

**HỘI THẢO CHUYÊN ĐỀ BỒI DƯỠNG HỌC SINH GIỎI
CÁC TRƯỜNG THPT CHUYÊN KHU VỰC DUYÊN HẢI
VÀ ĐỒNG BẰNG BẮC BỘ NĂM 2021**

**CHUYÊN ĐỀ
HÓA SINH, DI TRUYỀN VI SINH VẬT**

MỤC LỤC

PHẦN I: MỞ ĐẦU	4
I. Lí do chọn đề tài.....	4
II. Mục tiêu của chuyên đề	4
III. Đối tượng áp dụng	4
PHẦN II: NỘI DUNG CHUYÊN ĐỀ	5
A. LÝ THUYẾT.....	5
I. VI KHUẨN.....	5
1. Hình dạng, kích thước và cấu tạo.	5
1.1. Hình dạng,	5
1.2. Kích thước.....	5
1.3. Cấu tạo, chức năng của thành tế bào vi khuẩn (cấu trúc bắt buộc).....	5
2. Di truyền học Vi khuẩn	10
2.1. Biến nạp ở vi khuẩn (Transformation)	11
2.2. Tiếp hợp ở vi khuẩn (Conjugation).	12
2.3. Tải nạp (Transduction).....	23
II. VI NẤM VÀ VI TẢO	27
1. Vi nấm.....	27
1.1 Đặc điểm chung của vi nấm.	27
1.2. Di truyền ở vi nấm.	28
1.3. Nấm men như là <i>E. coli</i> của các tế bào eukaryote.....	33
2. Vi tảo.....	38
2.1. Đặc điểm của vi tảo.	38
2.2. Di truyền ở một số vi tảo thông dụng.	40
III. VIRUT	40
1. Một số đặc tính của virut.	40
2. Hình thái và cấu tạo của virut.....	41
2.1. Kích thước và hình dạng của virut.	41
2.2. Cấu tạo của virut.....	42
2.3. Cấu tạo của thể thực khuẩn.....	43
2.4. Các dạng cấu trúc đối xứng của virut	44
3. Di truyền học Virus.	47
3.1. Đặc tính của các virus.	47

3.2. Di truyền học thể thực khuẩn (Bacteriophage hay phage).	47
3.3. Tái bản của các virus.	56
B. CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP	65
I. Câu hỏi:	65
II. Bài tập:	74
PHẦN III: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	93

PHẦN I: MỞ ĐẦU

I. Lí do chọn đề tài

Trong chương trình sinh học cấp trung học phổ thông, phần kiến thức về **Hóa sinh, Di truyền vi sinh vật** là một nội dung khá quan trọng, được đưa nhiều vào đề thi chọn học sinh giỏi quốc gia, quốc tế. Nhiều giáo viên và học sinh còn lúng túng với phần kiến thức này trong khi ôn luyện đội tuyển HSG. Mặc dù hiện nay có rất nhiều tài liệu viết về **Hóa sinh, Di truyền vi sinh vật** nhưng ở các tài liệu khác nhau với mục đích khác nhau, phần kiến thức về **Hóa sinh, Di truyền vi sinh vật** được trình bày theo nhiều cách khác nhau. Vì vậy, chúng tôi biên soạn chuyên đề: “**Hóa sinh, Di truyền vi sinh vật**” để giúp học sinh có cái nhìn tổng quát hơn, thống nhất hơn. Đồng thời hỗ trợ cho giáo viên kiểm tra kiến thức học sinh thông qua hệ thống các câu hỏi. Đây cũng là nguồn tài liệu ôn tập trong các kì thi trung học phổ thông, học sinh giỏi các cấp, kì thi chọn học sinh giỏi quốc gia, quốc tế.

II. Mục tiêu của chuyên đề

- Hệ thống hóa một số kiến thức về Hóa sinh, Di truyền vi sinh vật.
- Giới thiệu một số câu hỏi, bài tập vận dụng.

III. Đối tượng áp dụng

- Học sinh ôn thi trung học phổ thông.
- Các đội tuyển ôn thi học sinh giỏi môn sinh học các cấp.
- Các giáo viên sinh học.

PHẦN II: NỘI DUNG CHUYÊN ĐỀ

A. LÝ THUYẾT

I. VI KHUẨN

1. Hình dạng, kích thước và cấu tạo.

1.1. Hình dạng,

Hình dạng vi khuẩn khác nhau ở loài này và loài khác, đối với các vi khuẩn đa hình thì hình dạng có thể khác nhau trong các giai đoạn sống khác nhau của chu kỳ sinh trưởng.

Vi khuẩn có các hình dạng chính: Cầu (cầu khuẩn); Que (trực khuẩn); Xoắn (xoắn khuẩn); Phẩy (phẩy khuẩn).

1.2. Kích thước

Đơn vị đo kích thước của vi khuẩn là μm

- Kích thước của vi khuẩn khoảng 1- 10 μm

- Kích thước tế bào vi khuẩn = 1/10 tế bào nhân thực

1.3. Cấu tạo, chức năng của thành tế bào vi khuẩn (cấu trúc bắt buộc)

1.3.1. Cấu tạo

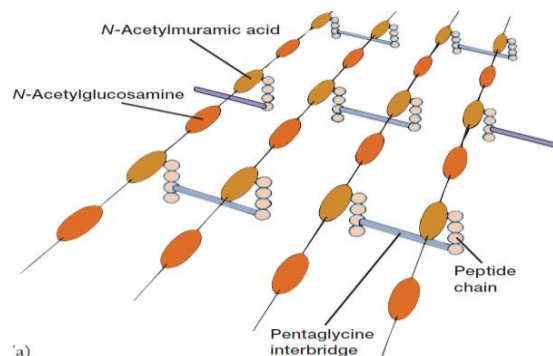
1.3.1.1. Thành tế bào vi khuẩn

- Thành tế bào vi khuẩn được cấu tạo bởi peptidoglycan, tức là gồm peptit và glican.

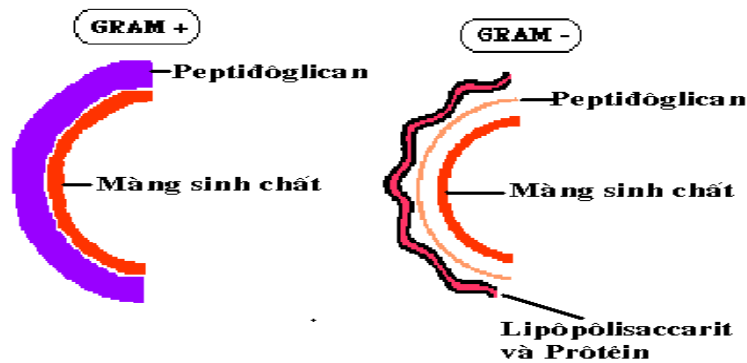
- + Glican gồm 2 đơn vị đường amin là N- axetyl glucosamin(NAG) + a N axetyl muramic(NAM)

- + Peptit là 4 aa tạo tetrapeptit. Axit amin thứ 3 của chuỗi tetrapeptit hàng trên gắn chéo với aa thứ 4 của chuỗi tetrapeptit hàng dưới hoặc hàng bên, tạo thành mạng lưới dây đặc, vững chắc bao quanh màng sinh chất.

Sơ đồ cấu tạo của peptidoglycan.

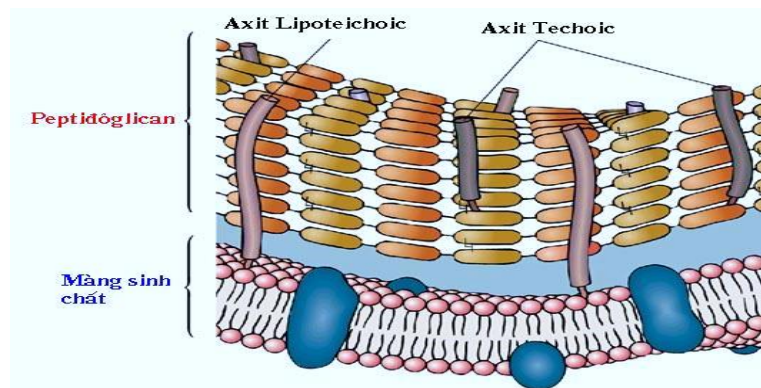


- Ngoài peptidoglycan, thành TB còn chứa các thành phần khác. Dựa vào các thành phần khác nhau đó và độ dày của lớp peptidoglycan mà vi khuẩn được chia làm 2 loại gồm: vi khuẩn Gram dương và vi khuẩn gram âm.



Sơ đồ cấu tạo thành TB vi khuẩn G^+ và vi khuẩn G^-

* Cấu tạo thành tế bào vi khuẩn vi khuẩn G^+



- Vi khuẩn G^+ có lớp peptidoglycan dày từ 150- 800 Å⁰ gồm 40-50 lớp.
- Axit teichoic: là polyme của glyxerol và ribitol photphat được gắn với peptidoglycan qua NAM hoặc màng TBC. Axit teichoic còn liên quan đến kháng nguyên bề mặt và tính gây bệnh của một số vi khuẩn.
- Bên ngoài cùng là lớp S, là lớp không cố định, bản chất là lipoprotein, polysaccharit.

* Cấu tạo thành tế bào vi khuẩn G^-

- Vi khuẩn G^- có lớp peptidoglycan mỏng (50- 180 Å⁰)
 - Không có axit teichoic
 - Ngoài lớp peptidoglycan là lớp màng ngoài thành lipopolysaccharit (LPS).
- + Phần lipid gọi là lipid A là nội độc tố của vi khuẩn

+ Phần đường gồm polysaccarit lõi và polysaccarit O. Polysaccarit O được dùng trong phân loại vi khuẩn, là kháng nguyên O (kháng nguyên bề mặt).

+ Kênh protein màng ngoài gọi là porin (protein lỗ và đặc trưng ở vi khuẩn G⁻)

- Khoảng giữa màng ngoài và màng sinh chất là không gian chu chất.

- Bên ngoài cùng là lớp S

Thành TB là cấu trúc rất phức tạp và bắt buộc của TBVK. Tuy nhiên có một số vi khuẩn không có thành TB như Mycoplasma.

***Các hợp chất có thể tác động vào thành tế bào vi khuẩn**

- Lysozym: cắt liên kết β 1,4 glycozit giữa 2 phân tử NAM và NAG làm thành TB bị phá hủy.

Khi VK mất thành $\rightarrow$ VK G⁺ biến thành TB trần và VK G⁻ trở thành thể hình cầu.

+ Tế bào trần: không còn tính kháng nguyên, không có khả năng phân chia, khả năng phục hồi thành khó, dễ lai các tế bào với nhau.

+ Thể hình cầu: còn kháng nguyên bề mặt do còn lớp LPS, khả năng phân chia chậm, khả năng phục hồi thành dễ, khó lai các tế bào với nhau

- Penicilin cắt liên kết giữa aa thứ nhất và aa thứ 2 trong chuỗi tetrapeptit của NAM

- Muroendopeptidaza cắt cầu nối aa giữa 2 phân tử NAM.

***Phương pháp nhuộm Gram**

- Để phân biệt vi khuẩn G⁺ vi khuẩn G⁻ người ta sử dụng phương pháp nhuộm Gram. Phương pháp nhuộm Gram là phương pháp nhuộm kép, dựa vào sự khác nhau trong cấu trúc thành vi khuẩn

- Phương pháp nhuộm Gram:

+ Nhỏ một giọt dịch huyền phù vi khuẩn lên lam kính, cố định vết bôi trên ngọn lửa đèn cồn

+ Nhuộm màu bằng thuốc nhuộm tím kết tinh, củng cố màu nhuộm bằng dung dịch Lugol (chứa iot).

+ Tẩy màu bằng ancol hoặc axeton (1 phút) cho tiêu bản mất màu, sau đó rửa lại bằng nước.

+ Nhuộm bổ sung bằng thuốc nhuộm màu đỏ (Fuchsin), rửa nước, hong khô và soi kính.

Kết quả: vi khuẩn G⁺ bắt màu tím, vi khuẩn G⁻ bắt màu đỏ.

- Cơ chế nhuộm Gram: Bản thân peptidoglican không bị nhuộm màu, nhưng ngăn cản sự thất thoát của tím kết tinh. Khi bị tẩy bằng cồn, ở vi khuẩn Gram dương, các lỗ ở peptidoglican dày lại có nhiều liên kết chéo, nên giữ được màu. Trong khi ở vi khuẩn Gram âm, lớp peptidoglican mỏng, các lỗ lớn nên không giữ được màu. Khi tẩy bằng dung môi đã làm tan lipid, nên kích thước lỗ càng lớn nên không giữ được màu.

Khi nhuộm bổ sung bằng thuốc nhuộm màu đỏ, vi khuẩn Gram dương không bắt màu, vi khuẩn Gram âm bắt màu thuốc nhuộm bổ sung.

***Chức năng của thành**

- Duy trì hình dạng ổn định của TB
- Duy trì áp suất thẩm thấu
- Tham gia vào quá trình phân bào
- Hỗ trợ sự chuyển động của tiên mao
- Bảo vệ TB (k/s, thuốc nhuộm, kim loại nặng, 1 số enzym phân giải...)

1.3.1.2. Màng sinh chất(cấu trúc bắt buộc)

- Cấu trúc của màng sinh chất: Giống sinh vật nhân chuẩn.
- Đặc điểm khác với màng ở sinh vật nhân chuẩn (không chứa cholesterol, lipid ở màng sinh chất chứa nội độc tố của VK)
- Chức năng: Hấp thu các chất dinh dưỡng, thực hiện quá trình hô hấp, gấp nếp thành mezosom là nơi định vị DNA khi phân chia tế bào, chứa sắc tố ở VK quang hợp..)

1.3.1.3. Ribosom 70S(cấu trúc bắt buộc)

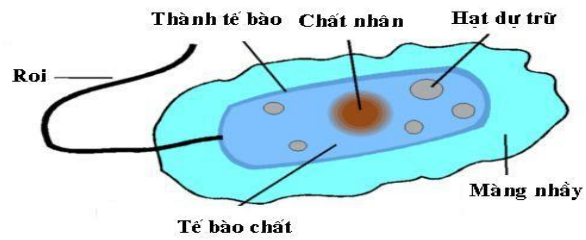
- Giống Ribosom của ty thể, lập thể ở SV nhân chuẩn.

1.3.1.4. Vật chất nhân (cấu trúc bắt buộc)

- Nhân không có màng bao.
- Nhân là đơn bội (chỉ là 1 NST cấu tạo bởi 1 sợi DNA dạng kép, mạch vòng) → đột biến là biểu hiện ngay.

1.3.1.5. Glicocalix (cấu trúc không bắt buộc)

- Glicocalix là lớp bao ngoài cùng của tế bào, bao gồm cả màng giáp lẫn màng nhày.
 - Thành phần hóa học của Glicocalix có thể là polysaccarit hoặc protein hoặc cả 2.
 - Nếu glicocalix được tổ chức chặt chẽ gắn chắc vào thành tế bào thì gọi là màng giáp, nếu cấu trúc lỏng lẻo không gắn chắc vào thành thì gọi là màng nhày.
 - * Màng giáp giúp tế bào vi khuẩn thoát khỏi bị tiêu diệt bởi thực bào.
-



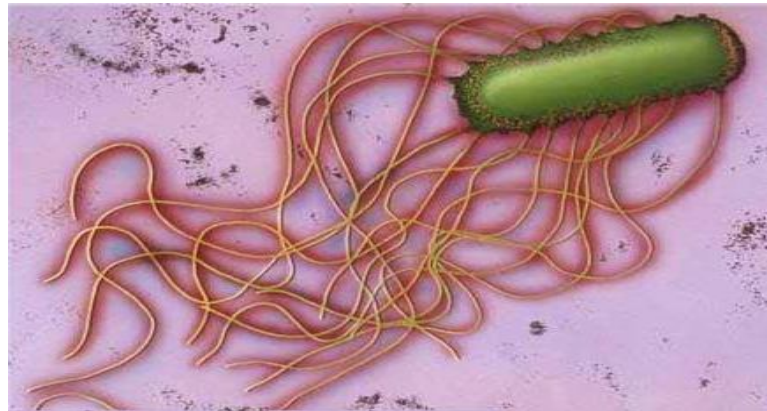
* Màng nhày:

- Màng nhày có nhiều ở nhóm vi khuẩn G⁻
- Màng nhày hình thành trong những điều kiện: Quá dư thừa đường, quá dư thừa nitơ, cần tăng cường độc tính..)

- Vai trò của màng nhày: Tăng cường độc tính của VK, cung cấp chất dd khi cần.

- Loại kháng nguyên có ở màng nhày: Kháng nguyên K

1.3.1.6. Tiên mao và tiêm mao (cấu trúc không bắt buộc)



- Chức năng: vận chuyển

- Loại kháng nguyên có ở tiên mao: Kháng nguyên H

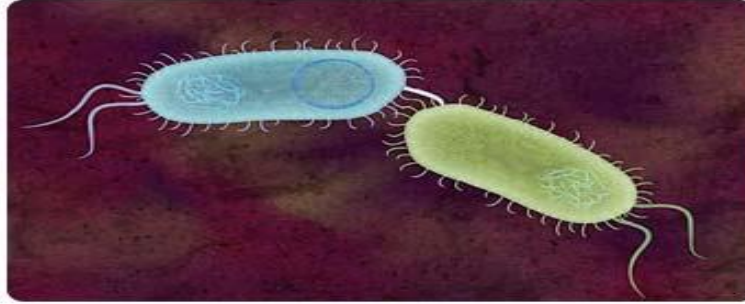
1.3.1.7. Nhung mao (cấu trúc không bắt buộc)

- Các loại nhung mao: phổ thông, giới tính

- Vai trò:

+ Nhung mao phổ thông là lông kết dính hông cầu.

+ Nhung mao giới tính là cầu tiếp hợp giữa hai VK.



1.3.1.8. Các vật thể ẩn nhập - Các chất dự trữ (cấu trúc không bắt buộc)

- Các chất dự trữ vô cơ: P, S, N
- Các chất dự trữ hữu cơ: Glucogen, lipit, cacboxysom, PHB

1.3.1.9. Plasmid (cấu trúc không bắt buộc)

- Cấu trúc của plasmid: Là yếu tố di truyền ngoài NST, mạch kép dạng vòng, có thể tiếp hợp hoặc không, có khả năng nhân đôi độc lập với AND của NST.
- Chức năng của plasmid: Chứa gen qui định khả năng kháng thuốc, phân giải chất độc, kháng độc tố...

1.3.1.10. Nội bào tử của vi khuẩn (cấu trúc không bắt buộc)

- Cấu tạo của nội bào tử :6 lớp màng, có khả năng kháng nhiệt và hoá chất...
- Điều kiện hình thành nội bào tử: Cuối giai đoạn sinh trưởng hoặc khi gặp điều kiện sống bất lợi. Khi điều kiện sống thuận lợi bào tử lại hoạt hoá, nứt vỏ và mọc ra. Nội bào tử không phải là bào tử sinh sản.
- Mỗi TB vi khuẩn chỉ hình thành một nội bào tử (chỉ một số khuẩn mới có khả năng hình thành nội bào tử)

2. Di truyền học Vi khuẩn

Nghiên cứu di truyền học các vi khuẩn là nền tảng chính của di truyền học phân tử sau này, với đối tượng kinh điển được nhắc lại nhiều lần là *Escherichia coli*, lý do rất ấn tượng là bộ gene của nó 4.639.221 cặp base, chứa 4.290 gene mã hoá protein (Maloy 2006). Một lợi thế khác là trong suốt toàn bộ chu kỳ sống, *E. coli* chỉ tồn tại ở pha đơn bội, vì vậy các đột biến biểu hiện ra kiểu hình rõ ràng mà không bị lấn át bởi các allele trội trong kiểu gene dị hợp tử như ở các sinh vật lưỡng bội.

Vi khuẩn (bacteria) thuộc nhóm sinh vật tiền nhân (prokaryote) và thường chỉ có một phân tử nhiễm sắc thể chính với nhiều plasmid. Chúng không có sự xen kẽ các thể hệ lưỡng bội và đơn bội, không có các giao tử và không có giảm phân. Nhưng chúng có các quá trình tái tổ hợp di truyền gọi là *sinh sản cận hữu tính*, đó là: biến nạp, tiếp hợp và tải nạp.

2.1. Biến nạp ở vi khuẩn (Transformation)

2.1.1. Định nghĩa.

Biến nạp là quá trình xâm nhập của DNA ngoại bào (thể cho) vào tế bào thể nhận và gây biến đổi một (một số) đặc tính của thể nhận bằng ảnh hưởng của DNA thể cho.

Biến nạp là quá trình chuyển DNA trực tiếp tách ra từ thể cho sang thể nhận mà không cần sự tiếp xúc trực tiếp giữa hai tế bào hoặc thông qua vật trung gian (các phage). Tế bào thể cho và thể nhận có thể bắt nguồn từ các sinh vật khác nhau, nhưng trong khuôn khổ của bài này, chúng ta chỉ xét hiện tượng biến nạp ở vi khuẩn.

Hiện tượng này lần đầu tiên được Fred Griffith phát hiện ở vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae* năm 1928 trong các thí nghiệm trên chuột. Tiếp tục phát triển hướng nghiên cứu này với DNA tinh chiết và gây biến nạp *in vitro*, thông qua xử lý bằng các enzyme khác nhau, đến năm 1944 O.T. Avery và cs đã chứng minh được rằng: DNA là vật chất mang thông tin di truyền, chứ không phải protein.

2.1.2. Cơ chế phân tử của biến nạp.

Cơ chế biến nạp chủ yếu bao gồm việc vi khuẩn thể nhận tiếp nhận DNA của thể cho và sau đó DNA này có thể trao đổi với đoạn DNA tương đồng của thể nhận bằng trao đổi chéo. Những tế bào có khả năng tiếp nhận DNA gọi là các *tế bào khả biến* (competent). Tế bào vi khuẩn nhận đoạn ngoại lai lúc đó có bộ gene ở trạng thái *lưỡng bội một phần* (merodiploid) hay *hợp tử từng phần* (merozygote). Quá trình trao đổi thông tin di truyền bằng cách chuyển chỉ một phần vật chất di truyền như thế được gọi là sự *giao nạp* hay *tiếp hợp từng phần* (meromixis).

Về mặt thực nghiệm, DNA được tách ra từ các tế bào thể cho, sau đó được đưa vào quần thể các thể bào thể nhận. Các tế bào thể nhận sẽ tiếp nhận các đoạn DNA một cách ngẫu nhiên. Không phải tất cả các loài vi khuẩn đều có khả năng tiếp nhận DNA. Ngay cả những loài có khả năng này cũng chỉ có thể tiếp nhận được DNA ở những pha sinh trưởng nhất định và trong môi trường nuôi cấy cụ thể. Ví dụ: các loài *Streptococcus pneumoniae* (tức *Diplococcus*) và *Bacillus subtilis* tương đối dễ dàng trở thành khả biến hơn, trong khi *E. coli* phải mất đi hai loại enzyme exonuclease và phải được nuôi cấy trong môi trường có nồng độ cao của calcium chloride để làm cho màng tế bào của nó có thể thấm được DNA.

Để biến nạp có thể xảy ra với hiệu quả cao ở vi khuẩn, chẳng hạn *B. subtilis*, DNA biến nạp phải có mạch kép và phân tử lượng tương đối cao (1.10^6 dalton). Khi DNA xuyên qua màng tế bào của vi khuẩn khả biến thì một trong các sợi của DNA bị phân

huỷ. Sau đó sợi đơn DNA chuyển sang có thể trao đổi với nhiễm sắc thể thể nhận ở vùng tương đồng; sự kiện này có thể phát hiện được nhờ những khác biệt di truyền thích hợp giữa các tế bào thể cho và thể nhận.

Tóm lại, hiệu quả của biến nạp phụ thuộc vào ba yếu tố: (1) Tính dung nạp hay khả biến của tế bào thể nhận; (2) Kích thước của đoạn DNA được biến nạp; và (3) Nồng độ của DNA.

Cơ chế phân tử của biến nạp (trong thí nghiệm Griffith) về cơ bản, có thể giải thích như sau:

(1) DNA sợi kép tế bào vi khuẩn cho S xâm nhập qua màng tế bào vi khuẩn nhận R, với một sợi đơn bị phân huỷ bởi nuclease;

(2) DNA thể nhận R biến tính ở vùng tương đồng để bắt cặp hay tiếp hợp (*synapsis*) với đoạn DNA sợi đơn còn lại của thể cho S. Để có thể tái tổ hợp bình thường ở vi khuẩn cần có protein được mã hoá bởi gene *recA*⁺.

(3) Phân tử DNA với đoạn lai (*heteroduplex*) "R-S" tái bản tạo ra hai DNA sợi kép con: một sợi kép "R-R" và một sợi kép khác có mang đoạn DNA thể nhận "S-S", tất cả có hai sợi đơn giống nhau (*homoduplex*).

Từ thí nghiệm của Avery và cs, ta thấy rằng: Mặc dù thành phần hoá học của vỏ vi khuẩn (capsule) được xác định bằng các gene, nhưng mối quan hệ đó là gián tiếp. DNA được phiên mã thành RNA và RNA được dịch mã thành các protein. Kiểu hình của pneumococcus — thành phần của vỏ polysaccharide — được xác định bằng các enzyme (proteins) cụ thể (dùng để tổng hợp polysaccharide).

2.2. Tiếp hợp ở vi khuẩn (Conjugation).

2.2.1. Định nghĩa.

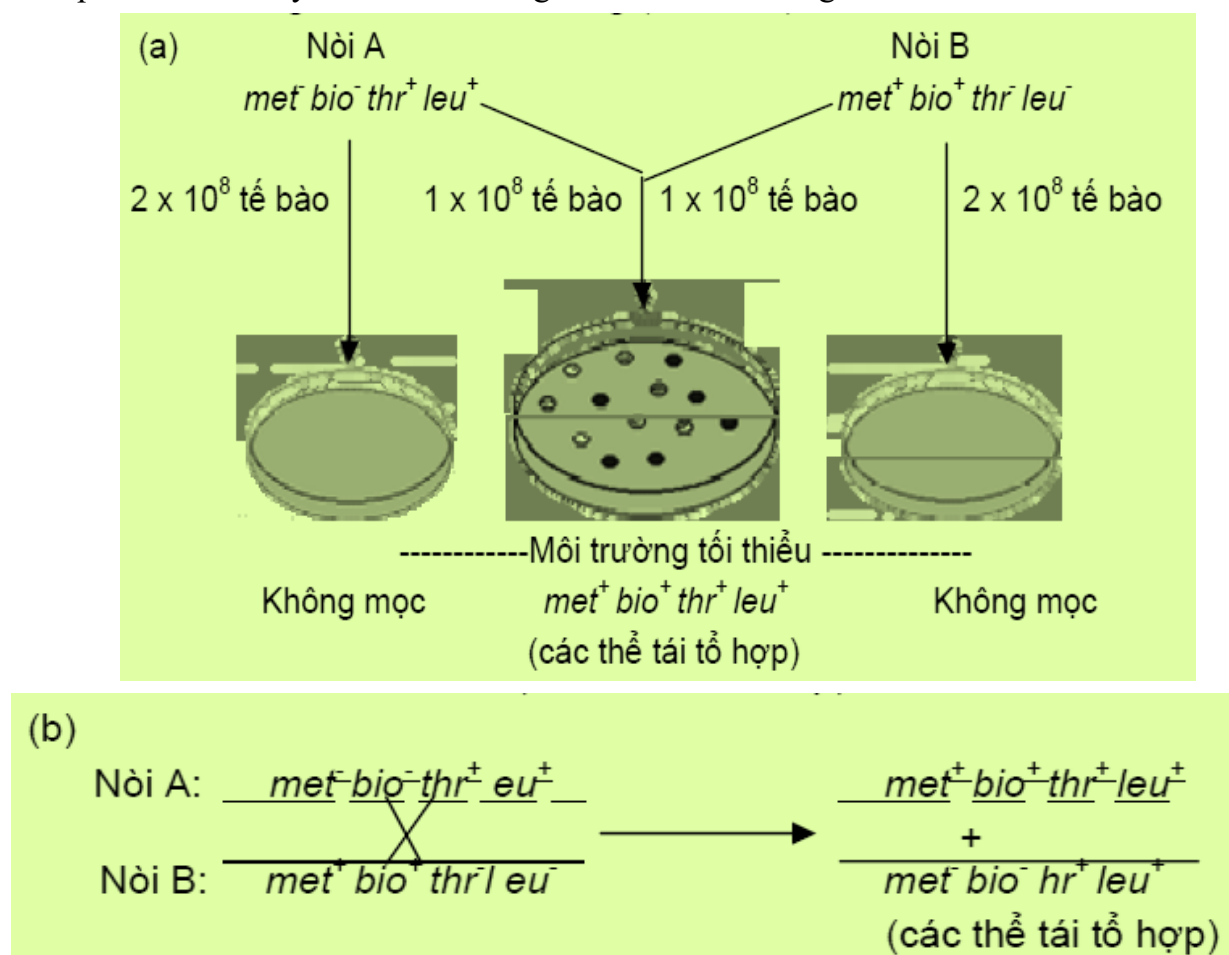
Tiếp hợp là hiện tượng tiếp xúc trực tiếp giữa hai tế bào vi khuẩn và kèm theo việc truyền một phần vật chất di truyền từ tế bào thể cho (donor) sang tế bào thể nhận (recipient, receptor).



Hình: *E. coli* tiếp hợp. Hai tế bào kết hợp nhau bằng một cầu nối, thể cho bên trái và thể nhận bên phải.

Vào năm 1946, Joshua Lederberg và E.L.Tatum đã sử dụng các nòi đột biến khuyết dưỡng khác nhau ở *E. coli* để chứng minh có tái tổ hợp giữa chúng. Cụ thể, nòi A có kiểu gene $met^- bio^- thr^+ leu^+$ và nòi B có kiểu gene ngược lại, $met^+ bio^+ thr^- leu^-$. Nếu đem nuôi cấy riêng rẽ trên các môi trường tối thiểu, các nòi này không sinh trưởng được.

Tuy nhiên sau khi trộn lẫn hai nòi A và B trong ống nghiệm và đem cấy lên môi trường tối thiểu, thấy có xuất hiện các khuẩn lạc. Điều đó chứng tỏ có sự tái tổ hợp giữa hai nòi và làm xuất hiện dạng lai hay các thể tái tổ hợp, với kiểu gene $met^+ bio^+ thr^+ leu^+$, bù đắp sự khiếm khuyết cho nhau trong nhu cầu dinh dưỡng.



Hình: Thí nghiệm kinh điển về tái tổ hợp ở vi khuẩn.

(a) Hai nòi khuyết dưỡng A và B được hỗn hợp với nhau. Mỗi nòi tự nó không thể mọc được trên môi trường tối thiểu, nhưng khi hỗn hợp hai nòi làm xuất hiện các thể tái tổ hợp có thể mọc được trên môi trường tối thiểu, cho các khuẩn lạc mọc trên đĩa petri ở giữa.

(b) Sự kiện tái tổ hợp làm sản sinh các thể nguyên dưỡng. Một trao đổi chéo xảy

ra giữa các gene bio và thr đem các allele kiểu dại về một nhiễm sắc thể và các allele đột biến trên nhiễm sắc thể kia.

Như vậy, theo hiểu biết sau này ta có thể hình dung một số vi khuẩn, ví dụ *E. coli*, có thể truyền một phần nhiễm sắc thể của chúng cho thể nhận mà chúng tiếp xúc trực tiếp. Khi thể cho tái bản nhiễm sắc thể của nó thì bản sao được tiêm vào thể nhận. Tại thời điểm bất kỳ thể cho và thể nhận tách khỏi nhau thì việc truyền gene dừng lại. Các gene thực hiện "chuyến du hành" thành công sẽ thay chỗ tương đương trong nhiễm sắc thể của thể nhận. DNA được truyền gồm một bộ các gene nằm kề nhau gọi là các *gene truyền*. Các gene truyền có thể tồn tại ở dạng phân tử DNA mạch vòng gọi là các *plasmid* hoặc nằm bên trong nhiễm sắc thể cho gọi là plasmid *lồng ghép* trong nhiễm sắc thể.

2.2.2. Các đặc điểm.

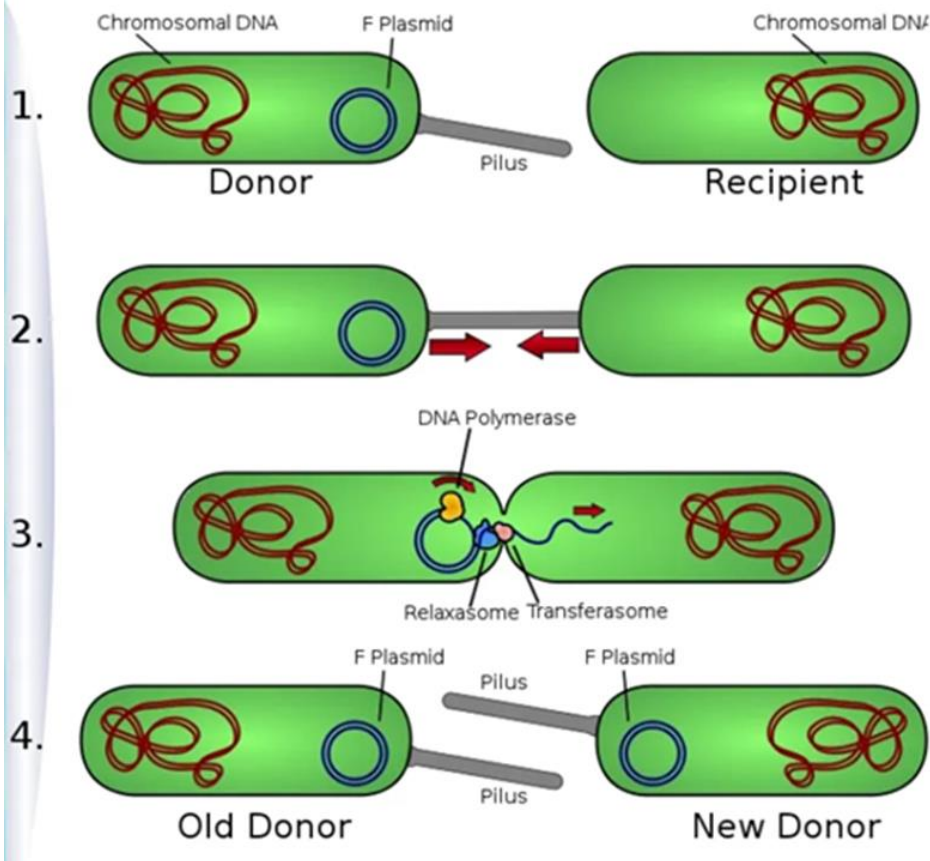
(1) Chỉ có thể xảy ra giữa các tế bào thuộc các kiểu bắt cặp đối diện; trong đó thể cho (male) mang một nhân tố hữu thụ (F^+) và thể nhận (female) không có nhân tố này (F^-). Lưu ý rằng, hiện tượng phân hoá giới tính này ở vi khuẩn (tương tự các giống đực và cái ở sinh vật bậc cao) đã được Hayes phát hiện từ năm 1953.

(2) F là một bộ các gene nguyên vẹn nhận được từ một plasmid và bây giờ được sát nhập vào nhiễm sắc thể vi khuẩn; nó xác định khởi điểm tái bản cho nhiễm sắc thể; một phần của F là motor ("đầu máy") đẩy nhiễm sắc thể vào trong tế bào thể nhận; phần còn lại của nó là "toa công nhân".

(3) Ở *E. coli*, trung bình một gene truyền qua mất một giây mà các tế bào vẫn được duy trì tiếp hợp với nhau, lúc đó mất khoảng 100 phút để chuyển toàn bộ bộ gene 4.377 gene của nó. Nhưng quá trình này thực ra dễ dàng bị gián đoạn, vì thế có thể các gene vật chủ nằm gần phía sau các gene của plasmid F đi trước sẽ được truyền đi sớm hơn là các gene nằm xa hơn. Phần còn lại "toa công nhân" hiếm khi được truyền đi vì vậy khó mà nhận được một nhân tố F hoàn chỉnh, tế bào thể nhận tiếp tục là F^- .

(4) DNA truyền qua sẽ tìm ra vùng tương đồng trên DNA thể nhận và thay chỗ đó bằng một trao đổi chéo kép.

(5) Bằng cách tách các tế bào một cách cẩn thận vào bất cứ lúc nào, trật tự và khoảng cách tương đối của các gene có thể được xác định. Theo đó, ta có thể thiết lập một bản đồ di truyền — tương đương với bản đồ di truyền của các eukaryote. Nhưng ở đây các quãng cách bản đồ được tính bằng giây (hoặc phút), chứ không phải bằng centiMorgan.



Hình: Sự tiếp hợp giữa các tế bào *E. coli* F⁺ (đực) và F⁻ (cái), với việc truyền nhân tố F- (ở dạng DNA sợi đơn đang tái bản kiểu vòng lẩn) từ tế bào F⁺ sang tế bào F⁻ qua cầu tiếp hợp. Trong điều kiện lý tưởng, tế bào F⁻ nhận được một bản sao của nhân tố F và sau đó tổng hợp sợi DNA bổ sung và trở thành tế bào F⁺.

Như vậy, đặc trưng của việc truyền DNA trong tiếp hợp là đòi hỏi phải có sự tiếp xúc tế bào - tế bào (tiếp hợp được ngăn bởi màng lọc chỉ cho phép pha trộn môi trường nhưng ngăn cản tiếp xúc giữa các tế bào cho và nhận); xảy ra thông qua lỗ tiếp hợp; truyền theo một chiều từ thể cho sang thể nhận mà không ngược lại; ...

2.2.3. Cơ chế.

Tiếp hợp được gán cho các kiểu yếu tố di truyền nhất định, cụ thể là các plasmid. Việc truyền plasmid từ thể cho sang thể nhận không đòi hỏi DNA của plasmid để tái tổ hợp với DNA của thể nhận. Tiếp hợp là có tính bảo tồn - thể cho vẫn giữ lại bản sao của plasmid sau khi truyền đi, điều đó chỉ ra rằng sự tái bản của plasmid xảy ra trong khi tiếp hợp.

Sự tái bản plasmid đòi hỏi phải có một "cầu tiếp hợp" (mating bridge) giữa các tế bào cho và nhận. Đó là vùng tiếp xúc giữa các tế bào này, trong đó DNA được truyền qua

một cái lỗ. Như vậy, trước khi cầu tiếp hợp có thể hình thành, thể cho phải nhận biết tế bào nhận và phải tiếp xúc với thể nhận. Hai sự kiện này không nhất thiết xảy ra đồng thời.

Có nhiều gene được cần đến cho tiếp hợp. Chẳng hạn, đối với plasmid TiC58 các *trb* operon mã hoá cho các sản phẩm gene cần thiết để nhận biết thể nhận và bắt cặp (giao phối). Các gene trong cụm phức hợp này mã hoá cho sợi lông giới tính (sex pilus), yếu tố thiết yếu cho tiếp hợp. Lông giới tính có thể rất dài (ví dụ lông sinh ra bởi plasmid F) hoặc rất ngắn (ví dụ lông sinh ra bởi plasmid RP4). DNA không phải được truyền qua lông giới tính. Mặc dù thể nhận còn chưa biết về plasmid tiếp hợp bất kỳ nào, nhưng sợi lông giới tính là cần cho việc nhận biết tế bào thể nhận. Các plasmid tương tự F mã hoá cho các lông gấp nếp (flexous pili) bắt cặp tốt trong môi trường lỏng, nhưng các plasmid mã hoá cho các lông ngắn cứng (short stiff pili) thường bắt cặp chỉ trong bề mặt đặc. Sự tiếp xúc như sau, sợi lông dài gấp nếp của F hoạt động như một chiếc motor co rút - các tế bào cho và nhận được kéo lại gần nhau khi các tiểu đơn vị của sợi lông khử polymer thành ra màng tế bào chất của các tế bào cho. Ngược lại, bản chất co rút của các sợi lông khác vẫn chưa được xác định.

Các *tra* operon mã hoá các sản phẩm gene cần cho các chức năng tái bản DNA. Sự tái bản DNA đòi hỏi nhiều bước.

- Khởi đầu *tái bản vòng lăn* (rolling circle replication) hay *tái bản sigma* (σ replication) đòi hỏi phải đứt sợi ở DNA của plasmid đóng vòng. DNA plasmid bị đứt tại một vị trí tác động *cis* đặc thù (specific *cis*-acting site) gọi là *nic* bên trong khởi điểm của đoạn truyền (*oriT*). Enzyme thuỷ phân làm đứt đó được gọi là "nickase" hay "strand transferase". Để làm đứt DNA, nickase vẫn giữ sự kết dính đồng hoá trị nhóm 5' phosphate, để lại nhóm 3'OH tự do. Các protein hỗ trợ tạo thuận lợi cho nickase bám vào *oriT*, và phức hợp này được gọi là "relaxosome" (thể giãn xoắn).

- Tái bản DNA khởi đầu tại 3'OH, và tiến hành theo chiều 5' đến 3'.
- Phức hợp relaxosome bám vào lỗ truyền.
- Sự tái bản DNA kiểu vòng lăn trong thể nhận đẩy DNA sợi đơn (single stranded DNA = ssDNA) vào trong tế bào thể nhận.
- ssDNA được biến đổi thành DNA sợi kép (double stranded DNA = dsDNA) trong thể nhận bằng cách tổng hợp DNA sợi ra chậm.

Khi vắng mặt thể nhận, relaxosome làm đứt và nối lại DNA của plasmid. Mặc dù cơ chế còn chưa rõ, sự tiếp xúc với tế bào thể nhận bằng cách nào đó kích thích làm đứt

và truyền DNA đi sau đó.

2.2.4. Phạm vi vật chủ.

Phạm vi vật chủ (host range) có thể được xác định bằng phạm vi các vật chủ mà có thể sử dụng với tư cách là các thể nhận cho việc truyền DNA hoặc phạm vi các vật chủ mà plasmid có thể tái bản bên trong chúng. Phạm vi vật chủ cho tiếp hợp được xác định tiêu biểu bằng khả năng plasmid tái bản nội bên trong vật chủ đặc thù. Chẳng hạn, xét các plasmid tiếp hợp sau:

Plasmid	Phạm vi vật chủ thích hợp	Phạm vi vật chủ tái bản	Phạm vi vật chủ truyền
F	hẹp (Gram- đường ruột)	hẹp	rộng
RP4	rộng (Gram- và Gram+)	rộng	rộng

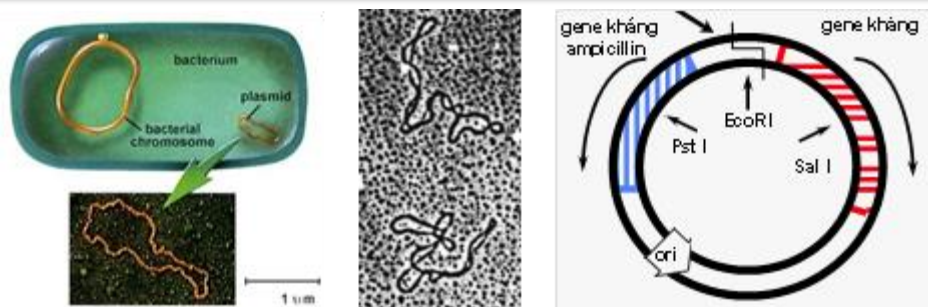
Phạm vi vật chủ của một số plasmid tiếp hợp là rất rộng, bao gồm cả việc truyền sang thể nhận là các vi khuẩn, nấm men, các tế bào thực vật và các tế bào động vật có vú. Tuy nhiên, sự tái bản của plasmid thường bị giới hạn vào các vật chủ nào đó.

2.2.5. Các plasmid và sự truyền DNA ở vi khuẩn

Plasmid là những phân tử DNA mạch vòng có khả năng tái bản độc lập và có kích thước 0,05- 10% kích thước của nhiễm sắc thể vi khuẩn. Chúng có ở nhiều loài vi khuẩn và thường không quan trọng đối với sự sinh trưởng của tế bào. Plasmid rất đa dạng về gene và nhiều gene của chúng không có trong nhiễm sắc thể vi khuẩn và bằng nhiều cách, chúng có thể có được các gene của vi khuẩn. Sự tồn tại của plasmid được chứng minh bằng kiểu hình mà tế bào mang chúng thể hiện. Ví dụ, plasmid mang allele *tet^r* sẽ làm cho vi khuẩn kháng với tetracyclin.

Plasmid dựa vào các enzyme tái bản DNA của tế bào chủ để tái bản, nhưng sự khởi đầu lại do các gene của plasmid kiểm soát. Do vậy số bản sao của chúng có thể khác nhau. Plasmid tái bản mạnh có thể tạo ra 50 bản sao trong một tế bào, trong khi các plasmid khác chỉ cho 1 hoặc 2 bản sao.

Có nhiều loại plasmid ở *E. coli*. Các plasmid đã được nghiên cứu kỹ là plasmid R, Col và F. *Plasmid R* gọi là *các plasmid kháng thuốc* vì chúng có mang các gene kháng với một hay nhiều loại kháng sinh. *Plasmid Col* có khả năng tổng hợp colicin - các protein có thể giết chết các vi khuẩn họ hàng không mang plasmid Col.



Hình: Các plasmid của vi khuẩn: pSC101 (trái), plasmid siêu xoắn (giữa), và pBR322 - một vector tạo dòng được dùng trong DNA sequencing - với vị trí của khởi điểm tái bản (ori), các gene kháng Amp^R và Tet^R và một số vị trí của các enzyme cắt giới hạn.

Plasmid F (F = fertility), còn gọi là các *plasmid giới tính* hay *nhân tố F* có kích thước ~94.500 cặp base (xấp xỉ 1/50 chiều dài của nhiễm sắc thể vi khuẩn), rất được quan tâm vì chúng chứa các gene truyền và xác định tính hữu thụ của vi khuẩn. Nhân tố F có chứa các gene quy định sự hình thành các lông giới tính (pili) mảnh, mềm và có thể rất dài trên mặt tế bào gọi là lông F. Các gene khác trong nhân tố F chuyên trách việc hình thành cầu tiếp hợp nối các tế bào cho và nhận để nhân tố F có thể chuyển qua. F là plasmid tái bản yếu, và một tế bào F⁺ điển hình mang 1 hoặc 2 bản sao của nhân tố F. Phần tử di truyền F⁺ này tồn tại ngoài nhiễm sắc thể nên còn gọi là *episome*.

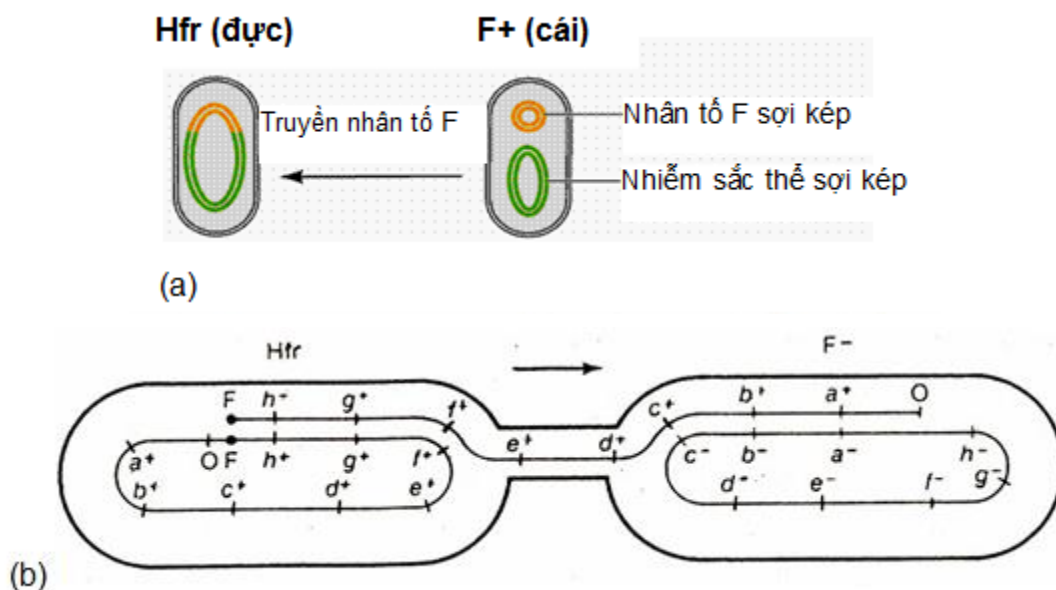
Nhân tố F được truyền từ tế bào F⁺ sang F⁻ trong quá trình tiếp hợp và xảy ra đồng thời với việc tái bản plasmid. Sự tiếp xúc giữa F⁺ và F⁻ là tín hiệu bắt đầu cho việc tái bản nhân tố F và chỉ một sợi đơn thẳng được truyền sang tế bào nhận. Quá trình tổng hợp DNA xảy ra đồng thời ở cả hai tế bào cho và nhận để tạo ra DNA sợi kép dạng vòng. Sau đó cả hai tế bào đều chứa nhân tố F và có thể thực hiện chức năng như là tế bào thể cho.

2.2.6. Nòi Hfr.

Một số nòi F⁺ có thể sinh ra những tế bào "thể cho" có khả năng truyền gene trên nhiễm sắc thể với tần số cao, gọi là các tế bào có khả năng tái tổ hợp cao hay các nòi Hfr (high frequency recombination). Các nòi Hfr cũng có những lông F như các tế bào F⁺, nhưng giữa chúng có một điểm khác biệt quan trọng ở chỗ, trong các tế bào Hfr nhân tố F được đính vào nhiễm sắc thể vi khuẩn. Vì vậy ngoài những biểu hiện của nhân tố F giống như các tế bào F⁺, các tế bào Hfr còn có khả năng truyền đi nhiễm sắc thể vi khuẩn qua ống tiếp hợp.

2.2.7. Sự xen plasmid F vào trong nhiễm sắc thể vật chủ.

Nhân tố F được đính vào nhiễm sắc thể bằng cơ chế trao đổi chéo đơn và làm cho nhiễm sắc thể này trở nên lớn hơn. Tế bào Hfr có thể biến đổi thành tế bào F^+ (mang nhân tố F trong tế bào chất) bằng một quá trình ngược lại.



Hình: (a) Sự sát nhập của nhân tố F vào nhiễm sắc thể ở vi khuẩn "cho" F^+ tạo thành nhiễm sắc thể có kích thước lớn trong vi khuẩn "nhận" Hfr bằng một trao đổi chéo đơn; hiện tượng này mang tính thuận nghịch. (b) Truyền DNA sợi đơn từ thể cho (Hfr) sang thể nhận (F^-).

Bởi vì nhân tố F có khả năng đính vào nhiều vị trí khác nhau trên nhiễm sắc thể vi khuẩn, do đó trình tự gene được chuyển sang các tế bào F^- bởi các nòi Hfr khác nhau là rất khác nhau. Vì khi bắt đầu chuyển gene từ Hfr sang F^- thì nhân tố F bị tách ra, nên một phần được chuyển đi trước, phần còn lại chính là đuôi của nhiễm sắc thể *E. coli* được chuyển đi sau cùng hoặc không được truyền sang nếu quá trình bị ngắt quãng giữa chừng. Khi đó chỉ một phần nhiễm sắc thể được chuyển sang F^- , phần còn lại cùng với nhân tố F vẫn nằm lại trong tế bào Hfr.

Những khác biệt cơ bản giữa việc truyền nhân tố F và Hfr như sau:

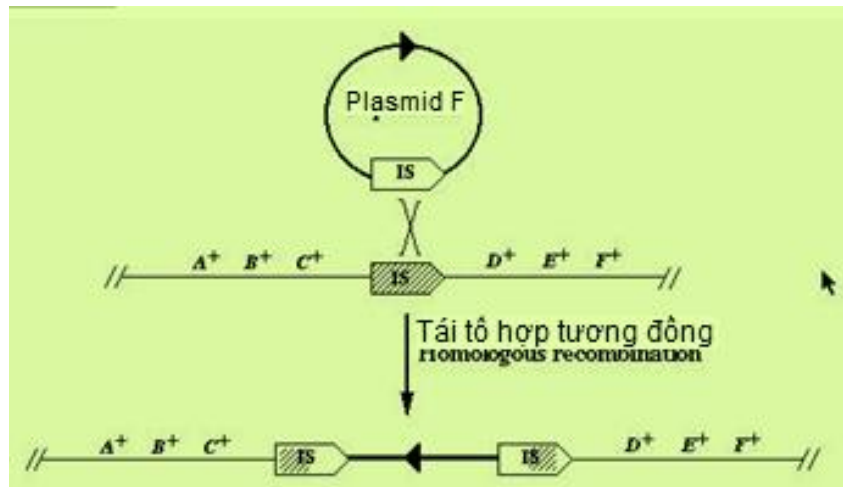
(1) Cần 100 phút để truyền toàn bộ nhiễm sắc thể vi khuẩn trong khi chỉ cần khoảng 2 phút để truyền nhân tố F.

(2) Quá trình truyền DNA Hfr thường bị đứt quãng. Trung bình khoảng vài trăm gene được truyền trước khi hai tế bào tách ra.

(3) Sau khi được truyền F^- vẫn là F^- vì đoạn cuối của F thường không được truyền sang (khi tiếp hợp giữa F với Hfr).

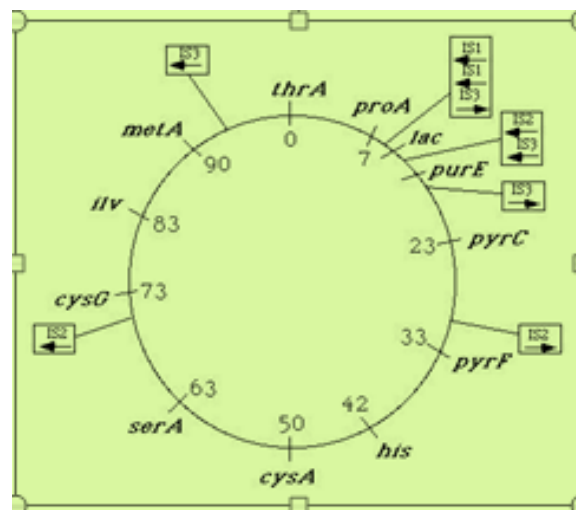
(4) Một đoạn DNA của Hfr được truyền đi không thể tạo thành mạch vòng được và không tự tái bản được, chúng có thể trao đổi chéo với nhiễm sắc thể của thể nhận để tạo nên các thể tái tổ hợp F^- . Ví dụ, cho tiếp hợp Hfr leu^+ x $F^- leu^-$ có thể cho ra $F^- leu^+$.

*Sự hình thành Hfr: Các nòi Hfr có thể hình thành giữa một yếu tố (đoạn xen) IS trên plasmid F và cùng yếu tố IS đó trên nhiễm sắc thể vật chủ.



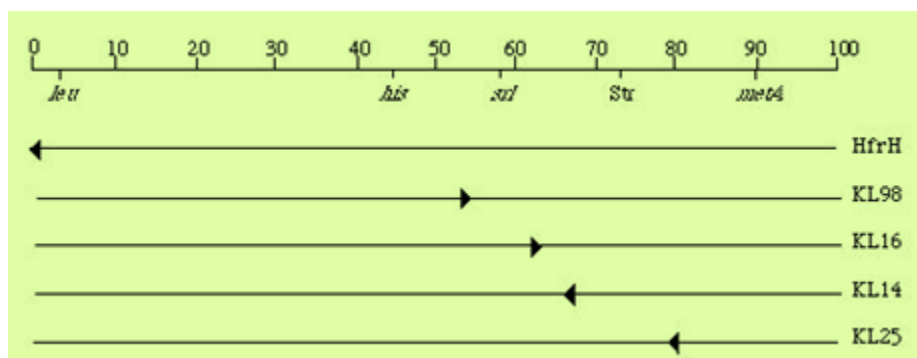
Hình: Sự hình thành Hfr tại đoạn xen IS.

Có nhiều đoạn xen IS trong nhiều nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Chẳng hạn, *E. coli* K-12 kiểu dại có 8 đoạn xen IS1, 6 đoạn xen IS2 và 5 đoạn xen IS3. Vì các đoạn xen IS là các yếu tố di truyền vận động, mỗi nòi có thể có số lượng các đoạn xen IS khác nhau. Sự định khu của một số đoạn xen IS1, IS2 và IS3 trên nhiễm sắc thể *E. coli* K-12 và hướng của chúng được cho thấy ở hình dưới đây.



Hình: Vị trí của các đoạn xen IS1, IS2 và IS3 trên nhiễm sắc thể *E. coli* K-12 và hướng của chúng.

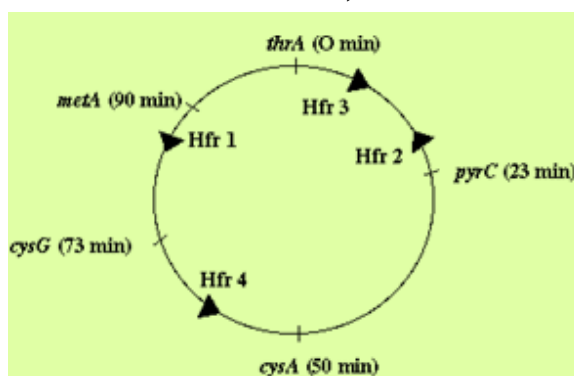
Bằng cách đó, các đoạn xen của Hfr có thể được phân lập tại nhiều vị trí ở *E. coli* và các hướng khác nhau so với nhiễm sắc thể. Một số ví dụ về các đoạn xen của Hfr đã được phân lập ở *E. coli* được cho thấy ở hình dưới đây. Lưu ý rằng nhiễm sắc thể *E. coli* ở đây được biểu diễn dưới dạng mạch thẳng. Các con số bên trên hình biểu thị số phút (hay là "centisome") trên bản đồ di truyền của *E. coli*.



Hình: Các đoạn xen của Hfr đã được phân lập ở *E. coli*.

Ngược lại, *Salmonella typhimurium* khuyết nhiều yếu tố IS vốn có mặt ở *E. coli*. Rõ ràng, các đoạn xen của Hfr được gây ra bởi sự tái tổ hợp tương đồng giữa các đoạn xen IS trên plasmid F và nhiễm sắc thể là hiếm gặp ở *S. typhimurium*.

Một thể đột biến mới được phân lập đó là Str^R và không thể sử dụng acetate như một nguồn carbon (ace). Để xác định vị trí các đột biến trên bản đồ, nó được cho giao phối với bốn nòi Hfr $\text{Str}^S \text{ace}^+$ khác nhau được chỉ ra dưới đây. (Các mũi tên chỉ ra sự định khu và hướng truyền từ mỗi Hfr khác nhau.)



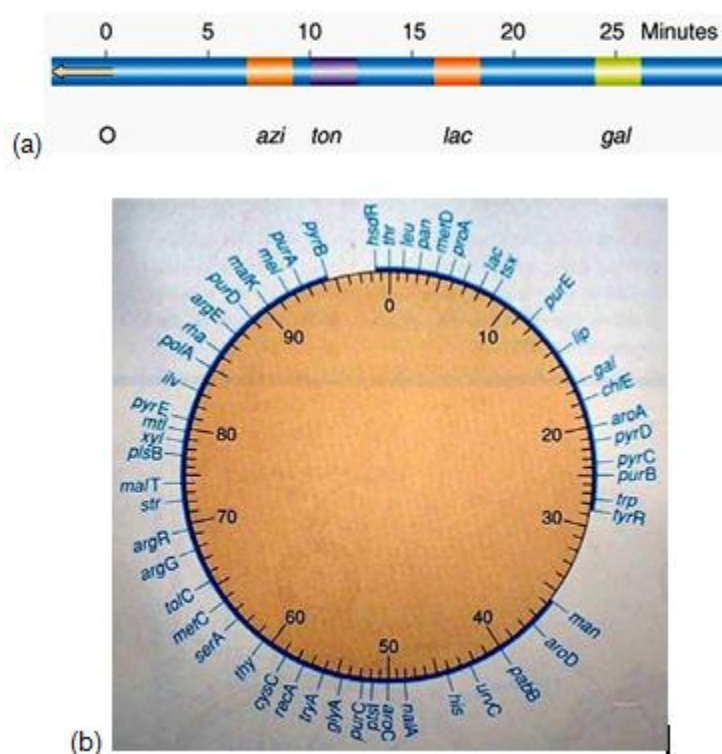
Hình: Vị trí và hướng truyền của các Hfr 1-4.

2.2.8. Lập bản đồ di truyền bằng tiếp hợp ngắt quãng.

Bằng các phép giao phối Hfr x F^- có thể lập được bản đồ gene. Tuy nhiên, bản đồ này khác với bản đồ liên kết gene thông thường, đó là bản đồ trật tự truyền gene.

Bằng cách ngắt quãng cơ học việc truyền gene trong quá trình giao phối có thể xác định thời gian mà một gene nào đó được truyền sang nhờ việc xác định tần số các thể tái

tổ hợp. Từ đó xác định được khoảng cách giữa các gene và vị trí của chúng trên nhiễm sắc thể đo bằng đơn vị thời gian (phút; Hình a dưới đây). Đó là *kỹ thuật ngắt quãng tiếp hợp* mà Elie Wollman và Jacob đã sử dụng để thiết lập bản đồ trật tự phân bố các gene.



Hình: (a) Vị trí và khoảng cách của một số gene trên nhiễm sắc thể đo bằng phút. (b) Bản đồ mạch vòng của bộ gene *E. coli* được thiết lập từ năm 1976 và chỉ chứa một phần các gene mà hiện giờ đã được lập bản đồ.

Để lập bản đồ của toàn bộ nhiễm sắc thể mạch vòng ở *E. coli* người ta đã sử dụng nhiều nòi Hfr khác nhau, mặc dù vậy trật tự của gene và vị trí của chúng trên nhiễm sắc thể, kể cả khoảng cách giữa các gene (đo bằng phút), vẫn giống nhau. Toàn bộ bản đồ nhiễm sắc thể ở *E. coli* là 100 phút.

2.2.9. Lập bản đồ với *E. coli*: các plasmid *F'* và phép thử *cis-trans*.

Các plasmid *F'*.

Nhân tố F đôi khi bị cắt khỏi DNA của tế bào Hfr bằng cơ chế trao đổi chéo các đoạn tương đồng giống như khi lồng ghép. Tuy nhiên, trong một vài trường hợp. Sự trao đổi chéo xảy ra không thật chính xác - tại đoạn không tương đồng - và vì vậy có thể tạo ra một plasmid mang một phần DNA của nhiễm sắc thể vi khuẩn - đó là plasmid *F'*.

Bằng cách dùng những nòi Hfr có các điểm khởi đầu truyền gene khác nhau,

người ta đã tách được những plasmid F' khác nhau. Những plasmid này có mang các đoạn nhiễm sắc thể của tế bào Hfr ở dạng lưỡng bội từng phần nên rất có ích cho việc nghiên cứu sự biểu hiện của gene. Người ta ký hiệu kiểu gene của tế bào, ví dụ mang đột biến *lac* và mẫn cảm với streptomycin, có chứa plasmid F' $lac^+flac^-str^s$.

Phép thử bổ sung cis-trans (cis-trans complementation test).

Về nguyên tắc chung của phép thử bổ sung *cis-trans*, có thể tóm tắt như sau: Hai đột biến khác nhau ảnh hưởng lên cùng một chức năng thì có thể thuộc về trắc nghiệm *cis-trans*, hay phép thử bổ sung, để xác định xem liệu chúng xảy ra trong cùng gene hay trong các gene khác nhau. Trong phép thử này, hai gene đột biến được cung cấp cho cùng tế bào ở dạng *trans* (trên các nhiễm sắc thể riêng biệt). Nếu như các đột biến bổ sung bù trừ cho nhau để cho chức năng kiểu dại, chúng có thể nằm trong các gene riêng biệt. Nếu như các đột biến không bổ sung được cho nhau, chúng tỏ chúng ảnh hưởng cùng một gene như nhau.

2.3. Tải nạp (Transduction).

2.3.1. Định nghĩa.

Tải nạp là quá trình chuyển vật chất di truyền từ vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận thông qua phage. Những phage này được gọi là các *hạt tải nạp*. Có hai dạng phage tải nạp là phage tải nạp chung và phage tải nạp đặc hiệu. Phage tải nạp chung sản sinh ra các hạt mang những đoạn DNA vi khuẩn từ bất kỳ phần nào của nhiễm sắc thể vi khuẩn và không có DNA phage. Còn *phage tải nạp đặc hiệu* sản sinh ra các hạt mang cả DNA phage và gene vi khuẩn liên kết thành một sợi đơn, và gene vi khuẩn được lấy từ những *vùng đặc biệt của nhiễm sắc thể vi khuẩn*.

2.3.2. Tải nạp chung (generalized transduction).

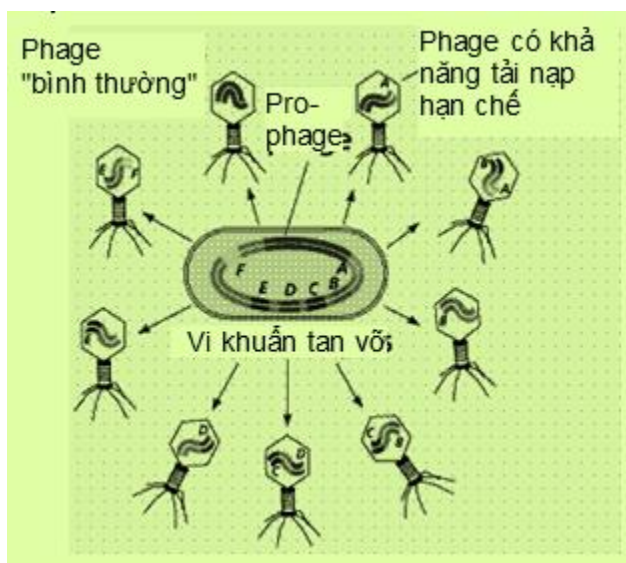
Tải nạp chung là trường hợp bất kì gene nào của thể cho cũng có thể được chuyển sang thể nhận bằng phage.

Thí nghiệm đầu tiên về tải nạp chung được N. Zinder và J. Lederberg tiến hành vào năm 1952 trên vi khuẩn *Salmonella typhimurium*.

Các tác giả này đã sử dụng một ống thủy tinh hình chữ U có ngăn ở giữa bằng màng lọc vi khuẩn, còn phage vẫn chui qua được. Bên trái của ống có chứa nòi vi khuẩn LA2 với kiểu gene $phe^+ trp^+ met^- his^-$ còn bên phải ống mang nòi LA22 với kiểu gene $phe^- trp^- met^+ his^+$.

Vi khuẩn kiểu dại đã xuất hiện ở bên phải ống nhưng không thấy có ở bên trái ống, chứng tỏ vật trung gian chuyển gene (mà sau này tìm ra là P22) đã được LA2 sinh ra

và nó làm xuất hiện các thể tái tổ hợp kiểu đại ở nòi LA22. P22 là một phage ôn hoà có khả năng tiềm tan hoá nòi LA22 và gây tan nòi LA2. Trong quá gây tan một đoạn DNA vật chủ có thể được bọc gói trong vỏ của phage, vì vậy khi tiềm tan hoá các tế bào LA22 chúng có thể sinh ra các thể tái tổ hợp kiểu đại do kết quả của trao đổi chéo giữa các đoạn DNA của LA2 (do phage P22 đưa sang) và nhiễm sắc thể của LA22.



Hình: Tải nạp chung (generalized transduction).

Tải nạp có thể diễn ra ở các vi khuẩn khác như *E. coli* với sự trung gian của phage P1, ở *Bacillus subtilis* với sự tham gia của phage SP10.

Phân tích di truyền bằng tải nạp chung: DNA của phage P22 bằng khoảng 1/100 DNA của *Salmonella typhimurium*, vì vậy phage chỉ có thể chuyển đi một đoạn rất nhỏ nhiễm sắc thể vật chủ. Do đó tải nạp có thể cung cấp thông tin về hai đột biến nằm rất gần nhau và cũng có thể giúp xác định trình tự tương đối của các gene khi tiến hành nghiên cứu đồng thời ba gene. Ví dụ, dùng phage P1 để tải nạp các gene giữa hai nòi *E. coli*. Nòi cho là *leu⁺ thr⁺ azi^r*, nòi nhận là *leu⁻ thr⁻ azi^s*. Kết quả của thí nghiệm được tổng kết ở bảng dưới đây.

Tần số đồng tải nạp các dấu chuẩn trong thí nghiệm dùng phage P1, nòi cho là *leu⁺ thr⁺ azi^r*, và nòi nhận là *leu⁻ thr⁻ azi^s*.

Dấu chuẩn chọn lọc	Dấu chuẩn không chọn lọc
<i>leu⁺</i>	50% <i>azi^r</i>
	2% <i>thr⁺</i>
<i>thr⁺</i>	3% <i>leu⁺</i>
	0% <i>azi^r</i>

Trong thí nghiệm chọn lọc theo *leu*⁺ các kết quả cho thấy các gene *leu* và *azi* nằm gần nhau và cả hai đều nằm xa gene *thr*. Kết quả của thí nghiệm chọn lọc theo *thr*⁺ cho thấy gene *leu* nằm gần gene *thr* hơn so với gene *azi*. Vậy trình tự các gene là *thr-leu-azi*.

Đoạn DNA tải nạp thường mang khoảng 50 gene và tải nạp có thể dùng để lập bản đồ gene. Giả sử một quần thể phage P1 được lấy từ vi khuẩn có kiểu gene *leu*⁺ *gal*⁺ *bio*⁺. Trong số các phage này sẽ có các hạt tải nạp chỉ mang hoặc *leu*⁺ hoặc *gal*⁺. Vì vậy nếu cho chúng xâm nhiễm vi khuẩn có kiểu gene *leu*⁻ *gal*⁻ thì có thể có các thể tải nạp *leu*⁺ *gal*⁻ hoặc *leu*⁻ *gal*⁺. Nếu tỷ lệ phage / vi khuẩn rất nhỏ hơn 1 sẽ không có các vi khuẩn lai *leu*⁺ *gal*⁺. Rất hiếm khi một đoạn DNA vi khuẩn lại mang cả hai gene *leu* và *gal* vì hai gene này khá xa nhau trên nhiễm sắc thể vi khuẩn.

Hai gene *gal* và *bio* chỉ cách nhau $2,3 \times 10^4$ cặp base nên chúng có thể cùng có mặt trên đoạn DNA tải nạp, vì hạt tải nạp có thể bọc gói một đoạn DNA có kích thước $7,7 \times 10^4$ cặp base. Tuy nhiên không phải tất cả hạt tải nạp *gal*⁺ đều cũng phải là *bio*⁺ và ngược lại, vì enzyme nuclease có thể cắt DNA ở điểm giữa hai gene này. Hiện tượng tải nạp cả hai gene đánh dấu được gọi là đồng tải nạp. Tần số đồng tải nạp tỷ lệ nghịch với khoảng cách giữa các gene. Sử dụng môi trường chọn lọc cho cả hai gene, ta sẽ phát hiện được các thể đồng tải nạp. Như vậy, việc nghiên cứu hiện tượng đồng tải nạp có thể giúp ta xây dựng bản đồ di truyền.

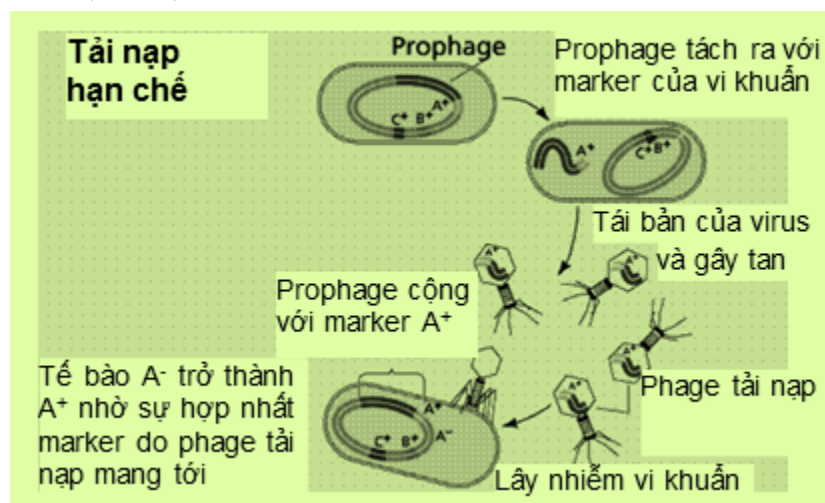
Có thể sử dụng đoạn DNA tải nạp mang ba gene đánh dấu để xác định trật tự gene. Trong trường hợp này gene nằm giữa sẽ có tần số tải nạp thấp nhất vì nó cần bốn trao đổi chéo để hình thành, trong khi hai gene kia chỉ cần có hai.

2.3.3. Tải nạp chuyên biệt (specialized transduction): Phage λ

Tải nạp chuyên biệt hay đặc hiệu là trường hợp phage chỉ truyền đi những gene nhất định từ thể cho sang thể nhận. Ví dụ, trường hợp phage lambda (λ) thực hiện tải nạp giữa các vi khuẩn *E. coli*. Phage λ chứa DNA có chiều dài 50.000 cặp base, bằng khoảng 1/4 DNA của các phage T chẵn. Hầu như toàn bộ DNA của λ có mạch kép và bổ sung nhau.

Khi *E. coli* bị nhiễm λ thì DNA của phage tạo thành vòng tròn, nó có thể sao chép và bắt đầu sinh tan, hoặc có thể xen vào nhiễm sắc thể vật chủ để chuyển sang trạng thái prophage. Việc xen vào này diễn ra giống như đối với nhân tố F: có một điểm dính đặc hiệu cho λ ở trên DNA vật chủ (λ attachment site, viết tắt là *att λ*). Đây là một đoạn tương đồng với đoạn trên DNA phage gọi là *b2*. Sau đó diễn ra trao đổi chéo giữa DNA phage và DNA vi khuẩn tại vị trí nói trên dẫn đến xen bộ gene λ vào giữa các gene *gal*

(galactose) và gene *bio* (biotin) trên nhiễm sắc thể *E. coli*.



Hình: Tải nạp chuyên biệt hay tải nạp hạn chế (restricted transduction).

2.3.4. Lập bản đồ các đột biến bằng tải nạp.

Năm 1956 J. Lederberg đã tiến hành tải nạp gene từ nòi vi khuẩn *E. coli* K12(λ) kiểu đại tiềm tan sang nòi *E. coli* K12 không tiềm tan và có mang nhiều đột biến khuyết dưỡng. Kết quả là chỉ có gene *gal*⁺, tức gene nằm kế sát điểm *att* λ , mới được phage chuyển sang thể nhận, vì vậy gọi là tải nạp đặc hiệu.

Cơ chế tải nạp đặc hiệu. Bước đầu tiên là hình thành vòng bộ gene phage sai (vì ngoài bộ gene λ còn có một đoạn nhỏ nhiễm sắc thể vi khuẩn chứa gene *gal*⁺ nằm trong vòng tròn). Một trao đổi chéo xảy ra tạo thành vòng DNA có chứa phần lớn bộ gene λ (chứ không phải tất cả) và một đoạn ngắn nhiễm sắc thể vi khuẩn chủ mang gene *gal*⁺. DNA mạch vòng (dưới tác dụng của enzyme) chuyển thành mạch thẳng để sau này lắp ráp vào các hạt phage thể hệ con gọi là λ dg (λ defective galactose), chúng có mang gene *gal*⁺ của vi khuẩn.

Phage λ dg có thể truyền gene *gal*⁺ vào tế bào thể nhận không tiềm tan. Khi nhiễm vào tế bào đó, DNA của λ dg có thể xen vào nhiễm sắc thể thể nhận bằng trao đổi chéo diễn ra ở vùng *gal* tương đồng. Ở đây, trao đổi chéo tạo thành DNA mạch thẳng có chứa prophage khiếm khuyết (λ def, defective prophage) nằm giữa hai gene *gal* của vi khuẩn. Vì *gal*⁺ là trội so với *gal*⁻ nên kiểu hình là *gal*⁺.

Tải nạp đặc hiệu có thể sử dụng để nghiên cứu di truyền học. Ví dụ, có thể tiến hành phép thử nghiệm bổ trợ đối với các đột biến nằm trong vùng *gal* để xác định số lượng đơn vị chức năng (cistron). Trên thực tế, người ta đã xác định được vùng *gal* có chứa ba cistron.

II. VI NẤM VÀ VI TẢO

1. Vi nấm.

1.1 Đặc điểm chung của vi nấm.

Vi nấm là các tế bào sinh vật nhân thật, phân bố rất rộng rãi trong đất, nước và cả trong không khí. Vi nấm sống hoại sinh và ký sinh trên các sinh vật khác nên cũng là tác nhân gây bệnh cho người và động vật. Trong số khoảng 100,000 loài nấm đã được biết đến có khoảng 100 loài có khả năng gây bệnh. Một số loài vi nấm làm hư hỏng thực phẩm hoặc tiết ra độc tố. Trong đất vi nấm có vai trò quan trọng trong việc phân hủy các chất hữu cơ thành các chất dinh dưỡng cho thực vật. Cấu trúc nên lớp mùn màu mỡ của đất, tham gia vào sự chuyển hoá các chất vô cơ trong đất. Một số loài nấm có khả năng lên men thực phẩm như men rượu (*Saccharomyces cerevisiae*), một số có khả năng sinh chất kháng sinh (*Penicillium sp*), enzym, các axit hữu cơ và nhiều chất khác.

Vi nấm gồm có nấm men và các nấm sợi không sinh thể quả lớn (còn gọi là mũ nấm), có các đặc điểm chung sau:

- Cơ thể của nấm là một tản, có bộ máy dinh dưỡng chưa phân hóa thành cơ quan riêng biệt. Tản của nấm có thể là đơn bào hoặc đa bào. Đa số có dạng sợi gọi là sợi nấm hay khuẩn ti, có hoặc không có vách ngăn, đường kính trung bình 5-10 μm , có khi 25 μm hoặc 1–2 μm . Có sợi nấm trong suốt không màu, có sợi có màu. Đa số sợi nấm phân nhánh nhiều lần nhưng cũng có sợi nấm không phân nhánh.

- Từ một bào tử hay một đoạn sợi nấm gặp điều kiện thuận lợi sẽ phát triển ra cả ba chiều thành một khối sợi nấm (hệ sợi nấm hay khuẩn ti thể). Trên khuẩn ti thể người ta chia ra làm hai loại khuẩn ti là khuẩn ti dinh dưỡng là khuẩn ti cắm sâu vào môi trường và khuẩn ti khí sinh là khuẩn ti phát triển tự do trong không khí.

- Để thích nghi với các điều kiện sống khác nhau, hệ sợi nấm có thể biến hoá thành nhiều dạng khác nhau như: rễ giả, sợi hút, sợi áp, sợi bò hay thân bò, vòng nấm hay mạng nấm. Từ khuẩn ti khí sinh có thể mọc ra những sợi sinh sản vô tính hoặc hữu tính sau đây: đầu bào tử trần, nang bào tử kín, đảm, túi giá, cụm giá, đĩa giá, bó giá, hạch nấm, thể đệm, quả túi.

- Các vách ngang ở sợi nấm có vách ngăn đều có lỗ thông. Chất nguyên sinh và nhân tế bào có thể đi qua các lỗ thông này. Trừ các tế bào nấm men đơn bào, các sợi nấm chưa có cấu tạo tế bào điển hình như các tế bào vi sinh vật nhân thật. Mỗi tế bào trong sợi nấm chưa có hoạt động trao đổi chất độc lập vì chưa có giới hạn rõ rệt.

- Nấm có rất nhiều đặc điểm chung với các sinh vật có nhân thật, nhất là về cấu tạo của nhân. Nấm khác hẳn về nhiều mặt với các vi sinh vật thuộc nhóm nhân nguyên.

- Nấm có những đặc điểm riêng biệt về mặt hóa học tế bào. Không có cấu trúc thống nhất giữa các nhóm về thành phần của thành tế bào giữa các nhóm nấm. Chất dự trữ của nấm không phải là tinh bột như ở thực vật mà là glycogen như ở động vật. Nấm thành tế bào vững chắc cấu tạo bởi cellulose hoặc chitin. Một số nấm như nấm nhày không có thành tế bào mà chỉ có màng nguyên sinh chất nên chúng thường có hình dạng vô định.

- Nấm không chứa trong tế bào các sắc tố quang hợp vì vậy không có khả năng quang hợp, không có khả năng sống tự dưỡng. Nấm chỉ có đời sống hoại sinh, kí sinh hoặc cộng sinh.

- Sinh sản bằng bào tử vô tính và bào tử hữu tính.

- Nấm không có một chu trình phát triển chung. Có 5 kiểu chu trình phát triển là: (1) chu trình lưỡng bội; (2) chu trình hai thế hệ; (3) chu trình đơn bội; (4) chu trình đơn bội - song nhân và (5) chu trình vô tính.

1.2. Di truyền ở vi nấm.

1.2.1. Tính không dung hợp (incompatibility) ở vi nấm.

Khái niệm tính không dung hợp ở nấm được dùng để chỉ khả năng kết hợp với nhau giữa các dòng nấm trong sinh sản hữu tính. Cho đến nay gần 450 loài nấm đã được nghiên cứu về các kiểu không dung hợp. Sự không dung hợp được xác định về mặt di truyền. Theo kiểu dung hợp thì nấm được phân làm 2 loại:

Đồng tản (Homothallic) là khi có sự kết hợp với nhau giữa các tế bào (hay hệ sợi tơ – mycelium) giống nhau trong sinh sản hữu tính. Ví dụ, tế bào a kết hợp với tế bào a , hay α với α tạo dạng lưỡng bội $2n$ tương ứng aa hay $\alpha\alpha$.

Dị tản (Heterothallic) là kiểu khi có sự lai nhau giữa 2 loại tế bào khác nhau như a với α tạo dạng dị hợp tử lưỡng bội $a\alpha$. Các nấm dị tản có thể chia thành: lưỡng cực (bipolar) và tứ cực (tetrapolar).

Đại diện điển hình của nấm dị tản lưỡng cực (bipolar heterothallic) là nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Ở nấm men, sự hợp bào (cytogamy) và hợp nhân (karyogamy) chỉ xảy ra giữa các tế bào (hay nang bào tử - ascospore) có kiểu bắt cặp (mating type) khác nhau như a và α và các allele khác nhau của locus MAT. Do có sự tham gia của 2 allele nên gọi là lưỡng cực. Nấm mốc vàng bánh mì *Neurospora crassa* cũng thuộc kiểu không dung hợp này. Nấm rơm (*Volvariella volvacea*) và nấm mỡ

(*Agaricus bisporus*) cũng thuộc loại này.

Kiểu dị tản tứ cực (tetrapola heteropolic) đặc trưng cho nhiều loại nấm đảm Basidiomycetes mà đại diện là *Schizophyllum commune*. Nấm bào ngư (*Pleurotus*) và nấm hương (*Lentinus edodes*) thuộc kiểu không dung hợp này. Sự xác định di truyền không dung hợp ở các loài nấm này do 2 gen A và B. Mỗi gen có 2 allele hoặc nhiều hơn, thường là A₁, A₂ và B₁, B₂. Sự kết hợp giữa các dòng đơn bội chỉ tạo dạng hữu thụ có kiểu gene A₁A₂B₁B₂ tức bốn nhân tố khác nhau, do đó gọi là tứ cực.

Sự đa dạng của các chu trình sống và các kiểu không dung hợp ở nấm có ảnh hưởng đến các phương pháp phân tích di truyền. Ở một số nấm sinh sản hữu tính thực hiện trên cơ sở dị hợp bào (heterogamy) như ở *Neurospora crassa*. Ở những loài khác, sự sinh sản hữu tính thực hiện trên cơ sở đồng hợp bào (isogamy). Song song với sinh sản hữu tính còn có chu trình cận hữu tính hoàn toàn hay không hoàn toàn phụ thuộc vào loại nấm. Chu trình sinh sản cận hữu tính là quá trình kết hợp và tái tổ hợp gene diễn ra trong nguyên phân chứ không phải giảm phân, không có sự thụ tinh như sinh sản hữu tính.

1.2.2. Phân tích bộ bốn và lập bản đồ ở vi nấm.

Nấm men có nhiều đặc trưng để trở thành mô hình lý tưởng cho nghiên cứu di truyền ở eukaryote. Nấm men là một eukaryote đơn bào, chu kỳ sống chỉ khoảng 90 phút, có thể thu được nấm men với số lượng lớn khi nuôi trên môi trường đặc. Bộ gen của nấm men chứa khoảng 12 megabase với 6.000 gen phân bố trên 16 nhiễm sắc thể. Nấm men là eukaryote đầu tiên được giải mã bộ gen.

Chu trình sống của nấm men gồm hai giai đoạn có thể chuyển đổi qua lại. Tế bào có thể tồn tại ở cả dạng lưỡng bội và cả dạng đơn bội. Trong cả hai trường hợp, tế bào mẹ tạo chồi giống hệt nó. Những tế bào lưỡng bội này có thể tiếp tục sinh trưởng bằng mọc chồi và có thể trải qua giảm phân tạo 4 bào tử đơn bội (haploid) trong một nang (ascus) được gọi là tetrad. Bào tử đơn bội (haploid spore) của kiểu kết cặp khác nhau (a với α) sẽ qua thụ tinh tạo thể lưỡng bội. Những bào tử của kiểu kết cặp giống nhau sẽ tiếp tục sinh trưởng bằng nảy chồi.

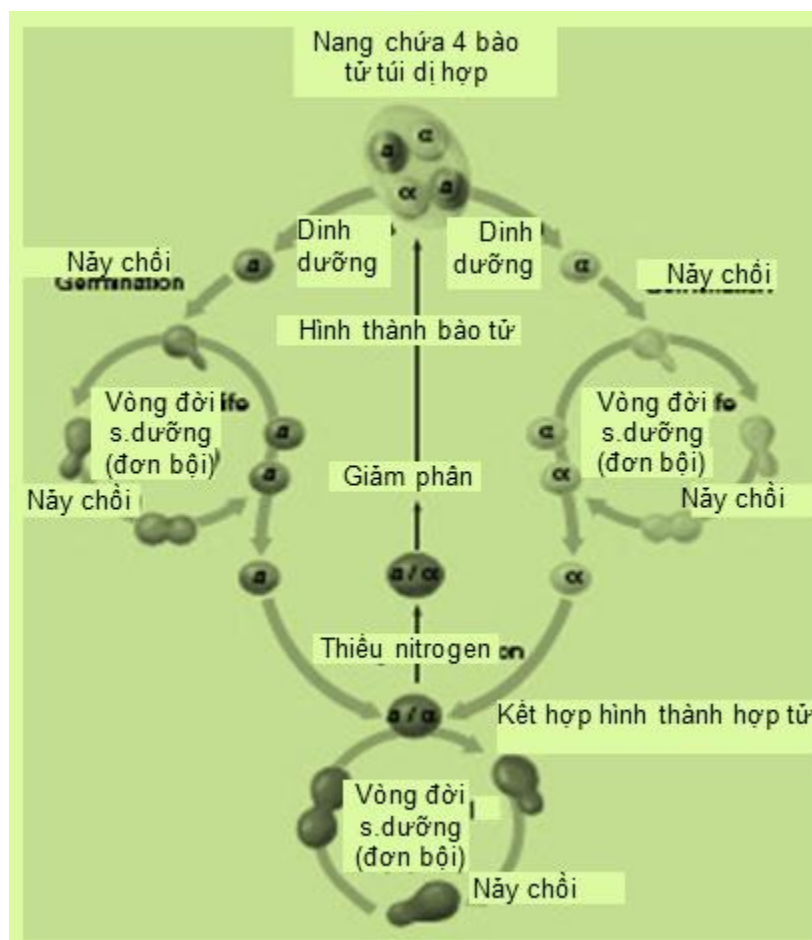
Nấm men được xem là *E. coli* của các tế bào eukaryote, có thể sử dụng nấm men để phân tích đột biến. Tế bào nấm men đơn bội được gây đột biến bằng tia X, sau đó sàng lọc các kiểu hình đột biến trên môi trường nuôi cấy. Đầu tiên nuôi cấy tế bào nấm men trên môi trường giàu dinh dưỡng để tất cả các tế bào phát triển. Đĩa nuôi cấy này sau đó được nhân lên qua đĩa sao chép chứa môi trường chọn lọc hoặc điều kiện sinh trưởng đặc biệt. Chẳng hạn, các đột biến nhạy cảm nhiệt độ có thể sinh trưởng trên các đĩa gốc

nhưng lại không sinh trưởng trên các đĩa sao chép ở nhiệt độ giới hạn. So sánh các khuẩn lạc ở đĩa gốc với đĩa sao chép sẽ phát hiện được những đột biến nhạy cảm với nhiệt độ.

Lớp nang khuẩn (Ascomycetes) có đặc điểm là khi các tế bào lưỡng bội phân chia giảm nhiễm sẽ tạo ra các bào tử nằm trong một vỏ bao được gọi là nang (ascus). Các cơ thể này có các đặc điểm thuận lợi cho phân tích di truyền:

Các vi nấm có thể tồn tại ở dạng đơn bội, nên tất cả các gene có thể biểu hiện trực tiếp thành kiểu hình.

Các vi nấm này có thể tạo ra số lượng cá thể lớn ở thế hệ sau nên có thể phát hiện các sự kiện di truyền hiếm và có thể ước lượng được tần số tái tổ hợp một cách chính xác.

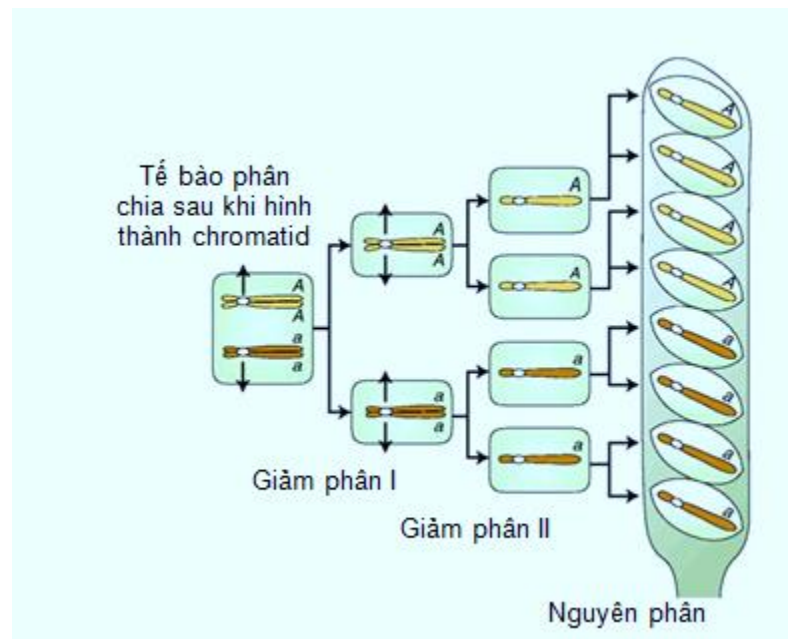


Hình: Chu trình sống của nấm men.

Tế bào nấm men có thể sống ở dạng sinh dưỡng đơn bội hay dị bội. Tín hiệu chuyển từ đơn bội sang dị bội xuất hiện theo dạng kết hợp và tín hiệu chuyển từ dị bội sang đơn bội là sự giảm phân trong quá trình hình thành bào tử.

Trong chu trình sống, chỉ có hợp tử là lưỡng bội, sẽ trải qua giảm phân ngay sau khi được tạo thành, tạo các bào tử đơn bội, bào tử nảy mầm hình thành giai đoạn cây. Ở

một số loài các bộ bốn tạo thành trải qua một lần phân chia nguyên nhiễm nữa để tạo ra từng cặp gồm hai bào tử giống hệt nhau. Ở mốc vàng cam bánh mì (*N. crassa*), các bào tử xếp thẳng hàng trong nang theo một trật tự xác định liên quan trực tiếp đến tiến trình của giảm phân. Hầu hết các loại nấm mốc khác, sản phẩm của giảm phân không sắp xếp theo một trật tự đặc biệt trong nang như mốc bánh mì.



Hình: Mốc vàng cam bánh mì (*Neurospora crassa*) là mô hình nghiên cứu phân li trong giảm phân.

- Lập bản đồ di truyền bằng phân tích bộ bốn.

Đối với trường hợp bộ bốn không theo thứ tự:

Ví dụ: khi lai các tổ hợp của hai gene $AB \times ab$. Sự thụ tinh cho nhân lưỡng bội AB/ab và nó chia giảm nhiễm ngay.

Nếu không có trao đổi chéo xảy ra hoặc trao đổi chéo đôi xảy ra trên cùng hai chromatid thì sẽ có bộ bốn: $2 AB : 2 ab$, gọi là kiểu đôi cha mẹ (parental ditype – PD).

Nếu trao đổi chéo xảy ra trên cả bốn chromatid của mỗi cặp nhiễm sắc thể kép, sẽ có $2AB : 2aB$, gọi là bộ bốn kiểu đôi không cha mẹ (Nonparental ditype – NPD) hay còn gọi là kiểu đôi tái tổ hợp (Recombinational ditype – RD)

Trường hợp tạo ra mỗi nang bốn loại bào tử có kiểu gene khác nhau: $1AB : 1Ab : 1aB : 1ab$ được gọi là kiểu bốn (tetrad type)

Phân tích bộ bốn cho phép xác định hai gene liên kết. Khi hai gene không liên kết

thì tần số bộ bốn kiểu đôi bố mẹ và kiểu đôi không bố mẹ bằng nhau ($PD = NPD$). Ngược lại khi hai gene liên kết, kiểu PD có tần số lớn hơn kiểu NPD. Tần số tương đối của các kiểu bộ bốn khác nhau được sử dụng để xác định bản đồ khoảng cách giữa hai gene liên kết.

1.2.3. Phân tích di truyền trong chu trình cận hữu tính (tái tổ hợp trong nguyên phân).

Nhiều loại nấm có sợi dinh dưỡng kết hợp với nhau, làm cho các nhân đơn bội từ các dòng cùng ở chung trong tế bào chất. Các thể dị nhân (heterocaryon) được tạo nên có thể tồn tại lâu dài như ở *N. crassa*. Sự tạo thành các thể dị nhân được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu sự tương tác giữa các gene, giữa các allele và giữa các gene của nhân với tế bào chất. Trong một số trường hợp, sự so sánh các dị hợp tử và dị nhân cho thấy sự khác nhau trong tương tác giữa các allele, có lẽ do:

- Tỷ lệ số lượng nhân và tương ứng các allele trong thể dị nhân có thể khác nhau.
- Các allele của các gene ở một nhân không được ngăn cách như ở giữa các thể dị nhân.

Các nhân ở thể dị nhân đôi khi hợp nhau tạo nên đoạn lưỡng bội. Hơn nữa trong quá trình chia nguyên phân tiếp theo, nhân lưỡng bội có thể chịu tác động của hai quá trình: đơn bội hoá hoặc tái tổ hợp nguyên phân.

Sự đơn bội hoá (Haploidisation).

Sự đơn bội hoá có thể xảy ra ngẫu nhiên hoặc được gây tạo bởi chất n-fluorophenylalanin.

Nếu như các nhân trong nhiều nguyên phân bị 1 nhiễm sắc thể ($2n - 1$) thì nhân lệch bội vừa xuất hiện trở nên không ổn định và tiếp tục mất các nhiễm sắc thể khác của một bộ đơn bội, cho đến khi trở thành nhân đơn bội (n) ổn định. Trong quá trình đó nhiễm sắc thể bị mất độc lập nhau, các gene của cùng một nhiễm sắc thể có sự liên kết hoàn toàn. Dựa vào đặc điểm này có thể xác lập sự liên kết dựa vào gene đánh dấu trên mỗi nhiễm sắc thể.

Tái tổ hợp trong nguyên phân (Mitotic recombination).

Tái tổ hợp trong nguyên phân là hiện tượng thường gặp ở nhiều sinh vật, khi xảy ra trao đổi chéo giữa các nhiễm sắc thể tương đồng trong nguyên phân.

Trong trường hợp này khoảng cách của gene đánh dấu xa tâm động nhất, sự đồng hợp tử hoá thường xảy ra hơn cả (được coi là 100%) và sự phân bố các gene được tính theo công thức:

$$D = \text{Nab}/\text{Nb} \times 100\%$$

D: khoảng cách của gene đến tâm động

Nb - tổng số các dạng phân li, đồng hợp tử theo b.

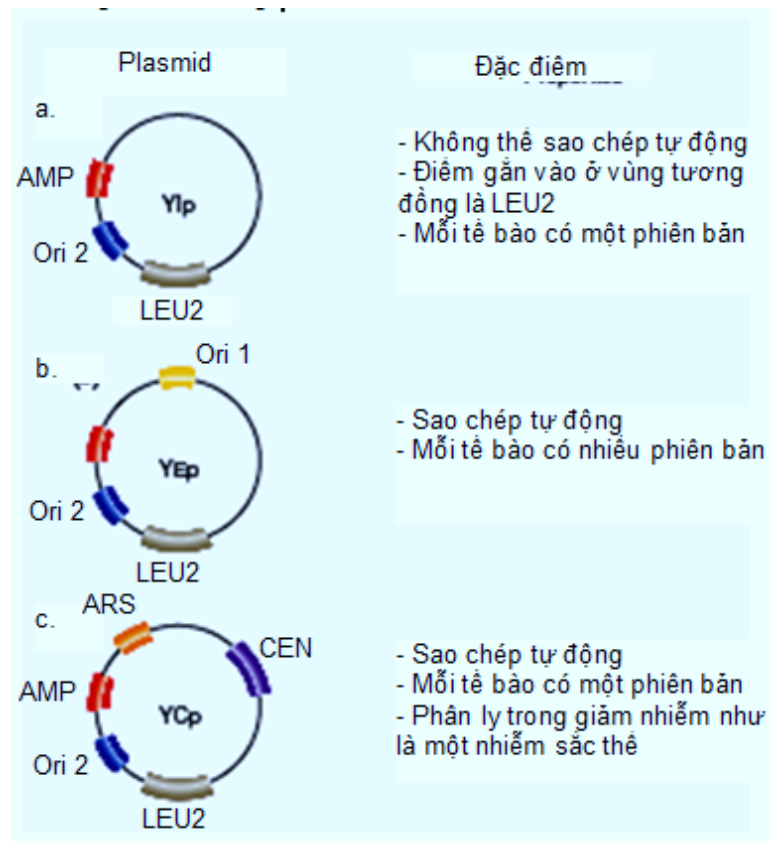
Nab - số các dạng phân li đồng hợp cả a và b, nếu như b là gene đánh dấu xa tâm động nhất.

Bản đồ liên kết gene được xây dựng bằng tái tổ hợp giảm phân và tái tổ hợp nguyên phân (trong chu trình cận hữu tính) có thứ tự gene xếp giống nhau ở *Aspergillus nidulans*.

1.3. Nấm men như là *E. coli* của các tế bào eukaryote.

1.3.1. Các nhiễm sắc thể nấm men nhân tạo (YAC).

Để xây dựng nhiễm sắc thể nhân tạo có chức năng như một phần bộ gene của tế bào, để đảm bảo sự phân chia của nhiễm sắc thể cần có tâm động (centromere). Thứ hai, phần đầu mút của nhiễm sắc thể thẳng dài được giữ nguyên vẹn khi đưa vào tế bào, tránh được sự phân giải của nuclease nhờ đoạn trình tự DNA lặp lại đặc biệt và phức hợp protein bao đầu nhiễm sắc thể là telomere. Cuối cùng, DNA phải sao chép trước khi tế bào phân chia vì vậy để nhiễm sắc thể nhân tạo sao chép phải có ít nhất một điểm xuất phát sao chép.



Hình: Plasmid của nấm men

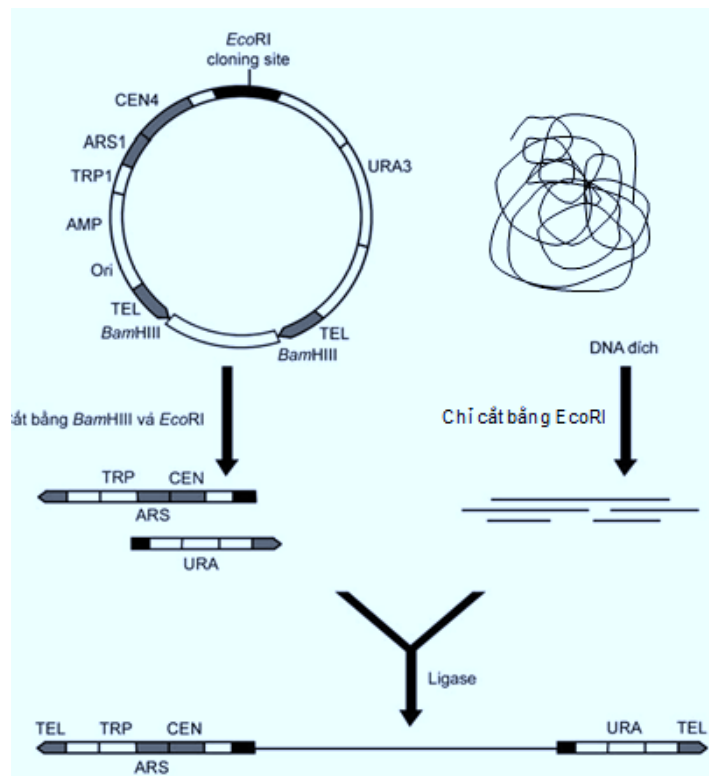
- a. YIp: không chứa ori và không thể sao chép tự động
- b. YEpl: chứa điểm ori 1 và sao chép tự động
- c. YCp: chứa tâm động và phân ly trong quá trình giảm phân

LEU2: gen nấm men, Ori 1: xuất phát sao chép của plasmid nấm men, Ori 2: xuất phát sao chép của vi khuẩn, AMP: gen kháng kháng sinh của vi khuẩn

Vào những năm 1980, các nhà di truyền học phân tử đã đưa ra 3 yếu tố chìa khóa cho một nhiễm sắc thể: centromere, telomere và điểm xuất phát sao chép và sử dụng vật liệu từ tế bào nấm men là plasmid để cấu tạo nhiễm sắc thể nấm men nhân tạo.

Cho đến nay, ở eukaryote chỉ tìm được một loại plasmid duy nhất đó là plasmid vòng tròn 2 µm dài khoảng 6300 cặp base có nhiều trong tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Sự cải tiến plasmid này qua nhiều bước tạo thành nhiễm sắc thể nhân tạo ở nấm men, gọi là YAC (yeast artificial chromosome), có chứa các trình tự nucleotide quan trọng:

ARS (autonomously replicating sequence): trình tự sao chép tương tự ori ở plasmid. CEN (centromere): trình tự của tâm động, đảm bảo sự chia đôi và đi về 2 cực của tế bào như tâm động. 2 TEL (telomere): hai trình tự duy trì hai đầu mút nhiễm sắc thể thẳng mà không bị cắt, vẫn sao chép và phân chia.



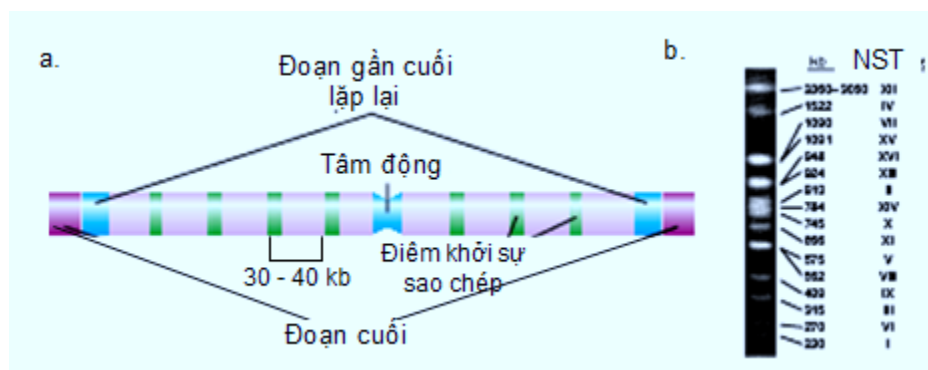
Hình: NST nhân tạo của nấm men

TEL: telomere của nấm men, ARS 1: trình tự sao chép tự động, CEN 4: tâm động của NST, URA 3 và TRP 1: các gen marker của nấm men, Amp: gen kháng Ampicillin của pBR322, ori: điểm xuất phát sao chép của pBR322.

1.3.2. Những hiểu biết mới về tổ chức của các nhiễm sắc thể của nấm men.

Nấm men là cơ thể eukaryote đơn bào, bộ máy di truyền của nó giống với tế bào của cơ thể bậc cao. Các điểm xuất phát sao chép, tâm động và telomere được xác định là một đoạn DNA nhỏ, tự do. Tế bào nấm men đơn bội có 16 nhiễm sắc thể trong nhân, xếp thành dãy có chiều dài khoảng 235.000 đến hơn 2 triệu bp. Tất cả có cấu trúc theo cùng bản đồ chi tiết. Mỗi nhiễm sắc thể chứa một tâm động. Hai đầu nhiễm sắc thể chứa đoạn lặp lại dài theo sau trình tự telomere ngắn. Trên nhiễm sắc thể có chứa nhiều điểm xuất phát sao chép, ở cách nhau khoảng 30-40 kb. Nhiễm sắc thể nấm men cũng tạo thành các đơn vị là các nucleosome chứa lõi histon gồm H₂A, H₂B, H₃ và H₄.

Điện di trên gel với trường dao động (pulse field gel electrophoresis), tách ra những nhiễm sắc thể nguyên vẹn và lập được karyotype phân tử của nhiễm sắc thể nấm men. Dựa vào karyotype có thể quan sát được các biến đổi chủ yếu trong cấu trúc nhiễm sắc thể. Qua karyotype cho thấy, nhiễm sắc thể số I dài khoảng 235 kb là nhiễm sắc thể nấm men nhỏ nhất. Nhiễm sắc thể số XII lớn nhất với kích thước khoảng 2060 – 3060 kb, sự khác nhau về kích thước của nhiễm sắc thể này do số lượng gen của rRNA lặp lại với số lượng khác nhau, thường dao động khoảng 100 – 200 bản sao ở những chủng khác nhau. Trình tự DNA của nấm men được giải mã 100% vào tháng 4/1996.



Hình: Nhiễm sắc thể nấm men

a. Các thành phần của NST. Mỗi sợi chứa 1 tâm động, nhiều điểm khởi sự sao chép, các đoạn gần cuối lặp lại và đoạn cuối của chuỗi DNA.

b. Hệ gen của NST nấm men trên hình ảnh điện di.

Bản đồ di truyền của nấm men được xác định bằng phân tích bộ bốn. Một đơn vị chức năng của tần số tái tổ hợp trong giảm phân khoảng 4400 cM, trung bình khoảng 3

kb/cM. Khoảng cách di truyền tỷ lệ với khoảng cách vật lý. Bản đồ di truyền của nấm men dài khác thường so với bản đồ di truyền của các nấm khác. Ví dụ: *Neurospora crassa* có cùng hàm lượng DNA như nấm men nhưng bản đồ di truyền chỉ dài khoảng 15% bản đồ di truyền của nấm men. Số lượng gene mã hoá protein của nấm men ít hơn khoảng 6 – 10 lần số lượng gene của người. Từ khi chương trình giải mã genome nấm men hoàn thành vào năm 1996, không thể nói chính xác có bao nhiêu gene mã hoá cho protein ở nấm men. Số lượng gene mã hoá protein của nấm men khoảng 6.000 – 6.500 gene ở nấm men.

1.3.3. Những hiểu biết về tái bản và phiên mã của bộ gen nấm men.

Nấm men có thể hoàn thành một chu trình sao chép và phân chia khoảng 1,4 giờ. Xuất phát điểm cho sao chép DNA của nấm men gồm nhiều điểm giống với oriC của *E. coli*. Đó là vùng giàu AT được tách ra khi có một protein khởi động gắn vào điểm kè bên. Các điểm xuất phát sao chép dài hàng ngàn đến hàng chục ngàn nucleotide. Khác với prokaryote, mỗi nhiễm sắc thể eukaryote có nhiều điểm xuất phát sao chép để quá trình sao chép genome của eukaryote có kích thước lớn hơn nhiều xảy ra một cách nhanh chóng. Có khoảng 400 điểm xuất phát sao chép phân bố trên toàn bộ 16 nhiễm sắc thể của nấm men. Sự sao chép xảy ra trực tiếp trên nhiều điểm xuất phát sao chép. Sợi mạch kép được tạo thành ở mỗi điểm xuất phát sao chép kéo dài và nối với sợi kép được tạo thành ở một điểm khác. Khi sao chép trên 2 mạch đơn hoàn thành sẽ tạo ra 2 phân tử DNA con giống hệt nhau.

Sự tổng hợp DNA chỉ xảy ra ở một giai đoạn trong chu trình tế bào, đó là pha S. Ở nấm men có 3 protein cần cho lắp ráp của replisome. Đó là phức hợp DNA polymerase phối hợp hoạt động ở chẽ ba sao chép. Phức hợp nhận biết điểm xuất phát (Origin recognition complex – ORC) sẽ gắn vào trình tự xuất phát của nấm men như DnaA protein của *E. coli*. Những phức tương tự được tìm thấy ở tất cả các eukaryote. Sự có mặt của ORC làm bổ sung thêm 2 protein khác, Cdc6 và Cdt. Cả 2 protein này và ORC làm kích hoạt helicase và những thành phần khác của replisome. Sự gắn vào của helicase được xem là sự “xác nhận” (license) cho điểm xuất phát, giúp lắp ráp replisome và bắt đầu tổng hợp DNA.

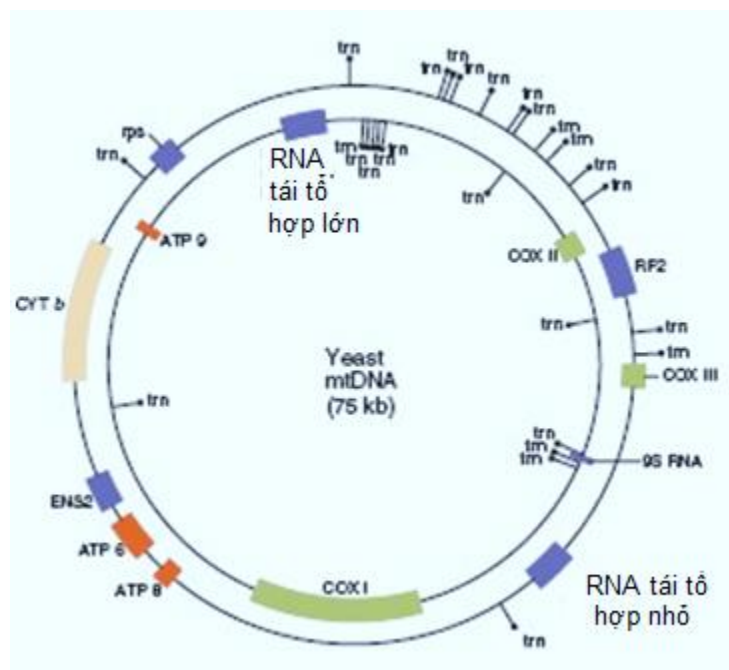
Trong số các gene mã hoá protein, intron chỉ có khoảng 4-5% tất cả các gene của nấm men (276 gene chứa một intron đơn và 7 gene chứa 2 intron riêng rẽ), kích thước trung bình của intron khoảng 2000 nucleotide. Tần số thấp của intron ở nấm men có lẽ liên quan với tần số thấp của các gene giả (pseudogene) giống như intron, phổ biến ở

eukaryote bậc cao. Gene giả chứa trình tự mã hoá, nhưng vì thiếu intron và promoter phiên mã nên trình tự mã hoá không được biểu hiện.

Gene mã hoá protein không chỉ là những dạng gene chức năng. Genome của nấm men chứa số lớn gen tạo ra RNA không mã hoá, bao gồm các gene lặp lại mã hoá cho rRNA, 274 gene của tRNA, trong đó có 80 gene chứa nhóm intron đặc biệt, 71 RNA nhân nhỏ (snRNA) tham gia chức năng chế biến rRNA, 5 snRNA tham gia chế biến intron, một vài RNA chưa biết chức năng và 3 RNA như là các tiểu đơn vị chức năng của enzyme Rnase, endoribonuclease và telomere.

1.3.4. Những hiểu biết về ADN ty thể của nấm men.

DNA ty thể (mitochondrial DNA – mtDNA) nấm men dài 4 lần hơn DNA ty thể của người và những động vật khác. Hai yếu tố trên DNA ty thể nấm men được cho là có kích thước lớn hơn so với các đối tượng khác: trình tự giữa các gene (intergenic) và intron. Trình tự dài, giàu A-T của vùng đệm “spacer” tách biệt với các gene của mtDNA. Hầu hết DNA của spacer đều được dịch mã và một số trong chúng được duy trì trên mRNA như đầu 5’ và 3’ kéo dài, không dịch mã. Yếu tố thứ hai là intron, chiếm khoảng 25% genome ty thể nấm men và nó được xem là tạo ra sự khác nhau về kích thước giữa mt DNA của nấm men và người.



Hình: DNA ty thể nấm men

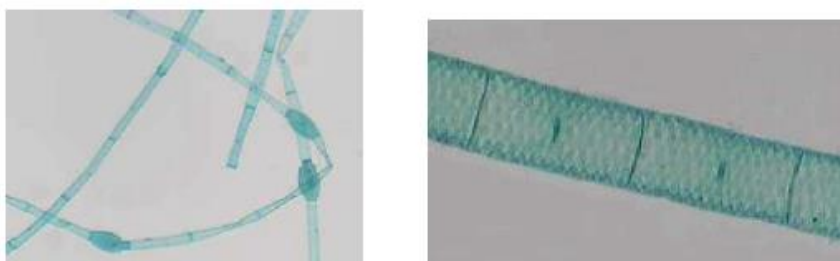
2. Vi tảo.

2.1. Đặc điểm của vi tảo.

Tảo là các vi sinh vật nhân thật có khả năng quang hợp bao gồm các loài tảo nước ngọt và tảo nước mặn. Tảo là nguồn thực phẩm quan trọng. Chlorophyll *a* có ở tất cả các loài tảo cùng với những sắc tố khác. Các sắc tố này qui định màu sắc của loài tảo đó.

Tảo lục

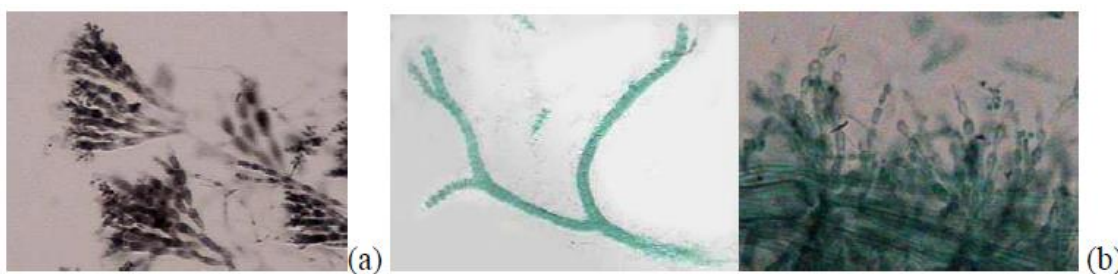
Tảo lục là tảo đơn bào do có chứa diệp lục tố (hình dưới). Một số tảo lục đa bào có kích thước lớn. Chúng sống trong biển và trong nước ngọt. Một số sống trong đất ẩm, sống cộng sinh với nguyên sinh động vật, động vật không xương sống hoặc với nấm.



Hình: *Oedogonium macrandous* (100x)

Tảo hồng

Tảo hồng là tảo đa bào bên cạnh diệp lục tố còn có sắc tố đỏ phycoerythrin. Hầu hết các loài tảo hồng phân bố ở môi trường biển ấm. Một số ở nước ngọt và ở trong đất. Có một vài loài tảo hồng sống ở độ sâu 260m dưới đáy biển.



Hình: (a) Tảo hồng *Nemalion* (250X); (b) Tảo hồng *Batrachospermum*

Tảo nâu

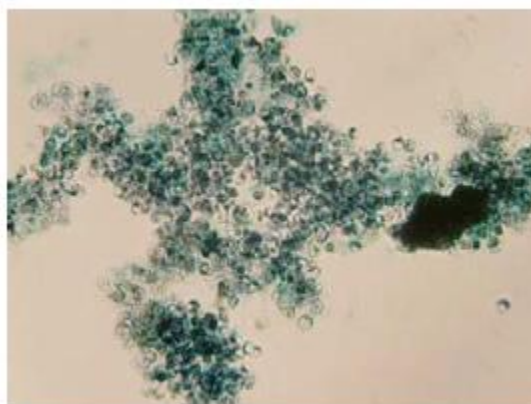
Tảo nâu là tảo đa bào, ngoài diệp lục tố còn có thêm sắc tố nâu fucoxanthin. Fucoxanthin che án màu của diệp lục tố có trong chúng. Chúng thường phân bố ở ven bờ biển ôn đới. Đa số các loài rong biển thuộc ngành tảo nâu.



Hình: Tảo nâu *Pylaiella* (1000X)

Tảo vàng nâu

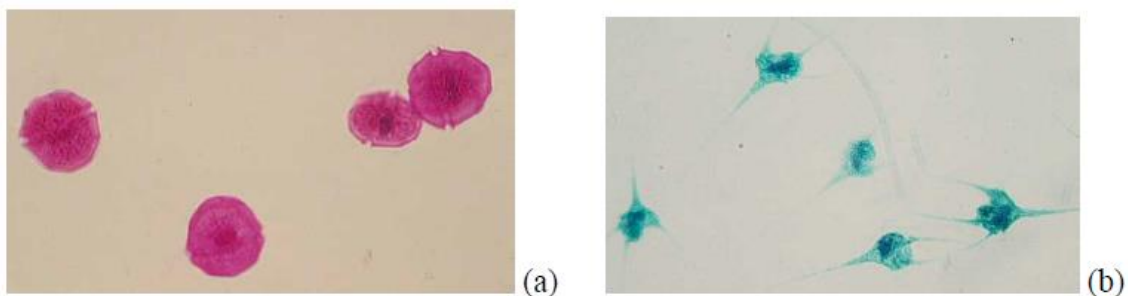
Tảo vàng nâu là tảo nước ngọt có màu vàng nâu do có sắc tố vàng, cam, nâu, carotenoid và xanthophyl. Hầu hết tảo vàng nâu có hai roi. Thường có mặt trong thành phần phiêu sinh vật nước ngọt. Chúng có thể tồn tại rất lâu trong các hồ nước lạnh hoặc khô hạn nhờ vào sự hình thành bào xác.



Hình: Tảo vàng nâu *Synura* 1100X

Tảo hai roi (Dinoflagellata)

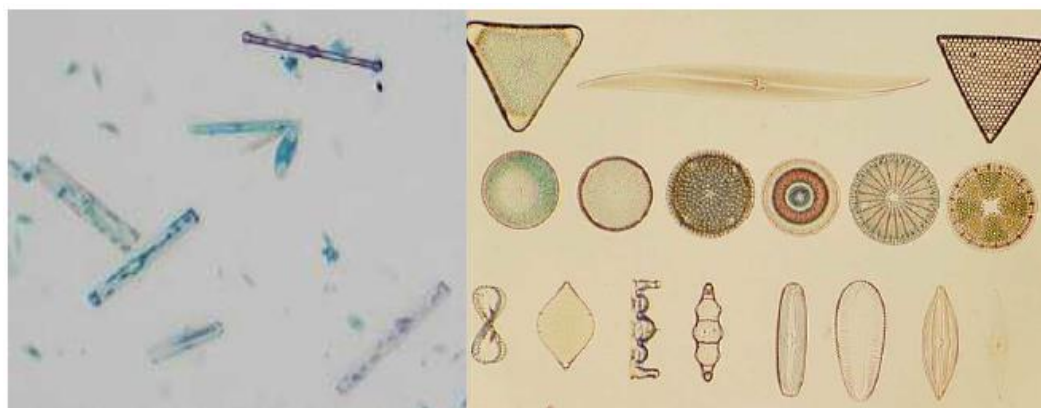
Là nhóm tảo di chuyển bằng cách xoay tròn cơ thể bằng 2 roi. Hai roi của chúng thường mọc vuông góc với nhau. Hầu hết các dinoflagellata có cấu tạo đơn bào. Một số sống thành tập đoàn. Chúng là thành phần của phiêu sinh vật có hình thức dinh dưỡng dị dưỡng và có khả năng quang hợp. Hiện tượng triều đỏ xảy ra là do khi mật độ tảo tăng quá cao trong một thời gian ngắn. Các loài sinh vật có vỏ sử dụng dinoflagellates làm thức ăn sẽ tích tụ độc tố và sẽ gây ngộ độc cho các sinh vật sử dụng chúng làm thức ăn kể cả con người.



Hình: Tảo hai roi (a) *Peridinium*; (b) *Ceratium*

Tảo silic (Diatom)

Diatom là các tảo đơn bào thuộc ngành tảo silic. Vách tế bào của chứa silic nên trông giống thủy tinh. Trên tế bào diatom có rất nhiều lỗ nhỏ giúp cho việc di chuyển và trao đổi khí của chúng. Diatom phân bố ở nước ngọt và nước biển.



Hình: Một số diatom (250x)

2.2. Di truyền ở một số vi tảo thông dụng.

Loài vi tảo được sử dụng sớm nhất và nghiên cứu di truyền chi tiết hơn cả là *Chlamydomonas reinhardtii*. Ưu thế của đối tượng này là có thể tiến hành lai và phân tích bộ bốn không xếp theo thứ tự.

Ở các loài này, các tế bào đơn bội có thể sinh sản vô tính một thời gian dài. Các tế bào đơn bội gồm 2 loại: mt (+) và mt (-) (mating type), tế bào đơn bội của mỗi loại không kết hợp với nhau. Sự kết hợp hai tế bào khác kiểu bắt cặp mt (+) với mt (-) tạo ra hợp tử. Hợp tử qua giảm phân cho tỷ lệ phân ly của một gen là 2 tế bào mt (+) : 2 tế bào mt (-).

III. VIRUT

1. Một số đặc tính của virut.

Virut thường được gọi là hạt virut vì chúng chưa có cấu tạo tế bào. Virut chứa những yếu tố di truyền là ADN hay ARN nằm trong một vỏ bọc protein và có thể có các hợp chất khác bao quanh bên ngoài vỏ. Ở trạng thái này virut còn được gọi là virion.

Trong tế bào, virion được nhân lên dựa vào sự hiệp trợ của hệ thống trao đổi chất của vật chủ mà sao chép axit nucleic, tổng hợp các thành phần như protein, lipoprotein, photpholipit. Khi hệ gen của virus có mặt trong tế bào chủ và được nhân lên gọi là quá trình nhiễm virus.

Trong điều kiện ngoại bào ngoài chúng có thể tồn tại lâu dài ở trạng thái đại phân tử hóa học không sống và có hoạt tính truyền nhiễm.

Theo nhà virus học A. Lwoff (1966) thì virus khác biệt với các sinh vật khác chủ yếu ở chỗ chúng chỉ có một loại axit nucleic, hoặc là ADN hoặc là ARN, có thể tiến hành tái tạo axit nucleic nhưng không thể sinh trưởng, không phân cắt thành hai phần đều nhau, không có các enzym tham gia vào trao đổi năng lượng, không có riboxom của mình.

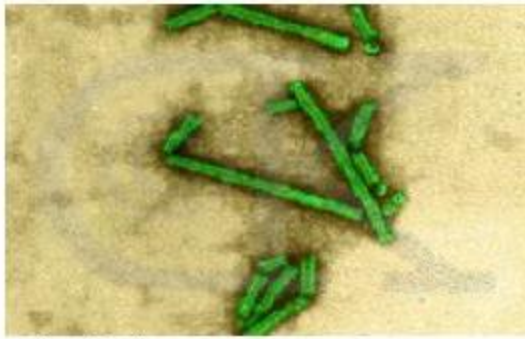
Vật chủ của virus bao gồm động vật, thực vật và vi khuẩn. Vì vậy virus cũng được phân loại theo vật chủ của tế bào mà chúng ký sinh là virus động vật, virus thực vật và virus vi khuẩn. Nhiều virus động vật có thể nuôi cấy được trong mô hoặc tế bào. Nuôi cấy tế bào là rất cần thiết cho việc nghiên cứu virus. Đối với virus vi khuẩn người ta dùng các vi khuẩn chuẩn thuần khiết để nuôi cấy chúng trên môi trường lỏng hoặc môi trường thạch.

Khi tế bào bị nhiễm virus có thể quan sát thấy dưới kính hiển vi quang học một đám lớn các hạt virus tập hợp lại với nhau tạo ra các thể bao hàm. Các vết làm tan vi khuẩn trên bản thạch đĩa gọi là vết thực khuẩn mắt thường cũng nhìn thấy được. Đó cũng là một tập hợp rất lớn các virus. Thể bao hàm có hình thái và kích thước không giống nhau. Đa số nằm trong tế bào chất của vật chủ nhưng cũng có một số ít nằm trong nhân tế bào. Có lúc thể bao hàm vừa tồn tại trong tế bào chất vừa tồn tại trong nhân.

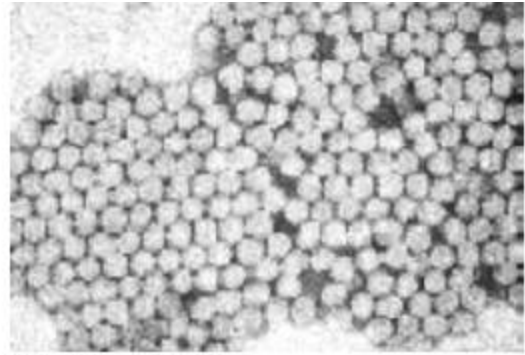
2. Hình thái và cấu tạo của virus.

2.1. Kích thước và hình dạng của virus.

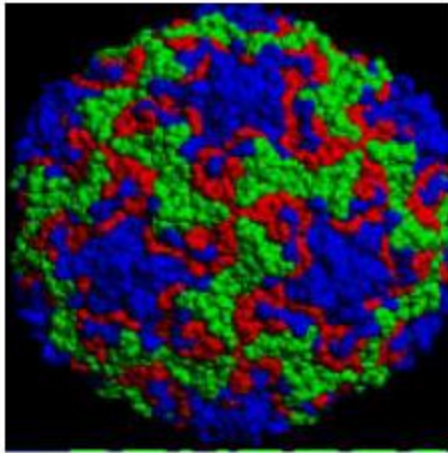
Virus có kích thước rất nhỏ dao động từ 5-300nm ($1\text{nm}=10^{-9}\text{ m}$), nên không thể quan sát thấy virus qua kính hiển vi quang học. Muốn quan sát hình thái và đo kích thước virus phải sử dụng kính hiển vi điện tử và các kỹ thuật phụ trợ. Virus có bốn hình dạng chủ yếu là hình khối, hình khối cầu, hình que và hình tinh trùng (hay hình nòng nọc) (hình 49).



Virut hình que



Virut hình khối



Virut hình cầu



Thực khuẩn hình nòng nọc

Hình 49. Các hình dạng chủ yếu của virut

2.2. Cấu tạo của virut.

Thành phần chủ yếu của virut bao gồm axit nucleic được bao bọc bởi vỏ protein và ở một số virut còn có một số phân tử khác.

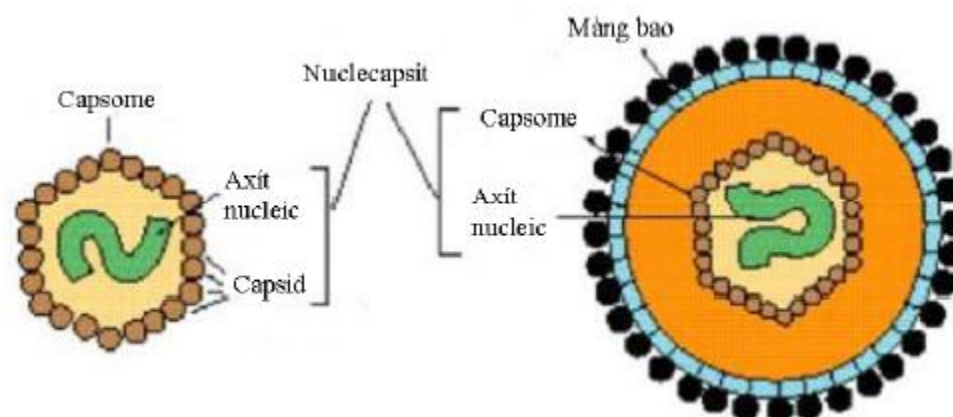
2.2.1 Axit nucleic (lõi)

Axit nucleic là cơ sở lưu trữ, tái tạo mọi thông tin di truyền, vì vậy là thành phần quan trọng của mọi virut. Virut có nhiều loại hình axit nucleic và là cơ sở phân tử để phân loại virut. Các loại hình axit nucleic của virut được phân biệt dựa trên mấy điểm chủ yếu sau đây: (i) AND hay ARN, (ii) Chuỗi đơn hay chuỗi xoắn kép, (iii) Dạng sợi, dạng vòng kín hay dạng vòng hở và (iv) Hệ gen là một, hai hay nhiều thành phần.

2.2.2 Vỏ protein (capsit)

Capsit mang các thành phần kháng nguyên và có tác dụng bảo vệ lõi axit nucleic. Capsit cấu tạo bởi các đơn vị phụ gọi là hạt capsit hay capsome. Các capsome có thể do một chuỗi polypeptit tạo thành hoặc có thể tạo thành từ các đơn phân monomer protein đồng nhất, mà mỗi đơn phân này cấu tạo từ nhiều chuỗi polypeptit. Lõi và vỏ virut hợp

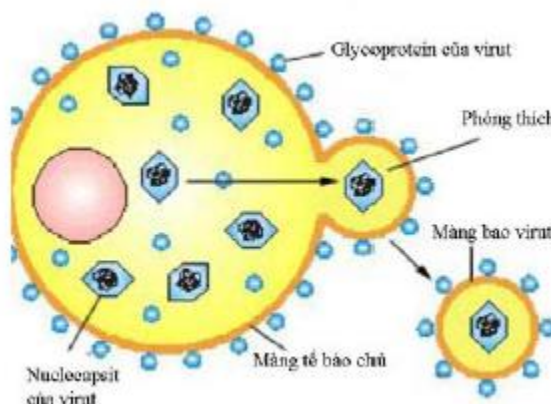
lại tạo thành một nucleocapsit, đó là kết cấu cơ bản của mọi virus.



Hình: So sánh virus có màng bao và virus không có màng bao

2.2.3 Màng bao

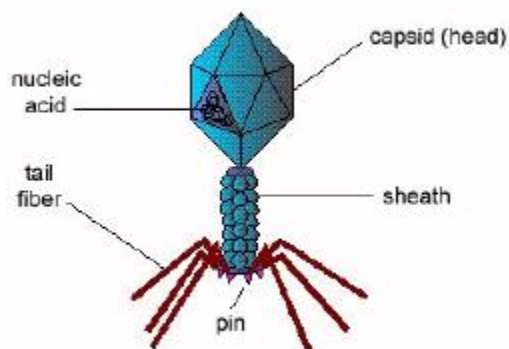
Một số virus bên ngoài capsit còn có một màng bao (hình trên) cấu tạo bởi photpholipit hay glycoprotein. Màng bao thường là màng nhân, màng tế bào chất hoặc là màng của các không bào của vật chủ bị virus cải tạo thành và mang tính kháng nguyên đặc trưng cho virus (hình dưới).



Hình: Sự hình thành màng bao của virus

2.3. Cấu tạo của thể thực khuẩn

Thể thực khuẩn là virus ở vi khuẩn. Cấu trúc của thể thực khuẩn thường phức tạp hơn cấu trúc của virus. Thể thực khuẩn thường có cấu trúc hình nòng nọc hay hình tinh trùng ví dụ như thể thực khuẩn T4 cấu tạo bởi ba bộ phận: đầu, cổ và đuôi. Phần đầu bao gồm capsit và axit nucleic như ở virus không có màng bao. Đầu nối với đuôi qua cổ. Đuôi gồm có bao đuôi, ống đuôi, đĩa gốc, 6 mấu ghim và 6 sợi đuôi. Bao đuôi và ống đuôi cấu tạo bởi các capsome. Đĩa gốc cũng tương tự như đĩa cổ, trên đó mọc ra 6 sợi đuôi và 6 mấu ghim. Sợi đuôi cấu tạo bởi các phân tử protein (hình).



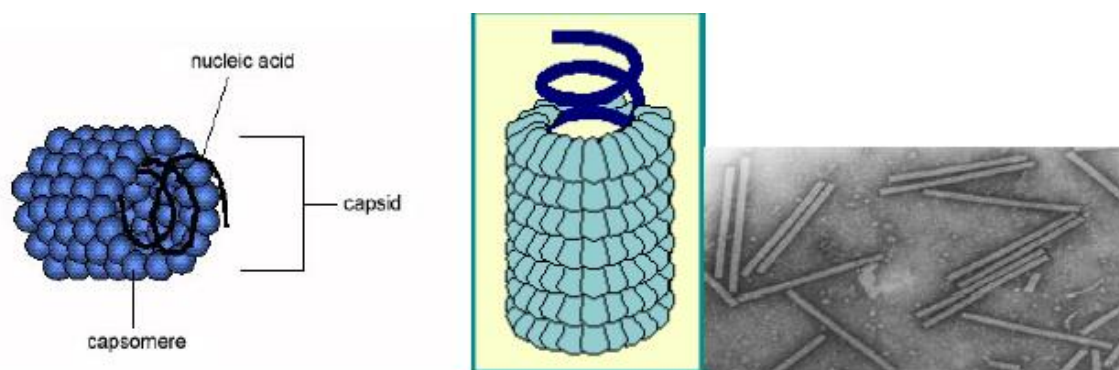
Hình: Cấu tạo thể thực khuẩn

2.4. Các dạng cấu trúc đối xứng của virut

Nucleocapsit của virut luôn có cấu trúc đối xứng do sự sắp xếp của các protein cấu trúc. Virut thường có cấu trúc đối xứng xoắn, đối xứng khối và là đối xứng phức hợp. Mỗi loại đối xứng lại phân thành loại có màng bao và loại không có màng bao.

2.4.1 Virut đối xứng xoắn

Điển hình như virut khảm thuốc lá (TMV) có hình que thẳng, dài 300nm. TMV có vỏ protein là capsit chứa 2130 capsome. Mỗi capsome cấu tạo bởi 158 gốc axit amin, khối lượng phân tử là 17500. Các capsome có đối xứng xoắn bao quanh và bám vào sợi ARN xoắn tròn ốc.



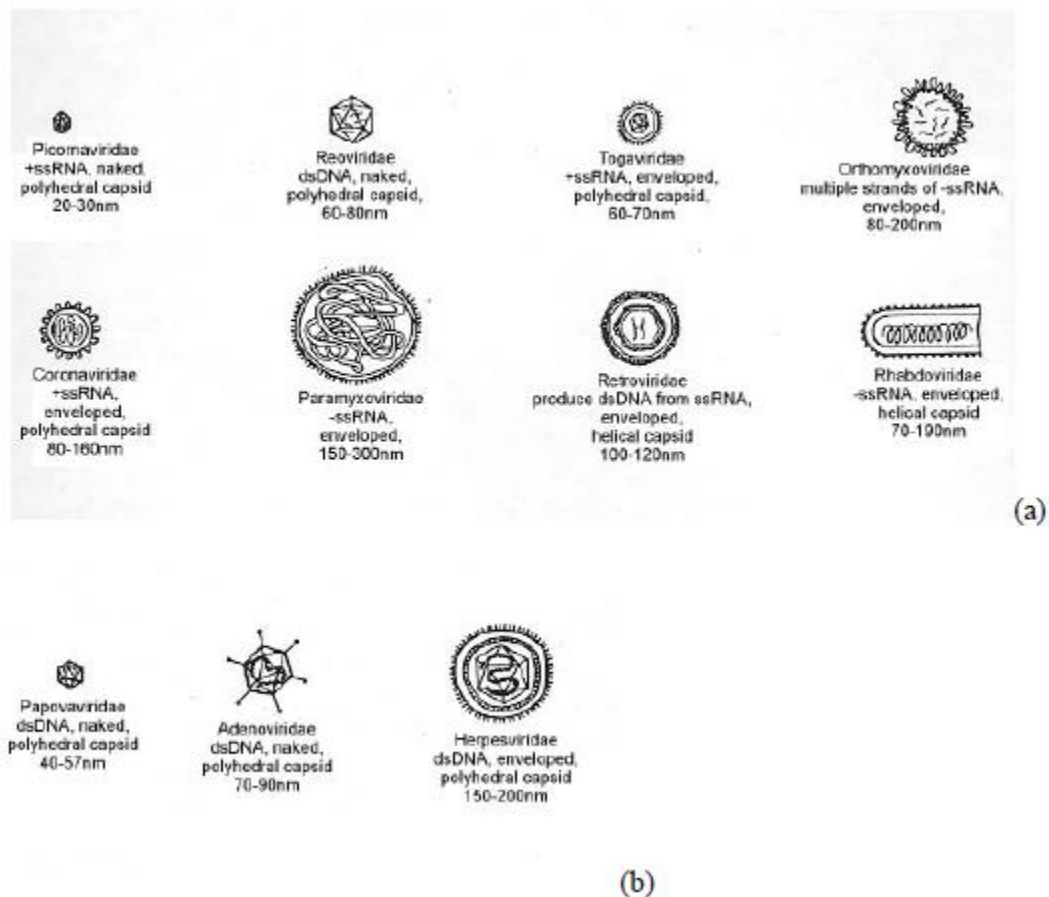
Hình: (a). Virut đối xứng xoắn (b) Virut khảm thuốc lá

TMV chứa 95% protein và 5% chuỗi đơn ARN. Có cả thảy 130 vòng xoắn. Mỗi vòng xoắn dài 2,3nm, trên đó có trung bình 16,33 capsome. Sợi đơn ARN có chứa 6390 đơn vị nucleotic, khối lượng phân tử là 2.10^6 . Cứ 3 nucleotic thì kết hợp với 1 protein, mỗi vòng có 49 nucleotic.

2.4.2 Virut đối xứng khối

Điển hình như Adenovirus có hình cầu cấu trúc 20 mặt, gần giống hình cầu, không có màng bao, đường kính khoảng 70-80nm. Adenovirus có tất cả 12 góc, 20 mặt, 30 cạnh. Capsit cấu tạo bởi 252 capsome, trong đó có 12 thể ngũ lân có khối lượng phân tử 70.000, phân bố ở 12 góc và 240 thể lục lân có khối lượng phân tử 120.000, phân bố đều ở trên 20 mặt. Thể ngũ lân cấu tạo bởi 5 monomer protein, còn có thể lục lân cấu tạo bởi 6 protomer. Ở mỗi thể ngũ lân có một sợi protein mọc thẳng ra đầu có hình cầu (như hình đỉnh ghim), những sợi này được gọi là sợi ADN xoắn kép. Tất cả mọi Adenovirus đều có 6.500 đôi nucleotic. Ngoài đối xứng 20 mặt một số virus còn có đối xứng 4 mặt và đối xứng 8 mặt.

Virus đối xứng xoắn và virus đối xứng khối có khi có màng bao. Trên thực tế kích thước hình thái của virus rất đa dạng, tùy theo loại axit nucleic của virus và vật chủ của virus.



Hình: (a) Hình thái virus ARN ở động vật; (b) Hình thái virus ADN ở động vật

2.4.3 Virus đối xứng phức hợp

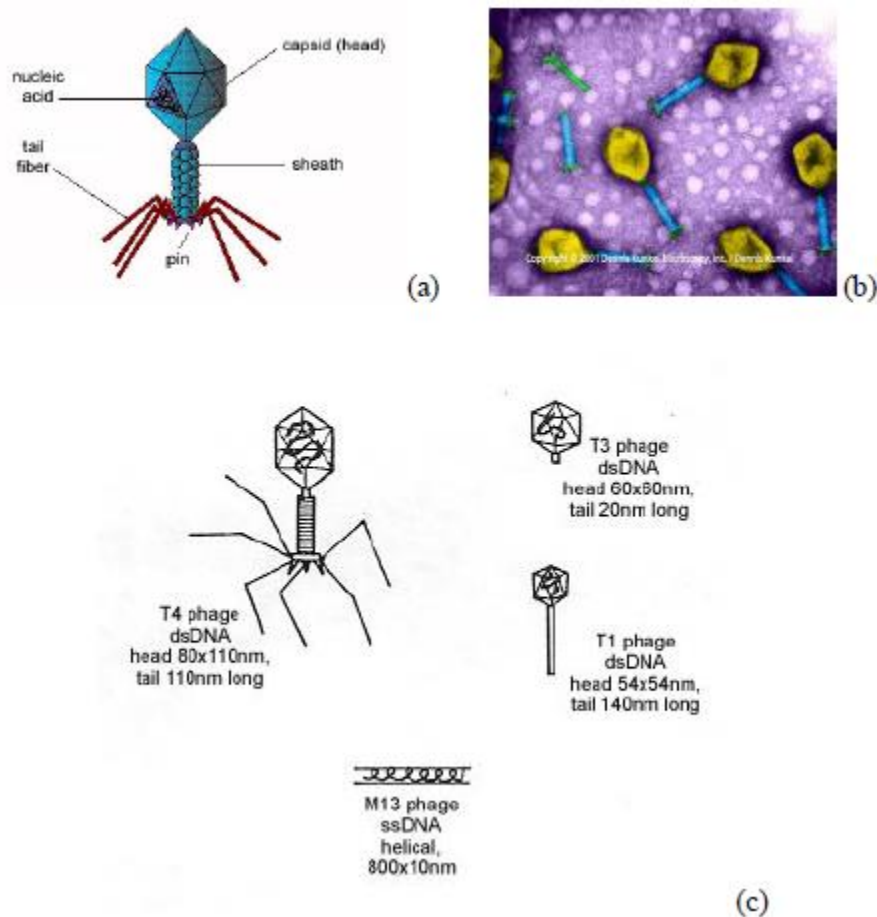
Điển hình như thể thực khuẩn T4 của vi khuẩn *E. coli*. Thể thực khuẩn T4 cấu tạo bởi ba bộ phận: đầu, cổ và đuôi. Đầu có cấu trúc 20 mặt còn đuôi lại có cấu trúc đối xứng xoắn.

Chính vì vậy mà người ta gọi là đối xứng phức hợp.

1. Phần đầu dài 95nm, rộng 65nm, dưới kính hiển vi điện tử có thể thấy rõ 20 mặt. Capsit có cấu tạo bởi 8 loại protein, lượng chứa protein chiếm tới 76-81% trong thể thực khuẩn. Có cả thấy 212 capsome, mỗi capsome có đường kính là 8nm. Bên trong đầu có sợi ADN xoắn kép.

2. Phần cổ nối phần đầu với phần đuôi. Đó là một đĩa hình lục giác tạo thành, đường kính 37,5nm, có 6 tua cổ (cánh tu) mọc ra từ cổ.

3. Phần đuôi gồm có bao đuôi, ống đuôi, đĩa gốc, 6 mấu ghim và 6 sợi đuôi:



Hình: (a) Cấu tạo thể thực khuẩn, (b) Thực khuẩn T4 của vi khuẩn *E.coli*, (c) Các dạng hình thái của thể thực khuẩn

- Bao đuôi dài 95nm, có 24 vòng xoắn cấu tạo bởi 144 capsome (mỗi capsome có khối lượng phân tử là 55.000) cấu tạo nên. Ống đuôi dài 95nm, đường kính 8nm, ở giữa

có lỗ thủng đường kính 2,5-3,5nm. Đây là con đường để dẫn ADN trong đầu của thể thực khuẩn xâm nhiễm vào tế bào vật chủ.

- Ống đuôi cũng cấu tạo bởi 24 vòng xoắn, tương ứng với 24 vòng xoắn trên bao đuôi.

- Đĩa gốc cũng tương tự như đĩa cổ, đó là một đĩa hình lục giác, rỗng ở giữa. Đường kính đĩa gốc là 30,5nm, trên đó mọc ra 6 sợi đuôi và 6 mấu ghim.

- Mấu ghim dài 20 nm có chức năng hấp phụ. Sợi đuôi dài 140nm có thể gấp lại ở chính giữa, đường kính 2nm.

- Sợi đuôi cấu tạo bởi 2 loại phân tử protein khá lớn và 4 loại phân tử protein khá nhỏ. Nó có tác dụng hấp thụ chuyên hóa vào vùng mẫn cảm của bề mặt tế bào vật chủ. Sau khi sợi đuôi hấp thụ đĩa gốc sẽ bị kích thích, dẫn đến việc co rút bao đuôi và làm cho ống đuôi đâm vào tế bào chủ.

3. Di truyền học Virus.

3.1. Đặc tính của các virus.

3.1.1. Tính đa dạng về cấu trúc và thành phần di truyền.

Virus có bộ gene rất đa dạng. Bộ máy di truyền của virus có thể là DNA mạch kép (double strand - dsDNA), DNA mạch đơn (single strand - ssDNA), RNA mạch kép (dsRNA) hay RNA mạch đơn (ssRNA). Bộ gene RNA của virus là một phân tử hoặc một đoạn, sợi đơn phân cực mạch (+) hoặc mạch (-), có thể ở dạng vòng tròn hay dạng thẳng. Virus nhỏ nhất có khoảng 4 gene, virus lớn có khoảng vài trăm gene. Bộ gene của virus cấu trúc đa dạng nhưng đều đảm bảo yêu cầu chung là phải sao chép được trong tế bào chủ tạo ra cả genome cho lắp ráp virion thế hệ sau và các mRNA phải tổng hợp protein của virus.

3.1.2. Tính đặc thù về vật chủ (Host specificity).

Mỗi kiểu virus có thể nhiễm và kí sinh chỉ ở một biên độ giới hạn của tế bào được gọi là biên độ chủ (host range). Các virus nhận biết tế bào chủ theo nguyên tắc “ổ khóa và chìa khóa” các protein bên ngoài của virion lắp vừa các điểm nhận trên bề mặt tế bào. Một số virus có biên độ chủ rộng đủ để xâm nhập vào vài loài. Chẳng hạn, các virus bệnh dại có thể nhiễm nhiều loài có vú gồm gặm nhấm, chó và người. Biên độ có thể rất hẹp như nhiều phage chỉ nhiễm vi khuẩn *E. coli*.

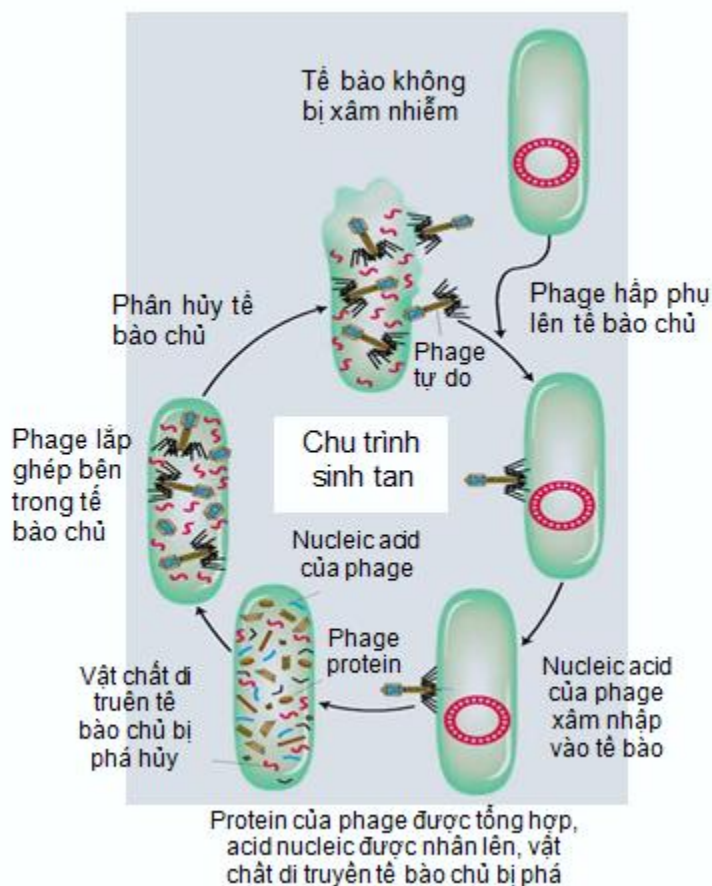
3.2. Di truyền học thể thực khuẩn (Bacteriophage hay phage).

3.2.1. Sự hình thành vết tan và các thể đột biến phage

Phage được phát hiện dễ dàng vì trong chu trình tan, một tế bào bị nhiễm phage vỡ

ra và giải phóng các hạt phage vào môi trường. Sự tạo thành các đám đã được quan sát.

Một số lớn tế bào vi khuẩn (khoảng 10^8 tế bào) được trải lên trên môi trường đặc. Sau một thời gian sinh trưởng, tạo một lớp tế bào vi khuẩn màu trắng đục. Nếu phage có mặt ở thời điểm vi khuẩn được trải lên môi trường, nó sẽ nhiễm vào tế bào vi khuẩn. Sau đó tế bào nhiễm phage bị làm tan và giải phóng nhiều phage mới. Thế hệ sau này của phage lại nhiễm vào vi khuẩn gần đó, và tham gia vào chu trình tan khác, các vi khuẩn này bị vỡ giải phóng ra nhiều phage, chúng có thể nhiễm vào các vi khuẩn khác ở vùng lân cận. Chu trình xâm nhiễm của phage được tiếp tục và sau nhiều giờ, phage phá hủy tất cả các tế bào vi khuẩn của một vùng, tạo đám (plage) trong suốt khác với lớp tế bào vi khuẩn màu trắng đục.

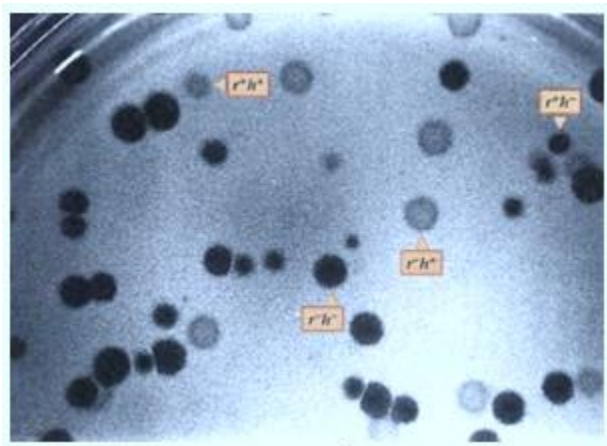


Hình: Chu trình sinh tan của bacteriophage

Phage chỉ có thể được nhân lên chỉ khi sinh trưởng trong tế bào vi khuẩn, vì vậy làm cạn nguồn dinh dưỡng trong môi trường sinh trưởng, làm hạn chế sự nhân lên của phage và kích thước của đám. Vì mỗi đám là kết quả của sự nhiễm một hạt phage ban

đầu, có thể đếm được số lượng các đốm riêng biệt có trên môi trường.

Kiểu gene của các thể đột biến phage có thể được xác định nhờ nghiên cứu các đốm. Trong một số trường hợp, sự xuất hiện của các đốm là đầy đủ. Chẳng hạn, đột biến phage làm giảm số lượng phage thể hệ sau từ những tế bào bị nhiễm thường tạo đốm nhỏ hơn. Các đốm lớn có thể được tạo ra bởi các đột biến gây ra sự tan sớm các tế bào bị nhiễm, nên mỗi đốm đó tiếp tục nhiễm nhanh hơn. Kiểu đột biến khác của phage có thể được xác định bởi phage có khả năng hoặc không có khả năng tạo đốm trên những chủng vi khuẩn đặc biệt.



Hình: Sự xâm nhập của phage vào tế bào vật chủ theo cả 2 dạng bố mẹ đồng thời.

r^+ : đốm nhỏ, r^- : đốm lớn, h^+ : đốm mờ, h^- : đốm trong

3.2.2. Tái tổ hợp di truyền trong chu kỳ sinh tan (Lytic cycle)

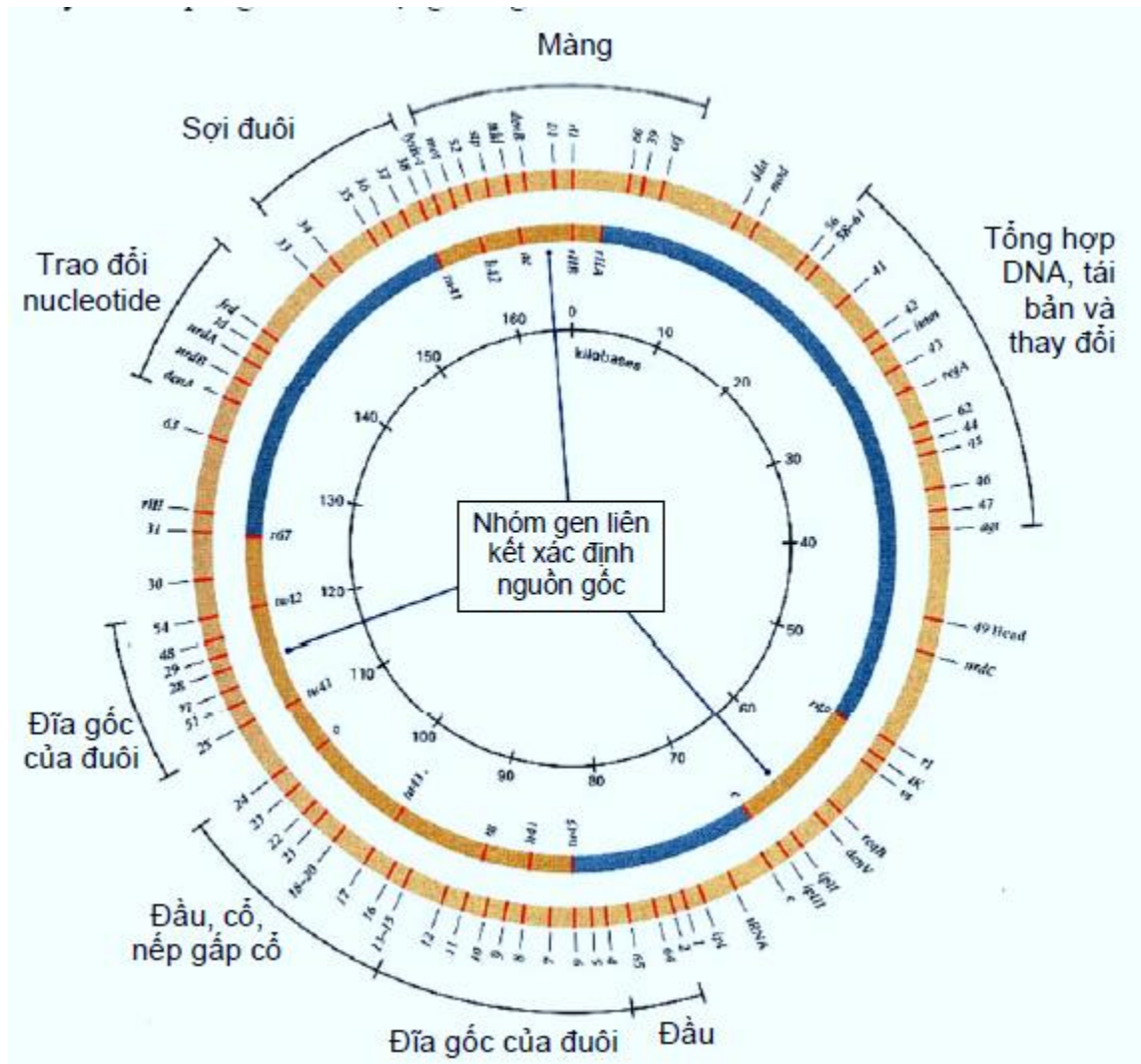
Các phage tuy có kích thước nhỏ bé phải nhìn dưới kính hiển vi điện tử mới thấy được. Nhưng các tính trạng của phage được quan sát dựa theo các vết tan hoặc biên độ chủ. Cho hai dòng phage T₄ có kiểu gene khác nhau nhiễm vào một tế bào vi khuẩn *E.coli*, một vài phage thể hệ sau sẽ thực hiện tái tổ hợp di truyền, DNA phage sao chép và trao đổi đoạn nếu có nhiễu âm. Allele r^- tan nhanh, kết quả tạo ra đốm lớn, allele h^- nhiễm vào các tế bào chủ, kết quả tạo đốm trong. Phép lai như sau: $r^-h^+ \times r^+h^-$

Kết quả thu được bốn kiểu đốm. Hai kiểu đốm đục, lớn và đốm trong, nhỏ tương ứng với kiểu hình của phage bố mẹ. Hai kiểu hình khác, đốm trong lớn, đốm mờ nhỏ là dạng tái tổ hợp tương ứng kiểu gene r^-h^- và r^+h^+ . Khi nhiều vi khuẩn bị nhiễm số dạng tái tổ hợp thuận nghịch thường được tìm thấy trong số các phage ở thế hệ sau. Trong thí nghiệm, mỗi kiểu gene trong số bốn kiểu gene trên sinh ra kiểu hình khác nhau về dạng đốm. Số lượng kiểu gene có thể xác định được bằng kiểm tra các đốm tạo thành. Tần số tái tổ hợp, được biểu diễn dưới dạng phần trăm, được xác định như sau:

$$\text{Tần số tái tổ hợp} = \frac{\text{Số phage tái tổ hợp}}{\text{Tổng số phage}} \times 100$$

3.2.3. Sự sắp xếp của các gene trong nhiễm sắc thể phage

Tần số tái tổ hợp có thể được sử dụng để xác định khoảng cách của bản đồ ở Eukaryote. Các thí nghiệm lập bản đồ cho thấy đột biến ở T4 được lập bản đồ thành 3 cụm riêng biệt. Cả ba cụm này có liên kết với một cụm khác. George Streisinger và cộng sự (1964) đã chứng minh bản đồ di truyền của phage T4 có dạng vòng tròn.



Hình: Bản đồ di truyền của T4 với các marker

Trong mỗi phép lai, lập ba đến bốn marker di truyền lần lượt với mỗi nhóm và tiến hành qua toàn bộ genome của T4. Nhiều gene khác đã được xác định và lập bản đồ đầy đủ trên phân tử vòng tròn. Những vùng ở vòng tròn bên trong là 3 cụm của marker T4 đã được xác định và lập bản đồ di truyền. Vòng ngoài có mặt của nhiều bộ marker lớn tạo

thành toàn bộ vòng tròn của bản đồ di truyền. Bản đồ di truyền phage T4 cho thấy gene của phage T4 tạo cụm mở rộng theo chức năng của chúng. Chẳng hạn có cụm lớn các gene dùng cho sao chép DNA ở vị trí phần tư bên trên phía phải và có cụm gene tổng hợp các cấu phần tạo nên đầu của phage ở phía dưới của vòng tròn.

Phân tử DNA của phage T4 là phân tử sợi đơn dạng thẳng, mỗi đầu tận cùng của DNA phage T4 được nhân lên hoặc lặp đoạn ở đầu cuối (terminal redundant). Do vậy, mỗi phân tử DNA có kích thước tăng thêm 2%. Khi DNA được sao chép trong tế bào, sự tái tổ hợp giữa các phần ở đầu tận cùng của bộ gen T4 với những trình tự tương đồng của bộ gen T4 khác, kết quả tạo ra sản phẩm DNA có kích thước lớn hơn khả năng chứa của phần đầu. Những phân tử chứa lặp đoạn được tạo thành vì sự tái tổ hợp trong bộ gen của phage T4 xảy ra thường xuyên, trung bình có khoảng 20% sự kiện tái tổ hợp xảy ra trên một nhiễm sắc thể. Khi phân tử DNA được gói vào phần đầu, nó được cắt bằng enzyme chỉ còn chứa khoảng 102% của chiều dài bộ gen phage T4, vì có chứa đoạn lặp lại của phần đầu.

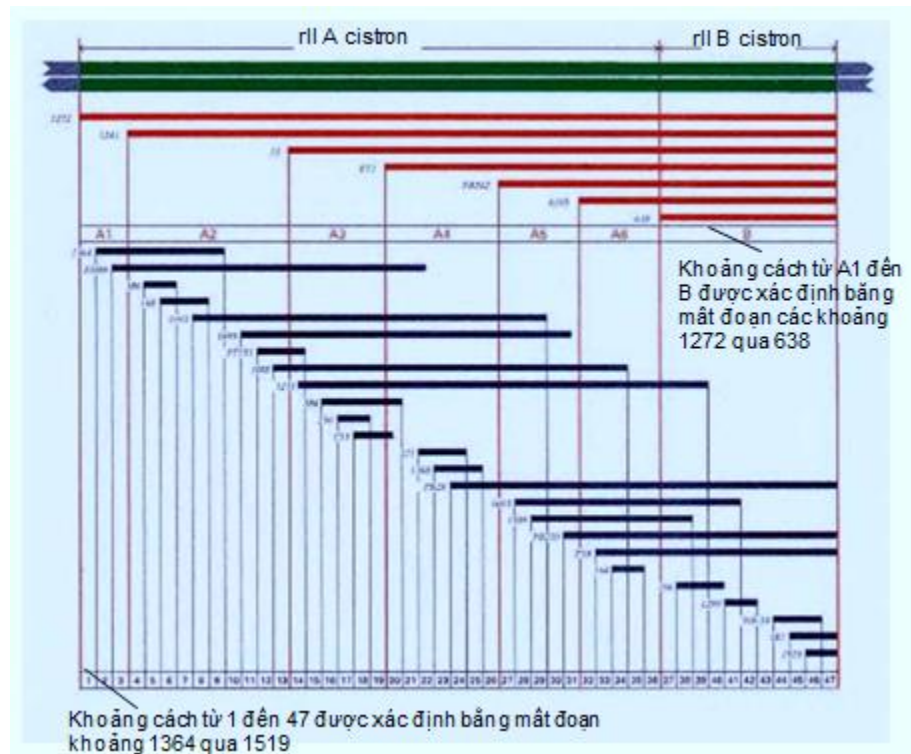
3.2.4. Lập bản đồ cấu trúc tinh vi vùng rII của phage T4

Các nghiên cứu chi tiết về các đột biến rII của phage T4 làm sáng tỏ hơn về cấu trúc gene. Phage T4 ở dạng hoang dại r^+ có khả năng nhiễm đồng thời hai nòi *E.coli* B và K. Các đột biến rII chỉ nhiễm nòi B nhưng không nhiễm nòi K. Seymour Benzer (1955) đã nhận được 2400 đột biến rII có nguồn gốc độc lập với nhau. Ông đã cho lai các đột biến với nhau và căn cứ vào sự xuất hiện các dạng tái tổ hợp hoang dại r^+ mà lập bản đồ các điểm đột biến.

Mỗi đột biến có thể tái tổ hợp với các đột biến khác. Đột biến mất đoạn ngăn cản sự tái tổ hợp với hai hoặc nhiều đột biến điểm ở các vị trí khác nhau của gene. Mỗi mất đoạn làm mất một phần bộ gene của phage bao gồm cả vùng rII. Sử dụng đột biến mất đoạn là phương pháp đơn giản để lập bản đồ của hàng ngàn đột biến. Bản đồ mất đoạn (Deletion mapping) dựa trên sự có hoặc không có dạng tái tổ hợp. Trong bất kỳ phép lai nào giữa một đột biến điểm chưa biết và một đột biến mất đoạn, sự xuất hiện của dạng hoang dại cho thấy đột biến điểm nằm ngoài vùng mất đoạn. Ngược lại, nếu đột biến điểm xuất hiện trong vùng mất đoạn, không xuất hiện dạng tái tổ hợp kiểu hoang dại ở thế hệ sau.

Nhiều phép lai đã được thực hiện để lập bản đồ đột biến chi tiết gene rII. Khoảng cách từ A1 đến A6 và B được trình bày ở hình 5.4. Một đột biến đặc biệt đã được kiểm tra định vị ở vùng A4. Đột biến này không tái tổ hợp tạo dạng kiểu dại trong phép lai với

các đột biến mất đoạn lớn như r1272, r1241, rJ3 và rPT1 nhưng nó có thể tái tổ hợp tạo dạng kiểu đại trong phép lai với rPB242, rA105 và r638. Các đột biến được tạo ra bởi cùng một khuôn, kết quả lai với các đột biến mất đoạn lớn sẽ được xếp vào vùng A4. Bản đồ di truyền trong vùng A4 có thể được tạo ra bởi một bộ các đột biến mất đoạn được trình bày ở phần dưới của hình. Xác định 7 tiểu vùng ở trong A4 (từ a qua g).



Hình: Đột biến mất đoạn được sử dụng để chia locus rII của bacteriophage T4 thành 7 vùng và 47 tiểu vùng nhỏ

Nghiên cứu đột biến ở vùng rII và lập bản đồ di truyền có vai trò quan trọng, qua đó có thể rút ra các kết luận sau:

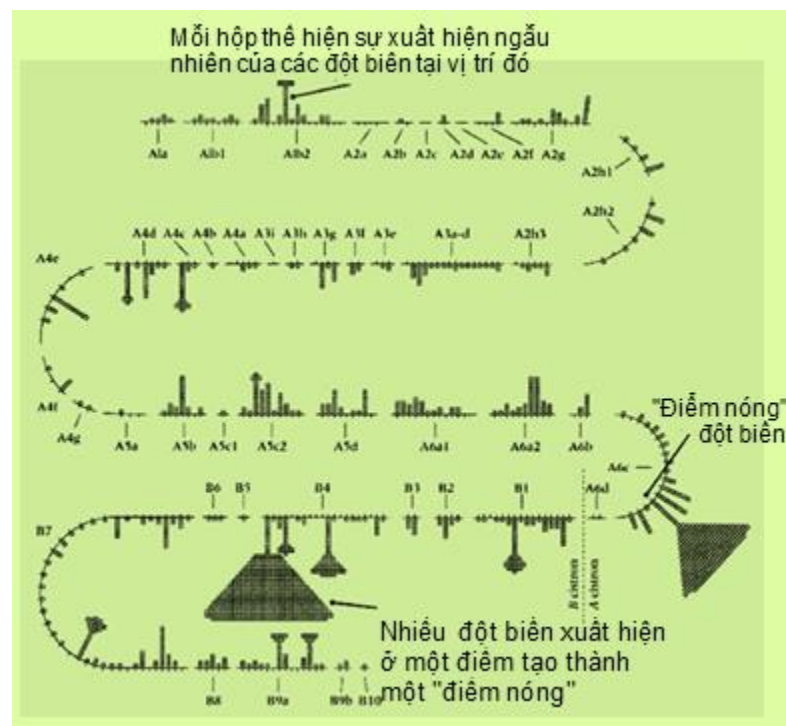
- + Sự trao đổi di truyền có thể xảy ra trong gene và có thể giữa các nucleotide ở gần nhau.
- + Các đột biến không được tạo ra ở cùng tần số với tất cả các điểm trong gene, chúng phân bố không đều nhau. Chẳng hạn, 2400 đột biến rII đã được xác định chỉ ở 304 điểm. Một trong những điểm này có thể có đến 474 đột biến. Những điểm có tần số đột biến cao như thế được gọi là các điểm nóng (hotspot mutation). Ở những điểm khác, đột biến được phục hồi một lần hoặc vài lần.

Kết quả phân tích vùng rII rất quan trọng, giúp cho chúng ta phân biệt được 3 khái niệm về gene. Phổ biến nhất, gene liên quan với một đơn vị chức năng. Điều này tương

ứng với một đoạn DNA mã hóa cho một phân tử protein. Benzer đưa ra thuật ngữ cistron để chỉ chức năng này, thuật ngữ cistron thỉnh thoảng vẫn được sử dụng. Đơn vị chức năng được xác định qua thử nghiệm bổ sung (complementation test), xác định được 2 đột biến có allele với nhau không.

Trước thí nghiệm của ông rII được coi là một locus. Thí nghiệm cho thấy các đột biến xếp thành hai nhóm rIIA và rIIB. Lai các đột biến rIIA x rIIB sẽ có r^+ , nhưng lai rIIA x rIIA và rIIB x rIIB thì thu được kiểu hình đột biến r.

Ngoài nghĩa là đơn vị chức năng, gene còn là đơn vị tái tổ hợp (recon) và đơn vị đột biến (muton). Cả hai đơn vị này, đều tương ứng với những nucleotide riêng lẻ trong gene.



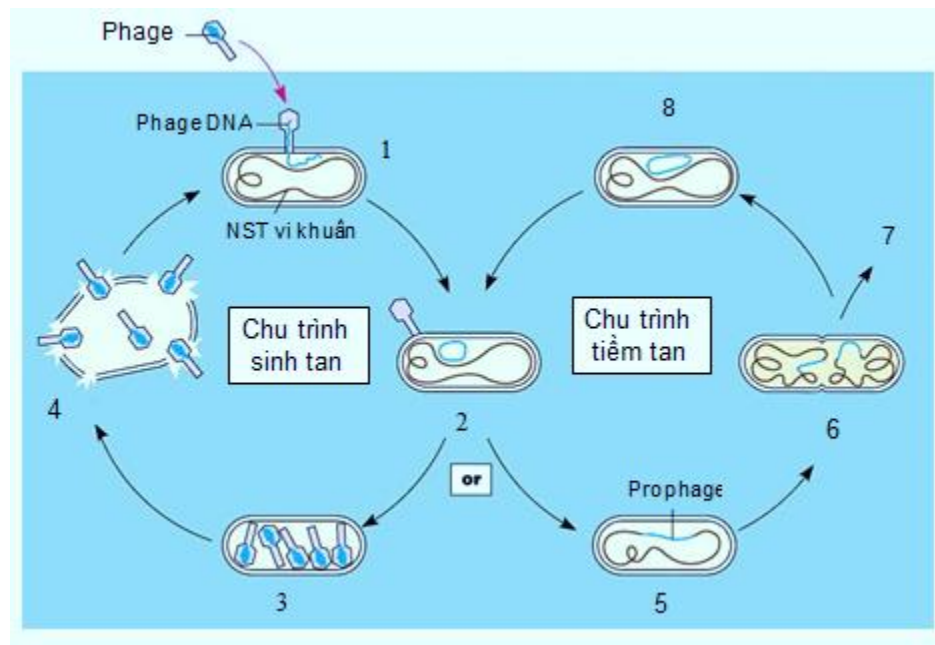
Hình: Bản đồ di truyền locus rII của phage T4

3.2.5. Tính tiềm tan (Lysogeny) và phage λ

Chu trình tiềm tan bắt đầu khi phân tử DNA của phage λ gắn vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn và tiến hành sao chép như một phần nhiễm sắc thể vi khuẩn. Các hạt phage không được tạo thành. Phân tử DNA của phage được gắn vào bộ gen của vi khuẩn được gọi là prophage, tế bào vi khuẩn mang prophage được gọi là tế bào tiềm tan (lysogen). Một chủng tiềm tan cho phage λ được ký hiệu theo tên của phage. Ví dụ chủng *E. coli* K12(λ) là chủng K12 trở thành tế bào tiềm tan của phage λ .

Phân tử DNA của phage λ có đầu các đầu cuối chứa 12 nucleotide không kết cặp,

mà ở dạng sợi đơn tạo đầu dính (cohesive end) bổ sung. Khi vào tế bào, đầu cuối bổ sung gắn lại tạo phân tử vòng tròn. Sự tạo vòng tròn xảy ra sớm ở cả chu trình tan và chu trình tiềm tan. Có khoảng 75% tế bào vi khuẩn bị nhiễm phage, phân tử DNA vòng tròn sao chép và chu trình tan xảy ra tiếp theo. Còn khoảng 25% tế bào bị nhiễm, phân tử DNA vòng tròn của phage λ và phân tử DNA vòng tròn của *E. coli* tương tác và xảy ra tái tổ hợp điểm chuyên biệt (site-specific recombination) và DNA của phage gắn vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn.



Hình: Chu trình tan và tiềm tan ở phage λ

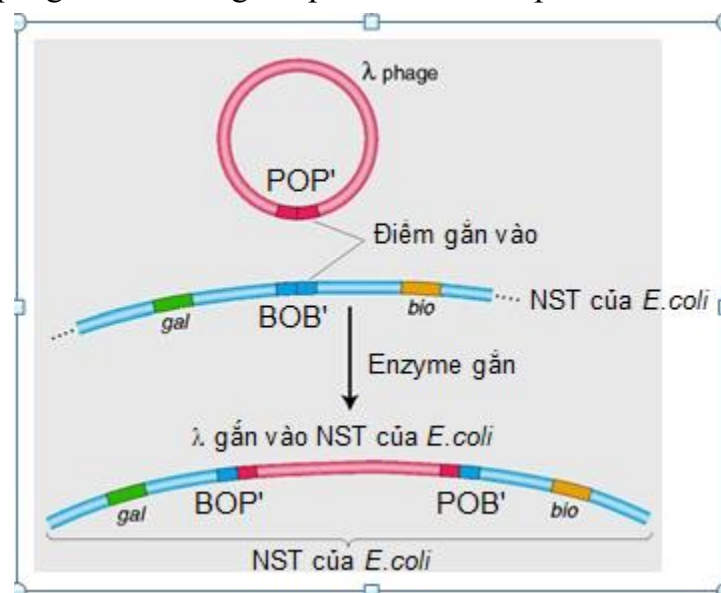
Chu trình tan:

1. Phage tấn công tế bào chủ và bơm DNA vào
2. Tái tạo vòng DNA phage
3. DNA và protein của phage được tổng hợp và lắp ghép tạo thành phage mới
4. Tế bào bị phân giải, giải phóng phage

Chu trình tiềm tan:

5. DNA của phage tích hợp vào NST vi khuẩn tạo thành dạng prophage
 6. Tế bào vi khuẩn phân chia bình thường, sao chép prophage và truyền cho thế hệ sau
 7. Nhiều tế bào phân chia tạo ra khuẩn lạc vi khuẩn có chứa prophage
 8. Một số prophage tồn tại trên NST vi khuẩn, khởi đầu cho chu trình sinh tan
- Vị trí của tái tổ hợp điểm chuyên biệt ở DNA của vi khuẩn và phage được gọi là

điểm gắn vào của vi khuẩn và phage (bacterial and phage attachment sites). Mỗi điểm gắn có chứa 3 đoạn: ở đoạn trung tâm có cùng trình tự nucleotide ở cả 2 vị trí gắn và là vùng mà sự tái tổ hợp thực sự xảy ra. Điểm gắn vào của phage được ký hiệu bởi POP' (P: phage) và điểm gắn vào ở vi khuẩn được biểu diễn bằng BOB' (B: bacteria). So sánh bản đồ di truyền của phage và prophage POP' nằm gần vùng trung tâm của phân tử DNA dạng thẳng. Một protein của phage, integrase, xúc tác cho tái tổ hợp điểm chuyên biệt. Enzyme integrase nhận ra điểm gắn vào của phage và vi khuẩn, gây ra sự trao đổi vật lý, kết quả là phân tử DNA của phage gắn vào phân tử DNA của vi khuẩn. Kết quả của sự tái tổ hợp làm bản đồ di truyền của prophage khác với bản đồ di truyền của phage. Bản đồ di truyền prophage là sự chuyển đổi vòng tròn bản đồ di truyền phage tự do. Prophage được chèn vào nhiễm sắc thể của *E. coli* giữa gene *gal* và gene *bio*. Sự chèn vào của phage λ làm tăng khoảng cách giữa gene *gal* và gene *bio*. Khoảng cách giữa gene *gal* và gene *bio* ở tế bào tiềm tan với phage λ là khoảng hai phút so với một phút ở tế bào không tiềm tan.



Hình: Mô hình gắn của phage λ vào NST của *E.coli*

Khi tế bào tiềm tan, các gene của phage trở thành một phần nhiễm sắc thể của vi khuẩn vì vậy có thể làm kiểu hình của vi khuẩn bị thay đổi. Nhưng hầu hết các gene của phage ở prophage đều được giữ ở trạng thái bất hoạt nhờ protein repressor - sản phẩm của gene ở phage. Protein repressor được bắt đầu tổng hợp nhờ sự nhiễm vào của phage và nó được tiếp tục tổng hợp nhờ prophage. Gene mã hóa cho repressor thường chỉ là gene của prophage được biểu hiện ở chu trình tiềm tan. Nếu tế bào tiềm tan bị nhiễm bởi phage giống với prophage, sự có mặt của repressor trong prophage ngăn cản sự biểu hiện các gene của phage nhiễm vào. Tính kháng với những phage giống với prophage được gọi là

tính miễn nhiễm (immunity). Đây là tiêu chuẩn để xác định tế bào vi khuẩn chứa phage đặc biệt. Chẳng hạn phage λ không tạo đốm trên vi khuẩn chứa prophage λ . Trong tế bào tiềm tan, sự sao chép không giải phóng các phage mới. Tuy nhiên, các prophage đôi khi trở nên có hoạt tính, trải qua chu trình tan, tạo ra số lượng lớn phage ở thế hệ sau. Hiện tượng này được gọi là sự cảm ứng prophage (prophage induction), nó được bắt đầu bằng sự hư hại DNA của vi khuẩn. Đôi khi prophage có thể tách ra khỏi DNA của vi khuẩn một cách ngẫu nhiên nhưng thường nó được gây ra do các tác nhân của môi trường như hóa chất hoặc chiếu xạ. Khả năng bị cảm ứng là một thuận lợi cho phage bởi vì DNA của phage có thể thoát khỏi tế bào bị hư hại. Cơ chế sinh hóa của sự cảm ứng là phức tạp nhưng sự thoát ra của phage xảy ra dễ dàng.

Sự cắt ra của phage là sự tái tổ hợp điểm chuyên biệt khác, ngược với quá trình gắn vào. Sự cắt này yêu cầu enzyme của phage, integrase thêm protein của phage là excisionase. Nghiên cứu di truyền của sự gắn vật lý cho thấy excisionase gắn với integrase và sau đó nhận ra điểm gắn vào của prophage BOP' và POB', gắn với các điểm này. Integrase cắt ở trình tự O và tạo ra lại BOB' và POP'. Quá trình tách diễn ra ngược lại với sự gắn vào.

3.3. Tái bản của các virus.

3.3.1. Phân loại virus

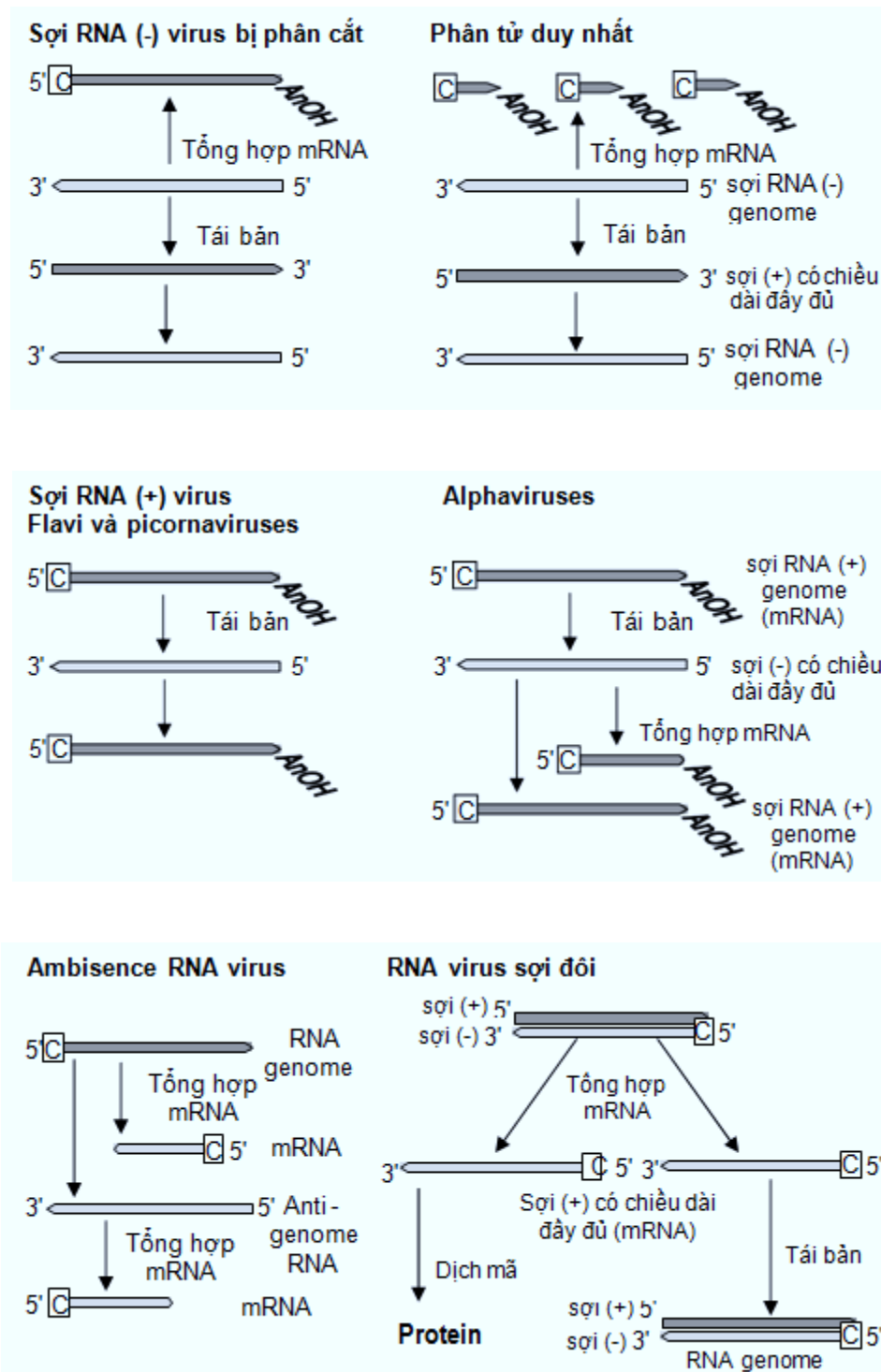
Virus được phân loại dựa trên các đặc điểm:

- Phân loại theo bệnh: chia ra virus gây bệnh ở người, động vật và cây trồng ... Vấn đề chủ yếu đối với hệ thống phân loại này là nhiều loại virus khác nhau lại gây ra cùng một triệu chứng. Chẳng hạn, sự nhiễm trùng hô hấp với sốt có thể được gây ra do nhiều virus khác nhau.

- Phân loại theo hình thái: phân loại virus cơ bản dựa trên cấu trúc của hạt virus. Kiểu phân loại này có hạn chế trong phân biệt giữa các virus có hình thái tương tự nhưng gây ra triệu chứng bệnh khác nhau.

- Phân loại theo chức năng: trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu được tiến hành dựa trên phương thức sao chép của virus. Cần xác định thành phần và cấu trúc genome của virus và từ đó xác định cách sao chép.

Kiểu tế bào bị nhiễm bởi virus có ảnh hưởng quan trọng đối với quá trình sao chép. Đối với virus của prokaryote, sự sao chép phản ánh mối quan hệ mở rộng đơn giản của các tế bào chủ. Đối với virus của tế bào eukaryote, vấn đề phức tạp hơn. Khả năng mã hoá của genome buộc virus chọn một phương thức sao chép.



Hình: Sao chép RNA của virus

Phương thức sao chép của virus phụ thuộc vào bản chất vật liệu di truyền của chúng. Về phương diện này, virus được chia thành 7 nhóm:

Nhóm I: Virus chứa DNA sợi đôi. Nhóm này được chia nhỏ thành hai loại:

+ Sao chép là chỉ của nhân. Sự sao chép của các virus này phụ thuộc tương đối vào các yếu tố của tế bào.

+ Sao chép xảy ra trong tế bào chất. Những virus này có liên quan với các yếu tố cần thiết cho phiên mã và sao chép genome của chúng và vì vậy phụ thuộc nhiều vào bộ máy tế bào.

Nhóm II: virus chứa DNA sợi đơn. Sự sao chép xảy ra trong nhân liên quan sự tạo thành qua trung gian sợi kép được xem như là khuôn cho tổng hợp lại DNA sợi đơn thể hệ sau.

Nhóm III: virus chứa RNA sợi kép. Những virus này có bộ gene được chia đoạn. Những đoạn này được phiên mã riêng để tạo ra các monocistronic mRNA.

Nhóm IV: Virus chứa RNA sợi đơn mạch (+), có thể chia nhỏ thành 2 nhóm:

+ Virus với polycistronic mRNA. RNA genome tạo ra mRNA, phân tử này dịch mã tạo sản phẩm là một polyprotein, thường được phân cắt để tạo các protein trưởng thành.

+ Virus phiên mã phức tạp. Cách dịch mã (như Togavirus) hoặc các RNA của subgenome (Tobamovirus) cần thiết để tạo RNA của bộ gene.

Nhóm V: Virus chứa RNA sợi đơn mạch (-), genome của virus này được chia thành 2 nhóm:

Genome không chia đoạn (Mononegvirales). Bước đầu tiên trong sao chép là phiên mã RNA sợi (-) của genome nhờ RNA polymerase phụ thuộc RNA của hạt virus để tạo ra monocistronic mRNA, được xem là khuôn cho sao chép genome.

Genome được chia đoạn (Orthomyxoviridae). Sao chép xảy ra trong nhân với monocistronic mRNA cho mỗi gene của virus được tạo ra nhờ enzyme transcriptase từ genome đầy đủ của virus.

Nhóm VI: Virus chứa mRNA sợi đơn mạch (+) qua trung gian DNA. Bộ gene của retrovirus là mRNA mạch (+) nhưng ở dạng lưỡng bội. Chúng không trực tiếp tạo ra mRNA mà phiên mã ngược tạo DNA.

Nhóm VII: DNA sợi đôi qua trung gian RNA. Virus nhóm này dựa vào enzyme phiên mã ngược, những khác với retrovirus, quá trình này xảy ra bên trong hạt virus trong suốt quá trình trưởng thành.

3.3.2. Các virus của vi khuẩn

Có 3 pha bắt đầu cho xâm nhiễm của virus.

- Bắt đầu nhiễm

-
- Sao chép và biểu hiện genome của virus
 - Giải phóng các virion trưởng thành từ tế bào bị nhiễm

Bacteriophage được thêm vào nuôi cấy vi khuẩn đang sinh trưởng mạnh và sau một vài phút nuôi cấy bị giảm, ngăn cản tương tác giữa các hạt phage và tế bào. Ngay sau khi làm giảm nuôi cấy, có giai đoạn khoảng 10-15 phút không phát hiện thấy các hạt phage, đây là giai đoạn che khuất (eclipse period). Điều này xảy ra một thời gian sau khi nhiễm vào tế bào, liên quan với genome của chúng như là điều kiện trước tiên cho sao chép. Ở giai đoạn này không có sự nhiễm nữa vì vậy không thể phát hiện nhờ vết đốm. Giai đoạn muộn là thời gian trước khi hạt virus mới đầu tiên xuất hiện và khoảng 20-25 phút cho hầu hết các bacteriophage. Khoảng 40 phút sau khi tế bào bị nhiễm, đường cong về số lượng hạt virus tổng số và virus ngoại bào hợp nhau thành một vì lúc này, tế bào bị nhiễm làm tan và giải phóng các hạt phage ngoại bào. Các bacteriophage làm chết tế bào chủ gọi là độc (virulent) và chúng sinh sản theo chu trình tan.

Các virus ôn hoà (temperate virus) có thể sinh sản mà không làm chết tế bào chủ. Chúng có hai khả năng sinh sản: chu trình tan và chu trình tiềm tan không làm chết tế bào chủ. Chu trình sống bắt đầu khi phage gắn vào bề mặt tế bào *E. coli* và bơm DNA vào trong gây nhiễm. DNA của phage sau khi vào tế bào tạo DNA vòng tròn và sẽ tham gia vào một trong hai chu trình. DNA của phage có thể hoặc tham gia vào chu trình tiềm tan của phage T₄ hoặc gắn vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn nhờ tái tổ hợp điểm chuyên biệt để bước vào chu trình tiềm tan.

3.3.3. Các virus thực vật

Hầu hết virus thực vật có genome RNA, tuy nhiên 2 nhóm virus thực vật được nghiên cứu nhiều nhất có chứa genome DNA: Cauliflower mosaic virus (CaMV) và gemini virus.

- Các virus RNA

Phần lớn virus thực vật có bộ gene RNA sợi đơn mạch (+) và nhiều dạng có capsid hình que, các protein capsomer hình xoắn.

Tobacco mosaic virus (TMV): Genome TMV là RNA sợi đơn. Genome của chúng mã hoá ít nhất 4 chuỗi polypeptid. Protein 130 và 180 kDal được dịch mã trực tiếp từ cùng một codon bắt đầu trên RNA bộ gene. Hai protein khác, 30 kDal và protein vỏ được dịch mã từ đoạn RNA. Protein 130 và 180 kDal liên quan với sao chép virus, trong khi đó protein 30 kDal cần cho sự di chuyển của virus từ tế bào này đến tế bào khác. Vì vậy 3 loại protein này cần cho sự nhân lên của virus trong toàn bộ cây.

- Các virus DNA

Virus thực vật có bộ gene DNA rất hiếm, chỉ gồm 2 nhóm:

+ Cauliflower mosaic virus: CaMV được nghiên cứu nhiều nhất trong nhóm Caulimovirus. Đây là nhóm virus dạng cầu, chứa genome DNA vòng tròn, mạch kép, kích thước khoảng 8 kb. Caulimovirus gây ra một số bệnh làm thiệt hại kinh tế cây trồng. Chúng có phổ vật chủ hạn chế, chỉ nhiễm cây 2 lá mầm.

DNA của CaMV có cấu trúc không bình thường, có 3 điểm gián đoạn trên sợi kép, hai điểm trên một sợi và một điểm trên sợi còn lại với những vùng trình tự overlap. Ngoài ra DNA CaMV có ribonucleotide gắn với đầu cuối 5' của điểm gián đoạn. Từ các nghiên cứu ở CaMV, Hull và Covey (1983), Pfeiffer và Hohn (1983) cho rằng sao chép CaMV liên quan với phiên mã ngược qua trung gian RNA của bộ gene. Chu trình sao chép giống với retrovirus và hepatitis B virus.

+ Gemini virus: Gemini virus là nhóm virus có phổ xâm nhiễm rộng, cả cây một lá mầm và 2 lá mầm. Virus sọc vằn lá ngô (maize streak virus – MSV) là một gemini virus lây nhiễm qua lá, được truyền do côn trùng. Bộ gene của geminivirus chứa phân tử DNA vòng tròn sợi đơn. Sao chép DNA virus được nghĩ là xảy ra nhờ trung gian DNA và genome của virus sao chép cho nhiều bản sao trong nhân của những tế bào tăng sinh nhanh. Virus gây ra sự ức chế sinh trưởng và lá có sọc vàng của những cây ngô bị nhiễm.

3.3.4. Các virus động vật

Chu trình sao chép của virus động vật có nhiều điểm tương tự với các virus khác với nhiều biến dạng đáng kể. Virus động vật thường có promoter mạnh, có thể áp dụng cho biểu hiện gene. Trong nhiều trường hợp, chúng có khả năng sao chép genome của chúng với số lượng lớn bản sao trong tế bào. Một số virus động vật như retrovirus gắn DNA của chúng vào nhiễm sắc thể tế bào chủ như là một phần chu trình sao chép của chúng.

- Các virus RNA như retrovirus, paramyxovirus ...

Retrovirus có phổ vật chủ rộng gồm chim, động vật có vú và những động vật khác. Sự nhiễm của retrovirus không dẫn đến làm chết tế bào. Biểu hiện gene của virus mạnh nhờ promoter mạnh. Retrovirus chứa genome RNA. Hạt virus chứa 2 bản sao RNA. Mỗi genome RNA có nhiều tính chất tương tự với mRNA eukaryote: có trình tự poly(A) khoảng 200 đơn vị ở đầu mút 3 và cấu trúc mũ ở đầu 5'. Virus xâm nhiễm vào tế bào kèm theo enzyme reverse transcriptase và integrase. Enzyme reverse transcriptase tham gia phản ứng tổng hợp cDNA, dẫn đến sự hình thành bản sao DNA mạch kép của RNA

virus, được gọi là DNA provirus. DNA provirus được đóng vòng tròn nhờ protein integrase và được xen vào genome tế bào chủ. Thường chỉ có một bản sao DNA provirus được gắn vào trong một tế bào chủ. Điểm gắn vào genome là ngẫu nhiên.

Retrovirus là một tác nhân gây ung thư. Hầu hết chúng có cấu trúc genome chứa trình tự oncogene. Oncogene virus thường được tạo thành từ gene của tế bào và thường là kết quả của sự dung hợp gene tế bào với gene của virus. Kết quả là những virus gây ung thư như thế bị mất chức năng gene của virus. Chúng có thể sao chép trong lây nhiễm hỗn hợp với một helper virus cung cấp chức năng bị mất.

- Các virus DNA: SV40, Bovine papilloma virus (BPV) ...

Hạt virus SV40 chứa DNA mạch kép, vòng tròn, khoảng 5,2 kb được gắn với 4 phân tử histon: H4, H2a, H2b và H3. SV40 có thể tham gia vào hai kiểu chu trình sống phụ thuộc vào tế bào chủ. Trong tế bào cho phép virus xâm nhiễm (permissive cell) thường là các dòng tế bào ổn định có nguồn gốc từ khỉ châu Phi, sự sao chép virus xảy ra như các trường hợp nhiễm bình thường. Trong tế bào không cho phép (non-permissive cell), thường là những dòng tế bào chuột, không có sự nhiễm làm tan tế bào vì virus không thể sao chép toàn bộ DNA của chúng. Ở những tế bào khi bị nhiễm và làm tan do SV40, có thể phân ra 3 giai đoạn. Trong suốt 8 giờ đầu tiên, hạt virus không vỡ và DNA của chúng di chuyển đến nhân tế bào chủ. 4 giờ tiếp theo là pha sớm (early phase), có sự tổng hợp mRNA sớm và protein sớm và có sự kích thích tổng hợp DNA của tế bào chủ. Trong pha muộn xảy ra ở 36 giờ tiếp theo, trong giai đoạn này có sự tổng hợp DNA của virus, mRNA muộn và protein muộn, lắp ráp virus và làm tan tế bào.

Bovine papilloma virus (BPV): BPV gây nên bệnh bướu (wart) ở trâu bò. BPV có genome DNA sợi kép, vòng tròn khoảng 7,9 kb.

3.3.5. Các virus gây ung thư, HIV/AIDS ...

Khoảng 15% ung thư ở người có cơ chế hình thành liên quan với virus. Chúng có các nhóm sau :

- + DNA virus: họ Apovavirus (Papilloma virus), họ Hepadnavirus (Hepative-B virus), họ Herpesvirus (Epstein-Barr virus)

- + RNA virus: họ Retrovirus (HIV-1, virus AIDS)

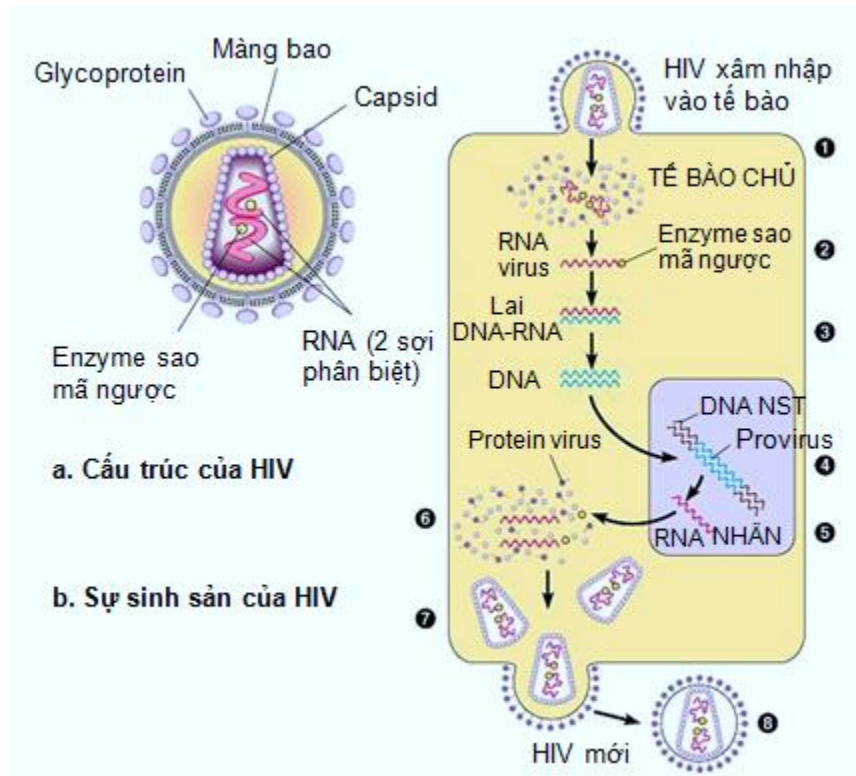
Các virus gây ung thư có thể tác động do xen đoạn DNA của chúng vào bộ gene chủ. Ngoài ra có thể thực hiện :

- + Hoạt hoá bộ máy sao chép DNA của tế bào chủ.

- + Kìm hãm tác động của các tumour suppressor gene chủ yếu để hoạt hoá sao chép

DNA.

Như vậy bằng nhiều cách khác nhau các virus khi xâm nhập tế bào có thể làm tế bào mất sự kiểm soát bình thường.



Hình: Chu trình sinh sản của virus HIV

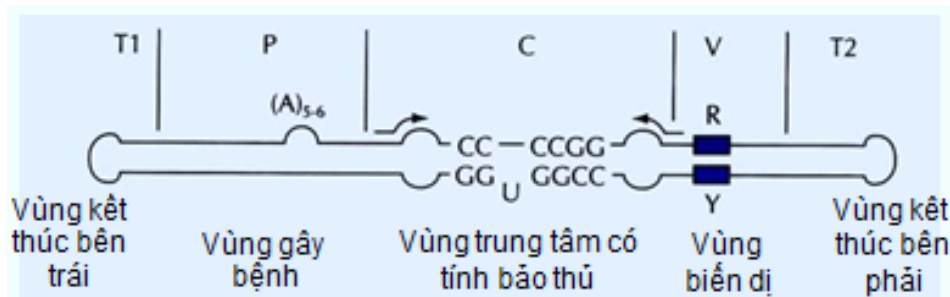
1. Virus xâm nhiễm vào tế bào
2. Phiên mã RNA của virus thành DNA sợi đơn nhờ enzyme phiên mã ngược
3. Quá trình tổng hợp DNA sợi đôi từ DNA sợi đơn
4. Sự gắn DNA retrovirus vào genome tế bào chủ
5. Sự phiên mã DNA retrovirus tạo thành mRNA virus và RNA genome virus
6. Tổng hợp vỏ protein virus
7. Lắp ráp RNA genome virus vào vỏ protein
8. Sự nảy chồi của virus, giải phóng virus khỏi tế bào

AIDS (Acquired immunodeficiency syndrome) là hội chứng do virus làm suy giảm miễn dịch ở người (HIV). Hạt virus là một khối cầu, bờ ngoài gồ ghề, gồm vỏ bên ngoài, trong là chất nền protein bao quanh lõi có mặt cắt dạng nón. Trong lõi có genome gồm 2 sợi RNA giống nhau gắn với enzyme DNA polymerase là reverse transcriptase. Trong quá trình nhiễm, virus HIV bám và nhiễm lõi của nó vào tế bào hệ thống miễn dịch của người. Tiếp theo chúng sử dụng enzyme reverse transcriptase để sao RNA genome

của chúng thành phân tử DNA sợi kép trong tế bào chất của tế bào chủ. Phân tử xoắn kép này chuyển đến nhân, gắn vào nhiễm sắc thể tế bào chủ nhờ một enzyme khác. Một khi đã gắn vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ, genome của virus có thể thực hiện một trong 2 quá trình. Nó có thể trung dụng bộ máy tổng hợp protein của tế bào chủ để có thể tạo ra hàng trăm hạt virus mới sinh sản bằng nảy chồi, tách khỏi màng tế bào và đôi khi làm chết tế bào chủ. Nó cũng có thể tiềm tàng trong nhiễm sắc thể của tế bào chủ, rồi sao chép và truyền genome virus sang 2 tế bào mới khi tế bào phân chia. Ngoài ra sinh học hiện đại còn phát hiện ra hai dạng sống đặc biệt là các viroid và prion.

3.3.6. Viroid

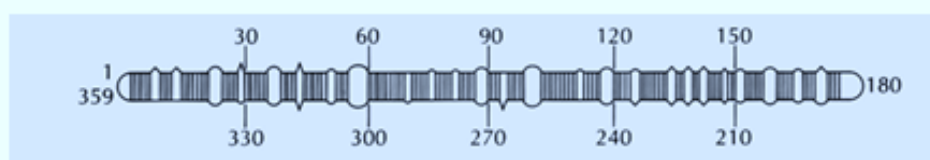
Viroid: là những phân tử RNA rất nhỏ (200-400 nucleotide), dạng que có mức độ cấu trúc bậc hai cao (hình). Chúng không có capsid và vỏ bao (envelope) và chỉ chứa một phân tử acid nucleic đơn. Viroid gắn liền với bệnh thực vật. Viroid đầu tiên được phát hiện và nghiên cứu đầy đủ nhất là viroid ống thoi khoai tây (potato spindle tuber viroid – PSTVd). Viroid không mã hóa cho bất kì một protein nào và nó được sao chép nhờ RNA polymerase của tế bào chủ hoặc có thể nhờ một sản phẩm của một gene RNA polymerase phụ thuộc RNA trong một vài tế bào eukaryote. Chi tiết của sao chép đến nay người ta chưa rõ, dường như nó xảy ra nhờ cơ chế vòng tròn xoay có sự cắt (autocatalytic cleavage) và gắn (self- ligation) để tạo ra viroid trưởng thành.



Hình: Các vùng chức năng của phân tử RNA viroid

Giữa các viroid khác nhau có các trình tự khác nhau, nó được sử dụng trong phân loại để chia viroid thành giống (genera) và loài (species). Tuy nhiên, tất cả viroid đều có đặc điểm chung là vùng trung tâm có tính chất bảo thủ liên quan với sao chép của chúng. Một nhóm các viroid có khả năng tạo thành cấu trúc « đầu búa » (hammerhead) làm cho chúng có tính chất enzyme của một ribozyme. Hoạt tính này được sử dụng để cắt cấu trúc nhiều đơn phân tạo ra trong quá trình sao chép. Các viroid khác sử dụng các enzyme chưa được biết trong tế bào chủ để thực hiện điều này. Một vài viroid gây bệnh trầm trọng và gây chết thực vật chủ. Các viroid khác gồm các loại từ không có biểu hiện bệnh bên

ngoài đến có triệu chứng bệnh nhẹ.



Hình: Cấu trúc RNA viroid

- Prion: Một nhóm bệnh lây nhiễm hệ thần kinh kinh niên, phát triển nhanh chóng và gây chết được biết như là bệnh xốp não lây nhiễm (Transmissible spongiform encephalopathies - TSE). Tác nhân lây nhiễm liên quan đến TSE không phải là acid nucleic (Tikvah Alper, 1967). Các bệnh TSE ở người như là bệnh Kuru và Creutzfeldt-Jacob có thể gây nên do các phần tử protein gây nhiễm và Stanley Prusiner (1982) gọi chúng là prion (proteinacious infectious particle). Bản chất của prion là chưa được chứng minh một cách chắc chắn. Chúng là một hiện tượng mới vượt ra ngoài hiểu biết thông thường. Tất cả các bệnh prion đều có bệnh lý giống nhau cơ bản, mặc dù giữa chúng có sự khác biệt có ý nghĩa ở những điều kiện khác nhau. Các bệnh khác nhau được đặc trưng bởi sự lắng (deposition) của các protein bất thường trong các mô khác nhau như thận, lách, gan hoặc não ... Sự lắng các « amyloid » này bao gồm sự tích lũy các protein khác nhau ở dạng tấm hoặc dạng cuộn rối tạo ra protein β amyloid. Chúng là kết quả từ những sai hỏng của bộ gene trong trao đổi chất do nhiều loại nhân tố chưa được biết.. Mặc dù cơ chế phân tử liên quan với sự chết của tế bào là chưa rõ ràng, nhưng tác động gây ra xốp não do tạo lỗ ở mô não đã được quan sát thấy dưới kính hiển vi. Những lỗ này gây ra do sự mất tế bào thần kinh và gliosis. Phép chẩn đoán xác định TSE không chỉ tiến hành trên lâm sàng mà yêu cầu chứng minh sự lắng protein prion (prp) bằng nhuộm hoá học miễn nhiễm mô não người sau khi chết.

B. CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

I. Câu hỏi:

Câu 1:

a. Vi khuẩn có những đặc điểm nào để thích nghi đa dạng và hiệu quả nhất với môi trường sống?

b. Penicilin và lyzozim có thể tác động rõ rệt đến quá trình tổng hợp thành vi khuẩn Gram dương nhưng vì sao lại ít gây tác động đến vi khuẩn Gram âm?

Trả lời :

a	Đặc điểm giúp vi khuẩn thích nghi với điều kiện sống: - Tỉ lệ S/V lớn → hấp thụ và chuyển hoá vật chất nhanh. - Hệ gen là ADN vòng trần, đơn bội → dễ phát sinh và biểu hiện đột biến - Có thành tế bào → duy trì được áp suất thẩm thấu. - Có khả năng hình thành nội bào tử → hạn chế tác động của điều kiện bất lợi - Một số vi khuẩn có plasmid mang một số gen quy định khả năng đặc biệt: chống chịu, kháng thuốc... - Nhiều vi khuẩn có hệ thống bơm ion đặc biệt (K^+, Na^+ hoặc các ion khác) để có thể sống ở môi trường khắc nghiệt
b.	Tác động của Penixilin: ngăn cản sự tổng hợp chuỗi tetrapeptit giữa các tấm của peptidoglican - Tác động của Lizozim: cắt đứt liên kết 1,4-β-glycozit giữa các đơn vị NAG – NAM của peptidoglican - Do sự khác nhau trong cấu trúc thành tế bào mỗi nhóm vi khuẩn: + Gr +: không có lớp màng ngoài thành (lớp Lipit A), thành tế bào chủ yếu chứa peptidoglican; có cầu nối pentaglixin → quá trình tổng hợp thành tế bào chịu ảnh hưởng rõ rệt bởi penixilin và lizozim + Gr-: thành peptidoglican rất mỏng nằm ở trong, ít cầu nối tetrapeptit → ít chịu tác động của penixilin và lizozym

Câu 2. Hiện tượng gì sẽ xảy ra khi đưa tế bào vi khuẩn Gram (-), Gram (+), tế bào thực vật và tế bào động vật vào dung dịch nhược trương có lyzozim ?

Trả lời:

- Vi khuẩn Gram (-): Lyzozim phá hủy thành peptydoglican của vi khuẩn nhưng vi khuẩn vẫn còn lớp màng ngoài bảo vệ nên vi khuẩn Gram (-) trong môi trường nhược trương chỉ hút nước đến một mức độ nhất định và không bị vỡ.
--

- Vi khuẩn Gram (+): Lyzozim phá hủy thành peptydoglican của vi khuẩn tạo thành thể cầu, trong môi trường nhược trương thể cầu bị vỡ do hút nhiều nước.
- Tế bào thực vật: có thành xenlulose nên không bị lyzozim phá hủy, tế bào hút nước nhưng không thay đổi hình dạng.
- Tế bào động vật: Không có thành tế bào nên không chịu tác động của lyzozim. Trong môi trường nhược trương, tế bào hút nước, tăng thể tích và vỡ ra.

Câu 3.

- a. Vi khuẩn có những đặc điểm gì để thích nghi cao nhất với môi trường sống?
- b. Khi chữa các bệnh nhiễm khuẩn bằng chất kháng sinh, người ta nhận thấy có hiện tượng vi khuẩn “quen thuốc”, làm cho tác dụng diệt khuẩn của thuốc nhanh chóng giảm hiệu lực. Nêu các cơ chế làm cho gen kháng thuốc kháng sinh được nhân rộng trong quần thể vi khuẩn.

Trả lời:

a.

- Tỷ lệ S/V lớn → hấp thụ và chuyển hoá vật chất nhanh.
- Hệ gen đơn giản → dễ phát sinh và biểu hiện đột biến.
- Thành TB duy trì được áp suất thẩm thấu.
- Có khả năng hình thành nội bào tử khi gặp điều kiện bất lợi.
- Một số vi khuẩn có plasmid mang một số gen quy định khả năng đặc biệt: chống chịu, kháng thuốc...
- Một số vi khuẩn có hệ thống bơm ion (K^+ hoặc các ion khác) để có thể sống ở môi trường có nồng độ muối cao.
- Một số vi khuẩn có roi (tiên mao) giúp nó di chuyển định hướng trong môi trường, có nhung mao giúp bám dính trên bề mặt, nhung mao giới tính tạo cầu tiếp hợp.
- Một số VK gây bệnh có khả năng hình thành màng nhầy để hạn chế thực bào của bạch cầu

b.

- Đột biến luôn xảy ra và gen kháng thuốc kháng sinh có thể tồn tại sẵn trong quần thể vi khuẩn.
- Chọn lọc tự nhiên có tác dụng phân hóa khả năng sống sót và sinh sản, làm cho những “cá thể” vi khuẩn có kiểu gen kháng thuốc tốt hơn sẽ sống sót nhiều hơn và truyền gen kháng thuốc cho con cháu chúng (di truyền dọc).
- Mặc dù có hình thức sinh sản chủ yếu là trực phân (sinh sản vô tính), nhưng vi khuẩn

đồng thời có một số hình thức “sinh sản hữu tính giả” đó là tiếp hợp, tải nạp và biến nạp (di truyền ngang), làm gen kháng thuốc dễ dàng phát tán trong quần thể vi khuẩn.

Câu 4.

a. Một số chất kháng sinh có thể ức chế sự tổng hợp prôtêin ở vi khuẩn. Tuy nhiên, cơ chế tổng hợp prôtêin của vi khuẩn và tế bào nhân thực đều sử dụng ribôxôm và các ARN. Vậy làm thế nào các kháng sinh loại này có thể tấn công chính xác vào quá trình dịch mã của vi khuẩn? Những kháng sinh này có gây độc với cơ thể người hay không?

b. Có một số loại bệnh ở thực vật và động vật đã gây thiệt hại cho ngành nông nghiệp một số nước trên thế giới. Ví dụ: bệnh "bò điên" ở Anh; bệnh còi cọc ở cây dừa. Người ta cho rằng nhân tố gây bệnh là các tác nhân lây nhiễm còn nhỏ hơn cả virut. Hãy cho biết các nhân tố đó là nhân tố nào?

Trả lời:

a	- Trong cơ chế tổng hợp prôtêin của vi khuẩn và tế bào nhân thực đều sử dụng ribôxôm và các ARN. Tuy nhiên các ribôxôm nhân sơ khác các ribôxôm nhân chuẩn về cấu trúc và kích thước: + ribôxôm nhân sơ là ribôxôm 70S cấu tạo từ hai tiểu phần 30S và 50S. + ribôxôm nhân thực là ribôxôm 80S cấu tạo từ hai tiểu phần 60S và 40S. Do đó, các kháng sinh loại này có thể tấn công chọn lọc vào sự dịch mã của vi khuẩn bằng cách tấn công vào các tiểu phần của ribôxôm vi khuẩn. - Các kháng sinh này có thể gây độc với cơ thể người nếu chúng tác động lên ti thể vì trong ti thể cũng có các ribôxôm 70S tương tự ribôxôm nhân sơ.
b	Nhân tố đó là Viroit và Prion. + Viroit là phân tử ARN đơn, kép vòng, không được bao bọc bởi protêin, có khả năng nhân lên trong tế bào thực vật. + Là tác nhân gây bệnh chỉ được cấu tạo bởi protêin không có axit nuclêic.

Câu 5:

a. Nêu những điểm khác biệt chính giữa hình thức sinh sản phân đôi ở vi khuẩn với nguyên phân ?

b. Trong những năm gần đây, các phương tiện thông tin đại chúng thông báo nhiều bệnh mới lạ ở người và động vật gây nên bởi các loại virut. Hãy đưa ra 2 nguyên nhân chính dẫn đến hiện tượng này.

Trả lời

a	- Sinh sản phân đôi ở vi khuẩn với nguyên phân có một số điểm khác biệt chính:
---	--

	sinh sản phân đôi không hình thành thoi vô sắc, không có các pha và các kì như nguyên phân.
b	- Do các virus có sẵn bị đột biến thành các virus gây bệnh mới. Nhiều loại virus rất dễ bị đột biến tạo nên nhiều loại virus khác nhau - Do sự chuyển đổi virus từ vật chủ này sang vật chủ khác

Câu 6:

a. Tại sao virus kí sinh trên thực vật không có khả năng tự nhiễm vào tế bào thực vật mà phải nhờ côn trùng hoặc qua các vết xước? Tại sao khi sử dụng vắc xin phòng chống một loại virus gây bệnh ở động vật có vật chất di truyền là ARN thì hiệu quả thường thấp?

b. Nêu cấu tạo chính và chức năng của nội bào tử ?

Trả lời

a	- Virus kí sinh trên thực vật không có khả năng tự nhiễm vào tế bào thực vật mà phải nhờ côn trùng hoặc qua các vết xước, bởi vì: thành tế bào thực vật dày và không có thụ thể nên đa số virus xâm nhập vào tế bào thực vật nhờ côn trùng (chúng ăn lá, hút nhựa cây bị bệnh rồi truyền sang cây lành); một số virus khác xâm nhập qua các vết xước. - Khi sử dụng vắc xin phòng chống một loại virus gây bệnh ở động vật có vật chất di truyền là ARN thì hiệu quả thường thấp vì: + Do ARN có cấu trúc mạch đơn, kém bền vững hơn nên tần số phát sinh đột biến cao vì vậy đặc tính kháng nguyên dễ thay đổi. + Trong khi đó, quy trình nghiên cứu và sản xuất vắc xin cần thời gian nhất định và chỉ có tác dụng khi đặc tính kháng nguyên của virus không thay đổi.
b	- Cấu tạo: nội bào tử không phải là hình thức sinh sản mà chỉ là dạng nghỉ của tế bào, nội bào tử có lớp vỏ dày và chứa canxiđipicolinat. - Chức năng: bảo vệ tế bào khi gặp điều kiện bất lợi do nó có tính kháng nhiệt, kháng bức xạ, hóa chất, áp suất thẩm thấu...

Câu 7: Nêu thành phần hóa học và tác dụng của lớp màng nhầy ở vi khuẩn. Có phải mọi tế bào vi khuẩn đều có lớp màng nhầy không? Cho ví dụ.

Trả lời :

+ Thành phần hoá học: Màng nhầy vi khuẩn có thành phần trên 90% là nước, polisaccarit, ở một số vi khuẩn có thêm một ít lipôprôtêin.

+ Tác dụng: Bảo vệ vi khuẩn, tăng khả năng kết dính, tăng độ lực, hạn chế thực bào.

+ Không phải mọi vi khuẩn đều có màng nhầy.

+ Ví dụ:

Vi khuẩn nhiệt thán hình thành màng nhầy khi có prôtêin động vật.

Vi khuẩn gây bệnh viêm màng phổi chỉ hình thành màng nhầy khi xâm nhập vào cơ thể động vật, khi ở ngoài không có màng nhầy.

Câu 8:

a. Trong hoạt động sống bình thường, màng sinh chất của vi khuẩn có thể có những kiểu biến đổi về mặt cấu trúc như thế nào? Chức năng của mỗi kiểu biến đổi đó?

b. Vi khuẩn có những đặc điểm gì để thích nghi cao nhất với môi trường sống?

Trả lời:

a. Các kiểu biến thái của màng sinh chất và chức năng:

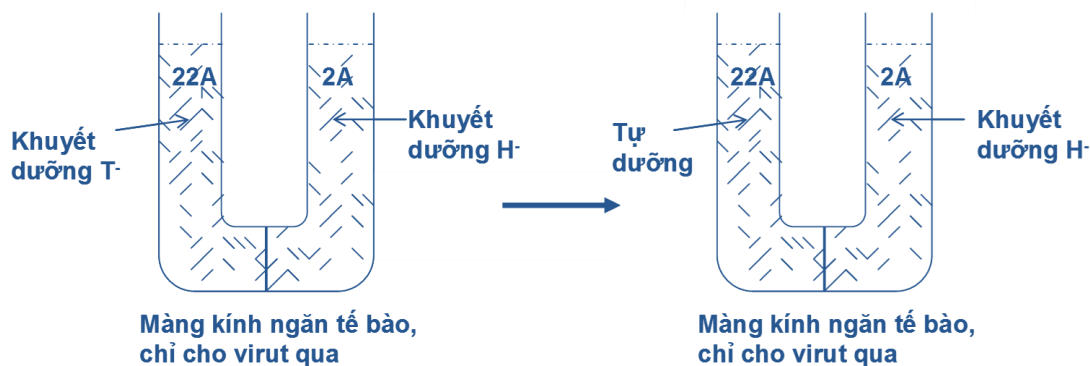
- MSC gấp nếp tạo mêzôxôm → định vị ADN, giúp phân chia tế bào.
- MSC tạo các túi chứa hạt dự trữ (nitrogenaza..) → cố định đạm.
- MSC gấp nếp tạo các tilacôit (vi khuẩn lam) → chứa sắc tố quang hợp, giúp vi khuẩn quang hợp.

b. Đặc điểm:

- Tỷ lệ S/V lớn → hấp thụ và chuyển hoá vật chất nhanh.
- Hệ gen đơn giản → dễ phát sinh và biểu hiện đột biến.
- Thành TB duy trì được áp suất thẩm thấu.
- Có khả năng hình thành nội bào tử khi gặp điều kiện bất lợi.
- Một số vi khuẩn có plasmid mang một số gen quy định khả năng đặc biệt: chống chịu, kháng thuốc...
- Một số vi khuẩn có hệ thống bơm ion (K^+ hoặc các ion khác) để có thể sống ở môi trường có nồng độ muối cao.

Câu 9: Tải nạp là hiện tượng chuyển vật liệu di truyền từ vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận bởi các phage.

Thí nghiệm của Lederberg và Zinder (1951) với 2 chủng khuyết dưỡng Salmonella: Chủng 22A khuyết dưỡng Tryptophan (T^-) và chủng 2A khuyết dưỡng với Histadin (H^-). Bố trí thí nghiệm như hình sau:



Thí nghiệm của Zinder và Lederberg

- Mô tả cách bố trí thí nghiệm.
- Đưa ra kết quả thí nghiệm và giải thích.

Trả lời:

a	Mô tả cách bố trí thí nghiệm: - Sử dụng 1 ống thủy tinh hình chữ U có ngăn ở giữa bằng màng lọc vi khuẩn nhưng phage vẫn chui qua được. - Bên trái ống chứa chủng vi khuẩn 22A khuyết dưỡng tryptophan (T^-) - Bên phải ống chứa chủng vi khuẩn 2A khuyết dưỡng histadin (H^-). Sau 1 thời gian, quan sát kết quả thí nghiệm.
b	- Kết quả thí nghiệm: Sau một thời gian, ở nhánh chứa chủng 22A có xuất hiện các chủng tự dưỡng và không thấy tế bào tự dưỡng nào ở nhánh chứa chủng 2A. - Giải thích: Các chủng 22A mang các phage (P_{22}) $\rightarrow$ P_{22} chui qua màng kính và làm tan tế bào 2A $\rightarrow$ P_{22} mang gen tổng hợp tryptophan của chủng 2A sang nhánh kia và truyền cho một số tế bào chủng 22A $\rightarrow$ trở thành tế bào tự dưỡng.

Câu 10: Thời gian hoàn thành 1 chu kì tế bào của vi khuẩn E.coli trong điều kiện thích hợp khoảng 20 phút, còn tế bào nhân chuẩn nhanh nhất cũng phải 60 phút. Hãy giải thích vì sao vi khuẩn lại phân chia nhanh hơn tế bào của sinh vật nhân chuẩn.

Trả lời:

Vì:

- Nhân tế bào nhân sơ không có màng bao bọc, ít bào quan nên tái lập tế bào nhanh.
- Vật chất di truyền ít hơn so với tế bào nhân chuẩn dẫn đến tốc độ nhân đôi, phiên mã nhanh.

-
- Kích thước tế bào nhỏ dẫn đến tỉ lệ s/v lớn, do vậy sự trao đổi chất nhanh tốc độ sinh trưởng nhanh.
 - Hệ gen của vi khuẩn là gen không phân mảnh nên giảm thời gian hoàn thiện mARN, phiên mã và dịch mã có thể diễn ra đồng thời.
 - Cấu trúc ADN vòng không liên kết protein nên tốc độ giãn xoắn nhanh hơn.

Câu 11:

Dựa vào kiến thức đã học về cấu tạo các nhóm tế bào vi sinh vật hãy:

- Giải thích vì sao chất kháng sinh penicilin không tiêu diệt được *Mycoplasma*?
- Nêu sự khác nhau về cách thức tác động vào thành tế bào vi khuẩn của các chất sau đây: enzym lizozim, enzym endo muropeptidaza, thuốc kháng sinh penicilin?

Trả lời:

- Do *Mycoplasma* không có cấu tạo thành tế bào do đó không chịu tác động của chất kháng sinh.
- Các cách tác động lên thành tế bào của các chất:
 - Lizozim: cắt đứt liên kết NAG và NAM làm cấu trúc murein bị phá vỡ → phá vỡ thành tế bào. Đây là tác nhân diệt khuẩn.
 - Endo muropeptidaza: ức chế sự hình thành của các mạch peptit → ức chế quá trình sinh trưởng của vi khuẩn.
 - Penixilin: tác động vào việc hình thành cầu nối các chuỗi bên tetrapeptit trong quá trình sinh trưởng của vi khuẩn.

Câu 12:

a. Nếu có 2 chủng cúm H₂N₁, H₇ N₃ cùng lúc nhiễm vào cùng một tế bào thì có thể tạo ra chủng cúm nào? Nếu chủng H₂N₁ đã có ở người và chủng H₇N₃ chỉ gây bệnh ở gia cầm, em hãy dự đoán chủng mới nào sẽ gây bệnh đến con người?

b. Tại sao virút có genom ARN âm nhất thiết phải mang theo ARN-polimeraza phụ thuộc ARN?

Trả lời:

a.

Chúng tạo ra các chủng H₂N₁, H₇ N₃, H₂N₃, H₇ N₁.

Chủng H₂ N₁ là chủng đã có ở người nên có thể gây dịch bệnh cho người. H₃ N₇ là chủng cúm gia cầm, không gây bệnh ở người. H₂N₃, H₇N₁ là chủng mới. Nếu nhiễm vào người kháng nguyên của chúng hoàn toàn mới với người nên có thể gây dịch bệnh lớn toàn vùng, có thể là đại dịch rất nguy hiểm.

b. Vi rút cần mang theo ARN-polimeraza phụ thuộc ARN vì tế bào không có enzym này. Virút tổng hợp enzym này từ trước khi lây nhiễm, sau đó đưa vào hạt virut.

Câu 13:

a. Hệ gen của các retrovirut (như HIV) và virut ADN kép có enzym phiên mã ngược (như HBV) đều có enzym phiên mã ngược nhưng chúng lại có cơ chế tái bản vật chất di truyền khác nhau. Em hãy chỉ ra những điểm khác biệt đó.

b. Tại sao các phagơ lây nhiễm vào tế bào vi khuẩn lại không lây nhiễm tế bào vi khuẩn cổ?

Trả lời:

a.

Virut retro phiên mã ngược (HIV) Hệ gen: 2 sợi ARN (+) giống nhau B1: Sử dụng enzym phiên mã ngược của virut (<i>ADN-pol phụ thuộc virut</i>) để tổng hợp ADN kép (cADN) trong tế bào vật chủ B2: ADN kép tích hợp vào NST trong nhân rồi từ đó phiên mã tạo ARN nhờ enzym của tế bào chủ (<i>ARN pol phụ thuộc ADN của tế bào</i>).	Virut ADN kép phiên mã ngược (HBV) Hệ gen: ADN kép B1: Sử dụng enzym phiên mã của tế bào (<i>ARN pol phụ thuộc ADN của tế bào</i>) để tổng hợp tiền genom virut là ARN (+) trong nhân tế bào B2: Ra tế bào vật chủ, dùng enzym phiên mã ngược của virut (<i>ARN-pol phụ thuộc virut</i>) để phiên mã ARN (+) thành ADN (-) rồi sau đó tạo ADN kép.
b. Phagơ lây nhiễm vào vi khuẩn bằng cách tiết lizozim làm tan một phần thành tế bào murêin vi khuẩn. Thành tế bào vi khuẩn cổ không phải murêin → không bị phagơ lây nhiễm.	

Câu 14: Trước kia người ta hay chuyển gen của người vào tế bào vi khuẩn để sản sinh những protein nhất định của người với số lượng lớn. Tuy nhiên, các nhà sinh học phân tử hiện nay lại ưa dùng tế bào nấm men làm tế bào để chuyển gen của người vào hơn là dùng tế bào vi khuẩn. Giải thích tại sao?

Trả lời:

Vì tế bào nấm men là tế bào nhân chuẩn, nên có enzym loại bỏ intron khỏi ARN trong quá trình tinh chế để tạo mARN trưởng thành, còn tế bào nhân sơ như vi khuẩn do chúng không có gen phân mảnh nên không có enzym cắt intron.

Câu 15:

Các câu sau đúng hay sai? Giải thích?

-
1. Vi khuẩn Gram dương không có axit teicoic trong thành tế bào.
 2. Vi khuẩn Gram dương mẫn cảm với các kháng sinh nhóm β -lactam, ví dụ penicillin
 3. Vi khuẩn Gram dương, thuật ngữ “bào tử nghỉ” và “tiền bào tử” diễn tả cùng một trạng thái của quá trình hình thành bào tử.
 4. Vi nấm bao gồm các nhóm nấm: nấm đơn bào, nấm sợi và nấm quả thể.

Trả lời:

1. Sai, có axit teicoic, đặc biệt nhiều ở xạ khuẩn.
2. Đúng, các kháng sinh có vòng β -lactam có khả năng phong bế riboxom (tiểu phần bé), nên không thể dịch mã hình thành mạch peptit ngắn của thành, vi khuẩn không tạo được thành mới nên không thể phân chia.
3. Sai, thuật ngữ “bào tử nghỉ” và “tiền bào tử” diễn tả 2 giai đoạn khác nhau: “tiền bào tử” diễn tả giai đoạn mới hình thành vách ngăn dẫn đến hình thành bào tử độc lập ở trong tế bào sinh dưỡng, hợp chất dipicolinat canxi mới bắt đầu hình thành. “Bào tử nghỉ” chỉ giai đoạn kết thúc hình thành bào tử.
4. Sai, vi nấm là thuật ngữ chỉ các nấm hiển vi, bao gồm nấm đơn bào và nấm mốc.

Câu 16. Trong hoạt động sống bình thường, màng sinh chất của vi khuẩn có thể có những kiểu biến đổi về mặt cấu trúc như thế nào? Chức năng của mỗi kiểu biến đổi đó?

Trả lời:

- Màng sinh chất gấp nếp tạo mêzôxôm để định vị ADN, giúp phân chia tế bào.
- Màng sinh chất tạo các túi chứa hạt dự trữ (nitrogenaza) trong quá trình cố định đạm.
- Màng sinh chất gấp nếp tạo các tilacoit (vi khuẩn lam) chứa sắc tố quang hợp, giúp vi khuẩn quang hợp.

Câu 17: Vi khuẩn có những đặc điểm cơ bản nào mà người ta sử dụng chúng trong các nghiên cứu di truyền học hiện đại?

Trả lời:

Những đặc điểm cơ bản của vi khuẩn.

- Bộ gen đơn bội, thường có 1 NST.
- Sinh sản nhanh, dễ nuôi cấy trong phòng thí nghiệm.
- Dễ tạo ra nhiều dòng biến dị, là vật liệu sinh học nghiên cứu các quá trình biến nạp, tải nạp và tiếp hợp.

II. Bài tập:

Bài 1.

1.

a. Trong một thực nghiệm biến nạp, thể cho là $ara^+nic^+gal^+$ và thể nhận là $ara^-nic^-gal^-$. Các thể biến nạp ara được chọn và sau đó kiểm tra tiếp. Kết quả cho thấy 40% là ara^+gal^+ và 5% là ara^+nic^+ . Xác định trật tự có thể của các gen.

b. Bạn có thể chỉ cần làm thêm một thực nghiệm biến nạp để xác định trật tự gen. Bạn phải sử dụng cùng thể cho và thể nhận, nhưng có thể thay đổi quá trình chọn lọc các thể biến nạp đầu tiên. Bạn phải làm gì và kết quả như thế nào khi xác định trật tự gen mà bạn cần?

Trả lời:

1. a. $ara\ nic\ gal$ hoặc $nic\ ara\ gal$.

b. Chọn lọc theo gal , sau đó đếm số khuẩn lạc gal^+ara^+ và gal^+nic^+ .

Nếu trật tự $ara\ nic\ gal$ là đúng thì số khuẩn lạc $gal^+ara^+ < gal^+nic^+$. Vì nic và ara đồng biến nạp 40% thời gian nên chúng phải gần và liền kề nhau. Nếu gal ở giữa thì nic^+gal^+ phải có tần số đồng biến nạp lớn hơn nic^+ara^+ (KN 9-A).

Nếu chúng ta chọn lọc theo gal^+ và thứ tự là $ara\ nic\ gal$, thì kiểu gen $gal^+ara^+nic^-$ chỉ cần hai trao đổi chéo đồng thời, trong khi gal^+ara^+ chỉ đòi hỏi một trao đổi chéo. Nếu trật tự là $nic\ ara\ gal$ thì gal^+ara^+ chỉ cần một trao đổi chéo và tần số thu được phải lớn hơn gal^+nic^+ (KN 9-C).

Bài 2.

2. ADN từ một chủng $a^+b^+c^+$ được sử dụng để chuyển sang chủng $a^-b^-c^-$. Số lượng từng kiểu gen xuất hiện dưới đây. Hãy xác định vị trí tương đối của các gen.

Kiểu gen	Số lượng
$a^+b^-c^-$	312
$a^-b^+c^-$	320
$a^-b^-c^+$	308
$a^+b^-c^+$	16
$a^+b^+c^+$	11
$a^+b^+c^-$	140
$a^-b^+c^+$	21

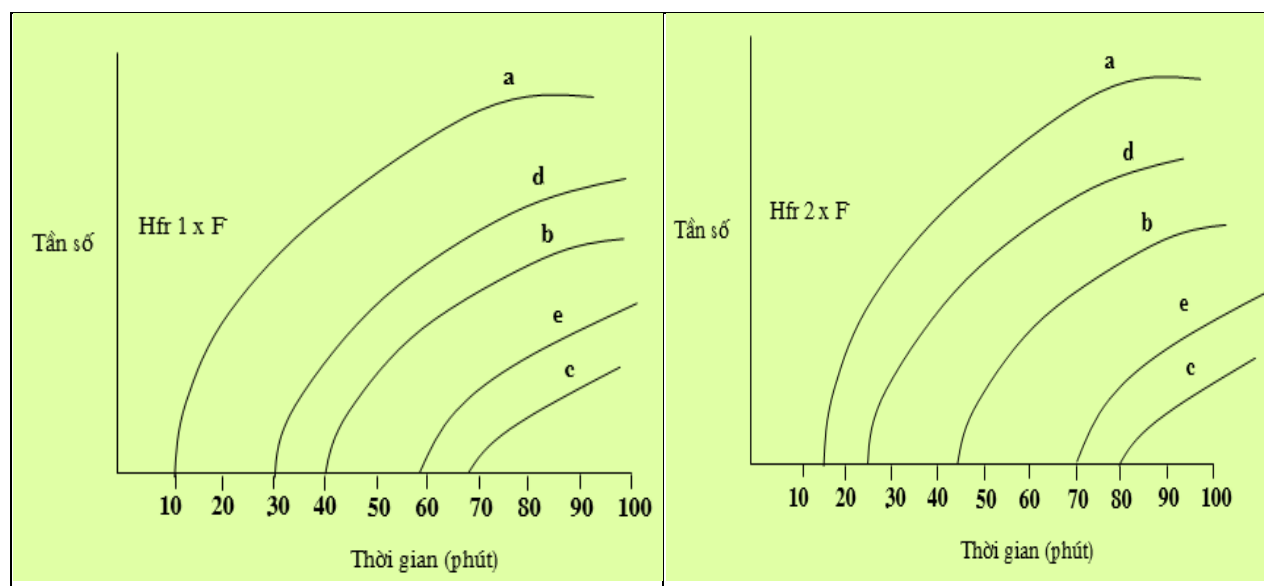
Trả lời:

2.. a và b gần nhau, c không liên kết với a và b .

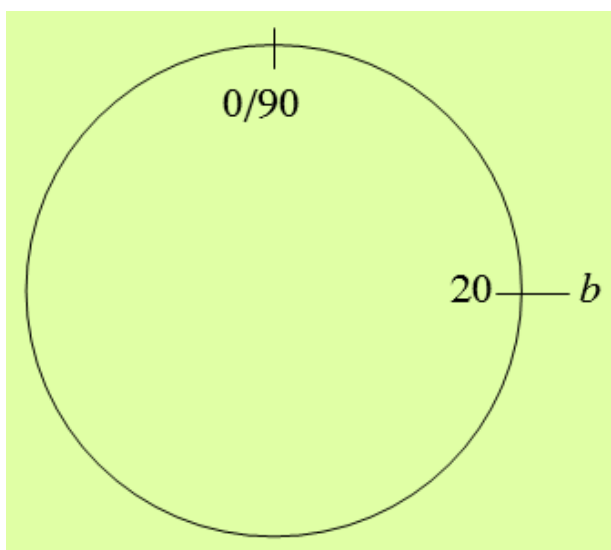
Chúng ta lưu ý rằng c^+ ít xuất hiện cùng với các gen khác cho thấy c rất xa a và b . Các gen không liên kết sẽ không nằm cùng một phân tử AND. Sự đồng biến nạp sẽ đòi hỏi 2 trao đổi chất đồng thời (KN 9-B).

Bài 3.

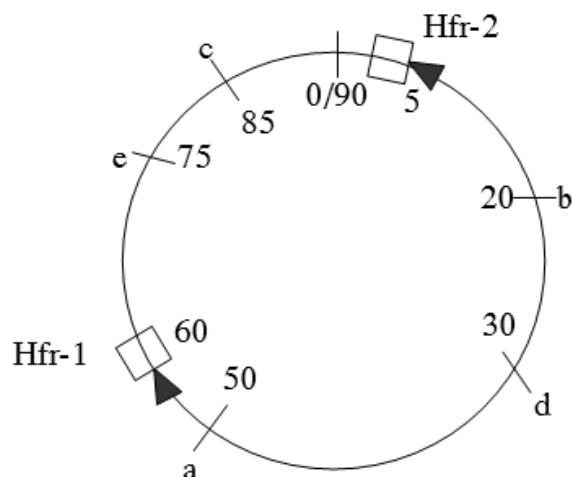
3. Hai chủng *Hfr* 1 và 2 đều là $a^+b^+c^+d^+e^+$ được lai với một chủng *F* là $a^-b^-c^-d^-e^-$. Các phép lai bị dừng ở từng giai đoạn cách nhau 5 phút và các kiểu gen của các thể tái tổ hợp được xác định. Kết quả như sau:



Hãy vẽ một bản đồ chứa tất cả các gen và cả hai nhân tố F. Thể hiện F trong các ô nhỏ và hướng truyền gen bằng mũi tên. Trên bản đồ chuẩn, gen b nằm cách điểm khởi đầu truyền gen 20 phút.



Trả lời:



Ở chủng 1, trật tự truyền gen, được xác định bởi sự xuất hiện gen đầu tiên, là $a\ d\ b\ c\ e$. Đối với chủng 2, trật tự là $b\ d\ a\ e\ c$. Nhiễm sắc thể vi khuẩn có dạng vòng.

$a-d = 20$ phút, $b-d = 10$ phút... Vì nhân tố F được truyền sau cùng và vì b (tại vị trí 20 phút) xuất hiện sau 40 phút tiếp hợp, nên nhân tố F ở thời điểm 60 phút, a cách nhân tố F 10 phút (tại vị trí 50 phút). Lý luận tương tự cho phép tìm ra các gen khác và nhân tố F thứ 2 (9-C).

Bài 4.

4. 8 đột biến trp^- độc lập nhau được phân lập. Tiến hành phép thử bổ trợ với các đột biến theo kiểu ghép đôi. Dựa trên kết quả thu được dưới đây, bạn có thể xác định được bao nhiêu gen và đột biến nào thuộc gen nào? (+ = bổ trợ, - = không bổ trợ).

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-	+	-	-	+	+	+	-
2		-	+	+	-	+	+	+
3			-	-	+	-	-	-
4				-	+	+	+	-
5					-	+	+	+
6						-	-	+
7							-	+
8								-

Trả lời:

4. 3 gen. Gen A: các đột biến 1, 4, 8; Gen B: các đột biến 2 và 5; Gen C: các đột biến 6 và 7.

Có lẽ thể đột biến 3 chứa một mất đoạn trùm lên các gen A và C. Hãy bắt đầu bằng việc tìm ra các đột biến không hỗ trợ cho nhau. Các đột biến này phải trong cùng một gen (KN 9-F). Các đột biến 2 và 5 trong cùng một gen. Đầu tiên chúng ta ngờ rằng các đột biến 1, 3, 4, 8 trong một gen và 6, 7 trong một gen khác. Nếu thể đột biến 3 thuộc gen A nó phải với 6 và 7. Điều đó không xảy ra.

Cách giải thích khác là đột biến 3 là một mất đoạn trùm lên A và C (KN 9-G). Khả năng khác là đột biến 3 có thể thuộc gen A nhưng là một đột biến cực (KN 9-J). Cả hai điều đó đều ngụ ý nói rằng trật tự của 3 gen là B A C.

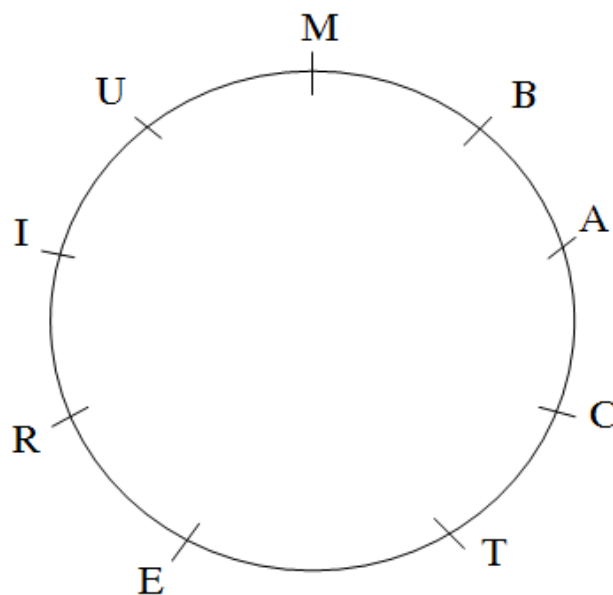
Bài 5.

5. Các chủng Hfr sau đây truyền các gen theo trật tự sau:

Chủng	Trật tự truyền gen (gen đầu tiên ở bên phải)
1	A C T E R
2	U I R E T
3	M B A C T
4	A B M U I

Hãy xác định trật tự các gen trên nhiễm sắc thể.

Trả lời:



Hãy sắp xếp theo trật tự để chúng trùng lên nhau:

1. *A C T E R*

2. *T E R I U*

3. *M B A C T*

4. *I U M B A*

Vì nhiễm sắc thể vi khuẩn có dạng vòng nên ta có trật tự biểu diễn ở hình trên (KN 9-C).

Bài 6.

6. Bạn phân lập được hai thể đột biến *rII* là *rII-1* và *rII-2* ở phage T4. *rII-1* không cho thể hồi biến kiểu dại và đột biến *rII-2* cho 4 thể hồi biến là *2rva*, *2rvb*, *2rvc*, *2rvd*. Mỗi thể hồi biến được lai với kiểu dại cho kết quả sau (+ = thể tái tổ hợp hồi biến kiểu dại):

rev a +

rev b -

rev c -

rev d +

a. Bản chất của đột biến *rII-1* và *rII-2*?

b. Bản chất của mỗi thể hồi biến?

Trả lời:

6. a. *rII-1* có thể là một mất đoạn và *rII-2* là một đột biến điểm.

b. Có lẽ các thể hồi biến biến *revb* và *revc* chứa đột biến tại điểm thứ hai.

Sự thiếu vắng các thể hồi biến gợi ý ta nghĩ đến một mất đoạn, do vậy *rII-1* có thể là một mất đoạn (KN 9-K). Nếu các thể tái tổ hợp kiểu dại nào được phục hồi từ các thể hồi biến, thì các thể hồi biến này có thể là đột biến ức chế hoặc là các đột biến vị trí thứ hai (KN 9-L).

Bài 7.

7. Trong một thí nghiệm tải nạp, thể cho là $d^+e^+f^+$, thể nhận là $d^-e^-f^-$; tiến hành chọn lọc theo f^+ . Kết quả thu được như sau, hãy xác định trật tự gen:

Kiểu gen	Số thể tải nạp
$d^+e^+f^+$	25
$d^+e^-f^+$	4
$d^-e^+f^+$	80
$d^-e^-f^+$	256

Trả lời:

7. *def*.

Chúng ta thấy rằng f và d đồng tải nạp gen ít nhất. Vì vậy d có lẽ nằm xa f và đòi hỏi 2 trao đổi chéo đồng thời (trao đổi chất kép) (KN 9-A, 9-B, 9-C). Chúng ta thấy rằng e và f có tần số đồng tải nạp cao, do vậy e gần f hơn d .

Bài 8.

8. Operon *trp* ở *E. coli* có trật tự sau: $p\ E\ C\ D\ B\ A$. Bạn tách được 3 thể đột biến *trp*⁻ độc lập nhau và tạo ra các thể lưỡng bội từng phần cho mỗi đột biến với $p^+E^+D^+C^+B^+A^+$; không thể lưỡng bội từng phần nào có thể tổng hợp được tryptophan. Ba vị trí khác nhau có thể có của các đột biến này là gì?

Trả lời:

8. Đột biến ở C , đột biến ở promoter, hoặc đột biến cực ở E hoặc D .

Vì đột biến không tạo ra sự bổ trợ với C^- nên nó có thể thuộc cùng một gen (KN 9-F). Nếu thể đột biến là p^- thì thể lưỡng bội là: $p^-E\ D\ C\ B\ A / p^+E\ D\ C^-B\ A$. ADN bên trên có thể không tạo ra ARN và sẽ không có sự bổ trợ (KN 9-J, xem chương 11). Một kiểu đột biến khác cũng sẽ không bổ trợ là một đột biến cực trong gen nằm trước C (KN 9-J).

Bài 9.

9. Có 9 chủng *his*⁻, ba trong số đó có những mất đoạn và 6 chủng có những đột biến điểm. Cấy 9 chủng trên môi trường tối thiểu và đếm số khuẩn lạc mọc (+ = mọc được).

1	2	3	4	5	6	7	8	9
+	-	+	+	-	+	-	+	+

Phage được nhiễm vào một trong 9 chủng và sau đó được sử dụng để tải nạp mỗi chủng mất đoạn. Các thể tải nạp từ mỗi phép lai được cấy trên môi trường tối thiểu và đếm các khuẩn lạc mọc (+ = thể tải nạp mọc được). Dựa trên kết quả sau, xác định:

a. Chủng nào là chủng đột biến mất đoạn.

b. Vị trí tương ứng của mỗi đột biến mất đoạn với mất đoạn khác ?

c. Vị trí tương ứng của 6 đột biến điểm.

	Chủng								
Mất đoạn	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	+	-	-	-	-	-	-	+	+
B	+	-	+	+	-	-	+	+	-
C	+	-	+	-	+	+	-	-	+

Trả lời:

9. Các chủng 2, 5, 7 là những mất đoạn.

5 _____ /////////////// _____
 7 _____ /////////////// _____
 2 _____ /////////////// _____
 * * * * * *
 1 9 6 3 4 8

Nuôi cấy trong môi trường tối thiểu cho phép phát hiện các thể hồi biến. Vì các mất đoạn không phục hồi được nên chúng không mọc được trên môi trường tối thiểu (KN9-K). Đã biết 2, 5, 7 là những mất đoạn, ta hãy phân biệt các chủng này từ bộ số liệu thứ hai.

	2	5	7
A	-	-	-
B	-	-	+
C	-	+	-

Chủng 2 không cho thể tái tổ hợp kiểu dại, vì vậy nó phải trù lên hai đột biến mất đoạn khác (KN 9-H). Các mất đoạn 5 và 7 không trù lên nhau. Thể đột biến 2 cho kết quả tương tự chủng A nên $A=2$. Vì B tái tổ hợp với 7, nên B phải là 5; do đó C là 7. Thể đột biến 9 không cho các tái tổ hợp kiểu dại với các mất đoạn 2 và 7. Nó phải nằm ở vùng được định vị duy nhất trong đột biến 5 (KN 9-I). Lý luận tương tự đối với đột biến 8: 8 ở vùng duy nhất với 7, 3 ở vùng duy nhất với 2. Các đột biến 4 và 6 phải nằm trong vùng mất đoạn chung cho 2 và 7 cũng như cho 2 và 5 tương ứng. Đột biến 1 cho các thể tái tổ hợp kiểu dại với tất cả các mất đoạn, nó phải nằm bên ngoài tất cả các vùng mất đoạn. Nó có thể nằm ở một trong hai đầu tận cùng của bản đồ.

Bài 10.

10. Bạn phân lập được một số đột biến điểm (ký hiệu từ a đến g) ở vùng rII của phage T4. Các phép lai ghép đôi cho tỷ lệ phần trăm các viết tan kiểu dại như sau:

Phép lai	%kiểu dại	Phép lai	% kiểu dại
$a \times b$	0.5	$a \times c$	0.3
$a \times d$	0.8	$a \times f$	0.3
$b \times e$	0.4	$b \times d$	1.3
$b \times f$	0.2	$c \times d$	0.5
$c \times g$	0.8	$e \times g$	1.0
$b \times g$	1.6	$g \times d$	0.3

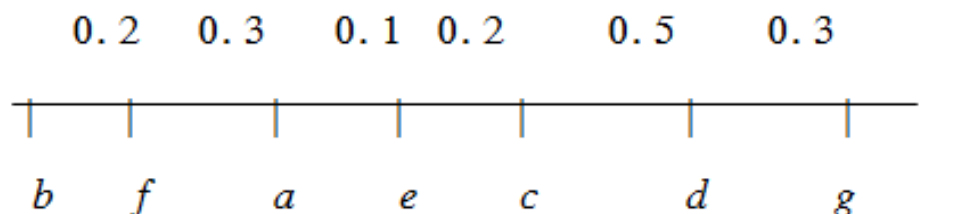
Bạn cũng lai mỗi đột biến điểm với mỗi đột biến mất đoạn và tính các thể tái tổ hợp kiểu dại. Kết quả thu được dưới đây (+ = thể tái tổ hợp kiểu dại, - = thể tái tổ hợp đột biến).

Mất đoạn	Đột biến điểm						
	a	b	c	d	e	f	g
1	-	+	-	+	-	+	+
2	+	+	-	-	+	+	-
3	-	-	-	+	-	-	+
4	+	+	-	-	+	+	+
5	+	+	-	-	-	+	+

- Vẽ bản đồ các đột biến điểm, tính khoảng cách.
- Xác định vị trí của các mất đoạn tương ứng với các đột biến điểm.
- Các thể đột biến a và e bổ trợ với nhau và e được biết là thuộc $rIIB$. Các đột biến nào ở $rIIA$ và đột biến nào thuộc $rIIB$?
- Những tổ hợp của các mất đoạn nào sẽ tạo ra các thể tái tổ hợp kiểu đại?

Trả lời:

10. a.



b.

- _____  _____
- _____  _____
-  _____
- _____  _____
- _____  _____

c. a, b, f ở trong $rIIA$; e, c, d và g ở trong $rIIB$.

d. Không tổ hợp nào.

Các đột biến b và d phải xa nhau, b và g cũng vậy, e và f phải nằm giữa b và d :

_____ b _____ 0.2 _____ f _____ 0.4 _____ e _____ d _____ 0.3 _____ g

Bây giờ hãy xác định vị trí của a và c . Vì $a-b = 0,5$ nên a phải cách f là 0,3 về bên phải. Đột biến c phải ở bên phải a , hoặc nó có thể cùng vị trí với f . Đột biến c phải ở bên phải a và khoảng cách được cộng kế tiếp (KN 9-E). Hãy tìm các dấu (-) trong các phép lai; các đột biến này sẽ bị phủ bởi các mất đoạn riêng. Mất đoạn 1 phải kéo dài đến các đột biến a , c và e vì không có thể tái tổ hợp kiểu đại nào xuất hiện (KN 9-I). Tương tự, đột biến 2 phải kéo dài đến c , d , g . Lý luận tương tự cho phép xác định các mất đoạn 3-5. Vì a bổ trợ e , vậy a phải thuộc $rIIA$, cũng giống như b và f (KN 9-F). Tất cả các mất đoạn đều thiếu c , do vậy không thể sinh ra các thể tái tổ hợp kiểu đại (KN 9-H).

Bài 11.

11. Có 3 thể đột biến *lac* (ký hiệu từ a đến c). Bạn thực hiện các thí nghiệm tải nạp và thu được số khuẩn lạc kiểu đại như sau:

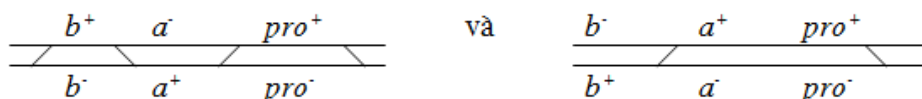
Thể cho	Thể nhận	Số khuẩn lạc kiểu đại
<i>lac a pro⁺</i>	<i>lac b⁻ pro⁻</i>	93
<i>lac b⁻ pro⁺</i>	<i>lac a⁻ pro⁻</i>	27
<i>lac a⁻ pro⁺</i>	<i>lac c⁻ pro⁻</i>	15
<i>lac c⁻ pro⁺</i>	<i>lac a⁻ pro⁻</i>	64
<i>lac b⁻ pro⁺</i>	<i>lac c⁻ pro⁻</i>	10
<i>lac c⁻ pro⁺</i>	<i>lac b⁻ pro⁻</i>	98

Xác định trật tự các đột biến *lac* so với gen *pro*.

Trả lời:

11. $c a b pro$.

Chúng ta phải xây dựng sơ đồ tải nạp, sử dụng 2 trật tự gen và tìm ra trật tự sẽ tạo ra và kiểu đại bằng trao đổi chất kép. Trật tự này sẽ cho ra một số ít thể tải nạp kiểu đại (KN 9-C). Giả sử rằng trật tự đó là $b a pro$. Những phép đầu là:



Nếu trật tự như trên, phép lai thứ nhất dự đoán có số lượng thể tái tổ hợp kiểu dại nhỏ hơn ở phép lai thứ 2 vì cần 2 cặp trao đổi chéo đồng thời cho phép lai 1. Kết quả này không thấy có, do vậy b phải nằm gần pro hơn a . Lý luận tương tự để tìm ra trật tự của c tương ứng với a và b .

Bài 12.

12. Thể đột biến phage 1 gây nhiễm vào chủng vi khuẩn B và D, thể đột biến 2 được gây nhiễm vào A và D. Chỉ phage kiểu dại mới sinh trưởng được ở chủng C. Cả hai chủng phage đột biến được sử dụng để lây nhiễm đồng thời vào D. Phage thể hệ con được pha loãng 10^{-7} và cấy vào D, thu được 200 vết tan. Phage thể hệ con được pha loãng 10^{-6} và cấy vào chủng C thu được 30 vết tan. Sự tái tổ hợp giữa thể đột biến 1 và 2 là gì ?

Trả lời:

12. 3%.

Chúng ta phải tính tổng số cá thể đời con và số con tái tổ hợp. Vì tất cả các phage sinh trưởng trong chủng D, nên số khuẩn lạc sinh trưởng được ở đây phải là tổng số cá thể đời con, đó là 200×10^7 . Kiểu dại chỉ sinh trưởng ở chủng C, do vậy các vết tan này phải là dạng tái tổ hợp. Tuy nhiên, số lượng thu được chỉ bằng 1/2 tổng số thể tái tổ hợp, vì các thể đột biến kép sẽ không sinh trưởng được. Số thể tái tổ hợp là $2(30)(10^6) = 60 \times 10^6$. Suy ra

$$RF = (60 \times 10^6) / (200 \times 10^7) \times 100 = 3\% \text{ (KN 9-E).}$$

Bài 13:

Ở nấm men, các phép lai thu được kết quả như dưới đây. Hãy xác định trật tự các gen và khoảng cách giữa chúng.

$a^+b^- \times a^-b^+$	$a^+c^- \times a^-c^+$	$b^+c^- \times b^-c^+$
a^+b^- 490	a^+c^- 425	b^+c^- 425
a^-b^+ 500	a^-c^+ 417	b^-c^+ 425
a^+b^+ 6	a^+c^+ 85	b^+c^+ 70
a^-b^- 4	a^-c^- 73	b^-c^- 80
1000	1000	1000

Trả lời:

Ở mỗi phép lai, hai lớp cuối cùng là những thể tái tổ hợp. Vì vậy:

$$\begin{aligned}\text{Khoảng cách } a-b &= 10/1000 \times 100 = 1 \text{ đơn vị bản đồ} \\ a-c &= 158/1000 \times 100 = 15,8 \text{ đơn vị bản đồ} \\ b-c &= 150/1000 \times 100 = 15 \text{ đơn vị bản đồ}\end{aligned}$$

Do đó trật tự các gen là:

$$\begin{array}{ccccccc} a & 1 & b & & 15 & & c \\ \hline\end{array}$$

Bài 14:

Trong phép lai: $leu^+ his^- \times leu^- his^+$ dưới đây, hãy phân biệt các dạng bào tử giống và khác bố mẹ (hoặc bộ bốn) và cho thấy dạng bào tử nào liên quan đến sự tái tổ hợp giữa gen và tâm động.

I	II	III
$Leu^+ his^-$	$leu^+ his^+$	$leu^+ his^-$
$leu^+ his^+$	$leu^+ his^+$	$leu^+ his^+$
$leu^- his^+$	$leu^- his^-$	$leu^- his^-$
$leu^- his^+$	$leu^- his^-$	$leu^- his^+$

Trả lời:

Các lớp I và II chứa hai dạng bào tử và các bào tử ở lớp I là giống bố mẹ. Vì vậy lớp I thuộc kiểu hai giống bố mẹ (parental ditype -PD) và lớp II là kiểu hai khác bố mẹ (non-parental ditype-NPD). Lớp III chứa 4 kiểu bào tử, do vậy nó là kiểu bốn (tetatype - TT), là kết quả từ sự tái tổ hợp giữa một gen và tâm động.

Bài 15:

Xét các phép lai sau ở *Clamydomonas*. Đối với mỗi phép lai, xác định xem 2 gen có liên kết không ?

	PD	NPD	TT	Tổng số
$ac^+ X + arg$	51	49	0	100
$ac^+ X + pab$	88	0	12	100
$ac^+ X + pf$	62	6	32	100
$pab + X + pf$	64	4	32	100
$pf + X + thi$	29	3	68	100

Trả lời:

So sánh số lượng PD và NPD ở mỗi phép lai. Nếu $PD \gg NPD$ thì 2 gen liên kết nhau. Do đó gen *ac*, *pab*, *pf* và *thi* liên kết nhau, *arg* không liên kết với các gen này.

Bài 16:

Ở *Neurospora*, 3 gen: *b*, *c*, *d* được lai theo các tổ hợp từng cặp. Dựa trên kết quả dưới đây, hãy tính khoảng cách giữa tâm động và gen:

<i>b</i> +	x	+ <i>c</i>							
	↓								
<i>b</i> +	++	+ <i>c</i>	<i>cd</i>	<i>c</i> +	<i>cd</i>	<i>cd</i>	<i>c</i> +	<i>cd</i>	<i>c</i> +
<i>b</i> +	++	++	+ <i>d</i>	<i>c</i> +	<i>cd</i>	<i>c</i> +	+ <i>d</i>	++	+ <i>d</i>
+ <i>c</i>	<i>bc</i>	<i>bc</i>	++	+ <i>d</i>	++	++	+ <i>d</i>	++	++
+ <i>c</i>	<i>bc</i>	<i>b</i> +	<i>c</i> +	+ <i>d</i>	++	+ <i>d</i>	<i>c</i> +	<i>cd</i>	<i>cd</i>
70	4	26	15	42	2	30	5	1	5

Trả lời:

Hãy tìm sự phân ly ở lần phân chia thứ 2. Chúng ta không thấy có sự phân ly đối với *b*, do đó khoảng cách từ *b* tới tâm động bằng 0, hay *b* liên kết với tâm động. Ở cả 2 phép lai, chúng ta thấy có 26 bào tử có phân ly ở lần phân chia thứ 2 đối với *c*. Vì vậy khoảng cách giữa *c* và tâm động bằng $1/2(26)/100 \times 100 = 13$ đơn vị bản đồ.

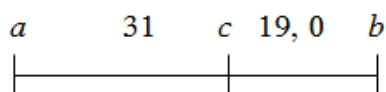
Đối với *d*, chúng ta thấy có 41 bào tử như vậy. Do đó khoảng cách từ *d* tới tâm động bằng $1/2(41)/100 \times 100 = 20,5$ đơn vị bản đồ.

Bài 17:

Các bào tử ngẫu nhiên sau đây nhận được từ phép lai *a*++ X ++*b**c*. Hãy lập bản đồ 3 gen đó.

<i>abc</i>	52	<i>a</i> ++	102
<i>ab</i> +	34	+ <i>b</i> +	8
+ <i>a</i> <i>c</i>	6	++ <i>c</i>	28
+ <i>bc</i>	112	+++	58
Tổng số: 400			

Trả lời:



Tiến hành giống như phân tích các gen liên kết. Các lớp có tần số cao nhất: $+bc$ và $a++$ là những dạng không phải do tái tổ hợp và những lớp có tần số ít nhất là do trao đổi chéo kép: đó là $a+c$ và $+b+$.

Do vậy, chúng ta có thể xác định trật tự các gen là acb . Vì:

$$RF_{b-c} = (34 + 14 + 28)/400 \times 100 = 19,0 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

$$RF_{a-b} = (52 + 58 + 34 + 28)/400 \times 100 = 43,5 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

$$RF_{a-c} = (52 + 14 + 58)/400 \times 100 = 31 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

Bài 18:

Bạn phân lập được một loại nấm mốc và nhận được dạng khuyết dưỡng *nic* và dạng khuyết dưỡng *thi*. Lai hai chủng này và nhận được 500 bào tử. Nuôi bào tử ở môi trường tối thiểu. Có 35 bào tử mọc được. Tính khoảng cách giữa 2 gen.

Trả lời:

14 đơn vị bản đồ. Phép lai là: $nic^- thi^+ \times nic^+ thi^-$. Kiểu gen mọc được trên môi trường tối thiểu là $nic^+ thi^+$ và đó là kết quả từ sự trao đổi chéo giữa hai gen. Dạng tái tổ hợp khác là $nic^- thi^-$ sẽ không mọc được trên môi trường tối thiểu. Do vậy, tổng số thể tái tổ hợp là $2 \times 35 = 70$.

$$\text{Và } RF = 70/500 \times 100 = 14 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

Bài 19:

Xét các phép lai và các bộ 4 xếp hàng sau đây. Vẽ bản đồ của 3 gen này. Tính khoảng cách giữa các gen và khoảng cách từ gen tới tâm động.

	I	II	III	IV	V	VI	VII
$a+ \times +b:$	$a+$	ab	$a+$	$a+$	$a+$	$a+$	ab
	$a+$	ab	$+b$	ab	$++$	$+b$	$++$
	$+b$	$++$	ab	$++$	ab	$a+$	$++$
	$+b$	$++$	$++$	$+b$	$+b$	$+b$	ab
	32	30	10	18	7	2	1

Tổng số = 100

	I	II	III	IV	V	VI	VII
$a+ X+c:$	$a+$	ac	$a+$	$a+$	$a+$	$a+$	ac
	$a+$	ac	$+c$	ac	$++$	$+c$	$++$
	$+c$	$++$	ac	$++$	ac	$a+$	$++$
	$+c$	$++$	$++$	$+c$	$+c$	$+c$	ac
	69	3	5	8	12	3	0
Tổng số = 100.							

Trả lời:

$$a \text{ ————— } 10 \text{ ——— } \cdot \text{ ——— } 8 \text{ ——— } c \text{ ——— } 15.5 \text{ ——— } b$$

Phân tích phép lai đầu tiên và phân biệt bào tử nào là PD, NPD và TT. Các lớp bào tử I và VI = PD, II và VII = NPD, III, IV và V = TT. Vì PD = NPD, nên a và b không liên kết nhau. (KN 8-B và 8-C). Bây giờ, hãy phân biệt mỗi gen ở mỗi bào tử là kết quả của sự phân ly ở lần phân chia I hoặc II (KN 8-E). Điều này cho phép tính khoảng cách giữa gen và tâm động (KN 8-F):

$$a\text{-tâm động} = 1/2(10 + 7 + 2 + 1)/100 \times 100 = 10 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

$$b\text{-tâm động} = 1/2(10 + 18 + 2 + 1)/100 \times 100 = 15, 5 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

Tiến hành tương tự ở phép lai 2. Vì PD $\gg$ NPD nên a và c liên kết (KN 8-C). Khoảng cách c — tâm động là:

$$c\text{-tâm động} = 1/2(5 + 12 + 3)/100 \times 100 = 8 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

Bây giờ tính khoảng cách a - c theo công thức $= (1/2 \text{ TT} + \text{NPD})/\text{tổng số bào tử} \times 100$ (KN 8-F).

$$a\text{-}c = [1/2(5 + 8 + 12)/100 + 3/100] \times 100 = 15, 5 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

Nếu a và c nằm ở một phía của tâm động, a - c có thể cách nhau 2 đơn vị bản đồ. Vì kết quả này không đúng nên a và c phải ở hai phía của tâm động.

Bài 20:

Nếu gen q nằm cách tâm động 12 đơn vị bản đồ, thì trong phép lai $q X+$, tỉ lệ % bào tử thể hiện sự phân ly ở lần phân chia thứ 2 là bao nhiêu ?

Trả lời:

Khoảng cách gen-tâm động $= 1/2$ số bào tử phân ly ở lần phân chia II / tổng số bào tử $\times 100$. Vì vậy tỉ lệ phần trăm phân ly ở lần phân chia thứ 2 $= 2 \times 12 = 24$ (KN 8-E và 8-F).

Câu 21:

Xét phép lai ở nấm tạo ra các bào tử nang sau

	PD	NPD	TT
$a + x + b$	48	52	0
$a + x + c$	90	1	9
$a + x + d$	51	49	0
$b + x + d$	60	10	30

a. Các gen nào liên kết nhau ?

b. Tính khoảng cách giữa các gen liên kết.

Trả lời:

a và c liên kết và cách nhau 5, 5 đơn vị bản đồ; b và d liên kết và cách nhau 25 đơn vị bản đồ.

Để xác định sự liên kết, hãy so sánh PD và NPD. Ở trường hợp 1 và 3, PD = NPD, suy ra a không liên kết với b hoặc d . Ở phép lai 4, PD >> NPD suy ra b liên kết với d (KN 8-C).

Chúng ta tính khoảng cách giữa $b - d$, $a - c$ theo công thức:

$(1/2 \text{ TT} + \text{NPD}) / \text{tổng số bào tử} \times 100$ (KN 8-D).

$a - c = (1/2, 9 + 1) / 100 \times 100 = 5, 5$ đơn vị bản đồ.

$b - d = (1/2, 30 + 10) / 100 \times 100 = 25$ đơn vị bản đồ.

Câu 22:

Ở *Neurospora*, phép lai $ad\ trp \times ++$ tạo ra các bộ 4 xếp hàng sau:

I	II	III	IV	V	VI	VII
$ad\ trp$	$ad+$	$ad\ trp$	$ad\ trp$	$ad\ trp$	$ad+$	$+trp$
$ad\ trp$	$ad+$	$ad+$	$+trp$	$++$	$+trp$	$++$
$++$	$+trp$	$+trp$	$ad+$	$ad\ trp$	$ad+$	$ad\ trp$
$++$	$+trp$	$++$	$++$	$++$	$+trp$	$ad+$
126	6	30	18	6	2	12

a. Xác định khoảng cách giữa các gen và tâm động.

b. Nếu các gen liên kết, tính khoảng cách giữa các gen và lập bản đồ.

Trả lời:

ad _____ 6, 5 _____ . _____ 12, 5 _____ *trp*

Trước hết hãy phân biệt các bào tử do phân ly ở lần phân chia thứ 2: đó là các lớp IV, V, VI đối với *ad*; và III, V, VI, VII đối với *trp* (KN 8-E). Khoảng cách giữa gen và tâm động là:

$$ad\text{-tâm động} = 1/2(18 + 6 + 2)/200 \times 100 = 6,5 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

$$trp\text{-tâm động} = 1/2(30 + 6 + 2 + 12)/200 \times 100 = 12,5 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

Bây giờ, phân loại các lớp I và V là PD, II và V là NPD và III, IV và VII là TT (KN 8-B và 8-C). Vì PD >> NPD nên các gen này liên kết. Ta tính:

$$RF = [1/2(30 + 18 + 12) + 8]/200 \times 100 = 19 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

Câu 23:

Có 3 tính trạng khác nhau: *x*, *y*, *z* trong một phép lai ở *Neurospora*. Từ phép lai *x++ X +yz*, các bộ bốn xếp hàng sau được tạo ra. Dựa trên số liệu đó, hãy xây dựng bản đồ của 3 gen và chỉ ra vị trí tâm động:

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
<i>x++</i>	<i>x++</i>	<i>x++</i>	<i>x++</i>	<i>x++</i>	<i>x++</i>	<i>x+z</i>	<i>x+z</i>
<i>x++</i>	<i>+yz</i>	<i>xyz</i>	<i>x+z</i>	<i>+yz</i>	<i>+yz</i>	<i>+yz</i>	<i>+y+</i>
<i>+yz</i>	<i>x++</i>	<i>+++</i>	<i>+y+</i>	<i>xyz</i>	<i>x+z</i>	<i>+y+</i>	<i>x++</i>
<i>+yz</i>	<i>+yz</i>	<i>+yz</i>	<i>+yz</i>	<i>+++</i>	<i>+y+</i>	<i>x++</i>	<i>+yz</i>

Trả lời:

• _____ 23 _____ x _____ 6 _____ y _____ 7 _____ z

Chúng ta phải phân tích đồng thời hai gen. Hãy bắt đầu bằng việc phân loại kiểu bào tử.

Bào tử	x-y	x-z	y-z
I	p	p	p
II	p	p	p
III	T	T	p
IV	p	T	T
V	T	T	p
VI	p	T	T
VII	p	T	T
VIII	p	T	T

Chúng ta không thấy có NPD, do vậy cả 3 gen liên kết nhau (KN 8- C). Bây giờ, hãy tính khoảng cách giữa gen và tâm động (KN 8-F).

$$x\text{-tâm động} = 1/2(70 + 4 + 4 + 2 + 6)/186 \times 100 = 23 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

$$y\text{-tâm động} = 1/2(70 + 18 + 4 + 4 + 2 + 6)/186 \times 100 = 28 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

$$z\text{-tâm động} = 1/2(70 + 18 + 14 + 4 + 4 + 6)/186 \times 100 = 31 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

Và, tính khoảng cách giữa các gen (KN 8-D).

$$x\text{-}y = 1/2(18 + 4)/186 \times 100 = 6 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

$$y\text{-}z = 1/2(14 + 4 + 2 + 6)/186 \times 100 = 7 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

$$x\text{-}z = 1/2(18 + 14 + 4 + 4 + 2 + 6)/186 \times 100 = 13 \text{ đơn vị bản đồ.}$$

Cả 3 gen này đều nằm về một phía của tâm động.

Câu 24:

Ở nấm men, khoảng cách từ gen *a* đến *b* là 12 và từ *a* đến *c* là 28. Tính PD, NPD, TT nếu trong một phép lai ta có:

a. $a+x \times b$, TT/NPD = 4.

b. $a+x \times c$, TT/NPD = 6.

Trả lời:

a. PD = 80, NPD = 4, TT = 16.

b. PD = 51, NPD = 7, TT = 42.

Chúng ta sử dụng công thức:

khoảng cách giữa các gen = $(\text{NPD} + 1/2 \text{ TT}) / \text{tổng số bào tử} \times 100$ (KN 8-D).

Đối với (a): $12 = \text{NPD} + 1/2(4 \text{ NPD})$, suy ra NPD = 4.

Đối với (b): $28 = \text{NPD} + 1/2(6 \text{ NPD})$, suy ra NPD = 7.

PHẦN III: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Nội dung chuyên đề đã đề cập đến hóa sinh, di truyền vi sinh vật:

- Hệ thống lí thuyết một số kiến thức về hóa sinh, di truyền vi sinh vật.
- Sử dụng một số hình ảnh minh họa để hiểu rõ về hóa sinh, di truyền vi sinh vật.
- Suru tầm, giới thiệu một số câu hỏi, bài tập vận dụng, một số đề thi thử cho HSG.

Với nội dung kiến thức cơ bản về hóa sinh, di truyền vi sinh vật cùng với hệ thống câu hỏi, bài tập được đề cập ở trên chúng tôi đã sử dụng trong giảng dạy các lớp chuyên và bồi dưỡng học sinh giỏi tại trường và thu được những kết quả nhất định:

- Học sinh hiểu bài, nắm chắc kiến thức, linh hoạt trong các câu hỏi vận dụng, giải thích tốt nhiều vấn đề có tính thực tiễn cao.

- Các em hứng thú hơn trong giờ học, tích cực chủ động sáng tạo trong quá trình học để lĩnh hội kiến thức.

- Nội dung chuyên đề sử dụng tốt trong công tác bồi dưỡng học sinh giỏi các cấp.

Chuyên đề này đã được tìm hiểu, tập hợp, chọn lọc từ nhiều nguồn tài liệu liên quan để trước hết là giúp tác giả trong quá trình giảng dạy, đồng thời hỗ trợ các em học sinh cùng tìm hiểu nội dung này. Hy vọng rằng chuyên đề sẽ giúp ích cho các thầy cô giáo và các em học sinh trong quá trình giảng dạy và học tập. Tuy nhiên, nhiều vấn đề còn ít nhiều mang tính chủ quan, kiến thức đưa ra trong phần lý thuyết còn chưa đầy đủ, có thể còn chưa chính xác, hệ thống bài tập chưa bao quát hết các nội dung, đề nghị các thầy cô giáo và các em học sinh đóng góp bổ sung để chuyên đề được hoàn thiện hơn, hợp lý hơn và có ích hơn trong thực tiễn. Xin trân trọng cảm ơn!