng tới tổng hợp enzym amilaza (lá mầm cây mù tạc) có vai trò gần như P₇₃₀ và GA ; tới enzym peroxydaza, scorbat oxydaza, tới glutamat oxydaza, tới phenylalanin - amoniacyl-lyaza (PAL).

Ở một vài loài vi khuẩn lam (như *Tolypothrix*, *Cyanidium*) có một vài sắc tố phycocrôm. Loại đỏ kích thích tổng hợp phycoerytrin ; loại xanh lục kích thích tổng hợp sắc tố phycoxanthin. Cả hai hấp thụ chủ yếu vùng ánh sáng xanh lục và da cam.

Phytocrôm ở tảo có vai trò thích ứng trong sự đồng hoá CO_2 ở trong nước, kích thích sự tổng hợp sắc tố ở tảo (tương ứng như phytocrôm kích thích tổng hợp sắc tố ở thực vật bậc cao).

c) Hình thức và kiểu tác động của phytocrôm

Phytocrôm là một sắc tố enzym phân bố một cách rộng rãi và phong phú trong các mầm sinh trưởng, vùng sát đỉnh sinh trưởng các mô phân sinh, các cơ quan dự trữ (hành, củ). Vai trò của nó có đặc tính của auxin ; tác động ở mức độ các axit nucleic (hoạt hóa gen) ; có vai trò trong các tổng hợp ; tác động ở mức độ tính thấm của tế bào ; có vai trò trong vận động cảm ứng.

Phytocrôm có mặt trong nhân của tế bào cây lúa mì úa vàng, trong ty thể, lục lạp, tế bào chất và trong màng sinh chất.

Hình thức và kiểu tác động của phytocrôm : được thể hiện rõ trên 3 loại hình :

- Phytocrôm và màng :

+ Khi ánh sáng chiếu rọi tới cây, gây nên sự chuyển đổi các đặc tính trên bề mặt rễ, tới điện thế, đến sự vận chuyển của lá và lục lạp. Tác động của phytocrôm tới tổng hợp protein màng, có thể là :

+ Một phần phytocrôm có thể liên kết ở các hợp phần màng.

+ Làm thay đổi cấu hình của protein tồn tại ở P_{660} và P_{730} .

Hướng của các phần tử P_{660} và P_{730} khác nhau :

* Trong tối, phytocrôm P_{660} phân bố một cách đồng dạng trong tế bào, nhưng các phần tử P_{730} sau khi tiếp nhận ánh sáng đỏ vận chuyển tới vị trí chất tiếp nhận đặc biệt của màng.

* Khi có quang chuyển đổi từ $P_{660} \leftrightarrow P_{730}$ những thay đổi đặc tính thấm xảy ra ở màng để cho sự vận chuyển dễ dàng các chất đồng hoá, các cation (K^+), các hoocmon (giberelin), các ATP từ mặt này tới mặt kia của màng.

- Phytocrôm và enzym :

Phytocrôm hay phytocrôm-enzym có thể tác động như enzym trong trao đổi chất tế bào mà hoạt động của chúng liên quan với sự chiếu sáng. Ví dụ enzym phenylalanin-amoniacylaza (PAL) của bao lá mầm cây mù tạc có thể chuyển đổi phenylalanin của axit xianic, là tiền chất của nhiều hợp chất phenol, flavonoid, antoxyan, cũng như lignin, cumarin.

Vai trò của phytocrôm có liên quan đến các enzym khi được hoạt hoá bởi ánh sáng (ngoài PAL, là RuDP cacboxylaza, PEP cacboxylaza, enzym malic và malat dehydrogenaza, NAD kinaza) hay kim hãm (lipoxygenaza).

- Phytocrôm và vận động của cây :

Nhiều cử động của cơ quan và cơ thể thực vật là do ảnh hưởng của ánh sáng thông qua phytocrôm.

Các quang cảm ứng (như là hiện tượng gập lá của lá và lá chết cây họ đậu, với sự thay đổi tính thấm đã gây nên sự hạ thấp sức trương của các "động cơ gối" khớp. Sự co cụm các

lá chết do P_{730} (hay do va chạm). Trạng thái và vị trí thức dậy của lá do tác động của một sắc tố, nhạy cảm với ánh sáng xanh da trời.

Hiện tượng quay và chuyển vòng của lục lạp ở tảo diễn ra khi ánh sáng yếu, chúng xếp thẳng góc với tia sáng, trong khi đó sự phân bố lại các lục lạp ở cây bậc cao hình như được điều khiển bởi ánh sáng xanh da trời.

Hiện tượng mở đóng lỗ khí cũng như quang hướng động là các quá trình sinh học mẫn cảm với ánh sáng được phytochrom điều khiển.

Phytochrom thay đổi tùy thuộc vào chất lượng ánh sáng (tỷ lệ giữa ánh sáng xanh da trời và đỏ thay đổi theo vị trí mặt trời trong ngày). Trong bóng tối, dưới tán lá, lá cây hấp thụ nhiều ánh sáng đỏ hơn ánh sáng đỏ xa.

Phytochrom có vai trò trong giải phóng khí CO_2 , sinh trưởng, vận động của lá và thân.

Phytochrom tác động từng phần trong sự chuyển hoá ánh sáng khi ánh sáng yếu. Như vậy trong điều kiện tự nhiên, ánh trắng có thể tham dự làm chuyển đổi các phản ứng diễn ra trong cây.

d) Vai trò quan trọng của phytochrom trong CNSH

- Sự hiểu biết về phytochrom cho phép áp dụng nó vào nghề trồng hoa trong nhà kính. Phần lớn các cây hoa *Chrysanthemum* (Cúc) là các cây ngày ngắn mới nở hoa. Sau thời gian sinh trưởng dinh dưỡng ở ngày dài, sự nở hoa được thực hiện trong vài tuần ở điều kiện ngày ngắn.

Đáp ứng nhu cầu thường xuyên suốt năm về hoa cúc, ta có thể thực hiện cho nở hoa ngay trong điều kiện ngày dài, nếu ta sử dụng tác động hạn chế của ánh sáng thông qua phytochrom, bằng cách dùng những biện pháp hoá học. Ví dụ về mùa hè, sự nở hoa có thể thực hiện bằng cách dùng một màn phản chiếu để tạo các đêm nhân tạo.

Ngược lại, trong điều kiện ngày ngắn, muốn tránh sự ra hoa sớm của cây ở các giai đoạn còn non trẻ, ta dùng sự chiếu sáng nhân tạo để "giả vờ" ngày dài (một hệ thống chiếu sáng quay vòng).

Dùng tia đỏ xa (IR) kích thích sự ra hoa ở hoa *Kalanchoe blossfeldiana* (loại thuốc bỏng), loại cây ngày ngắn: nếu chiếu sáng dài không ra hoa, nhưng nếu bổ sung 1 phút ánh sáng đỏ xa, cây sẽ ra hoa.

- Trong nông nghiệp, ta có thể tạo ảnh hưởng của khí hậu, trên cơ sở của quang chu kỳ ở một vùng nào đó. Tất cả sự sinh trưởng của cây được quy định bằng một chế độ ánh sáng có vai trò phytochrom. Người ta áp dụng chiếu sáng nhân tạo cho nghề trồng rau và nghề trồng giống cây rừng.

Thực hiện sự ra hoa của cây trồng ở ngoài đồng ruộng, vườn rau màu, vườn hoa ... dùng "tia laser helium – neon" có lợi thế là tạo nên các tia sáng ngắn và mạnh (632,8nm) chỉ trong vài giây có thể chuyển $P_{660} \rightarrow P_{730}$ để cây ra hoa theo mong muốn của nhà sản xuất. Nền "nông nghiệp laser" có ứng dụng tốt với tác động nhanh và hiệu quả định hướng cũng được ứng dụng để tác động vào chồi ngủ của cây ăn quả.

- Một hướng đi của quang sinh học (sinh học ánh sáng) với sự nghiên cứu sinh lý của sự phát triển, rất cần thiết cung cấp đầy đủ mọi nhân tố dinh dưỡng (dinh dưỡng khoáng, thành phần và dinh dưỡng khí) cùng nhân tố môi trường thích hợp cho cây (nhiệt độ đất và

không khí, độ ẩm), chuyển đổi không khí và ánh sáng (cường độ, chất lượng, độ dài chiếu sáng, chất lượng của đèn chiếu sáng). Các đèn tungsten và ánh sáng huỳnh quang, các loại đèn cao áp ... đều có ý nghĩa cho nền sinh học sử dụng ánh sáng (hay quang hợp nhân tạo). Kỹ thuật sử dụng tổ hợp tất cả các nhân tố trong các phòng thí nghiệm, các nhà vườn trồng cây nhân tạo (các phytotron) đã trở thành các biện pháp hữu hiệu đạt kết quả cao của công nghệ tế bào thực vật.

II - AXIT NUCLEIC

Khi chúng ta ăn các protein khác nhau từ thức ăn thực vật, động vật vào bộ máy tiêu hoá, chúng sẽ bị các enzym phân giải thành các axit amin. Các axit amin được hấp thụ vào tế bào, ở đây các axit amin được liên kết với nhau theo một trình tự sắp xếp nhất định (cấu trúc bậc 1) - tạo nên protein đặc thù cho cơ thể chúng ta.

Một vấn đề đặt ra cho các nhà sinh học là : cái gì quy định nên trình tự sắp xếp của các axit amin trong chuỗi polipeptit. Ngày nay câu giải đáp đã được khẳng định : tính đặc thù của phân tử protein được mã hoá trong phân tử axit nucleic.

Năm 1868 J. F. Miescher một sinh viên Y khoa Thụy Điển khi xử lý mù vết thương bằng enzym pepsin chiết xuất từ dạ dày lợn, đã thu được hỗn dịch nhân tế bào và đem phân tích hóa học, đã thu được hợp chất được ông đặt tên là "nuclein" (từ thuật ngữ nucleus-nhân). Về sau ông phân tích tinh dịch cá hồi và cũng thu được chất nuclein. Vì chất này có tính axit nên được gọi là axit nucleic. Ngày nay nhờ tiến bộ của phân tích sinh hóa, người ta biết rõ cấu trúc và chức năng của axit nucleic.

2.1. Cấu trúc của axit nucleic

Axit nucleic là đại phân tử sinh học được cấu tạo từ nhiều đơn hợp được gọi là *nucleotit*.

Nucleotit được cấu tạo gồm ba thành phần : bazơ nitơ, đường 5 (pentozo) và axit photphoric. Nếu trong thành phần chỉ có bazơ nitơ và đường thì chất đó được gọi là nucleozit. Như vậy nếu nucleozit liên kết với axit photphoric sẽ tạo thành nucleotit.

Nhiều đơn hợp nucleotit liên kết với nhau nhờ liên kết photpho - dieste (là liên kết giữa axit photphoric của nucleotit với đường pentozo của nucleotit bên cạnh), để tạo nên chuỗi dài gọi là chuỗi polinucleotit.

Số lượng, thành phần và trình tự sắp xếp của các nucleotit trong chuỗi polinucleotit tạo nên cấu trúc bậc 1 của axit nucleic thể hiện tính đặc thù của axit nucleic.

Trong cấu thành của nucleotit thì bazơ nitơ là cấu thành quan trọng bậc nhất. Có đến 5 loại bazơ nitơ khác nhau là : *adenin* (A), *guanin* (G) (là những bazơ nitơ có cấu trúc vòng kép được gọi là các purin), *timin* (T), *citozin* (C) và *uraxin* (U) (là những bazơ nitơ có cấu trúc vòng đơn được gọi là các pirimidin).

Các nucleotit không chỉ là cấu thành của axit nucleic, mà chúng còn có vai trò quan trọng khác : như được sử dụng làm chất tích lũy năng lượng cao (ATP, GTP), chất vận chuyển hydro (NAD, NADP và FAD) và chất làm tín hiệu thông tin (AMP).

Tuỳ theo thành phần nucleotit và đường pentozo, người ta phân biệt 2 loại axit nucleic là *axit deoxyribonucleic* (ADN) và *axit ribonucleic* (ARN) có cấu trúc và chức năng khác nhau.

2.2. Axit nucleic - vật chất mang thông tin di truyền

Chúng ta sẽ xem xét lịch sử, qua đó các nhà sinh vật học đã khám phá ra axit nucleic đóng vai trò là vật chất di truyền.

2.2.1. Nhân tố chuyển dạng của Griffith

Năm 1928, nhà sinh vật học người Anh, ông Frederick Griffith đã công bố các kết quả thí nghiệm về sự chuyển dạng (transformation) ở vi khuẩn gây bệnh viêm phổi (*Streptococcus pneumoniae*). Ông sử dụng 2 chủng vi khuẩn, một chủng gây bệnh viêm phổi và một chủng không gây bệnh – chủng lành. Chủng gây bệnh có đặc tính gây bệnh và có vỏ bảo vệ, còn chủng lành không gây bệnh và không có vỏ. Ông giết chết vi khuẩn gây bệnh bằng nhiệt độ cao và đem trộn lẫn các vi khuẩn gây bệnh đã giết chết với các vi khuẩn lành còn sống và đem tiêm vào chuột. Chuột bị bệnh viêm phổi và trong máu chuột tìm thấy các vi khuẩn gây bệnh sống. Ông kết luận rằng các chủng lành đã chuyển dạng thành các chủng gây bệnh do nhân tố nào đó (nhân tố quy định bệnh và di truyền) đã chuyển từ chủng bệnh sang chủng lành và biến chủng lành thành chủng gây bệnh. Các chủng gây bệnh do bị chuyển dạng sinh sản ra con cháu đều mang tính gây bệnh. Tuy nhiên thời đó, Griffith chưa phát hiện được bản chất hoá học của nhân tố chuyển dạng.

Phải đợi đến năm 1944, ba nhà khoa học Oswald Avery, Colin MacLeod và Maclyn McCarty tại Viện nghiên cứu Rockefeller (Mỹ) đã tiến hành nhiều thí nghiệm tỷ mỉ và chính xác trên các đối tượng vi khuẩn mà Griffith đã nghiên cứu và chứng minh dứt điểm rằng, nhân tố do Griffith giả định có bản chất là ADN, nghĩa là ADN của vi khuẩn gây bệnh đã chuyển sang cho vi khuẩn lành, biến vi khuẩn lành thành vi khuẩn gây bệnh có vỏ bảo vệ. Các nhà di truyền học gọi hiện tượng đó là *biến nạp di truyền* (genetic transformation). Ngày nay người ta biết rằng, biến nạp di truyền là hiện tượng khá phổ biến và thông qua nó, các cá thể vi khuẩn có thể trao đổi gen cho nhau để đa dạng hóa hệ gen của quần thể vi khuẩn.

2.2.2. Thí nghiệm của A. Hershey và M. Chase

Năm 1952, hai nhà sinh vật học người Mỹ là Affred Hershey và Martha Chase đã tiến hành nhiều thí nghiệm rất tỷ mỉ và tài tình trên đối tượng thực khuẩn (*Bacteriophage*) T2 là virus ký sinh trong vi khuẩn *E.coli*. Bằng phương pháp tách phần ADN và protein của virus riêng biệt nhau đánh dấu phóng xạ ADN bằng photpho phóng xạ (P^{32}), đánh dấu protein bằng sunphua phóng xạ (S^{35}), đồng thời gây nhiễm cho *E.coli* bằng virus có mang ADN và protein đánh dấu, các ông đã chứng minh rằng chỉ có ADN virus xâm nhập vào tế bào vi khuẩn và gây bệnh cho vi khuẩn, vì virus tạo được vỏ protein của mình (không có đầu phóng xạ) và sinh sản ra nhiều virus T2 phá huỷ tế bào vi khuẩn. Khi đem tiêm trực tiếp ADN của T2 vào *E.coli* thì *E.coli* bị lây nhiễm, còn tiêm protein của T2 vào *E.coli* thì *E.coli* không bị lây nhiễm. Như vậy các ông đã khẳng định, vật chất di truyền của virus là ADN.

Nhiều virus có vật chất di truyền là ARN, ví dụ virus gây bệnh khảm thuốc lá, virus HIV v.v... Trong những năm 50, nhiều thí nghiệm phân tích ARN và protein cũng đã chứng minh rằng, ARN là vật chất mang thông tin di truyền.

2.2.3. Hiện tượng tải nạp di truyền

Cũng trong năm 1952, các nhà khoa học Joshua Lederberg và Norton Zinder khi nghiên cứu trên đối tượng vi khuẩn *Salmonella typhimurium* đã phát hiện hiện tượng được

gọi là *tải nạp di truyền* (genetic transduction) – là hiện tượng chuyển tải ADN từ cơ thể này sang cơ thể khác một cách gián tiếp thông qua virus và khẳng định vai trò của ADN trong đặc tính di truyền của cơ thể. Thông qua hiện tượng tải nạp, các cá thể vi khuẩn có thể trao đổi gen cho nhau để đa dạng hóa hệ gen của mình.

2.2.4. Thí nghiệm của Heinz Fraenkel Conrat

Năm 1957, Heinz Fraenkel Conrat sau nhiều năm nghiên cứu trên đối tượng virus khảm thuốc lá là virus chứa ARN và protein, đã công bố công trình chứng minh rằng ARN là phân tử chịu trách nhiệm trong việc lây nhiễm bệnh.

Ông đã sử dụng 2 chủng virus khảm thuốc lá khác biệt nhau để thí nghiệm và bằng phương pháp tách phần ARN khỏi protein và cho lây nhiễm vào thuốc lá bằng virus có ARN và protein hỗn hợp (ARN của chủng này lắp ghép với protein của chủng kia), ông đã quan sát thấy virus được nhân lên trong vật chủ đều mang đặc tính của chủng gốc cho ARN. Như vậy ở đây, phân tử ARN là vật chất mang thông tin di truyền.

Từ khi phát hiện ra ADN là vật chất di truyền, các nhà di truyền học đã tích cực nghiên cứu bản chất và cấu trúc phân tử của chúng.

2.3. Hai loại axit nucleic

Có 2 loại axit nucleic là axit deoxyribonucleic và axit ribonucleic.

2.3.1. Axit deoxyribonucleic (ADN)

Trong thành phần của ADN có 4 loại bazơ nitơ là adenin (A), guanin (G), citozin (C) và timin (T). Bazơ nitơ liên kết với đường deoxyribozơ (là đường pentozơ khác với ribozơ vì trong phân tử bớt đi một nguyên tử ôxy) và axit photphoric để tạo nên 4 loại nucleotit khác nhau là A, G, C và T (người ta vẫn dùng các ký hiệu của bazơ nitơ để chỉ 4 loại nucleotit). Bốn loại nucleotit liên kết với nhau nhờ liên kết photpho - dieste để tạo nên chuỗi dài, được gọi là chuỗi *polinucleotit* - đó chính là phân tử ADN ở dạng mạch đơn và cũng là cấu trúc bậc 1 của phân tử ADN.

Số lượng, thành phần và trình tự sắp xếp của các nucleotit trong mạch đơn polinucleotit thể hiện cấu trúc bậc 1 của ADN - là cách thức để mã hoá thông tin di truyền của cơ thể. Trình tự sắp xếp của 1 bộ ba nucleotit trong mạch polinucleotit (ADN) quy định cho trình tự sắp xếp của một axit amin trong mạch polipeptit (protein) - vì vậy người ta báo ADN là vật chất mang thông tin di truyền.

Trong tế bào của cơ thể, hai mạch đơn ADN xoắn lại với nhau tạo nên xoắn kép ADN theo mô hình của Watson - Crick (2 nhà khoa học đã phát hiện ra chúng từ 1953 và đã được giải thưởng Nobel). Sợi xoắn kép ADN được xem như là cấu trúc bậc 2 của ADN. Trong nhân tế bào, sợi xoắn kép ADN sẽ gấp cuộn tạo nên cấu trúc không gian của ADN và thường được gọi là nhiễm sắc thể của tế bào. Ví dụ, nhiễm sắc thể của vi khuẩn là phân tử ADN xoắn kép dạng vòng được gấp cuộn phức tạp tạo nên các siêu xoắn có tên gọi là *nucleoid* còn ở tế bào nhân chuẩn, sợi xoắn kép ADN liên kết với histon tạo nên các cấu trúc sợi nhiều cấp từ sợi nucleoxom đến sợi nhiễm sắc và nhiễm sắc thể.

Mô hình cấu trúc sợi xoắn kép ADN của Watson - Crick có những đặc điểm (hình 1.8).

Hai mạch ADN liên kết với nhau tạo thành sợi xoắn kép theo *nguyên tắc bổ sung* trong đó A liên kết với T và ngược lại T liên kết với A (nhờ 2 cầu nối hydro), G liên kết với C và

ngược lại C liên kết với G (nhờ 3 cầu nối hydro). Nguyên tắc bổ sung giữa A=T và G≡C quyết định tính tự tái bản cũng như tính phiên mã của phân tử ADN.

Hai mạch ADN xoắn với nhau theo một trục giữa và theo hai chiều ngược nhau, một mạch theo hướng 3'-5' và mạch kia theo hướng 5' - 3' (theo số chỉ phân tử cacbon của đường deôxyribozơ trong bộ khung deôxyribozơ - photphat của sợi xoắn ADN). Nguyên tắc **đối song song** của hai mạch ADN quyết định cơ chế tự tái bản mã và phiên mã của ADN.

2.3.2. Axit ribonucleic (ARN)

Trong thành phần của axit ribonucleic có 4 loại bazơ nitơ là A, U, G và C (ở ARN khác với ADN, T được thay bằng U) và đường pentozơ là đường ribozơ (ở ADN là đường deôxyribozơ).

Như vậy 4 loại ribonucleotit là A, U, G, C liên kết với nhau tạo ra các mạch đơn poliribonucleotit (ARN). ARN được tế bào sử dụng như chất truyền đạt thông tin di truyền.

Đối với một số virus thì phân tử ARN được dùng làm vật liệu tích thông tin di truyền. Ví dụ : virus khảm thuốc lá, virus HIV.

Người ta phân biệt 3 loại ARN :

- ARN - thông tin (mARN) - là mạch đơn được phiên mã từ ADN trong nhân và được vận chuyển ra tế bào chất sử dụng làm khuôn để tổng hợp protein. Trong tế bào người, có thể có đến 80.000 đến 100.000 phân tử mARN khác nhau được dùng làm khuôn để tổng hợp nên hàng 100.000 protein khác nhau.

- ARN - riboxom (rARN) - là loại ARN có hàm lượng nhiều nhất, chúng chiếm đến 80% lượng ARN của tế bào, chúng cũng được phiên mã từ ADN và liên kết với protein để tạo nên riboxom, là nơi tổng hợp protein.

- ARN - vận tải (tARN) - đóng vai trò vận tải các axit amin để lắp ráp vào mạch polipeptit khi tổng hợp protein, tARN là những phân tử ARN bé, chỉ chứa khoảng 75 - 85 nucleotit. Có khoảng trên 20 loại tARN khác nhau đặc trưng cho 20 loại axit amin khác nhau. tARN được tổng hợp trong nhân tế bào và trong cấu trúc của chúng có những phần gấp cuộn đặc thù, cho phép chúng nhận biết các axit amin cần vận chuyển, đồng thời chúng có chứa bộ ba đối mã *anticodon* bổ sung với các bộ ba *codon* của mARN, điều đó cho phép chúng lắp ráp đúng các axit amin trong mạch polipeptit theo mã trong mARN.

Ngoài ra, các nhà di truyền học còn phát hiện các loại ARN khác, ví dụ snARN (small nuclear ARN) tìm thấy trong nhân tế bào, có vai trò trong quá trình chế biến và xử lý các ARN nguyên phát thành ARN chín. Các snARN tác động như enzym nên được gọi là ribozim.

2.4. Mô hình cấu trúc phân tử của ADN

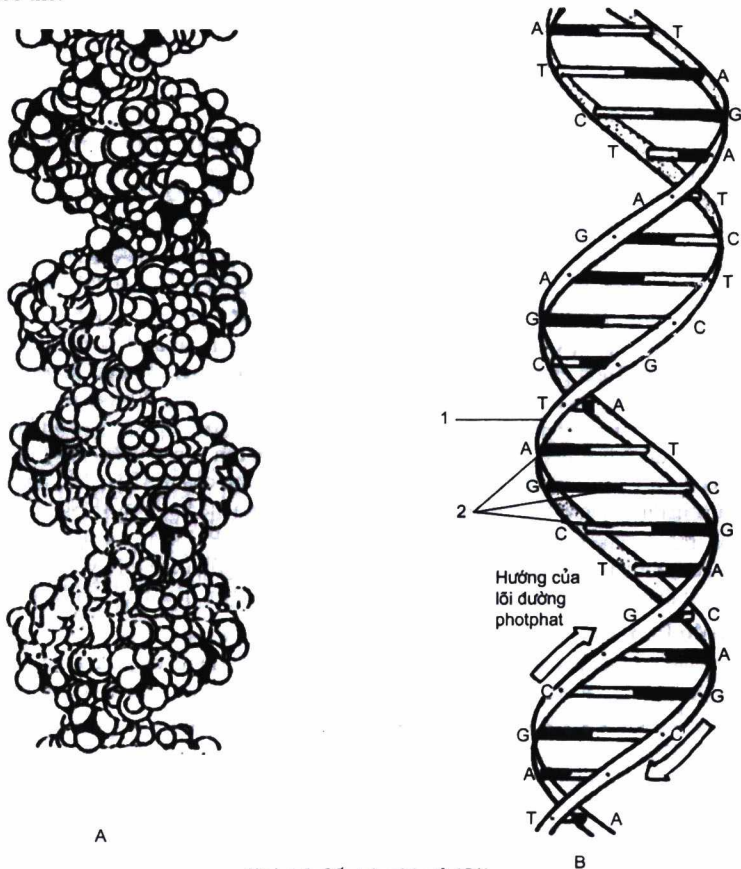
Như phần trên ta đã biết ADN là một loại axit nucleic. Chúng được cấu tạo gồm nhiều đơn hợp (monome), được gọi là nucleotit. Các nucleotit liên kết với nhau theo tuyến tính tạo nên mạch trùng hợp (polime), được gọi là mạch polinucleotit.

Năm 1953, nhà sinh học người Mỹ là Jame D.Watson và nhà vật lý người Anh Francis Crick, căn cứ vào cấu tạo hoá học của ADN và ảnh chụp tinh thể ADN bằng phương pháp nhiễu xạ Rongen (do Maurice Wilkins và Franklin Rosalind nghiên cứu) đã công bố mô hình cấu trúc phân tử ADN, được giới khoa học công nhận và năm 1962 hai ông (cùng với Wilkins) đã được nhận giải thưởng Nobel về công trình đó.

Theo mô hình cấu tạo phân tử ADN của Watson và Crick thì phân tử ADN là sợi xoắn kép gồm 2 mạch đơn deôxyribonucleotit xoắn với nhau quanh một trục trung tâm tương

tượng, trong đó hai tay thang dọc ở phía ngoài là các liên kết đường - photphat, còn nằm phía trong là các bậc thang – là các liên kết hydro giữa các bazơ nitơ của hai mạch theo nguyên tắc bổ sung : A-T và C- G (hình 1.8).

Sợi xoắn kép ADN theo nguyên tắc bổ sung của Watson và Crick không chỉ chứng minh cho công thức của Ewin Chargaff tìm ra trước đây là $[(A+T)/(C+G)] = 1$ (điều này có nghĩa là trong phân tử ADN, tổng số các nucleotit A và T luôn luôn bằng C và G), đồng thời cũng là cơ sở cấu trúc cho các đặc tính quan trọng của phân tử ADN như là phân tử tích thông tin di truyền ; là phân tử có đặc tính tự tái bản (ADN $\rightarrow$ ADN) để truyền thông tin di truyền qua các thế hệ. ADN còn là phân tử có đặc tính phiên mã để cho ra ARN ; từ đây dịch mã để tổng hợp protein, là cơ sở quy định nên các tính trạng hình thái và sinh lý mỗi thể hệ cơ thể.



Hình 1.8. Cấu trúc phân tử ADN

A. Mô hình phân tử lập thể.

B. Sơ đồ xoắn kép ADN : 1. Lõi đường - photphat ; 2. Cặp bazơ nitơ

Chương 2

KHÁI NIỆM VỀ GEN VÀ HỆ GEN

I - KHÁI NIỆM VỀ GEN

Từ năm 1865, G. Mendel khi công bố các quy luật di truyền đã giả định rằng, đặc tính di truyền được quy định bởi các "nhân tố" có ở bố mẹ và được di truyền lại cho thế hệ con cái. Các nhân tố đó quy định các tính trạng kiểu hình như độ lớn của cây, màu sắc hoa, dạng quả, hạt,... Nhân tố di truyền tồn tại thành cặp ở bố mẹ, được phân ly khi giảm phân và được tổ hợp lại khi thụ tinh. Sau năm 1900, tức là sau khi tái phát hiện các quy luật Mendel, các nhà di truyền học gọi các nhân tố Mendel là gen (gene - có nghĩa là sinh ra) và được xác định như là đơn vị chức năng quy định tính di truyền của cơ thể sống, và học thuyết nhiễm sắc thể của di truyền xác định rằng, gen được chứa trong các nhiễm sắc thể.

Trong cơ thể sinh sản hữu tính, nhiễm sắc thể tồn tại thành cặp tương đồng và gen tồn tại thành cặp gen - alen. Cặp gen alen phân ly khi giảm phân, tổ hợp lại khi thụ tinh và quy định tính trạng của cơ thể theo như quy luật Mendel.

Nhưng bản chất hoá học của gen là gì? Cấu trúc của gen ra làm sao? Mối tương quan giữa gen và protein đến tính trạng diễn ra như thế nào? Đó là những vấn đề mà suốt 60 năm của thế kỷ XX mới được làm sáng tỏ. Như ta đã biết phải đến năm 1944 cho đến những năm 1950, các nhà sinh vật học mới chứng minh dứt điểm rằng gen có bản chất là ADN.

Theo quan niệm chính thống ta có thể xem gen là một đoạn của phân tử ADN chứa các codon mã hoá cho mARN, tức là cho mạch polipeptit (protein). Nhưng theo nghĩa rộng thì các đoạn ADN chứa mã cho các tARN và rARN cũng được gọi là gen. Gen có cấu tạo phức tạp và đa dạng. Gen bao gồm các đoạn *intron* (tức là đoạn ADN không chứa mã với nghĩa là không có vai trò dịch mã tuy được phiên mã nằm xen vào các đoạn *exon* (tức đoạn chứa mã được phiên mã và được dùng để dịch mã). Gen có chứa đoạn khởi đầu và đoạn kết thúc, tức là điểm khởi đầu và điểm kết thúc cho sự phiên mã. Phía trước điểm khởi đầu có đoạn promoter là vùng để liên kết với ARN- polymeraza có nhiệm vụ xúc tác sự phiên mã. Đến lượt mình promoter được hoạt hoá nhờ đoạn enhancer nằm phía trước hoặc phía sau nó.

Còn mối tương quan giữa gen và protein thì ngay từ năm 1909, nhà vật lý người Anh là A. Garrod khi nghiên cứu bệnh sai lệch về trao đổi chất là Alkaptonuria (bệnh thể hiện trong nước tiểu có chứa alkapton do đó nước tiểu có màu đen khi tiếp xúc với oxy) đã giả thiết rằng, gen quy định tính trạng thông qua phân tử enzym xúc tác các phản ứng sinh hoá. Mãi đến những năm 1940, hai nhà di truyền học người Mỹ là G. Beadle và E. Tatum khi nghiên cứu trên nấm mốc *Neurospora crassa* đã đưa giả thuyết: một gen - một enzym. Nhưng vì enzym là một loại protein, cho nên các nhà sinh học phân tử đã xác định: một gen - một mạch polipeptit.

II - CẤU TRÚC CỦA GEN

Theo quan điểm hiện đại thì gen được xác định là một đoạn ADN chứa mã quy định cho một polipeptit. Nhưng khái niệm gen được mở rộng hơn ở chỗ người ta phân biệt : gen cấu trúc - đoạn ADN có chứa mã để tổng hợp polipeptit, gen điều chỉnh, gen vận hành v.v... là các đoạn ADN đóng vai trò điều chỉnh hoạt động của gen cấu trúc. Ngoài ra còn có các gen rARN và tARN là các đoạn ADN chứa mã cho các rARN và tARN. Người ta thường đánh giá độ lớn của gen bằng độ dài của đoạn ADN thể hiện bằng số cặp nucleotit có trong gen. Độ lớn của gen tùy thuộc vào loại gen, ví dụ : gen cấu trúc, gen rARN hay gen tARN... Bình thường gen cấu trúc có độ lớn từ 1000 - 2000 cặp nucleotit, nhưng nếu là gen khảm, số nucleotit của gen có thể đạt tới vài trăm nghìn đến hàng triệu cặp nucleotit. Như vậy, cấu trúc của gen và tổ chức của hệ gen (genom) - tập hợp tất cả gen và ADN của một cơ thể là vô cùng phức tạp.

Hệ gen của Eucaryota có tổ chức rất đa dạng và phức tạp, gồm các thành phần sau :

2.1. Các gen cấu trúc (structure genes)

Gen cấu trúc là các gen chứa các cặp nucleotit mã hoá cho polipeptit, khi phiên mã sẽ cho ra mARN và khi dịch mã cho ra protein. Có loại gen cấu trúc trong trình tự nucleotit chỉ chứa các cặp nucleotit, khi phiên mã cho ra mARN được dùng làm khuôn để dịch mã ngay. Loại gen cấu trúc này thường gặp ở vi khuẩn. Ở vi khuẩn, nhiều gen cấu trúc thường tập hợp thành cụm được gọi là *operon*, ví dụ operon *lac* ở *E.coli* gồm 3 gen cấu trúc (mã cho 3 enzym khác nhau) xếp tiếp nhau và khi phiên mã chúng được phiên mã đồng thời. Có loại gen cấu trúc trong trình tự nucleotit có chứa các đoạn *exon* xen kẽ với đoạn *intron*. Những gen như thế được gọi là *gen khảm*. Gen khảm thường quan sát thấy ở tế bào vi khuẩn cổ (*Archaea*) và ở tế bào nhân chuẩn (Eucaryota). Đoạn exon là đoạn nucleotit được phiên mã và sẽ được dịch mã cho ra polipeptit. Đoạn intron là đoạn nucleotit được phiên mã nhưng không được dịch mã và sẽ bị cắt bỏ trong quá trình xử lý ARN. Gen khảm thường có độ dài rất lớn, có thể chứa từ hàng chục nghìn đến hàng triệu cặp nucleotit, ví dụ ở người, gen mã hóa cho protein dystrophin có độ dài 2,4 triệu cặp nucleotit và chứa 79 intron. Các gen khảm khi phiên mã sẽ cho ra các tiền mARN. Các tiền mARN sẽ bị xử lý, chế biến để cắt bỏ các đoạn intron và nối các đoạn exon tạo nên mARN chín - chỉ chứa các codon quy định axit amin. Cấu trúc gen khảm có ý nghĩa nhất định trong quá trình tiến hóa, là cơ sở để tạo nên các tổ hợp gen ở mức độ các mARN.

Phụ thuộc vào gen cấu trúc còn có các đoạn *promotor*, *enhancer* hoặc *silencer* là các đoạn ADN chứa nucleotit có vai trò điều hoà sự phiên mã, nhưng bản thân chúng không được phiên mã. Ngoài ra trong gen còn chứa các đoạn nucleotit báo hiệu sự khởi đầu và đoạn nucleotit báo hiệu kết thúc phiên mã.

Promotor (còn được gọi là gen vận hành), là đoạn nucleotit nằm ngay phía trước gen, có vai trò là nơi liên kết của enzym phiên mã ARN polimeraza và tác động phiên mã chỉ xảy ra theo một chiều. Trong lúc đó *enhancer* (còn được gọi là gen phát động) và *silencer* (còn được gọi là gen im lặng, gen ngủ) là đoạn nucleotit dài hơn có thể định vị ở phía trước, phía sau hoặc phía trong gen, chúng tác động theo cả hai chiều và có thể tác động phối hợp với *promotor* điều chỉnh hoạt động của gen khi ở cách xa gen. Cơ chế tác động điều chỉnh của *promotor* cũng như của *enhancer* thể hiện ở chỗ chúng chứa vùng nucleotit đặc thù là nơi bám của các protein điều chỉnh.

2.2. Các gen điều chỉnh (regulator genes)

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

Hoạt động của operon *lac* của *E.coli* được điều chỉnh bởi gen điều chỉnh R, gen này hoạt động sẽ sản sinh ra protein ức chế R có tác động ức chế hoạt động của operon *lac*. Nhiều đoạn ADN đặc trưng đóng vai trò điều chỉnh hoạt động của gen cấu trúc bằng cách liên kết với các protein điều chỉnh.

2.3. Các gen rARN và tARN

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

Các gen rARN và tARN thường các gen đa bản.

2.4. Các gen đơn bản và gen đa bản

Nhiều gen có trong hệ gen là gen đơn bản, nghĩa là chỉ có một trình tự nucleotit độc nhất, nhưng có nhiều gen là trạng thái gen đa bản nghĩa là có nhiều bản về trình tự của gen đó - gen lặp, ví dụ, gen mã hoá histon có tần số lặp từ 20-1000 bản, các gen tARN và rARN cũng đều là những gen đa bản. Trong những trường hợp cần thiết tất cả các bản của gen đa bản đều có thể phiên mã cho ra mARN (tARN hoặc rARN) và dịch mã cho ra nhiều protein, đáp ứng kịp thời hoạt động sống của tế bào và cơ thể. Ví dụ, trong giai đoạn chín của noãn bào của động vật, các gen đa bản rARN được phiên mã hàng loạt để tạo nên rất nhiều rARN, xây dựng nên hàng tỷ ribosom đáp ứng kịp thời cho sự tổng hợp các chất dinh dưỡng của noãn hoàng trứng.

2.5. Các gen nhảy (transposons)

Gen nhảy hay còn được gọi là yếu tố ADN di động (transposable element) là đoạn nucleotit có khả năng di chuyển vị trí ngay trong nội bộ một nhiễm sắc thể hoặc từ nhiễm sắc thể này sang nhiễm sắc thể khác. Gen nhảy có vai trò trong sự tái tổ hợp lại hệ gen. Gen nhảy lần đầu tiên được bà Barbara McClintock phát hiện và nghiên cứu ở cây ngô từ những năm 40 của thế kỷ XX (Bà được giải thưởng Nobel năm 1983), nhưng phải chờ đến những năm 70-80 của thế kỷ XX với tiến bộ của kỹ thuật phân tích di truyền người ta mới hiểu rõ được cấu trúc và cơ chế hoạt động của transposon. Transposon được tìm thấy ở vi khuẩn, nấm, thực vật, động vật và con người.

2.5.1. Gen nhảy ở Procaryota

Loại transposon đơn giản nhất được tìm thấy ở vi khuẩn được gọi là *đoạn trình tự xen* hay *đoạn xen* (insertion sequences-IS), đó là những đoạn ngắn nucleotit xếp xen kẽ vào trong gen hoặc trong plasmid. Trường hợp điển hình IS gồm 2500 cặp nucleotit và chỉ chứa các gen mã hóa cho các protein có vai trò phát động hoặc điều chỉnh sự chuyển dịch vị trí. Nhiều loại IS ở vi khuẩn đã được nghiên cứu. Loại IS bé nhất gồm 768 cặp nucleotit được gọi là IS1. Các loại IS đều có đoạn trình tự ngắn tương đối giống nhau ở 2 đầu cuối được gọi là đoạn lặp cuối ngược chiều (inverted terminal repeats) chứa khoảng 9- 40 đôi nucleotit. Ví dụ :

```
ACCGTCGGC----- CGGCTGCCA
TGGCAGCCG----- GCCGACGGT
```

Đoạn lặp cuối này có vai trò quan trọng trong sự chuyển dịch của transposon. Những đột biến xảy ra trong đoạn này đều làm mất khả năng chuyển dịch của transposon. Sự chuyển dịch của transposon là nhờ có enzym transposaza, enzym này có vai trò bám vào ADN và cắt đoạn dịch chuyển và tách chúng khỏi ADN và ghép chúng vào vị trí mới của phân tử ADN đó hoặc phân tử ADN khác. Enzym transposaza thường được mã hóa trong trình tự nucleotit của IS.

Khi một IS được ghép xen vào phân tử ADN nhận (hoặc plasmid nhận) thì sẽ gây nên sự nhân đoạn (duplication) ở vùng đó của ADN. Trong phân tử ADN nhận, nơi mà IS được ghép vào là nơi có đoạn lặp cùng chiều (direct repeat) gồm khoảng 2-13 đôi nucleotit. Ví dụ :

--- ATGCA----- ATGCA---

---TACGT----- TACGT---

Như vậy sau khi được lắp ghép IS sẽ nằm xen vào giữa 2 đoạn lặp cùng chiều của phân tử nhận và phân tử ADN nhận sẽ có trình tự nucleotit như sau :

--- ATGCA.ACCGTCGGC----- CGGCTGCCA.ATGCA---

--- TACGT.TGGCAGCCG----- GCCGACGGT.TACGT---

Trong hệ gen của vi khuẩn, ví dụ *E.coli*, mỗi loại IS có thể có đến vài bản sao. Ví dụ, IS1 có từ 6-10 bản sao. IS có thể tồn tại trong hệ gen trong plasmid. Ví dụ trong plasmid F (là plasmid quy định tính tiếp hợp của *E.coli*) có hai IS khác nhau, đó là IS2 và IS3. Khi hai IS này được dịch chuyển sang hệ gen của cá thể *E.coli* nào đó thì cá thể có hệ gen tổ hợp này trở nên có khả năng tiếp hợp, nghĩa là trao đổi vật chất di truyền giữa hai cá thể để tạo nên ADN tái tổ hợp, tức là tạo nên đa dạng di truyền trong quần thể vi khuẩn.

Ngoài những IS, ở vi khuẩn còn có các đoạn xen có khả năng di chuyển có kích thước lớn hơn nằm xen vào giữa hai IS, được gọi là *transposon* (Tn). Ví dụ Tn9 với hai IS1 ở hai bên, chứa gen *camR* (gồm 2500 cặp nucleotit) quy định tính chống chịu cloramphenicol của vi khuẩn. Tn5 gồm hai IS50 chứa ba gen *kanR*, *bleR*, và *strR* (gồm 5700 cặp nucleotit) quy định tính chống chịu kanamixin, bleomixin, và streptomixin. Tn10 gồm hai IS10 chứa gen *tetR* (gồm 9300 cặp nucleotit) quy định tính chống chịu tetraxiclin của vi khuẩn.

Điều lý thú là các IS của các Tn có thể mã hóa cho các enzym và protein có vai trò trong sự chuyển dịch của Tn. Ví dụ đoạn IS50 có chứa gen mã hóa cho enzym transposaza cần cho sự cắt và dịch chuyển của Tn.

Nghiên cứu gen nhảy ở vi khuẩn có tầm quan trọng đối với Y dược học. Sự ra đời và sử dụng thuốc kháng sinh đã là cuộc cách mạng trong việc chữa trị các bệnh nhiễm trùng. Nhưng càng ngày vi khuẩn gây bệnh càng trở nên nhờn thuốc. Nhân loại đã từng vui sướng khi cho rằng bệnh lao đã được loại trừ ra khỏi đời sống, nhưng càng ngày càng vui vẻ người bị nhiễm lao và chết vì lao càng gia tăng. Tại sao vậy ? Bởi vì vi khuẩn lao đã chống chịu được (nhờn thuốc) với tác động của kháng sinh kể cả thuốc đa kháng sinh và với liều cao. Các hãng dược phẩm đang có cuộc chạy đua với tính kháng thuốc của vi khuẩn. Tại sao vi khuẩn xuất hiện tính kháng thuốc ? Các nhà khoa học đã phát hiện, là tính kháng thuốc của vi khuẩn có liên quan đến tính biến dị di truyền của vi khuẩn và đặc biệt liên quan đến các gen nhảy. Đa số Tn của vi khuẩn đều chứa gen chống chịu thuốc kháng sinh. Chúng có thể

di chuyển từ phân tử ADN này sang phân tử ADN khác, từ hệ gen này sang hệ gen khác, từ cá thể này sang cá thể khác và kết quả là gen kháng thuốc được phổ biến rộng trong quần thể vi khuẩn, và hậu quả là các thuốc kháng sinh không chóng thì chầy sẽ mất tác dụng chống bệnh. Quá trình này đã được quan sát thấy trong nhiều chủng gây bệnh ở người, ví dụ các chủng *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Neisseria*, *Shigella* và *Salmonella*. Hiện nay nhiều bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn như bệnh lỵ, lao, lậu... rất khó chữa khỏi, nhiều trường hợp bị tử vong vì vi khuẩn gây bệnh nhờn với nhiều loại kháng sinh khác nhau. Đặc biệt tính kháng thuốc được lan truyền nhanh trong quần thể vi khuẩn là do các *plasmid R tiếp hợp* (conjugative R plasmids) có chứa gen đề kháng. Những plasmid này có hai cấu thành : một, được gọi là nhân tố chuyển kháng (RTF) chứa các gen cần thiết cho sự chuyển gen bằng cách tiếp hợp giữa các tế bào ; cấu thành thứ hai được gọi là thể quyết định R chứa gen đề kháng. Các gen đề kháng này thường nằm trong transposon xếp xen kẽ trong plasmid. Các plasmid R tiếp hợp có thể được chuyển giao giữa các vi khuẩn trong quần thể, thậm chí giữa các loài khác nhau, ví dụ giữa *Coccus* và *Bacillus*. Như vậy tính kháng thuốc một khi đã có ở một bộ phận nhỏ sẽ được lan truyền nhanh chóng cho các bộ phận khác của quần thể vi khuẩn.

2.5.2. Gen nhảy ở Eucaryota

Người ta đã phát hiện nhiều loại gen nhảy ở nhiều nhóm sinh vật nhân chuẩn. Chúng rất đa dạng về độ lớn và cơ chế hoạt động, nhưng có điểm chung là đều được xếp xen kẽ vào hệ gen và sử dụng enzym transposaza để di chuyển từ vị trí này sang vị trí khác của phân tử ADN.

Ở cây ngô, các gen nhảy Ac và Ds đã được bà Barbara McClintock phát hiện và nghiên cứu. Chúng quy định tính biến dị thiếu áo và hạt dorm ở bắp ngô. Bà đã giả thiết là có hai nhân tố Ac và Ds quy định tính đột biến này và chúng là những yếu tố có thể di chuyển từ nhiễm sắc thể này sang nhiễm sắc thể khác. Về sau các nhà di truyền học phân tử đã xác định Ac và Ds thuộc họ gen nhảy (transposons). Trong hệ gen của ngô chứa rất nhiều bản Ac và Ds. Chúng có thể di chuyển và ghép xen vào trong gen gây nên đột biến gen. Kỹ thuật giải trình tự nucleotit cho thấy đoạn Ac gồm 4563 cặp nucleotit, được bao bởi đoạn lặp ngược chiều gồm 11 cặp nucleotit. Đoạn lặp này cần thiết cho sự di chuyển của Ac. Khi đã được di chuyển sang ADN nhận, chúng được bao bởi đoạn lặp cùng chiều gồm 8 cặp nucleotit. Ds cũng thuộc họ gen nhảy với Ac và sự hoạt động chuyển dịch vị trí đều phụ thuộc vào sự hoạt động tương tác của Ac và Ds.

Ở ruồi quả, gen nhảy được nghiên cứu nhiều nhất là yếu tố P của *Drosophila melanogaster*. Yếu tố P gây nên tính đột biến bất thường ở ruồi. Yếu tố P có trong nhiễm sắc thể của dòng bố (paternel) (nên được gọi là yếu tố P) là gen nhảy. Chúng gồm có 2907 cặp nucleotit với đoạn lặp ngược chiều gồm 31 cặp nucleotit. Yếu tố P có chứa gen mã hóa cho enzym transposaza. Nhờ transposaza, yếu tố P có thể chuyển dịch sang vị trí mới của hệ gen. Trong hệ gen của ruồi quả có thể có từ vài bản đến 50 bản yếu tố P. Điều đáng ngạc nhiên là trước năm 1950, người ta không phát hiện được yếu tố P trong các quần thể ruồi. Vì vậy các nhà di truyền học đã giả thiết rằng, yếu tố P được di nhập vào hệ gen của ruồi từ các virut ký sinh trong tế bào ruồi. Cũng tương tự như vậy, các yếu tố IS trong hệ gen vi khuẩn *E.coli* là có nguồn gốc từ thể thực khuẩn thông qua hiện tượng tải nạp di truyền (genetic transduction).

Ngoài ra ở ruồi quả còn phát hiện thấy gen nhảy *mariner* gồm 1286 cặp nucleotit với đoạn lặp ngược chiều gồm 28 cặp nucleotit. Điều đặc biệt là gen nhảy *mariner* còn được phát hiện ở nhiều bọ côn trùng, ở giun tròn, ở nấm và cả ở người. Đáng ngạc nhiên là gen nhảy *mariner* ở ruồi quả cũng tương tự như ở ong mật (đứng về mặt tiến hóa, chúng cách xa nhau hàng trăm triệu năm), vì vậy các nhà di truyền học cho rằng gen nhảy *mariner* đã được chuyển giao giữa các bọ côn trùng với nhau, hoặc thông qua virus ký sinh khi chúng lây nhiễm từ vật chủ này sang vật chủ khác và mang theo gen nhảy ghép vào trong hệ gen của vật chủ. Trong hệ gen của nhiều động vật không xương và động vật có xương, người ta cũng đã phát hiện gen nhảy Tc1 tương tự như *mariner*, nhưng lớn hơn, chứa khoảng 1700 cặp nucleotit.

2.5.3. Các Retrotransposon

- Trong genom của Eucaryota ngoài các gen nhảy có bản chất ADN, còn có các yếu tố di động có nguồn gốc từ ARN được gọi là retrotransposon. Có hai loại retrotransposon : một loại giống như retrovirus (virus ARN) nghĩa là giống với ARN của virus và thông qua sự phiên mã ngược thành ADN để nhân bản phổ biến, và một loại có liên quan đến ARN của tế bào được gọi là retroposon.

- Loại yếu tố giống retrovirus, ví dụ *Ty1 transposon* tìm thấy ở nấm men *Saccharomyces cerevisiae* là đoạn ADN chứa khoảng 5900 cặp nucleotit. Có chủng có tới 35 bản *Ty1*. *Ty1* chỉ chứa hai gen là gen *TyA* và gen *TyB* giống với gen *gag* và gen *pol* của retrovirus và sản phẩm protein của chúng trong tế bào nấm men cũng giống của virus. ADN của *Ty1* là có nguồn gốc từ sự phiên mã ngược từ ARN. Trong quá trình dịch chuyển của *Ty1* thì ARN được phiên mã từ ADN của *Ty1*, sau đó ARN sẽ được phiên mã ngược thành ADN *Ty1* (nhờ enzym revertaza do gen *Ty1B* mã hóa). ADN *Ty1* mới được ghép nối vào ADN nhận để hình thành nên *Ty1* mới. Các yếu tố di động giống retrovirus cũng được tìm thấy ở ruồi quả, ví dụ yếu tố *copia*, yếu tố *gypsy* đều chứa những gen giống với gen của retrovirus.

- + Retroposon là loại retrotransposon rất phổ biến trong giới động vật : đó là các yếu tố F, G và I tìm thấy ở ruồi quả ; các yếu tố LINE tìm thấy ở động vật có vú và người. Chúng có đặc tính là những đoạn ADN không chứa các đoạn lặp ở cuối và khi dịch chuyển vị trí phải thông qua ARN và sự phiên mã ngược thành ADN nhờ enzym revertaza do chúng mã hóa. Một đặc tính điển hình nhất của các retroposon là đều có nguồn gốc từ sự phiên mã ngược từ các ARN có phân tán cùng chứa nhiều nucleotit lặp poliA.

Đối với con người, retroposon LINE1 (còn gọi là L1) được phát hiện từ năm 1988 và được nghiên cứu nhiều nhất. Bình thường L1 có trong nhiễm sắc thể số 22 và khi chúng dịch chuyển vào gen liên kết với nhiễm sắc thể X (gen này mã hóa cho protein là nhân tố VIII của sự đông máu), gây nên đột biến và kết quả là gây bệnh hay chảy máu (hemophilia) ở người. Điều đáng ngạc nhiên là ở khi đột *Gorilla* cũng tìm thấy yếu tố L1 trong nhiễm sắc thể 22 của chúng, có nghĩa là L1 đã xuất hiện trước khi người và vượn người phân hóa thành hai nhánh cách đây trên 6 triệu năm. Trong hệ gen của người có thể có từ 50000 - 100000 bản sao L1 và chiếm tới 5% ADN của hệ gen.

2.5.4. Ý nghĩa tiến hóa của gen nhảy

Gen nhảy là cấu thành rất phổ biến và lâu đời của hệ gen. Đối với một số loài, gen nhảy chiếm số lượng khá nhiều, ví dụ ở ruồi quả, chúng chiếm tới 12 - 15% ADN của hệ

gen. Như vậy rõ ràng là gen nhảy là cấu thành quan trọng của hệ gen. Chúng có vai trò gia tăng tần số đột biến, ví dụ ở ruồi quả *Drosophila*, một nửa đột biến ngẫu nhiên là do gen nhảy tạo nên. Như vậy gen nhảy có vai trò gì trong quá trình tiến hóa? Gen nhảy từ đâu đến? Chúng là thành phần cấu trúc của hệ gen hay chỉ là phân tử ký sinh?

Nhiều nghiên cứu ở nhiều đối tượng khác nhau đã chứng minh rằng, gen nhảy là cấu thành quan trọng của hệ gen và đóng vai trò quan trọng trong sự tiến hóa của cấu trúc nhiễm sắc thể. Người ta đã xác định được ở ruồi quả có khoảng 40 họ gen nhảy khác nhau. Mỗi họ có thể có từ 20 - 80 thành viên. Với khả năng di chuyển vị trí, các gen nhảy tạo nên sự tổ hợp lại hệ gen làm cho hệ gen càng đa dạng. Hơn nữa gen nhảy còn tham gia tăng cao tần số đột biến. Các gen nhảy có thể được xếp xen kẽ vào các đoạn exon, các đoạn intron, hoặc vào vùng ADN điều chỉnh của gen và tạo nên các đột biến gen rất đa dạng. Tuy nhiên, những đột biến mới do sự di chuyển vị trí của gen nhảy xảy ra hiếm hơn vì chắc là có cơ chế kiểm soát chặt chẽ sự di chuyển của đa số gen nhảy. Về nguồn gốc của gen nhảy, có tác giả cho rằng gen nhảy là do sự phân hóa ngay trong hệ gen của tế bào. Về nguồn gốc, các retrotransposon có thể có từ các retrovirus bị biến đổi và bắt nhốt vào hệ gen vật chủ hoặc do các retrovirus mang theo khi lây nhiễm từ vật chủ này sang vật chủ khác.

Ngày nay kỹ thuật tách chiết, nhân bản, giải trình tự, chuyển ghép gen nhảy là một công cụ quan trọng của công nghệ gen và công nghệ tế bào.

III - HỆ GEN (GENOME). TỔ CHỨC CỦA HỆ GEN

Có thể xem hệ gen là một tập hợp tất cả ADN của một cơ thể, trong đó bao gồm cả ADN tạo nên các gen cấu trúc, gen điều chỉnh, các gen rARN và tARN, các ADN điều chỉnh cùng tất cả các loại ADN khác.

Cơ thể đơn bội (n) có chứa một genom, cơ thể lưỡng bội (2n) chứa hai genom bao gồm genom của bố và genom của mẹ. Trong tế bào và cơ thể đơn bội, gen không có alen, còn trong tế bào và cơ thể lưỡng bội gen có alen tương ứng: 1 gen có nguồn gốc từ bố và 1 gen có nguồn gốc từ mẹ. Gen và alen của nó định khu trong cùng locut của cặp nhiễm sắc thể tương đồng.

Hàm lượng ADN trong genom ở các cơ thể khác nhau là rất khác nhau, và tổ chức của genom phản ánh mức độ tiến hóa của loài.

3.1. Độ lớn của hệ gen

Độ lớn của hệ gen được đánh giá bằng hàm lượng ADN chứa trong tế bào thể hiện ở số lượng cặp nucleotit và chúng rất khác nhau ở các nhóm phân loại khác nhau. Qua quá trình tiến hóa, hệ gen của các sinh vật ở cấp độ tiến hóa cao hơn càng có hàm lượng ADN nhiều hơn. Tất nhiên cấp độ tiến hóa không thể hiện ở hàm lượng ADN trong hệ gen mà thể hiện chủ yếu ở tổ chức của hệ gen.

3.1.1. Đối với tế bào Prokaryota

Hệ gen của Prokaryota là phân tử ADN xoắn kép, trần dạng vòng, định vị trực tiếp trong tế bào chất. Hàm lượng ADN trong hệ gen của Prokaryota là khoảng $0,7 \times 10^6$ đến 10^7 cặp nucleotit, chứa khoảng vài trăm đến hàng nghìn gen. Hệ gen của vi khuẩn, ví dụ của *E.coli* là phân tử ADN xoắn kép có dạng vòng chứa khoảng $4,64 \times 10^6$ cặp nucleotit, chứa 4397 gen (mã hóa cho hàng nghìn protein quy định nên các đặc tính hình thái và sinh lý của vi khuẩn), và nếu ta cắt và kéo dài ra thì phân tử ADN có chiều dài khoảng 1,6mm và

rộng khoảng 2,4nm, như vậy nó dài hơn tế bào *E.coli* hàng nghìn lần, vì vậy trong tế bào vi khuẩn (có độ lớn vài μm) phân tử ADN phải cuộn gấp tạo thành thể chắc, được gọi là *nucleoid* (thể tương tự nhân).

Đối với một số ít vi khuẩn, ADN có dạng xoắn kép thẳng, ví dụ vi khuẩn *Borrelia burgdorferi* có ADN mạch thẳng với độ dài 910000 cặp nucleotit chứa 853 gen. Hệ gen của vi khuẩn không chứa các đoạn intron (trừ vi khuẩn cổ). Một đặc tính tổ chức của hệ gen vi khuẩn là các gen cấu trúc cùng với các phần điều chỉnh thường tập hợp thành đơn vị operon. Ví dụ, operon *lac* ở *E.coli* gồm có 3 gen cấu trúc với operator và promotor riêng.

Ngoài ra trong tế bào vi khuẩn còn có một số phân tử ADN bé hơn (chứa từ 1000 - 100.000 cặp nucleotit) có cấu tạo dạng thẳng hoặc dạng vòng được gọi là plasmid. Plasmid có thể tồn tại độc lập với genom hoặc có thể nhập vào genom tạo nên ADN tái tổ hợp. Plasmid có thể được di chuyển từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác. Trong plasmid chứa một số gen quy định một số đặc tính của vi khuẩn như tính chống chịu được môi trường khắc nghiệt, ví dụ gen chống chịu kim loại độc ; gen chuyển hóa các hóa chất đặc biệt như toluen, naphtalen, các sản phẩm dầu mỏ... ; gen chống chịu thuốc kháng sinh. Một số chất độc của vi khuẩn gây bệnh cho động vật và thực vật cũng do plasmid quy định. Một đặc tính quan trọng của plasmid là nó quy định tính tiếp hợp giữa hai tế bào vi khuẩn, qua đó chúng trao đổi gen cho nhau. Cũng vì vậy mà công nghệ gen đã sử dụng plasmid như là vectơ chuyển gen, đồng thời dùng plasmid để tạo các chủng vi khuẩn tái tổ hợp có đặc tính mong muốn sử dụng trong y học và công nghệ môi trường.

Với kỹ thuật giải trình tự hệ gen, các nhà công nghệ gen đã tiến hành giải trình tự hệ gen của nhiều loài vi khuẩn, đặc biệt là các vi khuẩn gây bệnh hoặc vi khuẩn có tầm quan trọng đối với công nghệ vi sinh vật. Điều này cho phép các nhà công nghệ gen biết được cấu trúc, hoạt động của hệ gen (tạo ra hệ protein) từ đó sử dụng chúng cho mục đích y dược học (tạo vaccin - phòng chống bệnh, tạo kháng sinh đặc hiệu chống nhờn thuốc...), mục đích công nghệ sản xuất các chế phẩm công nghiệp lên men (tạo chủng có năng suất cao nhất), công nghiệp thực phẩm (bia, rượu, nước giải khát, chất dinh dưỡng : sữa, bơ, pho mát, axit amin không thay thế...), công nghiệp hóa chất (chất phụ gia, mỹ phẩm, hóa chất tẩy rửa, nhuộm màu, xăng etanol, xăng hydro...), công nghệ xử lý rác thải làm sạch môi trường ...

3.1.2. Đối với tế bào Eucaryota

Trong tế bào Eucaryota, ADN liên kết với protein histon tạo nên cấu trúc nhiễm sắc thể chứa trong nhân tế bào. Hệ gen đơn bội của chúng chứa tới 10^8 (ở nấm, tảo, động vật đơn bào) cho tới 10^{11} cặp nucleotit (thực vật và động vật đa bào), tức là vào khoảng 6000 gen (ví dụ nấm men) cho tới vài chục nghìn gen. Ví dụ, hệ gen đơn bội của người chứa từ 3×10^9 đến $3,2 \times 10^9$ cặp nucleotit và chứa khoảng từ 32.000 đến 35.000 gen.

Số lượng gen này được chứa trong ADN của 23 thể nhiễm sắc (22 thể nhiễm sắc thường và một thể nhiễm sắc giới tính X hoặc Y). Ngoài ra trong tế bào người (cũng như ở các tế bào nhân chuẩn khác) còn có hệ gen ty thể chứa các phân tử ADN ty thể có cấu tạo xoắn kép dạng vòng, trần (giống ADN vi khuẩn). Mỗi ty thể của tế bào người chứa 10 phân tử ADN và mỗi phân tử ADN có 16569 cặp nucleotit, chứa 13 gen (không có đoạn intron) mã hóa cho protein riêng của ty thể. Ở các cơ thể nhân chuẩn quang hợp, trong lục lạp cũng có hệ gen lục lạp chứa các ADN lục lạp có cấu tạo xoắn kép dạng vòng (giống ADN vi khuẩn

lam). Ví dụ, trong lục lạp lúa ADN lục lạp có 136.000 cặp nucleotit và chứa hàng trăm gen. ADN ty thể và ADN lục lạp được gọi là ADN ngoài nhân chứa các gen tế bào chất (plasmogen) và là cơ sở của di truyền tế bào chất.

Khi phân tích hàm lượng ADN ở các cơ thể khác nhau, người ta không thấy có sự tương ứng giữa hàm lượng ADN với độ phức tạp của cơ thể ở các bậc tiến hoá. Ví dụ như bọ chân khớp, ở mức độ tiến hoá cao có tổ chức cơ thể phức tạp, có hàm lượng ADN giao động trong khoảng từ 10^8 - 10^{10} cặp nucleotit, tương tự với bọ động vật đơn bào là bọ ở mức tiến hoá thấp. Trong nhóm lưỡng cư, hàm lượng ADN giao động rất lớn từ 10^9 - 10^{11} cặp nucleotit. Đối với con người ở đỉnh cao của tiến hoá nhưng hàm lượng ADN ít hơn so với nhiều bọ lưỡng cư.

Đối với Eucaryota, tiến hoá của hệ gen không thể hiện ở hàm lượng ADN chứa trong hệ gen (xem bảng 2.1).

Bảng 2.1. Hàm lượng ADN trong tế bào của các cơ thể sinh vật

Cơ thể	Độ lớn của hệ gen (10^6 cặp Nu)
Procaryota	
- Mycoplasma genitalium	0,58
- Escherichia coli	4,64
- Bacillus megaterium	30
Eucaryota	
Nấm	
- Saccharomyces cerevisiae (Nấm men)	12,1
- Aspergillus nidulans	25,4
Động vật đơn bào	
- Tetrahymena pyriformis	190
Động vật không xương	
- Caenorhabditis elegans (Giun tròn)	100
- Drosophila melanogaster (Ruồi quả)	140
- Bombyx mori (Tằm dâu)	490
- Strongylocentrotus purpuratus (Cầu gai)	845
- Locusta migratoria (Châu chấu)	5000
Động vật có xương	
- Fugu rubripes (Cá Fugu)	400
- Rana esculenta (Ếch)	15000
- Salamandra	90000
- Mus musculus (Chuột nhắt)	3300
- Homo sapiens (Người)	3200
Thực vật	
- Arabidopsis thaliana (Rau tía)	100
- Oryza sativa (Lúa)	565
- Pisum sativum (Đậu Hà lan)	4800
- Zea mays (Ngô)	5000
- Triticum aestivum (Lúa mì)	17000
- Fritillaria assyriaca	120.000

Hơn nữa người ta cũng không quan sát thấy sự tương ứng giữa hàm lượng ADN và số lượng gen trong hệ gen. Ví dụ, nếu ta so sánh nấm men *Saccharomyces* có hàm lượng ADN là $12,1 \times 10^6$ cặp nucleotit chứa tới 6000 gen (đã được giải trình tự năm 1996) với người có hàm lượng ADN là 3200×10^6 cặp nucleotit (gấp 250 lần so với nấm men) thì hệ gen người phải chứa tới 1 triệu rưỡi gen. Nhưng thực sự hệ gen người chỉ có khoảng 32.000 – 35.000 gen (đã được giải trình tự năm 2001). Như vậy sự sai khác về tiến hóa trong hệ gen còn thể hiện ở tính tổ chức của hệ gen.

Nếu tính trung bình một gen có độ lớn khoảng 1500 -1800 đôi nucleotit thì tế bào con người chứa khoảng hàng triệu gen mã hoá cho hàng triệu protein khác nhau. Nhưng theo đánh giá của các nhà sinh học thì cơ thể con người có khoảng 100000 loại protein khác nhau và chỉ được mã hoá trong khoảng 32.000 gen trong hệ gen (xem bảng 2.2).

Bảng 2.2. Hàm lượng ADN và số lượng gen chứa trong bộ đơn bội nhiễm sắc thể người

Số NST	Nhóm NST	Hàm lượng ADN (triệu cặp Nu)	Số lượng gen	Số lượng gen/ 1 triệu cặp Nu
1	A	279	3013	13
2	A	251	2230	10
3	A	221	1979	10
4	B	197	1406	8
5	B	198	1678	9
6	C	176	1802	11
7	C	163	1479	10
8	C	148	1154	9
9	C	140	1250	11
10	C	143	1261	10
11	C	148	1948	15
12	C	142	1648	12
13	D	118	715	8
14	D	107	1072	12
15	D	100	987	13
16	E	104	1222	15
17	E	88	1486	19
18	E	86	580	8
19	F	72	1730	27
20	F	66	856	14
21	G	45	351	10
22	G	48	787	23
X	C	163	1218	8
Y	G	51	128	6

Như vậy tại sao lại có một hàm lượng ADN khổng lồ như vậy trong hệ gen người ? Để sáng tỏ được vấn đề này cần tìm hiểu tổ chức rất đa dạng và phức tạp của hệ gen.

3.2. Đặc tính tổ chức của hệ gen

Tính đa dạng và phức tạp của hệ gen (genome) ở Eucaryota không chỉ thể hiện ở thành phần cấu trúc mà còn thể hiện ở sự sắp xếp của các gen trong hệ gen, thể hiện ở chỗ :

3.2.1. Họ đa gen

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

Có họ đa gen mã hoá cho các họ protein có vai trò cấu trúc và chức năng như actin, tubulin, collagen, keratin, protein màng ruột, một số protein huyết tương, hemoglobin, một số protein màng, histon, protein noãn hoàng và protein kháng thể. Các gen trong họ đa gen là kết quả của sự nhân đoạn và đột biến hoặc tổ hợp từ gen gốc. Ví dụ ở người, trong tế bào nón và tế bào que (có vai trò thu nhận ánh sáng) tồn tại 4 gen mã hóa cho 4 loại protein khu trú trong màng sinh chất có chức năng thu nhận bức xạ ánh sáng khác nhau, 4 loại protein này đều thuộc họ rodopxin. Bốn gen này định vị thành một cụm trong nhiễm sắc thể X. Các bệnh sai lệch về thị giác, đặc biệt là bệnh mù màu là có nguyên nhân đột biến trong họ gen rodopxin dẫn tới làm sai lệch cấu trúc phân tử của protein thuộc họ rodopxin.

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

3.2.2. Sự định khu và sắp xếp của các gen

Trong phân tử ADN các gen được sắp xếp tuyến tính nối tiếp nhau theo từng cụm cùng với các phần bổ trợ tạo nên các operon như ở vi khuẩn hoặc sắp xếp theo các họ đa gen như Eucaryota. Các gen cùng họ có thể giống nhau và xếp liên tiếp cạnh nhau như các gen rARN ; hoặc có thể là các gen khác nhau xếp liên tiếp cạnh nhau như các gen mã hoá cho globin của hemoglobin ; hoặc có thể là các gen khác nhau định khu ở trong các nhiễm sắc thể khác nhau, ví dụ họ gen actin, họ gen tubulin.

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

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

Kiểu tổ chức theo kiểu gen khảm có vai trò quan trọng trong việc thực hiện cơ chế điều hoà hoạt động của gen, cũng như có vai trò trong tiến hoá.

3.2.3. Các đoạn ADN lặp

Trong hệ gen của Eucaryota có rất nhiều trình tự nucleotit lặp với tần số lặp từ 3 đến 100000 lần. Đoạn nucleotit lặp có thể chỉ chứa vài đôi nucleotit đến 300 đôi nucleotit hay nhiều hơn và có khi chiếm trên 40-50% ADN của hệ gen. Các đoạn lặp ngắn thường phân bố xen kẽ vào các gen cấu trúc. Có ý kiến cho rằng, các cụm nucleotit lặp xen kẽ đóng vai trò điều hoà và tổ hợp hoạt động của các gen cấu trúc.

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

Tính đa dạng và phức tạp về tổ chức của hệ gen không chỉ thể hiện trong cấu tạo mà còn thể hiện ở cơ chế hoạt động và điều hoà hoạt động của gen.

IV - MÃ DI TRUYỀN (GENETIC CODE) VÀ SỰ TÁI BẢN MÃ

4.1. Mã di truyền

- Mã di truyền (genetic code) là mã của ngôn ngữ protein được mã hoá bởi ngôn ngữ axit nucleic, hay nói một cách cụ thể hơn là trình tự các axit amin trong mạch polipeptit của protein được quy định bởi trình tự của các nucleotit trong mạch polinucleotit của ADN.

Để xây dựng nên polipeptit cần đến 20 loại axit amin, trong lúc đó cấu tạo nên mạch polinucleotit chỉ có 4 dạng nucleotit là A, T (U), G, C.

Các nhà di truyền học phân tử đã giả thiết rằng, mã di truyền là mã bộ ba (tripled code), nghĩa là trình tự của một bộ ba (một codon) nucleotit quy định cho trình tự một axit amin. Như vậy sẽ có $4^3 = 64$ codon tương ứng với 20 axit amin. Nhưng bộ ba (codon) nào quy định axit amin nào thì phải đến năm 1961, nhà sinh vật học người Anh là M. Nirenberg lần đầu tiên đã chứng minh bằng thực nghiệm rằng, mã di truyền là mã bộ ba và đã tìm ra codon đầu tiên mã hoá cho axit amin phenilalanin là bộ ba UUU. Những năm sau đó, các codon mã hoá cho 20 axit amin đều được xác định (xem bảng 2.3).

Bảng 2.3. Tự điển mã di truyền (ghi theo mã ARN)

Bazơ thứ hai					
	U	C	A	G	
U	UUU } Phe UUC } UUA } Le UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Kết thúc UAG }	UGU } Cys UGC } UGA-kết thúc UGG - Trp	U C A G
C	CUU } CUC } Le CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } Gln CAC } CAA } His CAG }	CGU } CGC } Ar CGA } CGG }	U C A G
A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG-Met và khởi đầu	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } As AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Ar AGG }	U C A G
G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } As GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Bazơ thứ ba

- Người ta đã phát hiện ra rằng, mã di truyền có tính chất thoái hoá, nghĩa là một axit amin có thể tương ứng với nhiều mã, ví dụ : tương ứng với phenilalanin có 2 mã, với valin có 4 mã và với leucin có đến 6 mã (xem bảng 2.3).

Theo quy định trong bảng mà người ta ký hiệu codon bằng 3 ribonucleotit, ví dụ UUU hoặc UUC mã cho phenilalanin, vì khi tổng hợp protein, ADN được phiên mã thành khuôn mARN theo nguyên tắc bổ sung tức là U-A và C-G.

Ngoài ra trong 64 mã còn có mã khởi đầu (mã AUG vừa là mã của methionin, vừa là mã khởi đầu) và mã kết thúc là 3 mã UAA, UAG, và UGA là mã báo hiệu sự khởi đầu và kết thúc mạch polinucleotit được tổng hợp trên khuôn mARN.

Mã thoái hoá nói lên tính dự trữ và thích nghi của cơ thể để hạn chế bất tác hại của đột biến xảy ra làm sai lệch mã dẫn đến hư hỏng protein.

- Mã di truyền có tính vạn năng, nghĩa là tất cả các cơ thể sống, từ vi khuẩn cho đến thực vật, động vật và cả con người đều sử dụng cùng một bộ mã chung. Bằng thực nghiệm, người ta đã chuyển gen từ cơ thể này sang cơ thể khác và gen đó vẫn được phiên mã và dịch mã tổng hợp nên protein do gen đó mã hoá. Tính vạn năng của mã chứng tỏ rằng, mã xuất hiện rất sớm trong quá trình tiến hoá và tất cả các cơ thể sống có chung cơ sở phân tử và nguồn gốc phát sinh.

Tuy nhiên vẫn có một số ngoại lệ, ví dụ như trong bộ mã của ADN ty thể hay bộ mã trong ADN của trùng lông, có một số mã khác với mã chung.

4.2. Sự tái bản của ADN

Một trong những đặc tính quan trọng của cơ thể sống là đặc tính tự sinh sản ra những cơ thể mới mang các tính trạng hình thái và sinh lý giống bố mẹ. Đặc tính đó dựa trên cơ sở sự *tự tái bản* (replication) của phân tử ADN, qua đó một phân tử ADN mẹ đã sinh sản ra 2 phân tử ADN con giống hệt ADN mẹ, và thông qua cơ chế phân bào, 2 phân tử ADN con được phân ly về 2 tế bào con, do đó mà 2 tế bào con mang đặc tính di truyền như tế bào mẹ.

4.2.1. Đặc tính của sự tái bản ADN

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

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

- Sự tái bản ADN mang tính nửa bảo tồn : Sự tái bản theo khuôn đã dẫn đến hình thành ADN con mang tính nửa bảo tồn, nghĩa là sợi ADN con mang một mạch đơn ADN cũ (mạch khuôn) và một mạch đơn ADN mới (mạch mới được tổng hợp).

- Sự tái bản ADN mang tính định hướng và diễn ra theo hai hướng ngược nhau, vừa liên tục vừa gián đoạn, nghĩa là sự tổng hợp mạch mới chỉ diễn ra theo hướng 3' → 5' (tức là từ đầu 3' đến đầu 5' của mạch khuôn) và vì lẽ rằng trong sợi kép ADN, hai mạch đơn ADN xoắn theo hai chiều ngược nhau nên sự tổng hợp diễn ra theo cả hai hướng ngược chiều (một mạch theo hướng 3' → 5' mạch kia theo hướng 5' → 3'). Trong hai mạch khuôn, thì một mạch khuôn có hướng 3' → 5' được dùng để tổng hợp mạch mới một cách liên tục (gọi là mạch dẫn đầu hay mạch liền - leading strand), còn mạch khuôn thứ hai có hướng 5' → 3', sự lắp ghép các nucleotit diễn ra gián đoạn (gọi là mạch chệch hay mạch gián đoạn - lagging strand), nghĩa là tổng hợp từng đoạn ADN ngắn (đoạn Okazaki) và sau đó mới được khâu lại tạo thành mạch ADN hoàn chỉnh (hình 2.1).

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

Có nhiều loại protein và enzym tham gia vào quá trình tái bản ADN :

- Phức hệ replisom (replisome) là một phức hệ đa enzym gồm có :
 - + Enzym helicaza có tác động mở xoắn và tách đôi sợi ADN kép thành 2 mạch đơn, và trạng thái mở xoắn của sợi kép được duy trì nhờ có tác động của protein SSB (Single Strand Binding Protein) bám giữ mạch đơn.

- + Primoxom (primosome) gồm enzym primaza và một số protein có trách nhiệm tổng hợp các đoạn ARN mới (ARN primer).
- + Các enzym ADN polimeraza I và III có vai trò lắp ráp các deoxyribonucleotit thành mạch ADN mới.
- + Enzym ATPaza có vai trò thủy phân ATP.
- + Enzym ADN polimeraza II có vai trò chủ yếu của enzym exonucleaza cắt bỏ và sửa chữa các sai sót trên sợi tái bản ADN.
- + Enzym topoisomeraza có tác dụng như enzym ligaza dùng để khâu các đoạn ADN lại với nhau.

Các enzym ADN polimeraza ngoài tác dụng trùng hợp - xúc tác tổng hợp mạch ADN mới, còn có hoạt tính enzym exonucleaza cắt mạch ADN từ đầu tự do (trong lúc các endonucleaza lại cắt ADN từ các điểm nằm bên trong sợi) và chúng có tác dụng sửa sai – phát hiện và cắt bỏ những bazơ kết cặp sai, giúp cho quá trình tái bản được chính xác.

- Phân tử ADN của vi khuẩn là sợi xoắn kép có dạng vòng. Bước vào quá trình tái bản, phân tử ADN dính vào mesoxom (phần lõm vào của màng sinh chất) ở điểm khởi đầu cho sự tái bản, ở vùng này có gen khởi đầu (initiator gene). Sự tái bản bắt đầu từ điểm khởi đầu. Do sự mở xoắn và tách hai mạch nên ở điểm khởi đầu xuất hiện "con mắt tái bản" ở dạng vòng tròn gồm hai mạch đơn nối liền với sợi xoắn ở hai điểm gọi là điểm tăng trưởng hay điểm chẻ đôi, từ đây sợi kép sẽ tiếp tục mở xoắn và tách ra ở cả hai đầu. Ở điểm tách ra của hai mạch tạo nên cái chẻ ba (gồm hai mạch đơn nối với sợi kép) được gọi là chẻ ba tái bản (replication fork - xem hình 2.1). Sự lắp ráp các deoxyribonucleotit diễn ra trong chẻ ba, dùng các mạch đơn ADN mẹ làm khuôn. Sự mở xoắn và tách hai mạch đơn là do enzym helicaza tác động, đồng thời các protein SSB bám vào mạch đơn ngăn không cho chúng xoắn lại với nhau, để chúng có thể làm khuôn tổng hợp mạch mới. Sự xoắn và tách đôi hai mạch đòi hỏi cung cấp năng lượng từ ATP. ATP được thủy phân cho ra ADP, P và năng lượng, nhờ enzym ATPaza của replixom (xem hình 2.1).

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

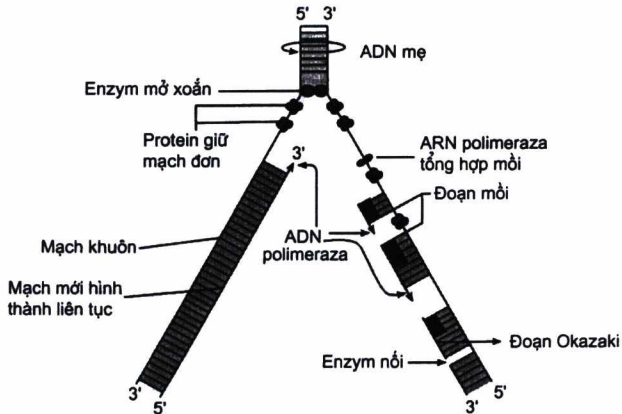
Các ADN polimeraza không có khả năng khởi đầu cho việc tổng hợp mạch ADN mới. Để khởi đầu cho việc tổng hợp ADN, đôi khi phải có một đoạn ARN mới gồm 10 ribonucleotit (ARN primer). Về sau đoạn mới bị tiêu hủy và sẽ bị ADN thế chỗ. Đoạn ARN mới được tổng hợp nhờ enzym primaza (ARN polimeraza phụ thuộc ADN) ngay từ khi khởi đầu tái bản- khi xuất hiện "con mắt tái bản". Vì lẽ rằng hai mạch ADN xếp song song ngược chiều cho nên tiến trình lắp ráp các mạch ADN từ hai mạch khuôn là không giống nhau.

3' -- ATGCTATGCATGC--5'

5' -- TACGATACGTACG--3'

Mạch khuôn có hướng 3'- 5' sẽ được tổng hợp trước và liên tục, mạch ADN mới được hình thành có hướng 5'- 3', mạch này được gọi là mạch liên. Đối với mạch ADN khuôn thứ hai có hướng 5'- 3' thì sự lắp ráp nucleotit thành mạch mới diễn ra chậm hơn và diễn ra gián

đoạn, nghĩa là tổng hợp từng đoạn ADN và sau đó được khâu nối lại nhờ enzym ligaza. Mạch ADN mới này có hướng 3'- 5' được gọi là mạch gián đoạn (hình 2.1).



Hình 2.1. Mô hình tái bản ADN theo mạch liên và mạch gián đoạn

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

Tiến trình tổng hợp ADN mạch gián đoạn diễn ra trên mạch ADN khuôn thứ hai. Vì lẽ rằng mạch ADN khuôn thứ hai có hướng 5'- 3' nên sự tổng hợp diễn ra gián đoạn và phức tạp hơn và chậm hơn so với mạch liên. Nhờ xúc tác của enzym ARN polymeraza phụ thuộc ADN (1 loại primaza) đoạn ARN mồi thứ 1 được tổng hợp, enzym ADN polymeraza III nhận biết đầu 3' - OH của ARN mồi, bắt đầu tổng hợp một đoạn ADN (có khoảng 2000 nucleotit) được gọi là đoạn Okazaki (hình 2.1). Đoạn ARN mồi thứ 1 bị thủy phân bởi ADN polymeraza (tác động như exonucleaza). Tiếp theo trên khuôn của ADN, đoạn ARN mồi thứ 2 được tổng hợp và tiếp theo đó ADN polymeraza tổng hợp đoạn Okazaki thứ 2, đoạn mồi thứ 2 bị cắt bỏ. Đoạn Okazaki thứ nhất được khâu nối với đoạn Okazaki thứ 2. Tiến trình cứ tiếp diễn như thế cho đến khi kết thúc sự tái bản - các đoạn Okazaki được khâu nối với nhau nhờ enzym ligaza thành mạch ADN liên tục. Đối với Eucaryota các đoạn Okazaki ngắn hơn, có khoảng 200 nucleotit.

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

4.2.3. Các đơn vị tái bản (replicon)

Đối với Procaryota chỉ tồn tại một điểm khởi đầu tái bản và quá trình tái bản diễn ra theo hai chiều ngược nhau xuất phát từ điểm đó. Như vậy ở Procaryota chỉ là một đơn vị tái bản. Thời gian tái bản của genom của *E.coli* diễn ra chỉ trong khoảng 30 phút.

Đối với tế bào Eucaryota, phân tử ADN vô cùng dài, vì vậy nếu như chỉ có một đơn vị tái bản thì thời gian tái bản phải kéo dài tới 76 ngày, trên thực tế thời gian tái bản chỉ kéo dài 6-8 giờ (tốc độ tái bản ADN xảy ra ở mức độ 2 $\mu\text{m/phút}$). Điều đó nói lên rằng ADN của Eucaryota tồn tại nhiều đơn vị tái bản (replicon). Mỗi replicon có chiều dài từ 40 - 400 μm . Người ta đã tính được ở động vật có vú có khoảng 10000 đơn vị tái bản. Mỗi replicon có điểm khởi đầu tái bản riêng của mình. Tiến trình tái bản trong từng replicon cũng diễn ra giống như ở Procaryota, nghĩa là theo nguyên tắc khuôn bổ sung, có định hướng, theo hai chiều ngược nhau, liên tục và gián đoạn.

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

4.2.4. Nucleoxom và tiến trình tái bản

Sự tồn tại cấu trúc nucleoxom ở Eucaryota làm cho tiến trình tái bản xảy ra chậm hơn và các đoạn Okasaki ngắn hơn (chỉ dài khoảng 200 nucleotit). Trong tiến trình tái bản, phân tử ADN nối cuộn khỏi lõi histon, trong lúc đó histon octome biến dạng thành 2 tetrame. Các histon mới được tổng hợp từ tế bào chất được chuyên chở vào nhân, tạo thành các octome mới để cùng sợi kép ADN được tổng hợp tạo thành các nucleoxom, và từ đó tạo thành các sợi nhiễm sắc và nhiễm sắc thể con.

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

4.2.5. Sự sửa chữa ADN

Sự tổng hợp ADN trên nguyên tắc khuôn và bổ sung xảy ra rất chính xác với tần số sai sót chỉ khoảng 10^{-9} (cứ 10^9 nucleotit được tái bản có một sai sót). Tần số này nhỏ hơn rất nhiều so với tần số sai sót do sự bất cập sai lệch giữa các bazơ trong quá trình tái bản, ví dụ bất cập sai T- G hay C- A với tần số khoảng 10^{-5} . Sự giảm thiểu tần số sai sót là do có cơ chế sửa chữa ADN trong quá trình tái bản cho phép loại trừ những cặp bazơ sai lầm, được gọi là cơ chế "đọc sửa" (Proofreading repair). Sự phát hiện và loại bỏ các cặp bazơ liên kết sai nguyên tắc bổ sung là phụ thuộc vào đặc tính của enzym ADN polimeraza. Chức năng chủ yếu của các ADN polimeraza là xúc tác tổng hợp ADN nhưng chúng lại không có khả năng khởi động sự gắn kết hai nucleotit với nhau để tổng hợp sợi mới. Để thực hiện được việc này đòi hỏi phải có đoạn mỗi nucleotit ngắn (khoảng 10 nucleotit) có đầu tận cùng mang nhóm OH ở vị trí 3' (đoạn mỗi do enzym primaza tổng hợp). Khi đã có đoạn mỗi, ADN polimeraza sẽ lắp ráp các nucleotit tạo cặp bổ sung trên sợi khuôn bằng cách gắn vào vị trí 3' nhờ liên kết photphodiester giữa nhóm OH và gốc photphat. Mọi sự ghép cặp không tuân theo nguyên tắc bổ sung đều được chúng phát hiện, cắt bỏ và loại trừ. Chính liên kết bổ sung của nucleotit cuối cùng tại đầu 3' của đoạn mỗi với khuôn đóng vai trò quyết định để ADN polimeraza nhận biết các bất cập sai và tự sửa chữa.

Quá trình sửa chữa ADN còn xảy ra khi ADN bị đột biến do tác động của nhiều tác nhân gây đột biến. Quá trình sửa chữa này khác với quá trình sửa chữa khi tái bản ở chỗ,

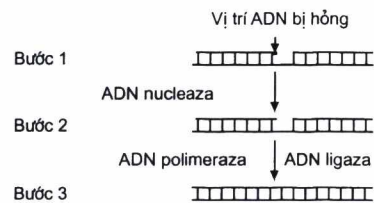
chúng đòi hỏi hệ enzym sửa chữa đặc biệt và theo nhiều cơ chế khác nhau, tuy nhiên cũng theo những nguyên tắc chung :

Sử dụng mạch đơn làm khuôn để sửa sai theo nguyên tắc bổ sung gồm 3 bước (hình 2.2) :

Bước 1 : Phần ADN bị đột biến được nhận biết và cắt bỏ nhờ enzym nucleaza làm nhiệm vụ sửa chữa (DNA repair nuclease). Liên kết photphodiester giữa nucleotit đột biến và nucleotit bình thường bị cắt đứt, tạo ra khoảng trống trên sợi ADN.

Bước 2 : Enzym ADN polimeraza nhận biết gốc 3'- OH ở khoảng trống và tổng hợp một đoạn nucleotit thay thế tại vị trí đó theo nguyên tắc bổ sung với sợi khuôn.

Bước 3 : Enzym ligaza nối đoạn ADN vừa tổng hợp tạo sợi ADN hoàn chỉnh, giống hệt sợi trước khi bị đột biến.



Hình 2.2. Ba bước cơ bản trong sự sửa chữa ADN

V - TỪ ADN ĐẾN ARN ĐẾN PROTEIN - SỰ BIỂU HIỆN THÔNG TIN DI TRUYỀN

Như ta đã biết, phân tử ADN là vật chất mang thông tin di truyền và thông tin di truyền được truyền từ thế hệ bố mẹ đến thế hệ con cái thông qua sự tái bản ADN và phân ly ADN về các tế bào con qua phân bào.

Ở mỗi cơ thể nhất định, thông tin di truyền (kiểu gen - genotype) được thể hiện ra ở các tính trạng hình thái và sinh lý - được gọi là kiểu hình (phenotype). Các tính trạng hình thái như độ lớn cơ thể, màu sắc, hình dạng, cũng như các tính trạng sinh lý và tập tính như trao đổi chất, trao đổi năng lượng, tính chịu nhiệt, ưa sáng v.v... đều do protein quy định. Như vậy phải có mối liên hệ giữa ADN và protein. Sinh học phân tử đã cho chúng ta biết dòng thông tin từ ADN đến protein phải thông qua ARN, hay còn gọi là giáo lý trung tâm của Crick :



Cấu tạo đặc thù của protein được quy định bởi cấu tạo đặc thù của ADN, hay nói một cách khác, mã của protein được quy định bởi mã của ADN và được gọi là mã di truyền (genetic code). Quá trình từ ADN $\rightarrow$ ARN được gọi là sự phiên mã (transcription) và quá trình từ ARN $\rightarrow$ protein được gọi là sự dịch mã (translation).

5.1. Sự phiên mã (transcription)

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

5.1.1. Các ARN polimeraza

ARN polimeraza là enzym có vai trò phiên mã, nghĩa là xúc tác sự tổng hợp các ARN (mARN, tARN và rARN) trên khuôn của một mạch ADN. Sự tổng hợp ARN diễn ra theo

chiều 3'- 5' của mạch khuôn và được xác định bởi promoter. Ở *Bacteria* người ta chỉ tìm thấy một dạng ARN polimeraza với khối lượng phân tử 500.000 dalton chứa nhiều mạch polipeptit (ví dụ ở *E.coli* có đến 5 mạch).

Ở Eucaryota có đến 3 dạng ARN polimeraza, mỗi dạng có vai trò riêng, đó là các dạng ARN polimeraza I, II và III :

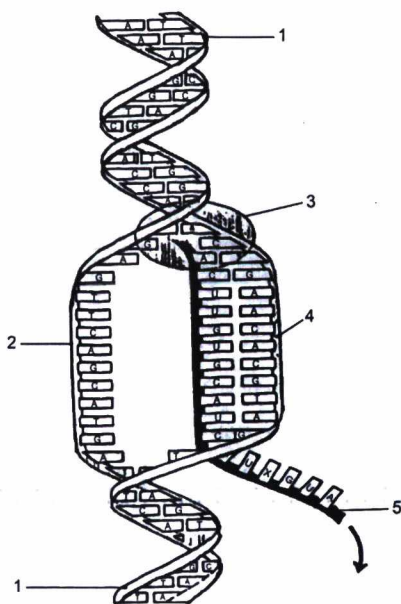
- ARN polimeraza I có vai trò tổng hợp các rARN (trừ rARN 5S).
- ARN polimeraza II có vai trò phiên mã các mARN.
- ARN polimeraza III có vai trò tổng hợp các tARN và rARN 5S.

Trong tế bào động vật có vú, người ta đã tính được có khoảng 40.000 phân tử ARN polimeraza I, 40.000 phân tử ARN polimeraza II và khoảng 20.000 phân tử ARN polimeraza III.

5.1.2. Cơ chế phiên mã

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

Promoter được nhận biết bởi các ARN polimeraza nhờ một hoặc nhiều protein liên kết với ADN ở đoạn promoter. Promoter trở thành hoạt động khi đã liên kết với protein (được gọi là nhân tố phiên mã), thì ARN polimeraza gắn vào promoter và bắt đầu phiên mã từ điểm khởi đầu và di chuyển dọc theo sợi ADN đã được tháo xoắn, bằng cách dùng một mạch ADN làm khuôn theo nguyên tắc bổ sung, các ribonucleotit được lắp ráp thành mạch ARN kéo dài theo hướng 5'- 3' cho đến điểm kết thúc. Phân tử ARN được tổng hợp



Hình 2.3. Sơ đồ phiên mã mARN từ ADN

1. Sợi kép ADN ; 2. Sợi đơn ADN không dùng để phiên mã ;
3. ARN polimeraza ;
4. Sợi đơn ADN được dùng làm khuôn phiên mã ; 5. Sợi mARN mới được tổng hợp

tức thì được tách khỏi ADN. ARN polymeraza cũng tách khỏi ADN (hình 2.3). Sự kéo dài và kết thúc mạch ARN đòi hỏi có sự tham gia của các nhân tố điều chỉnh.

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

Mạch ARN mới được tổng hợp bao gồm cả ARN được phiên từ các exon và intron, vì vậy được gọi là bản phiên khởi thủy. Bản phiên khởi thủy này phải được xử lý chế biến (ARN processing) thành các ARN có hoạt tính chức năng trước khi được tế bào sử dụng (các mRNA, tARN và rARN). Trong nhân tế bào, dưới tác dụng của các phức hệ ribonucleoprotein (snARN liên kết protein), các đoạn intron của mRNA khởi thủy bị cắt bỏ và sau đó các đoạn exon được khâu nối lại với nhau nhờ enzym ligaza và tạo thành mRNA chín có hoạt tính chức năng, nghĩa là dùng để dịch mã khi được chuyển đến ribosom.

5.2. Sự dịch mã (translation)

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

Trong tế bào và cơ thể sống, protein luôn được sử dụng, phân giải và tổng hợp mới từ nguồn axit amin có trong tế bào hoặc được thu nhận từ thức ăn. Tham gia vào sự sinh tổng hợp protein có nhiều yếu tố, nhưng có 3 yếu tố quan trọng bậc nhất là mRNA, tARN và ribosom.

5.2.1. Vai trò của mRNA

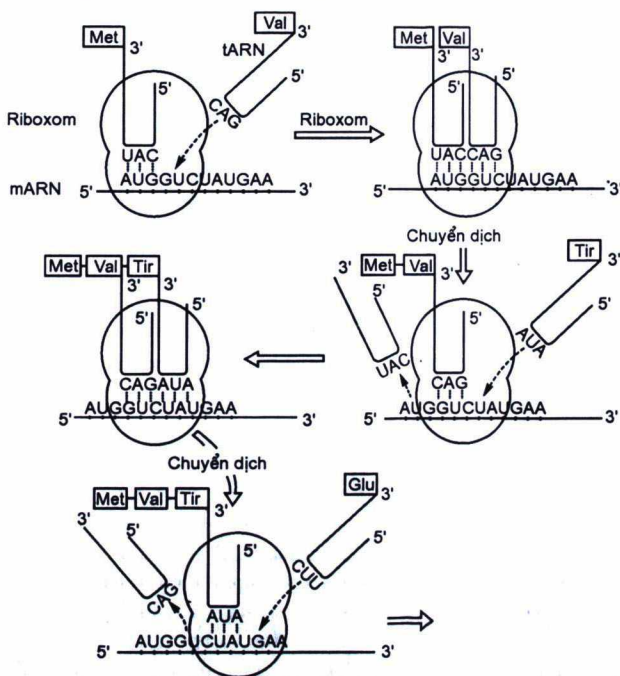
mRNA được phiên mã từ ADN và là bản sao của gen mã hóa cho protein cần được tổng hợp, mRNA được dùng làm khuôn để lắp ráp các axit amin, bởi vì trong mRNA chứa các codon quy định cho trình tự của axit amin cần được lắp ráp thành mạch polipeptit mà gen mã hóa. Điều này rất quan trọng ở chỗ cho phép chúng ta hiểu và thực hiện kỹ thuật chuyển gen để tổng hợp nên protein đặc thù cho cơ thể mang gen đó. Ví dụ, nếu ta chuyển gen mã hóa cho insulin của người vào trong *E.coli* thì gen này sẽ được phiên mã thành mRNA và mRNA này được dùng làm khuôn để tổng hợp nên insulin và insulin đó là của người.

5.2.2. Vai trò của tARN

tARN có vai trò chuyển chở các axit amin để lắp ráp thành mạch polipeptit. Mỗi axit amin tương ứng với vài tARN. Phân tử tARN liên kết với axit amin đặc trưng nhờ enzym aminoacyl - tARN synthetaza.

Có 20 aminoacyl - tARN synthetaza đặc trưng cho 20 axit amin. Đầu tiên aminoacyl-tARN synthetaza liên kết với axit amin đặc trưng cho riêng mình thành một phức hợp - phức hợp này liên kết với tARN đặc trưng qua đầu 3' với axit amin của phức hợp, tARN nhận biết được axit amin đặc trưng cho mình là nhờ enzym aminoacyl-tARN synthetaza, còn liên kết giữa tARN với axit amin đòi hỏi tiêu phí năng lượng từ ATP. Khi tARN đã liên kết với axit amin (aminoacyl-tARN) thì enzym được giải phóng và aminoacyl-tARN chuyển

đến bên A của riboxom trong đó anticodon của tARN liên kết bổ sung với codon của mARN, nghĩa là đúng codon của axit amin được mã hoá (hình 2.4).



Hình 2.4. Mô hình quá trình dịch mã

5.2.3. Vai trò của riboxom

Sự lắp ráp các axit amin để tạo thành mạch polipeptit được thực hiện trên riboxom gồm 3 giai đoạn :

- Giai đoạn khởi đầu bao gồm sự hình thành phức hệ khởi đầu do sự liên kết của mARN với đơn vị nhỏ 40S của riboxom (nhờ nhân tố F3 và ion Mg^{2+}), trong đó codon khởi đầu (codon AUG mã hoá cho metionin) được liên kết bổ sung với anticodon của metionin tARN. Đối với tế bào Eucaryota thì codon khởi đầu là metionin, còn đối với tế bào procaryota là N-Formyl- methionin. Methionin tARN kết hợp anticodon UAC với codon AUG nhờ nhân tố F19, F2, GTP và liên kết vào bên P của đơn vị nhỏ 60S của riboxom.

- Giai đoạn kéo dài : Trong tiến trình kéo dài, sự lắp ghép các axit amin thành mạch polipeptit bao gồm sự hình thành liên kết peptit giữa các axit amin và sự chuyển dịch. Các aminoaxil - tARN lần lượt chuyển chở các axit amin vào bên A (hay miền A) trong đó anticodon của tARN bổ sung với codon tiếp theo của mARN, ví dụ, codon tiếp theo AUG

là GUC (codon của valin) chẳng hạn thì valin - tARN sẽ đến đậu ở bên A và anticodon CAG sẽ khớp với codon GUC. Sự liên kết này đòi hỏi phải có mặt các nhân tố của sự kéo dài là EF1 và GTP. Với sự xúc tác của enzym peptidyl - transferaza và sự có mặt của ion K^+ , liên kết peptit giữa metionin - alanin được hình thành. Sau đó nhờ nhân tố EF2 và GTP, tARN mang metionin được giải phóng, đồng thời riboxom chuyển dịch theo sợi mARN với khoảng cách 1 codon và valin- tARN được chuyển sang bên P, và aminoaxil- tARN tiếp theo vào đậu ở bên A ứng với codon của nó (hình 2.4). Sự hình thành liên kết peptit và chuyển dịch của riboxom xảy ra liên tục, các tARN được giải phóng và lại quay vòng chuyển chở các axit amin tương ứng vào bên A và kết quả là kết thúc sự tạo thành mạch polipeptit.

- Giai đoạn kết thúc diễn ra khi riboxom dịch chuyển đến codon kết thúc dịch mã là UAA, hoặc UGA, hoặc UAG (đây là 3 codon kết thúc dịch mã chung cho tất cả mARN). Mạch polipeptit được giải phóng nhờ nhân tố giải phóng RF và GTP và riboxom phân giải thành hai đơn vị nhỏ, phân tử mARN cũng được giải phóng nhưng có thể được dùng lại để tổng hợp những phân tử protein khác. Các protein mới được tổng hợp sẽ được kiến tạo thành các cấu trúc bậc 2, bậc 3 v.v... là cấu trúc thù hình không gian đặc thù để thực hiện các chức năng của chúng trong tế bào.

VI - SỰ ĐIỀU HOÀ HOẠT ĐỘNG CỦA GEN

Hoạt động của gen thể hiện ở 2 quá trình : sự phiên mã để tạo nên các loại ARN (mARN, rARN, tARN, snARN...) và sự dịch mã tức là sự tổng hợp protein. Trong tế bào, các gen không hoạt động đồng thời. Một số gen hoạt động thường xuyên, cung cấp sản phẩm liên tục. Một số gen khác lại hoạt động ở những lúc cần thiết hoặc ở giai đoạn nhất định trong đời sống của mỗi sinh vật. Có gen ở mô này thì hoạt động nhưng ở mô khác không hoạt động. Sự hoạt động của gen chịu sự kiểm soát của nhiều cơ chế điều hoà ở trong tế bào, trong cơ thể và trong mối tương tác với môi trường sống.

6.1. Điều hoà hoạt động của gen ở sinh vật nhân sơ

Hệ gen của tế bào sinh vật nhân sơ có hàng trăm đến nghìn gen. Ở mỗi thời điểm chỉ có một số ít các gen hoạt động, đại bộ phận các gen khác ở trạng thái ức chế. Cơ chế điều hoà hoạt động của các gen đã được F. Jacob và J. Monod là hai nhà khoa học người Pháp phát hiện ở vi khuẩn *E.coli* vào năm 1961.

Cơ chế điều hoà của gen phụ thuộc vào cấu trúc của hệ gen trong ADN và phụ thuộc vào các nhân tố trong tế bào và các nhân tố của môi trường.

Trên ADN, các gen có liên quan về chức năng thường được phân bố thành một cụm, có chung một cơ chế điều hoà được gọi là operon. Ví dụ : Operon *lac* ở *E.coli* điều hoà tổng hợp các enzym (β - galactozidaza, transaxetilaza, permeaza...) giúp chúng sử dụng đường lactozơ có trong môi trường.

Operon *lac* gồm các thành phần :

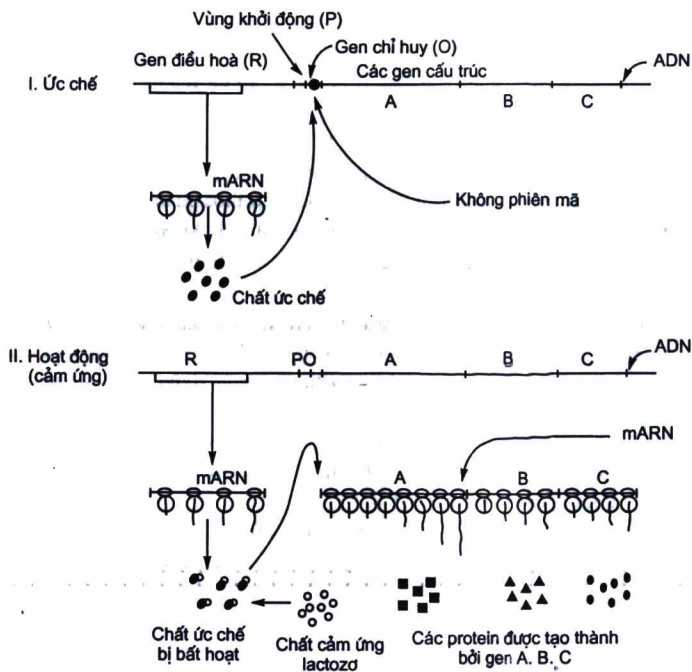
- Nhóm gen cấu trúc (structure gene-S) liên quan với nhau về chức năng nằm kề nhau (ví dụ các gen A, B, C) mã hóa cho các enzym (β -galactozidaza, transaxetilaza, permeaza).

- Gen chỉ huy (operator gene - O) : nằm trước các gen cấu trúc, là vị trí tương tác với protein ức chế.

- Vùng khởi động (còn gọi là gen vận hành) (promotor - P) : nằm trước gen chỉ huy, đó là vị trí tương tác với enzym ARN polymeraza để khởi đầu phiên mã.

Sự hoạt động của operon chịu sự điều khiển của một gen điều hoà (regulator gene- R) nằm ở trước operon. Bình thường gen R tổng hợp ra một loại protein có tác dụng ức chế (được gọi là protein ức chế – repressor) gắn vào gen chỉ huy do đó enzym ARN polymeraza không phiên mã được, gen cấu trúc ở trạng thái ức chế không hoạt động. Đó là trường hợp trong môi trường không có lactozơ. Khi trong môi trường có lactozơ thì operon chuyển sang trạng thái hoạt động. Lactozơ đóng vai trò như nhân tố cảm ứng bằng cách liên kết với protein ức chế, do đó protein ức chế không gắn vào O, nhờ vậy enzym phiên mã ARN polymeraza tương tác được với P để phiên mã.

Sơ đồ cơ chế điều hoà hoạt động của operon *lac* ở trạng thái ức chế (I) và trạng thái hoạt động (II) được mô tả trên hình 2.5 :



Hình 2.5. Sơ đồ cơ chế điều hoà hoạt động của operon *lac* ở *E. coli*

Mô hình trên đây thể hiện cơ chế điều hòa theo kiểu cảm ứng (hoạt hóa gen) xảy ra đối với các operon khi có chất cảm ứng là các cơ chất được vi khuẩn phân giải. Ngoài ra còn có cơ chế điều hòa theo kiểu ức chế (bất hoạt gen) đặc trưng cho các operon khi có chất ức chế

là các sản phẩm được tổng hợp bởi vi khuẩn. Ví dụ, đối với operon *trp* là operon chứa các gen mã hóa cho các enzym (tryptophan synthetaza) có vai trò tổng hợp axit amin tryptophan cần cho vi khuẩn. Trường hợp vi khuẩn thiếu tryptophan, operon *trp* hoạt động và sản sinh ra enzym, do đó tryptophan được tổng hợp, nhưng khi lượng tryptophan đã đủ thì chính tryptophan lại trở thành chất ức chế hoạt động của operon *trp*. Tryptophan được gọi là chất đồng ức chế (corepressor) bởi vì trong trường hợp bình thường, khi không có tryptophan thì chất ức chế do gen R sản sinh ra không có hoạt tính, nghĩa là không gắn vào O, do đó operon *trp* hoạt động sản sinh ra enzym, còn khi có tryptophan thừa thì tryptophan sẽ liên kết với chất ức chế và phức hợp này sẽ gắn vào O, do đó ức chế hoạt động của operon.

Nhân tố của môi trường tham gia vào cơ chế điều chỉnh hoạt động của gen có thể là các nhân tố nội bào (các sản phẩm của trao đổi chất) hoặc nhân tố đến từ môi trường. Chúng có thể đóng vai trò cảm ứng (hoạt hóa gen, ví dụ lactozơ hoạt hóa operon *lac*), hoặc đóng vai trò ức chế (bất hoạt gen, ví dụ tryptophan ức chế operon *trp*).

6.2. Điều hoà hoạt động của gen ở sinh vật nhân chuẩn

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

Cơ chế điều hoà hoạt động của gen ở sinh vật nhân chuẩn phức tạp hơn vì do cấu trúc phức tạp của ADN trong NST. ADN trong các tế bào của sinh vật nhân chuẩn có khối lượng rất lớn tới hàng chục triệu, hàng tỷ cặp nucleotit. Chỉ có một phần nhỏ ADN mã hoá các thông tin di truyền, còn đại bộ phận đóng vai trò điều hoà hoặc không hoạt động.

Tế bào tổng hợp protein nhiều hay ít là do nhu cầu của tế bào hoặc tùy từng giai đoạn phát triển.

ADN nằm trong nhiễm sắc thể có cấu trúc bền xoắn phức tạp, cho nên trước phiên mã, NST phải tháo xoắn. Sự điều hoà hoạt động của gen ở sinh vật nhân chuẩn qua nhiều mức điều hoà, qua nhiều giai đoạn như : NST tháo xoắn, phiên mã, biến đổi sau phiên mã, dịch mã và biến đổi sau dịch mã.

Trong cùng một loại tế bào, các loại mARN có tuổi thọ khác nhau. Các protein đã được tổng hợp xong vẫn tiếp tục chịu một cơ chế kiểm soát của các enzym. Khi các protein nào đó không còn cần thiết sẽ bị enzym phân giải.

Ở các sinh vật nhân chuẩn, bên cạnh vùng khởi động và kết thúc phiên mã, người ta còn thấy có các yếu tố điều hoà khác như các gen tăng cường, gen bất hoạt. Các gen tăng cường tác động lên gen điều hoà gây nên sự biến đổi cấu trúc của nucleoxom ; còn gen bất hoạt làm ngừng quá trình phiên mã.

Về tín hiệu thì ngoài những tín hiệu đóng mở gen có trong tế bào chất hoặc đến từ môi trường thì còn có rất nhiều tín hiệu đến từ tế bào bên cạnh, từ các mô và cơ quan khác nhau, ví dụ hoocmon steroid là tín hiệu hoạt hoá gen. Về cơ chế thì phức tạp hơn, thể hiện sự điều chỉnh theo nhiều cấp độ, lệ thuộc và phối hợp với nhau.

Ví dụ trong tế bào soma của động vật có xương sống bậc cao, không phải tất cả các gen đều hoạt động mà chỉ có một số gen (20 - 20000) hoạt động thuộc 2 loại :

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

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

6.2.1. Cấp độ điều hòa

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

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

6.2.2. Điều hoà hoạt động của gen trong phiên mã

a) *Protein điều chỉnh*. Các nhân tố điều hoà phiên mã là những protein (yếu tố *trans*) gắn vào ADN ở vùng điều chỉnh (yếu tố *cis*) của gen. Đó là những protein có cấu trúc bậc 4 ở dạng nhị hợp (dimer), hoặc đa hợp (polymer) có chứa tối thiểu 3 vùng hoạt tính : vùng hoạt tính cần cho sự nhị hợp hoá, vùng hoạt tính cần cho sự gắn kết với ADN và vùng hoạt tính cần cho sự điều hoà phiên mã (tương tác với ARN-polymeraza).

b) Cơ chế hoạt động của protein điều chỉnh

- Protein điều chỉnh nhận biết trình tự nucleotit của vùng điều chỉnh (vùng này thường nằm trong enhancer) của gen (gồm khoảng 6 nucleotit) ở cả 2 mạch ADN. Mỗi mạch polipeptit của protein điều chỉnh gắn với một mạch ADN ở vùng điều chỉnh.

Khi protein điều chỉnh gắn vào ADN điều chỉnh sẽ tạo nên chỗ gấp cong của ADN. Góc gấp cong ADN thay đổi tùy theo loại protein điều chỉnh và có ảnh hưởng đến tốc độ hoạt động của gen. Đồng thời protein điều chỉnh qua vùng hoạt tính thứ 3 của mình sẽ liên

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

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

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

- Sự ức chế phiên mã là do sự gắn của protein đặc thù (cũng thuộc protein điều chỉnh) vào vùng ADN được gọi là vùng dập tắt (silencer).

Ví dụ, những protein đặc thù kiểm soát sự phiên mã của các gen mã hoá cho các protein của neuron (các protein tạo nên các cơ thần kinh, các protein tạo nên kênh natri...), chúng không có trong nhân của các neuron, nhưng chúng tồn tại trong các tế bào không phải là neuron và có vai trò ức chế hoạt động của các gen mã hoá cho các protein của neuron trong các tế bào đó.

- Sự kích thích phiên mã là do các protein điều chỉnh gắn vào vùng ADN được gọi là vùng khuếch đại (enhancer) của gen và phát động sự phiên mã của gen đó.

c) Protein có tác động điều hoà sự phiên mã cần thiết cho sự biệt hoá tế bào và mô

Ví dụ protein MyoD1 tác động trong sự biệt hoá các hợp bào cơ vân, hàm lượng của chúng thay đổi tùy theo các giai đoạn phát triển của hợp bào cơ vân. MyoD1 là protein điều chỉnh phiên mã của các gen mã hoá cho các protein tạo nên các cơ cơ rút và các protein tạo kênh ion trong màng sinh chất hợp bào cơ vân. Ở giai đoạn cơ bào (myoblast) hàm lượng MyoD1 rất ít và được tăng cao ở giai đoạn khi trong hợp bào cơ hình thành nhiều cơ. Trong hợp bào cơ hàm lượng của chúng giảm khi cơ đã có phân bố thần kinh (hình thành xinap cơ - thần kinh) và sẽ tăng cao khi hợp bào cơ bị cắt mất dây thần kinh. Như vậy MyoD1 có tác động hoạt hoá các gen mã hoá cho các protein cơ rút khi cơ đang phát triển, hoặc protein kênh ion ở dạng "trưởng thành" của hợp bào cơ khi hợp bào cơ chưa có tiếp xúc thần kinh, và khi đã hình thành tiếp xúc thần kinh các gen này sẽ bị ức chế.

Protein MyoD1 kết hợp cùng các protein khác cùng họ với MyoD1 tác động nối tiếp nhau kiểm tra các giai đoạn biệt hoá của hợp bào cơ vân.

- d) *Protein điều chỉnh các gen có vai trò trong phát triển phôi.* Nhiều protein điều chỉnh có chứa vùng hoạt tính đặc biệt, được gọi là vùng homeo (homeodomain), chúng chịu trách nhiệm trong sự biệt hoá của phôi ở giai đoạn sớm, tức là kiểm soát sự phân cắt và phân cực của phôi.

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

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

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

- Trong tế bào tuyến nước bọt, promotor nằm cạnh exon S được hoạt hoá và tạo nên amilaza trong nước bọt.

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

6.2.3. Điều hoà hoạt động của gen sau phiên mã

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

a) *Sự xử lý ARN sơ cấp*. Các mARN vừa được tổng hợp chưa thể dùng làm khuôn để dịch mã được gọi là tiền mARN (hay mARN sơ cấp), chúng cần được xử lý ghép nối (alternative splicing), tức là quá trình cắt bỏ các đoạn intron và ghép nối các đoạn exon tạo thành nhiều mARN chín khác nhau, có thể làm khuôn để dịch mã sản sinh nhiều protein khác nhau. Sự chế biến ghép nối có thể tạo nên mARN để dịch mã cho các iso của cùng protein trong cùng một tế bào, hoặc trong các tế bào khác nhau, ví dụ, một gen có thể sản sinh ra các dạng iso của protein dính kết NCAM 140kDa và 180kDa trong neuron và cơ vân, và dạng 120kDa trong các tế bào thần kinh đệm (astrocyte). Sự chế biến ghép nối có thể tạo nên các mARN để dịch mã cho 2 loại protein khác nhau, trong 2 loại tế bào khác nhau, ví dụ cùng một gen nhưng trong tế bào của tuyến cận giáp sẽ sản sinh ra hormone parathyroid, còn trong neuron vận động lại sản sinh ra peptide CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) là chất trung gian thần kinh.

b) *Sự xuất xưởng và tuổi thọ của mARN*. Các quá trình khác trong sự chín của mARN và sự xuất xưởng của mARN ra tế bào chất cũng tham gia vào sự điều hoà hoạt động của gen, ví dụ, độ lớn và thành phần nucleotit của vùng 3' không mã hoá của mARN có ảnh hưởng đến sự ổn định và tuổi thọ của mARN. Phân tử mARN thường gồm 3 đoạn: đoạn 5' không mã hoá (không dùng để dịch mã sang protein) có độ lớn khoảng 100 nucleotit tạo

thành mũ được gắn với protein cần thiết cho sự vận chuyển mARN qua lỗ màng nhân và dịch mã trên riboxom ; và đoạn cuối 3' không mã hoá có độ lớn khoảng 1000 nucleotit và tận cùng bởi đuôi poli-A. Chính đoạn 3' không mã hoá này có chứa tín hiệu địa chỉ nơi tế bào chất mà ở đó mARN cần chuyển chở đến, cũng như chứa tín hiệu liên kết với protein đặc thù trong tế bào chất quy định tuổi thọ của mARN. Độ dài của đuôi poli-A quy định tuổi thọ của mARN, đuôi poli-A càng ngắn thì mARN bị phân giải càng nhanh. Trong tế bào chất, đoạn 3' không mã hoá có thể liên kết với các cấu trúc vi sợi và vi ống. Một số dạng mARN có tuổi thọ ngắn khoảng 15 phút, có dạng mARN có tuổi thọ dài tới vài ngày.

6.2.4. Cấu trúc hiển vi và cấu trúc siêu hiển vi của nhiễm sắc thể

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

6.2.5. Các nhân tố nội môi và ngoại môi trường

a) *Nhân tố nội môi.* Đa số nhân chuẩn là đa bào, cơ thể gồm nhiều loại tế bào phân hóa khác nhau, tạo nên các mô, cơ quan khác nhau, do đó sự hoạt động của gen chịu sự kiểm soát của các nhân tố nội môi, ví dụ : các hoocmon, các nhân tố sinh trưởng mà ta đã xem xét ở các phần trên là các nhân tố hoạt hóa gen trực tiếp hoặc gián tiếp. Tuổi thọ của mARN trong tế bào chất không chỉ tùy thuộc vào độ dài của đuôi poliA mà còn tùy thuộc vào sự trao đổi chất trong tế bào chất.

b) *Nhân tố môi trường ngoại.* Các nhân tố môi trường sống như nhiệt độ, ánh sáng, chất hóa học, virus... đều có thể gây ảnh hưởng đến hoạt động của gen.

- **Nhiệt độ và các gen sốc nhiệt (heat-shock genes) :** Thường thường khi cơ thể (kể cả Procaryota cũng như Eucaryota) bị sốc nhiệt thì cơ thể sản sinh ra một loại protein đặc biệt, được gọi là protein sốc nhiệt (heat shock proteins), có tác dụng giúp cho cơ thể ổn định nội môi để chống chịu sự thay đổi của nhiệt độ môi trường. Người ta đã chứng minh rằng, chính sốc nhiệt có vai trò kích thích sự phiên mã của các gen sốc nhiệt. Ví dụ, ở ruồi quả, protein sốc nhiệt được gọi là HSP70 có khối lượng 70 kDa, được mã hóa bởi họ gen sốc nhiệt HSP70 khu trú trong nhiễm sắc thể thường. Vào mùa hè khi nhiệt độ cao quá 33°C, một trong các gen sốc nhiệt được phiên mã thành mARN và được dịch mã sản sinh ra HSP70. Sự phiên mã của gen HSP70 được điều chỉnh bởi nhân tố phiên mã là HSTF có trong nhân của các tế bào của ruồi quả. Khi bị sốc nhiệt, HSTF bị photphorin hóa và có khả năng bám vào đoạn ADN ở trước gen HSP70 (được gọi là yếu tố trả lời sốc nhiệt-HSE) tạo điều kiện cho enzym ADN polimeraza II hoạt động phiên mã tạo nên mARN.

- **Ánh sáng :**

Enzym ribuloz 1,5 - biphosphat cacboxilaza (RBC) là loại protein nhiều nhất trong thế giới sống, có vai trò vô cùng quan trọng trong quang hợp của cây xanh. Chính nhờ hoạt

động của enzym này mà dioxitcacbon được chuyển hóa thành glucozo. Năng lượng cần cho sự chuyển hóa này được cung cấp từ ánh sáng. Sự sản sinh enzym RBC trong cây được cảm ứng bởi ánh sáng. RBC là một phức hệ enzym gồm đơn vị bé và đơn vị lớn, và được mã hóa bởi hai gen khác nhau. Đối với một số loài cây, cả hai gen đều ở trong ADN lục lạp, nhưng đối với một số loài cây khác, gen mã hóa đơn vị lớn định khu trong ADN lục lạp, còn gen mã hóa cho đơn vị bé định khu trong ADN của nhân. Sự hoạt hóa của các gen RBC dưới tác động của ánh sáng được điều chỉnh bởi protein đặc biệt có trong tế bào chất là phytocrôm (xem phần trên).

VII - TIẾN HÓA CỦA HỆ GEN

Gen như ta đã biết có bản chất là ADN (hoặc ARN như đối với một số virut), là đơn vị tích thông tin di truyền được tập hợp thành tổ chức hệ gen (genome). Gen cũng như hệ gen được xuất hiện và tiến hóa trong quá trình tiến hóa của sự sống. Gần đây các nhà di truyền học phân tử đã chứng minh : có thể là phân tử ARN xuất hiện trước, về sau mới chuyển nhiệm vụ tích thông tin di truyền cho ADN còn ARN chỉ đóng vai truyền đạt thông tin di truyền. Hiện nay còn tồn tại nhiều virut sử dụng ARN để tích thông tin di truyền, ví dụ virut khảm thuốc lá, virut HIV v.v... Trong quá trình ký sinh dung hợp trong tế bào vật chủ, virut HIV có thể phiên mã ngược từ ARN thành ADN và gắn ADN này vào ADN của vật chủ.

7.1. Đối với virut và Procaryota

Virut có ADN là phân tử mạch đơn hoặc mạch kép ở dạng trần không liên kết với histon, có cấu tạo mạch thẳng hoặc mạch vòng và búi với hàm lượng tương ứng với số lượng gen chứa trong đó. Ví dụ, thể thực khuẩn MS2 có ARN mạch đơn chứa 3569 nucleotit tạo nên 4 gen, thể thực khuẩn X174 có ADN mạch đơn chứa 5386 nucleotit tạo nên 11 gen. Virut có nhiều gen nhất là thể thực khuẩn T2, ADN của chúng chứa tới 150 gen.

Đối với Procaryota thì hàm lượng ADN và số lượng gen nhiều hơn, ví dụ, vi khuẩn *Haemophilus influenzae* có hàm lượng ADN chứa 1,83 triệu cặp nucleotit, chứa 1700 gen và *E.coli* có mạch kép ADN chứa 4,64 triệu cặp nucleotit, tạo nên khoảng 4000 gen.

7.2. Đối với Eucaryota

Ở Eucaryota thì cấu trúc của gen và tổ chức của hệ gen phức tạp hơn nhiều. Trong lúc Procaryota có ADN trần và hệ gen đơn bội (gen không có alen tương ứng) thì Eucaryota có ADN ở dạng mạch kép thẳng, luôn liên kết với histon, tạo thành nhiễm sắc thể và tồn tại ở dạng lưỡng bội (gen có alen tương ứng), hoặc đơn bội (gen không có alen – ví dụ trong tế bào đơn bội hoặc trong giao tử). Gen cũng như hệ gen ở Eucaryota có cấu trúc rất phức tạp. Hàm lượng ADN rất lớn và không tương ứng với số lượng gen chứa trong đó. Số lượng gen nhiều khi chỉ chiếm từ 10%-20% hàm lượng ADN. Gen có cấu tạo gồm ngoài những cặp nucleotit mã hóa cho axit amin còn chứa các nucleotit đóng vai trò hỗ trợ và điều chỉnh hoạt động của gen. Ở cơ thể tiến hóa càng cao thì yếu tố này càng nhiều, cũng vì vậy mà có một nghịch lý là : ở Eucaryota, hàm lượng ADN không tương ứng với số lượng gen mà cơ thể có và số lượng gen cũng không tăng tương ứng với số lượng protein hoạt động trong cơ thể theo mức độ tiến hóa. Chúng ta xem xét một vài ví dụ : Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* chứa hàm lượng đơn bội ADN là 12,1 triệu cặp nucleotit, có khoảng 6200 gen. Ruồi quả *Drosophila melanogaster* chứa hàm lượng đơn bội ADN là 165 triệu cặp nucleotit

nhưng số gen chỉ có khoảng 13350 gen và con người đỉnh cao nhất của tiến hóa chứa hàm lượng đơn bội 3000 triệu (3 tỷ) cặp nucleotit nhưng số gen chỉ có khoảng 35.000 gen mà thôi (theo tài liệu công bố trong tạp chí Science Vol.291.Feb.2001), nghĩa là chỉ hơn 2,5 lần so với ruồi quả. Trong lúc đó giun tròn *Caenorhabditis elegans* chứa 100 triệu cặp nucleotit nhưng có đến 18250 gen, nhiều hơn ruồi quả. Bọ ếch nhái lại chứa hàm lượng ADN rất cao, cao hơn nhiều so với động vật có vú. Ví dụ ếch *Rana esculenta* có ADN đơn bội đạt tới 15 tỷ đôi nucleotit, nhiều gấp 5 lần so với con người và đặc biệt là con *Salamandra* (một loại ếch nhái có đuôi) có hàm lượng ADN đơn bội đạt tới 90 tỷ đôi nucleotit nghĩa là gấp 6 lần so với ếch (thuộc cùng một lớp) và gấp 30 lần so với con người. Như vậy rõ ràng rằng, không thể dùng hàm lượng ADN cũng như số lượng gen để đánh giá mức độ tiến hóa của các cơ thể mà phải căn cứ vào cấu trúc của gen và tổ chức hệ gen của chúng. Ngày nay các nhà khoa học đã và đang giải mã trình tự của hệ gen nhiều cơ thể có ý nghĩa quan trọng trong bậc tiến hóa cũng như có vai trò thực tiễn quan trọng như các vi khuẩn gây bệnh, cây lương thực thực phẩm cũng như động vật nuôi và cả con người. Bước đầu giải mã hệ gen động vật có vú và người cho chúng ta thấy hướng tiến hóa không phải là tăng hàm lượng ADN, tăng số lượng gen mà điều chủ yếu là tăng cơ chế tái tổ hợp mới trên cơ sở cái đã có, ví dụ, tăng các vùng tổ hợp ADN mã cho các vùng (domains) hoạt tính của protein (như vậy không cần tăng số lượng gen), tăng vùng ADN (hoặc gen) điều chỉnh, tăng độ đa dạng của mARN nhờ cơ chế xử lý mARN trước khi dịch mã để tăng độ đa dạng của protein mà không cần tăng số lượng gen... Nếu ta so sánh : nấm men có khoảng 6000 gen và sản sinh khoảng 5000 protein hoạt động, ruồi quả có khoảng 13000 gen sản sinh khoảng 10000 protein hoạt động, thì ở cơ thể người với số lượng gen khiêm tốn chỉ có 35000 gen (chỉ gấp 2,5 ruồi quả) nhưng có thể tạo nên số lượng protein đa dạng rất lớn (khoảng 70000 - 100000, gấp 7-10 lần ruồi quả). Các gen mã hóa cho các globulin chỉ vài trăm nhưng do cơ chế tái tổ hợp về lý thuyết có thể tạo nên hàng tỷ kháng thể khác nhau để có thể đáp ứng bất kỳ kháng nguyên nào xâm nhập cơ thể. Hy vọng rằng, khi hệ gen của các cơ thể được giải mã hoàn toàn, các nhà tiến hóa luận sẽ lý giải được nghịch lý tiến hóa đã nêu trên đây.

Hệ gen của Eucaryota là lưỡng bội, nhiễm sắc thể tồn tại thành cặp tương đồng và gen có alen tương ứng. Sự đa bội hóa hệ gen cũng thể hiện phương thức tiến hóa của loài. Các cơ thể đơn bội gen không có alen, khi sinh sản, alen này được tái bản và sẽ được truyền đạt cho thế hệ sau nguyên xi alen đó. Ví dụ gen A sau khi được tái bản sẽ là AA và sau khi phân bào sẽ cho ra A và A. Các cơ thể lưỡng bội, gen luôn tồn tại thành cặp (gen-alen) : AA, Aa, aA hoặc aa. Như vậy cặp gen-alen có ba kiểu gen khác nhau và cơ thể sẽ có các genom chứa thành phần kiểu gen khác nhau. Nếu gen có nhiều alen (đa alen) thì sự tổ hợp kiểu gen càng lớn, độ đa dạng di truyền càng lớn. Ví dụ gen A có các alen a và a' sẽ cho ra các tổ hợp AA, aa, Aa, aA, Aa', a'A, a'a, a'a'. Gen quy định nhóm máu ở người có 3 alen quy định nên đa dạng nhóm máu : A, B, AB và O.

Gen mã hóa cho protein distrophin ở người có 29 alen và theo lý thuyết sẽ tạo nên 2^{29} kiểu gen khác nhau. Hiện tượng đa bội hóa (tam bội, tứ bội...) là phương thức tiến hóa rất phổ biến ở thực vật.

Cấu trúc của nhiễm sắc thể cũng rất phức tạp, được phân hóa thành nhiễm sắc thể thường và nhiễm sắc thể giới tính, vùng tâm động (centromere), vùng cùng tiết (telomere), vùng NOR (vùng chứa các gen rARN) v.v... Tổ chức như thế thể hiện phương thức đa dạng hóa cơ cấu di truyền (genotíp) của cơ thể.

Chương 3

DI TRUYỀN VÀ BIẾN DỊ

I - CÁC LOẠI BIẾN DỊ

Cơ thể sống không chỉ có đặc tính di truyền, tức là đặc tính thể hiện ở cơ thể con cái có tính trạng giống bố mẹ, nhưng đồng thời còn có các đặc tính biến dị thể hiện ở chỗ cơ thể con cái có nhiều tính trạng khác bố mẹ. Các nhà di truyền học phân biệt 2 loại biến dị là thường biến (modification) và biến dị di truyền (genetic variation). Ta hãy xét xem 2 loại biến dị này sai khác nhau ở những điểm nào.

1.1. Thường biến

Thường biến (modification) là các biến dị biểu hiện ra ở kiểu hình do tác động của điều kiện môi trường. Nó thể hiện mức phản ứng của kiểu gen đối với điều kiện môi trường. Thường biến không di truyền cho con cháu.

Ví dụ, cá bơn sống ở nền cát đen có màu sẫm, khi chuyển sang sống ở nền cát trắng da chúng trở nên có màu sáng. Nếu chúng ta chuyển cá bơn có màu sáng sang sống ở nền cát đen, chúng trở nên sẫm hơn.

Ví dụ, cây rau mác sống ở nước thường có nhiều dạng lá khác nhau : lá trên không khí có hình mác còn lá ở mặt nước có hình bản. Nếu chúng ta đem trồng cây rau mác ở môi trường cạn thì lá của chúng chỉ toàn là hình mác.

Thường biến thường mang tính thích nghi với môi trường và tất nhiên cũng có ý nghĩa đối với sự tồn tại của cá thể, bởi vì nếu không thích nghi được với thay đổi của môi trường, cơ thể sẽ chết và kiểu gen của chúng không di truyền cho thế hệ sau.

1.2. Biến dị di truyền

Biến dị di truyền (genetic variations) là các biến đổi trong kiểu gen có thể được biểu hiện hoặc không được biểu hiện ra kiểu hình. Nguyên nhân có thể do ngẫu nhiên hoặc do cơ chế tái tổ hợp trong hệ gen, hoặc do tác động của các tác nhân gây đột biến lên ADN, hoặc nhiễm sắc thể, như tác nhân hoá học, vật lý và virus.

Biến dị di truyền có thể xảy ra trong tế bào soma hoặc trong tế bào sinh dục. Nếu xảy ra trong tế bào soma sẽ gây biến dị đối với tế bào, mô và cơ thể (ví dụ gây ung thư). Nếu xảy ra trong tế bào sinh dục sẽ di truyền cho các thế hệ con cháu.

Các nhà di truyền học phân biệt 3 dạng biến dị di truyền :

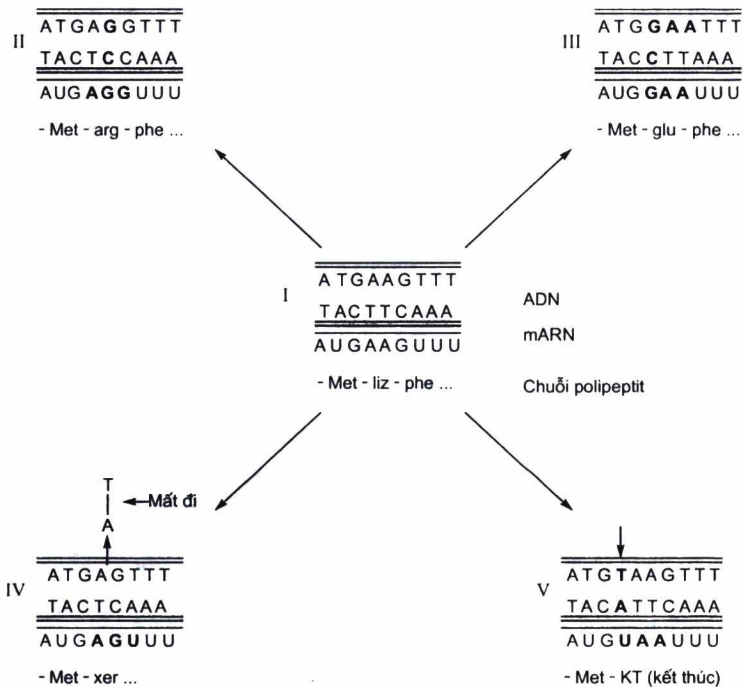
- *Đột biến gen* (gene mutation) hay là đột biến điểm, là những biến đổi trong cấu trúc của phân tử ADN.

- *Đột biến nhiễm sắc thể* (chromosome aberration) là những biến đổi trong cấu trúc và số lượng nhiễm sắc thể.

- *Đột biến tái tổ hợp* (genetic recombination) với nghĩa chính thống là những biến đổi trong ADN và thể nhiễm sắc gây ra do cơ chế hoán vị gen giữa hệ gen của bố và mẹ qua tiền kỳ phân bào giảm nhiễm I, do sự phân ly độc lập và tổ hợp tự do của hệ gen bố và mẹ (gen - alen) qua sự tạo giao tử và qua sự tạo hợp tử khi thụ tinh (xem phần sau).

II - ĐỘT BIẾN GEN

Đột biến gen còn được gọi là đột biến điểm, là những biến đổi trong cấu trúc của gen thể hiện ở sự thay thế nucleotit này bằng một nucleotit khác, hoặc đảo vị trí sắp xếp của nucleotit, hoặc mất đi hoặc thêm vào một hay một số nucleotit trong gen (hình 3.1).



Hình 3.1. Các dạng đột biến gen và sản phẩm polipeptit của chúng

I. Gen ban đầu ; II. Thay thế nucleotit ; III. Đảo nucleotit ; IV. Mất nucleotit ; V. Thêm nucleotit.

Đột biến gen có thể xảy ra đối với tất cả các gen của mọi cơ thể sống. Đột biến gen cũng như đột biến nhiễm sắc thể dẫn đến hình thành các biến dị di truyền mới, và từ đó tạo cho cơ thể có nhiều khả năng thích nghi với các biến đổi của môi trường.

2.1. Đột biến gen có thể là đột biến soma hay là đột biến mầm

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

Đột biến soma gây nên các biến đổi kiểu hình, thể hiện ở mức độ tế bào, mức độ mô hoặc cơ quan trong thể hệ một cá thể chứ không truyền cho thế hệ sau qua giao tử. Ví dụ, cam có lỗ rốn (navel orange) mềm ngon và táo ngọt lịm (delicious apple) đều là những thể đột biến soma. Người ta phải sử dụng phương pháp sinh sản sinh dưỡng như ghép cành, chiết cành để nhân giống chúng.

Đối với động vật và con người, các đột biến soma thường gây nên các hư hỏng ở mức độ tế bào, mô hoặc cơ quan nào đó, ví dụ như ung thư.

2.2. Đột biến gen là ngẫu nhiên hoặc cảm ứng

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

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

Trong thực nghiệm, người ta dễ dàng phân tích các dạng đột biến gen nhưng trong thực tế thật khó phân biệt các đột biến ngẫu nhiên và đột biến cảm ứng. Các nhà di truyền học thường phân tích các đột biến và so sánh chúng ở mức độ quần thể. Nếu người ta cho xử lý quần thể với một tác nhân gây đột biến nào đó, mà tần số đột biến tăng lên mức 99 trên 100 đột biến có mặt trong quần thể, thì đột biến đó là đột biến cảm ứng. Các nhà nghiên cứu thường sử dụng thống kê sinh học để tính toán, so sánh các tần số đột biến cảm ứng với tần số đột biến ngẫu nhiên trong các quần thể được tác động bởi các tác nhân gây đột biến, với các quần thể không có tác động bởi tác nhân gây đột biến thử nghiệm.

Các đột biến ngẫu nhiên xuất hiện không thường xuyên, tuy nhiên tần suất của chúng có thể thay đổi từ gen này đến gen khác, từ cơ thể này đến cơ thể khác. Người ta đã tính toán được tần số xuất hiện các đột biến ngẫu nhiên đối với các gen khác nhau là ở mức 10^{-7} đến 10^{-10} đối với một cặp nucleotit và đối với một thể hệ. Nếu ta đem so sánh tần số đột biến đối với một cặp nucleotit với một gen thì tần số đột biến ở mức 10^{-4} đến 10^{-7} (vì trung bình 1 gen chứa khoảng 1000 đôi nucleotit). Vì lẽ rằng ở các cơ thể bậc cao số gen là rất lớn, nên tần số đột biến là ở mức đáng kể.

2.3. Đột biến là quá trình ngẫu nhiên không mang tính thích nghi

Chúng ta rất quen biết với hiện tượng nhờn thuốc của côn trùng có hại khi xử lý bởi các loại thuốc diệt sâu, hoặc vi khuẩn gây bệnh khi xử lý bởi kháng sinh. Trong quá trình tác động giữa cơ thể và thuốc đã xuất hiện cá thể đột biến có đặc tính kháng thuốc. Học thuyết

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

Trong ví dụ về tính kháng thuốc của vi khuẩn, các nhà di truyền với nhiều thí nghiệm đã chứng minh rằng, bản thân vi khuẩn luôn luôn đột biến tạo thành nhiều chủng khác nhau, những chủng mới này không còn bị thuốc tác động, do đó chúng mang tính "nhòn" thuốc. Tính kháng thuốc là do đột biến gây nên và các đột biến này xảy ra không hề mang tính đáp ứng với thay đổi của môi trường, mà chúng xảy ra một cách ngẫu nhiên. Các nhà di truyền học phân tử đã phát hiện được nhân tố kháng thuốc và chúng có bản chất là ADN.

Một sự kiện đáng quan tâm là trong hệ gen người, tổ hợp cặp nucleotit bổ sung CG được quan sát thấy ít hơn (so với các cặp bazơ bổ sung khác), và người ta nhận thấy là cặp nucleotit CG là điểm nóng (hot spot) của sự methyl hóa, nghĩa là trong phân tử ADN, một số cytozin thường chịu sự biến đổi hóa học là gắn thêm nhóm methyl (bị methyl hóa). Các methyl-cytozin đến lượt nó lại gây nên biến đổi hóa học thứ hai là sự mất đi 1 nhóm hóa học là amin. Các methyl-cytozin bị mất amin sẽ biến thành thymin. Như vậy gốc cytozin (C) đã bị thay thế bằng gốc thymin (T) và loại đột biến này thường hay gặp và hình như chúng không được kiểm soát và không được sửa chữa, do đó cặp CG trong ADN là điểm nóng của methyl hóa, đồng thời cũng là điểm nóng của đột biến. Phải chăng tần số ít gặp cặp CG ở người là có định hướng ? Những người theo học thuyết tiến hóa trung lập cho rằng, đột biến này cũng là ngẫu nhiên mà thôi.

2.4. Đột biến là quá trình thuận nghịch

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

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

Khi đột biến thứ 2 làm khôi phục lại kiểu hình ban đầu đã bị mất đi do đột biến trước đó, thì quá trình đó được gọi là đột biến ngược (reverse mutation).

2.5. Hậu quả kiểu hình của đột biến gen

Đột biến gen gây nên nhiều thay đổi trong kiểu hình của cơ thể, từ mức độ phân tử có thể phát hiện bằng kỹ thuật sinh hoá tinh vi, cho đến mức độ cấu tạo hình thái hoặc gây chết cơ thể. Như vậy đột biến xảy ra trong ADN là nguyên liệu biến dị cho chọn lọc tự

hiện tác động trong quá trình tiến hóa. Một gen là một đoạn trình tự các cặp nucleotit của ADN mã hoá cho một polipeptit nào đó của cơ thể. Bất kỳ đột biến nào đó xảy ra trong một gen nào đó sẽ sản sinh ra alen mới của gen đó. Nếu gen chứa đột biến gây ra hậu quả bé và được phát hiện chỉ bằng kỹ thuật đặc biệt thì được gọi là đồng gen (isoalleles). Các đột biến khác được gọi là alen không (null alleles) khi alen mang đột biến hoàn toàn không hoạt động. Nếu gen mang các đột biến này hoạt động theo yêu cầu của sự phát triển cơ thể thì cá thể mang các đột biến này ở trạng thái đồng hợp sẽ không sống sót. Những đột biến như thế được gọi là đột biến lặn gây chết (recessive lethals).

Các đột biến có thể là trội (dominant) hoặc lặn (recessive). Đối với các cơ thể đơn bội như virus và vi khuẩn cả hai dạng đột biến trội và lặn đều có thể phát hiện được bởi hậu quả kiểu hình do chúng gây nên ở cơ thể. Còn đối với cơ thể lưỡng bội như cây lúa, ruồi quả hay con người thì chỉ có các đột biến lặn ở trạng thái đồng hợp mới thể hiện ra ở kiểu hình đột biến. Như vậy trong cơ thể lưỡng bội, các đột biến lặn sẽ không thể nhận biết được nếu cơ thể ở trạng thái dị hợp, vì chúng không gây nên sự thể hiện kiểu hình. Tuy nhiên các đột biến liên kết giới tính là ngoại lệ bởi vì chúng sẽ biểu hiện ra kiểu hình khi ở trạng thái bán hợp tử (hemizyote) trong các cá thể dị giao tử (ví dụ cá thể đực ở ruồi quả hoặc người; cá thể cái ở bướm hoặc chim). Những đột biến gây chết lặn liên kết với X sẽ làm thay đổi tỷ số giới tính ở thế hệ con, bởi vì các cá thể bán hợp tử mang gen đột biến lặn sẽ không sống sót.

2.6. Đa số các đột biến đều có hại và lặn

Kết luận đó của các nhà di truyền học khi nghiên cứu khảo sát trên hàng nghìn đột biến khác nhau, là căn cứ vào sự hiểu biết về sự kiểm tra di truyền sự trao đổi chất và với nhiều kỹ thuật phát hiện các đột biến. Sự trao đổi chất bao gồm trình tự các phản ứng hoá học, trong đó mỗi một giai đoạn được xúc tác bởi các enzym đặc trưng, được mã hoá bởi một hay nhiều gen. Đột biến trong các gen này sẽ dẫn tới ức chế một khâu nào đó trong quá trình trao đổi chất. Sự thay đổi trong trình tự các nucleotit của gen dẫn tới thay đổi trong trình tự các axit amin của polipeptit, do đó dẫn đến các sản phẩm không có hoạt tính chức năng. Đó là hậu quả thường thấy khi có đột biến gen.

Vì lẽ rằng mã di truyền là thoái hoá, nghĩa là một axit amin được mã hoá bởi nhiều codon, cho nên có nhiều đột biến gen không gây hậu quả kiểu hình cho cơ thể, do đó người ta gọi chúng là các đột biến trung tính (neutral mutation). Hơn nữa vai trò của các axit amin trong polipeptit không như nhau, ví dụ, các axit amin tạo nên trung tâm hoạt tính của enzym là rất quan trọng, do đó nếu đột biến xảy ra ở các codon mã hoá cho các axit amin đó sẽ gây hậu quả tác hại lớn hơn so với các axit amin khác.

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

Hemoglobin A chứa 2 mạch globin α và 2 mạch globin β . Mỗi mạch α gồm 141 axit amin, còn mỗi mạch β chứa 146 axit amin. Khi so sánh mạch β của hemoglobin A với mạch β của hemoglobin S, người ta thấy có sự sai khác thể hiện ở trình tự axit amin vị trí số 6 ở mạch β của hemoglobin A là axit glutamic đã bị thay thế bởi valin ở mạch β của hemoglobin S. Trong lúc đó, 2 mạch α ở cả 2 hemoglobin A và S hoàn toàn giống nhau.

Như vậy chỉ do sai lệch một axit amin trong hàng trăm axit amin đã dẫn đến sai lệch trong polipeptit, trong tế bào (hồng cầu hình lưới liềm) và cả cơ thể (bị bệnh thiếu máu). Sự thay thế axit glutamic trong hemoglobin A bằng valin trong hemoglobin S là do đột biến trong các codon mã hoá cho axit amin này, nghĩa là do sự thay thế nucleotit A bởi nucleotit T dẫn đến codon :

$\frac{GAG}{CTC}$ (mã hoá cho axit glutamic), đột biến thành codon $\frac{GTG}{CAC}$ (mã hoá cho valin).

Người ta đã phát hiện được hàng trăm dạng hemoglobin sai lệch do sự thay đổi trong mạch β và thường là do sự thay thế chỉ một axit amin, nghĩa là do đột biến trong một codon của gen mã hoá cho mạch β . Ví dụ về sai lệch hemoglobin ở người đã chứng minh rằng, đột biến gen là quá trình biến đổi trong cấu trúc của gen và thường là sự biến đổi một hoặc vài cặp nucleotit dẫn đến làm thay đổi trình tự của các axit amin trong polipeptit – Sự thay đổi trong cấu trúc protein đến lượt mình dẫn đến làm thay đổi kiểu hình của cơ thể và cơ thể đó được gọi là thể đột biến (mutant).

Đột biến gen có thể gây hậu quả ức chế một hay vài khâu trong quá trình trao đổi chất, do đó dẫn đến làm thay đổi kiểu hình, mà ở người thể hiện nhiều bệnh khác nhau, vì lẽ rằng đột biến một hay vài gen dẫn đến sự bất hoạt của gen, do đó không sản sinh ra enzym (hoặc sản sinh enzym không hoạt tính) dẫn đến ức chế các khâu của quá trình trao đổi chất, dẫn đến gây bệnh. Ví dụ bệnh phenylketon niệu (làm chậm phát triển trí não) là do có đột biến lặn trong các gen mã hoá cho các enzym có chức năng chuyển hoá phenylalanin $\rightarrow$ tyrosin.

2.7. Đột biến gây chết có điều kiện

Bệnh bạch tạng là do thiếu sắc tố melanin trong da, tóc, mắt gây nên do sai lệch trong các enzym có vai trò chuyển hoá tyrosin thành melanin. Bệnh bạch tạng là bệnh di truyền lặn theo nhiễm sắc thể thường, vì vậy nếu ở trạng thái dị hợp vẫn có màu da bình thường.

Đột biến gây chết có điều kiện là những đột biến gây chết cho cơ thể mang đột biến chỉ trong điều kiện giới hạn nào đó của môi trường, còn khi ở trong điều kiện khác (được gọi là điều kiện chấp nhận) sẽ tồn tại và phát triển. Nghiên cứu các đột biến gây chết có điều kiện cho phép các nhà di truyền học phát hiện và xác định được sự đột biến của gen cần nghiên cứu, vì hậu quả của đột biến sẽ thể hiện ở sự thiếu hẳn sản phẩm có hoạt tính của gen đó ở cá thể đơn bội. Đột biến mang đặc tính gây chết có thể tồn tại và phát triển trong các điều kiện chấp nhận, và các hiểu biết về chức năng của protein do gen đó mã hoá có thể xác định được khi chúng không thể hiện trong các đột biến có điều kiện giới hạn. Người ta đã sử dụng các đột biến có điều kiện để nghiên cứu làm sáng tỏ nhiều quá trình sinh học như quá trình phát triển cá thể, quá trình quang hợp v.v..., hoặc để thành lập bản đồ gen của cơ thể.

Ba thể đột biến gây chết có điều kiện được nghiên cứu nhiều nhất là :

- Thể đột biến trợ dưỡng (auxotrophic mutants).
- Thể đột biến cảm nhiệt (temperature-sensitive mutants).
- Thể đột biến cảm ức chế (suppressor-sensitive mutants).

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

2.8. Cơ sở phân tử của đột biến gen

- Như ta đã biết đột biến gen là đột biến xảy ra do có sự sai lệch trong ADN của gen. Sự sai lệch đó gây nên do sự thay thế nucleotit (được gọi là đột biến thay thế), hoặc do sự mất nucleotit (được gọi là đột biến mất), hoặc do sự thêm nucleotit (được gọi là đột biến thêm), hoặc do sự đảo thứ tự của nucleotit trong mạch ADN cấu tạo nên gen (hình 3.1).

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

Cơ chế của các đột biến thay thế có thể là :

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

+ Do sự dịch chuyển các nguyên tử hydro dẫn tới tạo thành các dạng tautomer của nucleotit và dẫn tới sự lắp ráp sai lệch các cặp khác với A-T và G-C.

+ Do sự thay đổi hoá học của các nucleotit : Người ta phát hiện được các nucleotit ở dạng thay đổi hoá học như 5-methylcytosin là do sự methyl hoá cytosin bởi enzym methylaza của tế bào. Vì 5-methyl cytosin khi bị khử amin đã chuyển hoá thành timin do đó dẫn tới sự bắt cặp sai : G-T.

Các đột biến mất hoặc đột biến thêm xảy ra là do sự mất đi hoặc thêm vào một hoặc vài nucleotit trong quá trình tái bản ADN. Các đột biến này thường làm thay đổi trình tự sắp xếp của nucleotit trong ADN, do đó làm sai lệch các codon, vì vậy còn được gọi là đột biến dịch khung (frameshift mutations). Các đột biến dịch khung thường gây nên các hậu quả thể hiện ở sự tổng hợp các protein không có hoạt tính. Ngoài ra người ta còn phân biệt dạng đột biến đảo là trường hợp thứ tự của một đoạn nào đó bị đảo một góc 180° , dẫn tới là sai lệch codon của gen.

Các dạng đột biến gen : đột biến chuyển, đột biến chuyển ngược, đột biến dịch khung hay đột biến đảo đều có nguyên nhân là sự sai lệch trong ADN của gen, là sự trục trặc trong bộ máy tái bản ADN, là sự kém hiệu quả của bộ máy sửa chữa ADN sửa chữa không hết các sai sót xảy ra trước và trong quá trình tái bản ADN, và cũng là do tác động của các tác nhân gây đột biến (mutagen) có trong môi trường sống như bức xạ tử ngoại, bức xạ ion hoá, nhiệt hoặc các chất hoá học gây đột biến v. v...

III - ĐỘT BIẾN TÁI TỔ HỢP

3.1. Khái niệm đột biến tái tổ hợp

Đột biến gen là cơ sở để tạo nên các alen mới từ các alen cũ, như ta đã phân tích là hiện tượng hiếm và xảy ra ngẫu nhiên. Nếu đột biến gen được gây nên do tác động của các nhân tố gây đột biến (hóa chất, vật lý...) thì lại thường là có hại cho cơ thể. Trái lại biến dị tổ hợp (còn được gọi là đột biến tái tổ hợp) là loại biến dị di truyền phổ biến nhất và là nguồn nguyên liệu chủ yếu của chọn lọc tự nhiên.

Đột biến tái tổ hợp là kết quả của sự sắp xếp lại trình tự của nucleotit trong gen do sự sắp xếp lại trình tự trong bản thân phân tử ADN, hoặc do sự trao đổi nucleotit giữa các phân tử ADN với nhau. Đột biến tái tổ hợp rất phổ biến trong sinh vật nhân chuẩn cũng như nhân sơ. Trong thế giới vi khuẩn, đột biến tái tổ hợp luôn được tạo thành thông qua hiện tượng biến nạp di truyền, tải nạp di truyền và tiếp hợp di truyền, do đó tạo nên sự đa dạng di truyền trong hệ gen của vi khuẩn.

Đối với cơ thể đa bào, tuyệt đại đa số đều sinh sản theo phương thức hữu tính. Phương thức sinh sản hữu tính thực chất là phương thức qua đó hệ gen của cá thể luôn được tái tổ hợp lại qua các thế hệ nhờ giảm phân và thụ tinh. Tế bào của chúng là lưỡng bội, nhiễm sắc thể tồn tại thành cặp tương đồng và gen có alen tương ứng. Qua mỗi lần sinh sản hữu tính thông qua giảm phân và thụ tinh, tất yếu phải xảy ra sự tái tổ hợp của các alen sẵn có qua mỗi thế hệ, và vì lẽ số lượng gen và số lượng nhiễm sắc thể của cơ thể là rất lớn nên tần số đột biến tái tổ hợp là rất lớn và chúng là cơ chế chủ yếu để tích lũy đa dạng di truyền trong quần thể, làm nguyên liệu chủ yếu cho chọn lọc tự nhiên.

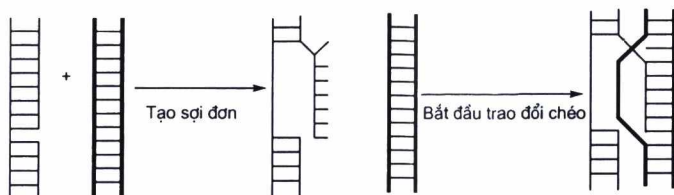
Đột biến tái tổ hợp có được là nhờ hai hiện tượng xảy ra qua phân bào giảm nhiễm : Sự hoán vị gen là sự trao đổi chéo gen giữa hai nhiễm sắc thể của cặp tương đồng và sự phân ly độc lập của các thành viên của cặp tương đồng về các giao tử. Hơn nữa khi thụ tinh, các giao tử kết hợp với nhau một cách tự do tạo nên hợp tử mang hệ gen tổ hợp. Nếu một cơ thể có số lượng gen x , số thể nhiễm sắc đơn bội là n thì đột biến tái tổ hợp qua mỗi thế hệ có thể xảy ra với tần số $2^x \times 2^n \times 2^n$. Vì vậy đột biến tái tổ hợp là nguyên liệu chủ yếu của chọn lọc tự nhiên cho quá trình tiến hoá.

Ở đây chúng ta xem xét đột biến tổ hợp ở mức độ phân tử, tức là ở mức độ ADN và gen ; còn tổ hợp ở mức độ tế bào, tức là ở mức độ hệ gen và nhiễm sắc thể chúng ta sẽ xem xét ở phần sau.

3.2. Mô hình phân tử của sự trao đổi chéo gen (hoán vị gen)

Năm 1964, Robin Halliday đề xuất mô hình trao đổi chéo giữa 2 nhiễm sắc tử không phải chị em của cặp tương đồng xảy ra ở tiền kỳ của giảm nhiễm lần I. Về sau các nhà di truyền học nghiên cứu trên nhiều đối tượng cơ thể đã đề xuất mô hình chung cho sự hoán vị gen như sau (hình 3.2) :

- Sự cắt đứt các sợi ADN tương đồng, trao đổi chéo các đoạn cắt và nối chúng vào sợi được trao đổi.
- Sự cắt, sửa chữa và khâu nối ADN tạo nên ADN tổ hợp.
- Sự tái tổ hợp có thể xảy ra ở bất kỳ vị trí nào dọc theo phân tử ADN.
- Sự trao đổi chéo xảy ra chính xác - không thừa không thiếu nucleotit, tức là không xảy ra đột biến gen.
- Sự cắt đứt, trao đổi chéo, sửa chữa và khâu nối ADN đều có sự tham gia của nhiều enzym và protein (endonucleaza, helicaza, ligaza, enzym sửa chữa, phức hệ protein RecA...).



Hình 3.2. Trao đổi chéo giữa 2 nhiễm sắc tử không phải chị em của cặp NST tương đồng dẫn đến tái tổ hợp gen.

Sự chuyển đổi gen (gene conversion) trong đó một đoạn nucleotit của mạch ADN tương đồng này chuyển sang cho mạch kia của cặp tương đồng (nghĩa là không có sự trao đổi chéo hai chiều giữa hai mạch của nhiễm sắc tử không phải chị em), có thể tạo nên hiện tượng không cân bằng về hai alen khác nhau khi phân ly về 4 giao tử. Ví dụ, tỷ lệ alen A : a ở các cặp nhiễm sắc tử tương đồng gốc là 2 : 2 (khi có trao đổi chéo hai chiều thì khi phân ly tạo 4 giao tử có 2 alen A và 2 alen a), nhưng do sự trao đổi chéo xảy ra một chiều nên sau khi tổ hợp và phân ly có thể được chuyển đổi với tỷ lệ 3 : 1 (3 alen A ở 3 giao tử và chỉ 1 alen a ở một giao tử), hoặc 1 : 3 (1 alen A ở một giao tử và 3 alen a ở ba giao tử). Sự chuyển đổi gen là kết quả của sự tái tổ hợp gen, trong đó tần số tái tổ hợp là 50%, nhưng chuyển đổi gen là hiện tượng độc lập, không phải luôn luôn xảy ra với tần số 50%.

Biến dị tổ hợp là nguồn biến dị di truyền phong phú, là nguyên liệu chủ yếu của chọn lọc tự nhiên tác động qua quá trình tiến hóa của cơ thể sống. Biến dị tổ hợp không chỉ được tạo ra bằng phương thức hoán vị gen qua giảm phân mà còn bằng nhiều phương thức khác nhau. Sự tổ hợp lại hệ gen có thể thông qua các hiện tượng như : *biến nạp di truyền* (genetic transformation), *tái nạp di truyền* (genetic transduction) và *tiếp hợp di truyền* (conjugation) qua đó các ADN trao đổi nucleotit cho nhau. Các gen nhảy chuyển dịch vị trí trong phân tử ADN, hoặc từ phân tử ADN này sang ADN khác cũng là phương thức xếp đặt lại hệ gen, tạo nên biến dị tổ hợp (xem phần trên).

3.3. ADN tái tổ hợp

3.3.1. Các enzym giới hạn (restrictaza)

Trong cơ thể sống, phân tử ADN có thể bị phân giải, bị cắt ra thành nhiều đoạn nucleotit bởi các enzym *nucleaza* gồm 2 loại : enzym *exonucleaza* cắt ADN ở các đầu tận cùng và enzym *endonucleaza* cắt ADN ở phần giữa. Năm 1970, Hamilton Smith và Daniel Nathan phát hiện được loại *endonucleaza* được đặt tên là *enzym giới hạn* (restriction endonuclease hay đơn giản là *restrictase*) ở vi khuẩn. (Hai ông được giải Nobel năm 1986). Các enzym *restrictaza* của vi khuẩn có khả năng cắt nhỏ ADN của thể thực khuẩn (virus ký sinh trong vi khuẩn) và làm cho chúng chết không thể nhân lên trong vi khuẩn được. Đó là phương thức miễn dịch chống virus của vi khuẩn. Các enzym giới hạn có đặc tính cắt phân tử ADN ở những vị trí nhất định trong phân tử ADN (tức là ở những trình tự nucleotit nhất định) thành nhiều đoạn cắt. Ngày nay, người ta đã tách chiết được khoảng 400 enzym giới hạn khác nhau. Đồng thời người ta cũng phát hiện thấy trong cơ thể có loại enzym được gọi

là *ligaza* có vai trò gắn, khâu nối các đoạn ADN lại với nhau. Ví dụ trong hiện tượng trao đổi chéo và hoán vị gen, các enzym endonucleaza cắt phân tử ADN thành đoạn, các đoạn trao đổi và được khâu nối bởi *ligaza* để tạo nên các ADN tổ hợp. Trong hiện tượng tự tái bản của ADN, các enzym endonucleaza và *ligaza* có vai trò cắt bỏ và khâu nối các nucleotit để sửa chữa các sai sót trong sự lắp ráp các nucleotit vào mạch ADN mới.

3.3.2. ADN tái tổ hợp

ADN tái tổ hợp (recombinant ADN) là sản phẩm của hiện tượng tái tổ hợp gen. Như vậy nhờ hoạt động của hệ enzym endonucleaza và *ligaza*, trong cơ thể sống các ADN tái tổ hợp (tạo nên biến dị tổ hợp) luôn được tạo ra (qua tiền kỳ giảm phân I, qua phân bào nguyên nhiễm, hay ngay trong bản thân nhiễm sắc thể của các tế bào soma, hay ngay trong nội bộ phân tử ADN).

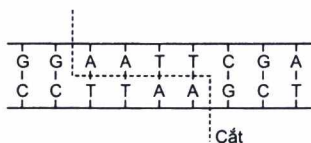
Các nhà di truyền học với hiểu biết về gen, về hiện tượng tái tổ hợp đã phát minh ra kỹ thuật ADN tái tổ hợp.

3.4. Kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Công nghệ di truyền

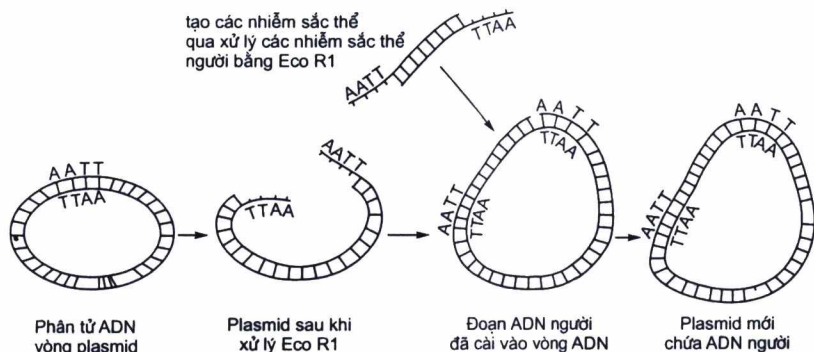
Đây là một công nghệ phát triển nhanh chóng nhờ đưa các gen tái tổ hợp vào các tế bào vi khuẩn (hoặc tế bào nấm men, thực vật, động vật) với mục tiêu sản xuất chế phẩm với số lượng lớn. Insulin và protein kháng virus interferon được sản xuất bằng cách này và đây là tiềm năng to lớn để tạo nên những chất khác có lợi cho con người kể cả kháng thể, hormone, chất kháng sinh, enzym, các yếu tố đông máu, là những chất thuốc được xem là trở nên vô giá trong việc điều trị bệnh.

Chẳng hạn cho đến nay chỉ có insulin là có hiệu lực để trị bệnh đái đường và trước đây insulin được tách chiết từ mô tụy của các động vật như lợn, bò. Đáng tiếc rằng insulin từ nguồn động vật là không giống với insulin của người cho nên nhiều người bị bệnh đái đường phát triển kháng thể chống lại sau một quá trình điều trị lâu dài và do đó cần có một số thuốc để ngăn chặn các phản ứng miễn dịch của người bệnh. Với insulin được chế tạo từ công nghệ gen vừa rẻ tiền và không phát sinh những vấn đề như thế.

Quá trình chuyển gen vào vi khuẩn là phức tạp nhưng những nguyên tắc chủ yếu của phương pháp có thể hiểu được từ hình 3.3. Đầu tiên phải cắt gắn các đoạn ADN để tạo nên ADN tái tổ hợp mong muốn. Các enzym giới hạn nhận biết và cắt những trình tự đặc biệt các nucleotit trong ADN. Hoạt động của enzym giới hạn đặc biệt được gọi là Eco - R1 được trình bày trong hình 3.3.A. Hoạt động này tạo nên vết cắt so le và sinh ra các trình tự bổ sung ở hai đầu đã tách rời của phân tử ADN. Khi dùng Eco - R1 để xử lý, các nhiễm sắc thể người có thể bị cắt ra thành nhiều đoạn ngắn, một số đoạn có thể chứa một gen đơn, gen mã hoá cho một protein người đặc biệt nào đó. Như thấy trên hình 3.3.B, những đoạn như thế có thể ghép vào các plasmid vi khuẩn và được chuyển vào tế bào vi khuẩn, ở đây chúng được tái bản như những đơn vị độc lập. Nuôi cấy các tế bào có gen ghép đã làm nhân bản lên nhiều lần các gen người được ghép. Vấn đề tối quan trọng trong công nghệ gen là phải nhận biết và tách ra được các gen để đưa chúng vào vi khuẩn để tạo được các sản phẩm có lợi.



A. Hoạt động của enzym giới hạn Eco R1



B. Nguyên tắc cài các gen nhiễm sắc thể vào plasmid vi khuẩn

Hình 3.3. Kỹ thuật di truyền

Thông qua mô hình hoạt động gen của Jacob và Monod, người ta biết rằng, sự biểu hiện gen ở vi khuẩn được điều khiển bởi hệ thống operon. Trong đó gen cấu trúc khi tạo mARN có thể được mở hay đóng bằng gen vận hành (promotor), gen vận hành lại được điều chỉnh bằng gen ức chế. Các đoạn ADN thu được do cắt thể nhiễm sắc, có thể bị thiếu các gen vận hành và gen ức chế tương ứng. Khi chỉ có đoạn promotor ghép vào plasmid của vi khuẩn, gen luôn luôn biểu hiện vì không có cơ chế để đóng nó lại và tế bào chủ luôn tổng hợp một số lượng lớn các protein mong muốn. Bằng kỹ thuật đó, người ta có thể tăng năng suất sản xuất một lượng lớn protein trong một thời gian nhất định.

Kỹ thuật ghép promotor còn được áp dụng khi sử dụng ADN mã hoá cho một protein nào đó bằng cách dùng các enzym sao chép ngược từ mARN tinh chế. Các trình tự mã hóa của đoạn ADN được tạo ra một cách chính xác giống như bản gen xuất phát, nhưng lại thiếu mất phần promotor để khởi động sự tổng hợp mARN. Có thể khắc phục được khó khăn này bằng cách gắn đoạn ADN mới tổng hợp vào với một gen vi khuẩn nguyên vẹn (có mang promotor) đã biết, và như thế cả 2 gen sẽ biểu hiện cùng nhau. Protein vi khuẩn và protein mong muốn sẽ dính vào nhau và người ta tách chúng ra bằng những phương pháp hoá học.

Người ta dùng kỹ thuật tương tự để chuyển gen vào các tế bào nhân chuẩn. Ví dụ, gen người, mã hóa cho hormone tăng trưởng, được cho liên kết với đoạn promotor của gen mã hóa cho protein chuột là metallothionein (đoạn promotor của gen metallothionein có đặc tính hoạt động rất mạnh khi có mặt kim loại nặng, ví dụ kẽm, hoặc hormone steroid), và đoạn ADN tái tổ hợp đó được ghép thành công vào ADN của hợp tử chuột mới thụ tinh. Protein tăng trưởng được sản sinh với lượng lớn khi tế bào được tiếp xúc với một lượng nhỏ kim loại kẽm. Phôi có gen ghép sẽ sản sinh nhiều hormone tăng trưởng và chuột sẽ lớn lên tới kích thước gấp 2 lần chuột bình thường. Hơn nữa, chuột có khả năng di truyền cho thế hệ sau khả năng đó như một bộ phận trong ADN của nó. Bằng công nghệ tạo ADN tái tổ hợp từ promotor của gen metallothionein và công nghệ chuyển gen, người ta đã tạo được giống cá hồi có khối lượng gấp hàng chục lần cá hồi bình thường. Bằng công nghệ chuyển gen, các nhà chọn giống đã tạo được giống lúa mới chứa đến 6 gen ngoại lai cho năng suất cao, có màu vàng nhạt hấp dẫn, giàu chất dinh dưỡng (giàu β -caroten và tăng hấp thụ sắt...).

Công nghệ chuyển gen và công nghệ phôi mở ra triển vọng áp dụng công nghệ tương tự để tạo ra các sản phẩm giống gia súc mới như bò, cừu hay gia cầm có tốc độ tăng trưởng nhanh. Tương lai người ta sẽ chuyển gen cố định nitơ vào các cây lương thực và sẽ không phải tốn kém để bón phân nữa.

Khi đã hiểu rõ được bản chất, cấu trúc và chức năng của gen, hiểu rõ vai trò của các enzym restrictaza, ligaza, các nhà kỹ thuật di truyền đã tinh chế được chúng và từ đó chế tạo được các ADN tái tổ hợp bằng những nguyên liệu ADN từ các cơ thể khác nhau, chọn dòng chúng và sử dụng chúng trong công nghệ gen với mục đích không chỉ để nghiên cứu khoa học mà chủ yếu để sản xuất các chế phẩm sinh học, được học phục vụ cho lợi ích sản xuất và sức khỏe của xã hội. Như ta đã biết năm 1983, sản phẩm đầu tiên của kỹ thuật ADN tái tổ hợp là insulin và sản phẩm thứ hai là hormone sinh trưởng người HGH (năm 1985). Em Kathy, người Mỹ bị bệnh lùn lúc 10 tuổi, sau nhiều năm được tiêm HGH do công nghệ gen sản xuất đã lớn lên bình thường như những em bé bình thường khác. Ngày nay với kỹ thuật di truyền, các nhà khoa học dễ dàng tạo nên các ADN tái tổ hợp *in vitro* từ các nguồn ADN của virus, vi khuẩn, thực vật, động vật kể cả con người với những trình tự biết trước, chọn dòng nhân bản chúng để sử dụng trong công nghệ gen, công nghệ tế bào.

IV - BIẾN DỊ DI TRUYỀN TRONG QUẦN THỂ

4.1. Vốn gen của quần thể

Quần thể (population) là đơn vị sinh học bé nhất chịu tác động của tiến hóa. Nghiên cứu quá trình và phương thức di truyền ở mức độ quần thể là đối tượng của di truyền học quần thể (population genetics). Khái niệm chủ yếu của di truyền quần thể là *vốn gen* (gene pool), là tập hợp tất cả các gen-alen (kiểu gen) của tất cả các cá thể trong quần thể. Vốn gen của quần thể là nguồn dự trữ cho sự rút thăm (tái tổ hợp) kiểu gen của các thế hệ cá thể tương lai của quần thể. Nguồn gốc biến dị di truyền trong vốn gen của quần thể là đột biến và biến dị tổ hợp.

Đột biến ở mức độ ADN và nhiễm sắc thể đều có thể dẫn đến tạo những alen mới trong vốn gen và chúng có thể được chọn lọc bởi môi trường và phổ biến trong quần thể. Đối với

các cơ thể có vòng đời ngắn như vi khuẩn, thì đột biến tuy là nguồn biến dị di truyền duy nhất nhưng chúng nhanh chóng được phổ biến trong quần thể.

Đối với các cơ thể sinh sản hữu tính như thực vật và động vật, thì biến dị tổ hợp được tạo nên qua quá trình phân bào giảm nhiễm và thụ tinh, sẽ dẫn đến sự hình thành nhiều tổ hợp di truyền đa dạng và phong phú trong quần thể.

Đột biến và biến dị tổ hợp là những quá trình xảy ra ngẫu nhiên và xác suất không mang tính chọn lọc và thích nghi, nhưng nhân tố môi trường đã chọn lọc chúng và phổ biến chúng trong quần thể.

4.2. Phân tích vốn gen. Công thức Hardy-Weinberg

- Năm 1908 nhà toán học Anh là Hardy và bác sĩ người Đức là Weinberg khi phân tích vốn gen của quần thể qua các thế hệ đã đề ra quy luật cho rằng trong điều kiện xác định, đối với một quần thể đủ lớn có giao phối ngẫu nhiên, tần số gen-alen (tần số kiểu gen) không đổi qua các thế hệ. Quy luật đó được biểu diễn bởi công thức :

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

trong đó : p là tần số của gen và q là tần số của alen tương ứng.

Ví dụ, trong quần thể có gen A (trội) và alen a (lặn) thì kiểu gen của quần thể sẽ là AA, Aa, Aa và aa.

Tần số của gen A là p và tần số kiểu gen AA là $p \times p = p^2$.

Tần số của alen a là q và tần số kiểu gen aa là $q \times q = q^2$.

Tần số kiểu gen Aa + aA = $2pq$.

Trong quần thể, mỗi cá thể chỉ mang một cặp alen vì vậy $p + q = 1$ và tần số kiểu gen $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$

Ví dụ, trong một quần thể cây hoa, alen A quy định màu hoa đỏ (trội), và alen a (lặn) quy định màu hoa trắng. Tần số alen A là $p = 80\%$ hay là 0,8 ; như vậy tần số alen a là $q = 0,2$. Tần số kiểu gen AA là $p^2 = 0,8 \times 0,8 = 0,64$, tần số kiểu gen aa là $q^2 = 0,2 \times 0,2 = 0,04$ và tần số kiểu gen Aa sẽ là $2pq = 2 \times 0,8 \times 0,04 = 0,32$. Như vậy vốn gen của quần thể có tần số là $0,64 + 0,32 + 0,04 = 1$.

- Công thức Hardy-Weinberg thể hiện trạng thái cân bằng của quần thể. Trạng thái cân bằng của quần thể chỉ đạt được trong điều kiện xác định như sau :

+ Không có tác động của đột biến, của phiêu bạt gen, của dòng gen.

+ Không có tác động của chọn lọc tự nhiên.

+ Có sự giao phối ngẫu nhiên, nghĩa là các kiểu gen có cùng độ thụ tinh và sức sống như nhau.

Đối với quần thể người có thể áp dụng công thức Hardy-Weinberg để tính số phần trăm người mang gen quy định bệnh di truyền. Ví dụ, bệnh Phenylketon niệu (Phenylketonuria) là bệnh di truyền thể hiện ở chỗ cơ thể không phân giải được phenylalanin, do đó làm cho bệnh nhân bị kém phát triển về trí tuệ. Theo thống kê ở Mỹ có 1/10000 ca em bé sinh ra bị bệnh. Bệnh do alen lặn quy định và như vậy tần số các cá thể mang bệnh là $q^2 = 0,0001$ và tần số của

alen lặn sẽ là q = căn bậc hai của $0,0001 = 0,01$, và tần số của alen trội là $p = 1 - q = 1 - 0,01 = 0,99$. Ta hãy tính tần số các cá thể dị hợp mang alen bệnh. Tần số kiểu gen dị hợp là $2pq = 2 \times 0,99 \times 0,01 = 0,0198$. Như vậy có khoảng 2% dân Mỹ có mang alen gây bệnh phenylketon niệu. Những người dị hợp mang alen bệnh không thể hiện bệnh nhưng có thể di truyền gen bệnh cho con cháu.

Thống kê và đánh giá được tần số các alen gây bệnh di truyền nguy hiểm trong quần thể cho phép đề ra các dự án dự phòng và bảo vệ sức khỏe cộng đồng một cách hữu hiệu.

4.3. Tiến hóa vi mô (Microevolution)

Học thuyết tiến hóa hiện đại phân biệt hai quá trình tiến hóa là tiến hóa vi mô và tiến hóa vĩ mô.

Tiến hóa vi mô (còn gọi là tiến hóa nhỏ) là quá trình tiến hóa diễn ra trong đơn vị sinh học bé nhất là quần thể, và như vậy có thể xác định tiến hóa vi mô là sự biến đổi tần số kiểu gen trong quần thể, từ đó dẫn đến hình thành loài mới. Tiến hóa vĩ mô là quá trình tiến hóa hình thành các bậc phân loại trên loài.

Một quần thể không tiến hóa là quần thể trong đó vẫn giữ cân bằng Hardy-Weinberg, nghĩa là vốn gen luôn giữ ổn định qua các thế hệ. Như vậy muốn có tiến hóa phải có sự biến đổi trong vốn gen của quần thể. Trong tự nhiên ít khi quần thể giữ được cân bằng di truyền, bởi vì quần thể luôn bị tác động của nhiều nhân tố gây nên sự biến đổi vốn gen của quần thể dẫn đến quá trình tiến hóa nhỏ. Thường có 4 nguyên nhân gây nên tiến hóa nhỏ :

- Biến dị di truyền : Biến dị di truyền dẫn đến làm thay đổi vốn gen của quần thể, làm tăng hoặc làm giảm tần số alen nào đấy, hoặc làm xuất hiện những alen mới. Những biến dị này có được di truyền và phổ biến qua các thế hệ hay không là còn tùy thuộc vào nhân tố chọn lọc tự nhiên và thông qua sinh sản.

- Hiện tượng phiêu bạt gen (genetic drift) : Hiện tượng phiêu bạt gen thường xảy ra trong quần thể nhỏ với số lượng cá thể ít và dẫn tới mất cân bằng Hardy-Weinberg, cũng vì vậy mà để có cân bằng thì quần thể phải đủ lớn.

Các cá thể trong thế hệ sau được truyền thụ kiểu gen từ thế hệ trước với tần số gen-alen một cách ngẫu nhiên và theo quy luật xác suất, nghĩa là để có được tần số của thế hệ sau càng giống thế hệ trước thì quần thể phải càng lớn. Quần thể càng bé thì độ sai lệch về tần số càng lớn và dẫn đến mất cân bằng trong vốn gen. Ví dụ, trong một quần thể cây hoa đỏ, hoa trắng chỉ có tất cả 10 cây với vốn gen có tần số alen A (đỏ) là $p = 0,7$ và tần số alen a (trắng) là $q = 0,3$, trong đó chỉ có 5 cây sinh sản và cho ra thế hệ sau 10 cây với tần số $p = 0,5$ và $q = 0,5$, đến thế hệ thứ 3 thì chỉ có 2 cây sinh sản và cho ra 10 cây với tần số $p = 1$ và $q = 0$. Như vậy alen a đã bị loại ra khỏi quần thể.

Cơ chế tiến hóa do sự biến đổi vốn gen trong quần thể bé tuân theo quy luật xác suất (may mắn) được gọi là phiêu bạt gen. Phiêu bạt gen có thể làm giảm độ biến dị của quần thể dẫn đến sự bảo tồn các dạng thích nghi hẹp. Phiêu bạt gen cũng có thể tác động sáng tạo dẫn đến tạo nên tiến hóa phân ly hình thành các quần thể mới, ví dụ ở các đảo, các hồ cô lập v.v...

- Dòng gen (gene flow) : Để duy trì được cân bằng Hardy-Weinberg đòi hỏi quần thể phải có vốn gen cô lập với các quần thể khác. Trong tự nhiên các quần thể không hoàn toàn

cô lập mà luôn luôn có sự trao đổi gen giữa các quần thể (dòng gen) thông qua sự di cư, hoặc nhập cư của các cá thể, hoặc giao tử hữu thụ từ một quần thể này sang một quần thể khác. Sự di cư hoặc nhập cư dẫn tới làm thay đổi vốn gen của quần thể. Ví dụ, với quần thể hoa đỏ, hoa trắng đã dần, nếu có trận gió mạnh thổi mang theo toàn phần hoa trắng vào vườn cây hoa bên cạnh sẽ dẫn tới làm tăng tần số gen a trong quần thể cây hoa của vườn.

Đối với quần thể người trong thời hiện đại, sự di cư, nhập cư diễn ra trên tất cả quốc gia và dòng gen là nhân tố quan trọng trong sự tiến hóa vi mô của các quần thể người trước đây sống biệt lập.

- Chọn lọc tự nhiên :

Phiêu bạt gen, dòng gen và đột biến đều là nguyên nhân của tiến hóa vi mô, nhưng tác động của chúng không nhất thiết dẫn đến thích nghi với môi trường nếu như những biến đổi đó không được chọn lọc và di truyền cho các thế hệ sau. Chỉ có chọn lọc tự nhiên mới tạo nên tiến hóa thích nghi. Như vậy đặc tính thích nghi của sinh vật không mang tính mục đích luận mà tiến hóa thích nghi là sự phối hợp giữa cái ngẫu nhiên là biến dị trong vốn gen với cái tất yếu là chọn lọc tự nhiên, tức là sự sống còn của các cá thể sinh sản hiệu quả nhất (cho nhiều con cháu hữu thụ ở các thế hệ sau). Quan niệm "đấu tranh sinh tồn" và "tồn tại của cá thể thích nghi nhất" của Darwin về chọn lọc tự nhiên phải hiểu là sự đóng góp của một cá thể này vào vốn gen của thế hệ tương lai nhiều hơn so với các cá thể khác. Nếu chỉ có thích nghi với môi trường mà không để lại con cháu hữu thụ cho thế hệ tương lai thì cũng không thể có tiến hóa. Như vậy sinh sản ra nhiều con cháu hữu thụ là vấn đề cốt lõi của chọn lọc tự nhiên. Chọn lọc tự nhiên thường thể hiện tác động theo 3 phương thức : chọn lọc định hướng, chọn lọc phân ly và chọn lọc ổn định.

Để thấy rõ được vai trò của chọn lọc tự nhiên, ta hãy xem xét 3 trường hợp sau đây trong di truyền quần thể người :

+ Di truyền bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm : Trong quần thể người Mỹ gốc da đen châu Phi có đến 1/500 người bị bệnh. Bệnh do alen lặn gây nên, như vậy chỉ có những người đồng hợp về alen lặn mới thể hiện bệnh. Có khoảng 1 trường hợp trong 11 người Mỹ da đen mang alen bệnh ở trạng thái dị hợp, tuy họ không thể hiện bệnh nhưng họ có thể truyền alen bệnh cho con cháu. Một vấn đề đặt ra là, tại sao alen bệnh lại rất phổ biến trong quần thể người Mỹ gốc châu Phi so với quần thể người Mỹ nói chung ? Các nhà di truyền học tiến hóa giải thích rằng, ở châu Phi nhiệt đới, alen bệnh là alen đột biến (do sự đột biến trong codon của axit glutamic biến thành codon của valin trong gen mã hóa cho mạch beta của hemoglobin), vừa có hại và vừa có lợi. Nếu ở trạng thái đồng hợp chúng sẽ gây nên bệnh, nhưng những người mang alen ở trạng thái dị hợp có khả năng chống chịu bệnh sốt rét là bệnh rất phổ biến ở các vùng nhiệt đới. Nghiên cứu sự phân bố của alen bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm trên thế giới cho thấy, tần số của chúng tăng cao trùng hợp với vùng phân bố tăng cao của bệnh sốt rét. Trong các quần thể người ở vùng nhiệt đới, alen lặn đơn thường gặp với tần số từ 0,2 đến 20%, như vậy tần số alen đồng hợp lặn sẽ là $q^2 = 0,2 \times 0,2 = 0,04$, tức là có 4% dân số bị bệnh hồng cầu hình liềm và tử vong, và tần số người dị hợp

$2pq = 2 \times 0,8 \times 0,2 = 0,32$, có nghĩa là trong dân số có đến 32% mang gen dị hợp không thể hiện bệnh nhưng có khả năng chống chịu bệnh sốt rét. Những người không mang gen bệnh, tuy không bị bệnh thiếu máu nhưng dễ dàng bị muỗi sốt rét tấn công và bị bệnh sốt rét. Như vậy alen lặn tuy có hại nhưng đã được chọn lọc và phổ biến trong quần thể.

+ Bệnh tim mạch : Bệnh tim mạch là bệnh rất nguy hiểm và rất phổ biến hiện nay. Những nghiên cứu về di truyền tiến hóa cho thấy rằng, bệnh do chế độ dinh dưỡng kết hợp với cơ cấu di truyền do con người thừa hưởng từ tổ tiên xa xưa của mình. Bệnh thể hiện nhiều nhất ở những nước phát triển cao như Mỹ, châu Âu với chế độ dinh dưỡng giống với cư dân của các bộ lạc người tiền sử (dinh dưỡng chủ yếu bằng thịt thú rừng béo nên cơ thể tích nhiều mỡ). Quá trình chọn lọc tự nhiên trong thời kỳ đói rét đã chọn lọc những cá thể thích nghi tích nhiều mỡ được sống sót và tồn tại, vì vậy tập tính đó được di truyền lại cho đến ngày nay (tất cả chúng ta hầu như ai cũng thích ăn chất béo bổ), và khi có điều kiện môi trường dinh dưỡng quá nhiều chất béo bổ, thì dễ phát sinh bệnh tim mạch.

+ Tính kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh : Nền Y học hiện đại sử dụng chất kháng sinh làm thuốc để điều trị các bệnh nhiễm trùng là một kỳ tích trong sự nghiệp bảo vệ sức khỏe con người. Nhưng chúng ta cũng đang đứng trước một vấn đề nan giải là, trong quá trình sử dụng thuốc đã làm xuất hiện những vi khuẩn kháng thuốc trong quần thể. Tính kháng thuốc được xuất hiện do chọn lọc tự nhiên cũng giống như tính kháng thuốc trừ sâu xuất hiện ở bọ sâu bọ có hại, là do có sự chọn lọc các cá thể đột biến trong quần thể.

Vi khuẩn đột biến (thường xuyên xuất hiện với tần số rất cao) chống chịu được với tác động của thuốc. Các cá thể đột biến có khả năng tiết ra các enzyme có tác động phân hủy thuốc, hoặc sử dụng thuốc như là nguồn dinh dưỡng. Tính kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh cũng như của sâu bọ gây hại mùa màng đang đặt ra những vấn đề cấp bách cho y tế công cộng cũng như công tác bảo vệ thực vật.

Chương 4

TẾ BÀO - ĐƠN VỊ TỔ CHỨC CƠ BẢN CỦA CƠ THỂ SỐNG

I - TẾ BÀO NHÂN SƠ VÀ TẾ BÀO NHÂN CHUẨN

1.1. Học thuyết tế bào

Tất cả các cơ thể sống, từ con vi khuẩn cho đến con người đều được cấu tạo từ những đơn vị cơ bản rất bé (phải xem qua kính hiển vi mới nhìn thấy), được gọi là *tế bào*.

Tế bào được phát hiện đầu tiên bởi R.Hooke từ 1665 khi ông quan sát cấu trúc bên của thực vật với kính hiển vi có độ phóng đại gấp 30 lần. Tổng kết thành tựu của nhiều nhà nghiên cứu qua thế kỷ XVII và XVIII trên vi sinh vật, thực vật, động vật và cả con người, hai nhà khoa học M.Shleiden và T.Shwann từ năm 1838 - 1839 đã đề ra *học thuyết tế bào*, chứng minh rằng tất cả các cơ thể vi sinh vật, thực vật và động vật đều có cấu tạo tế bào. Điều đó chứng minh rằng, thế giới sống tuy đa dạng nhưng thống nhất. Vì vậy mà F.Engel (1870) đã đánh giá học thuyết tế bào là một trong ba phát kiến vĩ đại của khoa học tự nhiên thế kỷ XIX (cùng với học thuyết tiến hoá và học thuyết bảo tồn vật chất và năng lượng).

Ngày nay dưới ánh sáng của sinh học phân tử, các nhà sinh học quan niệm rằng, tế bào là đơn vị tổ chức cơ bản của sự sống cả về cấu trúc, chức năng và di truyền, có nghĩa là sự sống chỉ thể hiện trong tổ chức tế bào và trong các cấp độ có cấu tạo gồm tế bào.

Những cơ thể đơn bào như con vi khuẩn, con amip hay con trùng lông *Paramecium* thì cơ thể của chúng chỉ gồm một tế bào nhưng chúng có đầy đủ đặc tính của cơ thể sống giống như con chuột gồm hàng tỷ tế bào. Có thể nói tất cả các hoạt động sống của cơ thể như trao đổi chất, trao đổi năng lượng, dinh dưỡng, tiêu hoá, bài tiết, phản ứng thích nghi với môi trường sinh trưởng, sinh sản, di truyền, tự điều chỉnh v.v... đều có cơ sở tế bào.

Sự già, bệnh tật và chết của tế bào ở mức độ nhất định dẫn tới sự già, bệnh tật, tử vong của cơ thể.

Vì vậy nghiên cứu về cấu trúc và chức năng của tế bào có tầm quan trọng quyết định trong sự nghiên cứu sinh học cơ thể.

Để nghiên cứu tế bào, người ta phải đo kích thước, khối lượng của tế bào cũng như các cấu thành của chúng.

Để đo kích thước tế bào người ta thường dùng đơn vị là *micromet* (μm). Một micromet bằng một phần nghìn milimet (mm). Tế bào người thường có kích thước từ 10-100 μm , vì vậy mắt thường ta không thể thấy được.

Để đo kích thước của các bào quan, người ta sử dụng đơn vị đo là *nanomet* (nm). Một nanomet bằng một phần nghìn micromet. Các bào quan thường có kích thước từ hàng chục đến hàng trăm nm. Phân tử glucosơ hoặc phân tử axit amin có kích thước vài nm, còn phân tử protein thường có kích thước từ 10nm trở lên.

Tế bào là một hệ mở luôn luôn trao đổi chất với môi trường xung quanh, vì vậy để đảm bảo cho sự trao đổi chất có hiệu quả thì phải có sự cân bằng giữa khối lượng tế bào và diện tích màng sinh chất bao quanh tế bào. Tế bào có kích thước bé là để tăng cường diện tích cần thiết cho sự trao đổi chất với môi trường.

1.2. Các dạng tồn tại của tế bào

Tế bào tồn tại trong tổ chức cơ thể sinh vật. Người ta phân biệt 2 dạng cơ thể sinh vật : *sinh vật nhân sơ* (Procarvota) và *sinh vật nhân chuẩn* (Eucaryota).

Tất cả vi khuẩn (*Bacteria*) và vi khuẩn lam (*Cyanobacteria*) đều thuộc dạng tế bào nhân sơ (được xếp vào giới Monera).

Cơ thể người cũng giống như cơ thể động vật (giới Animalia), thực vật (giới Plantae), nấm (giới Fungi) và nguyên sinh vật (giới Protista) đều được cấu tạo từ các *tế bào nhân chuẩn*, là dạng tế bào có mức độ tiến hoá cao và có cấu tạo phức tạp hơn so với dạng *tế bào nhân sơ*.

Cơ thể đơn bào, ví dụ vi khuẩn, động vật đơn bào (amip, trùng lông...), tảo đơn bào, nấm men đơn bào, là những cơ thể có cấu tạo chỉ gồm một tế bào nhưng chúng thực hiện đầy đủ chức năng sống.

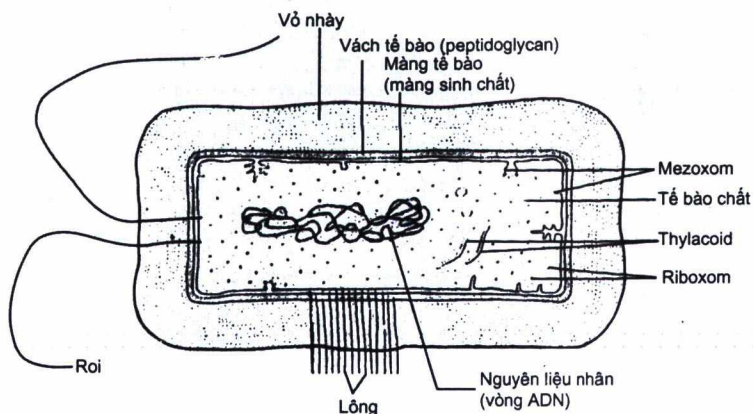
Cơ thể đa bào, ví dụ tảo *Chlorella*, nấm mũ, thực vật, động vật, là những cơ thể có cấu tạo gồm rất nhiều tế bào biệt hóa khác nhau, tập hợp thành các mô và cơ quan khác nhau về cấu tạo và chức năng.

Nếu chúng ta quan sát dưới kính hiển vi bất kỳ mô nào, cơ quan nào của cơ thể người thì chúng ta sẽ thấy đều gồm nhiều tế bào và các sản phẩm của tế bào. Các tế bào rất đa dạng về độ lớn, chủng loại, hình thái và chức năng. Theo tài liệu hiện nay, cơ thể người chứa đến 6.10^{13} tế bào gồm trên 200 chủng loại khác nhau về cấu trúc và chức năng. Riêng não bộ đã chứa trên 25 tỷ nơron (nếu kể cả tế bào thần kinh đệm sẽ đạt tới 100 tỷ). Trong 1ml máu có đến 4-5 triệu hồng cầu. Riêng số lượng hồng cầu trong máu đã đạt tới 23 nghìn tỷ, nếu đem xếp chúng thành hàng dọc (đường kính hồng cầu = $7\mu\text{m}$) sẽ tạo thành chiều dài cuộn quanh xích đạo trái đất 4 lần.

Để phân biệt tế bào Procarvota với tế bào Eucaryota, có thể xem bảng tổng kết 4.1 (và các hình 4.1, 4.2 A và B) sau đây.

Bảng 4.1. So sánh đặc tính của Procaryota và Eucaryota

Tế bào Procaryota	Tế bào Eucaryota
Vi khuẩn, vi khuẩn lam - Kích thước bé (1-3μm). - Có cấu tạo đơn giản. - Vật chất di truyền là phân tử ADN trần dạng vòng nằm phân tán trong tế bào chất. - Chưa có nhân. Nucleoid là phần tế bào chất chứa ADN. - Tế bào chất chỉ chứa các bào quan đơn giản như : riboxom, mezoxom. - Có lông, roi cấu tạo đơn giản. - Phương thức phân bào đơn giản bằng cách phân đôi.	Nguyên sinh, nấm, thực vật, động vật. - Kích thước lớn (3-20μm). - Có cấu tạo phức tạp. - Vật chất di truyền là ADN + histon tạo nên nhiễm sắc thể khu trú trong nhân. - Có nhân với màng nhân chứa chất nhiễm sắc và hạch nhân. - Tế bào chất được phân vùng và chứa các bào quan phức tạp như : mạng lưới nội chất, riboxom, ty thể, lục lạp, thể Golgi, lizoxom, perôxixom, trung thể... - Có lông roi cấu tạo theo kiểu 9+2. - Phương thức phân bào phức tạp với bộ máy phân bào.

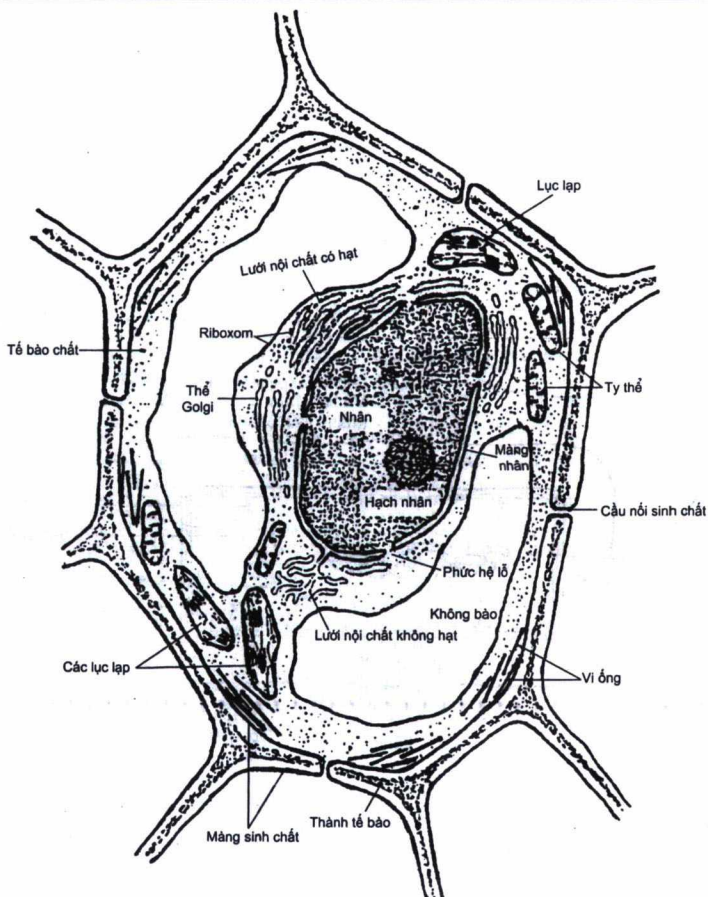


Hình 4.1. Cấu tạo của tế bào vi khuẩn điển hình

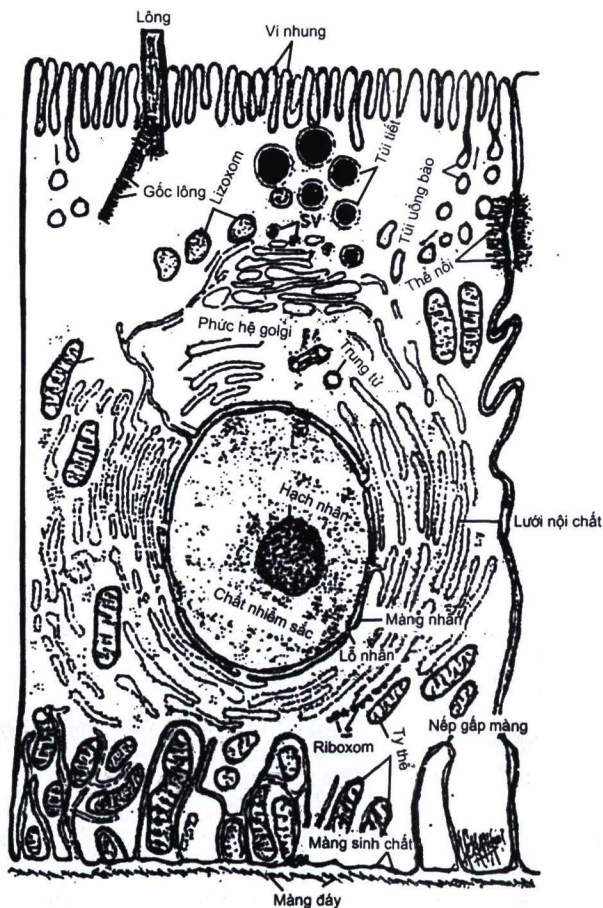
Tế bào thực vật được phân biệt với tế bào động vật ở các điểm cơ bản sau đây : (xem bảng 4.2 và hình 4.2 A và B).

Bảng 4.2. So sánh tế bào thực vật và tế bào động vật

Tế bào thực vật	Tế bào động vật
- Có vỏ xenlulozo bao ngoài màng sinh chất. - Có lục lạp - tự dưỡng. - Chất dự trữ là tinh bột. - Phân bào không có sao và phân tế bào chất bằng vách ngang ở trung tâm - Hệ không bào phát triển.	- Không có vỏ xenlulozo. - Không có lục lạp, dị dưỡng. - Chất dự trữ là glycogen. - Phân bào có xuất hiện sao và phân tế bào chất bằng eo thắt ở trung tâm. - Ít khi có không bào.



Hình 4.2A. Tế bào thực vật



Hình 4.2B. Tế bào động vật điển hình

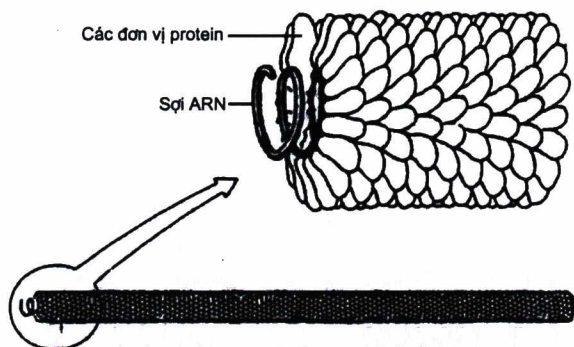
II - VIRUT- DẠNG SỐNG KHÔNG CÓ CẤU TẠO TẾ BÀO

2.1. Cấu tạo của virut

Virut là một dạng sống đặc biệt, chúng không tồn tại ở dạng tự nhiên mà là dạng ký sinh bắt buộc trong các cơ thể khác. Virut tự nó không phải là tiền thân của các sinh vật đầu tiên, bởi vì chúng phụ thuộc hoàn toàn vào tế bào sống để sinh sản. Virut xuất hiện có nguồn gốc từ các đoạn nhỏ của ARN và ADN, mà các phân tử này được nhân lên một cách đặc biệt từ vòng nhiễm sắc thể bên trong nhiều vi khuẩn. Những đoạn đó được một vỏ protein bảo vệ và có thể truyền từ tế bào này sang tế bào khác.

Các bệnh lây nhiễm ở người như đậu mùa, thủy đậu, sởi, bại liệt, quai bị, cúm, cảm lạnh, sốt vàng, viêm gan, đại và AIDS... đều do virus gây nên. Một số virus có liên quan như những yếu tố tham gia vào các bệnh ung thư, tự miễn dịch, xơ cứng. Những virus khác ký sinh trong tế bào thực vật và động vật gây bệnh nguy hiểm cho nhiều loại cây trồng và vật nuôi quan trọng. Ví dụ như virus TMV bệnh khảm thuốc lá, virus H5N1 gây bệnh cúm gà.

Cấu tạo của virus TMV được minh họa ở hình 4.3. Phần tử virus này được cấu tạo gồm một cuộn hình xoắn ARN được bao quanh bởi một vỏ protein hay là vỏ capsit. Vỏ capsit được cấu tạo gồm 2200 phân tử protein giống nhau (được gọi là capsomer) lắp ghép với nhau để tạo thành một cột hình trụ với một ống bên trong chứa phân tử ARN. Cấu tạo đều đặn đó cho phép TVM kết tinh và giữ hình dạng đó qua nhiều năm mà không bị mất đi tính chất gây bệnh. Một kiểu cấu tạo khác quan sát thấy ở adenovirus là nhóm gồm một số virus gây nên bệnh cảm lạnh cho người. Virus có cấu tạo khối cầu gồm 20 mặt tam giác, mỗi mặt được tạo nên từ các tiểu đơn vị protein lắp lại. Khoảng trống bên trong chứa đầy ADN, là vật liệu di truyền của virus.



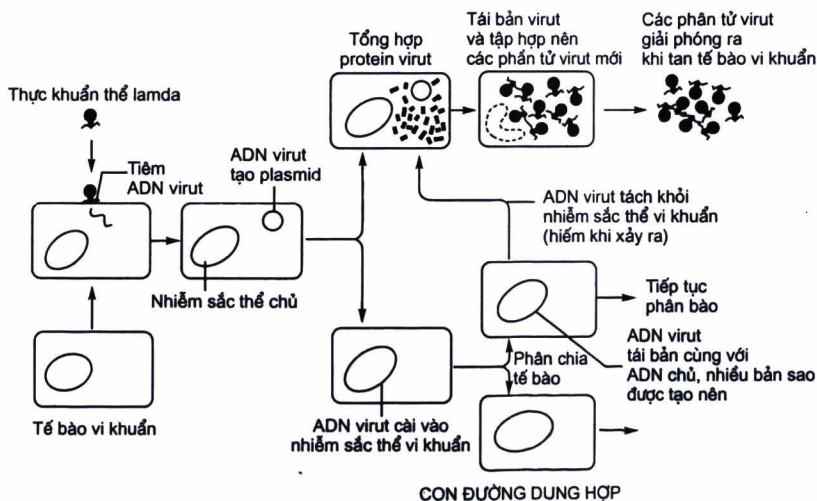
Hình 4.3. Virus khảm thuốc lá

Virus có cấu tạo phức tạp là virus ký sinh trong tế bào vi khuẩn được gọi là *thể thực khuẩn* (*Bacteriophage*). Vỏ capsit của thể thực khuẩn *Lamda* ký sinh ở *E.coli* được cấu tạo từ năm kiểu protein khác nhau. Khi *Lamda* tiếp xúc với một vi khuẩn thì nó gắn vào màng vi khuẩn và ADN của nó được bơm vào tế bào chất và hai hậu quả có thể xảy ra như được mô tả trong hình 4.4 : Theo kiểu phân giải, trong tế bào vi khuẩn, ADN của virus được nhân bản nhiều lần dẫn tới tạo thành các tiểu phần virus mới và nó sẽ được thoát ra khi tế bào chủ bị phân giải và vỡ ra ; theo kiểu dung hợp thì ADN của virus sẽ hoà nhập vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn và được nhân bản cùng với nhiễm sắc thể và các bản sao ADN virus sẽ tồn tại trong mọi tế bào con cháu vi khuẩn. Đôi khi ADN virus được thoát ra và gây nên trạng thái phân giải vi khuẩn. Cần nhấn mạnh rằng, trong tế bào vi khuẩn, ADN *Lamda* có khả năng tạo nên những vòng đóng kín nhỏ, được gọi là *plasmid*.

Virus sao chép ngược (Retrovirus) có ARN là nguyên liệu di truyền, nhưng khác với ARN virus khác bởi chúng có enzyme sao chép ngược (revertaza) để chuyển ARN thành ADN. Khi được nhiễm vào tế bào chủ, enzyme sao chép ngược được giải phóng và tổng hợp

ADN từ khuôn mẫu ARN virus. Theo cách này thì gen virus được biến đổi từ dạng ARN thành dạng ADN và được gắn nhập với ADN của tế bào chủ và sẽ được nhân bản cùng với ADN của tế bào chủ. Khác với ADN được hoà nhập từ virus ADN, ADN có nguồn gốc từ virus sao chép ngược có thể trở nên hoạt tính mà không cần giết chết tế bào chủ. Nguyên nhân của điều đó phức tạp nhưng kết quả là những virus mới có thể tiếp tục được tạo nên trong những tế bào chưa kịp chết.

CON ĐƯỜNG PHÂN GIẢI



Hình 4.4. Vòng đời của Bacteriophage lambda

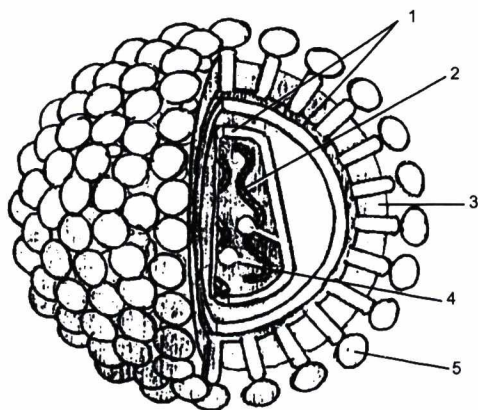
2.2. Virus suy giảm miễn dịch ở người (HIV)

Virus HIV gây bệnh AIDS, là thành phần của nhóm virus sao chép ngược (hình 4.5).

AIDS là hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (acquired immune deficiency syndrome). AIDS được phát hiện và mô tả từ năm 1981, là bệnh thể hiện nhiều triệu chứng thay đổi ở các bệnh nhân khác nhau, và nhanh chóng trở thành nạn dịch của thế kỷ. Từ năm 1981 đến năm 1992 đã có 14 triệu người lớn, 1 triệu trẻ em mắc nhiễm HIV và 3,5 triệu người bị nhiễm HIV trong đó có 25 triệu bị AIDS. Ở Việt Nam trường hợp nhiễm HIV đầu tiên được phát hiện từ 12/1990 và đến giữa năm 2001 đã có trên 35.000 người nhiễm HIV, trong đó có 5000 người bị AIDS, trên thực tế con số này còn cao hơn. Bệnh dịch lan truyền nhanh chóng trong lứa tuổi từ 13 đến 19 do sự luyến ái giao hợp bừa bãi, do nạn tiêm chích ma túy lan tràn. AIDS do virus gây suy giảm miễn dịch gây nên (human immunodeficiency virus - HIV) đầu tiên được phân lập và mô tả tại viện Pasteur ở Paris năm 1983. HIV thuộc loại retrovirus và có bộ gen là ARN được bao bởi vỏ protein và bao ngoài cùng là lớp màng có nguồn gốc là màng sinh chất của tế bào vật chủ (hình 4.5). Khi xâm nhập vào tế bào người, thường là các tế bào T hỗ trợ (tế bào T CD4), các đại thực bào và về sau có thể ký

sinh trong tế bào não. HIV nhanh chóng sản sinh ra nhiều virus con cháu, phá huỷ các tế bào của hệ miễn dịch. Triệu chứng sớm khi bị nhiễm HIV còn khó biết và nhanh như nổi hạch bạch huyết, mệt mỏi, đau mình, sốt, lạnh lùng. Số lượng tế bào T hỗ trợ bị giảm nhưng các kháng thể vẫn được tiết để chống lại virus. Sự có mặt kháng thể trong máu là chỉ tiêu đầu tiên để xác định nhiễm HIV và người bị bệnh xác định là HIV dương tính (HIV₊). Kháng thể không phát huy được tác dụng tiêu diệt virus vì virus ký sinh bên trong tế bào.

Sang giai đoạn 2 của nhiễm HIV, số lượng các tế bào T hỗ trợ bị giảm mạnh. Người khoẻ trong 1mm³ máu có khoảng 800 tế bào T hỗ trợ. Ở người nhiễm HIV số lượng tế bào T hỗ trợ giảm dần theo thời gian, có thể kéo dài 6 tháng đến 10 năm. Trong giai đoạn này thể hiện các triệu chứng như hạch bạch huyết ở cổ, ở nách và bẹn bị sưng. Khi số lượng tế bào T hỗ trợ bị giảm xuống dưới 250 tế bào trong 1mm³ máu thì bệnh nhân chuyển sang giai đoạn 3 và chính thức mắc bệnh AIDS với sự có mặt của các triệu chứng kèm theo như lao phổi, viêm phổi và đối với phụ nữ là ung thư cổ dạ con di căn. Tính mệnh bệnh nhân AIDS bị đe dọa hàng ngày và phải nằm viện theo dõi, các triệu chứng nguy hiểm như thoái hoá hệ thần kinh, thay đổi tính tình, bất động, mất trí và cuối cùng là chết.



Hình 4.5. Virus HIV

1. Vỏ protein ;
2. ARN - vật chất di truyền của virus ;
3. Màng vỏ có nguồn gốc từ màng sinh chất tế bào người ;
4. Enzym transcriptaza ngược.
5. Protein liên kết virus với tế bào người.

Nguy hiểm của nhiễm HIV ở chỗ HIV không chỉ tiêu diệt tế bào miễn dịch ngay tức thì mà ARN của HIV được phiên mã ngược thành ADN và dung hợp với ADN của tế bào vật chủ, và ADN của HIV được nhân bản cùng với ADN của vật chủ. Khi virus ở dạng gắn vào ADN của tế bào vật chủ, HIV có thể bất hoạt từ 10-15 năm và là nguồn lây nhiễm cho các tế bào của cơ thể.

HIV là loại virus dễ bị chết khi ở ngoài cơ thể. Nhiệt độ cao (135°F trong 10 phút), xà phòng và các chất tẩy rửa và tiệt trùng (như lysol và clo) đều có thể giết chết HIV.

HIV được lây nhiễm trong dân chúng qua máu, tinh dịch, dịch âm đạo, hoặc sữa mẹ. Bệnh AIDS thường được xem là bệnh truyền nhiễm tình dục bởi vì HIV dễ dàng lây nhiễm qua giao hợp khác giới hoặc đồng giới (đối với nam). Khi quan hệ tình dục, HIV có thể xâm nhập vào cơ thể qua các vết rách, xước của lớp màng nhầy lót cơ quan sinh dục, trực tràng và miệng. Tiêm chích ma túy cũng là con đường lây nhiễm dễ dàng HIV. Các bà mẹ bị nhiễm HIV có thể truyền cho thai nhi qua nhau thai, qua máu khi sinh đẻ, hoặc qua sữa khi cho bú.

Truyền máu chưa được xác định HIV là con đường lây nhiễm HIV. HIV có trong nước mắt, nước bọt, nước tiểu, phân đã được chứng minh nhưng lây nhiễm thông qua các vật phẩm này là khó xảy ra và chưa có tài liệu nghiên cứu chứng minh. Vì vậy các phương thức giao tiếp như nói chuyện, ôm, hôn má, hôn kín miệng, bắt tay, ho hoặc tắm bể bơi, bồn tắm rất khó lây nhiễm HIV.

Biện pháp ngăn chặn lây nhiễm HIV hiệu quả nhất là giáo dục tuyên truyền trong quảng đại quần chúng các kiến thức về HIV, về AIDS và kết hợp các biện pháp phòng chống tệ nạn xã hội và y tế như thực hiện Luật Hôn nhân một vợ một chồng, không quan hệ tình dục bừa bãi, quan hệ tình dục bắt buộc phải có bao cao su, ngăn chặn nạn buôn bán và phổ biến tiêm chích ma túy, phát hiện sớm người nhiễm HIV để có chính sách xã hội và y tế đối với họ. Các mẫu máu truyền bắt buộc phải được xác định HIV.

Y tế học thế giới đã có nhiều nỗ lực chữa trị HIV/AIDS như dùng liệu pháp hoá chất, liệu pháp vaccin v.v... nhưng chưa có liệu pháp nào là có hiệu quả mong muốn. Liệu pháp dùng kết hợp các thuốc AZT với ddI và ddC là hiệu quả nhất trong việc kéo dài đời sống của các bệnh nhân nhiễm HIV.

III - TẦM QUAN TRỌNG CỦA VI KHUẨN VÀ VIRUT TRONG CNSH

3.1. Sự lên men

Đây là một dạng hô hấp kỵ khí trong đó các hợp chất hữu cơ được vi khuẩn phân huỷ thành những chất mới và có ích. Trong công nghệ sản xuất bơ sữa, sự lên men vi khuẩn bao gồm *Lactobacillus* và *Streptococcus* được sử dụng trong sản xuất pho mát và sữa chua. Những vi khuẩn này có thể thực hiện đường phân nhưng không có enzym cần thiết cho chu trình axit xitric. Do vậy mà, mặc dù sử dụng lactozơ là nguồn năng lượng, chúng cũng không thể phân huỷ được lactozơ một cách hoàn toàn và axit lactic được giải phóng ra như là chất thải. Axit lactic được tích tụ lại, giảm độ pH và có vị hắc. Các sản phẩm khác của sự lên men gồm có dấm, mì chính glutamat monosodium. Cỏ lên men, được gọi là silô, là nguồn thức ăn dự trữ về mùa đông quan trọng cho gia súc.

3.2. Xử lý nước thải

Việc xử lý nước thải có hiệu quả chủ yếu là để chống ô nhiễm nguồn nước, ngăn chặn sự lây lan dịch bệnh. Cả vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí đều có tham gia vào quá trình này. Trong quá trình hoạt hoá nước thải, những chất cứng có trong chất thải thô được lắng đọng xuống. Chất lắng đọng hay chất thải sẽ được các vi khuẩn kỵ khí tác động. Chúng tạo nên methane mà thường được sử dụng như là nhiên liệu cho dân dụng hoặc cho các nhà máy xử lý nước thải. Bùn lắng có thể được phơi khô và sử dụng làm phân bón hoặc đưa lên tàu đem đi đổ xuống biển. Nước từ chất thải cho qua các thùng chứa, khí sủi lên qua áp suất làm tăng sự sinh trưởng của vi khuẩn hiếu khí và vi sinh vật khác. Những vi sinh vật này tiêu thụ các hợp chất hữu cơ hoà tan để tạo nên cacbon dioxit và nước. Sau khi lọc hoàn toàn có thể thải nước thải vào các dòng sông một cách an toàn.

3.3. Phòng trừ sinh học

Đây là phương pháp sử dụng những sinh vật ăn thịt hay sinh vật gây bệnh để phòng trừ các vật ăn hại cây trồng. Một ví dụ được biết rõ là việc đưa bọ *Ladybird* vào nhà kính để phòng trừ bệnh nhện xanh phá hoại cây cà chua.

Vì khuẩn và virus đôi khi cũng được sử dụng giống nhau. Ví dụ như virus gây bệnh *Mysomatosis* là một chứng bệnh tự nhiên ở một số loài thỏ của Nam Mỹ đã được suy tính cẩn thận để đem nhập nội để làm giảm số lượng quần thể thỏ ở Úc và miền tây châu Âu. Sâu bướm và sâu một số côn trùng khác bị vi khuẩn tấn công và một số loài *Bacillus* đã được sử dụng có hiệu quả trong việc bảo vệ cây trồng.

3.4. Vi sinh vật học công nghiệp

Khả năng chuyển hoá của vi khuẩn là rất quan trọng đối với công nghệ thực phẩm, hoá chất và thuốc. Nhiều loại enzyme khác nhau từ vi khuẩn đã được tách chiết và làm tinh sạch cho các nghiên cứu sinh học và y học. Số khác được sử dụng trong các xí nghiệp xà phòng, pho mát, làm mềm thịt và trong bột giặt "sinh học". Protein sản xuất từ vi sinh vật cung cấp nguồn protein rẻ hơn là thức ăn động vật theo truyền thống. Chẳng hạn, Pruten, một loại sản phẩm khô từ vi khuẩn *Methylophilus* được sản xuất số lượng lớn bởi hãng ICI dùng methanol và ammoniac là nguyên liệu khởi đầu. Việc sản xuất các chất kháng sinh từ vi khuẩn đã được công nghệ hoá.

Virus và vi khuẩn không chỉ được sử dụng như là đối tượng thí nghiệm nghiên cứu trong Sinh học phân tử mà còn được sử dụng trong công nghệ gen, công nghệ enzyme-protein, trong công nghệ tế bào cũng như CNSH môi trường.

IV - MÔ HÌNH CẤU TRÚC VÀ CHỨC NĂNG CỦA TẾ BÀO

Tế bào được cấu tạo gồm 3 cấu thành : là màng sinh chất (plasma membrane), tế bào chất (cytoplasm) và nhân (nucleus).

Ta lần lượt xem xét cấu tạo và chức năng của các cấu thành trên.

4.1. Màng sinh chất (Plasma membrane)

Tất cả các tế bào đều có một lớp màng bao bọc lấy khối tế bào chất ở phía trong, được gọi là *màng sinh chất*. Màng sinh chất không chỉ giới hạn tế bào với môi trường xung quanh mà còn có chức năng thực hiện quá trình trao đổi vật chất năng lượng và thông tin với môi trường (hệ thống mở).

4.1.1. Cấu trúc siêu vi và phân tử của màng sinh chất

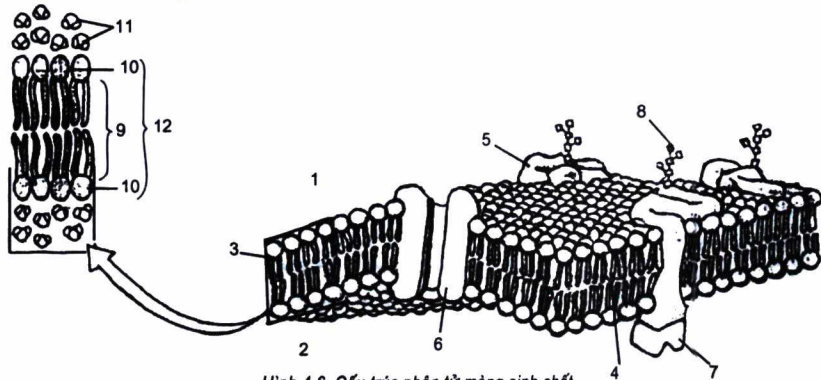
Màng sinh chất có độ dày từ 7-9 nm được cấu tạo gồm các phân tử lipid và protein là chủ yếu nên có tên gọi là màng lipoprotein. Ngoài ra màng còn chứa các phân tử glucit.

Các phân tử lipid, protein và glucit tạo nên màng không xếp lộn xộn mà được định vị theo một trật tự nhất định làm cho màng vừa có tính ổn định lại vừa có tính linh hoạt đáp ứng nhiều chức năng quan trọng của màng. Mô hình cấu trúc phân tử của màng theo mô hình "khảm động" (được Singer và Nicolson đề nghị từ năm 1972, được bổ sung và được công nhận) thể hiện như sau :

Lipid trong màng thường chiếm từ 25-75% tùy loại tế bào. Thành phần lipid chủ yếu của màng là photpholipit và cholesterol. Các phân tử photpholipit xếp thành lớp kép và tạo thành cái khung liên tục của màng, trong đó đầu ưa nước (phần phân cực được cấu tạo gồm nhóm ưa nước là colin hoặc xerin, hoặc ethanolamin, nhóm này liên kết với nhóm photphat và thông qua phân tử glixerol liên kết với đuôi kỵ nước) của photpholipit quay ra phía ngoài và

phía trong, còn đuôi kỵ nước (được cấu tạo bởi axit béo là 2 mạch hydrocacbon) thì quay lại với nhau (hình 4.6). Các phân tử cholesterol phân bố xen kẽ vào giữa các phân tử photpholipit ở vùng ghét nước.

Tỷ lệ giữa hàm lượng cholesterol với hàm lượng photpholipit trong màng thay đổi tùy loại tế bào. Hàm lượng cholesterol càng cao thì độ vững chắc của màng càng lớn và ngược lại. Đối với màng sinh chất của đa số tế bào, hàm lượng cholesterol chiếm tới 20 – 25% lượng lipid của màng.



Hình 4.6. Cấu trúc phân tử màng sinh chất

- | | |
|-----------------------|--------------------------------|
| 1. Ngoại bào ; | 7. Enzym ; |
| 2. Nội bào ; | 8. Gluxit ; |
| 3. Photpholipit ; | 9. Đuôi ghét nước ; |
| 4. Cholesterol ; | 10. Đầu ưa nước ; |
| 5. Protein thụ quan ; | 11. Phân tử H ₂ O ; |
| 6. Protein tạo kênh ; | 12. Lớp kép photpholipit. |

Protein có trong màng sinh chất với hàm lượng 25-75% tùy loại tế bào và thường phân bố rải rác (khảm) ở rìa ngoài hoặc rìa trong hoặc xuyên qua màng (hình 4.6). Các protein màng thuộc nhiều dạng và có chức năng rất khác nhau và chính chúng đóng vai trò quan trọng trong chức năng của các màng thuộc các dạng tế bào khác nhau (tế bào gan, máu, thần kinh,...).

Protein xuyên màng rất đa dạng về cấu hình và chức năng :

- Loại protein xuyên màng một lần hoặc nhiều lần, phần nằm trong màng thường ở dạng xoắn α và liên kết với lipid, phần lồi ra phía ngoài thường là ưa nước và liên kết với gluxit, phần lồi vào tế bào chất là ưa nước và thường liên kết với các protein của tế bào chất. Các protein xuyên màng có nhiều chức năng khác nhau : tạo nên các kênh vận chuyển, là protein mang (transporter), là thụ quan màng (receptor), là enzym, là protein đánh dấu (marker) để tế bào nhận biết nhau, liên kết với nhau.

- Loại protein rìa màng thường nằm ở rìa trong hoặc rìa ngoài của màng. Loại protein rìa trong thường không liên kết với gluxit, nhưng liên kết với các protein sợi như actin, clathrin... có tác dụng neo màng làm cho vững chắc. Nhiều protein rìa trong liên kết với màng một cách lỏng lẻo tạm thời qua nhóm axit béo và đóng vai trò truyền đạt thông tin, ví dụ các protein G.

Các protein rìa ngoài thường liên kết với glucit tạo nên các glycoprotein có vai trò tạo nên lớp áo ngoài để bảo vệ hoặc liên kết với các tế bào khác thông qua nhiều loại protein dính kết gian bào (như cadherin, conexin...).

Glucit trong màng chỉ chiếm từ 2-10% và thường liên kết với lipid ở dạng glicolipit hoặc với protein ở dạng glycoprotein và thường định vị ở mặt ngoài màng tiếp xúc với môi trường ngoại bào, tạo nên tính bất đối xứng của màng. Chính lớp glucit này tạo nên lớp áo tế bào ở động vật có nhiều vai trò quan trọng như : tham gia bảo vệ tế bào, tham gia kiểm soát cân bằng muối - nước của dịch gian bào vì tính mang điện tích âm của màng (do axit sialic trong thành phần của glicolipit của màng là gangliosid), tham gia liên kết với tế bào khác nhờ các glycoprotein, tạo nên các kháng nguyên, ví dụ kháng nguyên A và B (có trên màng hồng cầu) đều là glicolipit màng.

Mô hình "khảm động" còn thể hiện tính "động" của màng, tức là tính mềm dẻo và linh hoạt của màng, đáp ứng chức năng đa dạng của màng.

4.1.2. Tính linh hoạt của màng sinh chất

Màng sinh chất không phải là màng cứng, tuy nó có tính ổn định, làm hàng rào ngăn cách tế bào với môi trường, nhưng nó có đặc tính linh hoạt và là một hệ thống hầu như "lỏng". Đặc tính này do tính chất của lớp kép lipid, các protein và các glicolipit cũng như glycoprotein có trong màng quy định nên.

a) *Tính linh hoạt của lớp kép lipid* : thể hiện ở trạng thái lỏng hoặc nhớt của lớp do sự phân bố các photpholipit chưa no và no. Khi các photpholipit ở trạng thái no (trong axit béo không có nối đôi : - CH_2 - CH_2 -), màng trở nên nhớt và khi photpholipit ở trạng thái chưa no (trong axit béo có nối đôi : - $\text{CH}=\text{CH}$ -), màng ở trạng thái lỏng.

Tính linh hoạt của lớp kép lipid còn thể hiện ở sự chuyển động của các phân tử photpholipit : chuyển động dịch chỗ và chuyển động co giãn.

Khi chuyển động dịch chỗ, các phân tử photpholipit chuyển chỗ theo tuyến ngang (dịch chuyển sang bên cạnh), là loại chuyển động nhanh. Sự chuyển chỗ của các phân tử photpholipit có thể xảy ra từ một lớp lipid này sang lớp lipid kia (chuyển dịch bấp bênh hay chuyển dịch Flip - Flop). Đó là chuyển dịch chậm hơn.

Sự chuyển động co giãn của các phân tử lipid thể hiện ở tính co giãn của phân tử photpholipit chưa no ở các mạch hydrocacbon có liên kết đôi. Tính co giãn của lớp kép lipid còn tùy thuộc vào hàm lượng cholesterol trong màng, sự tăng cao hàm lượng cholesterol làm tăng tính vững chắc của màng.

b) *Tính linh hoạt của các protein màng* : Nhiều nghiên cứu chứng minh rằng protein là những phân tử rất linh hoạt và do đó tạo nên tính linh hoạt của màng. Các phân tử protein có khả năng chuyển động quay và chuyển dịch vị trí trong màng. Bình thường các phân tử protein phân bố ít nhiều đồng đều, nhưng trong điều kiện khi có sự thay đổi nào đó của môi trường, ví dụ : sự hạ thấp độ pH, sự kích thích của các kháng thể, thì các phân tử protein di chuyển tạo nên những tập hợp. Phân tử protein có cấu trúc 3D đặc trưng và sự thay đổi hình thù của chúng gây nhiều ảnh hưởng đến tính linh hoạt của màng.

Đặc tính linh hoạt của màng sinh chất tạo điều kiện cho tế bào điều chỉnh tính thấm chọn lọc của màng đối với các chất khác nhau tùy nhu cầu của tế bào thích nghi với thay đổi của môi trường sống.

c) Kiểm soát tính linh hoạt của màng

Tính linh hoạt của màng, đặc biệt là tính linh hoạt của các protein màng được kiểm soát bởi các nhân tố bên ngoài và bên trong. Sự kiểm soát ngoài là do các tác nhân của môi trường ngoại bào. Ví dụ : Lectin kích thích sự hợp nhóm của các glicoprotein màng, chúng không xâm nhập vào tế bào nhưng kích thích sự xâm nhập của một số chất vào tế bào và khởi động sự tăng trưởng của tế bào, thông qua các protein màng.

Sự kiểm soát tính linh hoạt của màng tùy thuộc vào hệ thống bộ xương tế bào, gồm các vi sợi và vi ống nằm sát màng liên kết với màng qua các protein rìa trong của màng.

4.2. Chức năng của màng sinh chất

Màng sinh chất thực hiện các chức năng quan trọng sau đây :

- Ngăn cách tế bào với môi trường, tạo cho tế bào một hệ thống riêng biệt.
- Thực hiện sự trao đổi chất giữa tế bào và môi trường.
- Thu nhận thông tin có nguồn gốc ngoại bào và chuyển vào môi trường nội bào.
- Ngoài ra, màng sinh chất của tế bào vi khuẩn còn có chức năng hô hấp, vì trong màng có chứa các enzym hô hấp và tham gia vào sự phân bào của vi khuẩn nhờ cấu trúc mesoxom (là phần màng sinh chất gấp nếp lõm vào tế bào chất).

4.2.1. Màng sinh chất ngăn cách tế bào với môi trường

Tất cả các tế bào dù là ở cơ thể đơn bào hay ở cơ thể đa bào đều được ngăn cách với môi trường xung quanh bởi màng sinh chất, do đó tạo cho tế bào là một hệ thống riêng biệt và qua màng, tế bào trao đổi một cách có chọn lọc các chất cần thiết cho sự sinh trưởng, phát triển của tế bào và cơ thể. Trong cơ thể đa bào, các tế bào được ngăn cách nhau bởi lớp dịch mô - là môi trường ngoại bào, và các tế bào liên hệ với nhau thông qua màng sinh chất và lớp dịch mô. Các cấu trúc phân hoá để tăng cường mối liên hệ giữa các tế bào là cấu trúc phân hoá của màng sinh chất (như desmoxom, desmoplasma - xem phần sau). Đối với các hợp bào (ví dụ : cơ vân...), màng sinh chất ngăn cách các tế bào có thể biến mất để tạo thành khối tế bào chất chứa nhiều nhân và có một màng chung.

Màng sinh chất giữ cho tế bào có một hình dạng ổn định, nhưng đồng thời do tính linh hoạt của màng tế bào, có thể thay đổi hình dạng đáp ứng chức năng của cơ thể (như chuyển động amip, thực bào, uống bào v.v...).

4.2.2. Sự vận chuyển chất qua màng (hình 4.7)

Màng sinh chất không chỉ ngăn cách tế bào với môi trường mà còn đóng vai trò quyết định trong sự trao đổi chất giữa tế bào và môi trường ngoại bào. Màng sinh chất để cho nhiều chất đi qua theo cả 2 hướng. Các chất đi vào tế bào là những chất cần thiết cho các quá trình sống và là nguyên liệu để tổng hợp nên các chất xây dựng cấu trúc của tế bào, còn chất thải ra là các sản phẩm trao đổi chất, chất dư thừa. Sự vận chuyển chất qua màng không chỉ phụ thuộc vào kích thước và bản chất của chất được vận chuyển, mà còn phụ

thuộc vào cấu tạo và tính chất của màng. Sự vận chuyển có thể là thụ động không tiêu phí năng lượng hoặc theo phương thức hoạt tải - vận chuyển tích cực kèm theo tiêu phí năng lượng ATP. Sự vận chuyển còn tùy thuộc vào sự có mặt của các protein màng, hoặc do sự thay đổi hình dạng của màng (hiện tượng xuất bào - nhập bào) .

a) Vận chuyển chất không kèm theo tiêu phí năng lượng

Đó là phương thức vận chuyển thụ động, vận chuyển nhờ dung môi, vận chuyển dễ dàng.

- Vận chuyển thụ động : Sự vận chuyển thụ động của các chất qua màng tùy thuộc vào các điều kiện sau.

+ Kích thước của phân tử : Các chất có kích thước càng bé, tốc độ vận chuyển càng nhanh, tuy nhiên các chất đó phải là chất không phân cực (oxy dễ dàng thấm qua màng) và không tích điện. Một phân tử tích điện và có mức độ hydrat hoá cao, ví dụ ion, tuy kích thước rất bé nhưng rất khó đi qua màng. Trái lại phân tử CO_2 tuy có khối lượng phân tử 44Da lại dễ dàng đi qua màng.

+ Tính chất của phân tử : Những chất hoà tan trong lipid dễ dàng đi qua màng (ví dụ các alcol, các aldehyt, các xeton, các glycerol và các chất gây mê ...), còn các chất hoà tan trong nước khó đi qua màng. Các chất hoà tan trong lipid dễ dàng "hoà tan" vào lớp lipid kép của màng nên nhanh chóng chui qua màng. Trái lại nước và các chất hoà tan trong nước hình như bị lớp ghét nước của lớp lipid giữ lại, chúng được vận chuyển qua màng theo một cơ chế khác.

+ Gradient nồng độ : Một phân tử được vận chuyển thụ động qua màng tùy thuộc vào gradient nồng độ của chất đó ở hai phía của màng. Chúng sẽ di chuyển từ nơi có nồng độ cao đến nơi có nồng độ thấp theo nguyên tắc khuếch tán. Lợi dụng tính dễ qua màng của chất lipid, người ta đã chế ra các lipoxom (liposome) là các viên có kích thước 50nm, được bao bởi một lớp lipid kép và chứa các chất có hoạt tính (enzym, chất chống đông), và được sử dụng trong điều trị như là phương tiện chuyên chở chất thuốc, vì chúng dễ dàng đi qua màng sinh chất và giải phóng các hoạt chất (chất thuốc) vào tế bào.

- Sự vận chuyển nhờ dung môi : Như trên đã biết, nước và các chất hoà tan trong nước rất khó qua lớp kỵ nước của màng sinh chất. Tính thấm thấu của màng đối với nước và các chất hoà tan trong nước chỉ có thể giải thích bằng cơ chế tạo lỗ hoặc kênh do sự di chuyển hợp nhóm của các protein có trong màng. Ví dụ, màng của tế bào biểu mô bóng đá của ếch là không thấm đối với nước. Bình thường các phân tử protein trong màng phân bố phân tán, nhưng khi có tác động của hoocmon chống lợi tiểu thì nước trong bóng đá sẽ được hấp thụ lại nhờ các tế bào biểu mô bóng đá, khi đó các phân tử protein màng di chuyển hợp nhóm để tạo nên các vùng thấm thấu đối với nước gồm các lỗ và kênh.

- Sự vận chuyển dễ dàng : Sự vận chuyển của các chất hòa tan còn được làm dễ dàng thêm nhờ cơ chế sử dụng các protein mang (transporter). Các protein mang là các protein nằm tại màng, được sử dụng làm chất chuyên chở bằng cách protein mang gắn với chất được chuyên chở nhờ các phần có hình thù bổ trợ đặc trưng và chuyển chúng vào tế bào chất. Hoạt tính này cũng tương tự như phản ứng giữa enzym - cơ chất (vì vậy thường được gọi là permeaza), nhưng khác ở chỗ chất được chuyên chở không bị làm thay đổi cấu trúc. Trong hoạt động chuyên chở, các protein mang thay đổi thù hình từ một phía của màng (khi gắn với chất chuyên chở) và trở lại thù hình ban đầu ở phía kia của màng (khi đã giải phóng chất chuyên chở).

Nhiều chất như D-glucosơ, axit amin được chuyên chở dễ dàng vào tế bào theo gradien nồng độ, không cần thiết phải tiêu phí năng lượng là nhờ hoạt động của các protein mang. Ví dụ, sự vận chuyển dễ dàng glucosơ là nhờ một protein có hoạt tính enzym permeaza.

Sự vận chuyển ion cũng được dễ dàng hoá nhờ các chất mang ion (ionophore). Một số vi sinh vật tổng hợp một số chất có tính kháng sinh (valinomycin, gramicidin A) có tác dụng tăng cường tính thấm của màng đối với một số ion. Ví dụ, valinomycin làm tăng 10.000 lần lượng kali đi qua màng trong một đơn vị thời gian. Các chất kháng sinh mang ion hoạt động theo cơ chế tạo nên một kênh xuyên màng, hoặc tạo nên các túi để chuyên chở ion qua màng.

Hoạt động của các protein mang : Hoạt động của các protein mang có thể xảy ra theo 3 phương thức và có thể tham gia vào cơ chế vận chuyển thụ động hoặc vận chuyển tích cực (hoạt tải).

+ Vận chuyển đơn hướng hay đơn kênh (uniport) là trường hợp vận chuyển chỉ một chất từ phía này đến phía kia của màng. Ví dụ : sự chuyên chở glucosơ từ môi trường ngoại bào vào tế bào chất khi ở môi trường ngoại bào nồng độ glucosơ cao hơn trong tế bào chất. Hình thức vận chuyển này là thụ động, không cần tiêu phí năng lượng.

+ Vận chuyển đồng hướng hay đồng kênh (symport) là sự vận chuyển một chất này phải kèm theo đồng thời sự vận chuyển một chất khác theo cùng hướng. Ví dụ, các tế bào ruột hoặc tế bào ống thận khi phải vận chuyển glucosơ từ xoang ống ruột, hoặc xoang ống thận (nơi có nồng độ glucosơ thấp) vào tế bào chất (nơi có nồng độ glucosơ cao hơn) bằng phương thức vận chuyển tích cực (ngược với gradien nồng độ) là nhờ sự vận chuyển đồng hướng với Na^+ (nồng độ Na^+ ở dịch ngoại bào rất lớn).

+ Vận chuyển đối hướng hay đối kênh (antiport) là trường hợp sự vận chuyển đồng thời hai chất nhưng theo hai hướng ngược nhau, một chất đi vào tế bào chất, chất kia đi ra môi trường ngoại bào. Protein mang các anion có tên băng III có trong màng sinh chất của hồng cầu người, hoạt động đối hướng trong sự vận chuyển Cl^- và HCO_3^- .

b) Sự vận chuyển tích cực qua màng

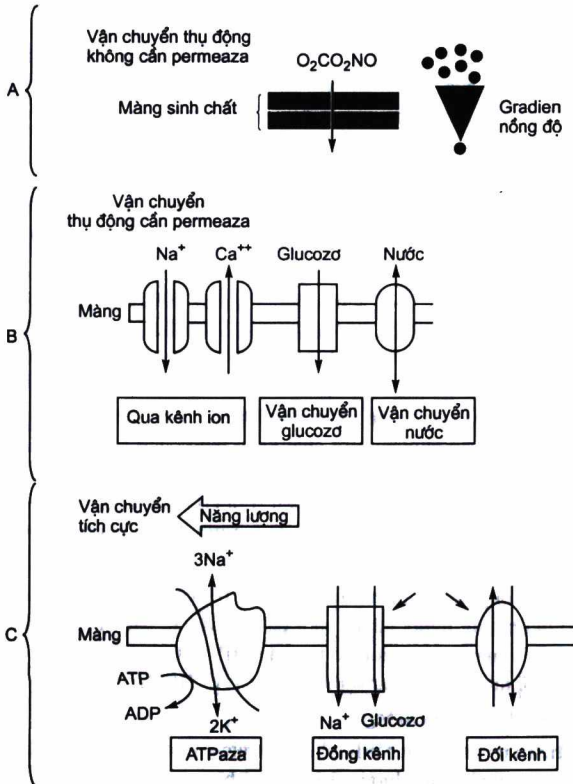
Sự vận chuyển tích cực hay hoạt tải là phương thức vận chuyển chất qua màng chống lại gradien nồng độ, có tiêu phí năng lượng ATP, do tế bào cung cấp.

- Hoạt tải các ion : Các tế bào động vật có khả năng duy trì nồng độ Na^+ thấp và nồng độ K^+ cao trong tế bào chất, trong khi ở môi trường ngoại bào thì ngược lại. Khả năng đó là do màng sinh chất đã thực hiện sự hoạt tải các ion Na^+ và K^+ ngược với gradien nồng độ. Sự hoạt tải này cần có năng lượng cung cấp từ ATP vì khi sự hô hấp tế bào bị ức chế thì sự hoạt tải bị đình trệ. Sự hoạt tải các ion có được là nhờ các "Bơm ion".

Bơm ion được tạo nên bởi các protein xuyên màng. Bơm natri và kali là các protein xuyên màng được gọi là $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ adenosin triphosphatase ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase). Protein này là tetramer $2\alpha - 2\beta$ có khối lượng phân tử 270.000Da. Đơn vị lớn α (95.000Da) có chứa một phần có chức năng cố định và thủy phân ATP (nằm ở phía hướng vào tế bào chất) và một phần có tác dụng liên kết với các chất steroid cường tim (nằm ở phía ngoại bào). Đơn vị bé β (40.000Da) mang các mạch hydrat cacbon. Phần tử $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase hoạt động như một cái bơm, nó đẩy 3 ion Na^+ ra khỏi tế bào và hút 2 ion K^+ vào tế bào theo cơ chế sau :

+ Enzym được photphorin hoá nhờ thủy phân ATP với sự có mặt của Mg^{++} và 3 ion Na^+ bám vào phần của phân tử $Na^+ - K^+ ATPaza$ nằm mặt trong tế bào chất.

+ Enzym đã được photphorin hoá sẽ thay đổi hình thù và chuyển ion Na^+ ra mặt ngoài màng.



Hình 4.7. Sự vận chuyển thụ động không tiêu thụ năng lượng ATP (A, B) và sự vận chuyển tích cực có tiêu thụ năng lượng ATP (C) qua màng.

A. Các phân tử bé như O_2 , CO_2 , NO được vận chuyển thụ động qua màng theo gradien nồng độ ; B. Các ion Na^+ , Ca^{++} , ... được vận chuyển thụ động qua màng nhờ các kênh ion, các phân tử như glucôzơ, nước được vận chuyển dễ dàng qua màng nhờ các protein mang (permeaza) ; C. Vận chuyển tích cực.

Enzym giải phóng photpho và kéo theo sự giải phóng 3 ion Na^+ ra môi trường ngoại bào, đồng thời liên kết với 2 ion K^+ .

$Na^+ - K^+ ATPaza$ lấy lại hình thù ban đầu, chuyển và giải phóng 2 ion K^+ vào dịch nội bào.

Các chất ouabain và digitalin có tác dụng ức chế hoạt động của bơm đối với Na^+ bằng cách bám vào phần thụ nhận steroid cường tim và do đó làm cho nồng độ Na^+ nội bào tăng cao. Sự tăng cao Na^+ kéo theo sự tăng cao Ca^{++} nội bào và do đó tăng cường sự co bóp của cơ tim.

Sự hoạt tải các ion có tầm quan trọng đối với tế bào trong các hoạt động sống vì do sự khác biệt của các ion ở mặt trong và mặt ngoài màng đã tạo nên điện thế màng. Ví dụ : hoạt động của bơm $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ dẫn tới sự thay đổi điện thế màng từ điện thế tĩnh sang điện thế hoạt động, là cơ sở điện hoá của dẫn truyền thần kinh.

Ngoài bơm $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, còn tồn tại các loại bơm ion khác nữa, ví dụ bơm H^+ để hoạt tải ion H^+ , bơm canxi để hoạt tải các ion Ca^{++} qua màng, bơm clo để hoạt tải các ion Cl^- qua màng. Các bơm ion hoạt động theo kiểu đồng hướng hoặc đối hướng đối với các ion khác nhau, hoặc đối với các chất khác nhau. Những bơm này đóng vai trò vô cùng quan trọng trong hoạt động sinh lý của tế bào và cơ thể sống, và nếu chúng hoạt động trục trặc sẽ dẫn đến tình trạng bệnh lý.

- Hoạt tải glucozơ : Sự hoạt tải glucozơ cũng như các đường khác, hoặc các axit amin tùy thuộc vào sự có mặt của permeaza đặc trưng, ATP và các ion.

Sự hoạt tải được cung cấp năng lượng do sự thủy phân ATP và được kèm theo sự vận chuyển các ion. Ví dụ, trong sự hoạt tải glucozơ thì glucozơ được vận chuyển theo kiểu đồng hướng với ion Na^+ theo cùng một hướng. Ví dụ, các tế bào ống thận có khả năng hấp thụ lại glucozơ từ nước tiểu theo kiểu hoạt tải.

c) Sự nhập bào và xuất bào

Nhiều chất có khối lượng phân tử lớn, ví dụ các protein, lipoprotein, glicoprotein, cũng như các phần tử thức ăn rắn, lỏng không thể vận chuyển trực tiếp qua màng. Chúng được vận chuyển bằng phương thức nhập bào và xuất bào.

Sự nhập bào (Endocytosis) và sự xuất bào (Exocytosis) (hình 4.8) là sự vận chuyển các chất qua màng sinh chất, trong đó có sự thay đổi và tái tạo của màng để tạo nên các bóng hoặc túi (dạng không bào - vacuoles) được bao bởi màng và được dùng như một phương tiện vận chuyển chất qua màng.

- Sự nhập bào (endocytosis) : Hiện tượng nhập bào là sự vận chuyển các chất (phần tử rắn hoặc lỏng) từ ngoài vào trong tế bào thông qua sự hình thành các bóng nội bào do sự lõm vào và tách ra của một phần màng có chứa một chất rắn hoặc dịch lỏng. Người ta phân biệt ba dạng nhập bào : đại ẩm bào (macropinocytosis), vi ẩm bào (microcytosis) và thực bào (phagocytosis).

Hiện nay người ta tách biệt hiện tượng thực bào là một hiện tượng riêng biệt khác với hiện tượng nhập bào. Hiện tượng nhập bào (endocytosis) là để chỉ sự hình thành các bóng có đường kính rất bé (khoảng 0,1µm) được tạo nên do sự lõm vào của màng sinh chất ; còn hiện tượng thực bào (phagocytosis) là sự hình thành chân giả để vây bắt các phần tử (như các vi khuẩn, mảnh vỡ tế bào, hồng cầu v.v...) và tạo thành các bóng (túi) thực bào (phagosome) có kích thước lớn hơn các bóng nhập bào (có đường kính đạt từ 1-2µm). Điểm khác biệt là ở chỗ, quanh các bóng thực bào được bao bởi các vi sợi actin, còn quanh các bóng nhập bào thì không có.

Thường có hai dạng nhập bào :

+ Dạng ẩm bào (pinocytosis) là hiện tượng bắt giữ và đưa vào tế bào các giọt chất lỏng ngoại bào mà các chất hoà tan trong đó giống như thành phần dịch ngoại bào. Một phần màng sinh chất lõm vào thành một cái bóng hở khoảng 0,1µm, chất lỏng ngoại bào tràn vào trong bóng và bóng được khép lại rồi tách khỏi màng và tạo thành các bóng ẩm bào

(pinosome). Đây là một phương thức vận chuyển các chất lỏng vào trong tế bào, trong đó có các chất khác nhau. Các bóng ẩm bào trơn không có lớp áo bao quanh.

+ **Dạng nhập bào** - thụ quan là dạng nhập bào trong đó có tạo thành các bóng nhập bào có áo bao quanh, do sự lõm vào và tách ra một phần màng đặc biệt có chứa thụ quan màng (receptor).

Phần màng sinh chất có chứa thụ quan (receptor) đặc trưng khi tiếp xúc với chất gắn đặc trưng (ligand) sẽ lõm vào tế bào chất do tác động của một mạng lưới clathrin được hình thành ngay dưới màng. Phần màng ở chỗ thụ quan liên kết đặc trưng với chất gắn (chất hoá học mang thông tin) sẽ lõm vào và tách ra hình thành bóng nhập bào. Xung quanh bóng được bọc một lớp áo-màng lưới clathrin bao lấy bóng như một chiếc giỏ. Clathrin là protein gồm 3 mạch polipeptit dài và 3 mạch polipeptit ngắn xếp thành kiềng 3 chân.

Bằng cách tạo nên các bóng nhập bào có áo clathrin như vậy, tế bào thu nhận được các tín hiệu mang thông tin đặc trưng (xem phần sau) để xử lý cần thiết cho quá trình sống. Sau khi hoạt động, bóng nhập bào bị giải thể thì thụ quan màng và áo clathrin được gắn trở lại màng và được tái sử dụng.

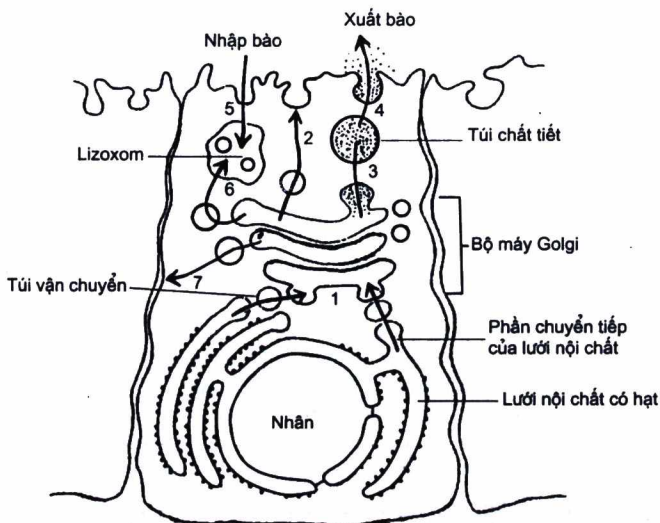
- **Sự thực bào (phagocytosis)** : Sự thực bào bao gồm các hiện tượng tạo thành các thể thực bào (phagosome) - là những bóng có kích thước lớn (1-2µm) có màng bao bọc và chứa các phần tử rắn, vi khuẩn hoặc mảnh vỡ tế bào.

Từ lâu hiện tượng thực bào được xem như một cơ chế bảo vệ đảm nhiệm bởi các tế bào đặc biệt - tế bào của hệ lưới - mô bào (các đại thực bào và các bạch cầu có hạt). Thật ra thì các loại tế bào khác kể cả amip đều có khả năng thực bào. Ngày nay người ta đã làm sáng tỏ cơ chế của hiện tượng thực bào. Quá trình thực bào diễn ra phức tạp và theo nhiều bước. Khi vi khuẩn xâm nhập vào cơ thể, chúng sẽ bị opsonin hoá, nghĩa là các kháng thể - opsonin của cơ thể sẽ gắn vào bề mặt vi khuẩn như một kiểu đánh dấu. Các tế bào thực bào nhận biết các vi khuẩn mang opsonin (được đánh dấu) nhờ thụ quan màng đặc trưng (thụ quan Fc) của mình và qua thụ quan - opsonin, vi khuẩn bị gắn chặt vào màng tế bào thực bào. Thụ quan màng (receptor Fc) là một polipeptit chứa 231 axit amin, trong đó có 180 axit amin thò ra ngoài màng và chứa vùng liên kết đặc trưng với vật gắn (ligand - vi khuẩn có mang opsonin). Nằm cạnh thụ quan màng là kênh ion có nhiệm vụ vận chuyển natri, và phức hệ Fc - ligand sẽ làm hoạt hoá kênh ion, do đó một lượng ion natri sẽ xâm nhập vào tế bào. Điện thế màng bị hạ thấp làm hoạt hoá sự thực bào, tức là sự chuyển dạng của màng cùng phần ngoại sinh chất nằm dưới màng tạo nên các chân giả, các chân giả nối lại với nhau bao lấy vi khuẩn và tạo nên bóng thực bào. Như vậy vi khuẩn đã bị nhốt vào bóng thực bào - hay thể thực bào phagoxom (phagosome) - màng bao quanh thể thực bào là màng sinh chất, và sự tạo thành chân giả là nhờ sự hoạt động của các vi sợi phần ngoại sinh chất và cung cấp năng lượng từ ATP. Các thể thực bào vào tế bào chất sẽ liên kết với các lizoxom biến thành các phagolizoxom và vi khuẩn bị tiêu hóa (xem phần lizoxom).

- **Sự xuất bào (exocytosis)** :

Là hiện tượng tạo thành các bóng xuất bào (exosome) (còn được gọi là túi vận chuyển hay túi chất tiết) trong tế bào chất từ mạng lưới nội sinh chất và phức hệ Golgi. Bóng xuất bào được bao bởi màng và chứa các chất tiết (nội tiết và ngoại tiết) như protein, các lipoprotein, glicoprotein, hoặc hoocmon v.v... hoặc các chất thừa mà tế bào không dùng

đến cần bài xuất ra khỏi tế bào. Như vậy sự xuất bào là một phương thức vận chuyển chất ra khỏi tế bào qua màng sinh chất thông qua bóng xuất bào. Các bóng xuất bào sẽ được di chuyển đến màng sinh chất (nhờ dòng chảy tế bào chất tạo nên do sự hoạt động của các vi sợi, vi ống và tiêu phí năng lượng từ ATP) và gắn vào mặt trong màng sinh chất. Khi màng bóng xuất bào gắn vào màng sinh chất thì hai màng hòa hợp, tạo nên vùng hòa hợp là vùng mà ở đó, các protein màng di chuyển làm cho lớp lipid đứt ra tạo thành các mixen, và do đó bóng xuất bào được mở ra và các chất chứa được giải phóng ra ngoài tế bào. Sự hoà hợp và hoà tan của màng là tùy thuộc vào một loại protein đặc trưng (protein hoà hợp màng).



Hình 4.8. Hiện tượng nhập xuất bào

Ở đa số tế bào, sự chế tiết bằng phương thức xuất bào có thể xảy ra liên tục, tức là tế bào thường xuyên tiết các chất ra ngoài mà không cần sự kích thích đặc biệt nào cả. Đối với một số tế bào thì sự chế tiết cần có sự kích thích của một tín hiệu ngoại bào, ví dụ sự chế tiết insulin (thông qua bóng xuất bào) từ tụy vào máu chỉ xảy ra khi có nồng độ glucocorticoid ở trong máu cao. Sự chế tiết của nhiều tế bào tuyến nội tiết và ngoại tiết xảy ra chỉ khi có điều kiện nhất định đóng vai trò nhân tố kích thích (tuyến nước bọt, tuyến tụy, miễn tuyến trên thận v.v...).

4.2.3. Sự trao đổi thông tin qua màng

Qua màng, tế bào phát đi và thu nhận thông tin để điều chỉnh các hoạt động sống. Thông tin ở dạng những tín hiệu hóa học (thường có bản chất protein) có khả năng liên kết đặc trưng với các thụ quan - hoạt hoá hoặc thụ quan - ức chế của màng.

Tín hiệu có thể là nội tiết (endocrine) khi tế bào phát thông tin ở xa tế bào nhận thông tin và lúc này sự truyền đạt thông qua các chất hormone theo hệ mạch máu đưa tới.

Tín hiệu được gọi là cận tiết (paracrine) khi tế bào phát thông tin ở ngay cạnh tế bào nhận thông tin, lúc này thông tin được truyền đạt qua hệ thần kinh (ví dụ qua xinap giữa tế bào thần kinh và tế bào tuyến), hoặc thông qua các cầu nối tế bào (cell gap) nối giữa hai tế bào ở cạnh nhau.

Tín hiệu cũng có thể là tự tiết (autocrine) nếu như tín hiệu tác động đến bản thân tế bào phát ra tín hiệu.

Tác động của tín hiệu có thể là kích thích hoặc ức chế.

a) Hoocmon và thụ quan màng

- Thụ quan màng và tín hiệu kích thích : Các tín hiệu hoocmon đều là tín hiệu nội tiết (do tuyến nội tiết tiết ra) có tác động điều chỉnh hoạt động của tế bào. Ví dụ : glucagon do tuyến đảo tụy tiết ra có tác động hoạt hóa các tế bào gan phân giải glicogen, tăng cường giải phóng glucozo vào máu.

Glucagon đóng vai trò tín hiệu là một chất gắn (ligand) có khả năng liên kết đặc trưng với thụ quan màng (là một protein đặc trưng trong màng). Phức hệ ligand-receptor đến lượt mình lại làm hoạt hóa một protein bên cạnh gọi là protein - truyền đạt (protein Gs). Protein Gs gồm 2 đơn vị : đơn vị β và đơn vị α . Sự hoạt hoá protein Gs kéo theo sự chuyển đổi GDP (guanosin diphosphat) thành GTP (guanosin triphosphat). Dưới tác động của GTP, đơn vị α của protein Gs thay đổi thù hình và liên kết với enzym nội màng là adenincyclaza. Enzym adenincyclaza được hoạt hóa và biến đổi ATP thành AMP vòng. Khi quá trình hoạt hóa đã xong, hoocmon tách khỏi thụ quan và đơn vị α lại lấy lại thù hình ban đầu, và như vậy thông tin từ tín hiệu hoocmon thông qua màng được truyền đạt vào trong tế bào. Với lượng hoocmon 10^{-8} đến 10^{-12} mol sẽ sản sinh ra lượng AMP vòng là 10^{-3} mol, như vậy thông tin được khuếch đại lên 10^5 đến 10^9 lần. Đối với tín hiệu glucagon, thì AMP vòng hoạt hóa enzym phosphorilaza là enzym có tác dụng phân giải glicogen thành glucozo. Hoạt tính của AMP vòng được kiểm tra bởi enzym phosphodiesteraza bằng cách biến AMP vòng thành 5' AMP là chất không có hoạt tính.

- Thụ quan màng và tín hiệu ức chế : Trong màng còn chứa những thụ quan - ức chế. Những thụ quan này khi liên kết với hoocmon có tác động ức chế thể hiện ở chỗ phức hệ receptor-ligand tác động lên một protein màng là Gi α , và đến lượt mình protein Gi α ức chế sự hoạt hóa của enzym adenincyclaza.

b) Truyền đạt thông tin giữa hai tế bào ở cạnh nhau

- Giữa hai tế bào thần kinh : Sự truyền đạt thông tin có thể được thực hiện bởi các tế bào thần kinh thông qua xinap - hoá học, hoặc xinap - điện, hay được thực hiện giữa các tế bào không phải thần kinh thông qua phân tử "thông tin".

Khi hai tế bào thần kinh (nơron) liên kết với nhau qua xinap hóa học là khi sự truyền đạt thông tin thông qua các chất trung gian thần kinh (neurotransmettor) mà bản chất rất khác nhau, tùy thuộc vào chức năng của tế bào thần kinh. Các chất này được chứa trong các bóng xinap, ví dụ : chất acetylcholin chẳng hạn. Khi có xung động thần kinh dẫn truyền đến xinap làm tăng cường sự xâm nhập các ion Ca^{2+} vào xinap và làm giải phóng acetylcholin khỏi bóng xinap. Acetylcholin chui qua màng trước xinap xâm nhập vào khe xinap và tác động lên màng sau xinap như một chất gắn đặc trưng. Trong màng sau xinap, có chứa thụ quan đặc trưng cho acetylcholin. Phức hệ receptor-acetylcholin sẽ hoạt hóa các

kênh ion natri và tăng cường sự vận chuyển ion natri vào trong tế bào chất của neuron sau xinap (neuron nhận), do đó làm phân cực hóa màng sau xinap, acetylcholin nhanh chóng được giải phóng khỏi thụ quan màng và bị thủy phân.

Trong trường hợp xinap - điện thì sự truyền đạt điện thế hoạt động từ tế bào thần kinh này sang tế bào thần kinh bên cạnh thông qua cầu nối (gap), do đó sự truyền đạt xảy ra cực nhanh.

- Giữa hai tế bào không phải tế bào thần kinh : Trong trường hợp này sự truyền đạt có thể qua trung gian các phân tử "thông tin" thông qua cầu nối tế bào (gap), qua đó hai tế bào cạnh nhau có thể trao đổi thông tin để phối hợp hoạt động. Sự trao đổi này cần có mặt các ion Ca^{2+} và tiêu phí năng lượng từ ATP. Sự truyền đạt thông tin giữa hai tế bào không phải thần kinh có thể thực hiện thông qua sóng giải phân cực của màng (sự biến đổi điện thế màng).

4.3. Sự phân hóa của màng sinh chất

Trong cơ thể đa bào, nhiều loại tế bào có màng sinh chất phân hóa về cấu trúc và biến dạng thành các phức hệ cấu tạo thích nghi với các chức năng khác nhau như : tăng cường mối liên hệ giữa các tế bào ở cạnh nhau, tăng cường hấp thụ, chế tiết, dẫn truyền v.v...

4.3.1. Tăng cường mối liên kết giữa các tế bào cạnh nhau

Trong mô đa bào, các tế bào liên kết với nhau qua khoảng gian bào. Khoảng gian bào được giới hạn bởi màng của các tế bào cạnh nhau và chứa đầy các phân tử protein có chức năng kết dính các tế bào với nhau, gọi là adherin - là một glicoprotein. Chất dịch gian bào đóng vai trò cơ học giữ cho các tế bào ổn định trong tổ chức mô học, đồng thời cũng là môi trường ngoại bào đóng vai trò quan trọng trong các hoạt động của tế bào như trao đổi chất, di chuyển và sinh sản v.v...

Qua khoảng gian bào, màng các tế bào cạnh nhau được liên kết với nhau nhờ các nối kết gian bào (intracellular junction), ở vùng nối kết gian bào có sự thay đổi về cấu tạo và hình dạng của màng sinh chất, có sự tham gia của các protein liên kết và sự tạo thành phức hệ phức tạp các vi sợi actin trong tế bào chất.

Tùy tính chất và cấu tạo, người ta phân biệt hai loại nối kết gian bào.

a) Các cầu nối gian bào hay nối kết thông thường (junction-gap)

Là những nối kết giữa hai tế bào cạnh nhau mà ở đó hai màng sinh chất tiếp cận nhau sát đến nỗi không thể phân biệt được hai màng, vì khoảng gian bào chỉ hẹp có 2-3nm. Các cầu nối có được là nhờ sự liên kết của protein - connexin tồn tại trong màng của cả hai tế bào.

Cầu nối gian bào cho phép hai tế bào cạnh nhau trao đổi chất một cách trực tiếp, nhanh chóng và nhờ cầu nối mà các tế bào cạnh nhau có được sự hợp tác trong trao đổi chất. Ví dụ, AMP vòng có thể qua cầu nối gian bào từ tế bào này vận chuyển sang tế bào khác, do đó tăng cường nhanh chóng sự phân giải glicogen để giải phóng glucozo vào máu kịp thời.

b) Các nối kết vững chắc hay thể nối (hay thể dây chằng) (desmosome) : Là kiểu nối kết trong đó có sự thay đổi hình dạng màng sinh chất, có sự tham gia của protein liên kết và cả sự tham gia của phức hệ vi sợi tế bào chất, làm cho nối kết ổn định và vững chắc. Kiểu nối kết này có vai trò tăng cường độ liên kết giữa hai tế bào cạnh nhau về cơ học và qua phần nối kết không có sự trao đổi chất giữa hai tế bào, ví dụ giữa các tế bào biểu bì da động vật.

Có kiểu nối kết kém vững chắc như nối kết vùng (zonula junction) khi nối kết bao quanh toàn bộ tế bào, nối kết điểm (macula junction) khi nối kết chỉ định khu ở một phần tế bào ở dạng vòng hoặc ô van.

c) *Các nối kết tế bào chất hay cầu nối sinh chất (plasmodesma)* : Ở tế bào thực vật, ngoài màng sinh chất còn được bao bởi lớp thành vỏ xenlulozơ. Vì vậy, để bảo đảm độ liên kết và trao đổi giữa các tế bào ở cạnh nhau, có cấu trúc nối kết plasmodesma. Ở đây màng sinh chất và thành xenlulozơ thay đổi và tạo nên những cầu nối tế bào chất, qua đó các tế bào có thể trao đổi chất trực tiếp cho nhau. Sự vận chuyển muối và nước từ rễ vào thân bằng con đường hợp bào (symplast) chính là thông qua các cầu nối tế bào chất giữa các tế bào rễ.

4.3.2. Tầng cường hấp thụ và chế tiết

Các vi mao (microvilli) ở một số tế bào phân hóa như tế bào biểu mô ruột, tế bào ngoại tiết, màng sinh chất cùng tế bào chất ở phần đỉnh tế bào đã bị biến đổi tạo thành các vi mao (microvilli) là những phần lồi của màng kéo theo tế bào chất như kiểu lông nhỏ. Vi mao có đường kính từ 80-100nm và chiều dài 0,6-0,8 μ m. Mỗi tế bào biểu mô ruột có tới 3000 vi mao phủ lấy phần đỉnh tế bào (trước đây với kính hiển vi quang học, lớp vi mao được mô tả như là "nếp viền"). Vi mao được bao bởi lớp màng sinh chất có độ dày 9-11nm, bên trong là tế bào chất chứa bó sợi gồm 10-50 vi sợi actin, có vai trò cố định vi mao. Với cấu tạo vi mao, bề mặt tiếp xúc của màng được tăng lên và sự hấp thụ của tế bào được tăng lên nhiều lần (trên 1mm² bề mặt biểu mô ruột có đến 200 triệu vi mao).

Đối với nhiều loại tế bào biểu mô, màng sinh chất ở phần nền thường là phẳng, nhưng đối với một số loại, ví dụ : tế bào biểu mô ống thận có vai trò tích cực trao đổi chất thì màng sinh chất lõm sâu vào khối tế bào chất tạo thành những ô cách nhau và trong các ô chứa nhiều ty thể. Sự phân ô rất phát triển ở các tế bào của tuyến ngoại tiết như tuyến mang tai, tuyến muối của bọ chim biển. Sự phân ô làm tăng diện tích bề mặt của màng, đáp ứng sự vận chuyển tích cực của các chất (ví dụ, bọ chim biển thường uống nước biển và cần phải bài xuất một lượng muối rất lớn ra khỏi tế bào).

4.4. Lớp thành vỏ glycocalix

Đối với nhiều loại tế bào, phía ngoài màng sinh chất còn được bao bởi một lớp thành vỏ (vách, lớp áo) được các nhà tế bào học gọi là lớp glycocalix. Thành phần hóa học lớp glycocalix có bản chất là glucit hoặc dẫn xuất của glucit, chủ yếu có vai trò bảo vệ, nâng đỡ cho màng sinh chất, tuy nhiên trong nhiều trường hợp, chúng tham gia vào các chức năng như vận chuyển chất, trao đổi chất, miễn dịch v.v...

4.4.1. Lớp thành vỏ của tế bào vi khuẩn

Ở tế bào vi khuẩn, ngoài màng sinh chất có độ dày khoảng 10nm, có cấu tạo giống màng sinh chất của tế bào Eucaryota, người ta còn quan sát thấy thành vỏ bao ngoài màng. Lớp thành vỏ có vai trò bảo vệ cho vi khuẩn như một lớp xương ngoài, đồng thời nó duy trì cho tế bào vi khuẩn có áp suất thẩm thấu nội bào cao hơn môi trường ngoại bào. Lớp thành vỏ còn tạo cho vi khuẩn có hình dạng nhất định.

Chính do cấu trúc của lớp thành vỏ, bằng phương pháp nhuộm Gram (nhuộm bằng gentian violet và fucsin) người ta phân biệt hai loại vi khuẩn : vi khuẩn gram (+) và vi

khuẩn gram (-). Lớp vỏ bao của vi khuẩn gram (+) là một lớp đồng nhất dày từ 15-30nm, nằm sát màng sinh chất và được cấu tạo bởi một loại peptidoglycan là murein. Lớp vỏ bao của vi khuẩn gram (-) có cấu trúc phức tạp hơn, có độ dày từ 8-12nm, và gồm 2 lớp : lớp murein nằm sát màng sinh chất, phía ngoài lớp murein là lớp màng lipoprotein (giống màng sinh chất) dính với lớp murein bởi các protein có hình đa diện. Ở một số vi khuẩn, bao ngoài lớp thành vỏ còn có lớp vách bằng polisaccarit. Ở vi khuẩn, lớp thành vỏ có vai trò bảo vệ và nâng đỡ cho tế bào như bộ xương ngoài, đồng thời còn có vai trò kháng nguyên.

4.4.2. Lớp vỏ pectoxenulozơ ở tế bào thực vật

Tế bào thực vật bậc cao cũng như đa số thực vật bậc thấp đều có lớp thành vỏ pectoxenulozơ bao quanh màng sinh chất (trừ trường hợp các tế bào giao tử không có lớp vỏ pectoxenulozơ và lớp vỏ chỉ được hình thành sau khi hình thành hợp tử).

Lớp thành vỏ pectoxenulozơ được cấu tạo từ các polisaccarit : xenulozơ, pectin và hemixenulozơ. Ở các tế bào còn non hoặc đang phân bào thì lớp vỏ còn đơn giản, mỏng (0,5-1µm) và đàn hồi. Ở các tế bào đã biệt hoá, lớp vỏ trở nên phức tạp, dày lên và vững chắc, có cấu tạo sợi và gồm nhiều lớp.

Tùy loại tế bào mà trong lớp thành vỏ có thể tích lũy thêm các chất phức tạp tạo nên các cấu trúc như gỗ (thêm lignin), bần (thêm suberin) v.v...

Lớp thành vỏ pectoxenulozơ có tác dụng bảo vệ và nâng đỡ, tạo nên sức trương và độ cứng chắc của tế bào và cơ thể thực vật. Đồng thời chúng cũng góp phần đáng kể vào sự điều hoà sự vận chuyển chất. Ở nhiều tế bào thực vật, để tăng cường sự trao đổi chất giữa các tế bào cạnh nhau, màng sinh chất cùng với lớp vỏ bao biến đổi tạo nên các plasmodesma, qua đó tế bào chất 2 tế bào cạnh nhau thông thương trao đổi chất với nhau.

4.4.3. Lớp áo (cell coat) ở tế bào động vật

Ở tế bào động vật, tuy không có lớp thành vỏ cứng như ở tế bào thực vật, nhưng các nhà tế bào xem lớp polisaccarit (tuy là một thành phần của các glicolipit và glicoprotein) thò ra ngoài màng sinh chất tạo nên lớp áo (cell coat) tiếp xúc với môi trường. Lớp áo có chức năng bảo vệ, tạo tích điện âm, trao đổi chất, miễn dịch, liên kết giữa các tế bào v.v...

4.5. Tế bào chất và các bào quan

4.5.1. Tế bào chất

Tế bào chất (cytoplasma) là phần tế bào ở trong màng sinh chất và bao quanh nhân. Tế bào chất là nơi chứa các nguyên vật liệu, nơi diễn ra các hoạt động chức năng quan trọng của tế bào như phân huỷ chất, tổng hợp chất, chuyển hoá năng lượng, sinh trưởng, vận động v.v...

Tế bào chất của tế bào nhân chuẩn không phải là khối chất sống đồng dạng mà chúng có cấu tạo rất phức tạp gồm nhiều cấu thành (hình 4.2A và B).

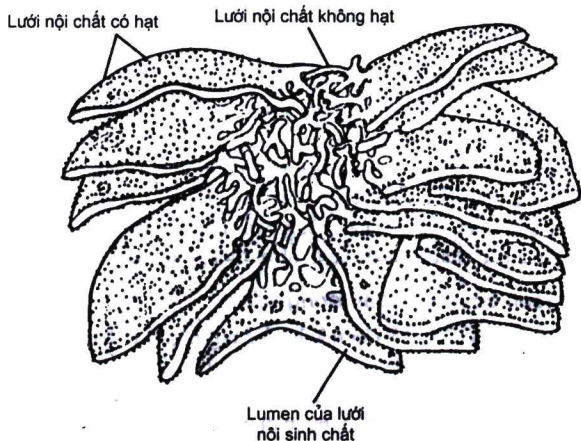
a) Các bào quan (organoide) là các siêu cấu trúc có cấu tạo và chức năng nhất định. Người ta phân biệt loại bào quan có cấu tạo màng lipoprotein đơn như mạng lưới nội sinh chất, bộ máy Golgi, lizoxom, perôxyxom ; các bào quan có cấu tạo màng lipoprotein kép như ty thể, lục lạp, màng nhân và các bào quan không có cấu tạo màng như riboxom, trung tử, vi sợi và vi ống.

b) **Các chất chứa** (inclusion) là các kho tích trữ các nguyên liệu của tế bào : đó là các giọt mỡ trong tế bào mỡ, hạt glicogen trong tế bào gan hoặc tế bào cơ v.v...

c) **Chất trong sáng** (hyaloplasma) hay còn được gọi là **dịch bào** (cytosol) là khối chất còn lại nếu ta tách chiết hết các bào quan và chất chứa khỏi tế bào chất. Chất trong sáng là **dung dịch keo loại** (colloidal solution), chúng chứa H_2O (đến 70%), các chất vô cơ, các chất hữu cơ, các đại phân tử ; là nơi trung chuyển chất từ màng sinh chất cho đến các bào quan, đến nhân và ngược lại. Chất trong sáng cũng là nơi diễn ra nhiều phản ứng sinh hoá quan trọng (ví dụ đường phân), nhiều quá trình hoá lý (như quá trình sol hoá và gel hoá). Độ nhớt, độ pH v.v... của chất trong sáng tuỳ thuộc vào dạng tế bào và tuỳ trạng thái sinh lý của chúng.

4.5.2. **Mạng lưới nội sinh chất (Endoplasmic reticulum)**

Mạng lưới nội sinh chất (MLNSC) là hệ thống mạng lưới có cấu tạo màng lipoprotein giới hạn tạo thành các túi dẹt, các kênh, các bóng liên thông với nhau phân bố khắp tế bào chất (hình 4.9).



Hình 4.9. Cấu trúc của mạng lưới nội sinh chất

Có hai loại MLNSC là MLNSC trơn và MLNSC hạt. MLNSC trơn là hệ thống kênh mà trên màng kênh không có *ribosom*. MLNSC trơn là nơi tổng hợp các chất béo, photpholipit, cholesterol, các hoocmon steroid. MLNSC trơn được xem là hệ thống kênh vận tải nội bào, vì từ đây các chất được tổng hợp có thể được vận chuyển tới các nơi khác, MLNSC trơn còn là nơi tiêu độc, ví dụ trong tế bào gan, các chất độc như rượu, thuốc trừ sâu sẽ được biến đổi hoá học và mất tác dụng độc hại.

MLNSC hạt là loại MLNSC gồm hệ thống túi dẹt mà trên màng của chúng có gắn nhiều *ribosom* - là bào quan chịu trách nhiệm tổng hợp loại protein dùng làm chất chế tiết, protein màng và các protein của lizoxom. Protein được tổng hợp trên *ribosom* của MLNSC hạt sẽ chui vào lòng túi, từ đây các protein được xử lý, chế biến (ví dụ sự tạo nên cấu trúc 3D, gắn thêm glucit) và vận chuyển tới các nơi khác như MLNSC trơn, tới bộ máy Golgi, tới các bóng chuyên chở v.v...

4.5.3. Riboxom (Ribosome)

Riboxom là bào quan có kích thước rất bé từ 25-30nm, nhưng có vai trò vô cùng quan trọng là nơi tổng hợp protein nội bào cũng như các protein chế tiết ra ngoài tế bào.

Riboxom thường phân bố trong tế bào chất, bám trên màng ngoài của màng nhân, bám trên màng của MLNSC hạt, hoặc định khu trong ty thể, lục lạp.

Riboxom có thành phần phân tử gồm rARN và protein. Riboxom của tế bào Eucaryota có hằng số lắng 80S, gồm 2 đơn vị bé : đơn vị bé 60S và đơn vị bé 40S. Đơn vị bé 60S chứa 3 loại rARN (28S ; 5,8S và 5S) và 45 protein, còn đơn vị bé 40S chứa rARN 18S và 33 protein. Khi tổng hợp protein, phân tử mARN bám vào riboxom làm khuôn để các tARN vận chuyển các axit amin tới riboxom, lắp ráp chúng đúng với trình tự do các codon trong mARN quy định (xem thêm phần sau).

Khi tổng hợp protein, nhiều riboxom thường liên kết lại với nhau tạo thành polioxom. Riboxom tự do trong tế bào chất thường được dùng để tổng hợp các protein nội bào ; còn riboxom trên MLNSC hạt thường được dùng để tổng hợp các protein cung cấp cho màng, protein chế tiết ra ngoài, các protein cung cấp cho các bào quan ; riboxom trong ty thể được ty thể dùng làm nơi tổng hợp protein riêng cho ty thể.

4.5.4. Bộ máy Golgi (Golgi apparatus)

Được gọi là bộ máy Golgi là do nhà khoa học người Ý là Camilo Goldgi phát hiện năm 1898. Bộ máy Golgi là một hệ thống gồm nhiều túi dẹt kín và nhiều bóng riêng biệt không thông với nhau (hình 4.8). Chúng cũng có cấu tạo màng lipoprotein giới hạn lòng túi là các xoang kín. Chức năng của bộ máy là tham gia vào khâu xử lý, đóng gói và chế xuất các sản phẩm chủ yếu là protein và glicoprotein. Chúng thu nhận protein từ MLNSC, thu nhận glucit từ tế bào chất vào các túi, trong đó các sản phẩm protein và glicoprotein được hoàn thiện (ví dụ proinsulin được chế biến thành insulin ; protein được glucit hoá tạo thành glicoprotein), sau đó các sản phẩm được đóng gói vào các bóng nhỏ được tách ra từ cái túi. Các bóng nhỏ được chuyển chở tới màng cung cấp protein và glicoprotein cho màng, hoặc bằng hiện tượng xuất bào (exocytosis) để xuất ra ngoài tế bào (ví dụ tiết insulin vào dòng máu của tế bào tuyến đảo tụy, hoặc tiết các enzym tiêu hoá vào ruột non của tế bào tuyến tụy).

Các sản phẩm enzym được đóng gói từ bộ máy Golgi có thể được đưa vào lizoxom tạo thành hệ enzym thủy phân của bào quan này.

4.5.5. Lizoxom (Lysosome) và Peróxyxom (peroxysome)

Lizoxom là bào quan có dạng bóng có kích thước khoảng 0,4 μ m, có cấu tạo màng lipoprotein, giới hạn xoang chứa đầy các enzym tiêu hoá. Có thể xem lizoxom như ống tiêu hoá nội bào. Các bóng nhập bào, các bóng thực bào sau khi được đưa vào tế bào chất, chúng được chuyển đến lizoxom và hoà hợp với lizoxom tạo thành bóng tiêu hoá (hay còn được gọi là lizoxom cấp II). Dưới tác động của các enzym thủy phân của lizoxom, các chất sẽ bị tiêu hoá, phân huỷ. Đó là phương thức tiêu hoá nội bào khác với phương thức tiêu hoá ngoại bào là khi các enzym tiêu hoá được tiết ra trong ống ruột để phân huỷ các chất thức ăn. Nhờ tiêu hoá nội bào mà lizoxom cung cấp cho tế bào các nguyên liệu cần thiết, hoặc tiêu huỷ các vật lạ nguy hiểm (ví dụ vi khuẩn). Lizoxom còn đóng vai trò tự tiêu khi chúng

hoà hợp với các mảnh bào quan vô dụng, hoặc khi màng lizoxom suy yếu, các enzym được giải phóng ra tế bào chất thì toàn bộ tế bào bị tiêu huỷ. Hiện tượng tự tiêu có ý nghĩa trong việc tái sử dụng các bào quan, cũng như trong quá trình sinh trưởng và phát triển của mô và cơ quan (một ví dụ điển hình là đến giai đoạn biến thái nòng nọc biến thành ếch, đuôi bị tiêu biến là nhờ sự tự tiêu do lizoxom hồng màng gây nên).

Người ta đã nghiên cứu hơn 40 bệnh có liên quan đến sai lệch của lizoxom. Ví dụ, bệnh Tay-Sachs thường xảy ra với tần số 1/2500 trong quần thể người Đông Âu, thể hiện ở các hội chứng điếc, mù, bại liệt và sai lệch thần kinh và thường bị chết vào lúc 3 tuổi. Tay-Sachs là một bệnh di truyền, khi em bé mang 2 gen sai lệch dẫn đến tổng hợp các enzym sai lệch trong lizoxom của tế bào thần kinh. Các enzym sai lệch đó không phân huỷ được lipid trong lizoxom, lipid tích lũy nhiều trong lizoxom làm rối loạn chức năng của tế bào thần kinh gây ra hội chứng Tay-Sachs. Bệnh viêm phổi phổ biến ở các công nhân mỏ đá, mỏ than, có nguyên nhân là trong lizoxom tích lũy nhiều hạt bụi silic, hoặc hạt than dẫn đến làm hồng màng lizoxom.

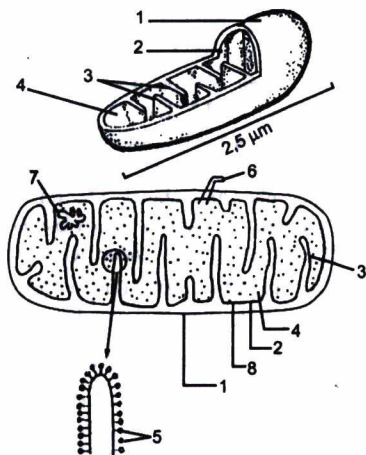
Perôxyxom là bào quan có dạng giống lizoxom nhưng khác ở chỗ, trong xoang perôxyxom có chứa hệ enzym oxy hoá như catalaza có chức năng phân giải chất độc hydro perôxyt (H_2O_2) (nên có tên gọi là perôxyxom).

Perôxyxom đóng vai trò tham gia chuyển hoá các chất ở khâu oxy hoá các sản phẩm cuối cùng như H_2O_2 hoặc axit uric. Axit uric là sản phẩm chuyển hoá của axit nucleic, dưới tác dụng của enzym *uricaza* chứa trong perôxyxom, axit uric sẽ bị phân giải. Điều đặc biệt là ở khỉ cao và người, khác với các động vật có xương sống khác là trong lizoxom của chúng không có enzym *uricaza* nên axit uric không bị phân giải, vì vậy trong nước tiểu của chúng có axit uric. Nếu axit uric tích lũy lại trong các khớp thì chúng gây ra bệnh đau khớp (goutte) thường hay gặp ở tuổi già, nhất là những người hoạt động trí óc nhiều.

4.5.6. Ty thể (Mitochondria)

Ty thể là bào quan phổ biến có trong các tế bào Eucaryota hô hấp hiếu khí. Ty thể có dạng hình que có kích thước chiều ngang $1\mu m$ và chiều dài là $7\mu m$, là trạm cung cấp năng lượng cho các hoạt động sống của tế bào.

Ty thể được cấu tạo gồm hai lớp màng lipoprotein : màng ngoài bao lấy ty thể và màng trong cách màng ngoài một khe gian bào. Hai màng bao lấy một xoang gọi là chất nền. Màng trong mọc vào chất nền nhiều *mào răng lược* (crista) (hình 4.10). Nhờ hệ thống



Hình 4.10. Cấu tạo của ty thể

- | | |
|-------------------------|---------------------|
| 1. Màng ngoài ; | 2. Màng trong ; |
| 3. Mào răng lược ; | 4. Chất nền ; |
| 5. Hạt hình nấm | 6. Riboxom ty thể ; |
| (phức ATP synthetaza) ; | 7. Riboxom ty thể ; |
| 8. ADN ty thể ; | 9. Khe gian màng. |

mào nên bề mặt màng trong được tăng lên nhiều lần, nhờ đó chúng chứa được nhiều protein và enzym - là các cấu thành của dây chuyền điện tử và của quá trình tổng hợp ATP.

Ty thể là nơi thực hiện quá trình, hô hấp hiếu khí. Khi có O_2 , ty thể biến đổi glucôzơ thành CO_2 và H_2O và cung cấp ATP cho tế bào :



Để tiến hành quá trình, đòi hỏi cung cấp O_2 từ tế bào chất và hoạt động của nhiều hệ protein và enzym có mặt trong ty thể.

Đầu tiên glucôzơ được phân giải nhờ quá trình *đường phân* (glycolyse) thành các phân tử axit piruvic. Quá trình đường phân xảy ra không cần đến O_2 được gọi là hô hấp kỵ khí, cung cấp cho tế bào ATP với hiệu suất thấp khoảng 3% (nghĩa là số năng lượng khi phân giải glucôzơ chỉ đủ để tích lũy vào 4 phân tử ATP cung cấp cho tế bào sử dụng). Nếu có O_2 , axit piruvic sẽ đi vào chất nền ty thể, ở đây axit piruvic được oxy hoá bởi hệ enzym có trong chất nền theo một chu trình, được gọi là *chu trình Krebs*, qua đó các điện tử được giải phóng và được truyền đi theo các mức bởi dây chuyền điện tử (gồm các protein và enzym) khu trú trong màng trong. Năng lượng được tách ra từng phần và được sử dụng để tổng hợp ATP nhờ hệ enzym ATP synthetaza có trong màng trong theo công thức $ADP + P \rightarrow ATP$. Như vậy, năng lượng được giải phóng do sự phân giải glucôzơ đã được tế bào tích vào 38 phân tử ATP, đạt hiệu suất cao hơn (40%) so với đường phân.

Vì có sự tổng hợp ATP kèm theo sự oxy hoá nên quá trình hô hấp hiếu khí còn được các nhà hoá sinh gọi là quá trình *oxy-phosphorin hoá*.

ATP được tổng hợp trong ty thể sẽ đi vào tế bào chất và đó là nguồn năng lượng cung cấp cho các quá trình sống như hoạt tải, tổng hợp protein, co cơ, dẫn truyền thần kinh v.v...

Nếu cấu trúc siêu vi hoặc hệ enzym của ty thể bị sai lệch do nhân tố di truyền hay do tác nhân ngoại cảnh sẽ dẫn tới các sai lệch trong hoạt động sinh lý, vì khi đó ty thể không thể tích năng lượng vào ATP mà năng lượng sẽ biến thành nhiệt năng đốt nóng cơ thể (khi chúng ta bị sốt cao).

Trong cơ thể, các tế bào sử dụng nhiều năng lượng thường có nhiều ty thể, ví dụ như tế bào gan, thận có từ 500-1000 ty thể, trong lúc đó các tế bào bạch cầu có rất ít ty thể.

Ty thể là bào quan có hệ di truyền tự lập và hệ tự tổng hợp chất. Trong ty thể có chứa các ADN và các dạng ARN (mARN, tARN, rARN). Mỗi ty thể chứa khoảng 5-10 phân tử ADN trong chất nền. ADN của ty thể cũng có cấu trúc sợi xoắn kép theo mô hình Watson-Crick và giống ADN của vi khuẩn (ADN dạng trần không có histon và có cấu tạo vòng). ADN ty thể chứa hệ gen mã hoá cho khoảng 13 protein của riêng ty thể. ADN ty thể là cơ sở của nhân tố *di truyền ngoài nhân* (ngoài nhiễm sắc thể).

Các dạng mARN, tARN, rARN trong ty thể đều được phiên mã từ ADN ty thể và chúng là cơ sở để ty thể có thể tự tổng hợp lấy một số protein của mình (còn đa số các protein khác của ty thể đều được tế bào chất cung cấp).

Vì ty thể có hệ di truyền tự lập nên ty thể có khả năng tự sinh sản bằng cách phân đôi ty thể mẹ để sinh ra các ty thể con. Thời gian nửa sống của ty thể (thời gian đủ để đổi mới

một nửa số lượng ty thể trong tế bào) là khoảng 10 ngày. Vì lẽ rằng ADN ty thể giống với ADN vi khuẩn và riboxom của ty thể giống riboxom của vi khuẩn về kích thước và thành phần rARN, cũng như có sự giống nhau về cơ chế tổng hợp protein giữa ty thể và vi khuẩn, nên các nhà tế bào học cho rằng, ty thể là kết quả của sự cộng sinh của dạng vi khuẩn hiếu khí trong tế bào trong quá trình tiến hoá sơ khai của tế bào Eucaryota.

4.5.7. Lạp thể, lục lạp

a) *Lạp thể* (plastide) được mô tả bởi Schimper từ 1885, là bào quan chỉ đặc trưng cho tế bào thực vật, trong đó có lục lạp (chloroplast) có liên quan đến quá trình quang hợp. Chính quá trình này đặc trưng cho sự trao đổi chất ở thực vật và sự có mặt của lạp thể, có lẽ là điểm sai khác chủ yếu giữa tế bào thực vật với tế bào động vật.

Ngày nay, người ta thường phân biệt hai nhóm lạp thể lớn : bạch lạp - là lạp thể không màu sắc và sắc lạp - là lạp thể có chứa sắc tố.

- Trong nhóm bạch lạp có : lạp bột (amiloplast) - nơi tổng hợp tinh bột, lạp dầu (oleoplast) - nơi tổng hợp dầu và lạp đạm (proteinoplast) - nơi tập trung protein.

- Còn nhóm sắc lạp gồm có lục lạp là lạp thể màu lục có chứa sắc tố chlorofin, và lạp cà rốt (carotinoidoplast) - là lạp thể có chứa sắc tố màu vàng. Trong rễ cây, lạp thể thường gặp là bạch lạp. Loại bạch lạp phổ biến nhất là lạp bột có số lượng rất lớn trong các phần dinh dưỡng của cây. Vai trò của lạp bột là tổng hợp các "tinh bột dự trữ" từ các sản phẩm của quá trình quang hợp.

Lục lạp có trong các bộ phận có vai trò quang hợp của cây, chủ yếu là trong lá. Còn sắc lạp cà rốt, theo nhiều ý kiến là loại biến dạng của lục lạp, và tạo nên màu sắc khác (vàng, đỏ, da cam...) ở hoa, quả, lá của cây.

Các loại lạp thể ở trên có liên hệ di truyền với nhau và có khả năng chuyển hoá từ loại này sang loại kia trong quá trình phát triển cá thể của thực vật. Ví dụ : bạch lạp có thể biến thành lục lạp (sự hoá xanh của mầm khoai từ chỗ tối ra chỗ sáng), bạch lạp có thể biến thành sắc lạp (khi hình thành củ cà rốt - bạch lạp đã biến thành lạp cà rốt)... Lục lạp có thể biến thành sắc lạp (khi quả chín, màu xanh thành màu đỏ hoặc vàng, về mùa thu lá xanh biến thành lá vàng là do lục lạp trong lá đã biến thành sắc lạp). Quá trình biến đổi trên có thể là ngược chiều (rất nhiều thực vật màu xanh khi để vào chỗ tối thì thành trắng).

b) Lục lạp.

- Cấu trúc lục lạp (hình 4.11)

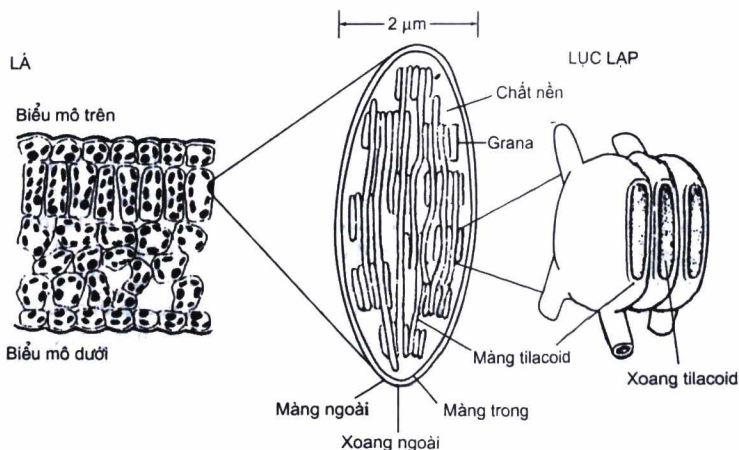
+ Lục lạp là loại lạp thể phổ biến nhất và đóng vai trò quan trọng trong thế giới sinh vật vì lục lạp thực hiện chức năng quang hợp, biến đổi năng lượng ánh sáng mặt trời sang năng lượng hoá học, cung cấp cho toàn bộ cơ thể sống trên trái đất. Không có lục lạp thì tất cả thực vật và động vật không thể tồn tại được.

+ Về hình dạng, kích thước và sự phân bố của lục lạp trong các tế bào khác nhau, ở loài cây khác nhau thì khác nhau, nhưng trong cùng một mô thì chúng tương đối ổn định.

Ở lá của thực vật bậc cao, tế bào chứa một lượng lớn lục lạp có dạng hình cầu, hình trứng hoặc hình đĩa. Tế bào tảo thường chỉ có một lục lạp lớn có dạng hình lưới, hình dải xoắn hoặc hình sao đẹp.

+ Số lượng lục lạp trong tế bào của các mô khác nhau là khác nhau, nhưng trong một chừng mực nào đó, số lượng lục lạp đặc trưng cho loài. Nếu như số lượng thiếu thì lục lạp sẽ phân chia để tăng thêm số lượng, và nếu thừa thì một số lục lạp sẽ thoái hoá đi. Ở thực vật bậc cao, tế bào lá thường chứa 20-40 lục lạp và rất ít gặp một loại tế bào có chứa một hoặc hai lục lạp. Tế bào giao tử *Anthoceros* và tế bào mô phân sinh *Selaginella* chỉ chứa có một lục lạp.

Kích thước lục lạp ở các tế bào khác nhau, ở các loài khác nhau cũng thay đổi khá lớn. Ở thực vật bậc cao, chúng thường có đường kính trung bình 2-4 μ m. Thường thì trong tế bào cùng loài, lục lạp có kích thước không đổi, nhưng lại có sự sai khác về giới tính và di truyền. Ví dụ, trong các tế bào đa bội lục lạp có kích thước lớn hơn so với tế bào đơn bội cùng loài. Thường thì những cây mọc ở chỗ bóng râm lục lạp lớn hơn và chứa nhiều chlorophin hơn so với cây được ánh sáng chiếu thường xuyên.



Hình 4.11. Sơ đồ cấu trúc hiển vi của lục lạp

Lục lạp phân bố trong tế bào chất có khi rất đồng đều, nhưng thường tập trung ở phần gần nhân hoặc ngoại biên gần thành tế bào. Đặc tính phân bố của lục lạp trong tế bào thường phụ thuộc vào điều kiện ngoại cảnh, ví dụ cường độ chiếu sáng. Người ta tính ra rằng ở lá cây *Ricinus communis*, cứ trên mỗi 1mm² có khoảng 400.000 lục lạp. Trong tế bào, lục lạp có thể chuyển chỗ hoặc thay đổi hình dạng do ảnh hưởng của dòng chảy tế bào chất, hoặc có thể tích cực chuyển vận theo amip, hoặc theo kiểu co rút tùy thuộc và cường độ chiếu sáng.

- Thành phần sinh hoá, cấu trúc siêu vi của lục lạp :

Ngày nay nhờ những phương pháp sinh hoá và lý sinh người ta biết rõ thành phần hoá học của lục lạp, bảng 4.3 chỉ rõ thành phần hoá học của lục lạp thực vật bậc cao.

Bảng 4.3. Thành phần hóa học của lục lạp ở thực vật bậc cao

Chất	Hàm lượng % khối lượng khô	Các cấu thành
Protein	35-55	Khoảng 80% không hoà tan
Lipit	20-30	Mỡ 50%, Colin 46%, Sterin 20%, Inozitol 22%, Sáp 16%, Glixêrin 22%, Photphatit 2-7%, Etanolamin 8%.
Gluxit	Thay đổi	Tinh bột : đường có photphat có chứa từ 3-7 nguyên tử C.
Chlorofin	9	Cholorofin a 75% Chlorofin b 25%
Carotinoit	4,5	Xantofin 75%, Carotin 25%
ARN	2-4	
ADN	0,2-0,5	

Trong lục lạp có đến 80% là loại protein không hoà tan có liên kết với lipit ở dạng lipoprotein. Như vậy đa số protein thuộc protein cấu trúc, nhưng một số lớn protein là các enzym. Các enzym chứa trong lục lạp có thể ở dạng hoà tan hoặc định khu trong cấu trúc của màng lục lạp. Thuộc lipit có các mỡ trung tính, các steroid, và photpholipit. Một trong những thành phần sinh hoá quan trọng của lục lạp là chlorofin. Phân tử chlorofin có cấu trúc không đối xứng gồm một "đầu" ưa nước được hình thành từ 4 vòng piron xếp xung quanh nguyên tử magie (Mg) và 1 "đuôi" dài là mạch ghét nước (gọi là mạch fiton). Chlorofin cũng giống sắc tố ở động vật, ví dụ hemoglobin và cytochrom, đều là những pocfirin, chỉ khác là trong phân tử của chúng, nguyên tử Fe được thay bằng Mg. Ngoài chlorofin ra, còn có các carotinoit là những sắc tố có màu khác, nhưng thường bị màu lục của chlorofin che lấp và chỉ về mùa thu ta mới thấy, vì khi đó hàm lượng của chlorofin bị giảm đi. Thuộc carotinoit có carotin và xantofin. Carotin có đặc tính ở chỗ mạch hydrocacbua chưa no ngắn, do đó chúng có tính chất hoàn toàn ghét nước, còn xantofin thì trái lại có chứa vài nhóm ưa nước.

+ Trong lục lạp có chứa axit nucleic. Ngoài ARN (có hàm lượng từ 2-4% khối lượng khô) còn có ADN, tuy với hàm lượng ít (0,2-0,5%) nhưng đóng vai trò quan trọng và đáng chú ý, vì sự có mặt của ADN trong lục lạp có liên hệ với hệ thống di truyền ngoài nhiễm sắc (di truyền tế bào chất), và hệ tự tổng hợp protein của lục lạp. Trong lục lạp có các chất truyền năng lượng và các enzym, NADP, cytochrom, plastokinon, plastoxianin, feredoxin, reductaza, ATP synthetaza và các enzym của chu trình Calvin.

+ Lục lạp có cấu trúc màng lipoprotein, gồm có màng ngoài và màng trong, 2 màng được phân cách bởi khe gian màng. Khác với ty thể ở chỗ màng trong của lục lạp là trơn không có mào. Màng giới hạn phần dịch bên trong gọi là chất nền (stroma). Trong chất nền có chứa nhiều hạt hình cầu có kích thước khác nhau. Nhưng cấu trúc quan trọng nhất của lục lạp là hệ thống cột hình mạng lưới nằm trong chất nền. Hệ thống gồm các cột (grana) được nối với nhau bởi các tấm gian cột (intergrana lamella) (xem hình 4.11). Số cột có thể thay đổi từ vài cột cho đến 50 cột tùy loại lục lạp và cột có đường kính khoảng 0,6µm. Cột

là hệ thống túi dẹt xếp chồng lên nhau. Túi dẹt có chiều dày 20nm và được cấu tạo từ màng lipoprotein dày khoảng 7nm, giới hạn xoang túi được gọi là màng *tilacoid*. Các cột thông với nhau nhờ các tấm gian cột cũng có cấu tạo màng lipoprotein. Màng của tilacoid có chứa các cấu trúc hạt hình nấm có kích thước 10-20nm - là phức hệ ATPsynthetaza. Tilacoid chứa các phân tử chlorofin và carotinoid. Các phân tử chlorofin xếp trong màng có trật tự nhất định - phần ưa nước của chlorofin liên kết với protein đặc trưng trong màng, còn "đuôi" kỵ nước thì liên kết với các photpholipit. Các phân tử chlorofin tập hợp thành từng đồng bộ gồm khoảng 200 phân tử hoạt động như một giàn anten thu bắt foton ánh sáng, được gọi là hệ quang hợp (photosysteme).

Trong màng tilacoid chứa các nhân tố và enzym của dây chuyền điện tử và tổng hợp ATP của hệ quang hợp I và II, còn các enzym chịu trách nhiệm tổng hợp glucôzơ thì định khu trong chất nền của lục lạp, ADN và các loại ARN cũng như riboxom định khu trong chất nền của lục lạp.

- Chức năng của lục lạp :

Lục lạp đóng vai trò vô cùng quan trọng trong đời sống thực vật vì lục lạp chính là nơi thực hiện quá trình quang hợp. Quang hợp là một trong những chức năng sinh học quan trọng bậc nhất. Nhờ chlorofin chứa trong lục lạp mà cây xanh có thể hấp thụ được năng lượng ánh sáng mặt trời ở dạng foton và biến chúng thành năng lượng hoá học trong phân tử ATP - được dùng để tổng hợp các chất hữu cơ khác nhau. Nếu như ty thể bằng phương thức ôxy photphorin hoá, sử dụng và chuyển hoá năng lượng có trong các phân tử thức ăn, thì quang hợp là quá trình ngược lại, hấp thụ và chuyển hoá năng lượng ánh sáng mặt trời tích vào phân tử thức ăn, vì vậy về phương diện cấu trúc và chức năng thì lục lạp và ty thể về nguyên tắc chung chúng rất giống nhau.

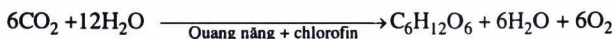
Quá trình quang hợp thực hiện trong lục lạp có mấy giai đoạn sau :

+ Hấp thụ năng lượng ánh sáng foton (nhờ giàn anten chlorofin) và chuyển chúng qua dây chuyền điện tử và cuối cùng vào ADP và ADP biến thành ATP (nhờ phức hệ ATP synthetaza) (quang photphorin hoá. Arnon, 1955).

+ Quang phân nước : $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}^+ + \text{O}^{2-}$ trong đó proton hydro được chuyển sang hệ thống NADP - H (Tegawa 1963) và giải phóng ôxy (O_2). Quá trình này được gọi là phản ứng Hill.

+ Liên kết CO_2 của không khí với đường có mạch 5 cacbon (ribulôzơ-1,5 diphosphat) hình thành hợp chất 6 cacbon và phân giải chúng thành 2 phân tử axit 3-phosphoglixeric (Calvin 1962).

+ Liên kết hydro với axit phosphoglixeric qua NADPH và khử axit này thành aldehyt phosphoglixeric; các đường trio này sẽ được trùng hợp để tạo thành các đường hexo (đồng hoá CO_2); và tái sinh ribulô (chu trình Calvin). Phản ứng tổng kết của quang hợp là :



Giai đoạn 1 và 2 được gọi là giai đoạn sáng và được thực hiện trong cấu trúc màng tilacoid của lục lạp nhờ hệ thống quang hợp I và II. Còn giai đoạn 3, 4 được gọi là giai đoạn tối và được thực hiện trong chất nền của lục lạp và không cần đến ánh sáng và nhờ năng lượng từ ATP và NADPH do phản ứng sáng cung cấp.

Theo thuyết hoá thẩm thấu (chemiosmotic) thì điện tử được truyền đi tạo nên dòng vận chuyển ion H^+ qua màng tilacoid, nhờ đó tạo nên sự khác biệt về pH và điện thế hoạt động đã xúc tiến quá trình tổng hợp ATP.

+ Sự phát sinh của lực lap :

Qua các thế hệ tế bào tính liên tục của lực lap là do lực lap có khả năng tự sinh sản bằng cách phân chia và người ta cũng đã chứng minh rằng, lực lap được hình thành chỉ bằng cách phân chia từ lực lap có trước. Khả năng tự phân chia của lực lap là do lực lap có hệ thống di truyền tự lập riêng (có ADN) và hệ tổng hợp protein tự lập (có chứa riboxom các loại ARN). Riboxom của lực lap giống riboxom của Procaryota. ADN của lực lap cũng có cấu tạo giống ADN của Procaryota (vi khuẩn lam), có cấu trúc vòng, không chứa histon, có chiều dài tối đa $150\mu m$ với hàm lượng $10^{-15} - 10^{-16}g$. ADN của lực lap chứa thông tin mã hoá cho một số protein mà lực lap tự tổng hợp trên riboxom của mình. Còn các protein khác do tế bào cung cấp. ADN lực lap - là nhân tố di truyền ngoài nhiễm sắc thể. Người ta cho rằng, trong quá trình tiến hoá chủng loại, lực lap được hình thành là kết quả cộng sinh của một số loài vi khuẩn lam trong tế bào.

4.5.8. Hệ vi sợi (microfilament) và vi ống (microtubule).

Với kỹ thuật hiển vi điện tử kết hợp với các kỹ thuật hoá lý khác, người ta đã phát hiện được một hệ thống sợi protein khác nhau khu trú trong tế bào chất tạo nên cái gọi là khung xương tế bào (cytoskeleton). Chúng được dùng làm bộ khung nâng đỡ, vừa đóng vai trò vận chuyển và vận động của các bào quan, của nhiễm sắc thể cũng như tế bào chất và toàn bộ tế bào.

Bộ khung xương bao gồm 3 loại sợi protein : vi sợi, sợi trung gian và vi ống.

a) *Vi sợi (microfilament)* là các sợi rất mảnh, có đường kính 7nm, được cấu tạo từ protein *actin* hoặc *miozin*. Các vi sợi actin và vi sợi miozin có kích thước dài ngắn khác nhau được phân bố rải rác hoặc tập hợp thành bó trong tế bào chất, tạo thành hệ nâng đỡ và vận động tế bào chất thay đổi hình dạng, vận động amip, hình thành chân giả khi thực bào. Trong tế bào cơ, các vi sợi actin và miozin liên kết lại tạo thành cấu trúc *tơ cơ* (myofibrille) là cơ sở cơ rút của cơ.

b) *Sợi trung gian (intermediate filament)* là các vi sợi có đường kính lớn hơn khoảng (10nm) được cấu tạo từ nhiều loại protein khác nhau. Các sợi trung gian rất chắc và có vai trò cơ học như giữ cho tế bào có hình dạng nhất định, giữ thế ổn định của các bào quan v.v...

c) *Vi ống (microtubule)* có dạng hình ống dài có đường kính khoảng 25nm. Vi ống được cấu tạo từ protein tubulin. Tùy điều kiện của tế bào như nồng độ ion canxi, magie, độ pH, nồng độ ATP, các phân tử tubulin trùng hợp tạo thành các vi ống có độ dài ngắn khác nhau. Các vi ống có thể phân bố rải rác trong các tế bào chất, tham gia vào bộ khung tế bào, hoặc tập hợp lại thành các bộ máy vận động nội bào như tạo thành *trung tử* (centriole) và *thoi phân bào* để vận chuyển các thể nhiễm sắc về hai cực lúc phân bào. Đối với một số tế bào, vi ống cùng với màng sinh chất tạo thành các *lông* (cilia) hoặc *roi* (flagella) là những cấu trúc được chuyên hoá để vận động.

4.5.9. Lông hay tiêm mao

Lông (Cillia) là bào quan vận động của tế bào. Lông có đường kính 250nm và chiều dài khoảng 2-10 μm .

Trùng lông có đến hàng trăm lông mọc quanh cơ thể, giúp cho chúng bơi trong nước.

Các tế bào lót ống hô hấp của động vật có xương sống thường có đến hàng trăm lông mọc ở mặt ngoài tế bào. Khi chúng chuyển động theo nhịp sóng tạo nên dòng chảy ngăn các bụi bặm, vi khuẩn xâm nhập vào phổi.

Lông được cấu tạo gồm lớp vỏ màng sinh chất dính với màng sinh chất của tế bào và bó vi ống gồm 9 đôi vi ống xếp ở ngoại vi và 2 vi ống xếp ở trung tâm (được gọi là kiểu 9 + 2). Khi có ATP và các ion canxi, các vi ống sẽ co rút nhịp nhàng tạo nên sự vận động của lông.

Những người nghiện thuốc lá, thuốc lào các lông bị huỷ hoại, ống hô hấp tích lũy nhiều chất nhầy bắn gây nên các cơn ho vào buổi sáng, đồng thời dễ bị nhiễm khuẩn đường hô hấp.

4.5.10. Roi hay tiên mao

Roi (Flagella) cũng là bào quan vận động của tế bào. Roi có số lượng ít hơn lông (thường một tế bào chỉ có một hoặc hai roi) có đường kính giống như lông, nhưng có chiều dài dài hơn, đạt tới 200µm.

Trùng roi có 1 hoặc 2 roi mọc ở phía trước cơ thể, giúp chúng di chuyển trong nước.

Tinh trùng của nhiều thực vật và động vật có roi (đuôi tinh trùng) giúp chúng di chuyển gặp tế bào trứng khi thụ tinh.

Roi cũng có cấu tạo siêu hiển vi giống lông, nhưng khác về kiểu vận động. Khi roi vận động làm cho tinh trùng tiến về phía trước. Trong tinh dịch đàn ông, những tinh trùng cụt đuôi hay đuôi bị dị dạng là những tinh trùng hỏng không có khả năng chuyển động hoặc chuyển động không đúng hướng, do đó tinh dịch chứa nhiều tinh trùng như vậy sẽ dẫn đến vô sinh.

4.6. Cấu trúc hiển vi và siêu hiển vi của nhân

Nhân tế bào (nucleus) là cấu thành bắt buộc của tế bào Eucaryota, vì trong nhân có chứa thể nhiễm sắc, là cấu trúc mang vật chất di truyền (ADN) của tế bào và của cơ thể (mỗi tế bào thường có một nhân).

Đối với tế bào Prokaryota được xem là không có nhân và phần tế bào chất có chứa phân tử ADN trần (được gọi là *nucleoid*) được xem là tương đương với nhân của Eucaryota.

Trong cơ thể người, các hồng cầu không có nhân là hiện tượng thứ sinh, hồng cầu được biệt hoá từ các tế bào có nhân là hồng bào. Hồng cầu thoái hoá nhân để tăng cường khối lượng chứa hemoglobin phù hợp với chức năng chuyên chở O₂ và CO₂. Chúng mất nhân nên không có khả năng sinh sản và chỉ sống trong thời hạn 120 ngày.

Có nhiều loại tế bào có thể có đến 2 hoặc 3 nhân, được gọi là tế bào đa nhân, ví dụ tế bào gan. Tế bào cơ vân có hàng trăm nhân là dạng hợp bào.

Nhân có kích thước từ 5-10µm, tùy loại tế bào và dễ dàng quan sát thấy qua kính hiển vi quang học.

Nhân có cấu tạo gồm các cấu thành sau : màng nhân bao lấy dịch nhân, trong dịch nhân có chất nhiễm sắc và hạch nhân (hình 4.2 A và B).

4.6.1. Màng nhân (nuclear membrane)

Màng nhân là lớp màng kép có thành phần lipoprotein, gồm màng ngoài và màng trong, giữa hai màng là khe gian màng. Màng nhân không liên tục mà chứa đầy lỗ xuyên

qua hai màng, làm thông dịch nhân với tế bào chất. Lỗ có kích thước 70-90nm, có cấu trúc phức tạp và chứa protein có tác dụng kiểm tra sự trao đổi chất giữa nhân và tế bào chất. Vào cuối tiền kỳ của phân bào, màng nhân biến mất để giải phóng cho các nhiễm sắc thể di chuyển về hai cực và được tái tạo lại ở mặt kỳ của phân bào.

4.6.2. Dịch nhân (caryolymph)

Dịch nhân là pha lỏng của nhân, có đặc tính lý hoá khác với tế bào chất. Dịch nhân là nơi diễn ra các quá trình quan trọng trong nhân như tái bản mã, phiên mã. Chúng chứa các nhân tố và các enzym cần thiết cho tái bản mã như ADN polimeraza, cho phiên mã như các rARN polimeraza, các nucleaza... Dịch nhân là nơi trung chuyển các sản phẩm của nhân như riboxom, các mARN, tARN, v.v... ra tế bào chất và các sản phẩm của tế bào chất vào nhân như các protein, các enzym cần cho hoạt động của nhân.

4.6.3. Hạch nhân (nucleolus)

Hạch nhân hay là nhân con có dạng cầu, có kích thước 1-2 μ m (hình 4.2.A và B). Mỗi tế bào thường có một hạch nhân. Hạch nhân xuất hiện trong dịch nhân ở mặt kỳ và mất đi ở tiền kỳ của phân bào. Tính chất mất đi và tái hiện của hạch nhân liên quan đến chức năng của chúng. Chúng là nơi tạo thành và dự trữ riboxom của tế bào. Ở gian kỳ là thời kỳ tế bào tích cực tổng hợp protein cần rất nhiều riboxom, hạch nhân được tạo thành do sự phiên mã của các gen rARN và sự tập hợp các protein để tạo thành riboxom, từ đây riboxom đi ra tế bào chất đáp ứng nhu cầu tổng hợp protein cho tế bào.

4.6.4. Chất nhiễm sắc (chromatine) và nhiễm sắc thể (chromosome)

Trong dịch nhân, ADN liên kết với protein (protein kiềm - histon và các protein axit) ở dạng sợi mảnh, xoắn với nhau tạo thành *chất nhiễm sắc*.

Có tên gọi là chất nhiễm sắc vì khi nhuộm tế bào ở giai đoạn gian kỳ bằng thuốc màu kiềm, chúng xuất hiện dưới kính hiển vi ở dạng các hạt bé, các sợi mảnh bắt màu phân bố khắp dịch nhân. Bước vào tiền kỳ của phân bào, chất nhiễm sắc bị biến đổi, chúng xoắn và co ngắn lại, tách ra thành các thể có kích thước từ vài micron đến chục micron, được gọi là *nhiễm sắc thể (chromosome)*. Trong mỗi tế bào người có 46 nhiễm sắc thể.

Như vậy chất nhiễm sắc và nhiễm sắc thể chỉ khác biệt nhau về cấu trúc vật lý và trạng thái hoạt động, còn chúng giống nhau về phương diện hoá sinh và cấu thành phân tử.

Chất nhiễm sắc (cũng như nhiễm sắc thể) được cấu tạo từ protein (60%) và ADN (40%). Trong đó ADN là vật chất mang thông tin di truyền, còn protein có vai trò bảo vệ và điều chỉnh.

ADN trong 46 nhiễm sắc thể của người chứa đến 6.10^9 cặp nucleotit, nếu kéo thẳng ra chúng dài gần 2 mét, trong lúc đó kích thước của nhân chỉ có 5 μ m, như vậy chuỗi ADN phải đóng gói làm sao để nằm gọn trong nhân mà vẫn có thể hoạt động chính xác theo thời gian và không gian hạn hẹp.

Chương 5

NHIỄM SẮC THỂ CỦA TẾ BÀO – TỔ CHỨC CHỨA ADN

I - CẤU TRÚC NHIỄM SẮC THỂ

1.1. Kỹ thuật nghiên cứu nhiễm sắc thể. Kiểu nhân

Nhiễm sắc thể được phát hiện rất sớm nhờ nghiên cứu hiện tượng phân bào có tơ (Hertwig, 1875 ; Flemming, 1880, 1882 ; Van Beneden, 1883). Từ 1883, Roux đã đưa ra ý kiến là nhiễm sắc thể tham gia vào hiện tượng di truyền và đến năm 1887 Weisman đã đề xuất học thuyết nhiễm sắc thể về di truyền. Có thể nói hơn 100 năm qua, chưa có một cấu trúc sinh học nào như nhiễm sắc thể được tập trung nhiều phòng thí nghiệm, nhiều nhà nghiên cứu, nhiều phương tiện kỹ thuật và kinh phí để nghiên cứu, nhằm mục đích làm sáng tỏ cấu trúc phân tử, siêu vi cũng như cơ chế hoạt động của chúng trong tế bào.

Thường thường người ta sử dụng các tế bào, mô đang phân bào *in vivo*, cũng như *in vitro* ở trung kỳ, là giai đoạn thể hiện rõ nhất cấu trúc hình thái của nhiễm sắc thể, với mục đích nghiên cứu kiểu nhân của một cơ thể nào đấy.

Ví dụ ở người, các nhà nghiên cứu sử dụng các sợi bào (fibroblast) hoặc tế bào limpho (lymphocyte) trong nuôi cấy *in vitro*, trong môi trường dinh dưỡng có thêm chất kích thích chuyển hóa là PHA (Phytohemagglutinin). Người ta làm đồng thời hóa sự phân bào của cả chủng quần và dùng chất colchicine để ách trung kỳ lại. Các tế bào nuôi cấy được ly tâm, cố định bằng dung dịch Carnoy và được xử lý bằng sắc nhuộm tương với mục đích giải phóng và phân tán các nhiễm sắc thể của trung kỳ, định vị trong một mặt phẳng nhất định và được nhuộm màu bình thường, nhuộm màu huỳnh quang, hoặc nhuộm màu cắt băng và quan sát dưới kính hiển vi. Bức ảnh của bộ nhiễm sắc thể phân tán trong một mặt phẳng nhất định chụp ảnh được, và sau đó được sắp xếp theo một thứ tự nhất định để quan sát, nghiên cứu được gọi là *kiểu nhân* (caryotype) (hình 5.1).

Kiểu nhân của tế bào sẽ cho ta biết được hình dạng, kích thước và số lượng của các nhiễm sắc thể cần nghiên cứu. Sử dụng biểu đồ kiểu nhân có tầm quan trọng trong nghiên cứu di truyền tế bào, trong y học lâm sàng chẩn đoán bệnh di truyền, bệnh ung thư, trong phân loại học cũng như trong công tác chọn giống cây trồng và vật nuôi.

Để nghiên cứu cấu trúc phân tử và siêu hiển vi của nhiễm sắc thể, người ta phải sử dụng kỹ thuật hiển vi điện tử và các kỹ thuật lý hóa phức tạp khác nhau của sinh hóa học và sinh học phân tử.

Ngày nay người ta thường dùng thuật ngữ nhiễm sắc thể để chỉ cơ cấu di truyền (ADN và ARN) của bất kỳ cơ thể nào kể cả virus, vi khuẩn, thực vật, động vật và con người. Ở đây chúng ta nghiên cứu nhiễm sắc thể của tế bào nhân chuẩn.

1.2. Hình thái nhiễm sắc thể

1.2.1. Kích thước nhiễm sắc thể

Nhiễm sắc thể của tế bào nhân chuẩn quan sát được ở trung kỳ thường có dạng hình chấm hoặc hình que, thường có kích thước vào khoảng $0,2\mu\text{m}$ đến $3\mu\text{m}$ đường kính và $0,2\mu\text{m}$ đến $50\mu\text{m}$ chiều dài. Ví dụ nhiễm sắc thể ở người, cái bé nhất là thể nhiễm sắc số 21 và 22 có kích thước $l = 1,5\mu\text{m}$; còn chiếc lớn nhất là nhiễm sắc thể số 1 có $l = 10\mu\text{m}$. Về kích thước thì ở các tế bào khác nhau là không giống nhau, nhưng chúng đặc trưng cho các tế bào và cá thể của cùng một loài. Tuy nhiên, có trường hợp trong các mô khác nhau của cùng một cơ thể có sự biến đổi về hình dạng và kích thước nhiễm sắc thể để thích nghi với chức năng của một giai đoạn phát triển. Ví dụ, trong tế bào của mô tuyến nước bọt ấu trùng bọ 2 cánh như ruồi quả chằng hạn (*Drosophila*), người ta quan sát thấy các nhiễm sắc thể khổng lồ (còn được gọi là thể nhiễm sắc thể đa sợi) có kích thước đạt tới $l = 300\mu\text{m}$ và $d = 20\mu\text{m}$, nghĩa là lớn gấp hàng chục lần so với nhiễm sắc thể bình thường có ở các mô khác của cơ thể ruồi.

1.2.2. Số lượng nhiễm sắc thể

Số lượng nhiễm sắc thể là một chỉ tiêu đặc trưng cho loài và bộ nhiễm sắc thể. Theo quy luật chung, mỗi một cá thể trong cùng một loài có số lượng nhiễm sắc thể đặc trưng cho loài đó. Ví dụ :

Người (*Homo sapiens*) $2n = 46$.

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

Khỉ Maca (*Macaca rhesus*) $2n = 42$.

Ếch (*Rana sp*) $2n = 26$.

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

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

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

Đậu (*Pisum sativum*) $2n = 14$.

Ngô (*Zea mays*) $2n = 20$.

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

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

+ Bộ nguyên bội (monoploid) được ký hiệu là x , là bộ đơn bội khởi nguyên từ đó hình thành các bộ đơn bội, lưỡng bội, đa bội. Đối với bộ lưỡng bội $2n$ thì bộ nguyên bội chính là bộ đơn bội n .

+ Bộ đơn bội (haploid) ký hiệu là n , đặc trưng cho các tế bào, cơ thể đơn bội cũng như các tế bào sinh dục chín (các giao tử) ở cơ thể sinh sản hữu tính. Ví dụ ở người, tinh trùng

và tế bào trứng có $n = 23$ nhiễm sắc thể. Tuy nhiên có nhiều cơ thể đơn bội, ví dụ, ở nhiều bọ côn trùng (ong, kiến...) con đực là cá thể đơn bội, trong lúc đó con cái là lưỡng bội. Bộ đơn bội trong giao tử được hình thành do sự phân ly của bộ lưỡng bội (do giảm phân). Bộ đơn bội trong cơ thể đơn bội (ví dụ ong đực) là do sự phát triển của trứng đơn bội (không được thụ tinh).

+ Bộ lưỡng bội (diploid) ký hiệu $2n$, đặc trưng cho các tế bào và cơ thể lưỡng bội. Trong cơ thể sinh sản hữu tính, các tế bào soma có chứa $2n$ nhiễm sắc thể. Ví dụ ở người, $2n = 46$ là tập hợp 23 nhiễm sắc thể của tinh trùng và 23 nhiễm sắc thể của tế bào trứng sau khi thụ tinh tạo thành hợp tử có $2n = 46$. Bộ lưỡng bội được hình thành do sự kết hợp của 2 bộ đơn bội (do thụ tinh).

Như vậy trong cơ thể lưỡng bội, nhiễm sắc thể tồn tại thành từng cặp (một từ bố và một từ mẹ) được gọi là cặp *nhiễm sắc thể tương đồng*, cặp được hình thành từ lúc thụ tinh ($2n$) và phân ly lúc phân bào giảm nhiễm (n).

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

Nhiều trường hợp các loài trong một chi (genus) có số lượng nhiễm sắc thể tạo thành dãy đa bội, và người ta phân biệt số nguyên bội (monoploid) là x từ đó hình thành các dạng đa bội và tên của dạng đa bội được gọi theo bội số của x chứ không phải của n .

Ví dụ : ở lúa mì (*Triticum*) có dãy đa bội là :

Triticum monococum $2n = 14$ ($x = 7, n = 7$) là lưỡng bội.

Triticum dicocum $4n = 28$ ($x = 7, n = 14$) là tứ bội.

Triticum vulgare $6n = 42$ ($x = 7, n = 21$) là lục bội.

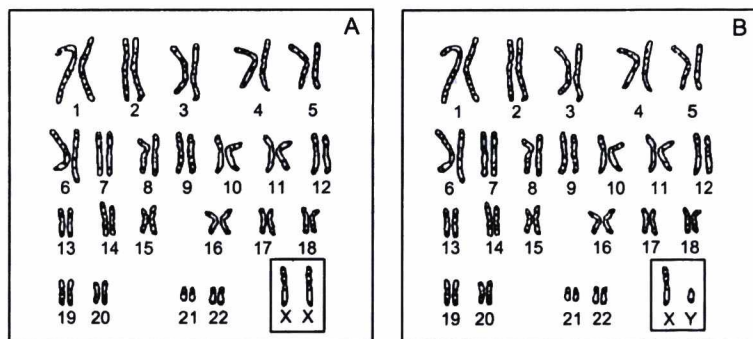
Trong đó số nguyên bội $x = 7$, còn đơn bội $n = 1/2$ số đa bội.

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

1.3. Cấu trúc hiển vi của nhiễm sắc thể

1.3.1. Nhiễm sắc thể thường và nhiễm sắc thể giới tính

Trong bộ lưỡng bội ($2n$) thường tồn tại nhiều cặp tương đồng, ví dụ ở người có 23 cặp tương đồng, mỗi cặp gồm 2 thành viên (1 nhiễm sắc thể từ bố - n của bố, 1 từ mẹ - n của mẹ) giống nhau về hình dạng, kích thước. Những cặp như thế được gọi là *nhiễm sắc thể thường* (autosome). Ngoài ra còn có 1 cặp trong đó 2 thành viên khác nhau về hình dạng, kích thước hoặc trạng thái hoạt động được gọi là *nhiễm sắc thể giới tính* (sex chromosome). Ví dụ ở người có 22 cặp nhiễm sắc thể thường và 1 cặp (cặp thứ 23) là nhiễm sắc thể giới tính. Ở nam giới, cặp nhiễm sắc thể giới tính là XY, còn ở nữ giới là XX (hình 5.1).



Hình 5.1. Caryotip của nam (A) ; của nữ (B)

Cặp nhiễm sắc thể giới tính là cơ sở di truyền để xác định giới tính và xác định tính di truyền liên kết giới tính ở đa số cơ thể sinh sản hữu tính.

1.3.2. Trung tiết (Centromere)

Trung tiết là cấu trúc định khu trên chiều dọc nhiễm sắc thể ở vùng được gọi là eo thắt cấp 1. Trung tiết là vùng phân hóa của nhiễm sắc thể có vai trò dính kết 2 nhiễm sắc tử với nhau, đồng thời giúp cho nhiễm sắc tử phân ly khỏi nhau và di chuyển về hai cực tế bào nhờ các sợi của thoi. Ở trung kỳ phân bào, dễ dàng quan sát thấy trung tiết vì trung tiết là nơi 2 nhiễm sắc tử dính kết với nhau. Ở trung kỳ sớm, trung tiết phân hoá thành 2 tâm động (kinetochore) là nơi nhiễm sắc thể dính với các sợi của thoi phân bào ở cả 2 phía đối mặt với 2 cực. Nghiên cứu về sinh học phân tử cho biết, vùng trung tiết (của nhiễm sắc thể của Nấm men - *S. cerevisiae*) được cấu tạo gồm đoạn ADN không có cấu trúc nucleoxom, chứa khoảng 110 - 120 cặp nucleotit gồm 3 đoạn, đoạn I và đoạn III ở hai đầu và cuối, đoạn II ở giữa, trong đó đoạn II có khoảng 90 nucleotit và giàu A-T (>90%) có khả năng liên kết với protein của sợi tâm động của thoi phân bào tạo thành tâm động. Đối với cơ thể bậc cao, trung tiết chứa ADN dài hơn nhưng đều là ADN có trình tự nucleotit lặp không mã hóa.

Trung tiết chia nhiễm sắc thể thành 2 vế, chiều dài của 2 vế phụ thuộc vào vị trí trung tiết. Người ta thành lập chỉ số trung tiết (centromere index - Ic) để xác định vị trí của trung tiết và phân loại các nhiễm sắc thể.

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

P : chiều dài vế ngắn.

Q : chiều dài vế dài.

- Nhiễm sắc thể tâm mút (acrocentric chromosome) có trung tiết ở đầu mút của nhiễm sắc thể (có vế P rất ngắn).

- Nhiễm sắc thể cận mút (telocentric chromosome) có trung tiết ở gần đầu mút của nhiễm sắc thể (Q > P). Ví dụ, nhiễm sắc thể số 21, 22 ở người.

- Nhiễm sắc thể cận tâm (submetacentric chromosome) có trung tiết ở gần chính giữa ($Q > P$). Ví dụ nhiễm sắc thể số 9, 10 ở người.

- *Nhiễm sắc thể cân tâm* (metacentric chromosome) có trung tiết ở chính giữa chia 2 về bằng nhau ($Q = P$). Ví dụ, nhiễm sắc thể số 1 ở người.

1.3.3. Tiết mút (telomere)

Mỗi nhiễm sắc thể chứa 1 phân tử ADN liên kết với protein tạo thành các sợi nhiễm sắc xoắn, gấp khúc chạy suốt nhiễm sắc thể. Đầu tận cùng của phân tử ADN ở đầu tận cùng của nhiễm sắc thể được gọi là tiết mút. Từ năm 1938, Herman J. Muller gọi đầu tận cùng nhiễm sắc thể là tiết mút (telomere) và chứng minh rằng, các nhiễm sắc thể bị tác động tia X làm đứt gãy tiết mút sẽ không còn khả năng truyền cho thế hệ sau. Khi nghiên cứu trên nhiễm sắc thể của ngô, bà Barbara McClintock đã chứng minh: các nhiễm sắc thể bị đứt gãy tiết mút có xu thế dính kết với các đoạn nhiễm sắc thể khác bị mất tiết mút và như vậy tiết mút có vai trò giữ cho các nhiễm sắc thể trong bộ không dính kết với nhau. Như vậy tiết mút có cấu trúc đặc biệt. Những dẫn liệu về cấu trúc phân tử đã chứng minh là tiết mút có ba chức năng quan trọng: (1) ngăn cản không cho enzym deoxiribonucleaza phân giải đầu tận cùng của phân tử ADN, (2) ngăn cản không cho các nhiễm sắc thể trong bộ dính kết với nhau và (3) tạo thuận lợi cho sự tái bản ADN ở phần đầu cuối của phân tử. Tiết mút có cấu trúc và thành phần nucleotit đặc thù gồm những đoạn lặp nucleotit, tuy ở các loài khác nhau thì khác nhau nhưng thường thể hiện theo phương thức $5' - T_{1-4} A_{0-1} G_{1-8} - 3'$. Ví dụ, ở người cũng như các động vật có xương sống, đoạn lặp đó là TTAGGG, ở bọt đơn bào *Tetrahymena thermophila* có đoạn lặp là TTGGGG, ở thực vật *Arabidopsis thaliana* có đoạn lặp là TTTAGGG. Đối với động vật có xương sống, thì đoạn lặp TTAGGG mang tính ổn định cao và đã được phát hiện thấy trên 100 loài khác nhau, bao gồm động vật có vú, chim, bò sát, ếch nhái và cá. Số lượng đoạn lặp thay đổi tùy loài, tùy nhiễm sắc thể trong bộ của loài, hoặc ngay trong một nhiễm sắc thể nhưng ở các tế bào biệt hóa khác nhau. Ở người trong các tế bào soma lành (không bị ung thư), tiết mút thường chứa tới 500 - 3000 đoạn lặp TTAGGG và chúng bị bớt dần dần theo tuổi thọ. Trái lại trong các tế bào dòng sinh dục và tế bào ung thư thì số lượng đoạn lặp của tiết mút không bị bớt đi theo tuổi. Nhiều nghiên cứu về thành phần nucleotit và cấu trúc phân tử của tiết mút đã chứng minh rằng, các trình tự lặp nucleotit của tiết mút được tạo nên với sự tham gia của enzym telomeraza (nếu thiếu enzym telomeraza các điểm mút sẽ bị ngắn dần dần tới làm mất các gen quan trọng) và có các protein đặc thù liên kết với tiết mút tạo nên tính bền vững của tiết mút (không cho các nhiễm sắc thể dính nhau). Như vậy tiết mút có vai trò không chỉ là ngăn cản không cho các nhiễm sắc thể trong bộ dính kết lại với nhau, mà đồng thời còn tham gia vào sự điều chỉnh tần số phân bào. Nhiều dẫn liệu còn cho rằng, tiết mút còn có vai trò tạo điều kiện cho các nhiễm sắc thể tương đồng nhận biết nhau và bắt cặp ở tiền kỳ giảm phân I.

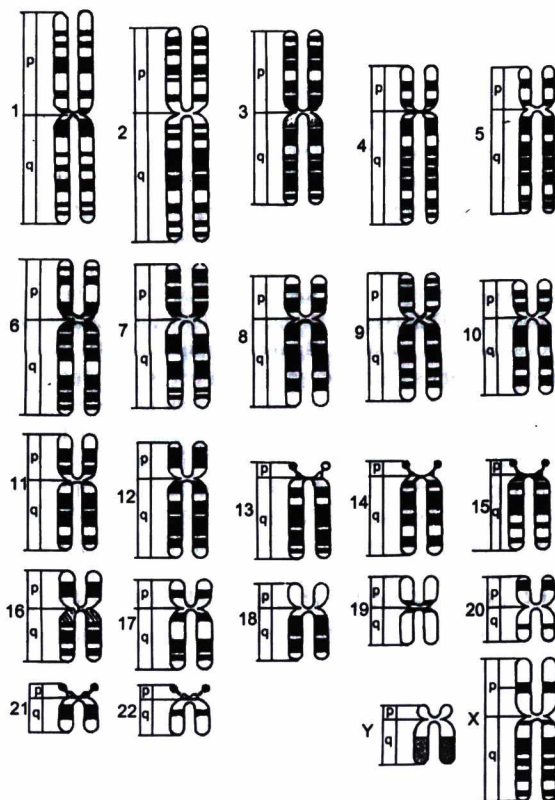
Đa số các tế bào soma của người thiếu hoạt tính của enzym telomeraza, và khi các tế bào soma được đem nuôi cấy invitro, chúng có số lượng lần phân bào hạn chế (chỉ khoảng 20-70 lần), sau đó đi vào thoái hóa và chết. Người ta đã quan sát thấy tỷ lệ chiều dài của tiết mút với số lần phân bào. Tế bào có tiết mút dài hơn có số lần phân bào nhiều hơn, tức là sống lâu hơn. Các tế bào ung thư được coi là "bất tử" trong nuôi cấy in vitro, chúng luôn phân bào vì các tế bào con luôn có hoạt tính telomeraza như tế bào mẹ (tiết mút không bị ngắn đi qua mỗi lần phân bào). (Cũng do đây có người đề nghị sử dụng chất ức chế enzym

telomera như là tác nhân chống ung thư vì hoạt tính phân bào của chúng sẽ bị ức chế và giảm dần). Khi nghiên cứu những người bị bệnh già trước tuổi (progeria) đã có biểu hiện sự già ở tuổi 8-10, giống các cụ già 70-80, người ta thấy rằng tiết mủ của các tế bào soma của họ rất ngắn do đó khả năng tăng sinh tế bào invitro bị giảm hẳn. Chắc chắn là có sự tương quan giữa chức năng của tiết mủ với sự già.

1.3.4. Các băng nhiễm sắc (chromosome bands) (hình 5.2)

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

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



Hình 5.2. Bản đồ băng của bộ nhiễm sắc thể

1.4. Cấu trúc siêu vi của nhiễm sắc thể

1.4.1. Sợi nucleoxom (hình 5.3)

Trong nhiễm sắc thể, ADN liên kết với protein tạo nên cấu trúc sợi xoắn nhiều cấp, được gọi là sợi nhiễm sắc. Sợi nhiễm sắc cơ bản có đường kính 11nm, là chuỗi hạt cườm, được gọi là sợi nucleoxom (nucleosome fiber).

Mỗi hạt cườm là một nucleoxom có kích thước 11nm dạng khúc giò gồm lõi được cấu tạo bởi 8 phân tử histon (2H₂A, 2 H₂B, 2 H₃, và 2 H₄). Sợi xoắn kép ADN cuốn xung quanh lõi histon với $1\frac{3}{4}$ vòng (chứa khoảng 146 cặp nucleotit). Các nucleoxom nối với nhau qua sợi xoắn kép ADN dài khoảng 60 nucleotit. Các sợi nucleoxom 11nm gấp khúc, cuộn lại nhờ các histon H₁, mỗi cuộn gồm 6 nucleoxom, để tạo thành các sợi nhiễm sắc lớn hơn có đường kính 30nm, được gọi là sợi solenoid (solenoid fiber), chắc rằng trong nhân gian kỳ, các sợi nhiễm sắc tồn tại ở trạng thái các sợi solenoid.

1.4.2. Các cấp độ cấu trúc của sợi nhiễm sắc

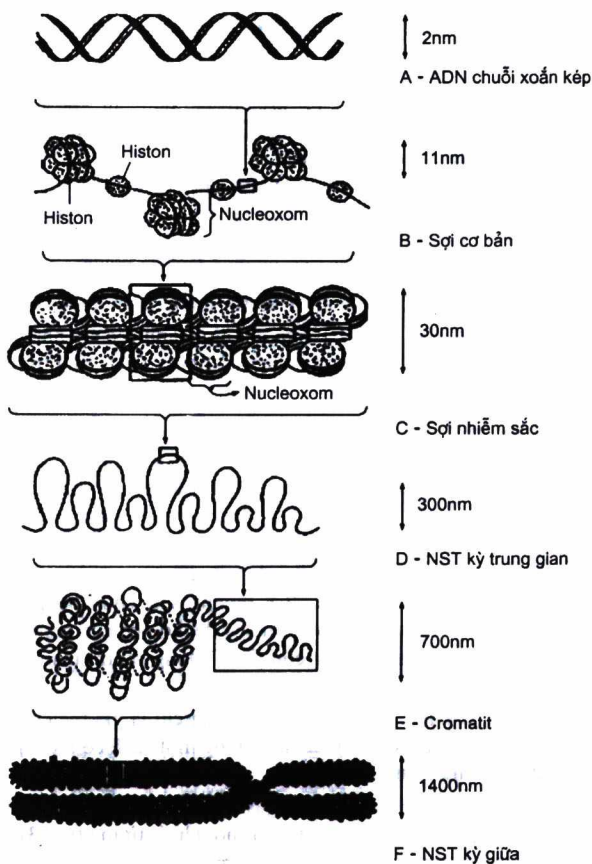
Sợi 30nm sẽ gấp khúc tạo nên các vòng bên (looped domains) chứa khoảng 20.000 – 80.000 cặp nucleotit và có kích thước khoảng 300nm. Các sợi 300nm sẽ cuộn lại tạo nên các sợi nhiễm sắc ở cấp độ lớn hơn từ 700nm đến 1400nm, tức là các nhiễm sắc tử và nhiễm sắc thể thấy rõ ở trung kỳ của phân bào (hình 5.3). Nhiều tác giả cho rằng cấu trúc vòng bên là đơn vị hoạt động của gen và thể hiện rõ nhất ở các cấu trúc vòng bên của thể nhiễm sắc khổng lồ (giant chromosome), hoặc thể nhiễm sắc chổi bóng đèn (lampbrush chromosome). Ngoài protein histon, trong nhiễm sắc thể còn có các protein axit, chúng rất đa dạng về thành phần và chức năng, nhưng chủ yếu là đóng vai trò tham gia điều hòa hoạt động của gen.

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

Trong các tế bào soma và tế bào sinh dục nguyên thủy, nhiễm sắc thể tồn tại thành cặp 2n (ví dụ, người 2n = 46) gồm một chiếc từ bố và một chiếc từ mẹ (n=23) được gọi là cặp tương đồng, do đó các locut gen định vị trên cặp tương đồng đều tạo thành cặp gen - alen, chúng phân ly qua phân bào giảm nhiễm và tái tổ hợp qua thụ tinh. Trong tế bào soma, gen-alen phối hợp hoạt động theo quy luật nhất định để tạo nên các tính trạng của cơ thể (xem phần sau).

Trong mỗi nhiễm sắc thể được phân hoá thành các cấu trúc có vai trò nhất định như vùng chất nhiễm sắc thực (eurochromatine), vùng chất dị nhiễm sắc (heterochromatine), vùng trung tiết hay tâm động (centromere), vùng tận cùng hay tiết mút (telomere).

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



Hình 5.3. Cấu trúc siêu vi và phân tử của nhiễm sắc thể

Trong bộ nhiễm sắc thể có các cặp phân hoá khác nhau : các cặp nhiễm sắc thể thường (autosome), cặp nhiễm sắc thể giới tính (gonosome), cặp nhiễm sắc thể có thể kèm và chứa vùng NOR – nơi định khu các gen rARN.

1.4.3. Chất nhiễm sắc thực (Eurochromatine)

Trong nhân gian kỳ, các vùng chất nhiễm sắc thực gồm các sợi nhiễm sắc ít cô đặc hơn và thường ở dạng các sợi nucleoxom. Về mặt di truyền chúng chứa các gen hoạt động. Trong các vùng này ADN thường chứa các gen không lặp và được phiên mã cho ra các mARN, tARN và rARN 5S...

1.4.4. Chất dị nhiễm sắc (Heterochromatine)

Trong nhân gian kỳ, chất dị nhiễm sắc chiếm đến 90% chất nhiễm sắc, thường biểu hiện ở dạng các bụi rất đậm đặc, trong đó chứa các đoạn ADN không hoạt động (không phiên mã) và rất giàu histon H_1 . Chất dị nhiễm sắc tồn tại ở 2 dạng :

- Dạng ổn định là dạng chứa ADN không có cấu trúc gen (nghĩa là không chứa mã), hoặc là một đoạn hay cả nhiễm sắc thể trong suốt chu kỳ tế bào vẫn giữ ở trạng thái cô đặc (ví dụ chất nhiễm sắc giới tính - thể Barr là một nhiễm sắc thể X, hoặc một phần nhiễm sắc thể Y là thuộc chất dị nhiễm sắc ổn định).

- Dạng tạm thời là dạng trong đó các gen bị đóng. Sự không hoạt động của một phần nhiễm sắc thể không làm thay đổi cấu trúc gen của chúng. Các gen hoạt động theo kiểu đóng, mở tùy loại tế bào qua quá trình biệt hóa, không thuộc dạng chất dị nhiễm sắc.

II - HỌC THUYẾT NHIỄM SẮC THỂ CỦA DI TRUYỀN

2.1. Thí nghiệm của T. Morgan

Từ năm 1910, các nhà di truyền học giả thiết rằng, các nhân tố di truyền Mendel là gen. Gen định khu trong nhiễm sắc thể bởi vì tập tính của nhiễm sắc thể qua phân bào nguyên nhiễm, phân bào giảm nhiễm, thụ tinh thể hiện tập tính của gen, tức là của nhân tố di truyền Mendel qua các thế hệ. Nhưng các nhà di truyền tế bào cần chứng minh bằng thực nghiệm là các gen định khu và liên kết với nhiễm sắc thể.

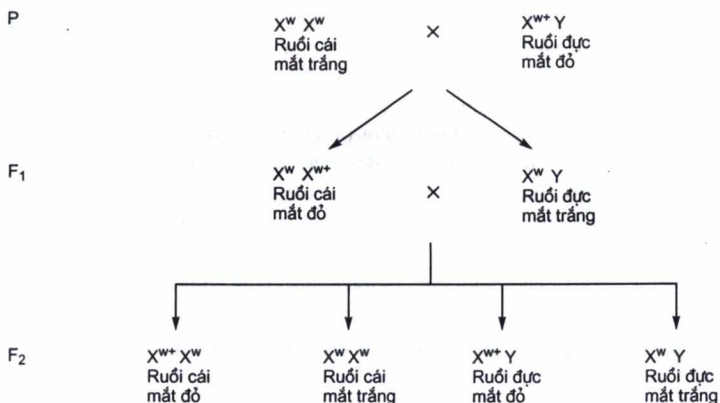
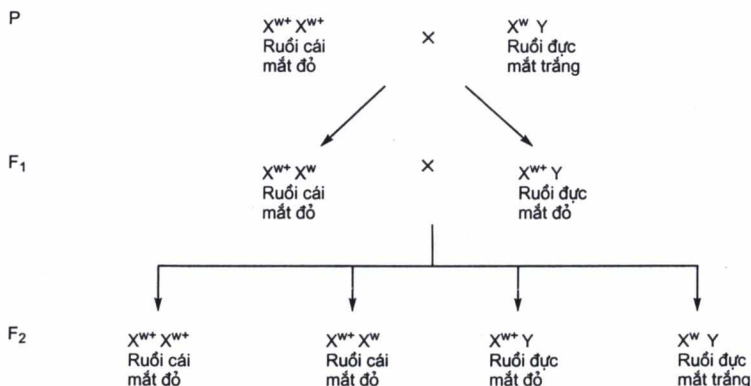
Thomas H.Morgan từ năm 1909 đã tiến hành nghiên cứu với đối tượng ruồi quả (*Drosophila melanogaster*). Ruồi quả là đối tượng thí nghiệm lý tưởng về di truyền học bởi vì chúng dễ nuôi trong phòng thí nghiệm ; chúng sinh sản nhanh, vì vậy trong thời gian ngắn có thể quan sát được nhiều thế hệ con cháu. Hơn nữa, tế bào của chúng chỉ chứa 4 đôi nhiễm sắc thể ($2n = 8$) trong đó có 3 đôi nhiễm sắc thể thường (autosome) và 1 đôi nhiễm sắc thể giới (gonosome), đối với ruồi đực là XY và đối với ruồi cái là XX, do đó dễ dàng phân tích kiểu nhân (caryotype) của chúng. Một trong các đặc tính rất quý của ruồi là qua các thế hệ con cháu, rất dễ quan sát thấy thể đột biến về màu mắt, dạng cánh v.v... Bằng nhiều thí nghiệm rất tỷ mỉ, Morgan đã chứng minh rằng đột biến về màu mắt ở ruồi quả có liên quan đến nhiễm sắc thể X và giả thiết là gen quy định màu mắt là định khu trong nhiễm sắc thể X.

Khi quan sát các chủng quần ruồi quả, Morgan nhận thấy có nhiều ruồi đực mang mắt trắng, trong lúc đó ruồi dạng đại mang mắt đỏ. Ruồi đực mắt trắng là dạng đột biến : khi đem lai ruồi đực mắt trắng với ruồi cái mắt đỏ (dạng đại) thì cho F_1 toàn ruồi mắt đỏ. Như vậy, mắt trắng là tính trạng lặn so với tính trạng mắt đỏ. Khi đem lai các ruồi mắt đỏ F_1 với nhau, Morgan quan sát thấy sự phân tính đặc biệt ở F_2 : tất cả các ruồi cái đều mang mắt đỏ, trong lúc đó ruồi đực có 1/2 là mắt đỏ và 1/2 là mắt trắng (xem sơ đồ hình 5.4). Morgan đã giả định là ở ruồi quả, tính di truyền của màu mắt là có liên quan đến nhiễm sắc thể giới tính, cụ thể là gen quy định màu mắt định vị trong nhiễm sắc thể X. Như vậy gen quy định màu mắt có 2 alen : alen W là alen đột biến (lặn) quy định mắt trắng, và alen đại W^+ (trội) quy định mắt đỏ.

Ruồi cái (kiểu gen XX) nếu mang cả 2 alen W^+W sẽ là ruồi cái mắt đỏ (vì alen W^+ trội quy định mắt đỏ). Nếu chúng mang 2 alen WW sẽ là ruồi cái mắt trắng (vì alen W là lặn quy định mắt trắng).

Đối với ruồi đực XY, vì X không có alen tương ứng (thường được gọi là bán hợp tử - hemizygote) cho nên ruồi đực chỉ cần mang một alen W^+ sẽ có mắt đỏ và khi mang một alen W sẽ có mắt trắng.

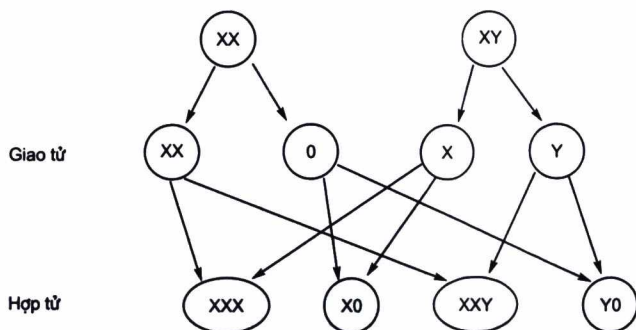
Ta hãy xem xét các công thức lai mà Morgan đã thí nghiệm dưới đây sẽ thấy rõ giả thiết của Morgan :



Di truyền các tính trạng do các gen định vị trong nhiễm sắc thể giới tính được gọi là di truyền liên kết giới tính. Đối với người, di truyền các tính trạng bệnh mù màu, bệnh máu khó đông v.v... đều liên kết giới tính, tức là các gen quy định các bệnh đó đều định vị trong nhiễm sắc thể X.

2.2. Thí nghiệm của C. B. Bridges

Học trò của Morgan là ông Bridges đã tiến hành nhiều thí nghiệm với ruồi quả mắt đỏ và mắt trắng đã phát hiện ra hiện tượng không phân ly của nhiễm sắc thể X qua giảm phân. Trường hợp bình thường, khi giảm phân 2 nhiễm sắc thể X sẽ phân ly vào các tế bào trứng đơn bội, nghĩa là mỗi tế bào trứng chứa một nhiễm sắc thể X, còn các nhiễm sắc thể XY sẽ phân ly vào tinh trùng (chứa X) và tinh trùng (chứa Y), và khi thụ tinh sẽ cho ra ruồi cái XX và ruồi đực XY. Nhưng khi giảm phân bất bình thường thì cả 2 nhiễm sắc thể XX sẽ không phân ly và sẽ cho ra một loại tế bào trứng có 2 nhiễm sắc thể XX và 1 loại tế bào trứng không có nhiễm sắc thể X. Như vậy, khi thụ tinh sẽ cho ra loại hợp tử có kiểu gen XXY và loại hợp tử có kiểu gen XO, hoặc với hợp tử có kiểu gen XXX và hợp tử với kiểu gen YO.



Bridges đã quan sát thấy ruồi cái XXX mà trong đó có 1 X^{w+} sẽ là ruồi cái mắt đỏ, ruồi cái với $X^wX^{w+}Y$ hoặc $X^{w+}X^{w+}Y$ sẽ là ruồi cái mắt đỏ. Ruồi với kiểu gen $X^{w+}O$ sẽ là ruồi đực mắt đỏ và hữu thụ. Còn các ruồi có kiểu gen YO, tuy là ruồi đực nhưng không có sức sống và chết sớm.

Bridges gọi hiện tượng không phân ly của nhiễm sắc thể qua giảm phân là có liên quan đến các tính trạng do các gen định vị trong nhiễm sắc thể tương ứng, tuy ông chưa nghiên cứu được nguyên nhân của hiện tượng.

Về sau các nhà nghiên cứu di truyền tế bào người đã chứng minh rằng ở người cũng xảy ra hiện tượng không phân ly nhiễm sắc thể qua giảm phân và do đó tạo ra các dạng lệch bội (aneuploide) không chỉ đối với các nhiễm sắc thể giới tính (XO và XXY) mà còn đối với các nhiễm sắc thể thường (ví dụ thể ba nhiễm sắc 21 - gây hội chứng Down-xem phần sau) và một trong những nguyên nhân là tuổi đời người mẹ quá cao (trên 35 tuổi).

2.3. Cơ sở nhiễm sắc thể của các quy luật Mendel

Mendel trình bày các thí nghiệm và các quy luật di truyền từ 1865 nhưng mãi đến 35 năm sau, năm 1900 mới được tái phát hiện bởi H. De Vries, C. Correns và E. Tschermak, và được công nhận rộng rãi, bởi vì chỉ sau những năm 1880, các nhà nghiên cứu mới phát hiện ra nhiễm sắc thể và tập tính của nhiễm sắc thể. Chúng tồn tại thành cặp tương đồng ở bố mẹ ($2n$) và phân ly vào giao tử (n), rồi được kết hợp lại ở hợp tử ($2n$) khi thụ tinh.

Nhân tố di truyền mà Mendel giả định tồn tại thành cặp ở bố mẹ, chúng quy định nên các tính trạng nhưng không hoà lẫn vào nhau mà phân ly, và lại được tổ hợp lại ở thế hệ sau. Các nhân tố di truyền được Mendel giả định về sau này được gọi là gen (Johansen - 1909). Ví dụ : 1 cặp nhiễm sắc thể tương đồng, trong đó một chiếc (bố) mang alen A và chiếc kia (mẹ) mang alen a (hoặc ngược lại). Cơ thể bố mẹ $2n$ có thể là AA (đồng hợp trội), aa (đồng hợp lặn) và Aa (dị hợp) và khi phân ly sẽ cho ra A và a, và khi tổ hợp sẽ lại cho ra AA, aa hoặc Aa. Đó là quy luật phân ly của Mendel khi nghiên cứu với 1 cặp gen - alen.

Nếu 2 cặp gen - alen định khu trong 2 cặp nhiễm sắc thể tương đồng khác nhau thì chúng sẽ phân ly độc lập và tổ hợp tự do theo quy luật 2 của Mendel.

Ví dụ cặp gen-alen Aa ở trong một cặp nhiễm sắc thể tương đồng và cặp gen-alen Bb ở trong một cặp nhiễm sắc thể tương đồng khác thì chúng sẽ phân ly độc lập và tổ hợp tự do (nghĩa là không phụ thuộc vào nhau) khi tạo giao tử và hình thành hợp tử, nghĩa là sẽ tạo nên 4 loại giao tử khác nhau là AB, ab, Ab, aB và khi tổ hợp tự do sẽ tạo nên 16 loại hợp tử khác nhau.

Một điều kiện cần cho quy luật 2 là 2 cặp gen-alen (A-a và B-b) phải ở trong 2 cặp nhiễm sắc thể tương đồng khác nhau.

- Hiện tượng di truyền liên kết nghĩa là di truyền các tính trạng được quy định bởi các gen cùng định khu trong một nhiễm sắc thể đã được W. Bateson và R. Punnett nghiên cứu từ đầu thế kỷ 20 trên đối tượng cây đậu ngọt. Họ đã chứng minh được rằng, gen quy định màu hoa và gen quy định độ dài hạt phấn được di truyền không độc lập, tức không tuân theo quy luật phân ly độc lập của Mendel. Về sau, T. Morgan và học trò của ông là H. Sturtevant đã chứng minh rằng, hiện tượng di truyền liên kết cũng như di truyền do hoán vị gen đều có liên quan đến nhiễm sắc thể. Di truyền liên kết là do các gen cùng định vị trong cùng một nhiễm sắc thể, cho nên qua giảm phân sẽ cùng nhau phân ly về giao tử, còn di truyền do hoán vị gen (hay di truyền liên kết không hoàn toàn là do có sự hoán vị gen giữa hai nhiễm sắc thể tương đồng ở tiền kỳ của giảm phân I).

Dựa trên các nghiên cứu về di truyền liên kết và di truyền hoán vị, người ta đã chứng minh rằng, trong tế bào số nhiễm sắc thể thì ít (ví dụ ở ruồi quả $2n = 8$) trong lúc đó số lượng gen thì rất nhiều (ví dụ ở ruồi quả có khoảng trên 10.000 gen), nghĩa là trong một nhiễm sắc thể chứa rất nhiều gen. Các gen định khu trong cùng một nhiễm sắc thể được sắp xếp theo dãy dọc liên tiếp nhau tạo thành một nhóm liên kết (ví dụ ở ruồi quả có $n = 4$ tức có 4 nhóm liên kết). Dựa vào hiện tượng di truyền liên kết và di truyền hoán vị, người ta đã thành lập được bản đồ thể hiện vị trí các gen định vị trong một nhiễm sắc thể theo các dãy dọc.

Ngày nay, di truyền học phân tử đã chứng minh rằng, mỗi một nhiễm sắc thể chứa một phân tử ADN rất dài và chứa các gen sắp xếp theo dãy dọc liên tục, tức là theo trình tự sắp xếp của các nucleotit trong mạch phân tử ADN, và với kỹ thuật giải trình tự nucleotit hệ gen, người ta đã xây dựng được bản đồ gen (gen map) của rất nhiều cơ thể, kể cả người.

III - ĐỘT BIẾN NHIỄM SẮC THỂ (CHROMOSOME ABERRATION)

Các nhà di truyền học tế bào bằng kỹ thuật phân tích kiểu nhân (caryotype) ở nguyên phân (mitosis) và giảm phân (meiosis) của nhiều cơ thể thường và cơ thể đột biến đã phát hiện ra các đột biến nhiễm sắc thể. Các đột biến đó có thể là các sai lệch về số lượng nhiễm sắc thể trong bộ, hoặc là các sai lệch về cấu trúc của từng nhiễm sắc thể trong bộ.

3.1. Đột biến số lượng nhiễm sắc thể

Mỗi một loài có số lượng nhiễm sắc thể ổn định trong bộ nhiễm sắc thể (ploidy) của mình. Cơ thể chứa bộ nhiễm sắc thể với số lượng ổn định của loài được gọi là chuẩn bội (euploid). Ví dụ ở người chuẩn bội của bộ đơn bội $n = 23$ và chuẩn bội của bộ lưỡng bội $2n = 46$. Số lượng nhiễm sắc thể trong bộ có thể bị biến đổi sai lệch so với bộ chuẩn bội. Khi số lượng nhiễm sắc thể trong bộ tăng lên theo bội số của n xuất phát (còn được gọi là x) - người ta gọi là bộ đa bội (polyploid) (ví dụ $3n, 4n$), còn khi số lượng nhiễm sắc thể thay đổi nhiều hơn hay ít hơn một vài nhiễm sắc thể trong bộ - người ta gọi là bộ lệch bội (aneuploid).

3.1.1. Đa bội (polyploid)

- Hiện tượng đa bội là hiện tượng khi số lượng nhiễm sắc thể trong bộ tăng lên theo bội số của n xuất phát ($3n, 4n, \dots$), là hiện tượng thường xuyên quan sát thấy ở thực vật và hiếm thấy ở động vật. Khoảng có 1/2 số loài thực vật hiện biết được là các loài đa bội. Đối với cây thảo thì có đến 2/3 loài là đa bội. Đa số các loài thực vật đa bội đều có thể sinh sản bằng sinh dưỡng (sinh sản vô tính). Đối với động vật, các cơ thể có phương thức sinh sản hữu tính là chủ yếu cho nên hiện tượng đa bội là hiếm, chắc chắn là có liên quan đến cơ chế sinh sản hữu tính, tức liên quan đến giảm phân và thụ tinh vì các bộ đa bội qua giảm phân đều cho ra các giao tử mất cân bằng về bộ nhiễm sắc thể, nên sẽ tạo ra các hợp tử kém sức sống hoặc chết.

Thường các cơ thể đa bội có tế bào lớn hơn, chứa các chất hữu cơ nhiều hơn, do đó các cây đa bội có cơ thể, cơ quan kể cả cơ quan như hạt, quả, củ to hơn và chứa nhiều chất hữu cơ hơn, vì vậy các dạng đa bội được các nhà chọn giống và trồng trọt quan tâm đặc biệt.

Các cây lương thực quý như lúa mì, khoai tây; cây thực phẩm như cà chua, chuối, dâu tây; cây công nghiệp như cà phê, bông, đậu nành; các cây cảnh như hồng, cúc, tulip, v.v... đều là các cây đa bội.

- Người ta thường phân biệt 2 dạng đa bội là *đa bội cùng nguồn* hay là *tự đa bội* (autopolyploid) và *đa bội khác nguồn* hay là *dị đa bội* (allopolyploid). Dạng tự đa bội là do hiện tượng nội phân (endomitosis) tạo nên, tức là trường hợp tế bào đã trải qua giai đoạn S - hàm lượng ADN đã được nhân đôi và số lượng nhiễm sắc thể đã gấp đôi nhưng không xảy ra hiện tượng phân bào dẫn tới sự tăng bội số nhiễm sắc thể trong bộ, vì chúng có cùng nguồn gốc nên được gọi là đa bội cùng nguồn (còn được gọi là đa bội mitosis). Ví dụ: 1 cơ thể có kiểu gen $2n = 4$ (AABB), trải qua giai đoạn S, số lượng nhiễm sắc thể tăng gấp đôi nhưng chúng không phân ly, chúng ở lại trong nhân và tạo nên dạng đa bội $4n = 8$ (AAAABBBB).

Các mô khác nhau trong cơ thể đa bào có thể tự đa bội hoá với mục đích phục vụ cho cơ thể đa bào, ví dụ mô rễ dự trữ chất dinh dưỡng. Nhờ phương pháp sinh sản sinh dưỡng, từ các mô, hoặc từ cơ quan đa bội có thể cho ra các cây đa bội.

Các loài trong chi Hoa Cúc (*Chrysanthemum*) là các loài tự đa bội. Số đơn bội khởi nguyên n hay là *nguyên bội* (monoploid) (còn được gọi là x) = 9. Loài Cúc lưỡng bội $2n = 18$, loài tứ bội $2n = 36$, lục bội $2n = 54$, bát bội $2n = 72$ và thập bội $2n = 90$. Những dạng Cúc đa bội đều có hoa to nhiều cánh.

Dạng dị đa bội có nguồn gốc từ hiện tượng lai từ các loài khác nhau tức là phải thông qua sinh sản hữu tính (thông qua giảm phân và thụ tinh) nên được gọi là đa bội khác nguồn

hoặc đa bội meiosis. Ví dụ một loài có kiểu gen $2n = 2$ (AA) và một loài khác có kiểu gen $2n = 2$ (BB), qua giảm phân, do phân ly không cân bằng nên có thể cho ra các loại giao tử khác nhau và khi tạo hợp tử sẽ hình thành các cơ thể dị đa bội $4n = 4$ (AABB) hoặc $3n = 3$ (AAB) (hoặc ABB). Các cơ thể dị đa bội có thể sinh sản sinh dưỡng cho ra các cơ thể thế hệ sau đều là dị đa bội và trường hợp này được gọi là *song lưỡng bội* (amphidiploid).

- Mặc dù các dạng đa bội có nhiều đặc tính về năng suất cao nhưng chúng thường bất thụ khi sinh sản hữu tính, bởi vì qua giảm phân thường tạo nên các giao tử không cân bằng về bộ nhiễm sắc thể (giao tử mang bộ nhiễm sắc thể lệch bội), nếu các giao tử này được thụ tinh sẽ tạo nên các hợp tử chết. Ví dụ một loài tam bội $3n$ khi giảm phân lần I có thể tạo nên các tiếp hợp ở dạng lưỡng trị (bivalent), nhưng cũng có thể là tam trị (trivalent) hoặc đơn trị (univalent) và qua giảm phân II sẽ tạo nên các giao tử không cân bằng từ 0 cho đến $3n$. Hợp tử do các giao tử không cân bằng tạo ra sẽ không có sức sống và thường chết. Vì vậy trong chọn giống người ta phổ biến nhân giống cây đa bội bằng phương pháp sinh sản sinh dưỡng (trồng bằng chiết cành, ghép cành, giâm củ v.v...), hoặc bằng công nghệ nhân bản vô tính.

Tuy vậy, cũng có nhiều dạng đa bội có khả năng sinh sản hữu tính, đó là những dạng đa bội qua giảm phân hình thành các giao tử cân bằng hoặc các cơ thể lai đa bội không cân bằng, tuy bất thụ nhưng qua sự nhân đôi thể nhiễm sắc, chúng trở thành đa bội cân bằng và sẽ hữu thụ. Ví dụ, nếu ta đem lai 2 loài lưỡng bội $2n$ gần gũi là AA và BB ta sẽ được con lai $2n$ (AB) bất thụ, vì khi giảm phân A không thể bắt cặp tiếp hợp với B. Khi bộ nhiễm sắc thể $2n$ của con lai nhân đôi sẽ cho ra dạng tứ bội $4n$ (AABB), vì vậy qua giảm phân các nhiễm sắc thể tương đồng là AA và BB sẽ bắt cặp tiếp hợp và sẽ cho ra các giao tử cân bằng (AB), từ đó sẽ tạo nên hợp tử $4n$ (AABB) hữu thụ. Một trong nhiều ví dụ điển hình là loài lúa mì lục bội $6n = 42$ hiện nay (*Triticum aestivum*) được hình thành bằng con đường như vậy.

Khi lai 2 loài lúa mì lưỡng bội $2n = 14$ là AA với loài $2n = 14$ là BB sẽ cho ra lúa mì lưỡng bội $2n = 14$ là AB sẽ bất thụ, nhưng cơ thể lai AB sẽ nhân đôi nhiễm sắc thể để tạo dạng tứ bội $4n = 28$ là AABB. Khi dạng tứ bội này lai với dạng lưỡng bội $2n = 14$ là DD sẽ tạo ra dạng tam bội $3n = 21$ là ABD sẽ bất thụ, nhưng khi chúng nhân đôi nhiễm sắc thể tạo ra dạng lúa mì lục bội $6n = 42$ là AABBDD sẽ hữu thụ.

Hiểu rõ cơ chế hình thành các dạng đa bội cùng đặc tính của chúng, các nhà di truyền và nhà chọn giống đã thành công trong việc lai tạo các giống đa bội thực nghiệm có ý nghĩa kinh tế cao. Ngay từ năm 1920, nhà nghiên cứu di truyền tế bào người Nga là Karpechenko đã chỉ ra rằng: bằng phương pháp lai thực nghiệm nhiều loài khác nhau có thể tạo ra các loài đa bội hữu thụ. Ví dụ, ông đã tạo ra giống cải mới tứ bội $4n = 36$ được đặt tên là *Raphano brassica*, do lai giữa 2 loài lưỡng bội $2n = 18$ là loài cải củ *Raphanus sativus* với loài cải *Brassica oleracea*.

Các nhà thực nghiệm đã kết hợp phương pháp lai với phương pháp tự tạo đa bội bằng sử dụng hoá chất gây đột biến, ví dụ dùng chất conixin là chất alkaloid chiết xuất từ cây *Colchicum autumnale*. Chất conixin có tác dụng ức chế sự tạo thoi phân bào do đó nó ức chế phân bào cho nên tạo ra tế bào và cơ thể tự đa bội, và bằng phương pháp sinh sản sinh dưỡng người ta có thể nhân giống nhanh các cây đa bội. Ví dụ từ năm 1940, J.O. Beasley đã thành công tạo ra loại bông *Gossypium* sp tứ bội $4n = 52$ có năng suất cao. Đem lai bông châu Âu $2n = 26$ với bông Mỹ $2n = 26$, ông thu được bông lai $2n = 26$ bất thụ. Đem xử lý bông lai với conixin ông thu được bông tứ bội $4n = 52$ hữu thụ.

- Hiểu rõ được cơ chế hình thành các dạng đa bội từ nguyên bội các nhà chọn giống đã chọn được các dạng nguyên bội (monoploid) gốc, kết hợp công nghệ nuôi cấy tế bào, công nghệ chuyển gen, để tạo nên các dạng cây trồng lưỡng bội và đa bội có nhiều đặc tính mong muốn như năng suất cao, giàu chất dinh dưỡng, chống chịu bệnh, thích nghi với các điều kiện sống khác nhau.

Tần số và tính phổ biến của hiện tượng đa bội trong tự nhiên ở thực vật đã nói lên tầm quan trọng của hiện tượng đa bội trong tiến hóa của thực vật. Các loài Mộc tặc và Thông đất có độ đa bội rất cao. Trong Thực vật hạt trần độ đa bội ít hơn, nhưng ở Dương xỉ và Thực vật hạt kín thì lại rất phổ biến. Đối với cây hạt kín độ đa bội có thể có đến 30-35%, ở một số cây hòa thảo có thể có tới 75% cây là đa bội. Rõ ràng là các dạng đa bội thường có sức sống cao và dễ dàng thích nghi với điều kiện sinh thái thay đổi, tạo ưu thế cho sự phổ biến của chúng ra các vùng sinh thái khác nhau.

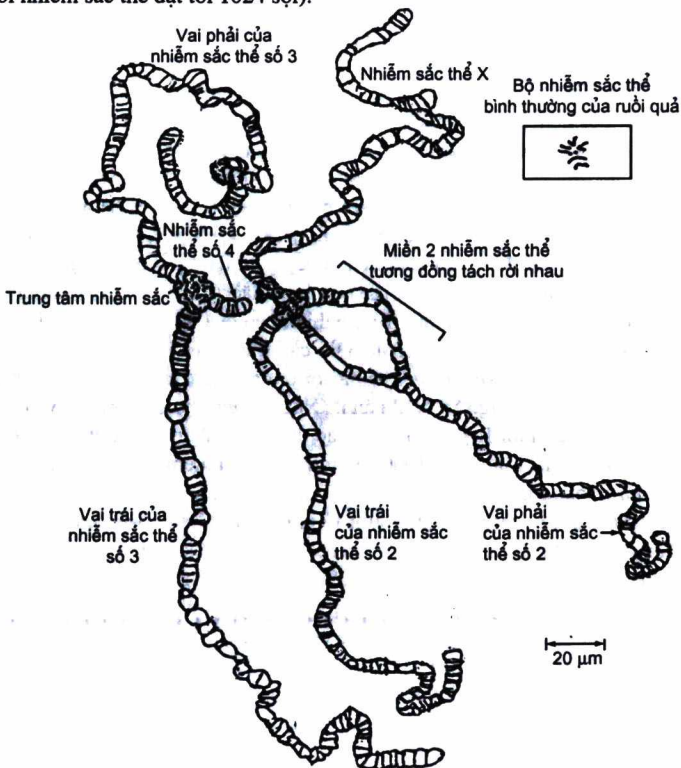
Hiện tượng đa bội thường thấy ở thực vật, còn ở động vật ít có trường hợp đa bội. Ở ech người ta quan sát thấy có trường hợp bát bội $8n = 104$ thể nhiễm sắc. Ở động vật có vú trường hợp đa bội quan sát thấy ở chuột đồng (*Cricetus cricetus*). Nói chung ở động vật bậc cao tế bào hoặc mô đa bội thể hiện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

3.1.2. Nhiễm sắc thể đa sợi

Một dạng đa bội hóa đặc biệt được gọi là dạng đa sợi hóa (politenisation) sẽ dẫn tới tạo thành các nhiễm sắc thể đặc biệt là nhiễm sắc thể đa sợi (politene chromosome), hay còn gọi là nhiễm sắc thể khổng lồ (gigant chromosome) (hình 5.4). Được gọi như thế bởi vì nhiễm sắc thể được cấu tạo gồm rất nhiều sợi nhiễm sắc (có thể tới hàng nghìn sợi) xếp song song sát nhau và có kích thước rất lớn và rất dài so với kích thước của nhiễm sắc thể bình thường. Nhiễm sắc thể đa sợi lần đầu tiên được phát hiện vào cuối thế kỷ XIX bởi nhà tế bào học Italia E.G.Balbani vào năm 1881 ở muỗi lác (*Chironomus*), nhưng mãi đến những năm 30 của thế kỷ XX nhờ công trình nghiên cứu của T. Painter, C.B. Bridges trên đối tượng ruồi quả (*Drosophila melanogaster*) thì cấu trúc và chức năng của nhiễm sắc thể đa sợi mới được làm sáng tỏ. Nhiễm sắc thể đa sợi thường được quan sát thấy trong các tế bào tuyến nước bọt của ấu trùng sâu bọ 2 cánh. Ở *Drosophila melanogaster* vào giai đoạn ấu trùng muộn (giai đoạn tuổi III), các nhiễm sắc thể trong nhân tế bào tuyến nước bọt có kích thước dài gấp hơn 100 lần (đạt 1000 micron) so với nhiễm sắc thể ở trung kỳ bình thường (có độ dài khoảng khoảng 7,5 micron). Ở muỗi lác *Chironomus*, nhiễm sắc thể đa sợi trong tuyến nước bọt có đường kính 20 μ m và chiều dài 270 μ m. Một đặc điểm nữa của cấu trúc nhiễm sắc thể đa sợi không chỉ thể hiện ở kích thước khổng lồ của chúng mà còn thể hiện ở sự tiếp hợp soma (tức là tiếp hợp không qua giảm phân). Ruồi quả có bộ nhiễm sắc thể $2n = 8$ gồm 3 cặp tương đồng autosome và 1 cặp giới tính, ở con cái là XX và ở con đực là XY. Nhưng do hiện tượng tiếp hợp soma cho nên trên tiêu bản nhiễm sắc thể đa sợi có cấu tạo rất đặc biệt gồm 1 dải ngắn và 5 dải dài tỏa ra từ một thể cố định được gọi là tâm nhiễm sắc (chromocenter), chính là vùng tâm động của các nhiễm sắc thể dính với nhau (hình 5.4). Người ta có thể phân biệt các dải này bằng cách sau : dải ngắn nhất là nhiễm sắc thể thường số 4 (là nhiễm sắc thể bé nhất), một dải có chiều dài lớn hơn là nhiễm sắc thể X (đây là bộ nhiễm sắc thể của ruồi cái và 2 nhiễm sắc thể X tiếp hợp với nhau nên trông thành một), còn lại 4 dải dài nhất là 4 vế của các nhiễm sắc thể thường số 2 và số 3. Nếu ta

quan sát tiêu bản bộ nhiễm sắc thể của ruồi đục ta sẽ thấy một nhiễm sắc thể X, còn nhiễm sắc thể Y rất khó phát hiện vì chúng thường bắt màu kém và lẫn vào vùng tâm nhiễm sắc thể. Cần chú ý là trên hình vẽ về (vai) phải của nhiễm sắc thể số 2 có chỗ tạo nên hình vòng vùng mà 2 nhiễm sắc thể tương đồng không tiếp hợp tách rời nhau. Người ta đã theo dõi được sự hình thành các nhiễm sắc thể đa sợi từ các tiền thân soma của chúng. Qua giai đoạn S của gian kỳ, ADN được tái bản, các sợi nhiễm sắc trong nhiễm sắc thể đều được nhân đôi và trong trường hợp bình thường, ở các mô của cơ thể, mỗi nhiễm sắc thể đều được nhân đôi nghĩa là mỗi nhiễm sắc thể tạo ra 2 nhiễm sắc thể chị em (khi đó $2n = 8 \times 2$) và đến hậu kỳ 1 và kỳ 2 của kỳ phân bào, các nhiễm sắc thể chị em sẽ phân ly về 2 tế bào con, do đó mỗi tế bào con có bộ nhiễm sắc thể $2n = 8$ đặc trưng cho ruồi quả.

Nhưng trong các tế bào tuyến nước bọt của ấu trùng ruồi, do một cơ chế nào đó có ADN được tái bản rất nhiều lần và tích lại trong nhiễm sắc thể dẫn tới tăng cao số lượng sợi nhiễm sắc trong từng nhiễm sắc thể (tạo nên nhiễm sắc thể đa sợi) trong lúc đó số lượng nhiễm sắc thể của bộ vẫn giữ nguyên ($2n = 8$) (ví dụ ở ruồi quả, số lượng sợi nhiễm sắc trong mỗi nhiễm sắc thể đạt tới 1024 sợi).



Hình 5.4. Sơ đồ chi tiết bộ nhiễm sắc thể khổng lồ ở tuyến nước bọt *Drosophila*

Một đặc điểm nữa trong cấu trúc của nhiễm sắc thể đa sợi là cấu trúc đĩa. Trên tiêu bản ta có thể quan sát thấy rõ là mỗi vế của nhiễm sắc thể đều có xen kẽ các đĩa nhuộm màu sẫm được gọi là đĩa Balbiani (do ông Balbiani phát hiện). Ví dụ thể nhiễm sắc X có đến 1000 đĩa và người ta đã tính được tất cả các nhiễm sắc thể có đến 5000 - 6000 đĩa. Trước đây người ta cho rằng, các đĩa là tương ứng với số gen có trong bộ nhiễm sắc thể của ruồi quả, nhưng khi nghiên cứu kỹ cấu trúc siêu vi và phân tử cũng như chức năng của nhiễm sắc thể đa sợi thì các đĩa chỉ là thể hiện trạng thái hoạt động khác nhau của tập hợp các họ gen trong hệ gen (genome). Điều lý thú là nhiễm sắc thể đa sợi thay đổi về độ lớn và cấu trúc đĩa qua sự phát triển của ấu trùng qua các giai đoạn. Khi ấu trùng chuyển từ giai đoạn II sang giai đoạn III, các nhiễm sắc thể đa sợi không chỉ to, dài đạt kích thước tối đa mà cấu trúc của các đĩa cũng bị biến đổi. Các đĩa được nở rộng phình ra, người ta nói là chúng được "búp" hóa (tạo nên các búp hoa - puff). Nơi các đĩa được búp hóa là nơi ở đó các sợi nhiễm sắc được mở xoắn và các gen đang hoạt động, nghĩa là đang xảy ra sự phiên mã (tổng hợp ARN) và dịch mã (tổng hợp protein). Nhiều nghiên cứu thực nghiệm đã chứng minh rằng hoocmon *ecdison* có tác dụng làm búp hóa các nhiễm sắc thể đa sợi (có tác dụng hoạt hóa các gen), phục vụ cho quá trình biến thái từ giai đoạn ấu trùng sang giai đoạn nhộng của bọ sâu bọ 2 cánh.

Nhiễm sắc thể đa sợi không chỉ được quan sát thấy ở trong mô tuyến nước bọt của bọ sâu bọ 2 cánh mà còn được quan sát thấy trong nhiều loại mô khác nhau ở nhiều động vật và thực vật khác nhau. Ví dụ trong các mô ruột giữa, trực tràng, ống Manpigi, mô dinh dưỡng của buồng trứng...

3.1.3. Lệnh bội (Aneuploid)

Hiện tượng lệnh bội xảy ra khi có sự thay đổi số lượng nhiễm sắc thể ở một cặp nào đó dẫn đến thay đổi làm tăng thêm hoặc bớt đi một số nhiễm sắc thể trong bộ. Ví dụ bộ lưỡng bội $2n$, khi có một cặp nào đó không phải là 2 mà là 3, ta sẽ có lệnh bội thể ba $2n + 1$ (trisomi), và khi có 1 cặp nào đó không phải là 2 mà chỉ là 1, ta sẽ có lệnh bội thể một $2n - 1$ (monosomi). Trường hợp khi một nhiễm sắc thể bị mất hẳn 1 vế (vai) vẫn được xem là lệnh bội.

Trường hợp lệnh bội được phát hiện đầu tiên là ở cà độc dược (*Datura stramonium*). Loài cà lưỡng bội $2n = 24$ có 12 cặp nhiễm sắc thể. Người ta quan sát thấy có đến 12 dòng đột biến khác nhau. Khi nghiên cứu bộ nhiễm sắc thể của 12 dòng đột biến thì chúng đều có liên quan đến thể ba ($2n + 1$) của một trong 12 cặp nhiễm sắc thể (tức $24 + 1 = 25$).

Lệnh bội được phát sinh do nhiều cơ chế như sự phân ly không cân bằng của các thành viên trong cặp tương đồng về giao tử qua giảm phân (ví dụ một giao tử có cả 2 nhiễm sắc thể còn giao tử kia không có, nếu giao tử mang 2 nhiễm sắc thể được thụ tinh với giao tử bình thường mang 1 nhiễm sắc thể sẽ tạo nên hợp tử mang 3 nhiễm sắc thể tức là thể ba, nếu giao tử bình thường mang 1 nhiễm sắc thể thụ tinh với giao tử không mang nhiễm sắc thể sẽ tạo nên thể một). Lệnh bội cũng có thể được hình thành qua nguyên phân do sự trục trặc nào đó trong cơ chế phân ly nhiễm sắc thể, ví dụ, sự đào thải của nhiễm sắc thể từ khi phân ly và như vậy nhiễm sắc thể đó không được chuyển về hai cực.

Sự phân ly không cân bằng của các thành viên trong cặp tương đồng qua giảm phân dẫn tới tạo thành lệch bội được các nhà di truyền tế bào nghiên cứu kỹ thể hiện ở bảng 5.1 sau đây :

Bảng 5.1. Sự tổ hợp dị thường trong các hợp tử do sự phân ly không cân bằng của cặp nhiễm sắc thể giới tính

Tình trạng	Giảm phân Bình thường		Không phân ly Trong giảm phân I		Không phân ly trong giảm phân II		
Trùng	X	Y	XY	O	XX	O	YY
Giảm phân bình thường							
X	XX	XY	XXY	XO	XXX	XO	XXY
Không phân ly trong giảm phân I hoặc II							
XX	XXX	XXY	XXXY	XXO	XXXX	XXO	XXYY
O	XO	YO	XYO	OO	XXO	OO	YYO

Ghi chú : Các tổ hợp OO, YO và YY chắc chắn là không có khả năng sống, còn các tổ hợp bất thường khác đều là bệnh lý.

Như vậy, dạng lệch bội $2n + 1$ được gọi là *thể ba* (trisomi), tức là trường hợp có một cặp nhiễm sắc thể trong bộ bị tăng lên 3, được xem là ưu bội (hyperploid). Trường hợp $2n-1$ tức là trong bộ có 1 cặp chỉ còn 1 nhiễm sắc thể được gọi là *thể đơn* (monosomi) và được xem là nhược bội (hypoploid).

a) **Hiện tượng thể ba.** Người ta đã nghiên cứu kỹ hiện tượng thể ba ở cà độc dược, ngô, cà chua, thuốc lá và ruồi quả. Các cơ thể mang thể ba có kiểu hình rất đặc thù. Đối với ruồi quả thường xảy ra thể ba ở nhiễm sắc thể số 4, chúng vẫn có sức sống. Sự phân ly của các tính trạng trong thế hệ con của những ruồi này là có cơ sở ở sự phân ly các nhiễm sắc thể khi không có sự đào thải các giao tử không cân bằng. Cho nên nếu có con ruồi cái với 3 thể nhiễm sắc số 4 mang những gen ++ ey (eyless - không mắt) được tạp giao với ruồi đực ey ey thì tỷ lệ ở thế hệ con sẽ là $5+ : 1$ ey. Tỷ số này là kết quả của phân ly của nhiễm sắc thể số 4 có 3 chiếc với sự tạo thành bốn kiểu giao tử theo tỷ lệ $2+ : 2+ ey : 1++ : 1$ ey. Đối với thực vật, các hạt phấn mang bộ nhiễm sắc thể không cân bằng, hoặc hoàn toàn không tham gia vào quá trình thụ phấn vì không mọc ống phấn, hoặc trong trường hợp ống phấn mọc được chúng cũng mọc chậm nên không thể cạnh tranh với các ống phấn mọc bình thường. Đối với cây ngô chỉ có khoảng 1 - 2% hạt phấn mang thể nhiễm sắc thể ba cho ra thế hệ con nhưng đối với tế bào noãn thì số lượng này đạt tới 25 - 50%. Những nhiễm sắc thể dư thừa có thể bị mất đi do chúng không tham gia vào trao đổi chéo, hoặc do sự phân ly chậm trễ ở hậu kỳ nên không có mặt trong nhân tế bào con. Sự mất đi thể nhiễm sắc thể dư

như vậy dẫn đến làm tăng tần số các giao tử đơn bội bình thường. Sự nghiên cứu các thể ba ở cây cà độc dược có ý nghĩa đặc biệt. Cà độc dược *Datura* có $2n = 12$ và như trên đã nói có thể có đến 12 dạng thể ba. Người ta đã phát hiện ra là, mỗi dạng thể ba có kiểu hình đặc trưng cho phép phân biệt dễ dàng chúng với nhau.

Các nhà nghiên cứu di truyền tế bào người đã phát hiện nhiều trường hợp lệch bội và có liên quan đến nhiều hội chứng bệnh. Ví dụ ở người từ năm 1866, Langdon Down đã quan sát thấy hội chứng ngu đần được gọi là hội chứng Down. Hội chứng Down được quan sát thấy với tần số 1/700 trẻ sơ sinh và là hội chứng do sai lệch nhiễm sắc thể được bắt gặp cao nhất. Hội chứng lâm sàng thể hiện ở chỗ : cơ thể thấp bé, đầu bé, cằm dẹt, lỗ mũi rộng, lưỡi dày có xu thế thò ra ngoài, vành tai biến dạng, ngón tay ngắn biến dạng, đường vân tay thay đổi rõ rệt, nhược cơ, tăng động khớp và chậm phát triển trí tuệ. Năm 1959, Lejeune đã lần đầu tiên mô tả cơ sở nhiễm sắc thể của hội chứng Down có bộ nhiễm sắc thể lệch bội thể ba ở nhiễm sắc thể 21, và như vậy $2n$ của họ là $2n + 1 = 47$, trong đó cặp 21 có đến ba chiếc thay vì hai chiếc như bình thường. Một trong những nguyên nhân là tuổi mẹ đã quá cao (từ 35 đến 44 tuổi), gây ảnh hưởng đến sự không phân ly của cặp nhiễm sắc thể 21 về giao tử, vì vậy có giao tử chứa 2 nhiễm sắc thể, và khi chúng thụ tinh với giao tử bình thường chứa 1 nhiễm sắc thể sẽ tạo thành hợp tử chứa thể ba về nhiễm sắc thể 21.

Hiện tượng thể ba ở người còn quan sát thấy ở các cặp nhiễm sắc thể khác trong bộ. Ví dụ thể ba 18 (hội chứng Edwards), thể ba 13 (hội chứng Patau), v.v...

Thể ba không chỉ gặp ở các cặp nhiễm sắc thể thường mà còn gặp ở nhiễm sắc thể giới tính. Ví dụ hội chứng Klinefelter gặp ở nam giới (được mô tả bởi H.F.Klinefelter năm 1942) có kiểu gen $2n + 1 = 47$, trong đó cặp nhiễm sắc thể giới tính có 3 chiếc là XXY (được Jacob và Strong chứng minh năm 1959). Trong trường hợp hội chứng siêu nam thì kiểu gen là XYY. Người ta cũng quan sát thấy hội chứng thể ba đối với nữ giới có kiểu gen là XXX. Các chàng trai XYY và các cô gái XXX đa số sinh con bình thường.

b) Hiện tượng thể một. Các cơ thể mang thể một là do có sự mất đi một trong một số các nhiễm sắc thể trong bộ lưỡng bội, do đó thể một thường gây hại nhiều hơn so với thể ba. Thường thì trường hợp thể một cũng hiếm quan sát thấy và nếu có chúng thường không có sức sống.

Các hội chứng thuộc thể một ($2n-1$) cũng quan sát thấy ở người. Ví dụ hội chứng Turner (do H. Turner mô tả vào năm 1938) quan sát thấy ở nữ giới. Năm 1959, Ford đã xác định các cô gái bị hội chứng Turner có kiểu gen $2n - 1 = 45$ trong đó thể một thuộc nhiễm sắc thể X (kiểu gen X0). Người bệnh thường thấp bé, thừa da ở gáy, mặt hình tam giác, mí sụp, mép sệ, lẹm cằm, tai thấp, tuyến sinh dục không phát triển và vô sinh. Trong nhân tế bào niêm mạc miệng không có thể Barr với kiểu gen X0. Đối với kiểu gen thể ba XXX, trong nhân tế bào niêm mạc miệng có đến 2 thể Barr. Như vậy, căn cứ vào test thể Barr, người ta có thể xác định được các thể ba XXX, XYY và thể một X0. Đối với hội chứng "tiếng mèo kêu" (người bệnh phát ra tiếng giống tiếng mèo kêu và kèm theo trí tuệ chậm phát triển) thì kiểu nhân $2n = 46$ nhưng vẫn được các nhà di truyền người liệt kê vào hội chứng thể một 5p (Monosomi 5p) vì có một nhiễm sắc thể số 5 bị mất đi 1 vế (vai) là vế p.

Bảng 5.2. Các dạng lệch bội do không phân ly ở người

Kiểu nhân	Công thức NST	Hội chứng lâm sàng	Tần số gặp	Kiểu hình
47,+21	2n+1	Down	1/700	Tay ngắn với bàn tay to ngắn, khớp lỏng, trí khôn dần, đầu to, mặt tròn, mồm loét lưỡi dài.
47,+13	2n+1	Patau	1/20000	Đầu, diếc, teo cơ, sút môi, tim dị dạng, gót lồi to.
47,+18	2n+1	Edward	1/8000	Dị dạng bẩm sinh ở nhiều cơ quan, dần, 90% chết ở tháng thứ 6 sau khi sinh.
45,X	2n-1	Turner	1/2500 lần sinh, con gái.	Con gái với cơ quan sinh dục chậm phát triển, lùn, vô sinh, da cổ nhăn nhoe, dị dạng tim mạch, ngẽn h ngẫng.
47,XXY	2n+1	Klinefelter	1/500 lần sinh, con trai.	Con trai với tinh hoàn bé, vú phát triển, giọng nữ, đầu gối nhỏ, tay chân dài.
48,XXXY	2n+2			
48,XXYY	2n+2			
49,XXXXY	2n+3			
50,XXXXXY	2n+4			
47,XXX	2n+1	Triplo-X	1/700 lần sinh, con gái	Con gái với cơ quan sinh dục bình thường, sinh sản bị hạn chế, trí khôn giảm nhẹ.

3.1.4. Nhiễm sắc thể phụ

Một kiểu lệch bội khác là sự xuất hiện thêm trong bộ nhiễm sắc thể các nhiễm sắc thể phụ. Dạng lệch bội này cũng khá phổ biến trong giới Thực vật cũng như giới Động vật. Các cơ thể mang dạng lệch bội này chịu đựng khá tốt sự có mặt của các nhiễm sắc thể phụ, chắc rằng vì chúng thường ở trạng thái dị nhiễm sắc. Nhưng khi số lượng các nhiễm sắc thể phụ khá nhiều, ví dụ ở lúa (có thể đến 6) sẽ dẫn đến sự phát triển yếu ớt của cây và giảm sản lượng. Sự có mặt các nhiễm sắc thể phụ ở cây mã đề *Plantago coronopus* gây nên những hậu quả di truyền nghiêm trọng : tất cả những cây mang nhiễm sắc thể phụ đều có tính bất thụ đực. Nhiều trường hợp các nhiễm sắc thể phụ chỉ có trong một số mô, ví dụ có trong hoa mà không có trong các mô rễ, điều đó gợi ý rằng chúng có thể có một vai trò chức năng nào đó liên quan đến sinh sản.

3.2. Đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể

Mỗi một loài được đặc trưng không chỉ bởi số lượng nhiễm sắc thể trong bộ mà còn đặc trưng bởi cấu trúc của từng nhiễm sắc thể của bộ. Ví dụ loài *Drosophila melanogaster* có 4 cặp nhiễm sắc thể trong đó có một cặp nhiễm sắc thể giới tính (sex chromosomes) ; ba cặp

nhuộm sắc thể thường (autosomes) : gồm 2 cặp nhiễm sắc thể cân tâm (metacentric chromosomes) và một cặp nhiễm sắc thể hình chấm bé. Còn loài *Drosophila virilis* có sáu cặp nhiễm sắc thể trong đó có một cặp giới tính và bốn cặp nhiễm sắc thể thường mút tâm (acrocentric chromosomes) ; một cặp nhiễm sắc thể thường hình chấm. Như vậy, các loài thuộc cùng một chi có thể có số lượng và cấu trúc nhiễm sắc thể khác nhau, và trong quá trình tiến hoá đã xảy ra sự sắp xếp và tổ chức lại bộ nhiễm sắc thể. Các nhà di truyền tế bào thường xác định các dạng đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể sau đây :

3.2.1. Mất đoạn (deletion)

Là trường hợp một đoạn nào đó của nhiễm sắc thể bị đứt ra và mất đi và hậu quả là nhiễm sắc thể bị mất đi một số gen (ADN) mà đoạn đó chứa. Ví dụ, một nhiễm sắc thể có các đoạn ABCDEGH, khi bị đứt gãy ở giới hạn đoạn E và G thì sẽ gây mất đoạn GH và nhiễm sắc thể chỉ còn lại các đoạn ABCDE. Nếu đoạn mất là đoạn cuối của nhiễm sắc thể thì đoạn đó sẽ không có tâm động, ví dụ đoạn GH, nên thường không phân ly được về hai cực và sẽ bị phân huỷ, còn khi nhiễm sắc thể bị đứt và mất cả hai đoạn mút thì hai đầu sẽ dính liền với nhau tạo nên nhiễm sắc thể vòng. Tùy theo đoạn mất có chứa nhiều gen quan trọng hay không sẽ gây ảnh hưởng nhiều hay ít đến sự biểu hiện tính trạng của cơ thể. Tùy theo độ dài của đoạn mất, người ta chia đoạn mất lớn, đoạn mất vừa, đoạn mất bé. Đoạn mất lớn thường gây chết cho cơ thể. Đoạn mất vừa sẽ gây chết ở trường hợp đồng hợp tử và có khả năng sống ở trường hợp dị hợp tử. Đoạn mất nhỏ có thể tồn tại ở trạng thái đồng hợp và gây ảnh hưởng lên kiểu hình giống với đột biến gen, nhưng sai khác ở chỗ chúng không có tính đột biến ngược chiều.

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

- Mất hẳn chức năng của một số gen.
- Thay đổi số lượng vật chất di truyền (ADN).
- Phá huỷ sự cân bằng gen và điều chỉnh trong hệ gen.

Tế bào và cơ thể có mất đoạn lớn thường gây ảnh hưởng tới sự hoạt động chức năng của tế bào và sự phát triển của phôi, do đó gây chết cho tế bào và cho cơ thể.

Người ta có thể phát hiện các mất đoạn nhờ các phương pháp nghiên cứu tế bào học qua kiểu nhân (caryotype), hoặc phương pháp di truyền học qua lai thể đột biến với kiểu dại. Đối với ruồi quả có thể phát hiện mất đoạn qua hiện tượng hình thành các vòng không tiếp hợp của nhiễm sắc thể đa sợi. Ví dụ ở về phải của nhiễm sắc thể số 2, ta thấy một vòng ở gần vùng tâm nhiễm sắc (hình 5.4), ở đây ta thấy vì có một đoạn nhiễm sắc thể đã bị mất đi nên không có sự bắt cặp và cơ thể ở dạng dị hợp về mất đoạn.

Đối với Thực vật, ở đại đa số trường hợp mất đoạn là yếu tố gây chết cho thể giao tử (gametophyte) dẫn đến tạo thành các hạt phấn rụng sớm. Trong trường hợp nếu mất đoạn thông qua thể giao tử truyền lại được cho thế hệ lưỡng bội tiếp theo, thì hình như chúng chỉ gây hại đến các locut của các gen mà thiếu chúng thì chức năng của hạt phấn vẫn không bị tác hại. Người ta đã chứng minh rằng ở thực vật, các thể nhiễm sắc với mất đoạn được bảo tồn qua dòng cái ; còn đối với dòng đực, các nhiễm sắc thể mất đoạn thường bị loại trừ do sự hình thành các hạt phấn không có sức sống, hoặc do những hạt phấn mang chúng sẽ không có khả năng cạnh tranh sinh trưởng với các hạt phấn bình thường.

Đối với động vật, ví dụ đối với ruồi quả *Drosophila*, các cá thể đồng hợp tử về mất đoạn ở nhiễm sắc thể X, còn sức sống chỉ trong trường hợp đoạn mất là một phần nhỏ của tiết mút (telomere). Sự mất các gen *yellow*, *achaete* và *scute* rõ ràng là không dẫn đến mất sức sống kể cả trong trường hợp đồng hợp tử hoặc bán hợp tử (hemizygote), vì các gen này chỉ chiếm một phần rất nhỏ và chắc rằng chúng không có vai trò quyết định về sức sống của ruồi.

Đối với cơ thể người, các mất đoạn gây nên nhiều dị hình bẩm sinh, ví dụ, bệnh bạch cầu tủy mãn tính có liên quan đến nhiễm sắc thể được gọi là nhiễm sắc thể Philadelphia (Ph^1), đó là nhiễm sắc thể 21 đã bị mất một phần lớn của vế dài. Hội chứng "tiếng mèo kêu" như phần trên đã nói có liên quan đến sự mất vế ngắn của nhiễm sắc thể số 5 (cũng được liệt kê vào dạng lệch bội thể một 5p).

3.2.2. Nhân đoạn hoặc thêm đoạn (duplication)

Là trường hợp một đoạn nào đó của nhiễm sắc thể được nhân lên gấp đôi hoặc nhiều lần. Đoạn được nhân lên có thể ở bất cứ vị trí nào hoặc chen vào giữa, hoặc ở phần cuối nhiễm sắc thể. Các nhà di truyền tế bào cho rằng nhân đoạn có ý nghĩa quan trọng đối với tiến hoá, vì lẽ các kiểu gen được phức tạp hoá là do hiện tượng nhân đoạn nhiễm sắc thể. Ví dụ nhiễm sắc thể ABCDEGH khi có thêm đoạn EG sẽ trở thành ABCDEGEHG. Hiện tượng nhân đoạn có thể xảy ra do sự nhân lên của một đoạn nào đó trong nhiễm sắc thể hoặc do hai nhiễm sắc thể tương đồng bắt cặp và trao đổi đoạn cho nhau, kết quả 1 nhiễm sắc thể mất đoạn và một nhiễm sắc thể tương ứng thêm đoạn. Cơ thể có nhân đoạn ít bị ảnh hưởng hơn so với mất đoạn, tuy nhiên, nếu đoạn thêm lớn sẽ gây ảnh hưởng đến sức sống của cơ thể. Hiện tượng nhân đoạn được nghiên cứu nhiều ở ruồi quả, ví dụ *đột biến Bar* (có mắt hình sọc ngang thay cho hình cầu) là dạng đột biến trội liên kết giới tính X, từ những năm 1930, C. B. Bridges đã phân tích nhiễm sắc thể X mang đột biến *Bar* và phát hiện thấy đoạn 16A nơi chứa gen quy định hình dạng mắt ruồi trong nhiễm sắc thể X đã bị nhân đôi lên. Ở ruồi quả các đột biến trội thể hiện cánh nhiều lông (Hairy Wing), hoặc đột biến mắt bé (Asteroid) đều do hiện tượng nhân đoạn gây nên. Người ta đã phát hiện được đột biến nhân ba đoạn 16A và ruồi mang đột biến có mắt rất bé được gọi là *đột biến Bar kép*. Người ta dễ dàng phát hiện đột biến nhân đoạn ở ruồi quả thông qua bộ nhiễm sắc thể đa sợi. Ngày nay với kỹ thuật phân tích phân tử, người ta dễ dàng phát hiện các đột biến nhân đoạn, mất đoạn rất bé ở hàng loạt cơ thể khác nhau. Ví dụ sự phân tích các nhân đoạn trong họ gen mã hóa cho protein hemoglobin ở động vật có vú.

Hiện tượng nhân đoạn tương đối phổ biến và có vai trò là nguồn biến dị di truyền đáng kể của tiến hóa.

3.2.3. Đảo đoạn (inversion)

Là trường hợp một đoạn nào đó của nhiễm sắc thể bị đứt và quay ngược một góc 180° , rồi nối lại dẫn đến thay đổi sự sắp xếp của gen trong đoạn đó. Ví dụ nhiễm sắc thể ABCDEGH khi bị đảo đoạn ở DEG sẽ trở thành ABCGEDH. Đảo đoạn có thể xảy ra do sự di chuyển của các gen nhảy (transposons) từ nhiễm sắc thể này sang nhiễm sắc thể khác. Như vậy, để xảy ra đảo đoạn phải có hai điểm đứt, còn khi chỉ có một điểm đứt ở đoạn mút có thể xảy ra đảo đoạn nhưng rất hiếm. Người ta phân biệt 2 dạng đảo đoạn :

+ Đảo đoạn ngoại tâm (đảo đoạn không đối xứng), là trường hợp đoạn đảo không bao gồm tâm động.

+ Đao đoạn quanh tâm (đao đoạn đối xứng) là trường hợp đao đoạn đảo có mang tâm động.

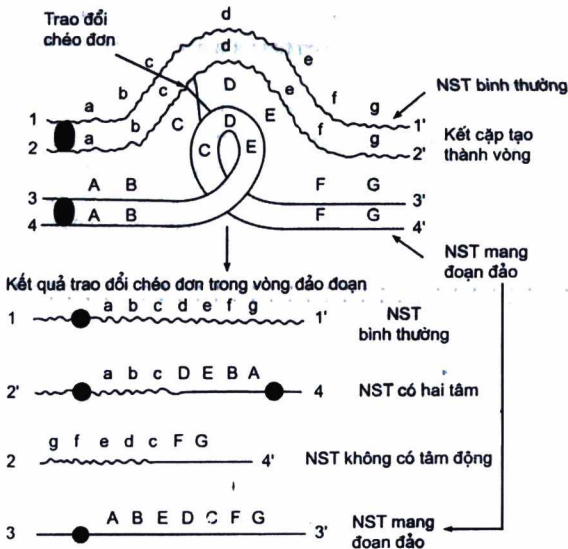
Đao đoạn có thể ở trạng thái đồng hợp tử hoặc dị hợp tử. Khi ở trạng thái đồng hợp tử hoặc bán hợp tử thì đao đoạn thường gây ảnh hưởng chết cho cơ thể, vì làm thay đổi vị trí của các gen (hiệu ứng vị trí) và đứt gãy nhiễm sắc thể sẽ dẫn tới gây chết.

Khi ở trạng thái dị hợp tử thì đao đoạn gây nên một số thay đổi về di truyền và tế bào, do đó người ta có thể dễ dàng phát hiện ra đao đoạn. Khi có đao đoạn ngoại tâm sẽ không làm thay đổi vị trí 2 vế, còn khi có đao đoạn quanh tâm sẽ dẫn đến thay đổi vế của nhiễm sắc thể, có thể biến nhiễm sắc thể mút tâm (acrocentric chromosome) thành nhiễm sắc thể cân tâm (metacentric chromosome) và ngược lại.

Trong các quần thể thực vật (ví dụ lúa mạch) hoặc động vật (ruồi quả) thường gặp ở các dạng đao đoạn với tần số cao, tuy nhiên đa số đều ở trạng thái dị hợp nên không gây chết. Trong trường hợp đao đoạn ở trạng thái dị hợp, người ta có thể phát hiện được chúng bằng phương pháp di truyền học hoặc tế bào học. Người ta có thể phát hiện được hiện tượng đao đoạn thông qua sự tạo thành các nút vòng đặc trưng trong tiền kỳ giảm phân I khi các nhiễm sắc thể tương đồng bắt cặp. Các nút vòng đó thể hiện sự đao đoạn dị hợp (hình 5.5).

Người ta cũng dễ dàng phát hiện được đao đoạn thông qua các kiểu nhân nhuộm cắt băng hoặc thông qua các nút vòng của nhiễm sắc thể đa sợi.

Đao đoạn có vai trò nhất định trong tiến hóa. Nghiên cứu phân tích về đao đoạn trên các loài ruồi quả thuộc chi *Drosophila* của Dowjansky đã chứng minh rõ vai trò của đao đoạn trong sự phân hóa của loài trong các quần thể khác nhau.



Hình 5.5. Hiện tượng đao đoạn và trao đổi chéo diễn ra khi có đao đoạn

3.2.4. Chuyển đoạn (translocation)

Là hiện tượng thay đổi trong cấu trúc nhiễm sắc thể khi một nhiễm sắc thể có đoạn bị đứt và được nối kết vào một thể nhiễm sắc khác không tương đồng. (Cần phân biệt với hiện tượng trao đổi chéo qua giảm phân là trao đổi đoạn giữa 2 thành viên trong cặp tương đồng). Ví dụ có 2 nhiễm sắc thể không tương đồng là ABCDEGH và A'B'C'D'E'G'H', khi có chuyển đoạn chéo ở đoạn EG và E'G' ta sẽ có 2 nhiễm sắc thể chuyển đoạn là ABCDE'G'H và A'B'C'D'EGH'. Chuyển đoạn có thể xảy ra do sự di chuyển của các gen nhảy từ một nhiễm sắc thể này sang nhiễm sắc thể khác. Hậu quả của chuyển đoạn là làm thay đổi nhóm gen liên kết trong nhiễm sắc thể. Người ta phân biệt các dạng chuyển đoạn sau đây :

- Chuyển đoạn chéo là trường hợp có sự chuyển một đoạn của một nhiễm sắc thể này sang một nhiễm sắc thể khác và xảy ra trao đổi chéo các đoạn giữa 2 nhiễm sắc thể không tương đồng (có khi có thể là giữa 2 nhiễm sắc thể tương đồng).

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

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

- Chuyển đoạn nhiễm sắc thể là trường hợp chuyển đoạn xảy ra ở mức nhiễm sắc thể toàn vẹn khi chưa được nhân đôi. Chuyển đoạn nhiễm sắc thể xảy ra ở mức nhiễm sắc tử, tức là ở giai đoạn nhiễm sắc thể đã được nhân đôi cho ra các nhiễm sắc tử.

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

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

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

Như vậy, hiện tượng chuyển đoạn xảy ra rất đa dạng và người ta rất khó phát hiện và phân biệt. Đối với thực vật, chuyển đoạn có thể gây chết hoặc có sức sống nhưng đối với động vật (ruồi quả) thì chuyển đoạn thường gây chết cho hợp tử, hoặc ở giai đoạn phôi sớm.

Các nhà di truyền tế bào thường sử dụng các đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể để lập bản đồ gen. Ví dụ, căn cứ vào đột biến chuyển đoạn chéo giữa nhiễm sắc thể số 14 với nhiễm sắc thể X ở người, các nhà di truyền học đã xác lập được gen HPRT (gen mã hoá cho enzym hypoxantin photphoribosyl transferaza) định khu trong vế dài của nhiễm sắc thể X. Một trong những thành tựu đáng chú ý của di truyền y học gần đây là sự phát hiện ra gen gây nên hội chứng nhược cơ Duchen ở người là gen DMD (Duchene muscular dystrophy). Hội chứng nhược cơ Duchen là bệnh thần kinh cơ rất nguy hiểm. Bệnh bắt đầu từ 6 tuổi và thường chết ở tuổi từ 12 – 20.

Các nhà di truyền tế bào học đã phát hiện bệnh là do đột biến chuyển đoạn của nhiễm sắc thể X sang nhiễm sắc thể số 5 và khi nghiên cứu so sánh nhiễm sắc thể X bình thường

bất hoạt với nhiễm sắc thể X bị chuyển đoạn trở thành hoạt động, họ đã xác định được vị trí định khu của gen DMD ở vùng P21 của nhiễm sắc thể X.

3.3. Các nhân tố gây đột biến nhiễm sắc thể

Các nhân tố gây đột biến nhiễm sắc thể có thể là nhân tố vật lý như bức xạ ion hoá, bức xạ tử ngoại, nhiệt v.v..., có thể là nhân tố hoá học.

Có nhiều dạng bức xạ tác động lên tế bào và cơ thể trong điều kiện tự nhiên và trong điều kiện *in vitro* như tia tử ngoại, tia rơntgen, tia α , β , γ , các proton, các neutron. Khi tế bào và cơ thể bị chiếu xạ, nhiều quá trình thay đổi đảo ngược và không đảo ngược xảy ra như sự hoại tử nhân, dính kết nhiễm sắc thể, phân đoạn nhiễm sắc thể, hình thành nhân khổng lồ, tế bào đa nhân, sai lệch phân ly nhiễm sắc thể về nhiều cực tạo nên các tế bào lệch bội v.v...

Tần số và đặc tính của các đột biến nhiễm sắc thể tùy vào liều chiếu xạ và vào giai đoạn của chu kỳ tế bào bị chiếu xạ, tức là tùy vào giai đoạn G1, giai đoạn khi nhiễm sắc thể chưa nhân đôi và ở giai đoạn G2 và phân bào là giai đoạn mà ở đó nhiễm sắc thể đã được nhân đôi. Tần số và mức độ đột biến nhiễm sắc thể còn tùy thuộc vào thời gian chiếu xạ. Tác hại của chiếu xạ gây nên các đứt gãy nhiễm sắc thể, do đó gây nên các mất đoạn (deletion) và qua thời gian chiếu xạ sẽ xảy ra các đột biến khác như nhân đoạn, đảo đoạn và chuyển đoạn. Tác hại của chiếu xạ cũng có thể gây nên các trao đổi đoạn giữa các nhiễm sắc thể, do đó tạo nên các đột biến chuyển đoạn. Đặc tính nhạy cảm phóng xạ của các cơ thể khác nhau thì khác nhau, ví dụ liều gây chết đối với một số khuẩn là 6.10^6 r, còn đối tượng động vật chỉ vài trăm r.

Để gây được đột biến nhiễm sắc thể ở thực vật bậc cao (ví dụ đối với *Vicia* và *Lilium*) chỉ cần chiếu xạ với liều 20r là đủ, còn đối với động vật đơn bào có roi chiếu xạ với liều 20000r vẫn chưa gây được đột biến. Đối với các mô khác nhau tính nhạy cảm với chiếu xạ cũng khác nhau, ví dụ mô tủy đỏ xương nhạy cảm hơn mô dịch hoàn.

Đột biến nhiễm sắc thể có thể được gây nên do các nhân tố hoá chất. Ngày nay người ta đã phát hiện nhiều loại hoá chất là tác nhân gây đột biến như chất iprit, ethylenimin, glixidol, formaldehit, urethan, chlorit aluminium, các hoá chất trừ sâu, diệt cỏ, các hoá chất dùng trong công nghiệp hoá mỹ phẩm, công nghiệp hoá thực phẩm và công nghiệp nhuộm màu.

Vụ nổ bom nguyên tử của Mỹ tại Hiroshima và Nagasaki năm 1945 và chất độc màu da cam (chất diệt cỏ 2,4 D và 2,4,5 T có chứa dioxin) mà đế quốc Mỹ sử dụng trong cuộc chiến tranh xâm lược Việt Nam đã gây cho nhân dân Nhật Bản và nhân dân Việt Nam những hậu quả nặng nề về quái thai, ung thư cũng như đột biến nhiễm sắc thể qua nhiều thế hệ.

Chương 6

CHU KỲ SỐNG CỦA TẾ BÀO (CELL CYCLE)

I - CÁC PHA CỦA CHỦ KỲ SỐNG

Chu kỳ sống của tế bào là thời gian diễn ra kể từ thời điểm tế bào được hình thành nhờ phân bào của tế bào mẹ và kết thúc bởi sự phân bào để hình thành thành tế bào mới (hình 6.1). Người ta chia chu kỳ tế bào ra hai thời kỳ chính :

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

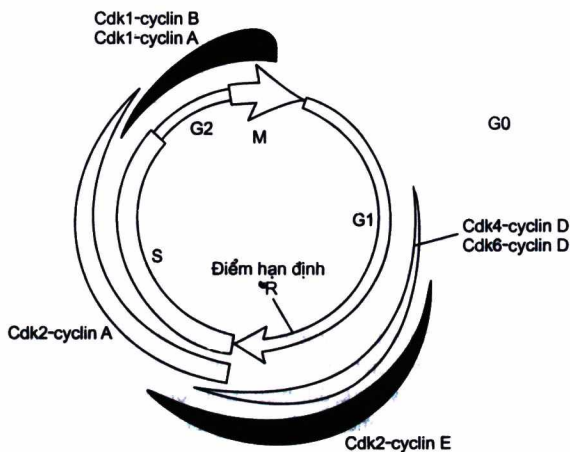
- Thời gian tiếp theo là kỳ phân bào (mitosis) được ký hiệu là M, là thời kỳ tế bào mẹ phân đôi cho ra hai tế bào con.

Trong cơ thể đa bào các tế bào đã được biệt hoá khác nhau để thực hiện

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

1.1. Gian kỳ

Trong gian kỳ, tế bào thực hiện các chức năng trao đổi chất, các hoạt động sống khác nhau, tổng hợp các ARN và ADN, các protein, các enzym... và chuẩn bị cho tế bào phân bào. Tùy theo đặc điểm chức năng người ta chia gian kỳ ra 3 giai đoạn (hay pha) liên tiếp nhau : giai đoạn G1 (gap 1), giai đoạn S (synthesis) và giai đoạn G2 (gap 2) (hình 6.1). Thời gian kéo dài của gian kỳ tùy thuộc vào thời gian của 3 pha G1 + S + G2, đặc biệt tùy thuộc vào G1, vì ở các loại tế bào khác nhau thì thời gian G1 là rất khác nhau, còn giai đoạn S và G2 tương đối ổn định.



Hình 6.1. Hoạt tính của phức hệ Cdk - cyclin qua chu kỳ tế bào ở động vật có vú (Mammalia)

1.1.1. Pha G1

Pha G1 được tiếp ngay sau phân bào, là pha đầu tiên của tế bào con.

Thời gian của G1 : thời gian của G1 kéo dài từ ngay sau khi tế bào được tạo thành do phân bào, cho đến khi bắt đầu pha S là pha tổng hợp ADN. Thời gian của G1 tùy thuộc vào chức năng sinh lý của tế bào, ví dụ đối với tế bào phổi thì thời gian của G1 = 30 phút-1 giờ, đối với tế bào gan động vật có vú $G1 = 1$ năm, còn đối với tế bào neuron G1 có thể kéo dài suốt đời sống cơ thể. Đối với tế bào ung thư thời gian của G1 bị rút ngắn rất nhiều. Người ta còn phân biệt pha G0 là pha trong đó tế bào đi vào trạng thái thoái hoá.

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

Nếu tế bào vượt qua điểm R, chúng tiếp tục đi vào pha S. Nhân tố điều chỉnh thời điểm R là hệ protein phức tạp trong đó có các cyclin và kinaza. Pha G1 là pha sinh trưởng của tế bào, trong pha này xảy ra sự tổng hợp các ARN và protein. Đối với các tế bào biệt hoá thì tế bào không vượt qua R mà đi vào quá trình biệt hóa tế bào.

1.1.2. Sự biệt hoá các tế bào soma

Quá trình phát triển phôi và hình thành các mô, các cơ quan bao gồm hai quá trình chủ yếu là *sự phân bào* (mitosis) và *biệt hoá tế bào* (cell differentiation).

Sự phân bào mitosis bảo đảm cho tất cả tế bào của một chủng quần cũng như toàn bộ cơ thể có bộ nhiễm sắc thể ổn định $2n$, xảy ra trong giai đoạn M của chu kỳ tế bào. Trong cơ thể đã trưởng thành, các tế bào gốc soma vẫn phân bào mitosis trong các chủng quần đổi mới như biểu mô nền của da, biểu mô ruột, các tế bào nguồn tủy đỏ xương. Trong các chủng quần ổn định (ví dụ gan) các tế bào soma không phân bào nhưng khi có nhân tố kích thích chúng vẫn có khả năng phân bào mitosis (khi hàn gắn vết thương, tái sinh mô...). Đối với thực vật các tế bào và mô soma có thể phân bào và tái biệt hoá thành cây trưởng thành theo kiểu sinh sản sinh dưỡng.

Sự biệt hoá tế bào là quá trình tạo thành các tế bào biệt hoá khác nhau về hình thái và chức năng - tức là tạo thành các tế bào của các mô và cơ quan khác nhau. Trong quá trình phát triển phôi ở động vật, sự biệt hoá thấy rõ nhất khi tạo thành 3 lá phôi : lá phôi ngoài (ngoại phôi bì), lá phôi trong (nội phôi bì) và lá phôi giữa (trung phôi bì), và từ 3 lá phôi các tế bào sẽ biệt hoá tạo thành các mô khác nhau. Sự sinh trưởng và biệt hoá xảy ra trong giai đoạn G1 của chu kỳ sống của tế bào.

a) Sự biệt hoá về hình thái và chức năng

Trong cơ thể đa bào, các tế bào soma khác biệt nhau về hình thái và chức năng. Có khoảng 200 dạng tế bào soma tập hợp thành 20 dạng mô khác nhau trong cơ thể người. Ví dụ : tế bào hồng cầu không nhân có dạng cầu lõm 2 mặt có chức năng chuyên chở O_2 và CO_2 ; tế bào biểu mô ruột có dạng hình khối trụ và nhiều vi nhung mao có chức năng hấp thụ chất dinh dưỡng ; bạch cầu có dạng cầu, có chân giả, có khả năng thực bào ; tế bào cơ dạng hình thoi chứa nhiều tơ cơ có khả năng co rút ; tế bào thần kinh dạng hình sao, có nhiều sợi dài, có chức năng dẫn truyền xung động.

b) Sự biệt hoá về sinh hoá

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

c) Sự biệt hoá thể hiện sự biệt hoá trong hoạt động của hệ gen

Như ta đã biết hoạt động của gen thể hiện ở 3 quá trình : tái bản mã, phiên mã và dịch mã.

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

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

Hiểu rõ được cơ chế biệt hóa và cơ chế điều chỉnh hoạt hóa của gen qua quá trình phát triển cơ thể, các nhà công nghệ tế bào đã thành công tạo ra các công nghệ chuyển gen, chuyển nhân... sản xuất các cơ thể động vật chuyển gen, nhân bản vô tính phục vụ cho mục đích y học và nông nghiệp

1.1.3. Pha S

Pha S (synthesis) là pha tiếp theo pha G1, được gọi là pha tổng hợp ADN vì chính trong pha này xảy ra sự tái bản ADN và nhân đôi số lượng nhiễm sắc thể của tế bào. Tế bào từ pha G1 vào pha S nếu tế bào vượt qua được điểm hạn định R. Trong pha G1 tế bào đã chuẩn bị điều kiện cho pha S, vào cuối pha G1, tế bào tổng hợp một loại protein đặc trưng là cyclin A và nhanh chóng tích lũy trong nhân tế bào. Protein cyclin A cùng với protein kinaza sẽ xúc tiến sự tái bản ADN. Protein cyclin A (nhân tố hoạt hoá tổng hợp ADN) tác động cho tới cuối pha S thì biến mất. Thời gian kéo dài của pha S ở đa số tế bào nhân chuẩn tương đối cố định (từ 6-8 giờ).

1.1.4. Pha G2

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

1.2. Phân bào

Tiếp theo pha G2 là pha M (mitosis) thời kỳ tế bào mẹ phân chia thành 2 tế bào con. Sự phân bào là phương thức sinh sản của tế bào, đồng thời là phương thức qua đó tế bào mẹ truyền thông tin di truyền chứa trong ADN (đã được nhân đôi qua pha S) cho hai tế bào con. Sự phân bào cùng với sự tổng hợp các chất nội bào và gian bào là cơ sở của tăng trưởng ở các mô, các cơ quan và cơ thể đa bào. Người ta phân biệt 4 dạng phân bào sau :

1.2.1. Trực phân (Amitosis)

Dạng phân bào này đặc trưng cho các tế bào đã biệt hóa cao, các tế bào bệnh lý, các tế bào bị tác hại đang đi vào quá trình thoái hóa. Trong trực phân, nhân được phân đôi một cách đơn giản, không xuất hiện nhiễm sắc thể cũng như thoi phân bào (vì vậy còn được gọi là phân bào không tơ - amitosis). Nhiều khi nhân phân thành hai nửa không đều nhau; hoặc phân thành nhiều mảnh, mọc chồi (trực phân bệnh lý hoặc bị tác hại). Tế bào chất có thể được phân đôi cùng với nhân hoặc không phân chia tạo thành tế bào hai nhân hoặc đa nhân (ví dụ tế bào gan).

1.2.2. Nội phân (Endomitosis)

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

1.2.3. Phân bào nguyên nhiễm (Mitosis)

Còn gọi là gián phân hoặc phân bào có tơ, là dạng phân bào chuẩn, phổ biến cho tất cả các dạng tế bào, qua đó các tế bào con có nguyên bộ nhiễm sắc thể như tế bào mẹ (xem chương sau).

1.2.4. Phân bào giảm nhiễm (Meiosis)

Là dạng phân bào đặc trưng cho các cơ thể sinh sản hữu tính, qua đó các tế bào sinh dục (tinh nguyên bào, noãn nguyên bào) phân chia tạo thành các tế bào sinh dục chín - các giao tử có số nhiễm sắc thể giảm đi một nửa ($2n \rightarrow n$) (xem chương sau).

II - ĐIỀU CHỈNH CHU KỲ TẾ BÀO Ở CƠ THỂ ĐA BÀO

Đối với cơ thể đơn bào thì chu kỳ sống của tế bào cũng là chu kỳ sống của cơ thể và chúng được kiểm soát trực tiếp bởi các yếu tố của môi trường. Đối với cơ thể đa bào tồn tại nhiều chủng quần thể bào soma, mỗi chủng quần được đặc trưng bởi nhịp điệu sinh trưởng và phân bào ổn định, được kiểm soát bởi mối tương quan giữa các tế bào, các mô và cơ thể. Sự ức chế tiếp xúc hay ức chế bề mặt dẫn đến sự kìm hãm quá trình phân bào. Bình thường tế bào gan không phân bào, nhưng khi bị cắt bỏ một phần thì ở phần bị cắt bỏ các tế bào gan sẽ phân bào tích cực để bù đắp lại phần cắt bỏ. Có thể là các tế bào chết đã tiết ra một chất có tác động kích thích sự phân bào, và sự phân bào diễn ra cho đến khi khối lượng gan đạt tới khối lượng nhất định thì dừng lại. Đó cũng là kiểu điều chỉnh theo cơ chế "liên hệ ngược". Sự ung thư hoá là sự trục trặc trong cơ chế điều chỉnh phân bào, các tế bào khi bị mất sự ức chế phân bào sẽ phân bào tự do, không chịu sự kiểm soát chung và di căn trở thành có hại cho cơ thể.

Như vậy dù là cơ thể đơn bào hay cơ thể đa bào thì chu kỳ sống của chúng đều được điều chỉnh bởi nhiều cơ chế. Chúng ta hãy xem xét một số cơ chế điều chỉnh cơ bản mà di truyền tế bào học phân tử đã làm sáng tỏ.

2.1. Hệ thống trung tâm phát động các quá trình cần thiết của chu kỳ

Để hiểu được cơ chế điều chỉnh của chu kỳ tế bào ta hãy xem xét tế bào như là một chiếc máy giặt quần áo. Chức năng giặt quần áo của máy gồm nhiều công đoạn nối tiếp nhau: lấy nước cùng bột giặt, vò quần áo, xả nước bẩn, vắt khô. Mỗi công đoạn diễn ra

trong một thời gian nhất định và nối tiếp nhau. Cũng giống như vậy, chu kỳ tế bào cũng gồm nhiều giai đoạn nối tiếp nhau như : sinh trưởng, nhân đôi ADN, phân bào. Mỗi giai đoạn diễn ra trong một thời gian nhất định và nối tiếp nhau. Giai đoạn trước phải được hoàn thành mới có thể tiếp theo giai đoạn sau, và điều kiện của giai đoạn sau cũng đã được chuẩn bị trong giai đoạn trước. Trong cả hai trường hợp : chu kỳ tế bào và máy giặt, đều có nhân tố điều chỉnh trung tâm khiến cho các quá trình xảy ra liên tiếp nhau theo trình tự, theo thời gian, trong đó nhân tố điều chỉnh hoạt động như một chiếc đồng hồ quy định thời gian hoạt động của mỗi quá trình (giai đoạn) thông qua các điểm chốt (check points). Điểm chốt thể hiện cơ chế điều chỉnh theo mối liên hệ ngược, nghĩa là sự hoàn thành quá trình trước là điều kiện phát động cho quá trình sau. Tuy nhiên, cơ chế điều chỉnh của chu kỳ tế bào phức tạp hơn nhiều, bởi vì các nhân tố điều chỉnh như chúng ta đã biết là các phức hợp sinh hóa phức tạp hoạt động trong mối tương quan với nhau và với môi trường nội bào và ngoại bào.

Hệ thống điều chỉnh chu kỳ tế bào gồm các phức hệ sinh hóa tác động theo chu kỳ và đó là các phức hệ protein hoạt động tương tác và kích thích, phối hợp với các quá trình tiền thân cần thiết cho sự nhân đôi và phân ly của ADN. Trong chu kỳ, hệ thống điều chỉnh đến lượt mình lại được kiểm tra bởi các "phanh" có tác động phanh hãm chu kỳ ở các điểm chốt đặc biệt.

Như vậy khi các quá trình tiền thân đã hoàn thành là điều kiện cần cho sự khởi động quá trình tiếp theo của chu kỳ, nhưng cũng có thể bị ách lại ở các điểm chốt. Hệ thống "phanh" rất quan trọng, nó cho phép kiểm tra hệ thống điều chỉnh của chu kỳ bởi các tín hiệu đến từ môi trường.

Các tín hiệu của môi trường tác động lên hệ thống điều chỉnh bởi hai điểm chốt chủ yếu : một ở giai đoạn G1 ngay trước khi vào giai đoạn S, và một điểm chốt ở G2 là điểm mà ở đó hệ thống điều chỉnh thực hiện quá trình có tác động khởi động sự phân bào ở M. Đối với các tế bào không đi vào phân bào thì chu kỳ bị phanh ngay ở điểm chốt ở G1.

Đối với tế bào nấm men, điểm chốt ở G1 thường được gọi là điểm xuất phát - điểm S (start point), còn đối với tế bào động vật điểm chốt này được gọi là điểm hạn định - điểm R (restriction point) (hình 6.1).

2.2. Hệ thống điều chỉnh chu kỳ - phức hệ các protein-kinaza

Nhiều nghiên cứu trên các đối tượng khác nhau như nấm men, tế bào phôi sớm, tế bào động vật có vú trong nuôi cấy invitro đều chứng minh rằng hệ thống điều chỉnh chu kỳ tế bào gồm hai họ protein chủ yếu. Họ thứ nhất là các *kinaza phụ thuộc cyclin* - Cdk (cyclin dependant kinase) có tác dụng phát động các quá trình tiền thân bằng cách gây photphorin hóa nhiều protein đặc trưng tại gốc serin và threonin. Họ protein thứ hai là các protein đặc biệt được gọi là *cyclin* (được gọi như thế vì chúng xuất hiện theo chu kỳ tế bào - cell cycle), các cyclin đóng vai trò kiểm tra hoạt tính photphorin hóa của Cdk đối với các protein đích.

Khi cyclin liên kết với Cdk thành một phức hệ thì Cdk ở trạng thái hoạt tính và khi cyclin tách khỏi Cdk thì Cdk không có hoạt tính. Như vậy bằng cơ chế tổng hợp và phân giải protein cyclin cùng với cơ chế tạo phức hệ và giải thể phức hệ *cyclin-Cdk*, tế bào điều chỉnh chu kỳ sống của mình. Có thể có nhiều loại cyclin khác nhau nhưng người ta xếp chúng vào hai loại chủ yếu là : các cyclin mitot (là các cyclin liên kết với Cdk trong giai đoạn G2) và cần thiết để tế bào đi vào mitot ; loại cyclin G1 là các cyclin liên kết với Cdk trong giai đoạn G1 và cần thiết cho tế bào đi vào giai đoạn S.

Người ta cho rằng đối với nấm men chỉ có một loại Cdk hoạt động ở cả 2 điểm chốt G1 và G2, còn đối với động vật có vú có thể có tối thiểu là 2 loại Cdk khác nhau, mỗi loại tác động cho một điểm chốt.

Sự hoạt hóa và không hoạt hóa của Cdk trong mỗi giai đoạn của chu kỳ thể hiện sự chuyển giai đoạn của chu kỳ và cũng là thể hiện hiệu quả của hệ điều chỉnh lên chu kỳ bằng cách phát động các phản ứng dẫn tới sự chuyển sang giai đoạn kế tiếp sau đó của chu kỳ. Sự hình thành phức hệ cyclin - Cdk ở G1 cho phép tế bào chuyển từ G1 sang S và sự hình thành phức hệ cyclin - Cdk ở G2 cho phép tế bào chuyển từ G2 sang giai đoạn M. Để hiểu rõ hơn cơ chế điều chỉnh trên đây, người ta đã phân tích và lý giải bằng các nghiên cứu trên nhiều đối tượng khác nhau.

2.3. Chu kỳ của tế bào phôi sớm

Đối với các tế bào có chu kỳ chuẩn thì tế bào phải qua G1 là giai đoạn sinh trưởng đủ dài mới chuyển sang giai đoạn S để nhân đôi hàm lượng ADN, và chỉ sau khi quá trình nhân đôi ADN hoàn thành thì tế bào mới bước vào giai đoạn G2 và M để phân bào. Như vậy chu kỳ chuẩn phải kéo dài trong một thời gian đủ dài để hoàn thành các giai đoạn cần thiết trước khi phân bào, và hệ thống điều chỉnh của chu kỳ hoạt động thích ứng với thời gian đó.

- Các tế bào của phôi ở giai đoạn phát triển sớm của nhiều động vật có chu kỳ bất bình thường : chúng phân bào rất nhanh và bỏ qua giai đoạn sinh trưởng G1, và như vậy đòi hỏi sự hoạt động của hệ điều chỉnh phải thích ứng với trạng thái đó, nghĩa là cho phép tế bào trong thời gian ngắn nhất phải hoàn thành được các quá trình tối ưu cần thiết là nhân đôi và phân ly hệ gen về 2 tế bào con.

Các nhà nghiên cứu đã sử dụng phôi sớm của ếch châu Phi (*Xenopus*) để xem xét hệ thống điều chỉnh như vậy.

Tế bào trứng của ếch là một tế bào rất lớn, đường kính khoảng 1mm, chứa một nhân bé nhưng chứa tế bào chất với khối lượng 100.000 lần nhiều hơn tế bào bình thường, trong tế bào chất của trứng chứa nhiều chất dinh dưỡng cần thiết đủ cho sự phát triển của trứng đến giai đoạn nòng nọc.

Noãn bào (ovocyte-tiền thân của tế bào trứng) sau khi đã qua giảm phân I trong đó số lượng thể nhiễm sắc đã giảm thành đơn bội (n). Đặc trưng cho giảm phân là có một lần nhân đôi ADN nhưng trải qua 2 lần phân bào (I và II). Sự sinh trưởng của noãn bào để tích lũy các chất dinh dưỡng trải qua thời gian rất dài, vì vậy tiến trình giảm phân bị ách lại ở pha G2 của chu kỳ chuẩn.

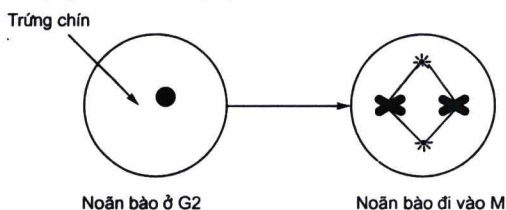
Để noãn bào có thể vượt qua điểm chốt để hoàn thành chu kỳ và trở thành trứng chín, đòi hỏi phải có hoocmon tác động đến noãn bào.

Khi trứng được thụ tinh, trứng nhanh chóng phân bào nguyên nhiễm liên tục cho ra một phôi có hàng nghìn tế bào bé mà không cần tăng trưởng và điều kiện cần độc nhất là tổng hợp và nhân đôi ADN qua 1 chu kỳ. Chu kỳ phân bào đầu tiên kéo dài khoảng 90 phút, nhưng 11 chu kỳ phân bào tiếp theo với khoảng cách chỉ 30 phút và trong khoảng 7 giờ đã hình thành phôi với 2^{12} (4096) tế bào con. Mỗi chu kỳ bao gồm giai đoạn M → 15 phút và kỳ trung gian (interphase-giữa hai lần M) kéo dài 15 phút đủ để nhân đôi ADN, như vậy coi như không có G1 và G2.

Nhân tố điều chỉnh có trong tế bào chất kiểm tra cửa vào M. Vấn đề đặt ra là tại sao các tế bào phôi sớm lại vượt qua được các điểm chốt dừng G1 và G2 để đi vào M nhanh như vậy ? Hai thí nghiệm chủ yếu cho phép người ta giả thiết là có nhân tố tồn tại trong tế bào chất của tất cả các tế bào đang ở trong trạng thái phân chia và nhân tố đó đã phát động cho tế bào đi vào M.

+ Thí nghiệm thứ nhất sử dụng các noãn bào của ếch đang bị ách lại ở G2 của giảm phân I tức là không đi được vào M.

Người ta tiêm tế bào chất của trứng ếch đã chín nhưng chưa thụ tinh vào trong noãn bào đang bị ách lại ở G2, thì noãn bào này sẽ chuyển vào M tiếp tục hoàn thành phân bào và trở thành tế bào trứng chín. Nhân tố có hoạt tính đó có trong tế bào chất được đặt tên là nhân tố phát động trứng chín-MPF (Maturation Promoting Factor), cũng là nhân tố phát động mitosis hoặc meiosis (Mitosis Promoting Factor - MPF), bởi vì nhiều thí nghiệm đã chứng minh chính MPF cũng là nhân tố phát động để tế bào vượt qua điểm chốt G2 tiến vào M (hình 6.2).



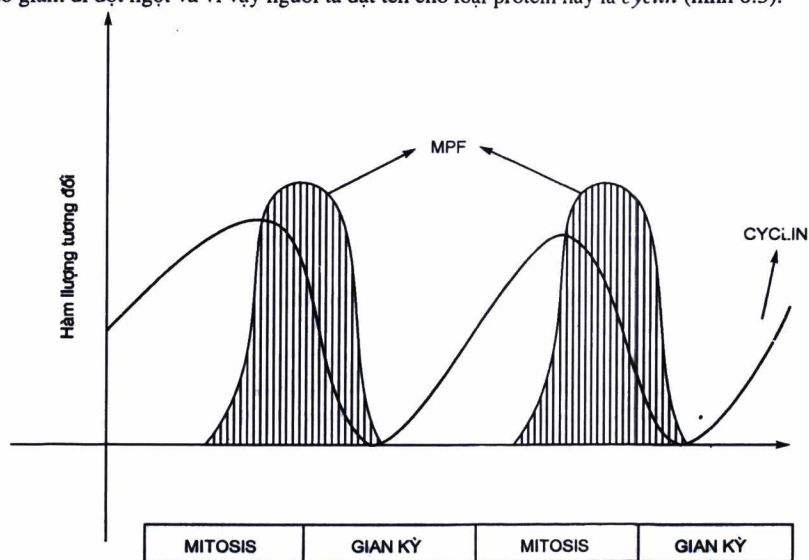
Hình 6.2. Thí nghiệm tiêm tế bào chất của trứng ếch đã chín có chứa MPF vào noãn bào ếch ở giai đoạn G2 của giảm phân I.

+ Loại thí nghiệm thứ 2 được tiến hành với các tế bào động vật có vú *in vitro*. Vì tế bào động vật có vú rất bé (10-30μm) nên khó sử dụng phương pháp tiêm, cho nên thông thường người ta nuôi cấy *in vitro* chung nhau các tế bào ở các giai đoạn khác nhau của chu kỳ, tạo điều kiện cho chúng hòa hợp lẫn nhau (bằng phương pháp lai tế bào soma). Ví dụ đem các tế bào đang ở giai đoạn M (giai đoạn phân bào) nuôi chung với tế bào ở giai đoạn G1 hoặc giai đoạn S, hoặc giai đoạn G2 thì các tế bào này (dù ở giai đoạn nào của I → gian kỳ) sẽ đi vào giai đoạn M. Điều đó thể hiện ở chỗ nhân của chúng có xu thế cô đặc, xoắn ngắn lại giống như nhiễm sắc thể của các tế bào đang ở giai đoạn phân bào.

Như vậy nhân tố MPF không chỉ có tác dụng phát động để vượt qua điểm chốt dừng ở G2 và có thể cũng là nhân tố phát động vượt qua điểm chốt dừng ở G1 cho phép tế bào đi vào S.

Nhiều thí nghiệm đã chứng minh rằng, đối với tế bào phôi ếch sớm thì hoạt tính của MPF được tăng cao ở giai đoạn phân bào và giảm bớt ở giai đoạn gian kỳ theo chu kỳ đỉnh cao 30 phút, như vậy hoạt tính phân bào là tùy thuộc vào hoạt tính của MPF. Nhiều thí nghiệm loại bỏ nhân cũng chứng minh rằng hoạt tính của MPF là đến từ tế bào chất và không phụ thuộc vào sự có hay không của quá trình nhân đôi ADN trong nhân. Nhưng khi quá trình tổng hợp protein ở G1 bị ức chế thì hoạt tính của MPF và cả tiến trình phân bào cũng bị ức chế, như vậy hoạt tính của MPF là có liên quan mật thiết đến sự tổng hợp protein đặc trưng trong gian kỳ. Để chứng minh người ta thí nghiệm với phôi sớm của cầu gai có chu kỳ tế bào giống phôi sớm của ếch. Sử dụng phương pháp đánh dấu bằng phóng xạ (S^{35} methionin) để theo dõi sự tổng hợp protein qua các chu kỳ tế bào, người ta chứng minh

rằng, một loại protein đặc biệt được tích lũy theo tiến trình của chu kỳ : trong giai đoạn gian kỳ chúng được tích lũy nhiều cho tới giai đoạn phân bào ở bước chuyển trung kỳ-hậu kỳ và sau đó giảm đi đột ngột và vì vậy người ta đặt tên cho loại protein này là *cyclin* (hình 6.3).



Hình 6.3. Sự tăng và giảm MPF và cyclin qua các chu kỳ tế bào phôi ếch sớm

Người ta đã giả thiết rằng có tồn tại một số loại cyclin, khi hàm lượng của chúng đạt tới ngưỡng nào đó sẽ tác động hoạt hóa MPF và khi chúng bị phân hủy sẽ làm bất hoạt MPF và ức chế phân bào.

Để làm sáng tỏ vai trò của cyclin, người ta theo dõi chu kỳ tế bào *in vitro*, người ta tách chiết tế bào chất của các phôi ếch đang phát triển và cho vào nuôi cấy *in vitro*. Người ta tách nhân của tinh trùng ếch và cho các nhân đó vào môi trường nuôi cấy *in vitro* có tế bào chất của phôi bào. Qua một thời gian các nhân tinh trùng trương phồng và nhân đôi ADN giống như trong tế bào đã được thụ tinh. Người ta có thể dùng phản ứng đó làm chỉ thị để xác định các giai đoạn của chu kỳ tế bào mà từ chúng tế bào chất được chiết xuất và sử dụng.

Nếu người ta đem phân hủy hết mARN trong tế bào chất được nuôi cấy *in vitro* thì chu kỳ tế bào bị đình chỉ ở gian kỳ giống như trường hợp có sự ức chế tổng hợp protein ở các phôi bào. Trái lại, nếu ta đem cho thêm mARN mã hóa cho cyclin thì hoạt tính của MPF được khôi phục và phát động phân bào. Điều đó chứng tỏ rằng hoạt tính của MPF phát động phân bào là lệ thuộc vào cyclin được tổng hợp và tích lũy đến một ngưỡng nào đó. Tuy nhiên hoạt tính của MPF không chỉ phụ thuộc vào cyclin mà còn phụ thuộc vào sự tác động của một số protein khác nữa, và cyclin chỉ được xem là một phần của phức hệ, đóng vai trò điều chỉnh hoạt tính của protein kinaza (Cdk) trong phức hệ MPF.

Như vậy, sự tích lũy cyclin là cần thiết cho tế bào đi vào mitosis và sự phân hủy đột ngột cyclin là cần thiết cho sự thoát ra khỏi mitosis. Thường thì cyclin bị phân hủy ở mitosis khi chuyển từ trung kỳ sang hậu kỳ.

Có nhiều loại (có thể có đến 5 loại) cyclin tác động qua chu kỳ tế bào khi liên kết với Cdk.

Như chúng ta đã nêu ở trên, phức hệ MPF gồm 2 cấu thành là cyclin đóng vai trò điều chỉnh, cấu thành kia là Cdk (protein kinaza) đóng vai trò là enzym kinaza là phần mang hoạt tính. Cdk sẽ photphorin hóa các protein khác cần thiết cho chu kỳ tế bào, bao gồm các protein có vai trò làm nhiệm vụ đặc biệt, làm phân hủy màng nhân (tác động đến tấm lamina), tạo thoi phân bào...

Một quá trình quan trọng nhất đòi hỏi phải có đủ thời gian xảy ra trước khi mitosis là sự tái bản ADN phải được hoàn thành, như vậy phải có cơ chế kiểm tra ngược đến từ ADN đang được tái bản, nhằm ngăn hệ thống kiểm tra tích cực làm cho tế bào tiến vào M, và như vậy ngăn chặn cho tế bào rơi vào tình trạng nguy hiểm "phân bào tự diệt" (vì không đủ lượng ADN để phân cho 2 tế bào con). Thế mà ở phôi ếch sớm, trong các chu kỳ tế bào đầu tiên diễn ra trong khoảng 30 phút hầu như bỏ qua G1 và G2, như vậy không có tín hiệu kiểm tra ngược. Người ta cho rằng ở đây, các điều kiện cho sự tái bản ADN đã có đầy đủ từ môi trường dinh dưỡng trong tế bào trứng, đủ để thực hiện 12 chu kỳ phân bào mà không cần chuẩn bị trước và sau thời gian đó, cơ chế kiểm tra ngược sẽ hoạt động giống như ở chu kỳ tế bào chuẩn. Ngoài ra còn tồn tại cơ chế kiểm tra tác động ức chế tái bản ADN xảy ra nhiều lần nếu như ADN đó đã được tái bản qua một chu kỳ trước khi vào M.

2.4. Điều chỉnh chu kỳ tế bào ở nấm men

2.4.1. Chu kỳ tế bào nấm men

Nấm men thuộc giới nấm (Fungi), cơ thể đơn bào, là đối tượng rất thích hợp trong nghiên cứu di truyền tế bào và sinh học phân tử. Chúng sinh sản rất nhanh chóng và dễ nuôi trong điều kiện *in vitro*, vì vậy sử dụng chúng để thực hiện các nghiên cứu về di truyền như xác định, chọn dòng các gen chịu trách nhiệm điều chỉnh chu kỳ tế bào, bởi vì về cơ chế điều chỉnh chu kỳ, tuy ít nhiều khác với động vật nhưng cùng nguyên tắc chung.

Hai loài nấm men thường được sử dụng để nghiên cứu về chu kỳ tế bào là nấm men mọc chồi (*Saccharomyces cerevisiae*) và nấm men phân đôi (*Schizosaccharomyces pombe*). Chúng đều tồn tại ở dạng đơn bội hoặc lưỡng bội và có chu kỳ sinh sản vô tính và hữu tính xen kẽ nhau. Khi trong môi trường đủ chất dinh dưỡng, nấm men mọc chồi ở dạng các tế bào lưỡng bội sẽ phân bào nguyên nhiễm (bằng cách mọc chồi con và lớn lên, sau đó tách ra thành hai tế bào) với chu kỳ khoảng 2 giờ. Khi môi trường nghèo chất dinh dưỡng, các tế bào lưỡng bội sẽ phân bào giảm nhiễm cho ra các bào tử đơn bội. Bào tử sẽ nảy mầm thành cơ thể đơn bội và khi điều kiện môi trường thuận lợi chúng có thể phân bào nguyên nhiễm (bằng nảy chồi) cho ra các tế bào đơn bội, hoặc các tế bào đơn bội kết hợp hữu tính ở giai đoạn G1 cho ra tế bào lưỡng bội.

Trái lại, nấm men phân đôi thường sinh sản vô tính (phân bào bằng cách phân đôi) ở dạng các tế bào đơn bội khi môi trường thuận lợi; nếu môi trường nghèo chất dinh dưỡng chúng sẽ kết hợp hữu tính cho ra các tế bào lưỡng bội. Các tế bào lưỡng bội nhanh chóng đi vào giảm phân cho ra các bào tử và bào tử sẽ tái sinh thành cơ thể đơn bội khi có điều kiện thuận lợi.

Chu kỳ tế bào nấm men kéo dài khoảng 2 giờ và nói chung phức tạp hơn so với chu kỳ tế bào phôi sớm của ếch, bởi vì đối với nấm men cũng như đa số tế bào là cần có thời gian

để sinh trưởng trước khi đi vào phân bào, nghĩa là chúng cần có giai đoạn G1 và G2 trong chu kỳ. Ở giai đoạn G1 có điểm chốt là điểm S (start) giữ cho tế bào đủ thời gian sinh trưởng và tăng khối lượng gấp đôi cũng như chuẩn bị điều kiện trước khi vào giai đoạn S (tức giai đoạn Synthesis - nhân đôi ADN). Trong trường hợp có điểm chốt G2, thì tế bào cần vượt qua chốt này trước khi vào M.

Đối với nấm men mọc chồi thì điểm S (điểm chốt G1) là quan trọng nhất vì nó kiểm tra độ sinh trưởng về kích thước tế bào và chịu ảnh hưởng của môi trường. Trong lúc đó, đối với nấm men phân đôi thì điểm chốt G2 lại là quan trọng hơn, nó kiểm soát cửa vào M.

2.4.2. Các gen điều chỉnh chu kỳ tế bào

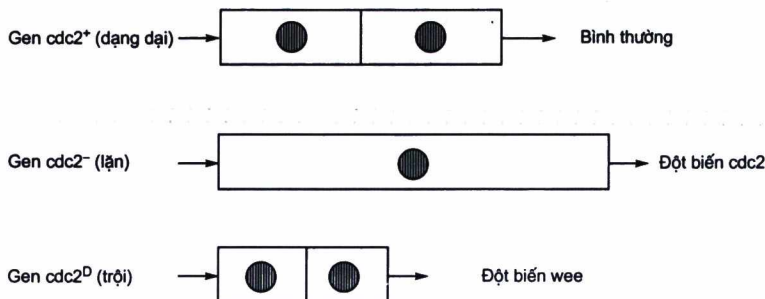
- Khi sử dụng nấm men (*Schizosaccharomyces pombe*) làm thí nghiệm để nghiên cứu chu kỳ tế bào, người ta phát hiện nhiều thể đột biến (mutant) trong đó 2 thể đột biến về kiểu hình được quan tâm là thể đột biến cảm nhiệt là do đột biến gen gây nên. Những gen đột biến này gây ảnh hưởng lên chu kỳ tế bào nấm men phân đôi.

+ Đột biến thứ nhất được gọi là đột biến *cdc2* (do gen đột biến *cdc2* gây nên) làm cho tế bào to hơn, dài hơn tế bào bình thường, vì chúng không phân đôi (không vượt qua điểm chốt G2 để vào M).

+ Đột biến thứ hai được gọi là đột biến *wee* (do gen đột biến *wee* gây nên) làm cho tế bào con bé hơn tế bào bình thường, vì tế bào mẹ lớn chưa đủ độ đã phân đôi trở thành tế bào con bé hơn (vượt qua điểm chốt G2 sớm hơn để vào M).

Bằng phương pháp di truyền phân tử và công nghệ gen, người ta đã chứng minh được rằng gen đột biến *cdc2* và *wee* là 2 dạng đột biến của gen đại (gen gốc) là *cdc2⁺*. Những tế bào nấm men phân đôi dạng đại, tức là dạng bình thường (có chu kỳ tế bào bình thường) sẽ sinh trưởng và phân đôi cho ra các tế bào con có kích thước bình thường.

Người ta quy định protein do gen *cdc2* mã hóa là protein Cdc2 (với chữ C đầu viết hoa). Nghiên cứu protein này ở các thể đột biến cho thấy trong trường hợp đột biến *wee* (đột biến bé), hoạt tính của protein Cdc2 rất cao dẫn đến phân bào sớm hơn (tức là vượt qua chốt G2 sớm hơn nên cho ra tế bào con bé hơn bình thường); còn trong trường hợp đột biến *cdc2* (đột biến dài) thì không có hoạt tính của protein Cdc2, do đó tế bào bị ách lại, không vượt qua điểm chốt G2 nên không phân bào và trở thành dài và lớn hơn bình thường (hình 6.4).



Hình 6.4. Sơ đồ các gen *cdc2* và kiểu hình *S. pombe*

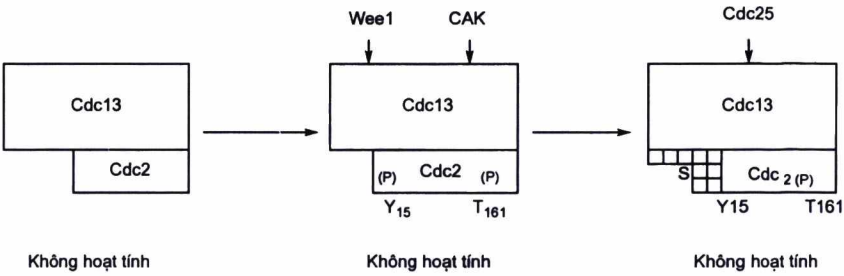
Như vậy đột biến gen *wee* là dạng đột biến trội của *cdc2* (được ký hiệu là *cdc2^D*) tức là sẽ sinh ra nhiều protein Cdc2 hơn bình thường, còn đột biến *cdc2* là đột biến lặn (được ký hiệu là *cdc2⁻*) tức là sẽ không sản sinh ra protein Cdc2 (hoặc sản sinh ra Cdc2 không có hoạt tính), và như vậy protein Cdc2 là protein đang đóng vai trò điều chỉnh chủ chốt trong chu kỳ tế bào từ G2 sang M. Bằng phương pháp thay thế và tái tổ hợp gen, người ta đã chứng minh được rằng Cdc2 là protein kinaza, tức là phần hoạt tính của phức hệ MPF.

Nghiên cứu trên nấm men *S.pombe*, người ta còn phân lập được gen *cdc13⁺* có vai trò cho phép tế bào đi vào mitosis và gen này mã hóa cho protein tương tự cyclin B ở phôi ếch và cầu gai. Chính cyclin Cdc13 liên kết với Cdc2 để tạo thành phức hệ MPF ở nấm men có tác động để nấm men chuyển chu kỳ tế bào từ G2 sang M.

Nghiên cứu trên các thể đột biến của nấm men *S.pombe* người ta còn phát hiện ra 2 gen khác nữa là gen *cdc25* và gen *wee1*. Gen *cdc25* mã hóa cho protein Cdc25 có tác dụng kích hoạt phức hệ MPF, trong lúc đó sản phẩm của gen *wee1* là protein Wee1 lại đóng vai trò ức chế hoạt tính của MPF. Như vậy bản thân phức hệ MPF (Cdc2-Cdc13) chưa có hoạt tính ngay, mà hoạt tính của chúng còn được kiểm tra bởi Cdc25 và Wee1. Nghiên cứu sinh hóa protein cho phép xác định protein Cdc25 là protein photphatase có tác động giải photpho hợp phần Cdc2 của MPF, do đó kích hoạt chúng ; Wee1 là protein kinaza có tác động photphorin hóa đối với một kinaza khác là CAK. Kinaza CAK đóng vai trò photphorin hóa Cdc2 của MPF.

2.4.3. Cơ chế điều chỉnh chu kỳ

- Như vậy ở *S.pombe* tham gia vào sự điều chỉnh hoạt tính của MPF có đến 3 loại protein là Cdc25, Wee1 và CAK. Người ta sơ bộ đưa ra mô hình điều chỉnh hoạt tính của MPF như sau : Khi nồng độ cyclin B (tức Cdc13) đủ sẽ liên kết với Cdk (tức Cdc2) tạo thành phức hệ MPF. Hợp phần Cdc2 trong MPF có thể được photphorin hóa (liên kết với photpho) ở 2 vị trí điều chỉnh là vị trí tyrosin15 (Y15) và vị trí threonin161 (T161). Ở trạng thái này MPF vẫn chưa có hoạt tính, chỉ khi vị trí T161 của Cdc2 bị giải photpho (bị lấy mất photpho) do tác động của Cdc25 là một photphatase thì MPF mới trở thành có hoạt tính, nghĩa là có khả năng liên kết với cơ chất mà nó cần photphorin hóa. Người ta cho rằng hợp phần cyclin (Cdc13) không chỉ có vai trò cố định Cdc2 mà chúng còn tham gia vào tạo thù hình liên kết của MPF với cơ chất (hình 6.5).



Hình 6.5. Sơ đồ hoạt hóa của phức hệ MPF (Cdc2 + Cdc13). (P)-photphat ; Y15-Tyrosin 15 ; T161-treonin 161 ; S-bể mất liên kết.

Người ta đã tìm thấy gen đột biến *wee* mã hóa cho kinaza Cdc2 bị sai lệch ở chỗ vị trí tyrosin 15 bị thay thế bởi phenylalanin, không thể photphorin hóa dẫn tới tăng cao hoạt tính của Cdc2 và kết quả tế bào vào M sớm hơn cho ra các tế bào có kiểu hình bé hơn (thể đột biến *wee*).

- Đối với nấm men mọc chồi *S.cerevisiae* thì điểm chốt quan trọng của chu kỳ là điểm ở G1, là điểm mà tế bào cần vượt qua để vào S. Để vượt qua điểm S, ở nấm men mọc chồi tối thiểu có 3 điều kiện quan trọng là kích thước tế bào phải đủ lớn, các chất dinh dưỡng cung cấp đủ và nhu cầu giao phối hữu tính. Nếu tế bào thiếu chất dinh dưỡng thì chúng sẽ dừng lại ở G1 lâu hơn. Và khi tế bào đòi hỏi phải tiếp hợp hữu tính thì chúng cũng dừng lại ở G1 để chuẩn bị tiếp hợp với tế bào khác để sinh sản hữu tính cho ra tế bào 2n.

Khi nghiên cứu các dạng đột biến cảm nhiệt ở *S.cerevisiae*, người ta phát hiện ra các dạng sau : dạng không chồi, dạng có chồi kích thước trung gian và dạng chồi lớn. Các dạng đột biến này đều do đột biến trong gen *cdc* đặc biệt gây nên. Như trên ta đã biết, ở *S.cerevisiae*, người ta quy định gen kiểu dại được ký hiệu là CDC28, còn gen đột biến lặn là *cdc28* và protein do chúng mã hóa được ký hiệu là Cdc28.

Gen kiểu dại CDC28 được tách chiết và chúng được dùng để thay thế cho gen đột biến không chồi, nghĩa là các thể đột biến không chồi khi đã được thay thế bằng gen CDC28 sẽ mọc chồi bình thường và chuyển từ G1 sang S và đi vào phân bào. Sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen CDC28 và kỹ thuật chuyển gen CDC28 vào *E.coli* và nghiên cứu protein Cdc28 mã hóa bởi gen CDC28, người ta thấy chúng là protein kinaza, chúng có hoạt tính tương tự Cdc2 ở *S.pombe*. Bằng thực nghiệm, gen CDC28 có thể thay thế cho gen *cdc2* ở thể đột biến của *S.pombe*.

Như vậy các gen CDC2 và *cdc28* ở *S.cerevisiae* đều mã hóa cho protein kinaza phụ thuộc cyclin (tức là Cdk) nhưng hai kiểu hình đột biến cảm nhiệt khác nhau : đột biến *cdc2* ở *S.pombe* bị ách lại ở G2, trong lúc đó kiểu hình đột biến *cdc28* lại bị ách ở G1. Vì protein Cdk là hợp phần hoạt tính của phức hệ MPF cho nên sai khác trên đây là do hợp phần điều chỉnh, tức là protein cyclin của MPF quy định. Phức hợp MPF ở *S.pombe* như ta đã biết, tác động ở G2 là do Cdc2 - cyclin B (cyclin của G2), còn đối với *S.cerevisiae* người ta đã giả thiết là có phức hệ SPF (S-Phase Promoting Factor) bao gồm 2 hợp phần là Cdc28 và cyclin của G1 tác động trong giai đoạn G1. Các nhà nghiên cứu đã phát hiện ra 3 gen mã hóa cho các cyclin của G1 là các gen CLN1, CLN2 và CLN3. Khi giải trình tự các gen này người ta thấy chúng mã hóa cho các cyclin thân thuộc. Mỗi một protein Cln (cyclin G1) đều chứa vùng có khoảng 100 gốc axit amin tương đồng với cyclin của mitosis ở cầu gai, ở *S.pombe* và ở người.

Những thí nghiệm loại bỏ gen (gene knockout) đã chứng minh rằng các tế bào *S.cerevisiae* có thể sinh trưởng trong môi trường giàu dinh dưỡng nếu như chúng mang một trong ba gen CLN. Nếu cả ba gen đó bị loại bỏ thì chúng sẽ chết và khi loại bỏ gen CLN3 giai đoạn G1 sẽ kéo dài thêm vài giờ.

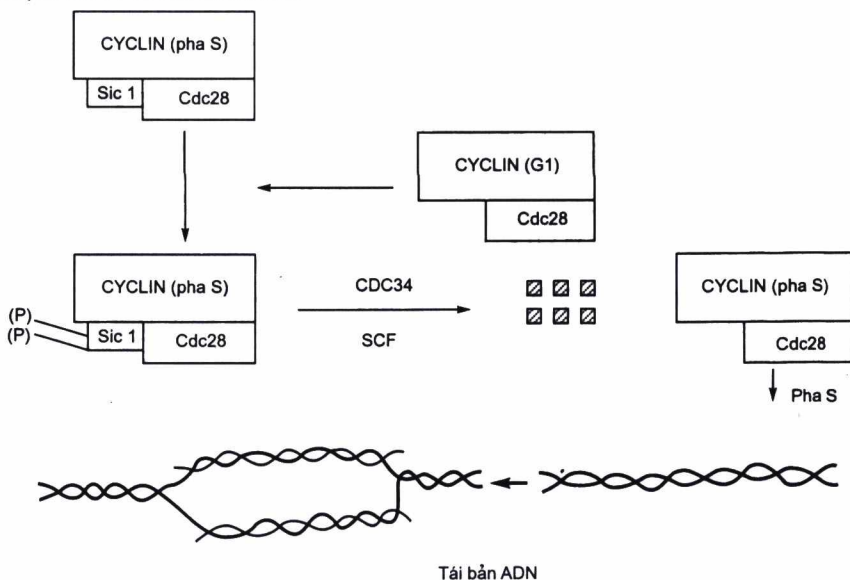
Như vậy phức hệ SPF bao gồm protein Cdc28 và ba dạng cyclin (Cln1, Cln2, Cln3) là phức hệ có hoạt tính kinaza cần thiết cho giai đoạn G1 chuyển sang giai đoạn S đối với *S.cerevisiae*, trong đó có cyclin Cln nào đó sẽ làm giảm tỷ lệ số tế bào ở lại giai đoạn G1 và khi hàm lượng Cdc28-cyclin G1 được tăng cao sẽ làm cho tế bào vượt qua điểm chốt S (tương đương với điểm hạn định R) sớm hơn để vào giai đoạn S. Trong lúc đó nếu thiếu bất kỳ dạng Cln nào thì tế bào đều bị ách lại ở G1, chứng tỏ rằng Cdc28-cyclin G1 (tức phức hệ SPF) là cần thiết cho tế bào nấm men đi vào giai đoạn S.

Đối với nấm men, dạng cyclin Cln3 được biểu hiện suốt cả chu kỳ với mức độ gần như ổn định, trong lúc đó cyclin Cln1 và Cln2 được biểu hiện ở nửa sau của giai đoạn G1 vì khi hàm lượng của chúng tăng cao nhanh chóng cho đến tối đa, khi tế bào đã vượt qua điểm chốt của G1 để vào S, sau đó hàm lượng của chúng giảm dần và bị giảm tối thiểu ở giai đoạn mitosis. Người ta chứng minh rằng Cdc28-Cln1 và Cdc28-Cln2 có vai trò photphorin hóa APC (phức hệ phát động hậu kỳ-Anaphase Promoting Complex) làm bất động chúng, cho phép tích lũy các cyclin Clb5-Clb6 ở cuối G1.

Nhiều thí nghiệm đã chứng minh rằng hoạt tính của Cdc28-Cln3 có tác động lên kích thước tế bào thông qua cơ chế điều chỉnh mà hiện nay chưa được biết rõ. Khi được hoạt hóa, Cdc28-Cln3 sẽ photphorin hóa và làm hoạt hóa hai nhân tố phiên mã là SBF và MBE và dẫn đến phiên mã các gen CLN1 và CLN2 và một số gen mã hóa cho các đơn vị bé của ADN-polimeraza, ADN ligaza và các enzym cần thiết cho sự tổng hợp ADN.

Ngoài ra người ta còn tìm thấy ở nấm men *S.cerevisiae* hai gen mã hóa cho dạng cyclin B là CLB5 và CLB6, hai gen này mã hóa cho cyclin Clb5 và Clb6 và được biểu hiện ở cuối G1. Các phức hệ Cdc28-Clb5 và Cdc28-Clb6 được tích lũy ở cuối G1 và bị bất hoạt do chúng liên kết với một nhân tố ức chế là Sic1. Sic1 có mặt ở cuối mitosis và đầu G1. Sic1 đóng vai trò là nhân tố ức chế giai đoạn S, đặc biệt là ức chế phức hệ Cdc28-cyclin B nhưng không có tác động với phức hệ Cdc28-Cln. Khi tế bào vào giai đoạn S và khi nhân tố ức chế Sic1 bị phân giải thì phức hệ Cdc28-Clb5 và Cdc28-Clb6 trở nên hoạt tính và phát động sự tái bản ADN (hình 6.6).

Nhân tố ức chế Sic1 bị phân giải bởi proteaxom bằng con đường ubiquitin hóa bởi các enzym Cdc34 và SCF (hình 6.6).



Hình 6.6. Cơ chế kiểm tra từ G1 → S ở *S. cerevisiae*

Vào thời gian cuối giai đoạn S có sự phiên mã của 2 gen mã hóa cho dạng cyclin B là Clb3 và Clb4 và chúng liên kết với Cdc28 tạo thành phức hệ kinaza I Cdc28-Clb3 và Cdc28-Clb4 có vai trò phối hợp với Cdc28-Clb5 và Cdc28-Clb6 duy trì sự tái bản ADN, nhưng đồng thời chúng có vai trò phát động sự tạo thành thoi phân bào khi bắt đầu mitosis.

Khi sự tái bản ADN kết thúc và tế bào đi vào G2 còn có 2 dạng cyclin B được biểu hiện là Clb1 và Clb2 đóng vai trò là cyclin của M. Chúng liên kết với Cdc28 tạo thành phức hệ cần thiết cho sự phân ly của nhiễm sắc thể và phân đôi nhân ở M.

- Như vậy các nghiên cứu ở nấm men *S.cerevisiae* chứng tỏ rằng có nhiều nhóm cyclin định hướng cho kinaza Cdc28 hoạt động phù hợp với các giai đoạn khác nhau của chu kỳ tế bào :

- + Ba dạng cyclin hoạt động trong G1 là : Cln1, Cln2 và Cln3. Hàm lượng của Cln3 giữ ở mức ổn định suốt chu kỳ nhưng hoạt tính của chúng bị kiểm tra bởi kích thước tế bào. Khi Cdc2-Cln3 hoạt động, chúng phosphoryl hóa hai nhân tố phiên mã dẫn đến sự hình thành ở cuối G1 các cyclin Cln1 và Cln2, các enzym và các protein khác cần thiết cho sự tái bản ADN, cũng như sự hình thành Clb5 và Clb6 ở cuối G1. Các cyclin Cln1 và Cln2 tạo phức hệ với Cdc28 có vai trò ức chế phức hệ APC, do đó cho phép tích lũy Clb5 và Clb6 ở cuối G1. Phức hệ Cdc28-Clb5 và Cdc28-Clb6 xuất hiện ở cuối G1 lúc đầu bị ức chế bởi Sic1. Sic1 được tạo thành ở đầu G1. Khi Sic1 bị phân hủy, Cdc28-Clb5 và Cdc28-Clb6 trở thành có hoạt tính và dẫn đến phát động tái bản ADN ở S và tạo thành thoi phân bào ở đầu M.

- + Các cyclin Clb1 và Clb2 được biểu hiện ở G2 sẽ liên kết với Cdc28 tạo thành phức hệ phát động các quá trình ở M.

- + Tất cả các cyclin dạng B bị phân hủy ở cuối hậu kỳ phân bào bởi phức hệ APC đã được hoạt hóa (Anaphase Promoting Complex). Hoạt tính của Cdc28 - Clb giảm dần tới sự chuẩn bị điều kiện sẽ diễn ra ở G1 cần thiết cho sự tái bản ADN.

- + Sự ức chế tái phát động tái bản ADN (sẽ diễn ra ở chu kỳ tiếp, trước khi hậu kỳ được hoàn thành và nhiễm sắc thể đã phân ly về 2 cực) là để duy trì sự phân ly chính xác số nhiễm sắc thể con về 2 tế bào con.

2.5. Điều chỉnh chu kỳ tế bào ở động vật có vú

2.5.1. Đặc tính chu kỳ tế bào ở động vật có vú

Đối với động vật có vú cũng như các cơ thể đa bào phức tạp khác được đặc trưng bởi sự phát triển cá thể (ontogenesis) là quá trình đa giai đoạn diễn ra theo thời gian, theo đó từ hợp tử, thông qua sự sinh sản của tế bào và biệt hóa tế bào sẽ hình thành các mô, các cơ quan và cơ thể toàn vẹn đặc trưng cho loài về kiểu hình và kiểu gen. Sự sinh sản và kiểm soát tế bào được diễn ra bởi một mạng lưới tín hiệu đến từ các tế bào của mô, của các cơ quan trong cơ thể, từ môi trường và phối hợp với các tín hiệu nội bào về sự tăng trưởng và phát triển theo đúng chương trình phát triển của kiểu gen. Như vậy chu kỳ tế bào và cơ chế điều chỉnh các chu kỳ là không như nhau đối với các tế bào biệt hóa khác nhau của cơ thể.

Các tế bào phôi sớm sinh sản rất nhanh, chu kỳ tế bào ngắn, trong lúc đó các tế bào biệt hóa của cơ thể trưởng thành rất khác nhau về thời gian kéo dài của chu kỳ, của từng giai đoạn của chu kỳ. Đối với tế bào gốc trong mô luôn được đổi mới như biểu mô ruột, da, mô tủy đỏ xương,... chúng luôn luôn phân bào để thay thế các tế bào bị mất đi. Đa số tế bào

của mô thường dừng lại ở giai đoạn G1 để biệt hóa thành các tế bào đặc trưng cho mô như mô gan, mô thận, mô cơ, mô thần kinh,... Và người ta bảo chúng ở giai đoạn G0. Trong điều kiện nào đó, các tế bào đã biệt hóa của các mô (ví dụ tế bào gan, tế bào limpho, tế bào bào sợi,...) có thể từ trạng thái G0 chuyển trở về G1, hoàn thành chu kỳ và đi vào sinh sản và sau đó lại đi vào biệt hóa khi ở giai đoạn G1. Ví dụ tế bào gan, ở phần gan bị cắt sẽ trở lại G1 và phân bào cho ra các tế bào gan mới để tái sinh lại phần gan bị cắt. Hoặc như tế bào limpho khi có kích thích của kháng nguyên sẽ trở lại G1 và phân bào, sau đó biệt hóa cho ra các tế bào có thẩm quyền miễn dịch,...

Có loại tế bào như tế bào neuron sau khi được biệt hóa chuyển vào G0 thì chúng ở trạng thái đó để thực hiện chức năng dẫn truyền thần kinh suốt đời. Có loại tế bào như hồng cầu ở động vật có vú, sau khi được biệt hóa mất nhân chứa Hb thì chúng chỉ hoạt động một thời gian và sẽ bị chết đi.

Như vậy khi nghiên cứu cơ chế điều chỉnh tế bào ở động vật có vú ta phải đặt các vấn đề sau đây :

- Bản chất của hệ thống điều chỉnh chu kỳ tế bào là gì ?
- Sự sinh sản của tế bào được kiểm tra như thế nào và bằng phương pháp nào để nghiên cứu chúng ?
- Những nhân tố ngoại bào nào tác động lên sự sinh trưởng và sinh sản của tế bào ? và bằng hệ thống cơ chế nào, các nhân tố ngoại bào tác động lên hệ thống điều chỉnh chu kỳ tế bào ?

Các nhà nghiên cứu rất khó quan sát cụ thể sự sinh trưởng và sinh sản của tế bào động vật *in vivo* (trong cơ thể). Đa số các nghiên cứu về sự điều chỉnh sự sinh sản của tế bào động vật có vú và người được tiến hành với các tế bào nuôi cấy *in vitro*. Như vậy có một số khó khăn nhất định. Các tế bào được tách từ các mô đem nuôi cấy *in vitro*, dù cho trong điều kiện thuận lợi chúng chỉ phân bào trong một số lần nhất định (ví dụ tế bào người là khoảng 50 chu kỳ), sau đó chúng ngừng phân bào đi vào thoái hóa và chết. Điều lý thú là có một số tế bào (đặc biệt là ở động vật Gặm nhấm) không đi vào thoái hóa mà sẽ phân bào vô hạn định, trở thành các tế bào bất tử và tạo thành một dòng tế bào riêng. Đó là những tế bào đột biến, chúng cũng giống như các tế bào đột biến được tách ra từ các mô ung thư (ví dụ tế bào HeLa tế bào tách từ mô ung thư cổ dạ con của chị Henrietta Lack bị ung thư dạ con chết từ năm 1950). Những dòng tế bào bất tử này được nuôi cấy *in vitro* trong tất cả các phòng thí nghiệm sinh học và y dược học, cung cấp cho các nhà nghiên cứu một mô hình thực nghiệm rất có ích cho sinh học, y dược nói chung và cho các nghiên cứu về chu kỳ tế bào nói riêng.

2.5.2. Các nhân tố sinh trưởng

Trong nhiều năm, các nhà nghiên cứu đã không thành công nuôi cấy các tế bào động vật *in vitro* mặc dù người ta tạo được môi trường nuôi cấy vô trùng có chứa đầy đủ các chất dinh dưỡng cần thiết. Chúng sẽ không sinh trưởng và sinh sản nếu như người ta không cho thêm vào môi trường nuôi cấy "chất huyết thanh" (serum), là dịch được chiết xuất từ máu sau khi để máu ngưng kết. Các tế bào sống trong môi trường không có serum thì chúng sẽ không phân bào mà chuyển sang trạng thái G0. Người ta đã chứng minh chất cần thiết có

trong serum là những protein rất đặc trưng được gọi là *nhân tố sinh trưởng* (growth factor) và chúng tác động với một nồng độ rất nhỏ (vào khoảng từ 10^{-9} đến 10^{-11} M).

Một trong những nhân tố sinh trưởng đầu tiên được xác định là nhân tố sinh trưởng từ tiểu cầu được gọi là PDGF (Platelet-Derived Growth Factor). Lúc đầu người ta sử dụng huyết tương (plasma) cho vào môi trường thì tế bào không sinh trưởng - sinh sản, nhưng nếu ta thay thế bằng serum thì chúng nhanh chóng sinh sản, bởi vì khi người ta chế tạo huyết tương bằng cách tách bỏ các tế bào máu trước khi chúng chưa kịp ngưng kết. Khi máu ngưng kết, các tiểu cầu sẽ tiết ra nhân tố PDGF vào serum. Khi người ta tách chiết các chất PDGF trực tiếp từ tiểu cầu thì chúng cũng có tác dụng kích thích sinh sản tế bào. PDGF là một protein được tiết ra từ các bóng tiết có trong tiểu cầu, chúng có tác dụng kích thích sự sinh sản của tế bào để tái sinh các mô bị hỏng trong cơ thể, ví dụ sự hàn gắn và tạo sẹo cho vết thương trong cơ thể.

Hiện nay người ta đã biết được trên 50 chất có tác động như là nhân tố sinh trưởng và chúng còn được gọi là chất *mitogen*, vì chúng kích thích phân bào (mitosis). Các tế bào đáp ứng lại với các nhân tố sinh trưởng bằng các thụ quan màng đặc trưng (membrane receptor). Ngoài các nhân tố sinh trưởng là protein, một số loại phân tử khác cũng có vai trò như thế, ví dụ các hormone steroid. Chúng tác động bằng cách liên kết với các thụ quan nội bào (trong các tế bào chất hoặc trong nhân).

Người ta thường chia các nhân tố sinh trưởng thành hai loại : loại đặc trưng rộng và loại đặc trưng hẹp. Loại đặc trưng rộng, ví dụ PDGF và EPGF (nhân tố sinh trưởng biểu bì-epidermal growth factor) là loại tác động lên nhiều dạng tế bào : thần kinh giao, tế bào biểu mô, v.v... Trong lúc đó loại đặc trưng hẹp, ví dụ erythropoietin chỉ tác động kích thích sinh sản dòng hồng cầu.

Các nhân tố sinh trưởng tác động lên tế bào theo nhóm và những tổ hợp rất đa dạng có thể là kích thích hoặc ức chế sự sinh sản của tế bào tùy theo nồng độ và tùy trường hợp, chúng có thể tác động lên sinh sản, sự tồn vong, sự biệt hóa, sự di cư của tế bào trong cơ thể đa bào.

Như vậy các nhân tố sinh trưởng là sản phẩm của tế bào nhưng chúng có tác động điều chỉnh hoạt động của các tế bào một cách đa dạng. Có nhân tố vừa kích thích sự sinh trưởng, đồng thời kích thích sự sinh sản của tế bào. Một số nhân tố có tác động kích thích sinh trưởng nhưng không cho phép vượt qua điểm hạn định R (tương đương điểm S ở nấm men) của G1, trong lúc đó lại có nhân tố cho phép vượt qua điểm R nhưng không có tác động kích thích sinh trưởng. Như vậy, đối với các tế bào của động vật có vú không tồn tại mối tương quan chặt chẽ giữa kích thích cơ thể tế bào với sự phân bào như ở nấm men.

Các tế bào đã biệt hóa như tế bào neuron có thể sinh trưởng để tăng thêm các phần tế bào chất, các phần phân nhánh mà không phân bào. Sự sinh trưởng của chúng được kiểm soát bởi nhân tố sinh trưởng thần kinh là NGF (Nerve Growth Factor) tiết ra do các tế bào đích được phân bố thần kinh. Tế bào đích càng tiết nhiều NGF thì neuron càng lớn nhanh, có khi lớn gấp hàng nghìn, hàng chục nghìn lần so với các tế bào khác của cơ thể, mặc dù chúng vẫn chứa một hàm lượng ADN như nhau.

2.5.3. Các điểm chốt của chu kỳ

Đối với chu kỳ tế bào động vật có vú, điểm chốt ở G1 (được gọi là điểm R - restriction point) tương tự điểm S ở nấm men là điểm chốt quan trọng mà tế bào phải vượt qua để vào

giai đoạn S và hoàn thành chu kỳ kéo dài từ 14-16 giờ, S kéo dài từ 6-8 giờ, G2 từ 1-2 giờ và M kéo dài khoảng 1 giờ. Tất nhiên như ta đã biết, trong cơ thể, các quần chúng tế bào biệt hóa khác nhau có thời gian chu kỳ khác nhau. Đa số bị dừng lại ở G1 và chuyển sang trạng thái G0 tạm thời (như tế bào gan, tế bào biểu mô, biểu mô ruột, tế bào limpho, v.v...) hoặc vĩnh viễn (như tế bào neuron). Người ta thường gọi G0 là giai đoạn nghỉ - giai đoạn "ngủ đông", hoặc đi vào thoái hoá của tế bào, thực chất tế bào không nghỉ hoàn toàn mà giảm cường độ hoạt động tổng hợp protein nhiều khi chỉ còn 20% và thực hiện các chức năng của mô, cơ quan mà tế bào đó là thành viên.

Đối với các tế bào đang phân bào thì ngoài điểm chốt R, còn có điểm chốt khác, ví dụ điểm chốt giữa G2 và M, giữa trung kỳ vào hậu kỳ, mà tế bào phải vượt qua để chuyển giai đoạn, hoàn thành chu kỳ.

2.5.4. Cơ chế điều chỉnh chu kỳ

a) Vai trò của Cdk và cyclin

Nhiều loại Cdk và cyclin tham gia điều chỉnh chu kỳ (hình 6.1). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng, khác với nấm men là bọn chỉ sản sinh một loại Cdk tham gia điều chỉnh chu kỳ, thì ở động vật có vú có nhiều loại Cdk tham gia điều chỉnh chu kỳ. Theo nguyên tắc hoạt động của các Cdk ở trong các tế bào động vật có vú, có thể phân ra các loại Cdk1, Cdk2, Cdk3, Cdk4, Cdk5 và Cdk6 (theo thứ tự phát kiến ra chúng).

Cdk1 ở người được phát hiện đầu tiên khi sử dụng phương pháp chọn dòng gen cdk và thay thế, bổ trợ cho nấm men *S.pombe* đột biến *cdc2* lúc đầu gọi là Cdc2 (vì tương đương với Cdc2 của *S.pombe*) và bây giờ có tên là Cdk1. Gen cdk1 cũng có khả năng thay thế bổ trợ cho đột biến *cdc28* ở *S.cerevisiae*. Cdk4 và Cdk6 đã được tách chiết và tác dụng của chúng cũng tương tự Cdk1. Còn các dạng Cdk3 và Cdk5 ít có tác dụng đối với chu kỳ tế bào mà có thể có vai trò khác.

Cũng giống như nấm men *S.cerevisiae*, tế bào động vật có vú cũng sử dụng nhiều loại cyclin tham gia điều chỉnh hoạt tính của Cdk, trong đó cyclin A và B tác động trong giai đoạn S, G2 và mitosis sớm (hình 6.1)

Ở động vật có vú cũng tìm thấy 3 loại cyclin D (D1, D2, D3) và cyclin E có tác động ở giai đoạn G1, tương ứng với các loại Cln ở nấm men *S.cerevisiae*.

Các loại cyclin khác nhau liên kết với các loại Cdk khác nhau tạo thành các phức hệ có tác dụng điều chỉnh chu kỳ ở các giai đoạn khác nhau. Ví dụ phức hệ Cdk4-cyclin D và Cdk6-cyclin D cùng với Cdk2-cyclin E tác động ở G1. Phức hệ Cdk2-cyclin A tác động ở giai đoạn S. Các phức hệ Cdk1-cyclin A và phức hệ Cdk1-cyclin B tác động ở giai đoạn G2 và M. Khi có nhân tố sinh trưởng, các phức hệ Cdk-cyclin sẽ kích thích các tế bào đang ở giai đoạn G0 trở lại G1 và vượt qua G1 để hoàn thành chu kỳ. Trong môi trường nuôi cấy *in vitro*, khi thiếu nhân tố sinh trưởng thì tế bào ở giai đoạn G0 không sản xuất Cdk và cyclin.

b) Vai trò của các nhân tố sinh trưởng

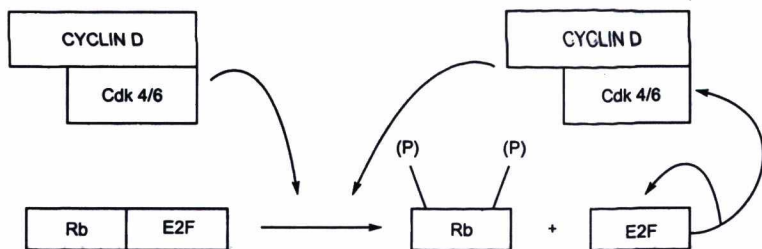
Tác động của nhân tố sinh trưởng là gây cho tế bào có 2 đáp ứng : đáp ứng sớm và đáp ứng chậm.

- Trong đáp ứng sớm thì sau khi được thêm nhân tố sinh trưởng chỉ vài phút hàm lượng các mRNA bắt đầu tăng. Như vậy, có sự phiên mã của nhiều gen chủ yếu là các gen mã hóa

cho các nhân tố phiên mã như c-Fos và c-Jun hoạt động. Người ta đã chứng minh được rằng, các dạng đột biến của các gen c-Fos và c-Jun do tác động của retrovirus đã dẫn đến tạo nên các protein (v.Fos và v.Jun) có tác động chuyển hóa tế bào lành thành tế bào ung thư. Như vậy, các nhân tố phiên mã trên là có vai trò trong việc điều chỉnh chu kỳ tế bào.

- Sau 30 phút, nồng độ các mARN tăng tối đa và sau đó giảm dần, các protein được tổng hợp trong giai đoạn đáp ứng sớm là những protein không bền vững cho nên nồng độ của chúng cũng giảm dần. Các protein được tổng hợp trong giai đoạn đáp ứng sớm có tác động hoạt hóa các gen ở giai đoạn đáp ứng chậm. Một số gen này là các gen mã hóa cho các nhân tố phiên mã như E2F. Một số gen khác trong đáp ứng chậm là các gen mã hóa cho các loại cyclin D, A, E, các gen mã hóa cho các loại Cdk2, Cdk4 và Cdk6 cũng được hoạt hóa và biểu hiện. Cho đến khi nào nồng độ các protein này tích lũy đủ thì tế bào mới vượt qua điểm R để vào S và tái bản ADN.

Một số nhân tố phiên mã E2F là cần thiết cho sự phiên mã các gen trên đây, cũng như các gen mã hóa cho nhiều protein tham gia vào tổng hợp ADN và nhân tố E2F cũng kích thích sự phiên mã các gen mã hóa cho bản thân chúng. Khả năng kích thích phiên mã của E2F lại bị ức chế bởi protein liên kết với chúng là Rb và bởi 2 protein thân thuộc khác là p107 và p130. Protein Rb đầu tiên được xác định như là sản phẩm của gen ức chế ung thư RB (tumor suppressor gene). Ở người, khi thiếu gen RB sẽ bị ung thư Rb (Retinoblastoma). Sự photphorin hóa protein Rb sẽ làm cho chúng mất vai trò ức chế, do đó dẫn đến sự hoạt hóa các gen cần thiết bởi E2F để đi vào giai đoạn S. Ta hãy hình dung 1 cơ chế phức tạp như sau : sự photphorin hóa protein Rb gây ra bởi các phức hệ Cdk4-cyclin D và Cdk6-cyclin D ở giữa G1 và khi Cdk2 và cyclin E được sản xuất thì phức hệ Cdk2-cyclin E lại photphorin hóa Rb ở cuối G2. Đến lượt mình, khi E2F có hoạt tính sẽ kích thích sự phiên mã gen của mình (theo mối liên hệ ngược dương) và đồng thời dẫn đến sản sinh Cdk2-cyclin E, đến lượt mình phức hệ này sẽ tăng cường photphorin hóa Rb (hình 6.7).



Hình 6.7. Vai trò ức chế của Rb đối với E2F

Đến thời điểm này chu kỳ diễn ra không còn phụ thuộc vào hoạt tính của Cdk4/6-cyclin D bởi vì cùng với tiến trình khi các nhân tố sinh trưởng không được tăng thêm thì mức cyclin D cũng giảm đi và khi đó tế bào vượt qua điểm R của G1 để vào S.

Như vậy sự photphorin hóa của protein Rb có tác động điều chỉnh để tế bào vượt qua điểm R để vào S là rõ ràng và người ta cũng thấy rằng, các tế bào có mang gen RB/- sẽ bị giữ lại ở G1 không phụ thuộc vào nhân tố sinh trưởng.

Protein Rb được duy trì ở trạng thái photphorin hóa suốt giai đoạn S, G2 và M bởi phức hệ Cdk2 - và Cdk1 - cyclin. Sau khi tế bào hoàn tất phân bào và đi vào G1 sớm hoặc G0 thì mức Cdk-cyclin giảm sẽ dẫn tới làm giải photpho protein Rb bởi các protein photphatase. Protein Rb lại tác động ức chế hoạt tính của E2F ở giai đoạn sớm của G1 của chu kỳ tiếp theo.

Cyclin A được tổng hợp ở cuối giai đoạn G1 khi G1 sắp chuyển sang S. Thiếu cyclin A thì tổng hợp ADN bị ức chế. Phức hệ Cdk2-cyclin A ở động vật có vú cũng giống như Cdc28-Cln5/6 có vai trò phát động sự tái bản ADN. Hoạt tính của Cdk2-cyclin A có thể bị ức chế bởi loại protein tương tự như protein Sic1 ở *S.cerevisiae*.

Ở động vật có vú, loại Cdk tác động trong G2 là Cdk1. Cdk1 mang tính tương đồng cao với Cdc2 của *S.pombe*, và đồng thời người ta có thể sử dụng mARN mã hóa cho Cdk1 của động vật có vú để kích thích sự chín của noãn bào ếch.

Hoạt tính MPF của phức hệ Cdk1-cyclin A và Cdk2-cyclin B của động vật có vú có vai trò chuyển chu kỳ từ G2 vào M cũng được điều chỉnh bởi các protein tương tự như Wee1, CAK, Cdc25 như ở *S.pombe* và theo cùng cơ chế tương tự, nghĩa là có các kinaza tương tự như Wee1; và CAK có tác động ức chế hoạt tính của Cdk bằng cách photphorin hóa chúng và chúng sẽ được hoạt hóa bởi các photphatase (tương tự Cdc25) bằng cách giải phóng nhóm photphat ức chế.

Đối với các tế bào có chu kỳ đối mới thường xuyên (ví dụ phôi sớm) thì cyclin B bắt đầu được tổng hợp ở S và tăng cao hàm lượng qua G2 đạt đỉnh cao ở M sớm và giảm mạnh sau hậu kỳ phân bào. Ở tế bào người, cyclin B đầu tiên được tích lũy trong tế bào chất và sau đó được chuyển vào nhân ở tiền kỳ sớm ngay khi màng nhân bắt đầu phân rã. Như vậy, hoạt tính của MPF không chỉ điều chỉnh bởi sự photphorin hóa (gắn photphat) và giải photphat (tách photphat) mà còn do sự vận chuyển cyclin B vào nhân.

Cyclin A và cyclin B sẽ bị phân hủy trong proteasom (proteasome) bằng con đường ubiquitin hóa nhờ phức hệ APC (Anaphase Promoting Complex), dẫn tới giảm hoạt tính của MPF, cho phép tế bào hoàn thành mitosis để đi vào chu kỳ mới.

c) Vai trò của các nhân tố ức chế

Ở động vật có vú cũng có các nhân tố ức chế hoạt tính của phức hệ cyclin-kinaza và chúng cũng tham gia vào điều chỉnh chu kỳ tế bào sống như Sic1 ở nấm men. Người ta giả thiết rằng các chất ức chế hoạt tính cyclin-kinaza được gọi là CKI (Cyclin-Kinase Inhibitor) và chúng có 2 lớp:

- Một lớp được gọi là CIP (Cdk Inhibitor Protein), chúng liên kết và ức chế tất cả các phức hệ Cdk1-, Cdk2-, Cdk4- và Cdk6-cyclin.

- Một lớp khác được gọi là INK4 (kinase 4 inhibitor) liên kết và ức chế chỉ với phức hệ Cdk4-cyclin D và Cdk6-cyclin D. Người ta đã biết được một loại protein INK4 là p16 có tác động như một chất ức chế ung thư (tumor suppressor). Người ta cũng đã biết được ở động vật có vú có 3 lớp protein CIP được gọi là p21, p27 và p57.

Các protein ức chế như INK4 và các CIP như p21, p27 và p57 đóng vai trò ức chế hệ MPF, từ đó ức chế chu kỳ tế bào. Vai trò của CIP p21 là đáp ứng lại sự hư hỏng của ADN ở tế bào động vật có vú. Chúng cũng có vai trò ức chế sự tăng sinh tế bào trong phát triển phôi sinh. Ví dụ, trong phôi phát triển của ruồi quả, trong các tế bào mầm sẽ cho ra biểu bì,

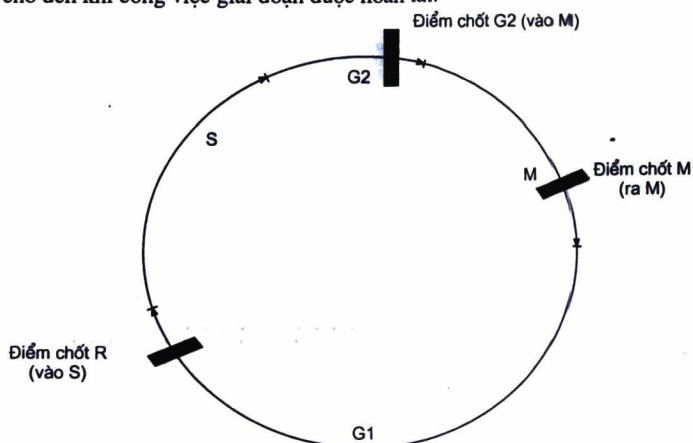
người ta tách chiết được protein dacapo tương tự như CIP được sản sinh ra ở đầu G2 của chu kỳ phân bào thứ 16, chúng liên kết và ức chế phức hệ Cdk2-cyclin E làm tế bào phôi bị ách lại ở G1 của chu kỳ thứ 17, nhằm hạn chế sự tăng sinh của các tế bào mầm biểu bì. Các thể đột biến Dacapo vì không có dacapo (protein tương tự p21) tế bào vượt qua G1 và phân bào tạo ra những ngoại chu kỳ bất bình thường.

Vai trò của các CIP p27 và p57 cũng đã được xác định bằng phương pháp loại trừ gen ở chuột. Các chuột đồng hợp p27^{-/-} phát triển phôi và sinh ra bình thường nhưng qua một vài tuần tuổi, chuột đột biến lớn vượt lên so với chuột bình thường hơn 30% vì có sự tăng sinh vượt trội của tế bào trong đa số cơ quan. Như vậy, protein CIP p27 rõ ràng là có vai trò ức chế chu kỳ tế bào và điều chỉnh sự tăng sinh tế bào trong cơ thể ở giai đoạn phôi và thai.

Protein CIP p57 được biểu hiện trong các tế bào được biệt hóa của đa số mô của cơ thể trưởng thành. Các con chuột bị loại bỏ gen không sản sinh ra p57 sẽ bị chết sau khi sinh với nhiều dị dạng do sự tăng sinh quá tải của các mô trong quá trình biệt hóa.

2.5.5. Các điểm chốt của chu kỳ và cơ chế tác động của MPF

Như trên đã nói, sự điều chỉnh chu kỳ tế bào theo thời gian (chuyển từ giai đoạn trước sang giai đoạn sau) xảy ra ở các điểm kiểm tra (control points), hay còn gọi là điểm chốt (check points). Cơ chế kiểm tra ở điểm chốt là cơ chế kiểm tra theo mối liên hệ ngược, nghĩa là công việc ở giai đoạn sau chỉ được bắt đầu khi công việc của giai đoạn trước đó đã hoàn thành, cũng có nghĩa là công việc sẽ xảy ra ở giai đoạn sau đã được chuẩn bị đầy đủ tiền đề cần thiết diễn ra ở giai đoạn trước đó. Nếu như công việc của giai đoạn trước chưa hoàn thành thì dẫn đến đình chỉ sự chuyển sang giai đoạn sau và tế bào phải ở lại giai đoạn trước đó cho đến khi công việc giai đoạn được hoàn tất.



Hình 6.8. Chu kỳ tế bào và các điểm chốt

Tác động lên điểm chốt có các tín hiệu nội bào và các tín hiệu đến từ các tế bào và mô khác trong cơ thể, cũng như tín hiệu đến từ môi trường.

Người ta thường phân biệt ba điểm chốt quan trọng (hình 6.8) : đó là điểm chốt từ G1 sang S [ở nấm men được gọi là điểm xuất phát S (start), còn ở động vật bậc cao được gọi là điểm hạn định R (restriction)], khi tế bào vượt quá được điểm chốt G1 chúng sẽ đi vào S để tổng hợp ADN. Điểm chốt thứ hai là điểm chốt G2 để kiểm tra cửa vào M của tế bào, và điểm chốt thứ ba là điểm chốt M ở thời kỳ từ trung kỳ chuyển sang hậu kỳ phân bào, thường được gọi là điểm cửa ra của phân bào, nghĩa là khi tế bào vượt qua điểm này sẽ hoàn tất phân bào và đi vào G1, tiếp tục chu kỳ mới.

a) Điểm chốt G1

Điểm chốt G1 báo hiệu rằng quá trình ở G1 đã được hoàn tất như quá trình tăng trưởng, quá trình chuẩn bị cho sự tái bản ADN. Như vậy điểm chốt ở G1 rất quan trọng và đối với các tế bào có chu kỳ chuẩn và liên tục thì điểm chốt G1 là điểm kiểm tra các quá trình diễn ra ở G1 mà khi hoàn tất sẽ phát động sự tái bản ADN và tiếp tục chu kỳ. Đối với các tế bào biệt hoá là do các tế bào bị ách lại ở G1. Các nhân tố sinh trưởng GF (Growth Factor) cũng như các chất kích thích phân bào (mitogen) thường tác động lên điểm chốt G1. Chúng phát động sự biểu hiện của các gen mã hóa cho nhiều protein, nhiều enzym tác động đáp ứng sớm của tế bào, trong đó có các gen mã hóa cho các nhân tố phiên mã, ví dụ như c-Fos, c-Jun. Các protein và enzym của đáp ứng sớm sẽ kích thích hoạt hóa các gen của giai đoạn đáp ứng chậm, trong đó quan trọng nhất là các gen mã hóa cho các nhân tố phiên mã E2F.

Một số gen khác trong đáp ứng chậm là các gen mã hóa cho các dạng cyclin của G1 và một phần của S-cyclin D, E và A, các gen mã hóa cho các dạng Cdk tác động trong G1 và S như Cdk2, Cdk4 và Cdk6.

Nhân tố phiên mã E2F có tác động kích thích sự phiên mã các gen mã hóa cho các protein và enzym cần thiết cho sự tái bản ADN. Khi tế bào chưa vượt qua điểm chốt G1 thì E2F bị ức chế do liên kết với các protein ức chế, ví dụ protein Rb. Khi protein Rb bị photphorin hóa nhờ các phức hệ kinaza (tức MPF) như Cdk4/6-cyclin D và Cdk2-cyclin E thì E2F được giải phóng, chúng sẽ tác động cùng với Cdk2-cyclin A lên hệ tái bản ADN và như vậy G1 được chuyển vào S.

Nhiều nguyên nhân gây tác động làm tế bào bị ách lại ở G1. Ví dụ, khi phân tử ADN bị hư hỏng do các tác nhân phóng xạ hoặc hóa chất thì tế bào bị ách lại ở G1 cho tới khi các hư hỏng đó được sửa chữa. Sự ách lại ở G1 là để phòng ngừa sự tái bản các ADN bị đột biến sẽ dẫn đến thể đột biến trong các tế bào con.

Người ta đã phát hiện ra protein p53 (gọi như vậy vì có khối lượng 53kDa) có vai trò ức chế tế bào người dừng lại ở G1 khi có sự hư hỏng ADN. Khi protein p53 không hoạt động, các tế bào với hư hỏng ADN sẽ vượt qua G1 vào S để tái bản ADN, hoàn thành chu kỳ và sẽ cho ra các tế bào con có thể chuyển dạng thành tế bào ung thư. Vì vậy người ta gọi gen mã hóa cho protein p53 là gen ức chế ung thư (tumor suppressor gene).

Trong trường hợp bình thường, protein p53 là một nhân tố phiên mã, chúng rất không bền vững, vì vậy chúng tồn tại với lượng rất ít, vừa đủ để bám vào yếu tố kiểm tra tương ứng của ADN và hoạt hóa sự phiên mã. Sự hư hỏng ADN làm bền vững hóa protein p53 và do đó nồng độ của chúng tăng cao, chúng sẽ tích cực kích thích phiên mã. Một trong các gen được chúng kích thích phiên mã là gen mã hóa cho protein ức chế CIP p21, là protein ức chế hoạt tính của phức hệ cyclin-kinaza. CIP p21 liên kết và ức chế tất cả Cdk-cyclin ở động vật có vú và kết quả là tế bào bị ách lại ở G1 (hoặc G0) cho tới khi ADN hư hỏng đã được sửa chữa, vì nồng độ p53, CIP p21 giảm xuống.

Nếu ADN bị hư hại quá nặng thì protein p53 sẽ hoạt hóa các gen dẫn đến quá trình *tự chết của tế bào* (apoptosis). Quá trình apoptosis theo chương trình xảy ra một cách bình thường trong quá trình phát triển cá thể ở động vật đa bào. Đối với động vật có xương sống, protein p53 có vai trò đáp ứng lại các hư hỏng nặng của ADN bằng cách tự chết là để ngăn ngừa sự đột biến ADN có thể sẽ dẫn đến phát triển các tế bào ung thư. Những tế bào chứa đột biến gen p53 ở cả hai alen (p53) khi ADN bị hư hỏng, chúng vẫn vượt qua G1 vào S và vẫn tái bản tạo ra đột biến và tái sắp xếp lại ADN dẫn đến phát triển ung thư.

Hậu quả của đột biến trong gen p53 là ví dụ điển hình trong ý nghĩa của điểm chốt của chu kỳ tế bào đối với sức khỏe của động vật và con người chúng ta. Nghiên cứu và sử dụng chúng có tầm quan trọng trong công nghệ y dược học chống ung thư.

b) Điểm chốt G2

Điểm chốt G2 báo hiệu là các quá trình cần thiết cho sự phân bào phải được hoàn tất như sự tái bản ADN, sự đông đặc và tăng xoắn của nhiễm sắc thể, sự tạo thành các vi ống chuẩn bị cho sự tạo thành thoi phân bào, thì tế bào mới vượt qua chốt để vào tiền kỳ của phân bào. Nếu các quá trình đó chưa được hoàn tất hoặc có xảy ra sự hư hỏng ADN thì tế bào cũng bị ách lại ở G2 và không vào được M, như vậy đã ngăn chặn không để xảy ra sự hư hỏng trong hệ gen của thế hệ tế bào con cháu.

Phức hệ Cdk1-cyclin A và Cdk1-cyclin B phát huy tác dụng trong G2 và cả ở trong mitosis sớm. Hoạt tính của chúng cũng được điều chỉnh bởi các protein ức chế và bởi sự photphorin hóa nhờ các kinaza, và giải photpho nhờ các photphataza.

Phức hệ Cdk1-cyclin G2 (A và chủ yếu là B) khi được hoạt hóa sẽ photphorin hóa hoặc protein đóng vai trò chủ yếu trong sự co đặc và tăng xoắn nhiễm sắc thể (như protein condensin); các protein có vai trò tạo nên các vi ống của thoi phân bào (như các tubulin); các protein có vai trò trong sự phân giải và tái tạo màng nhân (như các lamin),...

c) Điểm chốt M

Điểm chốt của giai đoạn M ở vào trung kỳ chuyển sang hậu kỳ. Nếu các quá trình như tan rã màng nhân, tạo thoi phân bào và các trung tiết (tức tâm động) bám gần nhiễm sắc thể vào sợi của thoi... chưa hoàn tất thì tế bào bị ách lại ở trung kỳ, chất conixin có tác dụng ức chế sự trùng hợp hóa vi ống tubulin dẫn đến không tạo được thoi phân bào, do đó tế bào bị ách lại ở trung kỳ tạo nên các tế bào đa bội vì hậu kỳ, mạt kỳ không xảy ra.

Phức hệ Cdk-cyclin có tác động hoạt hóa phức hệ APC (Anaphase Promoting Complex), phức hệ APC cần thiết cho sự tác động hậu kỳ cũng như phân hủy các cyclin không chỉ để hoàn tất sự phân ly nhiễm sắc thể về hai cực mà còn để phân đôi tế bào chất tạo ra hai tế bào con.

Khi APC được photphorin hóa nhờ phức hệ Cdk-cyclin, chúng sẽ có hoạt tính và sẽ tác động hướng dẫn theo con đường ubiquitin hóa để các protein ức chế hậu kỳ (ví dụ protein cohesin có vai trò gắn hai nhiễm sắc tử với nhau ở tâm động) bị phân giải bởi proteasom, do đó các nhiễm sắc tử tách khỏi nhau và vận động về hai cực nhờ sự giải trùng hợp các vi ống của sợi thoi. Khi các cyclin chưa bị phân hủy thì phức hệ Cdk-cyclin sẽ tác động để tái tạo lại màng nhân, cũng như tác động gây co thắt eo phân bào (do tác động photphorin hóa protein miozin-actin) làm cho tế bào bị phân thành hai.

Vào mạt kỳ, APC bằng con đường ubiquitin hóa sẽ tác động lên cyclin nhờ proteasom. Nồng độ cyclin giảm, Cdk mất hoạt tính và tế bào ra khỏi mitosis.

Chương 7

PHÂN BÀO NGUYÊN NHỄM

I - ĐẶC ĐIỂM CỦA PHÂN BÀO NGUYÊN NHỄM

Phân bào nguyên nhỄm hay còn gọi là nguyên phân (Mitosis) xảy ra trong pha M của chu kỳ tế bào, tiếp ngay sau pha G2. Qua M, tế bào mẹ sau khi đã đi qua pha S (trong đó bộ máy di truyền đã được nhân đôi), sẽ tạo ra 2 tế bào con, mỗi tế bào con mang bộ máy di truyền giống hệt tế bào mẹ. Hiện tượng phân bào nguyên nhỄm là hiện tượng phân bào phức tạp đặc trưng cho các tế bào Eucaryota, được phát hiện lần đầu tiên bởi Strasburger và Flemming từ những năm 1882, và vì quan sát thấy các cấu trúc sợi nên đặt tên là phân bào có tơ (Mitosis).

Bản chất của hiện tượng phân bào là phương thức, qua đó tế bào mẹ phân đôi ADN (đã được nhân đôi qua pha S) về 2 tế bào con.

1.1. Đối với Procaryota

Ở Procaryota, bộ máy di truyền có cấu trúc đơn giản, chỉ là phân tử ADN dạng vòng, vì vậy phương thức phân bào đơn giản được gọi là *sự phân đôi* (binary fission). Trong pha S sau khi phân tử ADN bám vào mesoxom (phần lõm của màng sinh chất) và tái bản cho ra 2 phân tử ADN giống hệt nhau, mesoxom được phân đôi và mỗi phần mesoxom kéo theo mình 1 phân tử ADN con. Tiếp theo một màng được hình thành cắt đôi tế bào thành hai nửa, mỗi nửa có chứa 1 phân tử ADN, kết quả là hình thành 2 tế bào vi khuẩn con có chứa ADN giống tế bào vi khuẩn mẹ.

1.2. Đối với Eucaryota

Ở Eucaryota, bộ máy di truyền có cấu trúc phức tạp, phân tử ADN liên kết với histon và các protein phi histon tạo thành các nhiễm sắc thể được phân tách với bào chất bởi màng nhân, cho nên tiến trình phân bào diễn ra phức tạp, đòi hỏi phải có bộ máy phân bào (mitotic apparatus) là hệ thống sợi tạo nên *thoi phân bào* (mitotic spindle). Cùng với sự xuất hiện các cấu trúc nhiễm sắc thể là các cấu trúc sợi tơ nên các nhà tế bào học trước đây gọi là phân bào có tơ (mitosis do từ mitos là sợi, tơ). Phân bào có tơ có những đặc điểm chung sau đây :

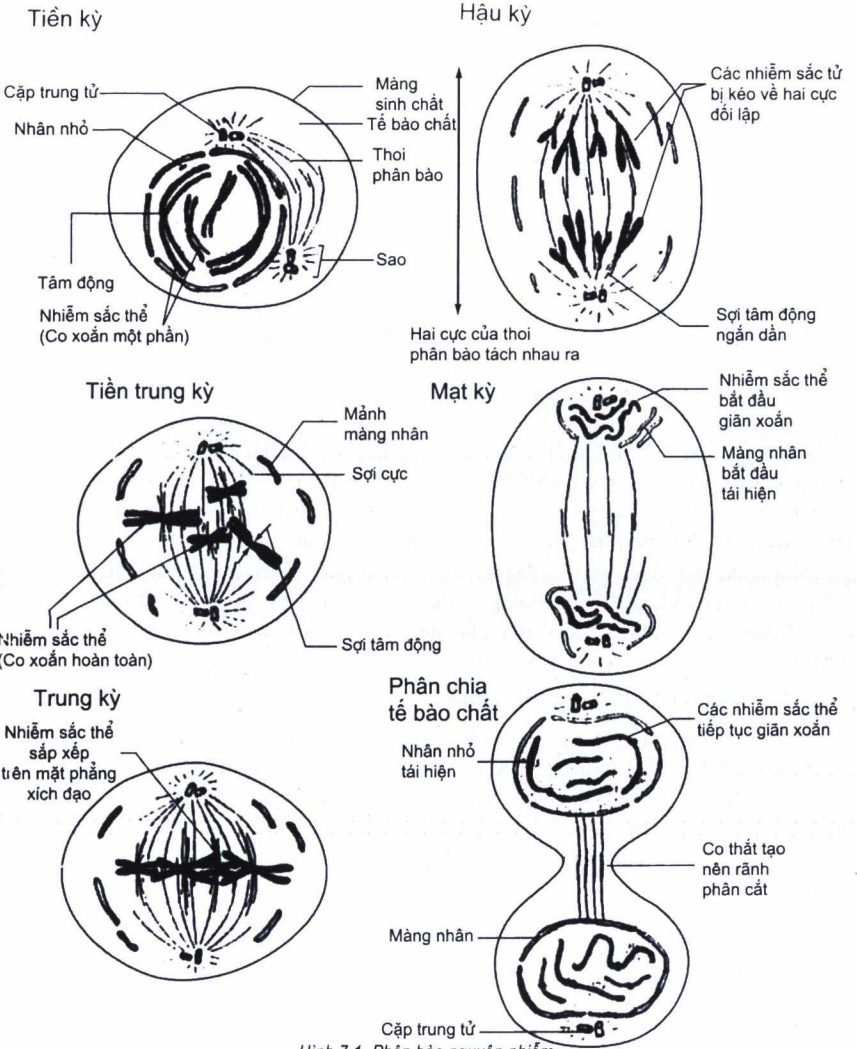
- Phân bào nguyên nhỄm là dạng phân bào phổ biến ở Eucaryota.
- Kết quả của phân bào hình thành 2 tế bào con có chứa số lượng nhiễm sắc thể giữ nguyên như tế bào mẹ (cho nên có tên là phân bào nguyên nhỄm).
- Xuất hiện nhiễm sắc thể và phân chia nhiễm sắc thể về 2 tế bào con.
- Xuất hiện trong tế bào chất bộ máy phân bào tức là thoi phân bào, có vai trò hướng dẫn các nhiễm sắc thể con di chuyển về 2 cực tế bào. Trong tiến trình phân bào, màng nhân và hạch nhân biến mất và lại được tái tạo ở 2 tế bào con.

II - CÁC KỲ CỦA PHÂN BÀO

Quá trình phân bào diễn ra theo 6 kỳ liên tiếp nhau, bắt đầu thời gian tiếp theo pha G2 của gian kỳ và kết thúc khi hình thành 2 tế bào con.

Sự phân nhân (caryokinesis) là tiến trình phân đôi của nhân bao gồm 5 kỳ liên tiếp là : tiền kỳ, tiền trung kỳ, trung kỳ, hậu kỳ và mạt kỳ. Còn sự phân tế bào chất (cytokinesis) là tiến trình phân đôi tế bào chất, là kỳ cuối cùng - kỳ phân tế bào chất.

Thực tế, trong tế bào sống rất khó phân biệt giới hạn chuyển tiếp giữa các kỳ. Mỗi kỳ được đặc trưng bởi cấu trúc, tập tính của nhiễm sắc thể, bộ máy phân bào, màng nhân v.v... cũng như các tính chất lý hóa của tế bào chất v.v... (hình 7.1).



Hình 7.1. Phân bào nguyên nhiễm

2.1. Tiền kỳ (prophase)

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

a) *Hình thành nhiễm sắc thể* : Chất nhiễm sắc ở gian kỳ bao gồm các sợi nhiễm sắc đã được nhân đôi qua pha S, trở nên xoắn và cô đặc lại, hình thành các nhiễm sắc thể thấy rõ dưới kính hiển vi thường, mà số lượng, hình thái là đặc trưng cho loài. Mỗi một nhiễm sắc thể gồm 2 nhiễm sắc tử chị em (sister chromatid) dính với nhau bởi 1 vùng được gọi là trung tiết (centromere). Hai nhiễm sắc tử chị em trong một nhiễm sắc thể chứng tỏ rằng nhiễm sắc thể đã được nhân đôi qua pha S.

b) *Màng nhân và hạch nhân có nhiều thay đổi* : Hạch nhân giảm thể tích, phân rã và biến mất. Màng nhân đứt ra thành nhiều đoạn và biến thành các bóng không bào bé phân tán trong tế bào chất.

c) *Hình thành bộ máy phân bào* : Như ta đã biết ở phần trên, đa số tế bào động vật có MTOC gồm 2 trung tử (centriole) và vùng quanh trung tử (pericentriole), qua pha S, trung tử được nhân đôi tạo thành 2 đôi trung tử con. Mỗi đôi trung tử con trở thành 1 MTOC mới. Do sự hoạt hóa của chất quanh trung tử, các đơn hợp tubulin trong tế bào trùng hợp tạo thành các vi ống tubulin. Các vi ống xếp phóng xạ quanh trung tử mới tạo thành sao phân bào (aster). Hai sao di chuyển về 2 cực tế bào. Giữa 2 sao, các vi ống phát triển sắp xếp thành hệ thống ống có dạng hình thoi, được gọi là thoi phân bào. Cấu tạo nên thoi có 2 dạng vi ống chạy từ sao của cực này đến cực kia. Các vi ống cực (hay sợi cực) chạy liên tục từ cực này đến cực kia, còn các vi ống tâm động (hay sợi tâm động) là các sợi nối với trung tiết của nhiễm sắc thể (chỗ nối này được gọi là tâm động vì nó có vai trò hướng dẫn nhiễm sắc thể con về hai cực của tế bào) ở vùng xích đạo của tế bào. Đến cuối tiền kỳ, khi màng nhân biến mất thì bộ máy thoi với hai sao đã được hình thành.

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

2.2. Trung kỳ sớm (prometaphase)

Trung kỳ sớm (hay tiền trung kỳ) bắt đầu khi màng nhân tiêu biến thành các bóng nhỏ phân tán trong tế bào chất quanh thoi phân bào. Thoi phân bào hình thành lúc đầu ở vùng cạnh màng nhân, khi màng nhân biến mất thì nó di chuyển chiếm ngay vị trí trung tâm. Các nhiễm sắc thể mang trung tiết (centromere) là nơi dính 2 nhiễm sắc tử chị em. Lúc này trung tiết phân hóa thành 2 cấu trúc được gọi là tâm động (kinetochore) kẹp lấy trung tiết, có kích thước khoảng 1µm. Thông qua tâm động, nhiễm sắc thể được dính với các sợi tâm động của thoi. Như vậy nhiễm sắc thể được xếp nằm thẳng góc với các sợi tâm động của thoi, còn tâm động có vị trí đối mặt với 2 sao ở 2 cực, mỗi phía có 1 tâm động (hình 7.1).

2.3. Trung kỳ (metaphase)

Nhiễm sắc thể ở trung kỳ xoắn, cô đặc và co ngắn tối đa. Mỗi nhiễm sắc thể dính với sợi tâm động qua tâm động, và do tác động của các sợi tâm động, các nhiễm sắc thể sắp xếp

cùng trên mặt phẳng xích đạo, tạo nên cái gọi là tấm trung kỳ. Tấm trung kỳ nằm thẳng góc với trục dọc của thoi. Hai tâm động dính với các sợi tâm động ở cả 2 phía đối mặt với sao. Ngoài các sợi tâm động, thoi còn có các sợi cực. Sợi cực của thoi không dính với tâm động, có 2 loại : 1 loại liên tục chạy từ cực này đến cực kia, 1 loại chỉ chạy từ cực đến miền xích đạo.

2.4. Hậu kỳ (anaphase)

Đặc điểm của hậu kỳ là sự tách đôi của 2 nhiễm sắc tử chị em khỏi nhau và trở thành nhiễm sắc thể con độc lập. Mỗi nhiễm sắc thể con mang một tâm động riêng dính với sợi tâm động phía đối mặt với sao. Tất cả các nhiễm sắc thể con cùng tách khỏi nhau và cùng thời gian di chuyển về 2 cực nhờ sự co ngắn của sợi tâm động (do sự giải trùng hợp của vi ống tubulin) phối hợp với sự kéo dài của các sợi cực và hẹp lại của thoi. Người ta đã tính được tốc độ di chuyển về cực của nhiễm sắc thể khoảng $1\mu\text{m}$ trong 1 phút.

2.5. Mạt kỳ (telophase)

Trong kỳ này, các nhiễm sắc thể con đã di chuyển tới hai cực, giãn xoắn, dài ra và biến dạng trở thành chất nhiễm sắc. Thoi phân bào biến mất, đồng thời hình thành màng nhân bao quanh chất nhiễm sắc. Hạch nhân được tái tạo. Hình thành 2 nhân con trong khối tế bào chất chung.

2.6. Phân chia tế bào chất (cytokinesis)

Sự phân chia tế bào chất được bắt đầu từ cuối hậu kỳ hoặc đầu mạt kỳ và diễn ra suốt mạt kỳ. Ở tế bào động vật, sự phân tế bào chất được bắt đầu bởi sự hình thành 1 eo thắt tại vùng xích đạo ở vùng giữa 2 nhân con. Sự hình thành eo thắt và lõm sâu của eo, tiến tới cắt đôi tế bào chất là do sự hình thành vòng co rút ở vùng xích đạo được cấu tạo gồm vi sợi actin. Khi vòng sợi actin co rút kéo theo phần màng sinh chất lõm thắt vào trung tâm, và khi màng nối với nhau sẽ phân tách tế bào chất thành 2 nửa, mỗi nửa chứa 1 nhân con. Mặt phẳng phân cắt tế bào chất thẳng góc với trục của thoi phân bào.

Đối với tế bào thực vật được bao bởi lớp vỏ xenlulo làm cho tế bào không vận động được nên sự phân tế bào chất xảy ra khác với tế bào động vật. Sự phân tế bào chất ở tế bào thực vật được bắt đầu bằng sự xuất hiện một vách ngang ở vùng trung tâm xích đạo, vách ngang phát triển dần ra ngoại vi cho đến khi liên kết với vách bao tế bào và như vậy phân tách tế bào chất thành 2 nửa chứa nhân con. Trên vách ngang phân tách 2 tế bào con phát triển hệ thống cầu nối tế bào chất tạo thành cấu trúc plasmodesma đặc trưng cho tế bào thực vật. Tham gia vào sự tạo thành vách ngang có phức hệ Golgi, mạng lưới nội chất và các vi ống cực của thoi còn tồn dư lại ở vùng xích đạo.

Ở hậu kỳ, các bào quan như ty thể, lục lạp, mạng lưới nội sinh chất v.v... được phân về 2 tế bào con. Nói chung trong thời kỳ phân bào, các hoạt động tổng hợp chất, hoạt động sinh lý của tế bào bị đình chỉ, hoặc giảm bớt nhằm phục vụ cho sự phân bào.

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

2.7.1. Thời gian của các kỳ

Trong cơ thể đa bào, các chủng quần tế bào mà ở đó các tế bào luôn được đổi mới nhờ sự phân bào thì tế bào duy trì một nhịp điệu phân bào ổn định. Bình thường đối với động vật có vú trưởng thành, chu kỳ tế bào trong cơ thể kéo dài từ 10 giờ đến 20 giờ, thì thời gian

phân bào có thể kéo dài từ 1 giờ đến 2 giờ. Tuy nhiên thời gian của M không phụ thuộc vào thời gian của chu kỳ. Thời gian của chu kỳ có thể dài hơn nhiều nhưng thời gian của M tương đối ổn định. Tiền kỳ thường kéo dài từ 10 đến 15 phút, trung kỳ sớm và trung kỳ kéo dài từ 25 đến 35 phút. Thời gian của hậu kỳ là ngắn nhất chỉ kéo dài từ 5 đến 8 phút, còn mặt kỳ diễn ra trong khoảng 20 đến 25 phút.

2.7.2. Chỉ số phân bào

Để xác định nhịp điệu phân bào của một chủng quần tế bào *in vivo* cũng như *in vitro*, người ta xác định *chỉ số phân bào* hay *chỉ số mitos* (mitotic index - IM). Chỉ số mitos được tính bằng số tế bào đang phân chia (tổng cộng số tế bào ở các kỳ phân bào) trên 1000 tế bào quan sát được với kính hiển vi thường.

$$IM = \frac{\text{Tổng số tế bào phân chia}}{1000 \text{ tế bào quan sát}}$$

Ví dụ, trên tiêu bản quan sát có tổng số 1000 tế bào (kể cả tế bào không phân chia và đang phân chia), trong đó có : 6 tế bào ở tiền kỳ, 8 tế bào ở trung kỳ sớm và trung kỳ, 2 tế bào ở hậu kỳ và 10 tế bào ở mặt kỳ thì chỉ số mitos sẽ là :

$$IM = (6 + 8 + 2 + 10) / 1000 = 26/1000 = 2,6\%$$

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

2.7.3. Sự điều chỉnh phân bào

Tham gia điều chỉnh quá trình phân bào có các nhân tố nội bào và ngoại bào khác nhau. Chúng ta xét xem một số nhân tố đó.

a) *Nhân tố nội bào* : Khi đề cập đến các nhân tố kiểm tra sự phân bào, người ta thấy một nhân tố nội bào có tính quyết định là : tế bào phải trải qua pha S nghĩa là ADN và nhiễm sắc thể phải được nhân đôi, tế bào ở pha G1 muốn đi vào pha S phải vượt qua điểm R ở cuối pha G1. Điều này tùy thuộc vào phức hệ protein điều chỉnh chu kỳ tế bào (xem phần trên). Cường độ tổng hợp protein nói chung trong pha G1 (sự sinh trưởng) dẫn đến làm mất cân bằng tỷ lệ khối lượng giữa nhân và tế bào chất cũng là nguyên nhân dẫn đến phân bào. Vượt qua pha G2 cũng là điều kiện cần cho sự phân bào vì trong pha G2 tế bào tổng hợp các protein cần thiết cho sự phân bào, đặc biệt sự trùng hợp hóa các tubulin để tạo thành vi ống. Chất ức chế trung kỳ conixin ức chế sự trùng hợp các vi ống, do đó ức chế sự tạo thoi phân bào và tế bào dừng lại ở trung kỳ. Sự chuyển tiếp từ pha G2 vào pha M tùy thuộc vào protein cyclin đặc trưng được gọi là cyclin B, có tác dụng hoạt hóa một kinaza tạo điều kiện cho việc hình thành thoi và sự tiêu biến của màng nhân (xem phần trên).

b) *Nhân tố ngoại bào* : Người ta đã phát hiện nhiều yếu tố ức chế sự phân bào : đó có thể là hóa chất, hoặc các bức xạ có tác động trực tiếp hoặc gián tiếp lên sự phân bào : có thể

tác động lên sự tái bản ADN ; lên sự tạo thành thoi ; lên nhiễm sắc thể, hoặc lên sự phân chia tế bào chất. Các chất kháng sinh, ví dụ actinomycin D, daunomycin, nogalomycin có tác dụng liên kết với ADN, do đó ức chế sự tổng hợp ADN. Các chất cycloheximid, puromycin ức chế sự tổng hợp protein bằng cách tác động lên ribosom. Streptomycin ức chế tế bào ở pha G2. Các chất chống chuyển hóa (antimetabolite) : chất alkylant, các thuốc nhuộm đều có tác động ức chế hoặc làm sai lệch sự tái bản ADN dẫn đến ức chế phân bào.

Các chất có nguồn gốc thực vật như conixixin, colcemid, podophylin, vinblastin v.v... đều có tác dụng ức chế sự tạo thành thoi phân bào, tế bào dừng lại ở trung kỳ và tạo thành các nhân đa bội. Nhiều chất có tác động lên nhiễm sắc thể làm đứt gãy nhiễm sắc thể, hoặc phân ly không chính xác về 2 cực, ví dụ các chất yperit, các bức xạ ion hóa v.v...

Lithium, cysteamine, cytochalasin ức chế sự phân tế bào chất dẫn đến tạo thành tế bào đa nhân.

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

Nghiên cứu cơ chế phân bào và các nhân tố điều chỉnh phân bào có tầm quan trọng đặc biệt đối với CNSH tế bào : tạo giống mới, lai soma, vi nhân giống, công nghệ tế bào gốc.

III - VAI TRÒ CỦA PHÂN BÀO NGUYÊN NHIỄM

Phân bào nguyên nhiễm là phương thức sinh sản của tế bào, của các cơ thể đơn bào cũng như các tế bào trong cơ thể đa bào. Trong cơ thể đa bào các chủng quần luôn được đổi mới (như tuỷ đỏ xương, biểu mô da, biểu mô ruột v.v...). Hàng giây, hàng phút có nhiều tế bào chết đi và được thay thế nhờ sự phân bào của các tế bào gốc.

3.1. Phân bào và sinh trưởng

Phân bào nguyên nhiễm là phương thức sinh trưởng của các mô, cơ quan trong cơ thể đa bào. Các mô, cơ quan tăng khối lượng không chỉ do sự gia tăng tổng hợp các chất nội bào và gian bào mà chủ yếu do gia tăng số lượng tế bào do phân bào. Khi sự phân bào của chủng quần bị ức chế (ví dụ do khối lượng mô hoặc cơ quan đạt mức tối hạn) thì mô và cơ quan ngừng sinh trưởng.

3.2. Phân bào và sinh sản

Phân bào nguyên nhiễm là phương thức sinh sản của tế bào cũng như của cơ thể đơn bào, qua đó tế bào mẹ truyền thông tin di truyền cho các thế hệ tế bào con. Thông tin di truyền trong ADN và nhiễm sắc thể được nhân đôi qua pha S và được phân đôi về 2 tế bào con qua phân bào nguyên nhiễm, do đó bảo tồn, giữ nguyên số lượng nhiễm sắc thể qua các thế hệ.

Phân bào nguyên nhiễm là cơ sở tế bào của phương thức sinh sản sinh dưỡng (vô tính) của thực vật cũng như một số động vật bậc thấp.

Chương 8

PHÂN BÀO GIẢM NHIỄM

I - SINH SẢN VÔ TÍNH VÀ SINH SẢN HỮU TÍNH

1.1. Sinh sản vô tính

Sinh sản vô tính là hình thức sinh sản phổ biến ở vi khuẩn, động vật đơn bào, nhiều loài tảo, nấm, thực vật và động vật. Các hình thức sinh sản vô tính tuy đa dạng như phân đôi, nảy chồi, tái sinh (ở động vật), sinh sản sinh dưỡng bằng các bộ phận cơ thể (thực vật) v.v... nhưng đều có đặc điểm chung là thông qua hiện tượng phân bào nguyên nhiễm, qua đó một cơ thể mẹ (hoặc tế bào mẹ) sinh ra những cơ thể con (hoặc tế bào con) giống mẹ về mặt di truyền. Một con vi khuẩn, một con amip, một con nấm men phân đôi là đã sinh sản ra 2 cá thể giống hệt nhau về mặt di truyền. Một đốt mía, một củ khoai tây, một lá cây bỏng được gieo trồng sẽ sản sinh ra cây con toàn vẹn nhờ sinh sản vô tính và có kiểu gen hoàn toàn giống với cây mẹ. Trong cơ thể động vật bậc cao như bọ có vú và người, các mô tăng trưởng và đổi mới nhờ sự sinh sản vô tính của tế bào (phân bào nguyên nhiễm). Sự sinh đôi cùng trứng ở người có thể xem là một hình thức sinh sản vô tính của tế bào hợp tử vì hợp tử được thụ tinh có bộ nhiễm sắc thể $2n$ qua phân bào nguyên nhiễm cho ra tế bào con (2 phôi bào) giống nhau và từ mỗi tế bào con này phát triển thành cơ thể riêng biệt giống hệt nhau về mặt di truyền. Sinh sản vô tính là phương thức sinh sản đơn giản, cho phép tăng nhanh số lượng cá thể trong môi trường sống nhất định, nhưng đặc tính di truyền không được thay đổi qua nhiều thế hệ (không có tái tổ hợp lại hệ gen), điều đó không tạo nên đa dạng di truyền cho chọn lọc tự nhiên.

1.2. Sinh sản hữu tính

Sự xuất hiện sinh sản hữu tính là bước tiến hoá lớn của sinh vật. Nó đảm bảo cho sự xuất hiện đa dạng di truyền bằng cách tổ hợp hai genom của 2 cá thể (hoặc 2 tế bào) trong loài vào một cá thể mới, đồng thời qua các thế hệ sinh sản hữu tính tái tổ hợp lại genom của các cá thể thế hệ tiếp theo.

Trong sinh sản hữu tính xảy ra sự xen kẽ thế hệ đơn bội và lưỡng bội. Phân bào giảm nhiễm bảo đảm cho sự hình thành thế hệ tế bào đơn bội (các giao tử) và qua thụ tinh, 2 tế bào đơn bội hòa hợp với nhau tạo thành hợp tử lưỡng bội, và đối với cơ thể đa bào hợp tử lưỡng bội phát triển thành cơ thể. Phương thức sinh sản hữu tính đơn giản bằng hình thức tiếp hợp xuất hiện ở một số vi khuẩn, động vật đơn bào, tảo v.v... Ở động vật và thực vật bậc cao, hình thức sinh sản hữu tính phức tạp hơn nhiều, đòi hỏi sự phân hóa giới tính ở cơ thể bố mẹ, có cơ quan sinh sản chứa các tế bào sinh dục. Thông qua phân bào giảm nhiễm tạo thành các giao tử đực và cái. Tuy ở các loài khác nhau, chu kỳ sinh sản diễn ra khác

nhau nhưng cơ chế và bản chất của phân bào giảm nhiễm diễn ra giống nhau theo một sơ đồ chung.

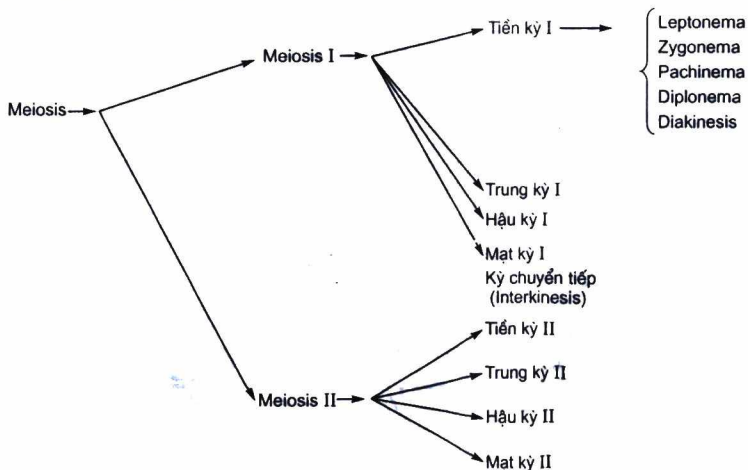
II - SƠ ĐỒ CHUNG CỦA PHÂN BÀO GIẢM NHIỄM

Phân bào giảm nhiễm (Meiosis) do Boveri phát hiện lần đầu tiên vào năm 1887, nhưng mãi đến những năm 30 - 40 của thế kỷ 20, các nhà tế bào học và di truyền học mới làm sáng tỏ vai trò quan trọng của chúng.

Qua phân bào giảm nhiễm, các tế bào con có số lượng nhiễm sắc thể giảm đi 1/2 so với tế bào mẹ (do từ meo là 1/2).

2.1. Sơ đồ chung

Phân bào giảm nhiễm gồm 2 lần phân bào diễn ra theo sơ đồ sau :

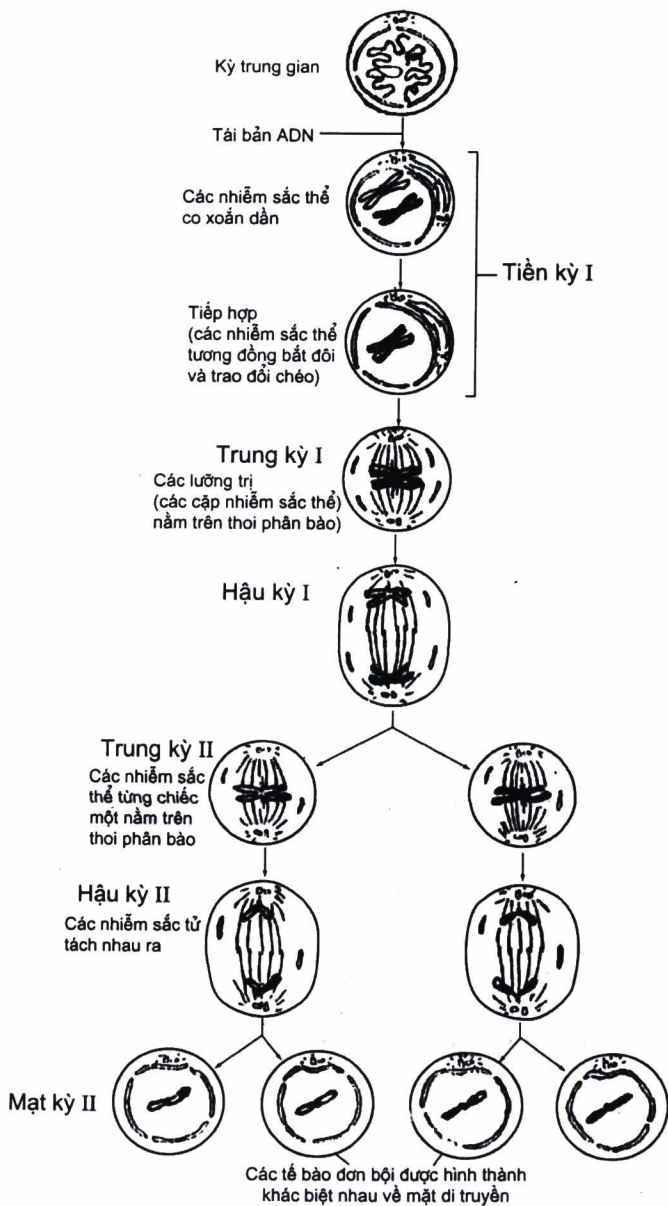


Hình 8.1. Sơ đồ chung của phân bào giảm nhiễm

2.2. Phân bào giảm nhiễm I

Phân giảm nhiễm I được gọi là lần phân bào giảm nhiễm thực thụ vì qua lần phân I, hai tế bào con được tạo thành có số lượng nhiễm sắc thể đơn bội kép còn lần phân II được gọi là phân cân bằng, diễn ra giống mitosis, trong đó một tế bào đơn bội kép phân chia thành hai tế bào đơn bội (các giao tử).

Phân bào giảm nhiễm I có thời gian kéo dài và rất phức tạp, đặc biệt là tiền kỳ I có thể kéo dài tới hàng ngày, hàng tháng thậm chí hàng năm và lại được chia thành 5 giai đoạn sau : (hình 8.2).



Hình 8.2. Phân bào giảm nhiễm

a) *Giai đoạn Leptonema* : Xuất hiện các sợi nhiễm sắc xoắn, co ngắn, có mang trung tiết, sắp xếp định hướng thành hình bó hoa và dính vào màng nhân.

b) *Giai đoạn Zygonema* : Sự sắp xếp có định hướng của các sợi nhiễm sắc tạo điều kiện cho sự tiếp hợp cặp đôi của các nhiễm sắc thể tương đồng. Cặp nhiễm sắc thể tương đồng là cặp gồm 1 chiếc có nguồn gốc từ bố và 1 chiếc có nguồn gốc từ mẹ. Sự tiếp hợp của các cặp tương đồng xảy ra rất chính xác : mỗi trung tiết tiếp hợp tương ứng với nhau, các vết tiếp hợp tương ứng trong đó các gen tiếp hợp tương ứng nhau. Sự tiếp hợp tương ứng, chính xác này chuẩn bị cho sự trao đổi chéo xảy ra ở giai đoạn tiếp.

c) *Giai đoạn Pachinema* : Được đặc trưng bởi hiện tượng trao đổi chéo (crossing over) giữa 2 nhiễm sắc thể trong cặp tương đồng. Mỗi nhiễm sắc thể lúc này gồm 2 nhiễm sắc tử chị em dính với nhau qua trung tiết (đã được nhân đôi qua pha S của gian kỳ).

Như vậy 1 cặp tiếp hợp gồm 2 nhiễm sắc thể tương đồng, được gọi là *lưỡng trị* (bivalent), nhưng vì 1 nhiễm sắc thể lại gồm 2 nhiễm sắc tử chị em nên còn được gọi là *tứ tử* (tetrad). Sự trao đổi chéo xảy ra giữa các nhiễm sắc tử không phải là chị em của cặp tương đồng. Qua sự trao đổi chéo, các nhiễm sắc tử không phải chị em trao đổi các đoạn cho nhau - tức là trao đổi gen cho nhau giữa nhiễm sắc thể bố và mẹ, là quá trình được gọi là tái tổ hợp di truyền (genetic recombination).

Sự tiếp hợp (synapsis) và sự trao đổi chéo xảy ra là nhờ sự tạo thành phức hệ tiếp hợp (synapsis complex) ngay từ giai đoạn Zygonema. Phức hệ tiếp hợp bao gồm 1 trục protein ở trung tâm và 2 giải protein ở 2 bên dính kết với nhiễm sắc tử. Sự trao đổi chéo xảy ra được là nhờ hoạt động của nút tái tổ hợp (recombination nodule) có cấu trúc hình cầu hoặc ellip, có đường kính khoảng 90nm chứa 1 tập hợp protein. Ở vùng trao đổi chéo có xảy ra sự tổng hợp bổ sung 1 số lượng ADN.

Sự trao đổi chéo xảy ra ở đoạn nào của nhiễm sắc thể sẽ được biểu hiện rõ ở giai đoạn tiếp theo với các dạng bất chéo (chiasma), khi các nhiễm sắc thể trong cặp tương đồng tách khỏi nhau.

Giai đoạn Pachinema có thể kéo dài hàng ngày.

d) *Giai đoạn Diplonema* : Đặc trưng bởi sự phân ly của các cặp tương đồng. Phức hệ tiếp hợp biến mất. Hai thành viên của cặp tương đồng trong lưỡng trị tách khỏi nhau, tuy nhiên chúng vẫn còn dính nhau ở một vài điểm được gọi là điểm chéo (chiasma). Điểm chéo chính là vùng mà ở đó 2 nhiễm sắc thể tương đồng trao đổi gen cho nhau. Trong noãn bào (oocyte), giai đoạn diplonema có thể kéo dài đến hàng tháng hoặc hàng năm, vì lẽ ở giai đoạn này nhiễm sắc thể giãn xoắn, tạo nên một dạng nhiễm sắc thể đặc biệt gọi là nhiễm sắc thể chổi bóng đèn (lampbrush chromosome) với mục đích tổng hợp ARN, và từ đó tổng hợp các chất dinh dưỡng cần thiết để tạo noãn hoàn cho trứng trong giai đoạn sinh trưởng.

e) *Giai đoạn Diakinesis* : Đặc trưng của giai đoạn này là các nhiễm sắc thể ngừng tổng hợp ARN, xoắn lại và cô đặc, dày lên. Trong mỗi nhóm tứ tử ta thấy rõ 4 nhiễm sắc tử : trong đó 2 nhiễm sắc tử chị em vẫn dính với nhau qua trung tiết, còn các nhiễm sắc tử không phải chị em có trao đổi chéo thì dính với nhau qua điểm chéo. Các nhiễm sắc thể tách khỏi màng nhân. Màng nhân, hạch nhân biến mất. Xuất hiện thoi và sao phân bào. Do sự

hình thành các điểm chéo nên ta thấy các dạng khác nhau của các cặp lưỡng trị : dạng chữ X (khi có 1 điểm chéo), dạng O (khi có 2 điểm chéo) và dạng số 8 (khi có 3 điểm chéo).

Khi tiền kỳ I kết thúc, tế bào chuyển vào trung kỳ I, hậu kỳ I, mặt kỳ I và phân tế bào chất để hoàn thành phân chia I tạo ra 2 tế bào đơn bội. Sự giảm nhiễm từ $2n$ kép (với ý nghĩa là 4 nhiễm sắc tử của 2 nhiễm sắc thể tương đồng) thành n kép (với ý nghĩa là 2 nhiễm sắc tử chị em của 1 nhiễm sắc thể bố hoặc mẹ) là do cơ chế sắp xếp ở trung kỳ I và phân ly ở hậu kỳ I của các thành viên trong cặp tương đồng. Ở trung kỳ I, mỗi thành viên với 2 nhiễm sắc tử chị em của cặp tương đồng xếp song song với mặt phẳng xích đạo theo cách xếp đối mặt với nhau, trung tiết dính với các sợi của thoi và như vậy cả 2 thành viên xếp thẳng góc với trục của thoi và mỗi thành viên đối mặt với 1 cực. Mặt phẳng cắt dọc giữa 2 nhiễm sắc thể tương đồng chính là mặt phẳng phân ly ở hậu kỳ I.

Ở hậu kỳ I, mỗi thành viên của cặp tương đồng với 2 nhiễm sắc tử chị em dính nhau ở trung tiết sẽ di chuyển về mỗi cực để qua mặt kỳ I và phân tế bào chất tạo thành 2 tế bào con : trong đó mỗi tế bào con chỉ chứa thành viên của bố, hoặc chỉ của mẹ (nghĩa là mang tính đơn bội), nhưng mỗi thành viên vẫn có 2 nhiễm sắc tử (vì vậy nên gọi là đơn bội kép), do đó cần có lần phân bào II để phân chia nhiễm sắc tử chị em về 2 tế bào cháu mang số nhiễm sắc thể đơn bội (hình 8.2).

2.3. Phân bào giảm nhiễm II

Thường thường tiếp theo phân bào I, hai tế bào con trải qua 1 kỳ chuyển tiếp rất ngắn, trong đó không có sự nhân đôi nhiễm sắc thể, rồi chuyển sang phân bào II.

Lần phân bào II cũng trải qua các kỳ : tiền kỳ II, trung kỳ II, hậu kỳ II, mặt kỳ II và phân tế bào chất để tạo thành 2 tế bào cháu mang nhiễm sắc thể đơn bội. Người ta nói lần phân bào II là phân bào cân bằng và nó tương tự với phân bào mitosis vì sự phân ly ở hậu kỳ II giống hệt mitosis, nghĩa các yếu tố phân ly là 2 nhiễm sắc tử chị em tách khỏi nhau và di chuyển về 2 cực theo mặt phẳng cắt dọc giữa 2 nhiễm sắc tử chị em (hình 8.2).

So với tiến trình phân bào I thì phân bào II xảy ra nhanh chóng với thời gian chỉ chiếm 1 - 10%.

Kết quả là qua 2 lần phân bào, từ 1 tế bào $2n$ kép đã tạo nên 4 tế bào chứa số lượng nhiễm sắc thể đơn bội n , tức là các giao tử.

2.4. So sánh phân bào nguyên nhiễm với phân bào giảm nhiễm

Ta có thể so sánh sự khác biệt chủ yếu giữa sự phân bào giảm nhiễm và phân bào nguyên nhiễm theo các đặc điểm sau :

Bảng 8.1. So sánh phân bào nguyên nhiễm và giảm nhiễm

Mitosis	Meiosis
- Đặc trưng cho tất cả các dạng tế bào.	- Chỉ đặc trưng cho tế bào sinh dục đi vào quá trình chín để tạo giao tử.
- Tế bào con có bộ nhiễm sắc thể như tế bào mẹ ($2n-2n$).	- Tế bào con có bộ nhiễm sắc thể giảm đi $1/2$ ($2n \rightarrow n$).
- Gồm 1 lần phân chia.	- Phức tạp hơn, gồm 2 lần phân chia : I và II.

- Giai kỳ giữa 2 lần phân bào nguyên nhiễm có nhân đôi ADN và nhiễm sắc thể.	- Kỳ chuyển tiếp giữa phân chia I và phân chia II không có sự nhân đôi ADN và nhiễm sắc thể.
- Tiền kỳ ngắn, không có tiếp hợp và trao đổi chéo.	- Tiền kỳ I kéo dài (hàng tháng, hàng năm), có tiếp hợp và trao đổi chéo giữa 2 nhiễm sắc thể tương đồng.
- Hậu kỳ : yếu tố phân ly về 2 cực là 2 nhiễm sắc tử chị em của 1 nhiễm sắc thể, phân ly khỏi nhau, mỗi nhiễm sắc tử đi về một cực.	- Hậu kỳ I : yếu tố phân ly là thành viên trong cặp tương đồng. Mỗi thành viên là nhiễm sắc thể bố hoặc mẹ (với 2 nhiễm sắc tử chị em) phân ly khỏi lưỡng trị và di chuyển về 2 cực.
- Phương thức sinh sản vô tính, vẫn giữ nguyên genom không đổi qua các thế hệ.	- Phương thức sinh sản hữu tính : bảo đảm khâu tạo thành giao tử. Nhờ tái tổ hợp di truyền tạo nên đa dạng trong genom qua các thế hệ.

2.5. Nhiễm sắc thể chổi bóng đèn (lampbrushchromosome)

Khi nghiên cứu phân bào giảm nhiễm của noãn bào ech ở giai đoạn Diplonema, người ta quan sát thấy dạng nhiễm sắc thể có cấu tạo đặc biệt, được gọi là nhiễm sắc thể chổi bóng đèn. Nhiễm sắc thể chổi bóng đèn có thể đạt tới kích thước $d = 20 - 40\mu m$ và $l = 0,5\mu m$, có cấu trúc giống cái chổi để lau chùi bóng đèn thấp bằng dầu hỏa (nên có tên gọi chổi bóng đèn - lampbrush), hoặc giống cái chổi ống nghiệm. Nhiễm sắc thể gồm 2 sợi trục xếp theo hình số 8 mang các vòng bên mà số lượng đạt tới hàng vạn chiếc. Nếu quan sát dưới kính hiển vi điện tử thì sợi trục gồm 2 sợi nhiễm sắc ở dạng xoắn, còn các vòng bên là các sợi nhiễm sắc mở xoắn. Trong các vòng bên mở xoắn, các đơn vị hoạt động của gen đang tích cực tổng hợp nên ARN phục vụ cho việc tổng hợp các chất cần thiết cho sự phát triển của tế bào trứng về sau này. Nhiễm sắc thể chổi bóng đèn không chỉ được quan sát thấy ở noãn bào của giai đoạn tiền kỳ I ở con cái bọn ech nhái mà còn quan sát thấy ở cả tinh bào con đực tại giai đoạn tiền kỳ I của rất nhiều nhóm động vật không xương sống như : nhuyễn thể, tôm cua, côn trùng. Loại nhiễm sắc thể này cũng tìm thấy ở noãn bào cá, chim, có vú và người. Người ta cũng tìm thấy nhiễm sắc thể dạng chổi bóng đèn ở cả thực vật bậc thấp và thực vật bậc cao. Điều đó chứng tỏ tổ chức vòng bên của sợi nhiễm sắc (looped domains) được xem như là đơn vị tổ chức của hoạt động gen trong nhiễm sắc thể.

III - VAI TRÒ CỦA PHÂN BÀO GIẢM NHIỄM

3.1. Phân bào giảm nhiễm - tạo giao tử

Là khâu tạo thành giao tử mang bộ đơn bội nhiễm sắc thể của quá trình sinh sản hữu tính. Khi 2 giao tử đực và giao tử cái thụ tinh hòa hợp để tạo thành hợp tử, bộ lưỡng bội được khôi phục, do đó bảo đảm sự ổn định bộ nhiễm sắc thể qua các thế hệ nhờ sự luân phiên : phân bào giảm nhiễm (n) - thụ tinh (2n) - phân bào giảm nhiễm (n) - thụ tinh (2n) v.v...

Nếu không có phân bào giảm nhiễm thì theo đà thụ tinh qua các thế hệ, bộ nhiễm sắc thể của loài sẽ tăng từ $2n \rightarrow 4n \rightarrow 8n$ v.v...

3.2. Ý nghĩa tiến hóa của phân bào giảm nhiễm

Là phối hợp với thụ tinh (tức là sinh sản hữu tính) để tạo nên đa dạng di truyền một cách có quy luật và tất yếu, làm cơ sở cho chọn lọc tự nhiên mở ra những hướng tiến hóa muôn màu muôn vẻ của Eucaryota. Sự đa dạng di truyền có được là do hiện tượng tái tổ hợp di truyền đem lại. Đối với cơ thể đơn bội cũng như tế bào lưỡng bội, sinh sản vô tính bằng phân bào nguyên nhiễm thì qua các thế hệ, genom vẫn giữ nguyên không đổi, nghĩa là không có biến dị di truyền, hoặc có biến dị thì chúng xảy ra ngẫu nhiên (do tác nhân bên trong hoặc do tác nhân môi trường) không theo quy luật, vì vậy ít tạo được đa dạng di truyền, do đó hạn chế sự tiến hóa. Để khắc phục thiếu sót này ở Procaryota và ở Eucaryota bậc thấp đã xuất hiện hiện tượng tiếp hợp giữa 2 cá thể, qua đó 2 nhiễm sắc thể của 2 cá thể có thể trao đổi gen cho nhau với mục đích đổi mới genom của mình tạo ra đa dạng di truyền. Có thể xem đó là hình thức sinh sản hữu tính sơ khai. Sự sinh sản hữu tính tiến hóa theo phương cách phối hợp phân bào giảm nhiễm : bảo đảm điều kiện cho sự trao đổi gen ngay trong cùng một tế bào, dòng tế bào sinh dục ; và thụ tinh - bảo đảm sự tái tổ hợp lại toàn bộ genom của cá thể.

a) Sự trao đổi chéo

Sự trao đổi gen qua phân bào giảm nhiễm giữa 2 cặp nhiễm sắc thể tương đồng bảo đảm sự đổi mới thành phần gen trong từng nhiễm sắc thể của bố và cả của mẹ. Sự trao đổi chéo xảy ra trong giai đoạn tiền kỳ I là nhờ sự tiếp hợp chính xác của 2 nhiễm sắc thể tương đồng qua phức hệ tiếp hợp ; có sự tổng hợp thêm ADN cần thiết và hoạt động của các protein nhờ SSB protein (protein gây bất ổn định ADN), rec A protein cũng như các enzym đặc trưng cho quá trình trao đổi gen giữa 2 đoạn ADN tương đồng. Nhờ hiện tượng trao đổi chéo, các giao tử được hình thành qua phân bào giảm nhiễm mang genom khác biệt với genom của thể hệ giao tử trước đó. Số lượng giao tử khác biệt nhau xuất hiện qua meiosis tùy thuộc vào sự phân ly độc lập của các thành viên trong cặp tương đồng, tức là tùy thuộc vào số đơn bội (n) : ví dụ, nếu $n = 2$ thì số giao tử khác biệt nhau sẽ là 4, nếu $n = 3$ thì số giao tử khác biệt sẽ là 8. Khái quát chung, số giao tử khác biệt được tạo thành sẽ bằng 2^n . Ví dụ ở người $n = 23$ thì qua meiosis sẽ tạo ra số lượng giao tử khác biệt nhau là 2^{23} .

b) Sự tái tổ hợp lại toàn bộ genom của hợp tử khi thụ tinh

Khi thụ tinh có sự hòa hợp genom của giao tử đực và giao tử cái tạo thành một genom chung đặc trưng cho cơ thể tương lai. Sự tổ hợp 2 genom này xảy ra một cách tự do và sự đa dạng di truyền của chúng tùy thuộc vào số giao tử tham gia tổ hợp. Nếu $n = 2$ thì số giao tử khác biệt là 4 và số hợp tử đa dạng sẽ là $4 \times 4 = 16$. Nếu $n = 3$ thì số giao tử sẽ là 8 và số hợp tử sẽ là $8 \times 8 = 64$. Khái quát hóa, ta có số nhiễm sắc thể đơn bội là n thì số giao tử khác biệt là 2^n và số hợp tử đa dạng là $2^n \times 2^n$. Ví dụ ở người, số giao tử khác biệt nhau được tạo thành là 2^{23} và số hợp tử đa dạng là $2^{23} \times 2^{23}$.

SINH HỌC PHÂN TỬ VÀ TẾ BÀO ĐỐI VỚI CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Chương 9

TỪ KỸ THUẬT GEN ĐẾN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

I - TỪ SINH HỌC PHÂN TỬ ĐẾN KỸ THUẬT GEN

Những hiểu biết sâu sắc về các đại phân tử sinh học (ADN, ARN, protein) là cơ sở khoa học của kỹ thuật gen hay còn gọi là kỹ thuật di truyền, mà khởi đầu là kỹ thuật ADN tái tổ hợp.

1.1. Kỹ thuật ADN tái tổ hợp

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp là tập hợp nhiều kỹ thuật để tạo ra một gen hoặc cả hệ gen ; cải biến cấu trúc của gen, hệ gen nhằm tạo ra các gen mới rồi chuyển chúng vào trong tế bào, cơ thể chủ nhằm mục đích sản xuất các sản phẩm (protein, enzym...), các tế bào, cơ thể có tính trạng mới có ích như nhà thiết kế mong muốn.

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp bao gồm các bước cơ bản sau :

- Tách chiết để tạo các đoạn ADN hoặc ARN mong muốn (phân lập gen).
- Tạo vector tái tổ hợp (chuẩn bị vector tách dòng, cắt, nối các gen bằng enzym cắt giới hạn và enzym nối).
- Chuyển (biến nạp) ADN tái tổ hợp vào tế bào chủ và nhân dòng gen.
- Sàng lọc, theo dõi sự hoạt động của gen được chuyển trong tế bào chủ.

Nếu các bước trên được hoàn thành chúng ta sẽ có số lượng lớn đoạn ADN (gen) mong muốn để sử dụng vào mục đích khác nhau.

1.1.1. Tách chiết ADN, ARN và tạo gen mong muốn

Để tạo gen mong muốn, trước hết ta phải tách chiết ADN hoặc ARN từ các nguồn khác nhau.

a) Tách chiết ADN

Tùy theo nguồn axit nucleic khác nhau, chúng ta có các cách tách chiết ADN khác nhau :

- Đối với vi khuẩn, muốn tách chiết ADN, cần nuôi vi khuẩn để thu lượng sinh khối lớn, sau đó tiến hành phá vỡ màng tế bào vi khuẩn, loại bỏ các protein bằng các enzym. Cho kết tủa và tinh sạch ADN bằng các hoá chất, dung môi, dịch chiết thích hợp.

- Đối với các mô, tế bào của động vật, thực vật, nguyên tắc tách chiết ADN giống ; như tách chiết ADN từ vi khuẩn. Tuy nhiên chúng ta trực tiếp lấy các mẫu sinh phẩm như lông, tóc, thịt, máu, nước bọt, các mô thân, lá, rễ, hoa... Tùy theo mục đích nghiên cứu có thể sử dụng các kỹ thuật tách chiết với các hoá chất, dung môi thích hợp.

b) Tách chiết ARN

Muốn tách chiết ARN từ vi khuẩn, tế bào động, thực vật ta thực hiện như tách chiết ADN, Dịch chiết sau khi làm sạch protein, cần sử dụng enzym phân huỷ ADN, sau đó kết tủa để thu ARN. Tùy theo loại ARN mà sử dụng các cách khác nhau để thu được loại ARN mong muốn.

c) Định lượng ADN và ARN

Sản phẩm ADN, ARN sau khi tách chiết cần phải xác định độ tinh sạch và hàm lượng đủ cho nghiên cứu. Để định lượng độ tinh sạch, người ta thường dùng phương pháp đo quang phổ để xác định chỉ số hấp phụ, từ đó đánh giá độ tinh sạch cũng như hàm lượng ADN, ARN cần thiết.

Cũng có thể dùng phương pháp điện di trên gel thạch, gel poliacrilamit để xác định các băng ADN, ARN, từ đó suy ra độ tinh sạch và hàm lượng cần thiết.

1.1.2. Tạo vector tái tổ hợp

Muốn đưa một gen nào đó vào tế bào chủ, ta cần có vật mang gen (vector tách dòng) và vector này phải được gắn với gen cần chuyển (vector tái tổ hợp).

a) Vector tách dòng

Vector tách dòng còn gọi là phương tiện chuyển gen. Vector tách dòng thường là phân tử ADN có kích thước nhỏ, có khả năng cài (gắn) với các gen cần thiết, có khả năng tự tái bản, có khả năng tồn tại trong tế bào chủ và đặc biệt phải mang "tín hiệu" nhận biết trong tế bào chủ đã mang vector tái tổ hợp. Các loại vector tách dòng thường dùng trong công nghệ ADN tái tổ hợp là :

- Vector tách dòng là plasmid :

Plasmid là phân tử ADN xoắn kép, dạng vòng, có trong tế bào chất của vi khuẩn. Đặc tính của plasmid là khi chúng được gắn thêm một đoạn ADN nào đó, chúng sẽ chuyển đoạn ADN đó vào tế bào vi khuẩn khác.

- Vector tách dòng là phagơ :

Phagơ (thể thực khuẩn) dùng làm vector tách dòng, phần lớn là phagơ lamda (phagơ λ). Phagơ λ có hệ gen chứa những vị trí thuận lợi cho cài (gắn) các gen khác nhau, giúp các gen này dễ xâm nhập vào vi khuẩn và có khả năng sao chép nhanh.

- Vector tách dòng là virut của tế bào sinh vật nhân chuẩn :

Các vector này là các virut SV40, adenovirut, retrovirut và virut herpes... Các vector trong nhóm này sử dụng trong tách dòng và chuyển gen ở tế bào động vật và thực vật.

b) Enzym giới hạn

Enzym giới hạn là các enzym có khả năng nhận biết một đoạn trình tự trên phân tử ADN và cắt ADN ở những điểm đặc hiệu. Các nhà kỹ thuật gen sử dụng các enzym giới hạn như là những chiếc kéo để đồng thời cắt tách các đoạn ADN, hoặc gen từ hệ gen nào đó, cắt vector tách dòng hoặc cắt vector tái tổ hợp, để tạo điều kiện cài (gắn) đoạn gen mong muốn vào vị trí cần thiết.

Enzym giới hạn gồm 2 nhóm chính, tùy thuộc vào kiểu cắt ADN của chúng :

- Enzym giới hạn cắt đầu so le :

Enzym giới hạn cắt đầu so le (đầu dính) là enzym có khả năng nhận biết đoạn trình tự nhưng lại cắt ở các vị trí lệch nhau giữa 2 mạch đơn theo kiểu cắt chữ Z. Sử dụng enzym giới hạn cắt đầu so le để cắt 2 nguồn ADN tạo ra các đầu dính, từ đó có thể nối các đoạn ADN bị cắt lại với nhau (hình 3.3. Chương 3. Di truyền và biến dị).

- Enzym giới hạn cắt đầu bằng :

Đây là loại enzym giới hạn có khả năng nhận biết đoạn trình tự và cắt ngay tại vị trí giới hạn đó để tạo đầu bằng nhau và chúng không tự nối lại được. Cần phải sử dụng enzym nối (ligaza) để nối các đoạn cắt với nhau hoặc các đoạn nối (adaptor) chuyên dụng cho mỗi loại enzym.

Việc sử dụng đồng thời các enzym giới hạn cắt hai nguồn ADN khác nhau, sau đó khâu nối trộn lẫn sẽ tạo ra sản phẩm ADN tái tổ hợp.

1.1.3. Biến nạp ADN tái tổ hợp vào tế bào chủ và nhân dòng gen

Sau khi có ADN tái tổ hợp, cần đưa ADN tái tổ hợp vào tế bào chủ theo kỹ thuật biến nạp, nghĩa là chuyển trực tiếp ADN này vào tế bào chủ. Tế bào chủ có thể là vi khuẩn hoặc tế bào động vật, thực vật.

Công đoạn này nhằm mục đích sử dụng bộ máy di truyền của tế bào chủ để nhân bản ADN tái tổ hợp thành một lượng lớn bản sao. Người ta thường dùng hai loại tế bào chủ chính :

- Tế bào chủ là vi khuẩn *E.coli* dễ thao tác, ít tốn kém lại sinh sản nhanh, tạo dòng ADN tái tổ hợp nhanh.

- Tế bào nấm men, tế bào động vật, thực vật nuôi cấy *in vitro*. Loại tế bào chủ này thường dùng vào các mục đích cụ thể, ví dụ như cần nghiên cứu điều hoà hoạt động của gen, đột biến gen ở tế bào sinh vật nhân chuẩn...

1.1.4. Sàng lọc, theo dõi sự hoạt động của gen chuyển trong tế bào chủ

Công đoạn tiếp theo là sàng lọc, kiểm tra sự hiện diện của các gen thiết kế đã đưa vào và sau đó kiểm tra sự biểu hiện của gen đã được tạo dòng trong tế bào chủ.

Muốn sàng lọc, kiểm tra sự biểu hiện của gen đã được chuyển người ta sử dụng mẫu dò. Mẫu dò có thể là một đoạn có trình tự bổ sung (ADN hoặc ARN) đã được đánh dấu phóng xạ. Sử dụng phương pháp lai axit nucleic để phát hiện ra gen đã được đưa vào tế bào chủ. Nếu hiện tượng bắt cặp bổ sung xảy ra, có nghĩa là gen đã được chuyển vào tế bào chủ.

Kiểm tra sự biểu hiện của gen chuyển, cần tạo điều kiện cho sự biểu hiện của gen này : Muốn cho gen đã tách dòng biểu hiện đầy đủ, cần phải cài gắn vectơ biểu hiện bao gồm đủ các yếu tố phiên mã, dịch mã, sau đó kiểm tra sản phẩm protein tương ứng do gen chuyển tổng hợp nên.

1.2. Từ kỹ thuật gen đến công nghệ gen

1.2.1. Các kỹ thuật chuyển gen

Kỹ thuật chuyển gen (ghép gen) là đưa một gen lạ (một đoạn ADN hoặc ARN) vào tế bào chủ làm cho gen lạ tồn tại ở các plasmid của tế bào chủ, hoặc gắn vào hệ gen của tế bào

chủ. Các gen lạ này tồn tại và sao chép cùng với hệ gen của tế bào chủ. Gen lạ trong tế bào chủ hoạt động tổng hợp các protein đặc hiệu, gây biến đổi tính trạng, hoặc tạo những tính trạng mới ở các cơ thể được chuyển gen.

Sinh vật chuyển gen bao gồm các giống vật nuôi, cây trồng và các giống vi sinh vật mang gen mới có lợi cho con người, tạo nên sản phẩm có năng suất, chất lượng cao, hoặc những sản phẩm quý hiếm. Có nhiều phương pháp chuyển gen, chủ yếu là chuyển gen trực tiếp và chuyển gen gián tiếp.

a) Chuyển gen trực tiếp

Chuyển gen trực tiếp là phương pháp sử dụng các kỹ thuật như kỹ thuật siêu âm, kỹ thuật xung điện, vi tiêm, bắn gen... để nạp gen lạ vào tế bào chủ.

- Kỹ thuật siêu âm : Kỹ thuật siêu âm sử dụng để chuyển gen vào tế bào trần (không có thành xenlulozơ) bằng cách xử lý tế bào bằng các enzym pectinaza, hoặc xenlulaza, sau đó nuôi tế bào trần trong môi trường thích hợp. Dùng máy siêu âm để cho ADN ngoại lai xâm nhập vào hệ gen của tế bào trần của vật chủ.

- Kỹ thuật xung điện : Phương pháp chuyển gen bằng xung điện là sử dụng một dòng điện cao áp khoảng 500V/cm với thời gian 4 đến 5 phần nghìn giây tạo ra các lỗ thủng nhỏ trên tế bào trần, làm cho gen lạ bên ngoài dễ xâm nhập vào hệ gen của tế bào chủ.

- Kỹ thuật vi tiêm : Kỹ thuật vi tiêm là kỹ thuật sử dụng một lượng nhỏ ADN (các gen) tiêm vào tế bào chủ hoặc tiêm vào tế bào trứng đã thụ tinh ở giai đoạn phôi có 4-8 tế bào.

- Kỹ thuật bắn gen : Kỹ thuật bắn gen là kỹ thuật sử dụng thiết bị bắn vi đạn mang gen cần chuyển (súng bắn gen) vào hệ gen của tế bào chủ. Vi đạn là các hạt volfram hoặc vàng trộn với gen cần chuyển và phụ gia làm gen chuyển bao quanh vi đạn. Vi đạn được gắn vào đầu viên đạn lớn hơn, sau đó được nạp vào súng bắn gen. Súng bắn gen có lưới thép mịn ở đầu nòng cho phép khi bắn thì viên đạn lớn được giữ lại còn vi đạn được bắn vào tế bào với gia tốc lớn... Gen cần chuyển được bắn vào có thể tái tổ hợp với hệ gen của tế bào chủ, tạo nên tế bào mang gen chuyển, từ đó tạo cơ thể chuyển gen.

b) Chuyển gen gián tiếp

Chuyển gen gián tiếp là kỹ thuật chuyển gen (tải nạp) nhờ các nhân tố trung gian là vi khuẩn như vi khuẩn *Agrobacterium* hoặc virus và phage.

- Chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium* : Là phương pháp sử dụng vi khuẩn gây các khối u ở thực vật. Vi khuẩn *Agrobacterium* chứa một plasmid lớn tạo nên khối u ở thực vật gọi là Ti-plasmid. Cây bị nhiễm *Agrobacterium* qua vết xước thì vi khuẩn truyền một đoạn ADN của Ti-plasmid có mang các gen sản sinh auxin, opine... cho cây, làm cây hình thành khối u. Ti-plasmid được biến đổi, bằng cách loại bỏ gen gây khối u mà lại được gắn gen mới để chuyển gen vào cây trồng.

- Chuyển gen nhờ virus và phage : Là phương pháp sử dụng các virus (SV40, BPV...) hoặc các loại phage (phage λ , phage M13...) để chuyển gen vào vi khuẩn hoặc tế bào thực vật.

1.2.2. Kỹ thuật nhân bản gen bằng phản ứng chuỗi trùng hợp (phản ứng PCR)

a) Nguyên lý

Phản ứng PCR sử dụng nguyên tắc sao chép ADN với việc sử dụng cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên hai đoạn trình tự ở hai đầu đoạn ADN (gen) cần nhân bản, kết hợp

với việc sử dụng enzym ADN polimeraza chịu nhiệt. Phản ứng PCR cho phép nhân bản một lượng ADN rất nhỏ ban đầu thành lượng lớn đủ cho các thí nghiệm về ADN.

b) Các thành phần tham gia

- Đoạn ADN khuôn, có thể là ADN mạch kép, ADN mạch đơn hoặc ARN.
- Mồi : Việc lựa chọn cặp mồi ngắn, đặc hiệu cho phép nhân đoạn ADN hoặc gen mong muốn.
- ADN polimeraza là enzym chịu nhiệt xúc tác cho việc sao chép ADN. Thường dùng các loại ADN polimeraza như T_{aq} - ADN polimeraza, P_{fu} ADN polimeraza...
- Bốn loại deoxyribonucleotit triphosphat (dNTP).
- Dung dịch đệm và các ion kim loại cần thiết.

c) Chu kỳ của phản ứng PCR

Phản ứng PCR gồm nhiều chu kỳ lặp lại. Mỗi chu kỳ gồm 3 bước chính :

- Biến tính : Xử lý nhiệt ở 94°C - 95°C để tách ADN kép thành sợi đơn, trong 2-5 phút.
- Gắn mồi : Hạ nhiệt độ xuống 30°C - 65°C để các đoạn sợi đơn của mồi bắt cặp bổ sung vào ADN mạch đơn, trong khoảng 30 giây.
- Kéo dài : Các dNTP được lắp ráp để thành sợi ADN mới bổ sung với sợi ADN khuôn bắt đầu từ đoạn mồi nhờ xúc tác của enzym ADN polimeraza chịu nhiệt. Thời gian kéo dài từ 30 giây đến vài chục phút tùy đoạn ADN khuôn, quá trình tiến hành ở nhiệt độ 72°C .

Ba bước trên được lặp lại 30-60 chu kỳ tùy thuộc mục đích nghiên cứu.

Khi kết thúc phản ứng PCR, cần giữ ổn định ở nhiệt độ 72°C trong 5-7 phút. Bắt đầu từ chu kỳ thứ hai, khi gia nhiệt đến 94°C - 95°C , chỉ cần thời gian khoảng 20-40 giây.

Trên cơ sở nguyên lý, kỹ thuật của phản ứng PCR, người ta đưa ra một số kỹ thuật khác như :

1) Kỹ thuật đa hình ADN được khuếch đại ngẫu nhiên (kỹ thuật RAPD) :

Kỹ thuật RAPD tiến hành theo nguyên lý, kỹ thuật phản ứng PCR, tuy nhiên không dùng cặp mồi đặc hiệu mà dùng đoạn mồi ngẫu nhiên. Đoạn mồi ngẫu nhiên là một đoạn oligonucleotit, dài 8-13 nucleotit, cho phép nhân được nhiều đoạn ADN một cách ngẫu nhiên. Kỹ thuật RAPD để nghiên cứu sự đa dạng của phân tử ADN từ các nguồn khác nhau.

2) Kỹ thuật đa hình chiều dài các đoạn ADN được khuếch đại chọn lọc (kỹ thuật AFLP) :

Kỹ thuật AFLP dựa trên nguyên lý kỹ thuật PCR gồm hai nội dung cơ bản đó là :

- Cắt các phân tử ADN bằng các enzym giới hạn, bổ sung các đoạn nối (adaptor) đặc hiệu để tạo các đầu mút giống nhau đặc trưng cho các mồi đã chọn trước.
- Nhân đoạn ADN chọn lọc bằng kỹ thuật PCR.

3) Kỹ thuật khuếch đại các đoạn lặp đơn giản (kỹ thuật SSR) :

Trên phân tử ADN của sinh vật có nhiều đoạn lặp lại ngắn gồm vài nucleotit, còn được gọi là tiểu vệ tinh (SSR).

Kỹ thuật SSR được tiến hành theo nguyên lý, kỹ thuật phản ứng PCR với việc sử dụng đoạn mồi có trình tự bổ sung với hai đầu của vùng chứa đoạn SSR (vùng sườn). Do vùng sườn ở 2 đầu SSR khá bảo thủ nên kỹ thuật SSR có tính ứng dụng cao để nghiên cứu các loài, các chi khác nhau.

1.2.3. Kỹ thuật lai axit nucleic

a) Phương pháp lai Southern Blot

Phương pháp lai Southern Blot thực chất là phép lai ADN với ADN. Nguyên lý cơ bản của phương pháp này là sử dụng enzym giới hạn cắt ADN thành các đoạn nhỏ. Điện di trên gel thạch agar để tách các đoạn ADN nhỏ trên gel. Gây biến tính các đoạn ADN này trên màng lai (nilon hay nitroxenlulô). Sử dụng các mẫu dò là đoạn ADN đã đánh dấu phóng xạ lai với đoạn ADN trên màng lai. Phát hiện mẫu lai bằng phim phóng xạ tự chụp.

b) Phương pháp lai Northern Blot

Phương pháp lai Northern Blot tương tự như phương pháp lai Southern Blot, nhưng ở đây lai ARN (ví dụ mRNA) của tế bào cần phân tích với mẫu dò ADN tạo ra phân tử lai ARN - ADN và phát hiện phân tử lai bằng phim phóng xạ tự chụp.

1.2.4. Phương pháp giải trình tự ADN, ARN

Có các phương pháp giải trình tự ADN khác nhau, sau đây là một số phương pháp giải trình tự chủ yếu :

a) Phương pháp hoá học (Phương pháp Maxam và Gilbert)

Giải trình tự theo phương pháp hoá học dựa trên cơ sở biến tính phân tử ADN thành các mạch đơn được đánh dấu phóng xạ bằng đồng vị phóng xạ P^{32} đầu 5'. Các đoạn này chia làm 4 nhóm, mỗi nhóm chịu xử lý bởi các chất hoá học khác nhau để bẻ gãy đoạn ADN có các đầu tận cùng là A, G, C, T riêng biệt. Sau khi xử lý sẽ được các đoạn ADN có đầu tận cùng là các nucleotit khác nhau dài hơn kém nhau 1 nucleotit và được phát hiện bằng điện di trên gel poliacrilamid, từ đó suy ra trình tự của đoạn ADN phân tích.

b) Phương pháp dideoxy

Phương pháp giải trình tự dideoxy dựa trên nguyên tắc ADN polimeraza xúc tác cho việc kéo dài chuỗi polinucleotit khi gặp các deoxynucleotit dạng bình thường (dNTP), còn khi gặp các dideoxynucleotit (ddNTP) thì quá trình tổng hợp dừng lại do đầu 3'-OH của ddNTP, không có nhóm -OH. Người ta cho nồng độ ddNTP chỉ bằng 10% so với dNTP nên khi tổng hợp sẽ được các đoạn nucleotit dài ngắn khác nhau. Do vậy khi điện di trên gel poliacrilamid được các băng dài, ngắn khác nhau một nucleotit, từ đó suy ra trình tự của đoạn ADN cần phân tích.

c) Giải trình tự ADN tự động

Giải trình tự ADN tự động dựa theo nguyên lý của cả phương pháp dideoxy được cải tiến và dựa vào các thiết bị tự động hoá nhanh và chính xác. Trong kỹ thuật này người ta không đánh dấu bằng các đồng vị phóng xạ mà bằng chất hoá học phát huỳnh quang (fluochrome). Mỗi dideoxynucleotit được đánh dấu bằng một loại fluochrome có màu khác nhau. Sau khi phản ứng chúng sẽ được các đoạn nucleotit dài ngắn khác nhau một nucleotit với việc kết thúc bởi 1 đầu có màu tương ứng. Sau khi điện di trên gel poliacrilamid, kết quả sẽ được đọc trên máy tự động và cho trình tự các nucleotit của đoạn ADN cần phân tích.

II - NHỮNG ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN

Công nghệ di truyền được ứng dụng rộng rãi vào nhiều lĩnh vực đời sống khác nhau như trong việc bảo vệ sức khoẻ cộng đồng (sản xuất vacxin, sản xuất các hợp chất có hoạt

tính sinh học để làm thuốc, chữa bệnh bằng gen-liệu pháp gen...), hay ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp (ứng dụng trong chăn nuôi và trồng trọt...).

2.1. Công nghệ di truyền trong việc bảo vệ sức khỏe con người

Công nghệ di truyền được áp dụng rộng rãi trong lĩnh vực tạo ra các sản phẩm sinh học để phòng, chống bệnh bảo vệ sức khỏe cộng đồng. Công nghệ di truyền còn được ứng dụng trong việc chẩn đoán và chữa một số bệnh di truyền.

2.1.1. Công nghệ di truyền trong sản xuất vaccin tái tổ hợp

Trong y học người ta dùng vaccin để phòng ngừa các bệnh truyền nhiễm do virus, vi khuẩn gây ra.

- Các vaccin truyền thống như vaccin bất hoạt được chế tạo bằng cách giết chết các tác nhân gây bệnh trước khi đưa chúng vào người. Vaccin này có tính an toàn cao nhưng hiệu lực thấp. Vaccin được làm từ vi khuẩn hay virus còn sống nhưng đã giảm độc lực. Khi tiêm chúng vào người chúng có khả năng nhân lên.

- Vaccin này có hiệu lực cao, tuy nhiên cũng có khả năng độc tính của vi khuẩn, virus được phục hồi dẫn đến những hiệu ứng không mong muốn.

- Loại vaccin truyền thống thứ ba là peptit miễn dịch được sản xuất từ các peptit tổng hợp có tính kháng nguyên.

Cả 3 loại vaccin truyền thống đều có nhược điểm là dễ độc hoá trở lại, dễ gây dị ứng. Do vậy ngày nay người ta hướng tới sản xuất vaccin tái tổ hợp gen bằng công nghệ di truyền.

- Có hai loại vaccin tái tổ hợp gen :

- + Vaccin tái tổ hợp phân tử : Vaccin tái tổ hợp phân tử được tạo ra bằng cách ghép gen hay nạp gen kháng nguyên của đối tượng gây bệnh vào virus hoặc vi khuẩn. Virus hay vi khuẩn này sinh sản nhanh tạo ra nhiều phân tử kháng nguyên. Các kháng nguyên này được tách chiết, tinh sạch để làm vaccin tái tổ hợp chống lại các bệnh sốt xuất huyết, vaccin chống viêm gan B (HBV), vaccin chống bệnh sốt rét, vaccin chống HIV...

Ta có thể hình dung việc tạo vaccin tái tổ hợp chống bệnh sốt xuất huyết như sau : Người ta tách gen mã hoá protein vỏ (gen Den2) từ bộ gen ARN của tip virus Dengue2, là virus gây bệnh sốt xuất huyết. Tạo ra ADN bổ trợ (cDNA) rồi nhúng ADN lên bằng các phản ứng PCR sẽ thu được hàng loạt gen Den2. Sau đó gắn gen Den2 vào plasmid. Tiếp theo đó, đưa plasmid tái tổ hợp này vào tế bào nấm men. Tế bào nấm men sẽ tổng hợp nhiều protein tái tổ hợp có vai trò như kháng nguyên vỏ của virus xuất huyết, protein này ở dạng tinh thể nên dễ tách chiết, tinh sạch rồi để chế tạo vaccin.

Tạo vaccin viêm gan B tái tổ hợp bằng cách tạo kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (protein HBsAg) trong tế bào nấm men. Phân tử protein HBsAg do 3 gen mã hoá protein vỏ là protein S, protein pre-S₁ và protein pre-S₂ quyết định. Trong ba loại protein này thì pre-S₂ có khả năng đáp ứng miễn dịch mạnh nhất, nhanh nhất. Gen mã hoá cho pre-S₂ được tách dòng sau đó tái tổ hợp vào tế bào nấm men (*S. cerevisiae*) rồi phá vỡ tế bào nấm men để thu vaccin viêm gan B tái tổ hợp.

Hiện nay, Việt Nam là một trong số ít nước sản xuất thành công vaccin viêm gan virus B tái tổ hợp có hiệu quả cao ở quy mô công nghiệp. Sản xuất vaccin tái tổ hợp chống HIV thuộc loại retrovirus có hệ gen là phân tử ARN dạng xoắn, rất dễ bị biến đổi. Việc tách dòng gen mã hoá protein bề mặt của virus HIV để tạo vaccin miễn dịch chống lại virus HIV còn đang được nghiên cứu, thử nghiệm. Khó khăn trong việc tạo vaccin chống HIV là virus HIV có nhiều chủng và gây hại khác nhau. Do vậy cần tạo nhiều loại vaccin khác nhau. Mặt khác virus HIV có khả năng thay đổi nhanh chóng kiểu gen, thay đổi cấu trúc vỏ ngoài để chống lại các vaccin, do vậy gây khó khăn lớn cho việc tạo vaccin đặc hiệu.

+ Vaccin tái tổ hợp gen virus sống :

Vaccin tái tổ hợp gen virus sống là các virus động vật đã biến nạp các gen biểu hiện protein thích hợp mang tính miễn dịch từ các cơ thể bệnh lý khác nhau. Vaccin này có nhiều ưu điểm đó là : Cùng một lúc có thể đáp ứng miễn dịch khác nhau trong cùng một cơ thể, đồng thời nó có thể ngăn cản sự kháng thuốc của vi khuẩn và ký sinh trùng gây bệnh. Cấu trúc thông thường của một virus tái tổ hợp bao gồm : Một là gen ngoại lai mã hoá protein kháng nguyên của tác nhân gây bệnh, hai là virus ADN và ba là gen chỉ thị. Người ta tiến hành tái tổ hợp như sau : Trước hết tiến hành xen đoạn thứ cấp của bộ gen virus vào một plasmid vi khuẩn có mang gen kháng lại kháng sinh (1). Thứ hai là tạo tổ hợp gồm ADN khảm có chứa đoạn khởi động (promoter) mạnh gắn với gen kháng nguyên và đuôi poliA. Sau đó xen vào vùng cắt hạn chế của virus (2). Bước thứ ba là đưa (biến nạp) đồng thời cả plasmid (1) và virus (2) vào tế bào chủ nhân chuẩn. Tại đây virus ADN và plasmid hợp nhất và tạo ra virus tái tổ hợp.

Bằng phương pháp tạo vaccin tái tổ hợp virus sống, người ta đã tạo vaccin đậu mùa tái tổ hợp cho người và vật nuôi, tạo vaccin adenovirus tái tổ hợp chống một số bệnh hô hấp ở dạng viên nhộng để uống.

2.1.2. Công nghệ di truyền và ứng dụng trong sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học

Nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như insulin, interferon, hormone sinh trưởng người (HGH), somatostatin... rất cần thiết cho việc phòng chống và chữa bệnh cho người. Thông thường các hợp chất có hoạt tính sinh học như trên được tổng hợp với một lượng nhỏ trong tế bào của cơ thể người hoặc động vật bình thường. Một số người bị thiếu hụt các hợp chất trên, gây ra bệnh lý và cần điều trị bằng cách bổ sung vào cơ thể. Ngày nay người ta đã sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học bằng công nghệ di truyền với số lượng lớn, tinh sạch và có tính an toàn cao.

a) Sản xuất insulin

Insulin là loại hormone điều chỉnh lượng đường trong máu người và động vật. Thiếu hụt insulin sẽ gây bệnh tiểu đường, rồi dẫn đến nhiều bệnh lý khác. Insulin là phân tử protein có hai chuỗi polipeptit A và B. Năm 1965, người ta tổng hợp nhân tạo hai chuỗi polipeptit A và B rồi tạo ra insulin nhân tạo nhưng giá thành quá đắt.

Năm 1978, lần đầu tiên insulin được tổng hợp nhờ vi khuẩn *E.coli* bằng công nghệ di truyền. Người ta tạo ra các plasmid tái tổ hợp gồm : plasmid gắn với gen mã hoá chuỗi polipeptit A và plasmid gắn với gen mã hoá chuỗi polipeptit B. Mỗi vector tái tổ hợp này

được chuyển vào một dòng vi khuẩn *E.coli* và các chuỗi polipeptit A và B được tách ra khỏi các *E.coli*. Sau đó tạo điều kiện thích hợp nhất để gắn hai loại chuỗi này với nhau để tạo ra phân tử insulin có hoạt tính cao dùng trong chữa bệnh. Từ năm 1982, insulin sản xuất bằng công nghệ gen đã trở thành thương phẩm.

b) Sản xuất interferon

Interferon là một protein kháng thể hình thành khi tế bào bị nhiễm virus, giúp tế bào chống sự xâm nhiễm của virus khác. Interferon sản sinh trong tế bào loài nào thì có khả năng giúp cơ thể của chính loài đó chống lại virus. Interferon có nhiều loại khác nhau, đó là interferon α , β và γ . Sản xuất công nghệ interferon theo nhiều bước :

- Tách mARN từ các gen mã hoá cho interferon từ tế bào bạch cầu người.
- Thực hiện kỹ thuật phiên mã ngược mARN thành cADN tương ứng.
- Dùng vector tách dòng phage λ gắn với cADN tạo plasmid tái tổ hợp.
- Chuyển vector tái tổ hợp vào *E.coli*. Nuôi sinh khối vi khuẩn *E.coli* để thu interferon, sau đó tách chiết và tinh sạch để tạo sản phẩm interferon.

c) Sản xuất hoocmon sinh trưởng người

Hoocmon sinh trưởng người (HGH) là một protein được sản xuất từ tuyến yên giúp cho sự phát triển mô xương và làm cho cơ thể phát triển bình thường.

Sản xuất HGH bằng công nghệ di truyền theo các bước :

- Tách chiết mARN của hoocmon sinh trưởng người (mARN - HGH).
- Thực hiện phiên mã ngược mARN - HGH thành cADN tương ứng.
- Sử dụng enzym giới hạn cắt đoạn cADN, loại bỏ đoạn không cần thiết, bổ sung đoạn cần thiết tạo nên gen mã hoá cho HGH.
- Tạo plasmid tái tổ hợp gồm plasmid gắn với gen HGH.
- Chuyển vector tái tổ hợp trên vào *E.coli*. Nuôi cấy *E.coli* lấy sinh khối, tách chiết, tinh sạch tạo sản phẩm là hoocmon sinh trưởng người dùng để điều trị bệnh.

2.1.3. Công nghệ di truyền ứng dụng trong liệu pháp gen

a) Liệu pháp gen là gì ?

Liệu pháp gen là kỹ thuật đưa một gen lạ vào cơ thể để thay thế cho gen bệnh, hoặc đưa gen cần thiết nào đó thay vào vị trí gen bị sai hỏng. Việc đưa gen mới vào cơ thể thất bại hoặc thành công tùy thuộc vào vector tái tổ hợp và điều kiện kỹ thuật hiện đại.

Vector tách dòng dùng trong liệu pháp gen là retrovirus gồm các virus có hệ gen là ARN và có enzym phiên mã ngược. Tuy nhiên retrovirus có một số hạn chế. Nhóm vector tách dòng khác là adenovirus là virus có hệ gen là ADN, có khả năng xâm nhiễm vào nhiều loại tế bào.

b) Liệu pháp gen chuẩn đoán và chữa các bệnh di truyền

Một số bệnh di truyền như bệnh miễn dịch do khiếm khuyết của gen tổng hợp enzym ADA. Trẻ em thiếu hụt enzym ADA này phải nuôi cách ly trong lồng kính, tránh tất cả các tác nhân gây bệnh. Dùng liệu pháp gen chữa thiếu hụt ADA đã hồi phục được khả năng miễn dịch của bệnh nhân.

Bệnh hồng cầu hình liềm do gen β -globin bị đột biến. Dùng liệu pháp gen thay thế tế bào tủy xương mang gen đột biến bằng tế bào tủy xương mang gen bình thường đã điều trị được bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm. Các bước cơ bản của liệu pháp gen chữa bệnh hồng cầu hình liềm là :

- Tách tế bào tủy xương của người bệnh, sau đó chuyển gen β -globin bình thường vào các tế bào tủy xương người bệnh này. Chọn lọc các tế bào tủy xương mang tổ hợp gen β -globin bình thường.

- Nuôi cấy các tế bào tủy xương tái tổ hợp mang gen β -globin bình thường để tạo chủng quần thể bào.

- Chiếu xạ tia X liều cao cho bệnh nhân để giết các tế bào tủy xương mang gen đột biến.

- Cấy các tế bào tủy xương tái tổ hợp mang gen β -globin bình thường vào cơ thể người bệnh. Tế bào này phát triển và bệnh thiếu máu được khắc phục dần.

Ở Việt Nam đã triển khai công nghệ di truyền ứng dụng trong chuẩn đoán bệnh lao, phát hiện virus gây bệnh sốt xuất huyết, xác định bệnh viêm loét dạ dày, tá tràng do vi khuẩn gây viêm, hoặc chuẩn đoán ung thư gan...

Chẩn đoán bằng công nghệ chip ADN. Trên nguyên tắc bổ sung của các cặp nucleotit và lai ADN, các nhà công nghệ tin sinh học (Bioinformatic) đã chế tạo ra các chip ADN. Sử dụng các chip ADN để xác định mức độ hoạt động của gen trong các tế bào, mô và cơ thể lành và cơ thể bệnh, phát hiện các gen sai lệch, gen virus, gen vi khuẩn ký sinh giúp cho công tác phòng và chữa trị kịp thời.

2.2. Công nghệ di truyền trong sản xuất nông nghiệp

Công nghệ di truyền được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất nông nghiệp theo nhiều hướng khác nhau như chuyển gen để tạo ra vật nuôi, cây trồng có khả năng chống sâu hại, kháng lại vi sinh vật gây bệnh, chống chịu thuốc trừ cỏ, quả chín chậm, năng suất chất lượng cao... Đối với các động vật nuôi, công nghệ di truyền tạo ra các vật nuôi chuyển gen hoocmon sinh trưởng làm cho chúng tăng trọng nhanh, hoặc tạo động vật nuôi tăng sản lượng và chất lượng sữa, tạo sữa có chứa các protein có tác dụng kháng sinh, hoặc tạo phủ tạng có thể thay thế cho người...

2.2.1. Công nghệ di truyền ứng dụng trong chăn nuôi

- Công nghệ di truyền được ứng dụng đầu tiên đối với động vật là thành tựu chuyển gen bằng phương pháp vi tiêm vào phôi chuột. Sử dụng kỹ thuật di truyền có thể tách chiết, giải trình tự các gen mong muốn, sau đó tổ hợp với các nhân tố điều khiển hoạt động và biểu hiện của gen rồi chuyển vào cơ thể động vật. Những đối tượng đầu tiên được chuyển gen là chuột mang gen hoocmon sinh trưởng người, sau đó là chuyển gen này vào cừu, lợn và thỏ. Cho đến nay người ta đã nghiên cứu chuyển gen hoocmon sinh trưởng vào bò, dê, gà và trên 35 loài cá khác nhau.

- Mục đích tạo động vật chuyển gen :

Trong những năm gần đây, sự phát triển mạnh của công nghệ di truyền cho phép tạo động vật chuyển gen. Việc chuyển gen vào tế bào động vật hay vào cơ thể động vật để sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau bao gồm cả về nghiên cứu cơ bản, nghiên cứu ứng dụng và tạo ra sản phẩm động vật. Các mục đích chính của việc tạo động vật chuyển gen đó là :

+ Sản xuất các sản phẩm, các hợp chất sinh học dùng trong y học :

Đây là một hướng ứng dụng quan trọng của việc tạo động vật chuyển gen, nó là bước đột phá mới trong công nghệ sản xuất thuốc chữa bệnh có nguồn gốc protein. Bằng công nghệ di truyền, những gen mã hoá cho protein trị liệu quan trọng được chuyển vào cơ thể động vật hoặc tế bào nuôi cấy để sản xuất thuốc có nguồn gốc protein dùng để chữa trị nhiều loại bệnh tật. Một số loại thuốc có nguồn gốc protein như tPA làm tăng khả năng đông máu, erythropoietin tạo hồng cầu, các yếu tố đông máu VIII và IX trị bệnh máu khó đông... đã được sản xuất bởi các động vật chuyển gen. Đưa tổ hợp gen mã hoá cho β -lactoglobulin có gắn gen khởi động mạnh vào cừu, chuột... đã tạo ra sữa có β -lactoglobulin với hàm lượng cao. Phần lớn protein dùng làm thuốc chữa bệnh được biểu hiện ở tuyến sữa và chỉ có hemoglobin (là một protein có trong máu) là được tạo ra trong máu lợn. Do vậy có thể đưa gen tổng hợp hemoglobin máu người vào lợn, hy vọng tạo ra nguồn máu thay thế dùng để truyền cho bệnh nhân.

+ Sản xuất các sản phẩm nông nghiệp :

Bằng công nghệ di truyền người ta đã cải tạo nguồn gen di truyền, tăng năng suất vật nuôi bằng cách tạo động vật chuyển gen. Một trong những phương pháp nâng cao năng suất là làm tăng tốc độ sinh trưởng nhờ chuyển gen hoocmon sinh trưởng (GH) ở động vật, hoặc gen hoocmon sinh trưởng người (HGH) vào các động vật nuôi khác nhau để làm tăng tốc độ sinh trưởng, rút ngắn thời gian nuôi. Cá hồi chuyển gen hoocmon sinh trưởng lớn nhanh gấp 3 đến 6 lần và đưa ra thị trường sớm hơn một năm so với cá đối chứng không chuyển gen.

Trên thế giới, các nhà nghiên cứu đã tạo cá chạch, cá chép, cá giếc chuyển gen hoocmon sinh trưởng người (HGH), hoặc hoocmon sinh trưởng có nguồn gốc động vật đã tạo ra sản phẩm có giá trị. Ở Trung Quốc, cá chép mang gen hoocmon sinh trưởng người có tốc độ lớn nhanh và hiệu suất sử dụng thức ăn cao hơn cá đối chứng. Một ví dụ khác, khi chuyển gen hoocmon sinh trưởng người có gắn với gen khởi động mạnh vào cá rô phi, đã tạo ra giống cá rô phi tiêu tốn thức ăn ít hơn cá đối chứng khoảng 3-6 lần.

Ở Việt Nam, các nhà nghiên cứu đã tạo động vật chuyển gen. Tổ hợp gen hoocmon sinh trưởng người gắn với gen khởi động MT (promotor MT) của chuột rồi được chuyển vào cá vàng và cá chạch bằng phương pháp vi tiêm, đã tạo được một số cá chuyển gen lớn hơn cá đối chứng cùng đàn khoảng 2 lần. Gần đây các nhà nghiên cứu của Viện CNSH đã tiến hành tạo cá chuyển gen bằng vi tiêm, đã chuyển tổ hợp gen HGH gắn với gen khởi động MT của chuột vào tế bào phôi trần của cá chép ở giai đoạn 4-8 tế bào và đã tạo ra cá chép chuyển gen. Cá chép chuyển gen có tốc độ tăng trưởng cao hơn đối chứng 1,4 lần và hiệu suất sử dụng thức ăn cao hơn 1,2 lần so với cá đối chứng.

+ Tạo động vật chuyển gen có khả năng kháng bệnh, chống chịu với điều kiện bất lợi :

Công nghệ tạo động vật chuyển gen cho phép tạo ra vật nuôi có khả năng tự kháng lại các virut, vi khuẩn gây bệnh, hoặc chống chịu với điều kiện bất lợi như nhiệt độ lạnh, nước bị ô nhiễm...

Một trong những ví dụ cá chuyển gen có khả năng chống chịu bệnh tốt là ở cá hồi. Gen mã hoá cho glicoprotein IHNV gắn với gen khởi động cytomegalovirut (CMV) được chuyển vào cá hồi. Kết quả là cá hồi chuyển gen có khả năng kháng bệnh do một số virut gây nên tốt hơn so với cá đối chứng. Ví dụ khác, người ta chuyển gen mã hoá protein lactoferrin người (HLF) vào cá chép làm tăng khả năng kháng virut gây bệnh xuất huyết.

Nhiều loài động vật đang sống ở điều kiện lạnh. Ví dụ nhiều loài cá sống ở các sông, hồ vùng ôn đới, hàn đới có khả năng chịu lạnh rất tốt. Khả năng chống lạnh của chúng nhờ có một loại protein chống lạnh (antifreeze protein-AFPs). Ở nhiều loài cá, gen AFP biểu hiện suốt cả năm. Một số loài chỉ biểu hiện vào mùa đông. Người ta thiết kế vectơ tái tổ hợp hoặc vi tiêm trực tiếp gen AFP vào trứng cá chạch lớn, cá vàng, đã tạo ra cá chuyển gen có khả năng chịu lạnh tốt hơn cá đối chứng khi đưa chúng vào môi trường nhiệt độ thấp. Có thể chuyển gen tổng hợp protein prolactin vào cá chép, cá trê... làm tăng khả năng chịu mặn.

+ Cung cấp các cơ quan nội tạng để thay thế cho người :

Hàng năm, một số lượng lớn bệnh nhân cần phải được điều trị bằng cách cấy ghép nội tạng như tim, gan, thận... Thông thường người ta sử dụng nội tạng từ người này ghép cho người khác. Trên thực tế, số lượng nội tạng có được là ít hơn nhiều lần so với số trường hợp cần cấy ghép. Mặt khác, khi cấy ghép lại chịu hiện tượng loại thải mô, cơ quan cấy ghép, vì kháng thể của người được cấy ghép luôn chống lại miếng mô, cơ quan cấy ghép. Người ta suy nghĩ có thể sử dụng các nội tạng, mô của lợn đã được làm giảm khả năng loại thải để thay thế cho nội tạng người. Hướng nghiên cứu ứng dụng trong lĩnh vực này là ức chế các gen tổng hợp kháng thể gây hiện tượng loại thải ghép ở người, hoặc đưa gen biểu hiện một số loại protein của người vào lợn để tạo ra nội tạng của lợn khi ghép cho người giảm được sự loại thải.

+ Mục đích chuyển gen khác :

Người ta cũng đã thành công trong việc chuyển một số gen vào cá cảnh nhằm tạo ra những con cá có màu sắc phong phú, ngoại hình đa dạng. Một số gen mã hoá cho protein có khả năng phát huỳnh quang màu xanh (gen GFP), gen phát huỳnh quang màu đỏ (RFP), hoặc màu vàng (YFP) được chuyển vào cá mú vằn (*Danio rerio*) hoặc một số loài cá cảnh khác làm cho cá chuyển gen có màu sắc sặc sỡ khác nhau.

2.2.2. Công nghệ di truyền ứng dụng trong trồng trọt

Công nghệ di truyền được ứng dụng rộng rãi trong trồng trọt với mục đích khác nhau. Tuy nhiên chúng ta có thể hình dung có 2 hướng chủ yếu, đó là : Tạo ra cây trồng chuyển gen và công nghệ nuôi cấy mô tế bào.

Công nghệ di truyền trong tạo cây trồng chuyển gen mang nhiều đặc tính mới mà không thể thực hiện được bằng phương pháp lai hữu tính thông thường. Công nghệ di truyền đã tạo ra các cây trồng chuyển gen kháng sâu, kháng virus, chịu thuốc trừ cỏ, gen cho quả chín chậm, chuyển gen chống chịu điều kiện bất lợi...

- Tạo cây trồng chuyển gen chống sâu hại :

Gen chính được sử dụng trong việc chống côn trùng sâu hại là gen tổng hợp protein trừ sâu (độc tố) của vi khuẩn *Bacillus* (Bt) đã cắt bớt phần phụ (gen Cry). Gen Cry đã cắt ngắn này được chuyển vào các cây trồng khác nhau tạo ra các giống cây trồng kháng sâu hại.

Giống cà chua đã được chuyển gen Cry có khả năng kháng sâu đục quả rất rõ rệt.

Giống khoai tây chuyển gen Cry được công nhận là giống quốc gia ở Mỹ. Giống khoai tây này kháng được các loại bọ cánh cứng (bọ cánh cam, xén tóc, bọ rùa...) hàng năm giảm được hàng trăm triệu đô la tiền mua thuốc trừ sâu để diệt bọ cánh cứng cho khoai tây.

Nhiều loài cây trồng như bông, ngô v.v... cũng đã được chuyển gen kháng sâu đục quả, đục thân cùng cho kết quả rất cao. Có điều lý thú là, độc tố chống sâu bọ được chia làm 6 nhóm do 6 loại gen Cry được ký hiệu từ Cry I đến Cry VI. Mỗi loại gen tổng hợp ra, độc tố có độc tính đặc trưng cho các nhóm loài côn trùng khác nhau.

Gen Cry I diệt ấu trùng bộ Cánh vẩy (*Lepidoptera*).

Gen Cry II diệt ấu trùng bộ Cánh vẩy và bộ Hai cánh (ruồi muỗi - *Diptera*).

Gen Cry III diệt ấu trùng bộ Cánh cứng (*Coleoptera*).

Gen Cry IV diệt ấu trùng bộ Hai cánh.

Gen Cry V diệt ấu trùng bộ Cánh cứng và bộ Cánh vẩy.

Gen Cry VI diệt các tuyến trùng...

Một số gen khác cũng được chuyển vào cây trồng để kháng côn trùng. Người ta chuyển gen mã hoá enzyme α amilaza ở cây đậu tằm (α AI) vào cây họ đậu có tác dụng phòng trừ sâu hại cây họ đậu ngoài đồng cũng như hạt trong kho.

- Tạo cây trồng chuyển gen kháng thuốc trừ cỏ :

Nền nông nghiệp hiện đại gắn liền với việc sử dụng thuốc trừ cỏ. Vấn đề cần thiết là khi phun thuốc trừ cỏ chỉ diệt cỏ mà không hại cây trồng. Ứng dụng công nghệ di truyền trong lĩnh vực này là chuyển gen kháng thuốc trừ cỏ vào cây trồng. Các gen kháng thuốc trừ cỏ có thể là các gen tạo sản phẩm nâng cao hoạt tính các enzyme thường bị mất hoạt tính do tác động của thuốc trừ cỏ, cũng như tạo ra enzyme đột biến không bị ảnh hưởng của thuốc trừ cỏ, hoặc tạo enzyme phân giải thuốc diệt cỏ...

Glyphotphat là một loại thuốc có thể trừ được nhiều loại cỏ dại nhưng đồng thời có thể làm chết cây trồng nhất là các loài họ Hoà thảo. Cơ chế gây hại của thuốc trừ cỏ là kim hãm hoạt động của các enzyme tham gia quá trình trao đổi chất ở cây (enzyme EPSP). Nếu làm tăng hàm lượng enzyme này trong cây thì cây có thể chịu được thuốc trừ cỏ. Người ta tách gen tổng hợp enzyme EPSP từ vi khuẩn hoặc từ thực vật, sau đó chuyển gen này vào cây trồng. Kết quả tạo ra cây chuyển gen có hàm lượng, hoạt độ enzyme EPSP cao gấp 4 lần và hoàn toàn chống chịu được thuốc trừ cỏ glyphotphat. Hàng loạt cây kháng thuốc trừ cỏ điển hình là đậu tương, ngô và cây bông đã được tạo ra nhờ kỹ thuật chuyển gen.

- Tạo cây trồng chuyển gen kháng virus, vi khuẩn gây bệnh :

Nhiều loài virus gây hại nghiêm trọng cho cây trồng rất khó phòng trừ. Do vậy, việc tạo ra cây trồng chuyển gen kháng virus là rất quan trọng. Có nhiều hướng tạo cây trồng chuyển gen kháng virus như :

Chuyển gen mã hoá protein vỏ virus vào tế bào thì tế bào gây hiệu ứng kim hãm sự xâm nhập của ADN hoặc ARN của virus.

Chuyển gen tạo enzyme phân giải virus (ribozim) tạo ra cây có khả năng phân giải virus khi chúng xâm nhập vào tế bào.

Bằng công nghệ chuyển gen, người ta đã tạo ra các cây kháng virus bệnh khảm dưa chuột (CMV), khoai tây kháng virus X, đu đủ kháng virus đốm vòng (PRSV)... Cây chuyển gen kháng vi khuẩn gây bệnh cũng là hướng ứng dụng trong trồng trọt. Chuyển gen tổng

hợp lyzozim từ tế bào động vật hay phagơ T4 vào các cây khoai tây, thuốc lá làm cho chúng kháng được nhiều loại vi khuẩn khác nhau.

- Tạo cây trồng chuyển gen chống chịu điều kiện bất lợi :

Cây trồng không thể tự chuyển để tránh nắng nóng, nhiệt độ quá lạnh, đất mặn hoặc khô hạn... Con người phải cải tạo cây trồng chống chịu các điều kiện bất lợi bằng công nghệ di truyền. Chuyển gen Thioproteaza vào cà chua tạo cà chua chịu rét. Chuyển nhóm gen mã hóa protein 68-104kDa hoặc gen mã hóa protein 20-33kDa vào ngô, đậu tương, cà chua... tạo ra các giống chịu nóng, chuyển gen mã hóa protein 26kDa vào thuốc lá tạo thuốc lá chịu mặn, hoặc chuyển gen mã hóa protein 21kDa vào lúa, ngô, tạo giống lúa ngô chịu hạn giỏi.

- Tạo cây trồng chuyển gen chín muộn :

Nhiều giống cây ăn quả, đặc biệt là cà chua, khi thu hoạch, vận chuyển dễ bị chín và dập nát. CNSH có thể chuyển gen vào cây ăn quả để thu quả già chín chậm. Chuyển gen mã hóa enzyme ACC oxidaza vào cà chua đã kéo dài thời gian chín thêm hai lần. Chuyển gen PG mã hóa enzyme poligalacturonaza dạng vô hoạt vào cây cà chua thì quả sẽ không bị mềm nhanh để tạo điều kiện thu hoạch, đóng gói và vận chuyển thuận lợi.

- Tạo giống hoa chuyển gen có nhiều màu sắc mới :

Trong mô của cánh hoa, đặc biệt là tế bào biểu bì của cánh hoa chứa các sắc tố tạo màu sắc hoa. Có ba nhóm antocyanin cơ bản là dẫn xuất của pelargonidin, cyanidin hoặc delphinidin.

Các sắc tố là dẫn xuất của pelargonidin cho màu hoa da cam, hồng, đỏ.

Các sắc tố là dẫn xuất của cyanidin cho màu hoa đỏ, màu hoa cà.

Các sắc tố là dẫn xuất của delphinidin cho màu hoa tím, xanh, xanh đen.

Người ta chuyển gen tổng hợp mạnh enzyme nào đó hoặc gen gây ức chế hoạt động của enzyme khác để tạo các giống hoa có màu sắc khác nhau.

Chương 10

TỪ KỸ THUẬT NUÔI CẤY TẾ BÀO ĐẾN CÔNG NGHỆ TẾ BÀO

I - KỸ THUẬT NUÔI CẤY TẾ BÀO IN VITRO

Sinh học tế bào cho chúng ta hiểu biết về cấu trúc, chức năng, thành phần sinh hóa, di truyền của tế bào Procaryota và Eucaryota, hiểu biết về mối tương tác của môi trường đối với sinh trưởng và phát triển của tế bào, từ đó xây dựng nên các kỹ thuật nuôi cấy tế bào *in vitro* (đối với khuẩn, nấm men, tế bào thực vật, tế bào động vật và cả tế bào người) không chỉ để phục vụ cho công tác nghiên cứu khoa học mà còn là kỹ thuật rất quan trọng của công nghệ di truyền cũng như công nghệ tế bào.

1.1. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật

Từ năm 1907, Harrison là người đầu tiên đã nuôi cấy thành công một mảnh mô phôi ếch trong dịch bạch huyết. Đến năm 1923, Carel đã hoàn thiện kỹ thuật nuôi cấy tế bào trong các bình thủy tinh (*in vitro*), để tiết trùng và tạo điều kiện cho tế bào phát triển tốt. Nhưng phải chờ đến những năm 60 của thế kỷ XX, khi hoàn thiện được môi trường nuôi cấy nhân tạo thì kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật mới được phát triển mạnh và được ứng dụng vào nhiều ngành CNSH.

Ngày nay người ta có thể nuôi cấy *in vitro* bất kỳ tế bào nào của động vật kể cả tế bào người để chọn dòng tế bào sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau.

1.1.1. Môi trường nuôi cấy

Vấn đề quan trọng bậc nhất trong nuôi cấy tế bào động vật là môi trường nuôi cấy phải đủ chất dinh dưỡng, nhân tố sinh trưởng, độ pH và nồng độ muối ổn định, đồng thời phải có hệ thống thải bỏ các sản phẩm trao đổi độc hại để tế bào có thể sống và phát triển được.

a) *Môi trường hòa chất* : được sáng chế từ những năm 1950 đã thay thế hoàn toàn cho các dịch sinh học như dịch chiết từ phôi gà, huyết tương... là những môi trường dễ bị nhiễm trùng. Môi trường hoá chất được điều chế hàng loạt cất giữ được lâu, dễ thay thế, thêm, bớt các chất cần thiết, ít bị lây nhiễm... Môi trường nuôi cấy có chứa đủ các chất dinh dưỡng : hydracarbon, axit amin, vitamin, nguyên tố vi lượng, hoocmon, nhân tố sinh trưởng. Ví dụ môi trường thường dùng là môi trường Eagle, môi trường Dulbecco.

Môi trường nuôi cấy phải là đẳng trương (isotonic) để duy trì cân bằng thẩm thấu. Người ta dùng bicarbonat để tạo hệ đệm (buffer system) kết hợp với hệ làm giàu CO₂ môi trường (5 - 10% CO₂/ 95% không khí) trong đó tế bào được nuôi. Độ pH thích hợp là 7,4. Để kiểm tra độ sống của tế bào người ta thường cho thêm đồ phenol vào môi trường để chỉ thị độ pH. Nếu môi trường chuyển dần từ đỏ sang vàng cam là tế bào mọc tốt, nếu từ đỏ chuyển sang vàng nhạt là môi trường bị nhiễm khuẩn.

b) *Nhân tố sinh trưởng*. Nếu không có nhân tố sinh trưởng thì tế bào động vật sẽ không phát triển. Người ta thường phải bổ sung thêm huyết thanh (serum) bẽ vào môi trường (10 - 15%) vì trong huyết thanh có chứa nhân tố sinh trưởng. Nhưng dùng huyết thanh đắt tiền lại dễ bị nhiễm trùng, cho nên ngày nay người ta thường dùng các chất bổ trợ để thay thế cho huyết thanh : insulin, transferin, ethanolamin... hoặc sử dụng lớp tế bào nuôi (feeder cells).

c) *Các chất kháng sinh dùng với mục đích chống nhiễm khuẩn cho mẻ cấy* : Các kháng sinh thường dùng là penicillin, streptomycin hoặc amphotericin B. Dùng kháng sinh có điều bất lợi vì chúng đều có độc tính, vì vậy phải dùng với liều lượng thích hợp và phải kết hợp với quy trình tiệt trùng chu đáo.

1.1.2. Đặc tính của tế bào động vật trong nuôi cấy

Có thể sử dụng các tế bào tự do (bạch cầu, tế bào limpho...) hoặc tế bào của mô. Mô được phẫu thuật trong môi trường vô trùng, cắt thành mảnh nhỏ và được xử lý bằng enzym (trypsin chẳng hạn) kết hợp với kỹ thuật nghiền mô (tissue homogenisator) để tách thành tế bào riêng biệt ở dạng huyền phù. Trong môi trường nuôi cấy, các tế bào tự do thường ở dạng huyền phù, còn tế bào mô thường bám vào đáy bình thành lớp. Sử dụng kính hiển vi soi ngược để quan sát các dạng tế bào mọc trong môi trường : tế bào sợi lúc đầu có dạng tròn, sau khi bám vào đáy bình có dạng thoi, tế bào biểu bì có dạng khối, tế bào non có dạng nhánh... Sử dụng buồng đếm hoặc máy đếm tự động để tính toán số lượng tế bào theo từng giai đoạn phát triển.

Người ta có thể thực hiện các mẻ cấy liên tục bằng cách trích một phần mẻ cấy trước để cấy chuyển vào môi trường mới. Nếu là mẻ bám thì phải sử dụng enzym để tách riêng tế bào, phải làm rất nhanh trong vòng 15 phút vì enzym có thể gây hại cho tế bào.

a) *Đời sống tế bào động vật trong nuôi cấy* : Tế bào mô động vật (nhất là động vật có vú) có đặc điểm là khi được nuôi cấy, dù là cấy chuyển chỉ qua được 50 thế hệ, sau đó chúng thoái hóa và chết. Thế hệ tế bào tùy thuộc vào độ biệt hóa của mô mà ta lấy tế bào. Ví dụ, đối với tế bào gốc thì khả năng sinh trưởng sẽ dài hơn so với tế bào biệt hóa, tế bào gốc phôi có khả năng sinh trưởng dài hơn tế bào gốc cơ thể trưởng thành...

Tuy vậy, người ta đã tạo nên các dòng tế bào "bất tử" tức là tế bào có khả năng sinh trưởng liên tục trong môi trường nuôi cấy chuyển. Đó là các tế bào ung thư của cơ thể, hoặc là tế bào được làm chuyển dạng "ung thư hóa" với những biến đổi di truyền. Sự chuyển dạng thường được thực hiện nhờ tác nhân gây đột biến, nhờ virus, nhờ gen ung thư (oncogen).

Ngày nay người ta đã nuôi cấy và cất giữ nhiều dòng tế bào "bất tử" nhân tạo (các dòng tế bào chuột, chuột Hamster TQ, khi...), hoặc lấy từ cơ thể từ các mô ung thư tế bào HeLa (từ mô ung thư cổ dạ con), tế bào Namalwa (tế bào ung thư lymphoma của chi Namalwa).

b) Sự sinh trưởng của tế bào động vật *in vitro*

Sự sinh trưởng của tế bào *in vitro* thường trải qua 3 pha :

- Pha chậm (lag phase) là giai đoạn từ 0 giờ khi tế bào được cho vào môi trường cho đến khi tế bào bắt đầu phát triển. Thời gian này dài hay ngắn tùy thuộc vào trạng thái biệt hóa của mô được trích tế bào.

- Pha tiến triển (exponential growth) là giai đoạn tế bào phân chia liên tục, tăng nhanh số lượng tế bào trong khoảng thời gian từ 15-25 giờ với số lượng tế bào đạt $1-2 \times 10^6/\text{cm}^3$, là nồng độ chuẩn cho nuôi cấy theo mẻ.

- Pha dừng (stationary phase) là giai đoạn sau pha tiến triển, trong đó số lượng tế bào giữ không thay đổi, tức là khi môi trường dinh dưỡng nghèo dần và bắt đầu tích lũy các sản phẩm trao đổi chất độc hại. Bắt đầu xuất hiện tự hoại tế bào (apoptosis) thể hiện ở chỗ nhân bị dẹt chẻ và trên bề mặt tế bào tạo thành các mảnh khối (blebs) có thể quan được dưới kính hiển vi. Muốn cho tế bào tiếp tục sinh trưởng, cần thực hiện các mẻ cấy chuyển với môi trường mới.

c) Các phương thức nuôi cấy

- Phương thức đơn giản nhất là nuôi cấy theo mẻ (batch culture), trong đó tế bào được nuôi trong vài ngày cho tới khi sinh trưởng dừng lại. Đây là hệ thống nuôi cấy kín vì ta không cho thêm gì vào và không lấy đi từ môi trường. Điều kiện chuẩn : nuôi lượng tế bào $10^5/\text{cm}^3$ và nuôi trong 3 ngày khi số lượng tế bào tăng tới $10^6/\text{cm}^3$. Cần khuấy lắc để huyền phù tế bào và chất dinh dưỡng phân bố đồng đều trong môi trường. Tuy nhiên môi trường sẽ nghèo dần chất dinh dưỡng và tích lũy nhiều chất độc (sản phẩm chuyển hóa của tế bào), do đó tế bào sẽ đi vào thoái hóa.

Người ta có thể kéo dài thời gian nuôi cấy bằng bổ sung thêm môi trường dinh dưỡng mới theo thời gian để tế bào tăng sinh thêm, nhưng đến một thời gian nhất định, sinh trưởng sẽ dừng lại vì môi trường tích lũy quá nhiều chất độc như ammonia hoặc lactat.

- Để giải quyết vấn đề, người ta tiến hành phương thức nuôi cấy liên tục (continuous culture), trong đó môi trường luôn được đổi mới và chất độc luôn được loại bỏ tương tự như ở trong cơ thể.

Có 2 cách nuôi cấy liên tục : cách thứ nhất dùng hệ thống tiếp liệu chất dinh dưỡng nhưng vẫn duy trì tế bào trong mẻ cấy cho đến khi đạt số lượng $10^7/\text{cm}^3$. Cách thứ 2 là đồng thời có thêm hệ thống rút bớt môi trường cùng với tế bào ra khỏi mẻ cấy, như vậy hệ số tăng trưởng tế bào sẽ tỷ lệ với hệ số đổi mới dòng chảy vào và ra. Một hệ cân bằng như vậy được gọi là hệ ổn hóa (chemostat), là một dạng nổi lên men dùng để nuôi cấy liên tục.

1.1.3. Nuôi cấy và tạo tế bào lai soma động vật

a) Tế bào lai soma

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

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

Khi phân tích bộ nhiễm sắc thể của các tế bào lai thấy rõ sự tổ hợp của hai bộ nhiễm sắc thể của cả hai dòng tế bào khởi nguồn (xem bảng 10.1)

Bảng 10.1. Bộ nhiễm sắc thể của dòng tế bào khởi nguồn N₁ và N₂ và của tế bào lai M

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

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

Điều đó chứng tỏ tế bào lai chứa cả 2 loại kháng nguyên bề mặt của cả 2 dòng tế bào khởi nguồn, do đó chúng đã bị thải loại khi tiêm cho mỗi một dòng chuột khởi nguồn.

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

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

Trong nuôi cấy *in vitro*, khi nuôi cấy trộn lẫn các tế bào thuộc 2 loài khác nhau, ví dụ tế bào chuột + tế bào người, vẫn thu được tế bào lai một cách ngẫu nhiên, tuy xảy ra với tần số rất thấp. Khi sử dụng các nhân tổ kích thích, ví dụ hoá chất, virus v.v... thì lai tế bào xảy ra dễ dàng hơn và với tần số lai cao hơn

b) Lai tế bào khi sử dụng virus kích thích

Năm 1965, các nhà nghiên cứu Harris, Watkins, Okada và Murayama đã sử dụng virus Sendai đã bị bất hoạt bởi bức xạ tử ngoại, làm tác nhân kích thích trong nuôi cấy, họ đã tạo được các tế bào lai heterocaryon giữa chuột với người, giữa lợn với người. Các tế bào lai này có thể tăng sinh để cho ra các thế hệ tế bào lai hợp nhân (syncaryon). Lúc đầu tế bào lai còn chứa cả 2 nhân - được gọi là heterocaryon. Heterocaryon có thể tồn tại một thời gian hoặc bị chết (trường hợp lai ngẫu nhiên), hoặc heterocaryon sẽ biến thành syncaryon khi 2 nhân hoà hợp tạo thành một nhân chung. Các syncaryon có khả năng phân bào mitosis cho ra các thế hệ nối tiếp, tạo nên dòng tế bào lai.

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

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

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

Do tính chất của virut liên kết với màng tế bào nên chúng làm liên kết các màng hồng cầu với nhau tạo nên ngưng kết máu. Trong nuôi cấy *in vitro*, virut Sendai làm liên kết màng sinh chất của 2 tế bào với nhau tạo điều kiện cho sự dung hợp 2 tế bào tạo thành heterocaryon. Tuy nhiên sự dung hợp tế bào còn tùy thuộc vào đặc tính của tế bào, vào số lượng hạt virut, vào nồng độ các ion, vào độ pH, vào nguồn năng lượng v.v... Để tăng tính liên kết, người ta thường sử dụng virut kết hợp với một loại hoá chất cũng có khả năng tạo dung hợp tế bào là polyetylen glycol.

c) Đặc tính của tế bào lai soma

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

- Sự hoạt hoá của nhân :

+ Khi lai các tế bào mang nhân hoạt hoá như limpho bào (lymphoblast) của chuột, tế bào ung thư HeLa (là tế bào ung thư cổ tử cung của chị Henrietta được tách ra để nuôi cấy năm 1951 khi chị bị tử vong) của người với tế bào mang nhân bất hoạt, ví dụ tế bào hồng cầu gà, người ta thu được tế bào lai có chứa nhân lai ở trạng thái hoạt hóa, trong đó các gen của hồng cầu gà trước đây bất hoạt nay đã trở nên hoạt hóa (tổng hợp ARN và protein đặc trưng cho gà).

+ Khi sử dụng các tế bào nhân bất hoạt nhưng ở mức độ vừa phải so với nhân hồng cầu, ví dụ các đại thực bào : Bình thường các đại thực bào không tổng hợp ADN và tế bào ở giai đoạn biệt hoá G1, chúng chứa hạch nhân nhỏ và tổng hợp một ít ARN. Khi nuôi cấy các đại thực bào (từ thỏ hoặc chuột) với các tế bào hoạt hoá như tế bào HeLa hoặc tế bào melanom của người, sẽ tạo nên các tế bào lai heterocaryon, trong đó nhân đại thực bào tăng cường thể tích và chúng tổng hợp ARN tăng 4 - 10 lần so với bình thường chỉ 1 giờ sau dung hợp, sau 3 giờ xảy ra tổng hợp ADN. Điều đó chứng tỏ so với nhân của hồng cầu gà, nhân của đại thực bào bất hoạt ở mức thấp hơn.

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

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

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

- Sự thụ tinh là sự dung hợp giữa tinh trùng và trứng để tạo nên hợp tử chứa cả nhân tinh trùng và nhân trứng - có thể được xem như một tế bào lai giữa 2 tế bào đơn bội cùng

loài, hoặc đôi khi khác loài xảy ra *in vivo*, trong ống dẫn trứng của con cái (hoặc ở phần nào đó trong xoang bụng, ngoài ống dẫn trứng) là đã được chương trình hoá trong bộ gen của chúng. Trong nuôi cấy *in vitro*, để thực hiện được sự thụ tinh giữa tinh trùng và trứng thì tinh trùng phải được xử lý để làm thay đổi tính chất sinh lý của chúng, được gọi là sự khả năng hoá (capacitation) ; nhưng khi sử dụng virus Sendai thì tinh trùng không cần phải "khả năng hoá" vẫn thực hiện được thụ tinh với trứng.

- Sự điều hoà tổng hợp ADN và ARN trong tế bào lai :

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

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

+ Nhân không có hoạt tính hoặc có hoạt tính thấp sẽ đạt mức tổng hợp ADN và ARN như ở nhân có hoạt tính.

Ví dụ, khi dùng tế bào chỉ có hoạt tính tổng hợp ARN mà không tổng hợp ADN (tế bào cơ, đại thực bào) thì trong tế bào lai, nhân không hoạt tính chỉ tổng hợp ARN.

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

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

- Biến đổi của bộ nhiễm sắc thể trong tế bào lai :

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

+ Trong tế bào lai khác loài, ví dụ giữa chuột và người, giữa chuột với khỉ, giữa chuột với gà v.v... khi 2 bộ nhiễm sắc thể của 2 tế bào bố mẹ tổ hợp lại với nhau sẽ xảy ra sự biến mất một số nhiễm sắc thể của một trong 2 bộ, hoặc của cả 2 bộ nhiễm sắc thể (xem bảng 10.2).

Theo dõi sự biến đổi bộ nhiễm sắc thể trong dòng tế bào lai qua các thế hệ thấy các quần thể tế bào lai chứa bộ nhiễm sắc thể rất đa dạng về mức bội thể (heteropolyploid), và tùy thuộc không chỉ về loài mà còn tùy thuộc vào loại mô bố mẹ (tim, gan, thận, tuỷ xương,

tuyến ức, lách, não, v.v...) mà còn tùy thuộc vào trạng thái của nhiễm sắc thể của tế bào bố mẹ trước khi đem lai (bị đột biến do chiếu xạ, hoá chất hoặc ung thư v.v...) và cả trạng thái hoạt động của gen. Xu thế là nhiễm sắc thể nào bị tổn thương, hoặc nhiễm sắc thể chứa nhiều gen hoạt động sẽ bị thải loại trong tế bào lai.

Bảng 10.2. Sự biến mất nhiễm sắc thể trong tế bào lai khác loài

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

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

Sự giữ lại hoặc thải loại nhiễm sắc thể nào trong bộ nhiễm sắc thể bố hoặc mẹ trong tế bào lai xảy ra không phải ngẫu nhiên mà chắc chắn là tuân theo các cơ chế tương tác giữa 2 genom trong trạng thái tế bào chất chung của tế bào lai và với môi trường nuôi cấy *in vitro*.

+ Trong tế bào lai xảy ra sự biến đổi về cấu trúc nhiễm sắc thể. Các tế bào bố mẹ được dùng để lai trong nuôi cấy có thể ở các giai đoạn khác nhau của chu kỳ tế bào: có tế bào ở giai đoạn M (Mitosis - giai đoạn phân bào), có tế bào ở giai đoạn gian kỳ I (Interphase - gian kỳ gồm G1, S, và G2). Khi các tế bào bố mẹ dung hợp tạo thành tế bào lai syncaryon chứa một nhân dung hợp thống nhất với 2 hoặc vài bộ nhiễm sắc thể, thường quan sát thấy sự biến đổi về cấu trúc trong các nhiễm sắc thể như sự đóng đặc hoá, đứt đoạn v.v... Nếu tế bào bố (mẹ) 1 ở giai đoạn M thì nhân của tế bào mẹ (bố) 2 có thể đang ở giai đoạn G1, S hoặc G2. Nếu ở G1 người ta quan sát thấy các sợi nhiễm sắc qua tế bào 1 ở dạng đồng đặc sợi đơn, nếu ở G2 tức là giai đoạn sau tổng hợp ADN, các sợi nhiễm sắc đồng đặc ở dạng sợi đôi gần giống như ở tiền kỳ của mitosis bình thường. Nếu ở S thì dạng đồng đặc ở dạng các mảnh vụn. Người ta cho rằng dưới ảnh hưởng của các nhân tố phân bào của tế bào 2 đã

làm biến đổi cấu trúc của nhiễm sắc thể của tế bào 1, sang dạng đông đặc gần giống với dạng đông đặc và co ngắn của nhiễm sắc thể ở kỳ giữa trong phân bào mitosis bình thường. Các nhiễm sắc thể bị đông đặc và đứt mảnh sẽ bị thải loại qua các kỳ phân bào của tế bào lai syncaryon.

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

- Sự biểu hiện của gen thành các tính trạng kiểu hình ở tế bào lai :

+ Khi ta cho lai hai loại tế bào soma khác loài *in vitro* ta thu được tế bào lai ở dạng heterocaryon chứa 2 nhân hoặc vài nhân riêng biệt, về sau các nhân trong heterocaryon dung hợp tạo nên một nhân độc nhất chứa tổ hợp các bộ nhiễm sắc thể trong một tế bào lai được gọi là syncaryon. Các heterocaryon có thể tồn tại rất lâu, hoặc chết đi, hoặc biến thành syncaryon. Người ta theo dõi số phận và đời sống của các tế bào lai qua các đặc tính như biểu hiện của hệ gen thành các tính trạng kiểu hình (phenotip) để đánh dấu, chủ yếu là tổng hợp các protein, các enzym, sự tạo thành các siêu cấu trúc, sự biệt hoá tế bào về hình thái và một số đặc tính sinh lý, sinh hoá khác như phản ứng với các tác nhân kích thích, sự sinh sản và phát triển v.v...

Để nghiên cứu sự biểu hiện tính trạng của các tế bào lai syncaryon người ta thường dùng : các tế bào bố mẹ có các đặc tính như tính toàn năng (totipotent), hoặc đa năng (multipotent). Ví dụ tế bào trứng đã thụ tinh, tế bào phôi ở giai đoạn sớm, tế bào teratoma (tế bào ung thư trong cơ quan sinh dục) hoặc các tế bào phôi ở giai đoạn phát triển muộn, tế bào của các mô ở động vật trưởng thành, hoặc các tế bào dị bội (heteroploide) chưa biệt hoá và sẽ không biệt hoá trong nuôi cấy lâu dài. Điển hình cho hai loại tế bào này là tế bào HeLa người và tế bào L chuột nhắt.

Sử dụng các protein đặc thù làm kiểu đánh dấu người ta theo dõi được sự biểu hiện của gen mã hoá cho protein đó và quá trình biệt hoá của tế bào lai, ví dụ hemoglobin là protein đặc thù cho hướng biệt hoá của hồng cầu, protein S-100 là protein sẽ dẫn tới biệt hoá tế bào thần kinh v.v... Nhưng cần phải lưu ý là : protein actin là đặc thù tế bào cơ, nhưng actin cũng có mặt trong rất nhiều dạng tế bào tạo nên cấu trúc vi sợi có chức năng là bộ khung xương tế bào và tham gia các kiểu vận động nội bào như vận động tế bào chất, vận động amip quan sát thấy ở bạch cầu, đại thực bào v.v... Vì vậy để đánh giá trạng thái biệt hoá của tế bào lai cần sử dụng kiểu đánh dấu hình thái và sinh lý, ví dụ : để đánh giá dạng biệt hoá neuron cần phân tích các cấu trúc như vi sợi thần kinh, các sợi lông tế bào chất, cũng như hoạt tính điện sinh lý v.v... ; dạng biệt hoá tế bào cơ là các cấu trúc tơ cơ v.v...

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

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

Khi sử dụng enzym glucozo-6-phosphat dehydrogenaza là enzym di truyền liên kết với nhiễm sắc thể X (gen mã hoá nằm trong X) để theo dõi biểu hiện của gen trong tế bào lai, thì thấy trong tế bào lai quan sát được cả hai dạng enzym của bố và mẹ, đồng thời còn xuất hiện cả dạng enzym tổ hợp gồm các tiểu đơn vị của cả 2 enzym bố và mẹ. Điều đó chứng tỏ rằng, một nhiễm sắc thể X bị bất hoạt hoá trong quá trình phát triển phôi (quan sát được ở dạng chất nhiễm sắc giới tính - thể Barr) đã được tái hoạt hoá trong tế bào lai.

+ Để nghiên cứu quá trình biệt hoá của tế bào lai, người ta thường sử dụng tế bào bố mẹ, đặc biệt là các tế bào ung thư của các mô như tế bào melanom (tế bào ung thư sắc tố), hepatom (tế bào ung thư gan), teratom (tế bào ung thư sinh dục), neuroblastom (tế bào ung thư thần kinh), hoặc các tế bào của các chủng quần biệt hoá cao ổn định như tế bào limpho, tế bào sợi, tế bào gốc dòng hồng cầu v.v... Ví dụ, khi lai tế bào melanom của chuột hamster (là tế bào có chứa sắc tố melanin ở dạng các hạt đen trong tế bào chất) với tế bào L (là tế bào được nuôi giữ *in vitro* không chứa melanin của chuột), ta thu được tế bào lai với các dòng khác nhau đều không chứa melanin. Bình thường melanin xuất hiện trong các tế bào sắc tố (melanocyte) là sự chuyển hoá của tirozin thành melanin dưới sự xúc tác của enzym diphenoloxydaza và gen mã hoá cho enzym này phải ở trạng thái hoạt động, tức là phiên mã và dịch mã. Như vậy trong tế bào lai không xuất hiện melanin, chứng tỏ các gen đó của tế bào melanom đã bị ức chế.

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

Để nghiên cứu các đặc tính biệt hoá về hình thái, người ta thường sử dụng các tế bào ung thư thần kinh - neuroblastom. Trong nuôi cấy *in vitro* các tế bào neuroblastom thể hiện hàng loạt đặc tính biệt hoá của noron như : đặc tính điện thế màng, hoạt tính axetylcholinesteraza cao, xuất hiện các cấu tạo hình thái như vi sợi thần kinh, các phân nhánh tế bào chất v.v... Khi sử dụng tế bào neuroblastom chuột nhắt lai với các loại tế bào khác nhau như tế bào L chuột nhắt nguyên sợi bào (fibroblast) người ta thu nhận được quần thể tế bào lai đa dạng về kiểu đánh dấu tế bào noron, ví dụ tế bào lai từ neuroblastom chuột nhắt với fibroblast người, thể hiện hoạt tính cholinaxetyltransferaza cao hơn hàng 100 lần so với tế bào bố mẹ, và khi phân tích bộ thể nhiễm sắc của tế bào lai thì thấy chúng chỉ giữ lại thể nhiễm sắc người số 9 trong tế bào lai. Sự xuất hiện các đặc tính của noron ở tế bào

lai rất đa dạng từ hoạt tính các enzym đến các cấu trúc như vi sợi thần kinh, nhánh lõi thần kinh, điều đó chứng tỏ trong quá trình biệt hoá neuron, các đặc tính xuất hiện theo từng giai đoạn và có sự điều hoà phối hợp lẫn nhau.

+ Khi theo dõi sự tổng hợp rARN28S trong tế bào lai giữa tế bào chuột nhắt và tế bào người, với sự sử dụng phương pháp nguyên tử đánh dấu bằng H^3 -hipoxantin, người ta quan sát thấy, nếu tế bào lai khi còn chứa gần đủ bộ nhiễm sắc thể của người và chuột thì khi đó tế bào lai tổng hợp cả 2 loại rARN người và chuột. Nhưng trong các dòng tế bào lai chỉ chứa đủ bộ nhiễm sắc thể của chuột còn nhiễm sắc thể của người bị thải loại nhiều thì rARN được tổng hợp chỉ là của chuột. Khi phân tích bộ nhiễm sắc thể trong các tế bào lai này thì thấy chúng không còn chứa các nhiễm sắc thể có thể kèm (nhiễm sắc thể số 13, 14, 15, 21 và 22) là những nhiễm sắc thể có chứa vùng NOR (Nucleolus Organizing Region) tức là chứa các gen rARN45S, từ đây sẽ phiên mã thành rARN45S và sau đó được chế biến để tạo thành các rARN28S ; 5,8S và 18S của ribosom. Các nhiễm sắc thể đó bị thải loại thì các gen đó cũng bị thải loại.

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

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

Khi theo dõi các chủng quần tế bào lai giữa chuột nhắt và người, và theo dõi mtADN người ta thấy có sự tương quan giữa sự thải loại nhiễm sắc thể và thải loại mtADN. Ở các chủng quần tế bào lai có đủ bộ nhiễm sắc thể chuột và đa số nhiễm sắc thể người thì còn có cả mtADN chuột và người, và theo đà nhiễm sắc thể người bị thải loại dần thì mtADN người bị thải loại tương ứng và ở tế bào lai không còn chứa nhiễm sắc thể người thì chỉ tìm thấy mtADN chuột mà thôi. Điều đó chứng tỏ có sự tương quan mật thiết giữa bộ gen trong nhân với mtADN của ty thể. Điều lý thú là trong tế bào lai mà trong đó có cả 2 loại mtADN chuột và người, đã phát hiện ra loại mtADN lai, tức là mtADN tái tổ hợp giữa người và chuột.

Khi nghiên cứu tế bào lai, người ta cũng đã xác định được hệ enzym ty thể do gen của nhân kiểm soát và hệ enzym ty thể do gen của ty thể (mtADN) kiểm soát.

1.2. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào thực vật

Tế bào thực vật khác với tế bào động vật ở nhiều đặc điểm, vì vậy kỹ thuật nuôi cấy tế bào thực vật có những đặc điểm và yêu cầu riêng.

1.2.1. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào thực vật *in vitro*

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào thực vật *in vitro* được hoàn thiện và phát triển mạnh từ những năm 60 của thế kỷ XX, khi tìm ra môi trường nuôi cấy chuẩn và đặc biệt sử dụng các chất hoocon sinh trưởng như auxin, giberilin, xytokinin... để kích thích sự phân bào và tăng trưởng tế bào cũng như tạo thành các mô và tái sinh cây toàn vẹn từ tế bào được nuôi cấy. Ngày nay người ta có thể nuôi cấy bất kỳ tế bào nào của cây (chồi, lá, thân, rễ, hoa...) để tạo

thành mô sẹo (mô gồm nhiều tế bào chưa biệt hóa, có khả năng sinh trưởng mạnh), và từ mô sẹo điều khiển cho tế bào biệt hóa thành các mô khác nhau (rễ, thân, lá...) và tái sinh ra cây trưởng thành. Các nhà CNSH đã kết hợp kỹ thuật nuôi cấy tế bào, lai tế bào, kỹ thuật chuyển gen... để hình thành nên CNSH vi nhân giống. Với công nghệ vi nhân giống, các nhà trồng trọt có thể tạo nên các giống cây (cây rừng, cây ăn trái, cây dược liệu, cây rau, cây hoa, cây cảnh...) có năng suất, chất lượng cao, thích nghi với điều kiện sinh thái, chống chịu bệnh và đặc biệt là nhân giống nhanh đáp ứng kịp thời nhu cầu về cây giống ngày càng tăng cao của thị trường toàn cầu.

Trong kỹ thuật nuôi cấy tế bào thì môi trường dinh dưỡng để nuôi tế bào sống được là rất quan trọng. Môi trường phải gồm đủ chất dinh dưỡng đa lượng như NH_4 , NO_3 , SO_4 , Ca, Cl, K, Na..., các chất vi lượng như Fe, Mg, Mn, Zn, I, Bo, Mo, Cu... Nguồn cacbon thường dùng là đường glucozo hoặc saccarozo. Ngoài chất dinh dưỡng ra, các chất hoocmon sinh trưởng cũng có vai trò rất quan trọng không kém. Chất auxin và xitokinin được dùng với tỷ lệ thích hợp và tùy nhu cầu. Nếu tỷ lệ (auxin/xitokinin) > 1 sẽ kích thích phát triển rễ, nếu tỷ lệ đó < 1 sẽ kích thích phát triển chồi.

Trong nuôi cấy *in vitro* vai trò của các yếu tố ngoại cảnh như thời gian, độ chiếu sáng, nhiệt độ, độ pH, nồng độ các khí CO_2 , O_2 ... đều phải được quan tâm vì chúng gây ảnh hưởng lên sự sinh trưởng và tái sinh của tế bào, mô sẹo và của cây non. Để hạn chế ảnh hưởng của các yếu tố trên đây, người ta sử dụng kỹ thuật nuôi cấy chuyển liên tục hoặc nuôi cấy trong các lò phản ứng sinh học ổn định.

Đối tượng tế bào được nuôi cấy thường là các tế bào của mô phân sinh (là mô chứa tế bào gốc) có khả năng phân bào cho ra mô sẹo (mô chưa biệt hóa chứa tế bào gốc), từ các tế bào mô sẹo sẽ biệt hóa thành các loại tế bào khác của phôi và sẽ tái sinh thành cây toàn vẹn. Các cây này đều đồng nhất về di truyền nên được gọi là dòng nhân bản vô tính.

Từ mô sẹo có thể điều khiển (bằng hoocmon sinh trưởng) để chúng chỉ biệt hóa ra rễ, thân, lá, hoặc hoa tùy theo yêu cầu của nhà sản xuất.

Người ta có thể sử dụng các tế bào đơn bội của bao phấn và hạt phấn để nuôi cấy tạo thành các dòng cây đơn bội dùng cho công tác lai tạo giống.

1.2.2. Kỹ thuật nuôi tế bào trần và dung hợp tế bào

a) Đối với tế bào thực vật thành vỏ xenlulozo là trở ngại cho việc nuôi cấy và việc tạo tế bào lai nhờ dung hợp tế bào. Vì vậy cần phải hủy bỏ thành vỏ xenlulozo của tế bào tạo tế bào trần (protoplast) trước khi đem nuôi cấy. Tế bào trần là các tế bào thực vật đã được xử lý bằng vi phẫu thuật hoặc xử lý bằng enzym (xenlulaza) để tách bỏ lớp thành vỏ xenlulozo. Các tế bào trần sống và phân bào sinh trưởng rất tốt *in vitro*, dễ dàng dung hợp để tạo nên các tế bào lai. Người ta nuôi cấy các tế bào trần của các cây, thuộc các loài (hoặc chi, họ...) khác nhau và chúng sẽ liên hợp với nhau tạo nên những tế bào lai, từ tế bào lai sẽ cho ra mô sẹo và từ mô sẹo sẽ tái sinh ra cây lai toàn vẹn (cây lai vô tính) mang đặc tính di truyền lai không khác gì cây lai hữu tính.

Cũng cần chú ý là các tế bào trần có thể sống *in vitro*, và tái tạo lại vỏ xenlulozo và trở thành tế bào nhiều nhân, hoặc nhân đa bội do hiện tượng nội phân, hoặc do hiện tượng liên kết của 2 hoặc vài tế bào cùng loại (vì tế bào thực vật có đặc tính liên kết tế bào chất với nhau qua cầu nối tế bào chất (plasmodesma) và chúng dễ dàng hợp nhất với nhau khi mất vỏ

xenululozo để tạo thành tế bào đa nhân). Vì vậy khi nuôi cấy *in vitro* các tế bào trần thuộc các loài hoặc chi khác nhau, ta cần phải xác định chính xác các tế bào lai thực sự trong đó có chứa bộ gen của cả 2 loài.

b) Sự liên kết và dung hợp tế bào trần tạo tế bào lai

Sự liên kết và dung hợp tế bào trần để tạo thành các tế bào lai heterocaryon giữa các mô cùng một loài, hoặc thuộc các loài khác nhau tùy thuộc vào nồng độ các ion natri, kali và canxi cũng như độ pH của môi trường nuôi cấy, cũng như tùy thuộc vào một số chất có tác dụng tăng cường liên kết tế bào như lisozym và đặc biệt là polietylen glycol do cấu trúc phân tử của chúng có thể tạo nên các liên kết ion với các chất có ở bề mặt màng sinh chất của tế bào. Sử dụng polietylen glycol (với nồng độ 0,2 - 0,3M) có thể tạo các tế bào lai đạt từ 25 - 50% và các tế bào lai có thể tồn tại qua nhiều thế hệ. Sự tạo thành callus và tái sinh cây từ tế bào lai syncaryon không phụ thuộc vào phương pháp tạo tế bào lai.

Các tế bào trần được nuôi cấy *in vitro* có thể chết, có thể dung hợp thành tế bào lai chứa 2 nhân khác loài - heterocaryon. Nếu heterocaryon tái sinh thành vỏ xenululozo và phân bào sẽ được xem như chúng sống và phát triển. Điều lý thú đối với lai tế bào trần ở thực vật là chúng không những có khả năng biểu hiện hoạt động của gen, sinh trưởng và biệt hoá giống như tế bào lai động vật mà còn có khả năng tái sinh thành cây toàn vẹn, được xem như *cây lai soma*.

Khi heterocaryon phân chia thì nhân ở thế hệ tế bào con chưa dung hợp thành một nhân lai độc nhất tuy chúng có xu thế đồng thời hoá mitos. Một số heterocaryon qua vài thế hệ nhanh chóng bị chết đi. Trong các heterocaryon có nhân ở cạnh nhau, thì qua mitos, 2 bộ thể nhiễm sắc sẽ hợp nhất để cho ra một nhân lai và ở các thế hệ sau các tế bào con đều là tế bào lai chứa một nhân lai độc nhất - các syncaryon. Tất cả các tế bào phát triển từ một syncaryon tạo nên một dòng lai (clon line) : Các tế bào lai syncaryon cũng giống như các tế bào soma thực vật cho ra khối mô đa tiềm năng (mô sẹo-callus) và khi nuôi cấy chúng với các hoocmon thực vật và chế độ chiếu sáng khác nhau sẽ biệt hoá thành chồi lá và rễ, và sẽ tái sinh thành cây toàn vẹn, ra hoa kết quả như cây lai hữu tính. Ví dụ, khi lai tế bào trần giữa 2 loài thuốc lá *Nicotiana* đã tạo được các cây lai soma giống như cây lai hữu tính.

c) Chọn lọc và xác định các dòng tế bào lai và mô sẹo

Để xác định các dòng tế bào lai soma thực vật các nhà nghiên cứu cũng sử dụng các đánh dấu như ở tế bào lai động vật. Các chỉ tiêu hình thái thường được dùng để đánh dấu cho các giai đoạn phát triển của tế bào lai, của mô sẹo cho tới khi tái sinh cây toàn vẹn như sự có mặt hay không các loại lap thể (bach lap, sắc lap, lục lap), sự sinh trưởng của mô sẹo tùy thuộc vào hoocmon auxin, mức độ phát triển biểu mô, hình dạng lá khi tái sinh cây v.v... Các đánh dấu như số lượng nhiễm sắc thể, bản chất các isoenzym, sự biểu hiện của gen v.v... đều được sử dụng để theo dõi, xác định và chọn lọc các dòng tế bào lai. Phân tích kiểu nhân ở tế bào lai thực vật cũng đóng vai trò quan trọng như ở tế bào lai động vật mà ta đã xem xét.

Sử dụng các đột biến và bổ trợ gen làm chỉ tiêu đánh dấu, người ta có thể phát hiện trạng thái hoạt động của gen khi so sánh tế bào lai và cây lai soma với tế bào bố mẹ và cây lai hữu tính. Ví dụ, khi đem lai soma từ các tế bào trung mô lá của 2 thể đột biến *Nicotiana tobacum* (đều không có khả năng tổng hợp chlorophyl nên sinh trưởng chậm và không có màu xanh), người ta thu nhận được các tế bào lai và từ đó tái sinh thành cây toàn vẹn, cây

lai soma này cũng giống các cây lai hữu tính (giữa 2 thể đột biến) về các đặc điểm như tổng hợp chlorophyll, có màu xanh và sinh trưởng bình thường. Khi nghiên cứu hiện tượng hỗ trợ gen, các nhà nghiên cứu phát hiện thấy trong tế bào lai soma giữa 2 loài thuốc lá *Nicotiana* xuất hiện phức hệ enzym diphosphoribulocacboxilaza (có khối lượng phân tử 550000D) là enzym tham gia vào quá trình quang hợp (cố định CO_2) trong lục lạp là phân tử lai.

Phức hệ chứa 2 đơn vị mã hoá bởi gen của lục lạp thuộc một loài bố mẹ, còn các đơn vị còn lại của enzym được mã hoá bởi cả 2 gen của 2 loài bố mẹ. Điều đó chứng tỏ có sự hoạt động hỗ trợ và ức chế của gen thuộc 2 loài khi chúng phối hợp hoạt động.

d) Ưu thế của lai soma thực vật

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

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

Hơn nữa kỹ thuật lai các tế bào trần thực vật không đòi hỏi phức tạp như lai động vật về môi trường dinh dưỡng, về hoạt chất kích thích sự dung hợp phức tạp như virus, mà chỉ cần sử dụng polietylen glycol kết hợp với sự xử lý bằng ion canxi là dễ dàng tạo tế bào lai với hiệu suất cao.

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

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

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

II - ỨNG DỤNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY TẾ BÀO TRONG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO

2.1. Công nghệ tế bào động vật

Áp dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật khác nhau không chỉ để phục vụ cho nghiên cứu về di truyền học, về tế bào học, về sinh lý học, phân loại học... mà còn phục vụ cho công nghệ tế bào. Kết hợp với các kỹ thuật chuyển gen, kỹ thuật lai tế bào soma, các nhà

công nghệ tế bào đã sản xuất các chế phẩm sinh học dùng làm thuốc phòng bệnh và chữa bệnh dùng trong Y tế và Thú y như các loại vaccin, interferon, kháng thể đơn dòng, các hoocmon, các nhân tố tạo máu, nhân tố chống đông máu, thuốc kháng u, thuốc diệt sâu bọ (xem phần công nghệ gen). Kỹ thuật nuôi cấy tế bào còn được sử dụng trong công nghệ tế bào lai, công nghệ nhân bản vô tính động vật, công nghệ tế bào gốc và công nghệ phôi.

2.1.1. Công nghệ nhân bản vô tính động vật

Nhân bản vô tính là thuật ngữ để chỉ quá trình hình thành cơ thể đa bào không bằng con đường sinh sản hữu tính (có sự kết hợp giữa tinh trùng và trứng để tạo ra hợp tử, từ hợp tử sẽ phát triển thành cơ thể) mà thông qua sự phát triển của tế bào soma (tế bào sinh dưỡng tạo nên các cơ quan), bằng cách phân bào nguyên nhiễm và biệt hóa tế bào thành cơ thể trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Đối với thực vật là cơ thể có khả năng sinh sản bằng phương thức sinh sản sinh dưỡng (sinh sản vô tính) từ các mô soma của rễ thân lá, thì kỹ thuật nhân bản vô tính *in vitro* không có gì khó khăn phức tạp. Nhưng đối với đa số động vật sinh sản bằng phương thức hữu tính thì kỹ thuật nhân bản có nhiều thủ thuật đặc biệt: đó là kỹ thuật chuyển nhân (nuclear transfert).

a) Kỹ thuật chuyển nhân

Trong nhân của tế bào soma có chứa $2n$ nhiễm sắc thể, chứa hệ gen quy định nên tất cả tính trạng của cơ thể giống như bộ nhiễm sắc thể của hợp tử. Qua quá trình phát triển, từ hợp tử sẽ phân bào và biệt hóa cho ra các tế bào của các mô khác nhau. Quá trình biệt hóa là thể hiện sự hoạt động biệt hoá trong hệ gen theo thời gian và không gian của phôi đang phát triển dưới sự kiểm soát của các nhân tố nội và ngoại bào. Nhân còn ít biệt hóa (tế bào gốc phôi, tế bào gốc cơ thể) càng có nhiều tiềm năng biệt hóa, vì vậy sử dụng tế bào gốc để nhân bản vô tính là dễ thực hiện hơn so với tế bào đã biệt hóa. Những thí nghiệm đầu tiên về kỹ thuật cấy chuyển nhân để nhân bản vô tính phải thực hiện với tế bào phôi (phôi nang, phôi vị). Tại sao phải chuyển nhân? Bình thường người ta tách nhân từ tế bào cho (tế bào soma) và đem cấy chuyển vào tế bào trứng chưa thụ tinh đã bị lấy hoặc hủy nhân để tạo nên một tế bào $2n$ (giống như hợp tử) chứa nhân của tế bào cho và tế bào chất của tế bào nhận (trứng đã mất nhân). Vì lẽ nhân $2n$ của tế bào cho là tế bào soma đã biệt hóa ở mức độ nào đó do tế bào chất của nó quy định phù hợp với thời gian và không gian phát triển của phôi. Khi nhân này được cấy chuyển vào tế bào chất của trứng là môi trường giống như của hợp tử, thì nhân sẽ tái biệt hóa trở lại trạng thái như nhân của hợp tử, và hệ gen của nó sẽ hoạt hóa theo đúng chương trình phát triển do các nhân tố của trứng điều khiển.

Những thành công của nhân bản vô tính bằng cấy chuyển nhân được thực hiện ở ếch, bằng cách sử dụng nhân của các tế bào soma lấy ở giai đoạn phôi. Năm 1952, lần đầu tiên 2 nhà khoa học tại Philadelph, R. Briggs và T. King đã nhân bản vô tính con nòng nọc bằng kỹ thuật chuyển cấy nhân từ tế bào phôi nang ếch. Từ những năm 1960, J. Gordon đã nhân bản vô tính thành công con ếch trưởng thành từ nhân của tế bào ruột nòng nọc và về sau từ nhân của tế bào ruột ếch. Về sau nhiều công trình nhân bản vô tính được thực hiện trên nhiều động vật như cá và cả động vật có vú.

b) Nhân bản vô tính động vật có vú

Đối với động vật có vú là động vật thụ tinh trong và phôi phát triển trong dạ con của mẹ dưới sự nuôi dưỡng qua rau thai, vì vậy kỹ thuật nhân bản vô tính khó khăn hơn và phức

tạp hơn nhiều. Từ những năm 1960 -1980, các nhà khoa học đã thành công trong kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm để tạo nên phôi người và cấy phôi vào dạ con người mẹ và sinh ra em bé được gọi là em bé sinh ra từ ống nghiệm (em bé đầu tiên được sinh ra bằng kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm là em Brown, một công dân người Anh từ năm 1978).

Kết hợp kỹ thuật chuyển nhân với kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm, từ năm 1983, các nhà công nghệ tế bào đã nhân bản thành công đối với chuột từ nhân lấy ở giai đoạn phôi nang, và từ năm 1984 đến 1986 thực hiện nhân bản vô tính cừu, bò... từ nhân lấy ở giai đoạn phôi. Trước năm 1992, các nhà khoa học cho rằng, đối với động vật có vú chỉ có thể nhân bản vô tính thành công với nhân lấy từ giai đoạn phôi, còn đối với nhân của tế bào soma trưởng thành thì không thể thực hiện được vì tính biệt hóa của chúng là không thể đảo ngược.

Sự kiện tháng 2-1997 khi báo chí công bố con cừu Dolly ra đời bằng kỹ thuật nhân bản vô tính với nhân lấy từ tế bào tuyến vú của cừu mẹ trưởng thành 6 năm tuổi do ông I. Wilmut thực hiện tại Học viện Roslin ở Anh đã gây tiếng vang lớn trong giới CNSH và cả xã hội về nhiều phương diện. Sự thành công của Wilmut không chỉ do có kỹ thuật thao tác phức tạp mà chủ yếu là do có hiểu biết sâu sắc không chỉ về sinh học phân tử mà chủ yếu về sinh học tế bào, về cơ chế điều khiển chu kỳ tế bào trong quá trình phát triển.

Tiếp theo cừu là hàng loạt động vật có vú được nhân bản vô tính như chuột, mèo, bò, lợn, dê, chó... và các nhà nhân bản vô tính tuyên bố sẽ nhân bản vô tính cả con người.

Công nghệ nhân bản vô tính được ứng dụng trong chăn nuôi tạo giống vật nuôi có năng suất cao, chất lượng tốt về sản phẩm (thịt, trứng, sữa, len...), đồng đều về tốc độ sinh trưởng, về thu hoạch sản phẩm... phục vụ cho chăn nuôi công nghiệp quy mô lớn, kết hợp với công nghệ gen tạo giống vật nuôi chống chịu bệnh tật, thích nghi với điều kiện chăn nuôi, cũng như sản xuất các sản phẩm đặc thù (thịt, trứng, sữa có chứa vacxin, chất sinh trưởng, chất dinh dưỡng quý hiếm...).

Công nghệ nhân bản vô tính được ứng dụng trong y học để tạo các mô, cơ quan phục vụ cho liệu pháp cấy ghép mô cơ quan.

Công nghệ nhân bản vô tính người với mục tiêu sinh sản, tức là để sinh ra một con người đã được nhiều nước và Liên hiệp quốc ngăn cấm vì có thể gây ra nhiều hậu quả vi phạm đạo đức.

2.1.2. Công nghệ tế bào gốc

a) **Tế bào gốc.** Tế bào gốc (stem cells) là những tế bào có khả năng sinh sản và biệt hóa cho ra các tế bào biệt hóa. Người ta phân biệt các tế bào gốc phôi và tế bào gốc trưởng thành. Tế bào gốc phôi là những tế bào gốc khi biệt hóa sẽ cho ra các tế bào gốc trưởng thành và các tế bào biệt hóa của giai đoạn phát triển phôi thai. Tế bào gốc trưởng thành là những tế bào gốc của cơ thể trưởng thành, có khả năng sinh sản và biệt hóa cho ra các tế bào biệt hóa của mô cần thay thế, tái sinh. Người ta phân biệt tế bào gốc soma (sản sinh và biệt hóa cho ra các tế bào của các mô, như tế bào gốc da, tủy xương...) và tế bào gốc sinh dục (sản sinh và biệt hóa cho ra các giao tử).

Tùy theo mức độ về tiềm năng biệt hóa người ta còn phân biệt : *tế bào gốc toàn năng* (là tế bào gốc có khả năng sinh sản và biệt hóa cho ra tất cả các loại tế bào biệt hóa của bất kỳ mô nào, ví dụ tế bào gốc phôi sớm), *tế bào gốc đa năng* (là tế bào gốc có khả năng sinh

sản và biệt hóa cho ra chỉ vài loại tế bào biệt hóa, ví dụ tế bào gốc tủy xương có khả năng cho ra các dòng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu...), *tế bào gốc đơn năng* (là tế bào gốc chỉ có khả năng sản sinh và biệt hóa cho ra một dòng tế bào biệt hóa, ví dụ tế bào gốc da chỉ ra các tế bào biểu mô da, tế bào gốc ruột chỉ cho ra dòng tế bào biểu mô ruột...).

b) *Ứng dụng công nghệ tế bào gốc.* Công nghệ tế bào gốc được ứng dụng trong g tạo giống vật nuôi bằng cách kết hợp với công nghệ gen, công nghệ nhân bản. Ngoài ra ngành chăn nuôi của thế giới đang đứng trước một thử thách lớn : qua chăn nuôi nhân loại sẽ bị hứng chịu những dịch bệnh lớn như kiểu dịch cúm gia cầm do virus H5N1, các nhà chăn nuôi sẽ bị phá sản khi phải giết bỏ hàng triệu vật nuôi. Công nghệ tế bào gốc mở ra một hứa hẹn lớn : sản xuất theo quy mô công nghiệp các sản phẩm chăn nuôi (thịt, trứng, sữa, len...) bằng kỹ thuật nuôi cấy tế bào gốc *in vitro* tạo ra các mô, cơ quan cần thiết không thông qua cơ thể, như vậy vừa tiết kiệm vừa dễ dàng kiểm soát được dịch bệnh.

Công nghệ tế bào gốc được ứng dụng làm liệu pháp tế bào, tức là sử dụng kỹ thuật phân lập, cất giữ và nuôi cấy các tế bào gốc và điều khiển cho chúng biệt hóa thành bất kỳ dòng tế bào nào, mô nào để làm nguyên liệu thay thế tế bào, mô bị hỏng, bị tổn thương cần thay thế. Kỹ thuật của liệu pháp thay thế gen có thể gây nhiều nguy hiểm vì người ta không thể kiểm soát được hoạt động của gen trong hệ gen ; liệu pháp cấy ghép cơ quan không đem lại kết quả lâu dài ; còn liệu pháp thay thế tế bào mô bằng công nghệ tế bào gốc sẽ đem lại hiệu quả mong muốn. Tế bào gốc toàn năng của chính con người được phân lập, cất giữ, và khi cần được nuôi cấy cung cấp kịp thời nguồn nguyên liệu thay thế cho bất kỳ tế bào nào, mô nào bị hư hỏng tổn thương. Bị bỏng nặng tổn thương da, nuôi cấy tế bào gốc cho biệt hóa ra mô da kịp thời gắn vá cho da bị hỏng. Bị suy tủy xương, ung thư tủy xương thì mô tủy xương hỏng được trích bỏ và được thay thế từ nguồn tế bào gốc tủy xương được nuôi cấy từ tế bào gốc. Bằng công nghệ tế bào gốc mở ra triển vọng chữa trị nhiều bệnh như ung thư, bệnh, Parkinson, Alzheimer, chấn thương tủy sống, đột quỵ tim mạch, tiểu đường típ I, viêm gan, teo cơ, mù, rụng tóc...

2.1.3. Lập bản đồ gen

- Để lập bản đồ gen, các nhà di truyền học sử dụng rất nhiều phương pháp trong đó có phương pháp lai tế bào soma. Khi lai các tế bào khác loài thì trong tế bào lai xảy ra sự đồng đặc và thải loại có chọn lọc các nhiễm sắc thể của một trong 2 loài, vì vậy căn cứ vào phân tích kiểu hình và bộ nhiễm sắc thể cho phép ta xác định được gen định khu trong nhiễm sắc thể nào, xác định các nhóm liên kết gen từ đó xác lập được bản đồ gen của mỗi một nhiễm sắc thể trong bộ. Hơn nữa có thể sử dụng tế bào lai để phân tích tính bổ trợ của gen, tức là các sai lệch di truyền trong tế bào có liên quan đến một hoặc nhiều locut gen khác nhau.

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

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

2.1.4. Công nghệ sản xuất kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody)

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

Kỹ thuật sản xuất kháng thể đơn dòng có thể tóm tắt (hình 10.1).

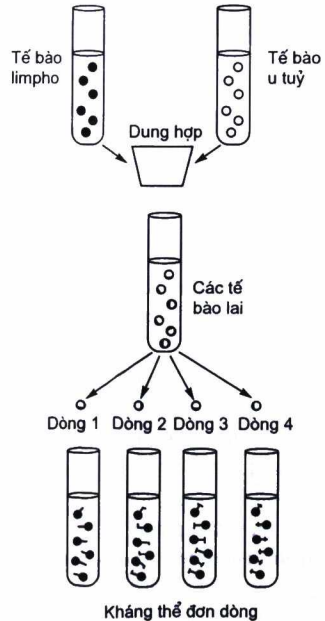
Chuột nhất được gây miễn dịch bằng một kháng nguyên nào đó, trong huyết thanh miễn dịch của chuột sẽ xuất hiện các kháng thể đa dòng khác nhau, tuy mỗi dòng tế bào limpho B chỉ sản xuất một loại kháng thể đơn dòng.

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

Các tế bào limpho B có khả năng tổng hợp kháng thể và có thể chống chịu được môi trường chứa HAT, nhưng chúng không sống được lâu và nhanh chóng bị chết đi. Các tế bào u tủy myeloma không có khả năng tổng hợp kháng thể nhưng chúng có khả năng sống rất lâu trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, nhưng vì trong môi trường chọn lọc có HAT là chất chúng không chống chịu được cho nên chúng cũng bị chết.

Trái lại các tế bào lai vừa có khả năng tổng hợp kháng thể, sống được trong môi trường chứa HAT lại vừa có khả năng phân bào và sống lâu dài. Bằng kỹ thuật chọn dòng (cloning) để tạo ra quần thể tế bào xuất phát từ chỉ một tế bào lai và mỗi dòng tế bào lai sẽ chỉ sản xuất ra một loại phân tử kháng thể hoàn toàn giống nhau - đó là kháng thể đơn dòng.

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



Hình 10.1. Mô hình sản xuất kháng thể đơn dòng

2.2. Công nghệ tế bào thực vật

2.2.1. Công nghệ vi nhân giống và nhân bản vô tính giống cây trồng

Để tạo nên các giống cây trồng có sản lượng cao, thích nghi với điều kiện sinh thái, các nhà trồng trọt thường sử dụng nhiều kỹ thuật tạo giống như: bằng phương pháp lai hữu tính, bằng phương pháp gây đột biến nhân tạo, bằng phương pháp đa bội thể. Để nhân giống nhanh người ta thường sử dụng các biện pháp sinh sản dinh dưỡng (vô tính) như kỹ thuật giâm củ, giâm cành, chiết, ghép cành... Những biện pháp trên đây đã đem lại những thành tựu to lớn của cuộc cách mạng xanh từ những năm 60 của thế kỷ XX và đã cứu hàng trăm triệu người thoát khỏi nạn đói kém. Nhưng với sự phát triển của nền kinh tế thế giới những công nghệ tạo giống cây trồng trên đây không đáp ứng được nhu cầu về sản lượng lương thực, thực phẩm mà nhân loại trên 6 tỷ người đòi hỏi. CNSH giống cây trồng đã kết hợp các công nghệ truyền thống với CNSH hiện đại (như công nghệ nuôi cấy tế bào, lai tế bào trần, chuyển gen, nhân bản vô tính...) mà đại diện là công nghệ vi nhân giống.

a) Công nghệ vi nhân giống

Công nghệ vi nhân giống là công nghệ kết hợp kỹ thuật nuôi cấy tế bào, kỹ thuật lai tế bào cũng như kỹ thuật chuyển gen nhằm mục đích sản xuất cây giống có đặc điểm được dự tính, một cách nhanh, nhiều, tốt, rẻ.

Từ mô sẹo trong nuôi cấy *in vitro* (từ tế bào thuận hoặc tế bào lai hoặc tế bào được chuyển gen...) sẽ tái sinh ra các chồi non, chồi non được cắt nhỏ thành nhiều đoạn, mỗi đoạn lại tái sinh thành chồi, chồi lại được cắt nhỏ, đoạn cắt lại được tái sinh... và như vậy các nhà tạo giống có thể tạo nên một "ngân hàng cây giống" theo đơn đặt hàng của thị trường.

Hiện nay hàng loạt cây giống như cây lương thực, cây thực phẩm, cây dược liệu, cây hoa, cây ăn trái, cây rừng... đang được sản xuất theo quy mô công nghiệp bằng công nghệ vi nhân giống. Công nghệ vi nhân giống có ý nghĩa kinh tế cao, nhất là đối với các cây sinh sản chậm (cây rừng, cây gỗ, cây ăn trái, cây dược liệu), hoặc đối với cây cần cung cấp số lượng cây giống rất nhiều trong thời gian ngắn như cây hoa (hoa hồng, phong lan...). Như ở phần trên đã dẫn, để nhân giống hoa hồng từ các đoạn thân có mắt ghép từ cây mẹ thì trong một năm tối đa ta chỉ tạo được 20-50 cây con. Nhưng với kỹ thuật vi nhân giống người ta có thể tạo được 500.000 cây hoa hồng trong một năm. Hơn nữa, chỉ thông qua kỹ thuật vi nhân giống mới có thể tạo được các giống cây thuần, cây lai, cây chuyển gen đồng đều về chất lượng, về tính chịu bệnh..., hoặc mang các đặc tính đáp ứng thị hiếu của người tiêu dùng. Ví dụ, với kỹ thuật vi nhân giống kết hợp kỹ thuật chuyển gen đã tạo được cây hoa có hình dạng, màu sắc cánh hoa rất đặc biệt chưa hề có trong tự nhiên, có giá trị thẩm mỹ và lợi nhuận cao.

2.2.2. Công nghệ tạo cây lai soma

Trong công tác tạo giống, người ta thường sử dụng phương pháp lai hữu tính để tạo cây lai có được đặc tính di truyền của bố và mẹ. Nhưng lai hữu tính chỉ có thể thực hiện được giữa các cá thể thuộc cùng một loài, nếu lai khác loài thì cây lai thường bất thụ. Hơn nữa, cây lai không phải khi nào cũng cho những đặc tính mà nhà chọn giống mong muốn, cây lai thường hay nhạy cảm với bệnh, do đó tạo giống lai hữu tính quá tốn kém và lâu dài.

Công nghệ nuôi cấy tế bào và lai tế bào trần đã cho phép các nhà tạo giống tạo nên những tế bào lai khác loài, khác chi thậm chí khác họ, bộ... Những tế bào lai này được gọi là *tế bào lai soma* (vì do 2 tế bào soma kết hợp với nhau). Từ tế bào lai sẽ tạo nên mô sẹo và sẽ tái sinh nên cây lai soma mang đặc tính di truyền của cả bố và mẹ chẳng khác gì cây lai hữu tính. Từ những năm 70 của thế kỷ XX người ta đã tạo được tế bào lai soma từ 2 loài thuốc lá và tái sinh được cây thuốc lá lai trọn vẹn. Đặc biệt là dùng kỹ thuật lai soma để lai tế bào khoai tây với tế bào cà chua đã tạo nên cây lai "Pomat" vừa mang đặc tính của khoai tây và của cà chua. Người ta cũng đã tạo được cây lai từ tế bào của cà rốt và mùi tây.

Hiện nay công nghệ tạo cây lai soma được thực hiện không chỉ ở thuốc lá, khoai tây, cà chua... mà cả cây ăn trái, cây lương thực (lúa, ngô...) và cả cây hoa.

2.2.3. Công nghệ nuôi cấy tế bào để sản xuất các chế phẩm sinh học

Thực vật không chỉ cung cấp cho con người lương thực và thực phẩm mà còn cung cấp các chất dược liệu quý, chất nhuộm màu, chất dùng trong công nghệ hóa chất...

Bảng 10.3. Các hợp chất lấy từ thực vật và vai trò của chúng

Hợp chất từ thực vật	Vai trò
Terpen	Kháng vi khuẩn
Terpenoid	Kháng ung thư
Flavonoid	Chống co thắt
Phenylpropanoid	Tăng lực
Amin	Diệt sâu
Alcaloid	Kích thích, xoa dịu
Hợp chất cyanogen	Chất thơm
Quinon	Tạo dầu thơm
Saponin	Kháng viêm
Coumarin	Cường tim
Chất màu	Tạo màu
Vitamin	Vai trò đa dạng
Enzym, protein, peptid	Vai trò đa dạng
Steroid	Vai trò đa dạng
Polisaccharid	Vai trò đa dạng

Các nhà sản xuất muốn thu nhận chế phẩm từ thực vật phải chiết xuất chúng từ các bộ phận của cây mọc trong tự nhiên hoặc trồng trong vườn ươm bằng kỹ thuật lý hóa phức tạp tốn kém. Các chế phẩm từ thực vật rất phức tạp nên rất khó tổng hợp nhân tạo và giá thành rất cao. Các cây dược liệu mọc ở vùng nhiệt đới và ôn đới phải vài năm đến hàng chục năm mới cho chế phẩm vì cây sinh trưởng chậm và các chất chỉ tích lũy trong các bộ phận trưởng thành của cây như lá, thân, rễ hoặc hoa. Ví dụ chất *berberin* chiết xuất từ rễ cây hoàng liên (*Coptis japonica*) ở tuổi 6 năm, chất *ginsenosid* là chất bổ dưỡng có ở rễ cây

nhân sâm (*Panax ginseng*) có tuổi từ 4-10 năm. Muốn thu được 10g chất *vinblastin* và 1g *vincristin* để làm thuốc, nhà sản xuất phải dùng tới 10 tấn nguyên liệu thô và khô, thế nhưng lượng thuốc đó cũng chỉ để chữa cho em bé bị bệnh ung thư bạch cầu trong một tuần.

CNSH nuôi cấy tế bào kết hợp kỹ thuật chuyển gen đã giúp cho các nhà sản xuất giải quyết những khó khăn trên đây và đẩy mạnh công nghiệp sản xuất các chế phẩm sinh học cũng như các dược phẩm từ thực vật với số lượng lớn, giá thành rẻ, đáp ứng nhanh chóng và kịp thời nhu cầu thị trường dược phẩm và hóa phẩm.

Chế phẩm đầu tiên được sản xuất theo quy mô công nghiệp bằng CNSH được thực hiện ở Nhật Bản từ năm 1983 là chất *shikonin* - chất sắc tố màu đỏ có trong cây *Lithospermum erithrorhizon*, có tác dụng kháng khuẩn, kháng viêm và kháng ung thư, đồng thời là chất phẩm màu có giá trị cao. Nhờ công nghệ nuôi cấy tế bào, năng suất sản phẩm đã tăng gấp 15 lần so với phương pháp chiết xuất truyền thống từ cây.

Công nghệ nuôi cấy tế bào thực vật áp dụng để sản xuất các chế phẩm sinh học gồm các công đoạn sau :

- Chọn lọc cây để lấy mô cấy phải là cây khỏe mạnh, sức sống tốt, có năng suất cao về sản phẩm cần thiết.

- Tiến hành nuôi cấy các mảnh mô từ lá, thân hoặc rễ... trong môi trường thích hợp (thường là môi trường đặc) để sản xuất các mô sẹo. Từ các khối mô sẹo sẽ được tách nhỏ ra thành nhiều mẻ cấy (qua 15 ngày nuôi cấy) được nuôi trong các điều kiện khác nhau về nhiệt độ, độ pH, thời gian chiếu sáng, nồng độ các chất hoocmon thực vật thích hợp, tạo điều kiện cho sự hình thành các dòng tế bào biệt hóa khác nhau dùng làm dòng gốc cho các mẻ nuôi cấy về sau.

- Tiến hành chọn lọc các dòng gốc có năng suất cao về chế phẩm cần sản xuất, có thể căn cứ vào màu sắc của mô cấy (nếu là chế phẩm màu), hoặc bằng kỹ thuật tinh chế và định lượng chế phẩm được sản sinh ra trong mẻ cấy.

- Tiến hành chuyển nuôi cấy sang môi trường lỏng để tăng sức sinh trưởng của mô cấy và tăng sản lượng chế phẩm với các bình cấy dung tích lớn (250 ml). Các dòng gốc có năng suất cao được chuyển sang nuôi cấy đại trà hoặc được cất giữ lâu dài trong bình nơ lỏng.

- Tiến hành sản xuất ở mức đại trà với quy mô nuôi cấy lớn trong các lò phản ứng sinh học (bioreactor) có hệ ổn hóa, có hệ điều chỉnh tự động về các điều kiện nuôi cấy với độ tiết trùng cao. Các lò phản ứng có dung tích từ hàng chục đến hàng trăm mét khối.

- Cuối cùng là công đoạn chiết và tinh chế các chế phẩm cần sản xuất.

Kết hợp kỹ thuật chuyển gen các nhà sản xuất có thể thu được các chế phẩm hoàn toàn mới không có ở thực vật (có nguồn gốc từ vi sinh vật, từ động vật hoặc con người) để làm thuốc như nuôi cấy mô cây thuốc lá để sản xuất *testosteron*, hay sử dụng nuôi cấy tế bào cây *Catharanthus roseus* để sản xuất thuốc chống viêm *pericin*.

Sản xuất các chế phẩm sinh học bằng CNSH đã đem lại lợi nhuận to lớn cho các công ty vì vậy mà các công ty được phẩm xuyên quốc gia đã bỏ ra hàng trăm triệu USD cho các dự án nghiên cứu và sản xuất các chế phẩm, chủ yếu là dược phẩm bằng CNSH. Năm 2001 các hãng dược phẩm đã thu lợi nhuận về mặt hàng CNSH đạt 10 tỷ USD.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Như Hiền. 2002. Di truyền và công nghệ tế bào soma. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội.
2. Nguyễn Như Hiền, Trịnh xuân Hậu. 2004. Tế bào học (in lần thứ 2). Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội,
3. Nguyễn Như Hiền, Chu Văn Mẫn. 2002. Sinh học Người. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. Hà Nội.
4. Nguyễn Như Hiền, Nguyễn Như Ất. 2001. CNSH và ứng dụng vào phát triển nông nghiệp nông thôn. Nhà xuất bản Thanh niên. Hà Nội.
5. Võ Thị Thương Lan. 2000. Sinh học phân tử. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.
6. B. Albert, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. Watson. 1994. Molecular Biology of the Cell. 3^d ed. Garland Publishing, Inc. New York.
7. Biotechnologies d'aujourd'hui. 1993. Sous la direction de R. Julien. Publin. Paris.
8. S. Blanquet. 1997. Biologie moléculaire. Cours de Biologie. Ecole polytechnique. Paris.
9. T. A. Brown. 1999. Genomes. John Wiley & Sons, Inc. New York.
10. P. Cau, R. Seite. 2002. Cours de Biologie cellulaire. 3^d ed. Ellipses edition Marketing S.A. Paris.
11. S. F. Gilbert. 2000. Developmental Biology. 6th ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts,
12. D. L. Hartl, E. W. Jones. 2003. Genétique. Les grands principes. (Traduction par E. Dequier) 3^d ed. Dunod. Paris.
13. H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaria, J. Darnell. 2001. Molecular Cell Biology. 5th ed. Scientific American Books. New York.
14. L. H. Hartwell, L. Hood, M. L. Goldberg, A. E. Reynolds, L. M. Silver, R. C. Veres. 2000. Genetics. From genes to genomes. Mc Graw-Hill companies, Inc. New York.
15. J. Pasternak. 2003. Genétique moléculaire humaine. (Traduction par D. C. Bensimon). Ed. De Boeck Université. Paris.
16. C. A. Smith, E. J. Wood. 1999. Cell Biology. 2^d ed. Chapman & Hall. New York.
17. D. P. Snustad, M. J. Simons. 2000. Principles of Genetics. 2^d ed. John Wiley & Sons, Inc. New York.
18. J. D. Watson. 1965. Molecular Biology of the Gene. New York. Amsterdam.

Chịu trách nhiệm xuất bản:

Chủ tịch Hội đồng Thành viên kiêm Tổng Giám đốc NGÔ TRẦN ÁI

Phó Tổng Giám đốc kiêm Tổng biên tập VŨ VĂN HÙNG

Tổ chức bản thảo và chịu trách nhiệm nội dung:

Phó Tổng biên tập NGUYỄN VĂN TƯ

Giám đốc Công ty CP Sách ĐH-ĐN NGÔ THỊ THANH BÌNH

Biên tập nội dung:

NGUYỄN HỒNG ÁNH

Trình bày bìa:

BÙI QUANG TUẤN

Sửa bản in:

NGUYỄN THU HUYỀN

Chế bản:

PHÒNG CHẾ BẢN (NXB GIÁO DỤC VIỆT NAM)

Công ty CP Sách Đại học – Dạy nghề, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam
giữ quyền công bố tác phẩm.

CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TẬP 1: SINH HỌC PHẦN TỬ VÀ TẾ BÀO – CƠ SỞ KHÓA HỌC CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 7K629y3-DAI

Số đăng kí KHXB : 54 - 2013/CXB/ 138- 51/GD.

In 700 cuốn (QĐ in số : 63), khổ 19 x 27 cm.

In tại Công ty CP In Thái Nguyên.

In xong và nộp lưu chiểu tháng 08 năm 2013.