

Công nghệ Sinh học



CÁC KHÁI NIỆM THEN CHỐT

- 20.1 Nhân dòng DNA nhằm thu được nhiều bản sao của một gene hoặc các đoạn DNA khác
- 20.2 Công nghệ DNA cho phép nghiên cứu trình tự, sự biểu hiện và chức năng của gene
- 20.3 Nhân bản các sinh vật giúp sản xuất tế bào gốc phục vụ nghiên cứu và các ứng dụng khác
- 20.4 Ứng dụng thực tiễn của công nghệ DNA ảnh hưởng đến cuộc sống con người theo nhiều cách

TỔNG QUAN

Hộp công cụ DNA

Vào năm 1995, một cột mốc khoa học quan trọng được công bố: Lần đầu tiên trên thế giới, các nhà nghiên cứu đã giải trình tự thành công toàn bộ hệ gene của một sinh vật sống, đó là vi khuẩn *Haemophilus influenzae*. Thông tin này đã trở thành nguồn cảm hứng cho cộng đồng khoa học. Một số nhà nghiên cứu còn mạnh dạn mơ ước rằng chỉ trong 12 năm, việc giải trình tự hệ gene có thể tiến hành với trên 2.000 loài. Đến năm 2007, các nhà nghiên cứu đã giải trình tự hoàn chỉnh hàng trăm hệ gene sinh vật nhân sơ và hàng chục hệ gene sinh vật nhân thực, bao gồm cả 3 tỷ cặp base của hệ gene người.

Xét cho cùng, những thành tựu này có sự đóng góp của các tiến bộ trong lĩnh vực công nghệ DNA, gồm tập hợp các phương pháp phân tích và thao tác DNA, bắt đầu ra đời vào những năm 1970. Một thành tựu quan trọng nhất theo đó là sự phát minh ra các kỹ thuật cho phép tạo nên các phân tử DNA tái tổ hợp; đó là các phân tử được hình thành từ sự kết hợp giữa các đoạn DNA khác nguồn gốc (thường từ các loài khác nhau) diễn ra trong điều kiện *in vitro* (tức là trong ống nghiệm). Tiến bộ của các kỹ thuật này là nền tảng cho việc tiếp tục phát triển các kỹ thuật hiệu quả khác phục vụ cho việc phân tích các gene và sản phẩm của gene. Bằng cách nào các nhà khoa học có thể chuẩn bị các phân tử DNA tái tổ hợp và dùng công nghệ DNA để trả lời các câu hỏi cơ bản của sinh học là một trong các trọng tâm chính của chương này.

Một trọng tâm khác trong chương này là việc công nghệ sinh học, gồm các phương pháp thao tác trên các cơ thể sống hoặc thành phần của chúng để tạo ra các sản phẩm hữu ích, có ảnh hưởng đến đời sống con người. Công

▲ Hình 20.1 Dãy các điểm này được dùng để so sánh các mô hình thường với các mô bị ung thư như thế nào?

nghệ sinh học có lịch sử phát triển từ lâu đời, bao gồm một số phương pháp đã được dùng từ lâu trong chọn, tạo giống ở vật nuôi, cây trồng cũng như trong việc sử dụng các vi sinh vật để sản xuất rượu vang hay phomat. Ngày nay công nghệ sinh học bao gồm cả kỹ thuật di truyền, là các phương pháp thao tác trực tiếp trên các gene vì các mục đích thực tiễn. Kỹ thuật di truyền đã khởi đầu cho một cuộc cách mạng trong công nghệ sinh học. Các công cụ trong hộp công cụ DNA giờ đây được ứng dụng theo nhiều cách (mà chỉ khoảng một thập kỷ trước không thể nghĩ ra được) đã có tác động đến mọi khía cạnh của đời sống: từ phát triển nông nghiệp đến điều tra hình sự và nghiên cứu y - dược học. Chẳng hạn như trên vi dây DNA (DNA microarray) được minh họa ở Hình 20.1, các điểm màu phản ánh các mức độ biểu hiện của 2.400 gene khác nhau ở người. Sử dụng phương pháp phân tích "microarray", các nhà nghiên cứu có thể so sánh sự biểu hiện gene đồng thời ở nhiều mẫu khác nhau, chẳng hạn từ việc đối chiếu giữa các mẫu mô bình thường với các mẫu mô bị ung thư. Kiến thức thu được từ những nghiên cứu biểu hiện gene như vậy đã và đang đóng góp đáng kể cho việc nghiên cứu ung thư cũng như nhiều bệnh lý phức tạp khác nữa.

Trong chương này, chúng ta trước hết sẽ mô tả các kỹ thuật thao tác DNA và các kỹ thuật phân tích sự biểu hiện cũng như chức năng của các gene. Tiếp theo, chúng ta sẽ tìm hiểu những thành tựu song hành giữa nhân bản cơ thể động vật và sản xuất tế bào gốc; đây là các kỹ thuật không chỉ giúp chúng ta có thể mở rộng tầm hiểu biết cơ bản về sinh học mà còn tăng cường năng lực của chúng ta trong việc ứng dụng các hiểu biết đó để giải quyết các vấn đề toàn cầu. Cuối cùng, chúng ta sẽ đề cập các ứng dụng thực tế của công nghệ sinh học và cân nhắc một số vấn đề đạo đức nảy sinh trong bối cảnh công nghệ sinh học ngày càng thâm nhập sâu vào mọi mặt của đời sống xã hội.

20.1 KHÁI NIỆM

Nhân dòng DNA nhằm thu được nhiều bản sao của một gene hoặc các đoạn DNA khác

Các nhà sinh học phân tử khi nghiên cứu một gene thường gặp phải một thách thức. Các phân tử DNA trong

tự nhiên thường rất dài và mỗi phân tử thường đồng thời mang nhiều gene. Hơn nữa, ở hệ gene của phần lớn sinh vật nhân thực, các gene chỉ chiếm một phần nhỏ trên các phân tử DNA nhiễm sắc thể; phần còn lại là các trình tự nucleotide không mã hoá. Chẳng hạn, một gene đơn lẻ ở người chỉ chiếm khoảng 1/100.000 chiều dài của một phân tử DNA nhiễm sắc thể. Một điểm phức tạp hơn là các gene chỉ khác biệt rất ít so với với các trình tự DNA ở xung quanh, mà thực chất, chỉ là trật tự của các nucleotide. Để có thể phân tích và thao tác được các gene mong muốn, các nhà khoa học phải phát triển các phương pháp cho phép chuẩn bị trước những đoạn DNA đặc thù tương ứng với những gene đó và nhân chúng lên thành nhiều bản sao qua một quá trình được gọi là **nhân dòng DNA**.

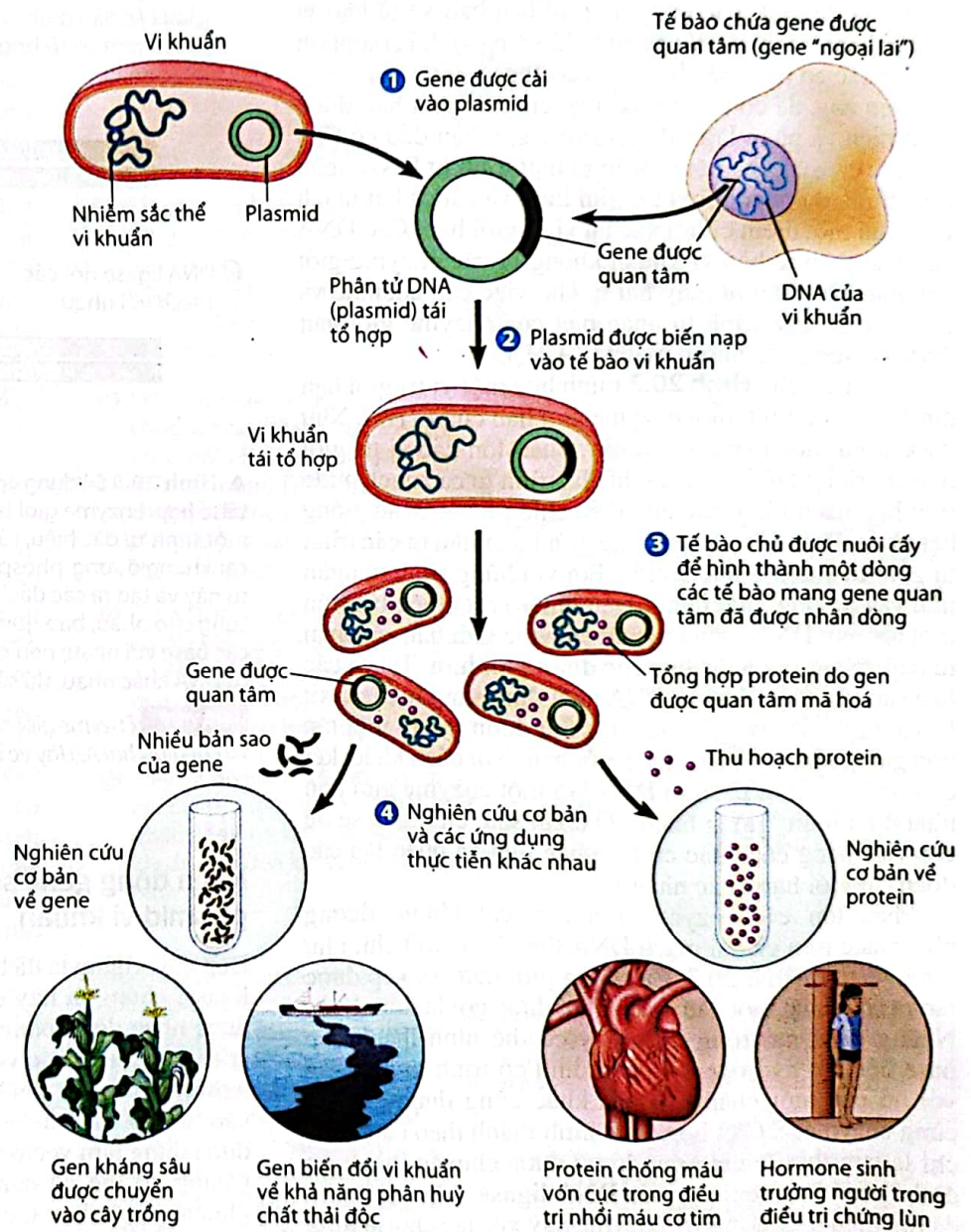
Nhân dòng DNA và ứng dụng của nó: Khái quát

Phần lớn các phương pháp nhân dòng các đoạn DNA trong phòng thí nghiệm đều có một số đặc điểm chung. Một cách tiếp cận phổ biến là dùng các vi khuẩn, trong đó phổ biến nhất là vi khuẩn *Escherichia coli*. Từ Chương 16, chúng ta biết rằng nhiễm sắc thể của *E. coli* là một phân tử DNA mạch vòng kích thước lớn. Ngoài ra, *E. coli* và nhiều vi khuẩn khác còn có các **plasmid**; đó là những phân tử DNA mạch vòng kích thước nhỏ, có khả năng tái bản độc lập với nhiễm sắc thể vi khuẩn. Mỗi plasmid chỉ chứa một số ít gen; những gene này thường có lợi cho vi khuẩn trong những môi trường sống nhất định, nhưng không phải là thiết yếu cho sự tồn tại và sinh sản của chúng trong phần lớn các điều kiện sống khác.

Để nhân dòng các đoạn DNA trong phòng thí nghiệm, các nhà nghiên cứu phải phân lập plasmid từ vi khuẩn, sau đó cài vào nó một đoạn DNA có xuất xứ từ một nguồn sinh vật khác (gọi là DNA "ngoại lai", **Hình 20.2**). Plasmid thu được lúc này được gọi là phân tử DNA tái tổ hợp, tức là DNA kết hợp từ hai nguồn khác nhau. Plasmid sau đó được đưa trở lại tế bào vi khuẩn, tạo nên một **vi khuẩn tái tổ hợp**. Tế bào vi khuẩn tái tổ hợp sau đó được cho sinh sản qua nhiều lần phân bào để tạo nên một dòng các tế bào; đây là một quần thể các tế bào giống hệt nhau về vật liệu di truyền. Nhờ các tế bào đang phân chia đồng thời tiến hành sao chép plasmid tái tổ hợp và truyền chúng cho các tế bào con, nên DNA ngoại lai và tất cả

các gene mà nó mang theo cũng sẽ được nhân dòng đồng thời. Quá trình sản sinh nhiều bản sao của một gene như vậy được gọi là **nhân dòng gene**.

Nhân dòng gene rất hữu dụng cho hai mục đích cơ bản: để tạo nên nhiều bản sao của một gene đặc thù và để tạo ra một sản phẩm protein. Các nhà nghiên cứu có thể phân lập các bản sao của một gene đã được nhân dòng từ vi khuẩn để sử dụng trong các nghiên cứu cơ bản, hoặc để tạo ra một cơ thể với khả năng chuyển hoá mới, chẳng hạn như khả năng kháng sâu. Ví dụ, một gene để kháng được tìm thấy ở một loài cây trồng có thể được nhân dòng, rồi chuyển vào các cây của một loài khác. Theo một hướng khác, một protein có giá trị y học, chẳng hạn như yếu tố sinh trưởng ở người, có thể được thu thập với lượng lớn từ việc nuôi cấy vi khuẩn mang gene được nhân dòng mã hoá cho protein đó.



▲ Hình 20.2 Khái quát về nhân dòng gene và một số ứng dụng các gene nhân dòng. Trong sơ đồ giản lược trên đây về nhân dòng gene, chúng ta bắt đầu với một plasmid được phân lập từ tế bào vi khuẩn và một gene được quan tâm bắt nguồn từ một cơ thể khác. Chỉ có một bản sao của plasmid và một bản sao của gene được vẽ trên hình, nhưng trong thực tế vật liệu khởi đầu thường gồm nhiều bản sao của mỗi loại phân tử này.

Phần lớn các gene mã hoá protein chỉ có một bản sao duy nhất trong hệ gene đơn bội (về đại thể chỉ chiếm khoảng một phần triệu như trường hợp DNA hệ gene người); do đó, khả năng để chuẩn bị một lượng lớn các đoạn DNA hiếm như vậy có ý nghĩa quyết định với khả năng ứng dụng liên quan đến một gene nào đó. Trong phần còn lại của chương này, chúng ta sẽ tìm hiểu về các kỹ thuật được tóm lược trên Hình 20.2 và các phương pháp khác có liên quan.

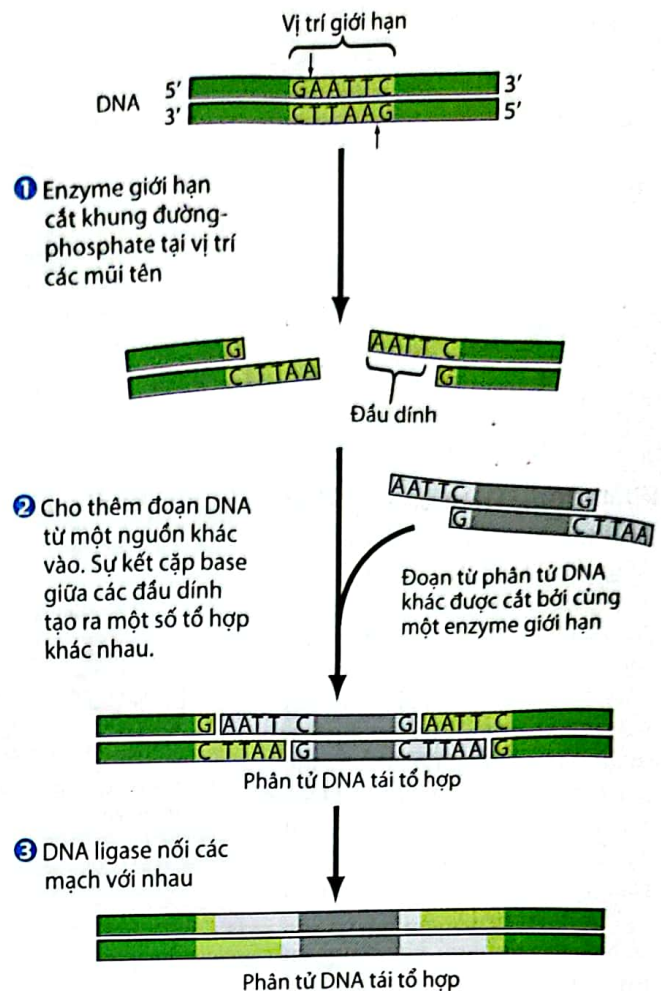
Sử dụng enzyme giới hạn để tạo DNA tái tổ hợp

Nhân dòng gene và kỹ thuật di truyền phụ thuộc vào việc sử dụng các enzyme có thể cắt các phân tử DNA tại một số giới hạn các vị trí nhất định. Những enzyme này, được gọi là *restriction endonuclease* hay các **enzyme giới hạn**, lần đầu tiên được phát hiện vào cuối những năm 1960 bởi các nhà khoa học nghiên cứu ở vi khuẩn. Từ Chương 19, chúng ta đã biết: các enzyme giới hạn bảo vệ tế bào vi khuẩn bằng cách cắt các phân tử DNA ngoại lai có nguồn gốc từ các cơ thể khác hoặc từ các phage.

Đến nay, đã có hàng trăm loại enzyme giới hạn được phát hiện và phân lập. Mỗi enzyme giới hạn đều có tính đặc thù cao, có khả năng nhận ra một trình tự DNA ngắn nhất định, được gọi là **vị trí giới hạn**, và cắt cả hai mạch DNA tại một điểm chính xác tại vị trí giới hạn. Các DNA của bản thân tế bào vi khuẩn không bị các enzyme giới hạn của bản thân nó gây hại là nhờ việc các adenine và cytosine tại các trình tự nhận biết của enzyme giới hạn được bổ sung các nhóm methyl ($-CH_3$).

Phần trên của **Hình 20.3** minh hoạ một vị trí giới hạn được nhận biết bởi một enzyme giới hạn của *E. coli*. Như được minh hoạ trong ví dụ này, phần lớn các vị trí giới hạn có trình tự đối xứng. Nghĩa là, trình tự các nucleotide trên hai mạch khi được đọc theo chiều $5' \rightarrow 3'$ là giống hệt nhau. Phần lớn các enzyme giới hạn nhận ra các trình tự gồm từ 4 đến 8 nucleotide. Bởi vì những trình tự ngắn như vậy thường xuất hiện (ngẫu nhiên) rất nhiều lần trên một phân tử DNA, nên khi một enzyme giới hạn cắt phân tử này, sẽ tạo ra bộ tập hợp các **đoạn giới hạn**. Tất cả các bản sao của một phân tử DNA nhất định sau khi được xử lý với một enzyme giới hạn đặc thù, luôn tạo ra một tập hợp giống nhau của các đoạn giới hạn. Nói cách khác, kết quả phân cắt một phân tử DNA bởi một enzyme giới hạn nhất định luôn giống nhau. (Ở phần sau, chúng ta sẽ đề cập việc bằng cách nào có thể phân biệt và phân lập các đoạn cắt giới hạn khác nhau.)

Phần lớn các enzyme giới hạn cắt khung đường phosphate trên cả hai mạch DNA theo kiểu chữ chi, như được vẽ trên Hình 20.3. Các đoạn giới hạn sợi kép được tạo ra có ít nhất một đầu mạch đơn, được gọi là **đầu dính**. Những đoạn mở rộng ngắn này có thể hình thành cặp base liên kết hydrogen với đầu dính có trình tự bổ sung với nó của một phân tử DNA khác cũng được cắt bởi cùng enzyme. Sự kết hợp được hình thành theo cách này chỉ là tạm thời, nhưng sau đó nó được chuyển thành ổn định (bền vững) bởi enzyme **DNA ligase**. Như chúng ta đã tìm hiểu ở Chương 16, enzyme này xúc tác cho sự hình thành liên kết cộng hoá trị nối khung đường - phosphate của các mạch DNA; ví dụ, nó nối các đoạn Okazaki trong quá trình tái bản. Phần dưới của Hình 20.3 minh hoạ việc nối DNA được xúc tác bởi DNA ligase từ hai nguồn khác nhau để tạo nên một phân tử DNA tái tổ hợp bền vững.



▲ **Hình 20.3 Sử dụng enzyme giới hạn và DNA ligase để tạo DNA tái tổ hợp.** Enzyme giới hạn trong ví dụ này (là *EcoRI*) nhận ra một trình tự đặc hiệu, tức là vị trí giới hạn, gồm 6 cặp base và cắt khung đường-phosphate theo hình chữ chi bên trong trình tự này và tạo ra các đầu dính. Các đoạn có các đầu dính bổ sung cho nhau, bao gồm cả hai phần đoạn gốc, có thể bắt cặp các base với nhau; nếu các phân đoạn này xuất xứ từ các phân tử DNA khác nhau, thì sản phẩm tạo ra là DNA tái tổ hợp.

HÃY VẼ Enzyme giới hạn *Hind III* nhận ra trình tự $5'-AAGCTT-3'$ và cắt giữa hai A. Hãy vẽ trình tự sợi kép trước và sau khi enzyme cắt.

Nhân dòng gene sinh vật nhân thực bằng plasmid vi khuẩn

Đến đây, chúng ta đã biết về các enzyme giới hạn và DNA ligase, chúng ta hãy quan sát kỹ hơn cách mà các gene được nhân dòng bằng các plasmid. Các phân tử plasmid gốc được gọi là các **vector nhân dòng**; chúng được định nghĩa là phân tử DNA có thể mang đoạn DNA ngoại lai vào tế bào chủ và sao chép ở đó. Các plasmid vi khuẩn được dùng làm vector nhân dòng vì một số nguyên nhân. Chúng có thể dễ dàng được phân lập từ các tế bào vi khuẩn, được thao tác để tạo nên các plasmid tái tổ hợp bằng việc cài đoạn DNA ngoại lai trong điều kiện *in vitro*, sau đó được đưa trở lại vào các tế bào vi khuẩn. Hơn nữa, các plasmid vi khuẩn tái tổ hợp (và đoạn DNA ngoại lai mà chúng mang) có thể nhân lên nhanh chóng nhờ tốc độ sinh sản cao của các tế bào chủ.

Sản xuất các dòng tế bào mang các plasmid tái tổ hợp

Giả sử chúng ta là những nhà nghiên cứu quan tâm đến gene mã hoá β -globin ở loài chim ruồi để kiểm tra xem protein vận chuyển oxygen này có khác nhau giữa các loài hay không, nhất là các loài có hoạt động trao đổi chất yếu hơn. **Hình 20.4** minh hoạ chi tiết một phương pháp nhân dòng gene của chim ruồi bằng việc sử dụng plasmid làm vector nhân dòng.

❶ Chúng ta bắt đầu phân lập DNA hệ gene của chim ruồi từ các tế bào của nó. Chúng ta cũng tiến hành phân lập loại vector mà chúng ta đã chọn, đó là một plasmid có nguồn gốc từ các tế bào của *E. coli*. Plasmid đã được cải tiến để mang hai gene hữu dụng sau này, đó là: *amp^R*, gene giúp tế bào *E. coli* kháng được với chất kháng sinh ampicillin; và *lacZ*, gene mã hoá cho enzyme β -galactosidase xúc tác thủy phân đường lactose. Enzyme này đồng thời có thể thủy phân một hợp chất được tổng hợp hoá học tương tự có tên gọi là X-gal thành một sản phẩm có màu xanh dương. Plasmid ở đây chỉ mang một bản sao duy nhất của vị trí giới hạn được nhận biết bởi enzyme giới hạn được dùng trong bước sau; vị trí này nằm trong gene *lacZ*.

❷ Cả plasmid và DNA của chim ruồi đều được cắt bởi cùng một enzyme giới hạn, rồi ❸ các đoạn được trộn với nhau, để cho các đầu dính bắt cặp với nhau. Sau đó, chúng ta cho thêm DNA ligase; enzyme này xúc tác hình thành liên kết cộng hoá trị trên khung đường phosphate giữa các đoạn có đầu dính kết cặp bổ sung với nhau. Một số plasmid tái tổ hợp thu được mang các đoạn DNA của chim ruồi giống như ba phân tử được minh hoạ trên Hình 20.4; một trong ba phân tử đó mang gene β -globin. Bước này còn tạo ra những sản phẩm khác nữa, như các plasmid mang đồng thời một số phân đoạn DNA của chim ruồi, hay sự kết hợp của hai plasmid, hay plasmid gốc tự nối lại mà không có sự tái tổ hợp.

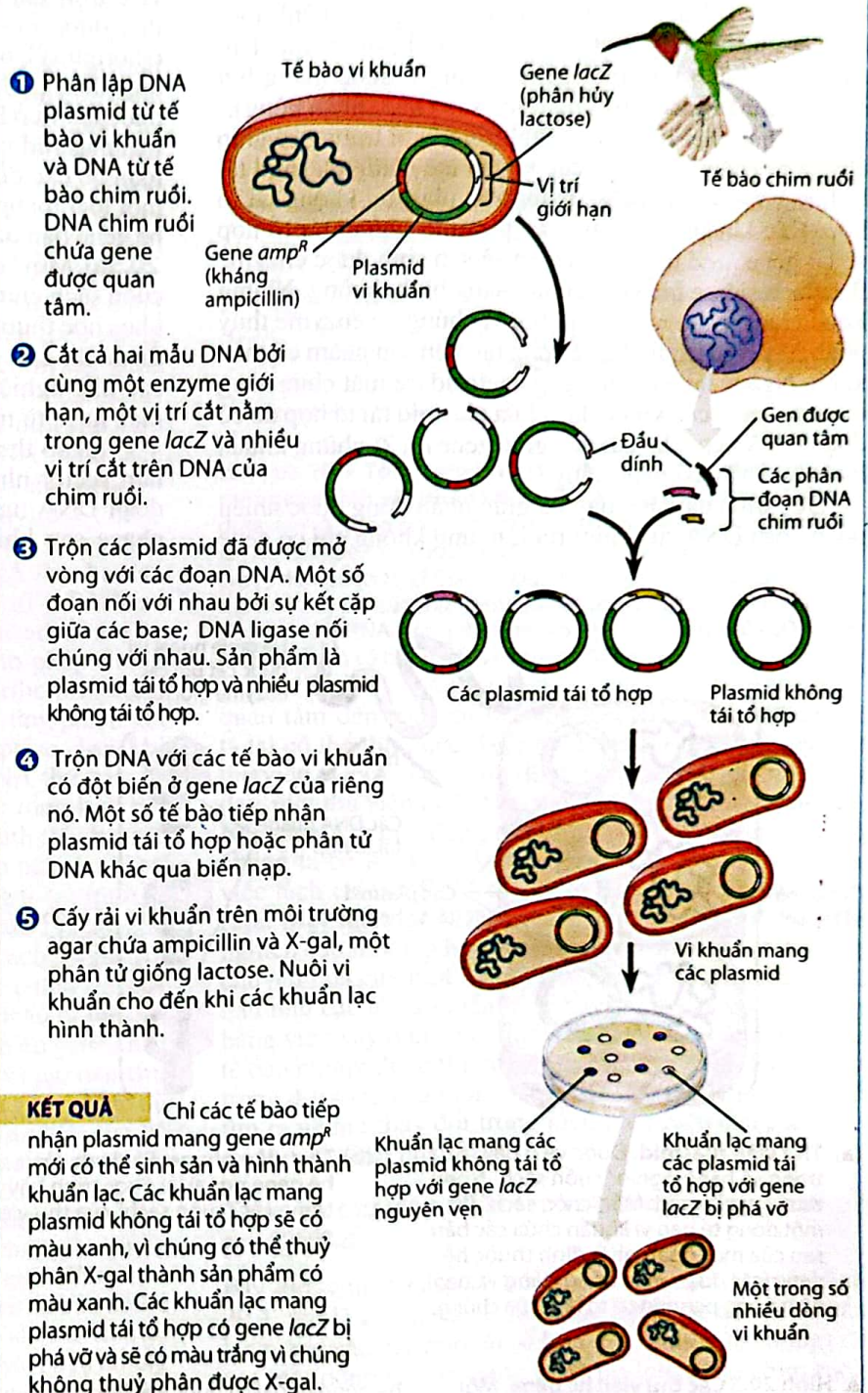
❹ Hỗn hợp DNA sau đó được cho vào các tế bào vi khuẩn mang đột biến ở gene *lacZ* trên nhiễm sắc thể của chúng, nên chúng không thể thủy phân lactose hay X-gal. Trong điều kiện thí nghiệm phù hợp, các tế bào sẽ tiếp nhận DNA ngoại lai qua quá trình biến nạp (xem các trang 306 và 561). Một số tế bào sẽ nhận được một plasmid mang một gene ngoại lai, trong khi các

▼ Hình 20.4 Phương pháp nghiên cứu

Nhân dòng các gene bằng plasmid vi khuẩn

ỨNG DỤNG Ứng dụng nhân dòng gene là quá trình tạo ra nhiều bản sao của một gene được quan tâm. Những bản sao này có thể được dùng trong giải trình tự gene, trong sản xuất các protein do gene mã hoá, hoặc trong các nghiên cứu cơ bản và các ứng dụng khác của nó.

KỸ THUẬT Trong ví dụ này, các gene của chim ruồi được cài vào plasmid có nguồn gốc từ *E. coli*. Ở đây chỉ vẽ ba plasmid và ba đoạn DNA của chim ruồi, nhưng trong thực tế hỗn hợp mẫu gồm hàng triệu bản sao plasmid và hàng triệu các phân đoạn DNA khác nhau của chim ruồi.



KẾT QUẢ Chỉ các tế bào tiếp nhận plasmid mang gene *amp^R* mới có thể sinh sản và hình thành khuẩn lạc. Các khuẩn lạc mang plasmid không tái tổ hợp sẽ có màu xanh, vì chúng có thể thủy phân X-gal thành sản phẩm có màu xanh. Các khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp có gene *lacZ* bị phá vỡ và sẽ có màu trắng vì chúng không thủy phân được X-gal.

ĐIỀU GÌ NẾU? Nếu môi trường ở bước 5 không chứa ampicillin, thì loại khuẩn lạc nào có thể mọc được? Chúng sẽ có màu gì?

tế bào khác sẽ nhận được các plasmid không tái tổ hợp, hoặc một đoạn DNA của chim ruồi không mã hoá, hoặc thậm chí không xảy ra biến nạp. Các gene *amp^r* và *lacZ* sẽ giúp chúng ta lọc ra những trường hợp này.

⑤ Đầu tiên, chúng ta tiến hành cấy rải tất cả vi khuẩn lên bề mặt môi trường đặc (chứa agar) được bổ sung ampicillin để giúp phân biệt các tế bào có xảy ra biến nạp plasmid hay không, cũng như để nhận ra các tế bào mang plasmid tái tổ hợp, so với các tế bào khác. Trong điều kiện đó, chỉ có các tế bào mang plasmid mới có thể sinh sản, bởi vì chỉ có chúng mới có gene *amp^r* để kháng được ampicillin trong môi trường. Mỗi tế bào vi khuẩn sinh sản sẽ tạo ra một dòng tế bào. Khi dòng tế bào phát triển gồm khoảng từ 10^5 đến 10^8 tế bào, thì chúng trở thành một khối dễ thấy trên bề mặt agar, được gọi là *khuẩn lạc*. Khi các tế bào sinh sản, mọi gene ngoại lai được mang bởi các plasmid tái tổ hợp cũng được sao chép (nhân dòng).

Thứ hai, việc bổ sung X-gal trong môi trường sẽ giúp chúng ta phân biệt được các khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp với các khuẩn lạc mang các plasmid không tái tổ hợp. Các khuẩn lạc mang các plasmid không tái tổ hợp sẽ có gene *lacZ* nguyên vẹn và sẽ sản sinh được enzyme β -galactosidase biểu hiện chức năng bình thường. Những khuẩn lạc này có màu xanh bởi vì chúng có enzyme thủy phân X-gal có trong môi trường tạo nên sản phẩm có màu xanh. Ngược lại, enzyme β -galactosidase mất chức năng được tạo ra từ các khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp do có đoạn DNA ngoại lai cài vào giữa gene *lacZ*; những khuẩn lạc này vì vậy có màu trắng.

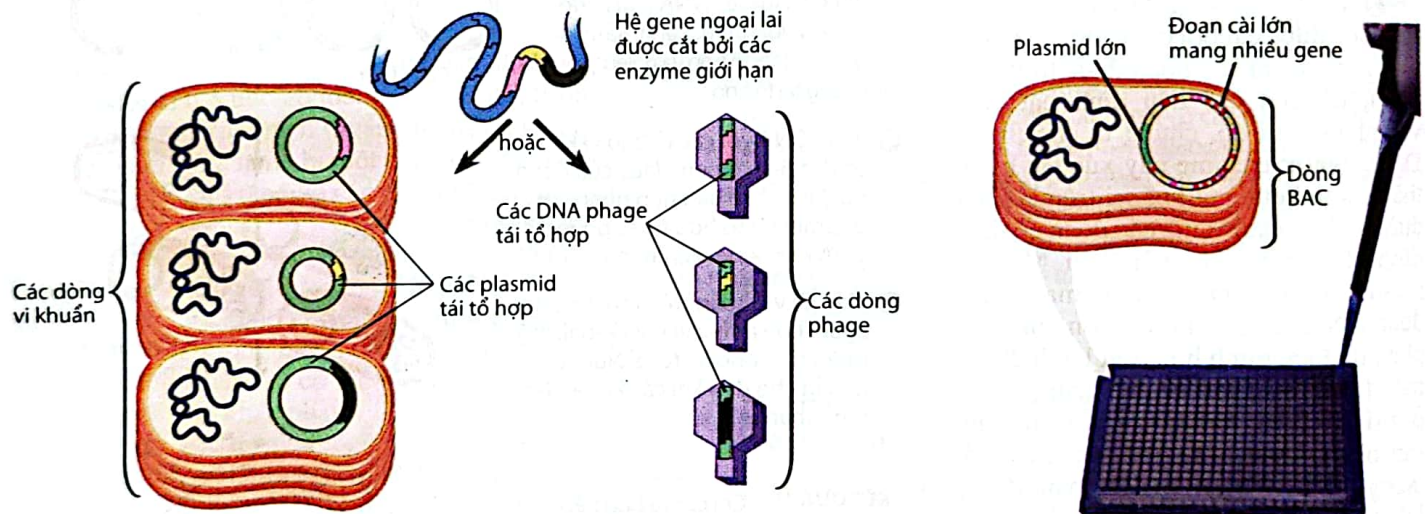
Quy trình này đến đây đã giúp nhân dòng được nhiều phân đoạn DNA của chim ruồi, nhưng không chỉ có gene

β -globin mà chúng ta quan tâm. Trong thực tế, tập hợp tất cả các khuẩn lạc trắng đại diện cho tất cả các trình tự DNA có trong hệ gene của chim ruồi, bao gồm cả các gene cũng như các trình tự không mã hoá khác. Bằng cách nào chúng ta có thể tìm ra khuẩn lạc (hay dòng tế bào) mang gene β -globin từ rất nhiều các khuẩn lạc mang các đoạn DNA khác của chim ruồi? Trước khi trả lời câu hỏi này, chúng ta hãy xem các dòng tế bào (khuẩn lạc) được bảo quản như thế nào.

Lưu giữ các gene trong thư viện DNA

Quy trình nhân dòng được vẽ trên Hình 20.4 bắt đầu bằng việc trộn lẫn các đoạn của toàn bộ hệ gene của một cơ thể, được gọi là phương pháp “nhân dòng ngẫu nhiên (shotgun)”; nghĩa là không chỉ nhân dòng một gene đích duy nhất. Có hàng nghìn các plasmid tái tổ hợp khác nhau được tạo ra ở bước 3, trong đó mỗi dòng tế bào mang một loại plasmid và tạo nên khuẩn lạc trắng ở bước 5. Tập hợp toàn bộ các dòng tế bào mang plasmid tái tổ hợp này, mà mỗi loại mang các bản sao của một đoạn nhất định trong hệ gene ban đầu, được gọi là một **thư viện hệ gene (Hình 20.5a)**. Mỗi “dòng plasmid” trong thư viện giống như một cuốn sách chứa đựng thông tin đặc thù. Hiện nay, các nhà khoa học thường nhận được những thư viện như vậy (hoặc thậm chí các gene nhất định đã được nhân dòng sẵn) từ các nhà nghiên cứu khác, hoặc từ các sản phẩm thương mại, hoặc từ một trung tâm giải trình tự DNA nào đó.

Một số thực khuẩn thể nhất định cũng đã được dùng làm vector nhân dòng để tạo các thư viện hệ gene. Các đoạn DNA ngoại lai có thể được ghép nối vào hệ gene phage sau khi nó đã được cắt tia bớt, giống như ghép



(a) Thư viện plasmid. Được vẽ ở đây là ba trong số hàng nghìn “cuốn sách” trong thư viện plasmid. Mỗi “cuốn sách” là một dòng tế bào vi khuẩn chứa các bản sao của một đoạn nhất định thuộc hệ gene (các đoạn màu hồng, vàng và đen) nằm trong plasmid tái tổ hợp của chúng.

(b) Thư viện phage. Ba đoạn của hệ gene ngoại lai được trình bày trong các “cuốn sách” của thư viện phage.

(c) Thư viện các dòng nhiễm sắc thể nhân tạo vi khuẩn (BAC). Thư viện này thường được lưu giữ trong các đĩa nhiều giếng, như một đĩa gồm 384 giếng ở trên hình. Mỗi dòng chiếm một giếng. (Thư viện toàn bộ một hệ gene thường cần nhiều đĩa). Thư viện plasmid cũng có thể lưu giữ như thế này.

▲ **Hình 20.5 Các thư viện hệ gene.** Một thư viện hệ gene là một tập hợp gồm nhiều dòng vi khuẩn hoặc phage. Mỗi dòng mang một bản sao của một phân đoạn DNA nhất định có nguồn gốc từ

hệ gene ngoại lai được kết hợp vào một vector (thể truyền) DNA phù hợp, chẳng hạn như plasmid hay hệ gene virus được cắt bỏ bớt. Trong thư viện hệ gene hoàn chỉnh, các đoạn DNA ngoại lai phủ kín

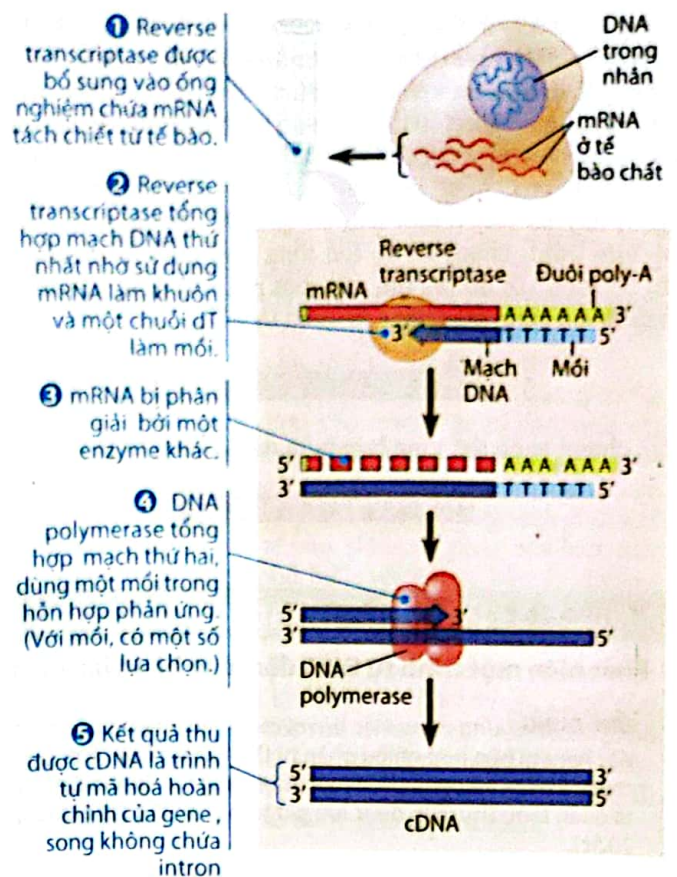
toàn bộ hệ gene của một cơ thể. Lưu ý là các nhiễm sắc thể vi khuẩn ở (a) và (c) không được vẽ đúng tỷ lệ; thực ra chúng lớn hơn các vector khoảng 1.000 lần.

nối vào một plasmid, nhờ các enzyme giới hạn và DNA ligase. Quá trình lấy nhiễm bình thường sẽ cho phép sản sinh ra nhiều hạt virus mới, mỗi loại mang một đoạn DNA ngoại lai. Một ưu điểm của việc sử dụng phage làm vector là chúng có thể mang các đoạn DNA dài có kích thước lớn đến 25.000 cặp base (25 kb), trong khi một plasmid vi khuẩn chuẩn chỉ có thể mang đoạn dài có kích thước nhỏ hơn 12 kb. Thư viện hệ gene được tạo ra bằng phage được bảo quản như một tập hợp của các dòng phage khác nhau (Hình 20.5b). Do các enzyme giới hạn không nhận biết được ranh giới của mỗi gene, nên một số gene ở bất cứ thư viện nào cũng có thể bị phân cắt thuộc về hai hay nhiều dòng khác nhau.

Một loại vector khác cũng được dùng để xây dựng thư viện là nhiễm sắc thể nhân tạo vi khuẩn (BAC). Mặc dù tên gọi như vậy, nhưng đây đơn giản chỉ là các plasmid kích thước lớn, được cắt tia bớt sao cho chỉ còn các gene thiết yếu cho quá trình sao chép và có thể mang được các đoạn dài khoảng 200 - 300 kb. Kích thước các đoạn dài rất lớn như vậy giúp giảm thiểu tối đa số dòng tế bào cần có trong thư viện hệ gene, nhưng cũng làm việc thao tác với thư viện trong phòng thí nghiệm có nhiều thách thức hơn. Các dòng BAC thường được bảo quản trong các đĩa nuôi cấy gồm nhiều giếng, mỗi giếng chứa một dòng tế bào (Hình 20.5c). Các dòng được bảo quản theo trật tự vị trí trên đĩa như vậy giúp việc sàng lọc để tìm các gene quan tâm rất hiệu quả, như chúng ta sẽ thấy ở phần sau.

Các nhà nghiên cứu cũng có thể tạo ra một thư viện DNA khác bắt nguồn từ các phân tử mRNA được tách chiết từ tế bào (Hình 20.6). Enzyme phiên mã ngược - reverse transcriptase (thu được từ các retrovirus) - được dùng để tạo ra các phân tử DNA mạch đơn trong điều kiện *in vitro* trên cơ sở dùng phân tử mRNA làm khuôn. Chúng ta nhớ lại rằng, đầu 3' của phân tử mRNA có một chuỗi gồm nhiều ribonucleotide loại adenine (A) được gọi là đuôi polyA. Đặc điểm này cho phép chúng ta sử dụng một mạch gồm nhiều deoxyribonucleotide loại thymine (dT) làm đoạn mồi cho phản ứng phiên mã ngược được xúc tác bởi reverse transcriptase. Sau khi phân giải mRNA bằng enzyme, mạch DNA thứ hai, có trình tự bổ sung với mạch thứ nhất, được tổng hợp bởi DNA polymerase. Phân tử DNA sợi kép hình thành được gọi là **DNA bổ sung (hay cDNA)**. Để tạo nên thư viện, các cDNA được biến đổi bằng việc bổ sung thêm trình tự nhận biết của các enzyme giới hạn ở mỗi đầu của nó. Sau đó, các cDNA được cài vào vector theo cách giống với việc cài các đoạn DNA của hệ gene. Sản phẩm mRNA được tách chiết là hỗn hợp của tất cả các phân tử mRNA có trong tế bào nguồn, được phiên mã từ nhiều gene khác nhau. Vì vậy, các cDNA được nhân dòng và tạo nên **thư viện cDNA** sẽ gồm một tập hợp của nhiều gene. Mặc dù vậy, một thư viện cDNA chỉ phản ánh một phần của hệ gene, bởi vì chỉ có một nhóm các gene được phiên mã ở mỗi tế bào mà từ đó mRNA được tách chiết.

Thư viện hệ gene và thư viện cDNA đều có ưu điểm tùy vào mục đích nghiên cứu. Nếu như chúng ta muốn nhân dòng một gene nhưng không biết loại tế bào nào biểu hiện nó hoặc khi không thu thập đủ các tế bào thuộc một loài phù hợp, thì gần như có thể chắc chắn thư viện hệ gene có chứa gene đó. Cũng tương tự như vậy, nếu chúng ta quan tâm đến các trình tự điều hoà hay các intron liên quan tới một gene, thì cần phải sử dụng một thư viện hệ gene bởi vì những trình tự này không có mặt trong các phân tử mRNA hoàn thiện được dùng để tạo nên các thư viện cDNA. Cũng chính vì lý do này, nếu chúng ta chỉ



▲ **Hình 20.6 Tổng hợp phân tử DNA bổ sung (cDNA) của một gene sinh vật nhân thực.** DNA bổ sung là phân tử DNA được tạo ra trong ống nghiệm (*in vitro*) bằng việc sử dụng mRNA làm khuôn để tổng hợp mạch đầu tiên. Do mRNA chỉ chứa các exon, nên phân tử cDNA sợi kép thu được sẽ mang trình tự mã hoá đầy đủ của một gene mà không có intron. Mặc dù ở đây chỉ vẽ mRNA, song thực tế tập hợp cuối cùng của cDNA sẽ phản ánh tất cả các mRNA có trong tế bào.

quan tâm đến trình tự mã hoá của một gene, thì chúng ta lại có thể thu được dạng đã được gọt giũa của gene từ thư viện cDNA. Trong thí dụ đối với gene β -globin nêu ở đây, một thư viện cDNA có thể đáp ứng tốt được yêu cầu. Nếu chúng ta biết dòng tế bào nào biểu hiện gene đó, thì chúng ta có thể bắt đầu xây dựng thư viện cDNA bằng việc tách chiết mRNA từ các tế bào hồng cầu của chim ruồi. Một thư viện cDNA cũng thường được sử dụng để nghiên cứu một tập hợp các gene quy định các chức năng chuyên hoá của một loại tế bào nhất định nào đó, chẳng hạn như các tế bào thần kinh hay tế bào gan. Cuối cùng bằng việc xây dựng các thư viện cDNA từ cùng một loại tế bào nhưng được thu thập vào các thời điểm khác nhau trong đời sống của một cơ thể, các nhà nghiên cứu có thể tìm ra những thay đổi trong kiểu biểu hiện của các gene trong quá trình phát triển.

Sàng lọc thư viện để tìm ra các dòng mang gene mong muốn

Bây giờ, chúng ta quay trở lại kết quả thu được ở Hình 20.4, tức là chúng ta sẽ sàng lọc được tất cả các khuẩn lạc mang các plasmid tái tổ hợp (các khuẩn lạc trắng) để tìm một dòng tế bào mang gene β -globin của chim ruồi. Chúng ta có thể phát hiện ra DNA của gene này dựa trên nguyên tắc kết cặp bổ sung của nó với một đoạn trình tự bổ sung trên một phân tử acid nucleic ngắn khác qua việc sử dụng phương pháp lai acid nucleic. Phân tử có trình tự bổ

sung ngắn này thường là acid nucleic mạch đơn, có thể là DNA hay RNA, và được gọi là **mẫu dò acid nucleic**. Nếu chúng ta đã biết một phần trình tự nucleotide của gene mà chúng ta quan tâm (có thể dựa vào trình tự amino acid của phân tử protein mà gene đó mã hoá, hoặc trong trường hợp ví dụ của chúng ta là dựa vào trình tự nucleotide của gene này đã biết ở một loài có quan hệ gần gũi với loài nghiên cứu), chúng ta có thể tổng hợp mẫu dò có trình tự bổ sung với nó. Ví dụ, nếu một phần trình tự trên một mạch của gene mà chúng ta quan tâm là

5' ...GGCTAACTTAGC... 3'

thì chúng ta có thể tổng hợp mẫu dò có trình tự là

3' [CCGATTGAATCG] 5'

Mỗi phân tử mẫu dò, có trình tự bổ sung sẽ liên kết hydrogen đặc hiệu với gene được quan tâm, được đánh dấu bằng một đồng vị phóng xạ hoặc bởi một gốc phát huỳnh quang để sau đó chúng ta có thể theo dõi và phát hiện.

Nhớ rằng các dòng tế bào trong thư viện hệ gene của chim ruồi đã được bảo quản trong các đĩa nuôi cấy gồm nhiều giếng (xem Hình 20.5c). Nếu chúng ta chuyển một số tế bào từ mỗi giếng sang một vị trí xác định trên một màng được làm bằng nylon hoặc nitrocellulose, thì chúng ta có thể cùng lúc sàng lọc được một số lớn các dòng tế bào có trình tự DNA bổ sung với DNA mẫu dò của chúng ta (**Hình 20.7**).

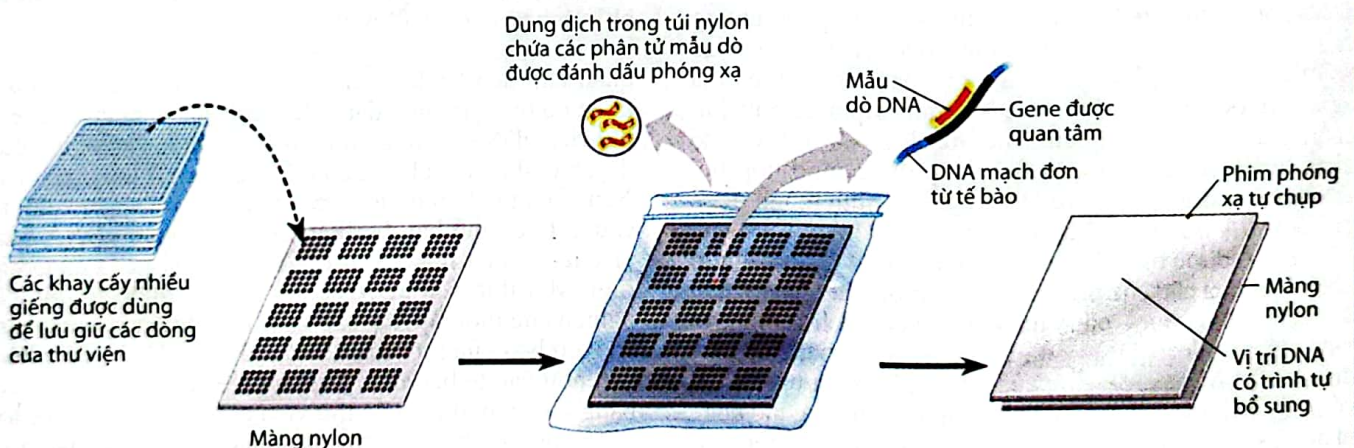
Khi chúng ta đã xác định được một dòng mang gene β -globin, chúng ta có thể nuôi cấy một số tế bào từ khuẩn lạc tương ứng trong một bình nuôi lớn chứa môi trường lỏng, rồi sau đó dễ dàng phân lập được rất nhiều bản sao của gene cần cho nghiên cứu. Chúng ta cũng có thể dùng

▼ Hình 20.7 Phương pháp nghiên cứu

Phát hiện một trình tự DNA đặc hiệu bằng lai với mẫu dò acid nucleic

ỨNG DỤNG Ứng dụng việc lai với một mẫu dò acid nucleic có trình tự bổ sung giúp xác định một trình tự DNA đặc hiệu từ hỗn hợp nhiều phân tử DNA khác nhau. Trong ví dụ này, một tập hợp các dòng vi khuẩn khác nhau từ một thư viện hệ gene chim ruồi được sàng lọc để xác định các dòng mang plasmid tái tổ hợp chứa gene mà chúng ta quan tâm. Thư viện được lưu giữ trong các đĩa cấy nhiều giếng, trong đó mỗi giếng chứa một dòng (xem Hình 20.5c).

KỸ THUẬT Các tế bào từ mỗi dòng được đưa lên một màng nylon đặc biệt. Mỗi màng đủ chỗ cho hàng nghìn dòng khác nhau (nhiều hơn số dòng được minh hoạ ở đây); vì vậy, chỉ cần một số ít màng là có thể giữ được mẫu của tất cả các dòng có trong thư viện. Tập hợp các màng này được gọi là *thư viện xếp hàng* và có thể được dùng để sàng lọc một gene đặc hiệu trên cơ sở sử dụng một mẫu dò đánh dấu. Ở đây, cách đánh dấu mẫu dò là dùng một nucleotide mang đồng vị phóng xạ, nhưng mẫu dò cũng có thể đánh dấu bằng cách sử dụng enzyme tạo các liên kết cộng hoá trị với các gốc phát quang hoặc tạo phản ứng màu.



- 1 Lăn lượt từng khay cấy, các tế bào từ mỗi giếng (đại diện cho một dòng) được chuyển sang một điểm nhất định trên một màng nylon đặc biệt. Màng nylon này sau đó được xử lý để phá vỡ tế bào và biến tính DNA nhằm thu được các mạch đơn DNA dính kết trên màng.
- 2 Màng sau đó được ủ trong dung dịch chứa phân tử mẫu dò đánh dấu phóng xạ có trình tự bổ sung với gene được quan tâm. Do DNA được cố định trên màng ở dạng mạch đơn, nên mẫu dò mạch đơn sẽ kết cặp base theo nguyên tắc bổ sung. Các DNA dư thừa sau đó được rửa trôi. (Điểm có phân tử lai mẫu dò phóng xạ-DNA được vẽ màu vàng trên hình, nhưng thực tế chưa quan sát thấy.)
- 3 Màng sau đó được đặt lên phim cho phép điểm phát phóng xạ tự chụp (gọi là phim phóng xạ tự chụp). Điểm màu đen trên phim tương ứng với vị trí trên màng mà ở đó DNA lai với mẫu dò. Vị trí này có thể được dùng để truy ngược trở lại giếng trên khay cấy mang dòng vi khuẩn chứa gene được quan tâm.

KẾT QUẢ Vị trí điểm màu đen trên phim phóng xạ tự chụp giúp xác định dòng chứa gene được quan tâm. Bằng cách sử dụng các mẫu dò có các trình tự nucleotide khác nhau, các nhà nghiên cứu có thể sàng lọc được đồng thời tập hợp các dòng vi khuẩn mang các gene khác nhau.

các gene được nhân dòng làm mẫu dò để tìm các gene tương tự hoặc giống hệt nó từ các sinh vật khác, chẳng hạn như các loài chim khác.

Biểu hiện các gene của sinh vật nhân thực sau khi đã được nhân dòng

Một khi gene nhất định đã được nhân dòng trong tế bào chủ, sản phẩm protein của nó có thể được tạo ra với số lượng lớn phục vụ cho mục đích nghiên cứu hay cho các ứng dụng thực tế khác mà chúng ta sẽ tìm hiểu trong Mục 20.4. Các gene đã nhân dòng có thể được biểu hiện thành protein hoặc trong tế bào vi khuẩn hoặc trong tế bào sinh vật nhân thực; mỗi loại có ưu và nhược điểm riêng.

Hệ thống biểu hiện ở vi khuẩn

Do một số khía cạnh về điều hoà biểu hiện gene ở sinh vật nhân thực và ở vi khuẩn là khác nhau, nên để có được sự biểu hiện chức năng của một gene sinh vật nhân thực đã được nhân dòng trong các tế bào chủ vi khuẩn có thể gặp khó khăn. Để khắc phục những sự khác biệt trong promoter và trong các trình tự điều khiển khác trên DNA, các nhà khoa học thường sử dụng một **vector biểu hiện**, đó là vector nhân dòng chứa một promoter vi khuẩn hoạt động mạnh nằm ngược dòng ngay gần một vị trí giới hạn mà ở đó gene sinh vật nhân thực được cài vào theo đúng khung đọc. Tế bào chủ vi khuẩn sẽ nhận ra promoter và thực hiện quá trình biểu hiện gene ngoại lai đã được nối với promoter đó. Những vector biểu hiện như vậy cho phép nhiều protein của sinh vật nhân thực được biểu hiện trong các tế bào vi khuẩn.

Một vấn đề khác liên quan đến sự biểu hiện của các gene sinh vật nhân thực đã được nhân dòng trong các tế bào vi khuẩn là sự có mặt các vùng không mã hoá (các intron) ở phần lớn các gene sinh vật nhân thực. Các intron có thể làm cho một gene sinh vật nhân thực trở nên rất dài và khó điều khiển; các tế bào vi khuẩn có thể biểu hiện sai những gene này bởi chúng thiếu bộ máy ghép nối RNA. Vấn đề này có thể được khắc phục bằng việc sử dụng dạng cDNA của gene vốn chỉ chứa các exon.

Hệ thống nhân dòng và biểu hiện ở sinh vật nhân thực

Các nhà sinh học phân tử có thể tránh được sự không tương đồng giữa sinh vật nhân thực và vi khuẩn bằng cách sử dụng các tế bào sinh vật nhân thực, chẳng hạn như nấm men thay cho các vi khuẩn, làm các tế bào chủ để nhân dòng và / hoặc biểu hiện các gene sinh vật nhân thực được quan tâm. Nấm men, một loại nấm đơn bào, có hai ưu điểm. Chúng có thể được nuôi cấy dễ dàng như vi khuẩn, đồng thời chúng cũng có plasmid, một hiện tượng hiếm gặp ở các sinh vật nhân thực. Các nhà khoa học thậm chí đã xây dựng được các plasmid tái tổ hợp kết hợp giữa DNA của vi khuẩn và nấm men và những plasmid này có thể tái bản ở cả hai loại tế bào. Một công cụ hữu hiệu khác để nhân dòng các gene sinh vật nhân thực là các **nhễm sắc thể nhân tạo của nấm men (YAC)** kết hợp các trình tự thiết yếu của một nhiễm sắc thể sinh vật nhân thực, gồm một trình tự khởi đầu tái bản DNA, một tâm động và hai đầu mút, cùng với đoạn cài DNA ngoại lai. Các vector giống nhiễm sắc thể như vậy hoạt động giống như các nhiễm sắc thể thông thường trong nguyên phân; chúng nhân dòng DNA ngoại lai khi tế bào nấm men phân chia. Do một YAC có thể mang một đoạn DNA dài hơn nhiều so với một vector plasmid, nên một đoạn được nhân dòng thường có xu hướng chứa đầy đủ trình tự của một gene hoàn chỉnh hơn là chỉ một phần của nó.

Một nguyên nhân khác sử dụng các tế bào chủ sinh vật nhân thực để biểu hiện một gene sinh vật nhân thực đã được nhân dòng là vì nhiều protein của sinh vật nhân thực sẽ không ở trạng thái hoạt động chức năng trừ khi chúng đã được biến đổi sau dịch mã một cách phù hợp, chẳng hạn bằng việc bổ sung các nhóm lipid hay carbohydrate. Các tế bào vi khuẩn không thể thực hiện những biến đổi này, và nếu sản phẩm của những gene này đòi hỏi một quá trình như vậy từ động vật có vú, thì ngay cả các tế bào nấm men cũng không thể biến đổi protein một cách chính xác. Vì vậy, việc sử dụng các tế bào động vật nuôi cấy làm các tế bào chủ lúc này có thể là cần thiết.

Các nhà khoa học đã phát hiện một loạt các phương pháp đưa DNA tái tổ hợp vào trong các tế bào sinh vật nhân thực. Trong **phương pháp xung điện** mà ở đó một xung điện cực ngắn được truyền qua dung dịch chứa các tế bào sẽ tạo ra những lỗ tạm thời trên màng sinh chất qua đó DNA có thể đi vào tế bào. (Phương pháp này hiện nay cũng còn được dùng phổ biến với các tế bào vi khuẩn.) Theo một cách khác, các nhà khoa học có thể tiêm DNA trực tiếp vào từng tế bào sinh vật nhân thực bằng việc dùng các vi kim tiêm. Để đưa DNA vào các tế bào thực vật, có thể sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium*, cũng như một số phương pháp khác mà chúng ta sẽ nói đến ở phần sau. Nếu DNA ngoại lai sau quá trình chuyển gene được kết hợp vào hệ gene của tế bào chủ nhờ tái tổ hợp di truyền, thì lúc này nó sẽ được tế bào biểu hiện.

Khuếch đại DNA trong điều kiện invitro: Phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR)

Nhân dòng DNA trong các tế bào vẫn là phương pháp tốt nhất để chuẩn bị một số lượng lớn của một gene hay một trình tự DNA nhất định nào đó. Tuy vậy, khi nguồn DNA là không đủ hoặc bị pha tạp, thì **phản ứng chuỗi trùng hợp hay PCR** là kỹ thuật nhanh và có tính đặc hiệu cao hơn. Trong kỹ thuật này, mọi đoạn trình tự đích đặc hiệu ở trong một hay nhiều phân tử DNA có thể được khuếch đại (sao chép nhiều lần) trong ống nghiệm một cách dễ dàng. Nhờ sự tự động hoá, PCR có thể tạo ra hàng tỷ bản sao của một đoạn DNA đích chỉ sau vài giờ, tức là nhanh hơn đáng kể so với thời gian nhiều ngày cần thiết để có thể thu được số bản sao giống như vậy qua sàng lọc một thư viện DNA để tìm một dòng mang gene mong muốn rồi để nó sao chép trong tế bào chủ. Trong thực tế, PCR ngày càng được dùng phổ biến hơn để tạo ra một số lượng bản sao đủ lớn của một đoạn DNA đích từ trước khi nó được cài trực tiếp vào vector. Để dễ tưởng tượng, chúng ta có thể ví PCR giống như việc photocopy chỉ một trang sách duy nhất chứ không phải việc xem qua tất cả các sách có trong một thư viện.

Trong quy trình PCR, một chu kỳ gồm ba bước sẽ thực hiện một phản ứng chuỗi để tạo ra một quần thể các phân tử DNA giống hệt nhau tăng dần lên theo hàm số mũ. Trong mỗi chu kỳ, hỗn hợp phản ứng được tăng nhiệt để làm biến tính (tức là làm tách) hai mạch đơn của chuỗi xoắn kép DNA, sau đó nó được làm mát trở lại để những đoạn mỗi DNA ngắn, mạch đơn, có thể gắn (hình thành liên kết hydrogen) với trình tự bổ sung trên mạch DNA đối diện ở hai đầu của trình tự đích; cuối cùng, một enzyme DNA polymerase chịu nhiệt sẽ tiến hành mở rộng các mạch DNA mới theo chiều 5' → 3' bắt đầu từ vị trí bắt cặp của các đoạn mẫu. Nếu enzyme DNA polymerase được dùng là loại bình thường không chịu nhiệt, thì protein cũng sẽ bị biến tính cùng với DNA trong bước làm nóng

đầu tiên và cần được thay thế sau mỗi chu kỳ phản ứng. Chìa khoá thành công của phản ứng PCR tự động là việc tìm ra các enzyme DNA polymerase có khả năng chịu được nhiệt độ cao bất thường, trong đó enzyme đầu tiên được tìm thấy từ một loài vi khuẩn sống ở suối nước nóng; enzyme này chịu được nhiệt độ cao ở bước thứ nhất của mỗi chu kỳ.

Hình 20.8 minh hoạ các bước trong chu trình PCR.

Tính đặc hiệu của PCR cũng ấn tượng như tốc độ của nó. Chỉ cần một lượng rất nhỏ DNA có trong vật liệu khởi đầu là đủ cho việc nhân dòng có thể diễn ra, thậm chí ngay cả khi DNA đã bị phân huỷ một phần, miễn là chỉ cần có một vài phân tử còn chứa trình tự đích nguyên vẹn. Yếu tố quyết định tính đặc hiệu cao này là các đoạn môi vón chỉ liên kết hydrogen với các trình tự đối diện ở các đầu của phân đoạn đích. (Để có tính đặc hiệu cao, các đoạn môi phải dài ít nhất khoảng 15 nucleotide). Vào cuối chu kỳ thứ ba, một phân tử số phân tử DNA con sẽ giống hệt trình tự của phân đoạn đích với cả hai mạch có chiều dài bằng nhau. Từ thời điểm này trở đi, sau mỗi chu kỳ, số phân tử có chiều dài cả hai mạch tương ứng đúng với phân đoạn đích sẽ ngày càng chiếm ưu thế so với tất cả các phân tử DNA khác có trong hỗn hợp phản ứng.

Mặc dù có ưu thế về tốc độ và tính đặc hiệu, song PCR không thể thay thế được việc nhân dòng gene nhờ các tế bào mỗi khi một gene nào đó cần với số lượng lớn. Lỗi sao chép đôi lúc xảy ra trong PCR là một nguyên nhân hạn chế số bản sao tốt được tạo ra bởi phương pháp này. Khi PCR được dùng để cung cấp những đoạn DNA cho việc nhân dòng bằng tế bào, thì các dòng thu được sẽ được giải trình tự để chọn ra các dòng mang các đoạn cái không chứa lỗi.

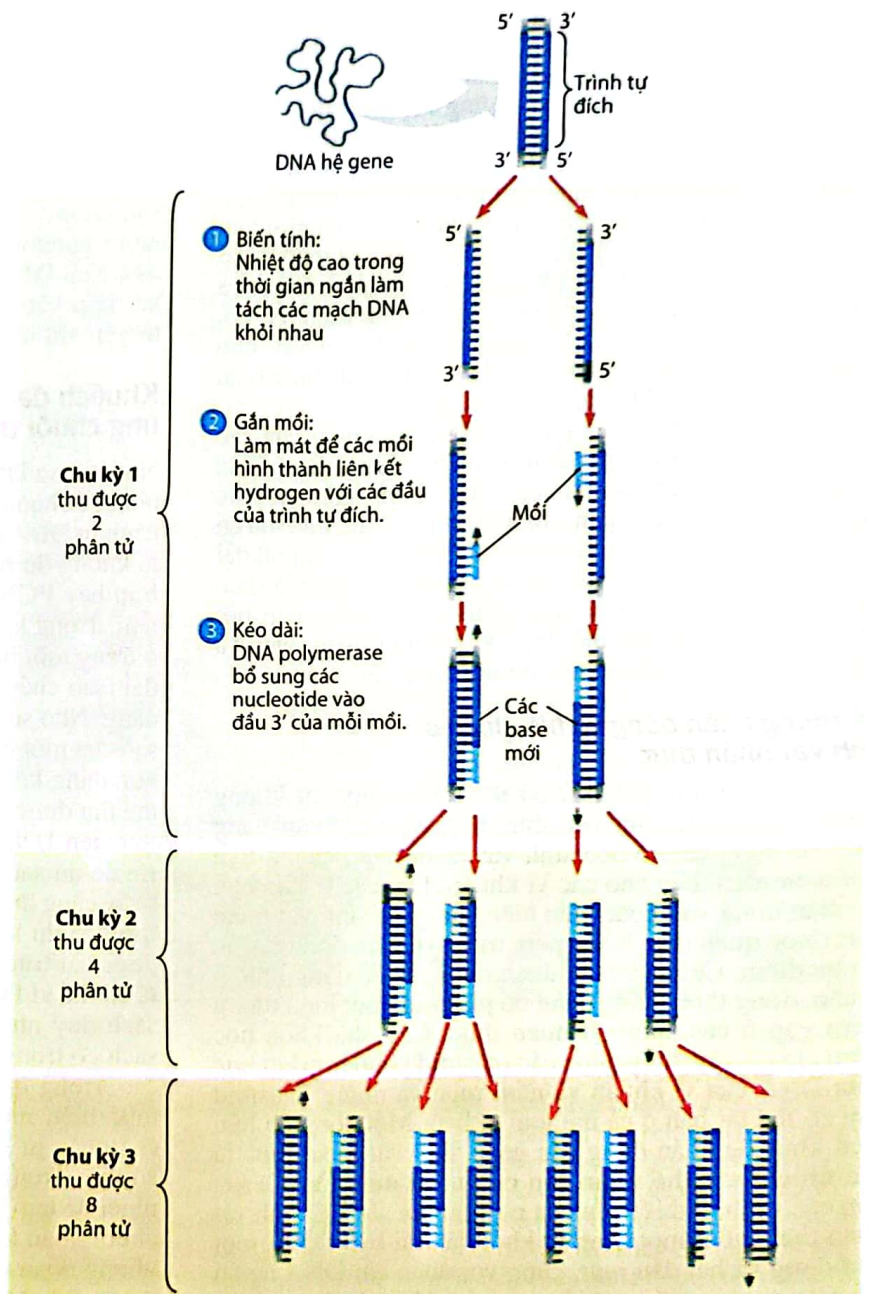
Được đưa ra năm 1985, PCR từ đó đã có tác động lớn đến các nghiên cứu sinh học và sự phát triển của công nghệ sinh học. PCR đã được sử dụng để nhân bản DNA từ nhiều nguồn vật liệu khác nhau: các phân đoạn DNA cổ từ một con voi Mamut đông lạnh đã sống cách đây 40.000 năm; DNA từ các dấu vân tay hoặc từ những lượng rất nhỏ của máu, các mảnh mô, tinh dịch tại hiện trường các vụ án hình sự; DNA từ các tế bào phôi duy nhất được dùng để chẩn đoán sai hỏng di truyền trước sinh; và DNA của các gene virus từ các tế bào bị nhiễm virus vốn rất khó phát hiện, chẳng hạn như HIV. Chúng ta sẽ quay trở lại với các ứng dụng của PCR ở phần cuối chương này.

Hình 20.8 Phương pháp nghiên cứu

Phản ứng chuỗi polymerase (PCR)

ỨNG DỤNG Nhờ PCR, mọi đoạn đặc hiệu - các trình tự đích - trong một mẫu DNA có thể được sao chép (khuếch đại) nhiều lần hoàn toàn trong điều kiện *invitro*.

KỸ THUẬT PCR đòi hỏi DNA sợi kép chứa trình tự đích, một enzyme DNA polymerase chịu nhiệt, cả bốn loại nucleotide, và hai mạch DNA dài khoảng 15 - 20 nucleotide làm mồi. Mỗi mồi có trình tự bổ sung với một đầu của trình tự đích trên một mạch; mỗi thứ hai có trình tự bổ sung với đầu còn lại trên mạch kia.



KẾT QUẢ

Sau 3 chu kỳ, một phân tử số phân tử khớp một cách chính xác với trình tự đích. Sau 30 chu kỳ, 99,99% số phân tử sẽ khớp chính xác với trình tự đích.

KIỂM TRA KHÁI NIỆM 20.1

1. Vị trí giới hạn của một enzyme giới hạn tên là *PvuI* có trình tự như sau:



Enzyme này cắt chữ chỉ trên mỗi mạch ở giữa T và C. Loại liên kết nào bị cắt bởi enzyme?

2. **HÀNG VẼ** Một mạch của một phân tử DNA sợi kép có trình tự như sau: 5'-CCCTGACGATCGTTACCG-3'. Hãy vẽ trình tự mạch bổ sung còn lại. Enzyme *PvuI* có cắt phân tử này không? Nếu có, hãy viết sản phẩm hình thành.
3. Những khó khăn nào có thể gặp phải khi dùng các vector plasmid và các tế bào chủ vi khuẩn để sản xuất một lượng lớn protein do các gene sinh vật nhân thực đã được nhân dòng mã hoá?
4. **ĐIỀU GÌ NẾU?** Nếu bạn muốn nhân dòng đoạn DNA được vẽ ở câu 2, thì trình tự đoạn mỗi sẽ như thế nào với giả thiết mỗi mỗi chỉ dài 4 nucleotide. (Trong thực tế, mỗi phải dài hơn.) Nhớ đánh dấu các đầu 5' và 3'.

Câu trả lời có trong Phụ lục A.

KHÁI NIỆM 20.2

Công nghệ DNA cho phép nghiên cứu trình tự, sự biểu hiện và chức năng của gene

Một khi kỹ thuật nhân dòng DNA đã cung cấp được một lượng lớn các đoạn DNA đặc thù, thì chúng ta có thể làm sáng tỏ được một số câu hỏi thú vị về một gene nhất định nào đó và chức năng của nó. Ví dụ, liệu có phải trình tự của gene β -globin ở chim ruồi chỉ ra cấu trúc của một protein có khả năng vận chuyển oxygen hiệu quả hơn so với loại protein này ở các loài vốn có hoạt động trao đổi chất yếu hơn so với chim ruồi? Liệu một gene nhất định nào đó ở người có khác nhau giữa người này với người khác không, và liệu các allele nhất định của gene đó có liên quan đến một rối loạn di truyền hay không? Một gene nhất định được biểu hiện ở đâu trong cơ thể và khi nào? Và, cuối cùng, vai trò của một gene nhất định trông có thể là gì?

Trước khi chúng ta có thể bắt đầu nói về các câu hỏi thú vị này, chúng ta cần xem một số kỹ thuật phòng thí nghiệm tiêu chuẩn được dùng để phân tích trình tự DNA của các gene.

Điện di trên gel và thẩm tách Southern

Nhiều phương pháp nghiên cứu về các phân tử DNA đều liên quan đến điện di trên gel. Kỹ thuật này sử dụng một loại gel được tạo nên bởi các hợp chất polyme, chẳng hạn như polysaccharide. Gel hoạt động như một chiếc "rây phân tử" cho phép phân tách các acid nucleic và protein ra khỏi nhau dựa vào kích thước, độ tích điện hoặc một số tính chất vật lý khác của chúng (Hình 20.9). Do các phân tử acid nucleic mang điện tích âm trên gốc phosphate của chúng, nên chúng luôn dịch chuyển về phía cực dương

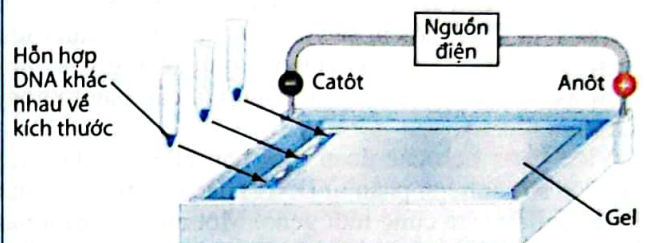
Hình 20.9 Phương pháp nghiên cứu

Điện di trên gel

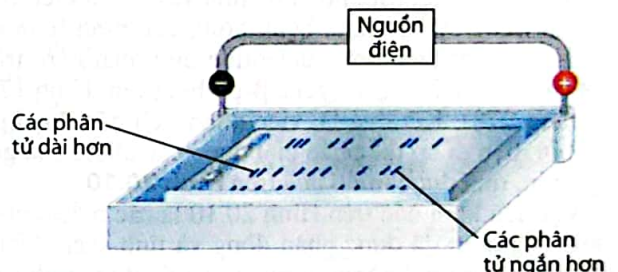
ỨNG DỤNG Điện di trên gel được dùng để phân tách các acid nucleic hoặc protein khác nhau về kích thước, độ tích điện, hoặc các thuộc tính vật lý khác. Các phân tử DNA được phân tách bởi điện di trên gel trong các thí nghiệm phân tích các đoạn giới hạn đối với cả các gene được nhân dòng (Hình 20.10) cũng như DNA hệ gene (xem Hình 20.11).

KỸ THUẬT Điện di trên gel phân tách các đại phân tử trên cơ sở tốc độ di chuyển trên điện trường qua gel polyme. Khoảng cách di chuyển của một phân tử DNA tỷ lệ nghịch với chiều dài của nó. Một hỗn hợp các phân tử DNA, thường hoặc là các đoạn cắt giới hạn hoặc là sản phẩm PCR, được phân tách thành các băng. Mỗi băng chứa hàng nghìn phân tử có kích thước giống nhau.

- 1 Mỗi mẫu, là một hỗn hợp nhiều phân tử DNA, được tra vào các giếng riêng biệt gần một đầu của bản gel mỏng. Bản gel được đặt trên một giá nhựa và ngâm trong một dung dịch đệm nước chứa trong một khay có các điện cực ở hai đầu.



- 2 Khi bật dòng điện, các phân tử DNA tích điện âm di chuyển về phía điện cực dương, với các phân tử ngắn di chuyển nhanh hơn các phân tử dài. Các băng điện di ở đây được vẽ màu xanh, nhưng trên bản gel điện di thực sự, lúc này chưa quan sát thấy các băng.



KẾT QUẢ Sau khi ngắt điện, một loại thuốc nhuộm liên kết DNA được bổ sung. Thuốc nhuộm này phát huỳnh quang màu hồng dưới nguồn sáng cực tím, cho phép phát hiện các băng riêng rẽ đã liên kết với thuốc nhuộm. Trong bản gel minh họa dưới đây, các băng màu hồng tương ứng với các đoạn DNA có kích thước khác nhau được tách rời nhau trên gel điện di. Nếu tất cả các mẫu được cắt trước bởi cùng một enzyme giới hạn, thì các kiểu băng điện di khác nhau cho biết chúng có nguồn gốc khác.

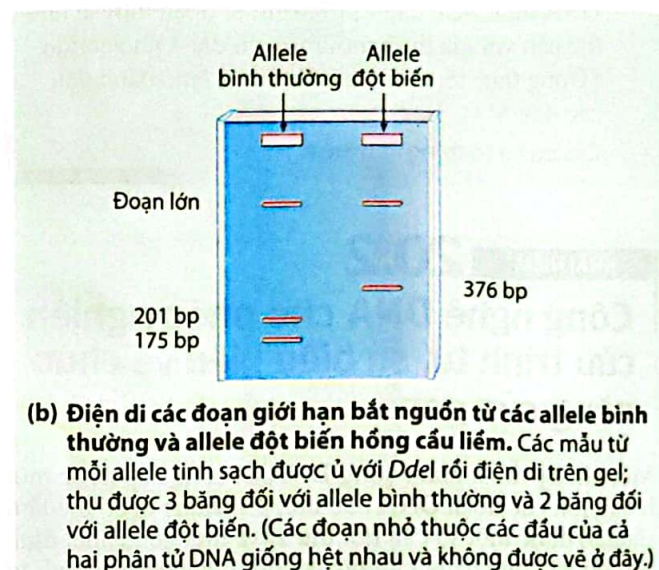
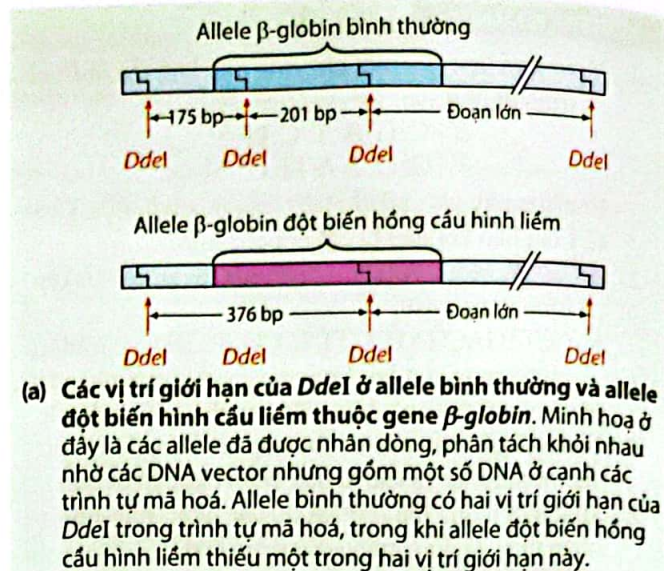


trên trường điện từ. Khi chúng dịch chuyển, đám các sợi polyme ngắn cản mạnh hơn đối với các sợi dài hơn, dẫn đến sự phân tách của các sợi có chiều dài khác nhau. Do vậy, điện di trên gel giúp phân tách hỗn hợp các phân tử DNA mạch thẳng thành các băng điện di, trong đó mỗi băng sẽ bao gồm các phân tử DNA có chiều dài giống nhau.

Một ứng dụng hữu ích của kỹ thuật này là *phân tích các đoạn giới hạn*, chúng có thể nhanh chóng cung cấp các thông tin có ích về các trình tự DNA. Trong kiểu phân tích này, người ta cắt phân tử DNA bằng enzyme giới hạn, sau đó các đoạn DNA được phân tách trên gel điện di. Khi hỗn hợp các đoạn giới hạn dịch chuyển qua trường điện di, nó tạo nên một kiểu các băng đặc trưng cho phân tử DNA gốc ban đầu được cắt bởi loại enzyme giới hạn nhất định. Trong thực tế, các phân tử DNA kích thước nhỏ của virus hay plasmid có thể dễ dàng phát hiện bằng kiểu phân bố các đoạn giới hạn của chúng. Do có thể thu hồi DNA nguyên vẹn trở lại từ gel điện di, quy trình kỹ thuật này còn là một cách để chuẩn bị các mẫu tinh sạch chứa các đoạn DNA riêng biệt nếu như băng điện di được quan tâm có thể phân tách rõ ràng khỏi các băng điện di còn lại. (Những phân tử DNA kích thước rất lớn, như DNA nhiễm sắc thể của sinh vật nhân thực, thường tạo nên quá nhiều băng đến mức chúng xuất hiện thành một dải băng điện di liên tục với các băng không tách khỏi nhau.)

Việc phân tích các đoạn giới hạn cũng rất hữu ích cho việc so sánh hai phân tử DNA khác nhau, chẳng hạn như hai allele của cùng một gene. Một enzyme giới hạn nhận ra một trình tự nucleotide đặc thù, và thậm chí chỉ cần một thay đổi ở một cặp base trên trình tự đó cũng đủ để bảo vệ nó không bị cắt ở một vị trí nhất định. Vì vậy, nếu hai allele khác nhau về các nucleotide trong vị trí giới hạn, thì việc xử lý bằng enzyme nhận biết ra trình tự đó sẽ tạo nên hai hỗn hợp các đoạn khác nhau tương ứng với hai allele. Mỗi hỗn hợp như vậy sẽ có kiểu băng điện di riêng. Ví dụ như: bệnh hồng cầu hình liềm gây ra bởi một đột biến đơn nucleotide duy nhất nằm trong một trình tự giới hạn của gene β -globin (xem Hình 20.22 và trang 278). Kết quả là, việc phân tích các đoạn giới hạn bởi điện di có thể phân biệt được các allele của gene β -globin, như được minh họa trên **Hình 20.10**.

Vật liệu khởi đầu trên Hình 20.10 là các mẫu của các allele β -globin đã được nhân dòng và tinh sạch. Nhưng nếu như chúng ta không có các allele đã được tinh sạch, thì chúng ta bắt đầu thế nào? Giả sử chúng ta muốn xác định liệu một người có phải có kiểu gene dị hợp tử về allele đột biến quy định hồng cầu hình liềm hay không. Trong trường hợp này, chúng ta có thể so sánh trực tiếp DNA hệ gene của một người như vậy với DNA của người bị bệnh (tức là đồng hợp tử về allele đột biến) và một người đồng hợp tử về allele bình thường. Như chúng ta đã nêu ở trên, việc điện di DNA hệ gene người được cắt bởi enzyme giới hạn rồi được nhuộm bằng thuốc nhuộm liên kết DNA thu được quá nhiều băng nên không thể phân biệt được chúng. Tuy vậy, một phương pháp được gọi là **thẩm tách Southern** hay **lai Southern** (còn được gọi là thẩm tách Nam, được phát triển bởi nhà hoá sinh học người Anh là Edwin Southern), trong đó kết hợp giữa điện di trên gel và lai acid nucleic, cho phép chúng ta phát hiện được những băng điện di mang gene β -globin. Nguyên lý giống với phương pháp lai acid nucleic để sàng lọc tìm ra các dòng vi khuẩn (xem Hình 20.7). Trong phương pháp



▲ **Hình 20.10** Sử dụng phân tích các đoạn cắt giới hạn để phân biệt giữa các allele hồng cầu liềm và allele bình thường của gene β -globin ở người. (a) Đột biến hồng cầu liềm làm mất một vị trí giới hạn của Ddel ở trong gene. (b) Kết quả là, khi xử lý với enzyme Ddel, các allele đột biến và bình thường tạo ra các phân đoạn giới hạn khác nhau.

ĐIỀU GÌ NẾU? Giả sử các dòng vi khuẩn tái tổ hợp mang các allele này. Bạn sẽ phân lập DNA của các allele như thế nào để tạo ra các mẫu tinh sạch trước khi chạy điện di trên gel? (Gợi ý: xem kỹ các Hình 20.4 và 20.9.)

lai Southern, mẫu dò thường là một phân tử DNA mạch đơn đánh dấu phóng xạ có trình tự bổ sung với gene được quan tâm. **Hình 20.11** phác thảo các bước của toàn bộ quy trình và chỉ rõ bằng cách nào kỹ thuật này có thể phân biệt được cá thể dị hợp tử (ở đây là allele hồng cầu liềm) so với một cá thể đồng hợp tử về allele bình thường.

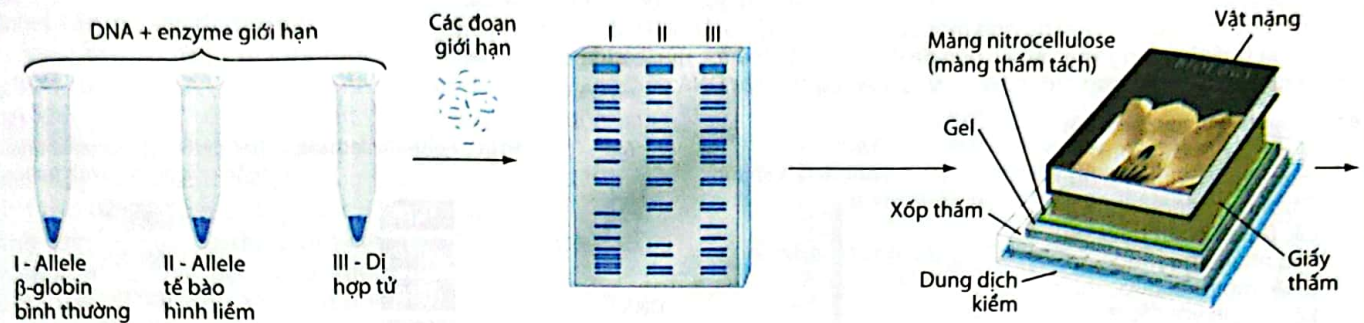
Việc xác định các cá thể mang các allele đột biến liên quan đến các bệnh di truyền chỉ là một trong những cách mà phương pháp lai Southern có thể được áp dụng. Trong thực tế, kỹ thuật này là một phương pháp sinh học phân tử chủ lực trong nhiều năm. Tuy vậy, gần đây nó được thay thế bởi các phương pháp nhanh hơn thường liên quan đến việc sử dụng PCR để nhân dòng các phần đặc hiệu của hệ gene.

▼ Hình 20.11 Phương pháp nghiên cứu

Phân tích các đoạn DNA bằng thẩm tách Southern

ỨNG DỤNG Các nhà nghiên cứu có thể phát hiện được các đoạn trình tự nucleotide đặc thù trong hỗn hợp DNA bằng phương pháp này. Thẩm tách Southern rất hiệu quả trong việc so sánh các đoạn giới hạn được tạo ra từ các nguồn mẫu DNA hệ gene khác nhau.

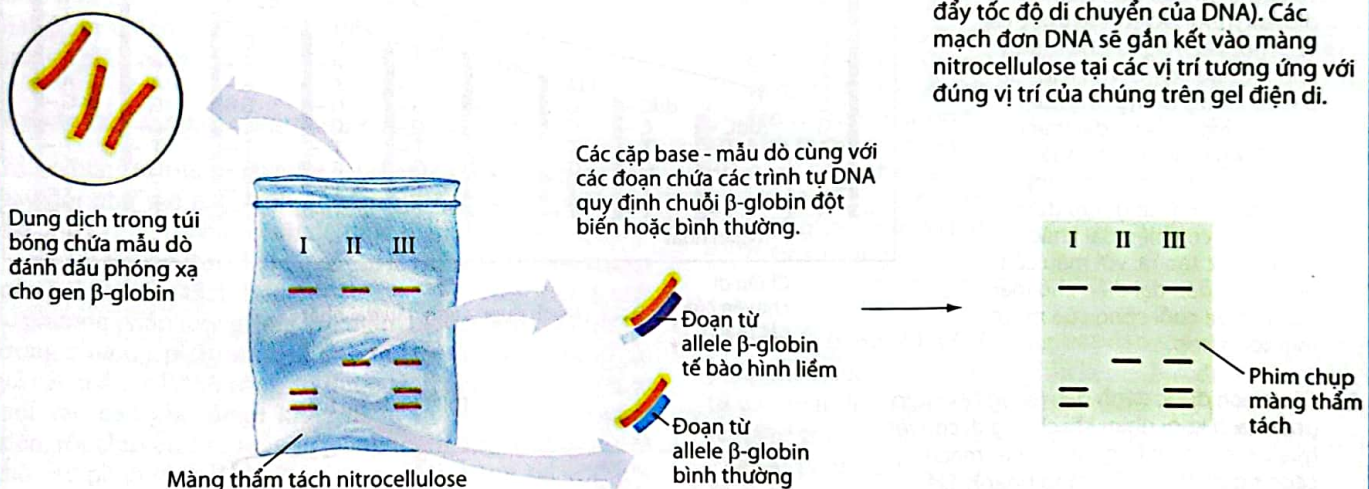
KỸ THUẬT Trong ví dụ này, chúng ta so sánh các mẫu DNA hệ gene từ ba cá thể khác nhau: một người là đồng hợp tử về allele β -globin bình thường (I), một người là đồng hợp tử về allele tế bào hồng cầu hình liềm (II), và một người dị hợp tử (III). Như đã mô tả trên Hình 20.7, chúng ta sử dụng một mẫu dò đánh dấu phóng xạ; tuy vậy cũng có thể sử dụng các phương pháp đánh dấu và phát hiện mẫu dò khác.



1 Chuẩn bị các đoạn giới hạn. Mỗi mẫu DNA được trộn với cùng một enzyme giới hạn, trong ví dụ ở đây là *DdeI*. Kết quả xử lý thu được một hỗn hợp gồm hàng nghìn các đoạn giới hạn.

2 Điện di trên gel. Các đoạn giới hạn trong mỗi mẫu được phân tách khỏi nhau bằng điện di, tạo nên một kiểu hình các băng điện di đặc thù. (Trong thực tế, số băng có thể nhiều hơn so với hình minh họa, và không quan sát thấy khi chưa được nhuộm.)

3 Chuyển DNA (thẩm tách). Với gel được sắp xếp như mô tả trên hình, hoạt động mao dẫn sẽ hút dung dịch kiểm từ dưới lên và đi qua gel. Dòng mao dẫn này sẽ chuyển DNA lên màng nitrocellulose, tạo nên hiện tượng thẩm tách; trong quá trình này, DNA đồng thời bị biến tính. (Một cách cải tiến của phương pháp này là dùng một dòng điện thúc đẩy tốc độ di chuyển của DNA). Các mạch đơn DNA sẽ gắn kết vào màng nitrocellulose tại các vị trí tương ứng với đúng vị trí của chúng trên gel điện di.



4 Lai với mẫu dò phóng xạ. Màng thẩm tách nitrocellulose sau đó được ngâm trong dung dịch chứa mẫu dò đánh dấu phóng xạ. Trong ví dụ này, mẫu dò là một đoạn DNA mạch đơn có trình tự bổ sung với gene β -globin. Phân tử mẫu dò sẽ gắn kết bởi sự kết cặp giữa các base của nó với tất cả các phân đoạn chứa một phần gene β -globin. (Trong thực tế, lúc này chưa quan sát thấy băng thẩm tách).

5 Phát hiện mẫu dò. Một tấm phim phóng xạ tự chụp được đặt đè lên màng thẩm tách. Hoạt độ phóng xạ của các mẫu dò ở trạng thái liên kết sẽ bộc lộ trên phim và tạo nên một ảnh tương ứng với các băng chứa các đoạn DNA mà ở đó có sự kết cặp base với các mẫu dò.

KẾT QUẢ Do kiểu hình băng giữa ba mẫu rõ ràng khác nhau, nên phương pháp này có thể được dùng để xác định các cá thể dị hợp tử mang allele hồng cầu liềm (III), cũng như những cá thể bị bệnh mang cả hai allele đột biến (II) với những cá thể không bị tác động nhờ có cả hai allele bình thường (I). Kiểu băng đối với các mẫu I và II tương ứng giống với kiểu băng của các allele bình thường và đột biến trên Hình 20.10b. Kiểu băng của mẫu dị hợp tử (III) là sự kết hợp của hai kiểu băng đồng hợp tử (I và II).

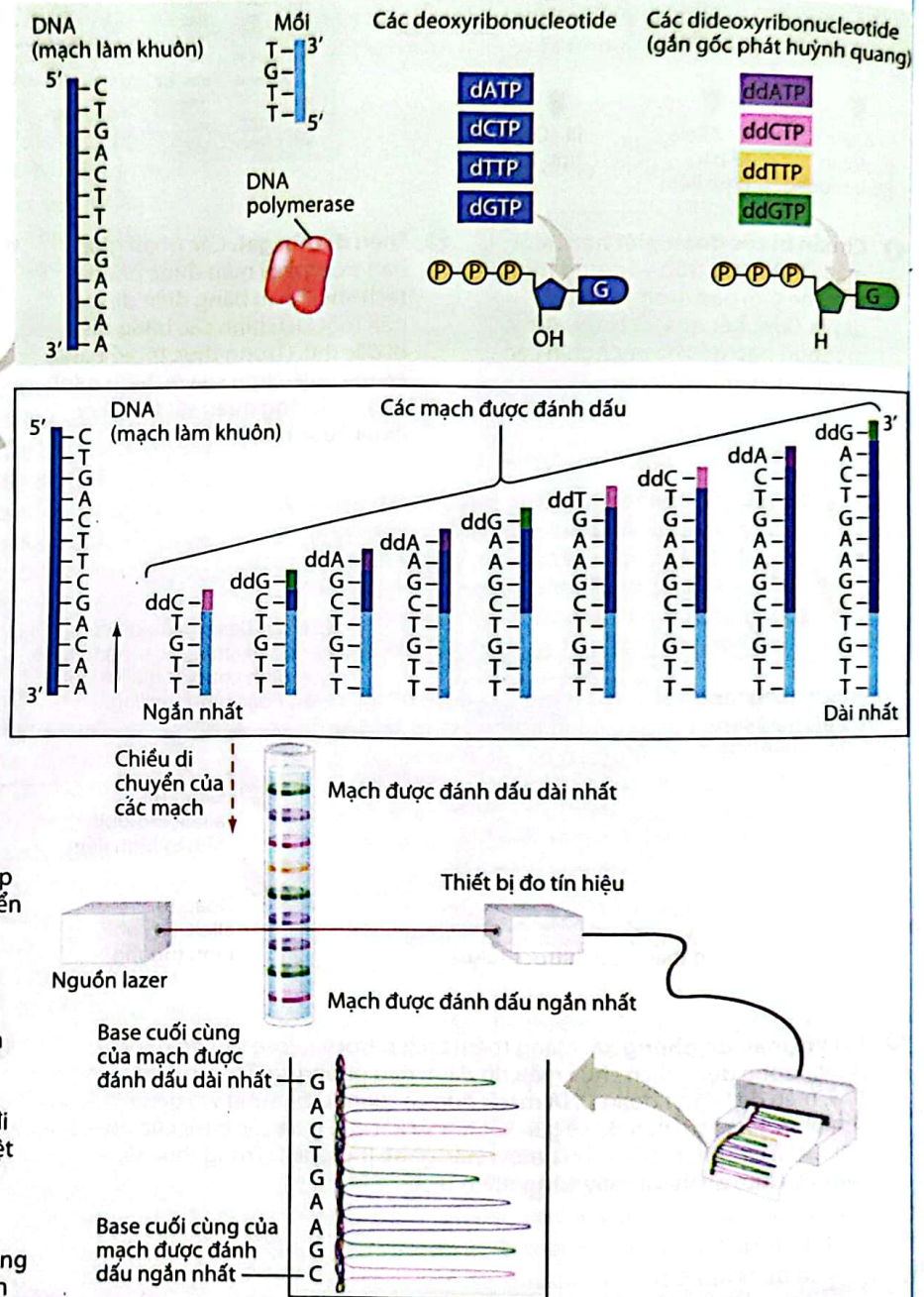
Hình 20.12 Phương pháp nghiên cứu

Giải trình tự DNA bằng phương pháp kết thúc chuỗi dideoxy

ỨNG DỤNG Trình tự nucleotide của các đoạn DNA dài đến khoảng 800 cặp base có thể xác định được nhanh chóng bằng máy thực hiện các phản ứng giải trình tự và tách các sản phẩm phản ứng dựa vào chiều dài của chúng.

KỸ THUẬT Phương pháp này tổng hợp nên một tập hợp các mạch DNA có trình tự bổ sung với đoạn DNA gốc. Mỗi mạch đều bắt đầu từ một mồi giống nhau và kết thúc bởi một dideoxynucleotide (ddNTP), tức là một loại nucleotide được biến đổi. Sự lắp ráp của ddNTP làm dừng phản ứng kéo dài mạch DNA bởi nó thiếu đầu 3'-OH là vị trí để nucleotide tiếp theo có thể gắn vào (xem Hình 16.14). Trong tập hợp các mạch DNA được tổng hợp, mỗi một vị trí nucleotide dọc theo trình tự gốc được thể hiện qua các mạch được kết thúc tại vị trí đó nhờ một ddNTP. Nhờ mỗi loại ddNTP được gắn với một gốc phát huỳnh quang khác nhau, nên dễ dàng xác định được nucleotide kết thúc ở mỗi mạch được tổng hợp mới, từ đó suy ra toàn bộ trình tự DNA gốc.

- Đoạn DNA cần giải trình tự được gây biến tính thành mạch đơn, rồi được ủ trong ống nghiệm với các thành phần thiết yếu cho phản ứng tổng hợp DNA: một mồi được thiết kế bắt cặp với đầu 3' đã biết của mạch DNA khuôn, DNA polymerase, bốn loại deoxyribonucleotide và bốn loại dideoxynucleotide được đánh dấu với một phân tử phát huỳnh quang đặc thù cho mỗi loại.
- Quá trình tổng hợp mỗi mạch mới bắt đầu từ đầu 3' của mồi và tiếp diễn cho đến khi một dideoxynucleotide được cài vào một cách ngẫu nhiên thay cho một deoxyribonucleotide bình thường tương ứng. Lúc này, sự tiếp tục kéo dài mạch mới đang tổng hợp bị ngăn cản. Cuối cùng, một tập hợp các mạch mới tổng hợp được đánh dấu có chiều dài khác nhau được tạo ra, với màu của gốc đánh dấu đại diện cho loại nucleotide cuối cùng của mạch mới tổng hợp.



- Các mạch được đánh dấu trong hỗn hợp phân tách khỏi nhau khi chúng di chuyển qua gel polyacrylamide, với các mạch càng ngắn di chuyển càng nhanh. Để giải trình tự DNA, gel được tạo ra trong các mao quản chứ không phải trên bản gel như ở Hình 20.9. Kích thước nhỏ của mao quản cho phép thiết bị đo tín hiệu cảm biến được màu của mỗi loại gốc phát huỳnh quang khi mỗi mạch DNA đi qua. Bằng cách này, thiết bị đo phân biệt được các mạch DNA chỉ khác nhau một nucleotide về chiều dài.

KẾT QUẢ Màu của gốc phát huỳnh quang trên mỗi mạch chỉ loại nucleotide ở đầu tận cùng của nó. Kết quả sẽ được in ra như một ảnh phổ, và trình tự nucleotide bổ sung với mạch làm khuôn được đọc lần lượt từ dưới (mạch ngắn nhất) lên trên (mạch dài nhất). (Lưu ý trình tự được đọc bắt đầu từ sau trình tự của mồi.)

Giải trình tự DNA

Khi một gene đã được nhân dòng, có thể xác định được toàn bộ trình tự nucleotide của nó. Hiện nay, kỹ thuật giải trình tự đã được tự động hoá và được thực hiện bằng máy giải trình tự tự động. Quy trình giải trình tự tự động dựa trên một kỹ thuật được gọi là *Phương pháp kết thúc chuỗi dideoxynucleotide* (gọi tắt là *dideoxy*) theo nguyên tắc được minh hoạ trên **Hình 20.12**. Phương pháp này được phát triển bởi nhà hoá sinh học người Anh - Frederick Sanger, người được trao giải Nobel năm 1980 về thành công này. (Ông là một trong bốn nhà khoa học được trao giải Nobel 2 lần; năm 1975, Sanger còn được trao giải Nobel về việc xác định trình tự amino acid insulin.)

Việc biết rõ trình tự của một gene cho phép các nhà nghiên cứu so sánh trực tiếp gene đó với các gene ở những loài khác đã biết về chức năng. Nếu hai gene thuộc hai loài khác nhau rất giống nhau về trình tự, thì có thể suy luận rằng sản phẩm do các gene này mã hoá có lẽ thực hiện các chức năng giống nhau. Bằng cách này, việc so sánh các trình tự có thể cung cấp các đầu mối tìm hiểu về chức năng của một gene, một chủ đề sẽ được chúng ta nói tới ở phần sau. Một tập hợp các dữ liệu khác được cung cấp từ các nghiên cứu phân tích thời điểm và vị trí gene được biểu hiện.

Phân tích sự biểu hiện của gene

Khi đã nhân dòng được một gene, các nhà nghiên cứu có thể tạo ra các mẫu dò acid nucleic được đánh dấu và sử dụng chúng để tiến hành lai với các phân tử mRNA được phiên mã từ gene đó. Các mẫu dò có thể cung cấp thông tin về thời điểm và vị trí gene được phiên mã trong cơ thể. Giai đoạn phiên mã thường được dùng là biện pháp xác định sự biểu hiện của gene.

Nghiên cứu sự biểu hiện của các gene đơn lẻ

Giả sử chúng ta muốn tìm hiểu sự biểu hiện của gene β -globin thay đổi như thế nào trong quá trình phát triển phôi của loài chim ruồi, có hai cách để thực hiện điều này.

Phương pháp thứ nhất được gọi là **thẩm tách Northern** (còn gọi là thẩm tách Bắc, một cách “chơi chữ” tiếng Anh do phương pháp này giống với thẩm tách Nam- Southern). Trong phương pháp này, chúng ta tiến hành điện di trên gel các mẫu mRNA tổng số được tách chiết từ phôi chim ruồi vào các giai đoạn khác nhau trong quá trình phát triển, rồi chuyển các mẫu đó sang màng nitrocellulose và cho các phân tử mRNA trên màng tiến hành lai với một mẫu dò đánh dấu nhận biết đặc hiệu mRNA của gene β -globin. Lúc này, nếu tiến hành chụp ảnh, thì hình ảnh thu được sẽ giống với ảnh thẩm tách Southern trên Hình 20.11 với mỗi băng tương ứng với một kích thước nhất định xuất hiện ở từng mẫu. Nếu băng mRNA được tìm thấy ở một giai đoạn phát triển nhất định, thì có thể giả thiết rằng: protein của gene biểu hiện chức năng trong các sự kiện diễn ra tại giai đoạn đó. Giống với thẩm tách Southern, phương pháp thẩm tách Northern đã từng là một phương pháp sinh học phân tử chủ lực trong thời gian dài, nhưng ở nhiều phòng thí nghiệm đôi khi nó có thể được thay thế bằng các kỹ thuật khác.

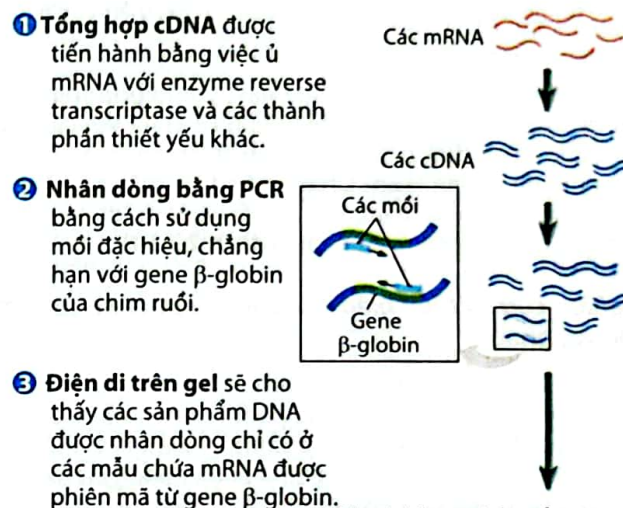
Một phương pháp nhanh và có tính chọn lọc cao (vì vậy ngày càng được dùng rộng rãi hơn) là **phản ứng chuỗi trùng hợp phiên mã ngược**, hay **RT-PCR** (**Hình 20.13**). Việc phân tích sự biểu hiện của gene β -globin ở

Hình 20.13 Phương pháp nghiên cứu

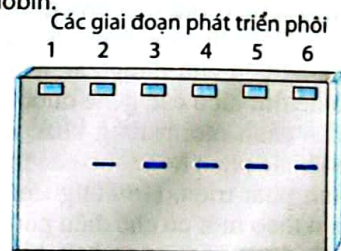
Phân tích sự biểu hiện của gene bởi RT-PCR

ỨNG DỤNG RT-PCR dùng enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase, RT) kết hợp với PCR và điện di trên gel. RT-PCR có thể được dùng để so sánh sự biểu hiện của gene giữa các mẫu; chẳng hạn giữa các giai đoạn khác nhau của quá trình phát triển phôi, giữa các mô khác nhau, hoặc cùng loại tế bào nhưng ở các điều kiện khác nhau.

KỸ THUẬT Trong ví dụ này, các mẫu chứa mRNA của sáu giai đoạn phát triển khác nhau của phôi ở chim ruồi được xử lý theo các bước được minh hoạ dưới đây. (Chỉ minh hoạ mRNA từ một giai đoạn.)

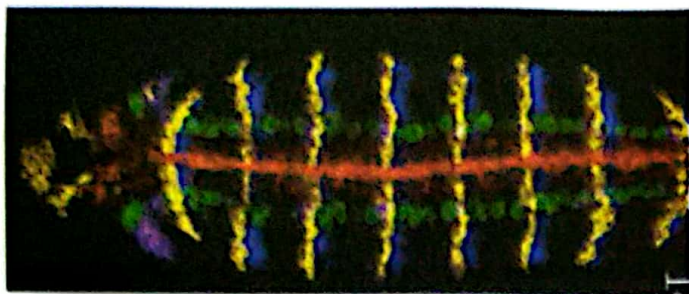


KẾT QUẢ mRNA của gene này bắt đầu được biểu hiện từ giai đoạn 2 và được duy trì biểu hiện liên tục tới giai đoạn 6. Kích thước các phân đoạn được nhân dòng phụ thuộc vào khoảng cách giữa các đoạn mồi được sử dụng.



chim ruồi bằng RT-PCR cũng bắt đầu giống như phương pháp thẩm tách Northern, nghĩa là mRNA được tách chiết từ các giai đoạn phát triển khác nhau của phôi. Enzyme reverse transcriptase sau đó được bổ sung để tổng hợp cDNA; phân tử này được dùng làm khuôn cho các chu kỳ PCR tiếp theo bằng việc dùng cặp mồi đặc hiệu với gene mã hoá β -globin. Khi sản phẩm PCR được chạy trên gel điện di, các bản sao của vùng DNA được khuếch đại được quan sát thấy như các băng, nhưng chúng chỉ có mặt ở các mẫu mà ban đầu có sẵn mRNA β -globin. Chẳng hạn, trong trường hợp β -globin của chim ruồi, chúng ta có thể trông chờ việc quan sát thấy một băng vào giai đoạn các tế bào hồng cầu bắt đầu hình thành, rồi tất cả các giai đoạn sau đó đều xuất hiện băng tương tự. RT-PCR cũng có thể dùng để phân tích các mRNA được thu thập từ các mô khác nhau vào cùng thời điểm để xác định xem mô nào phiên mã một loại mRNA nhất định.

Một phương pháp khác để xác định loại mô hay tế bào nào biểu hiện những gene nhất định là tìm ra các vị trí nhất định trên một cơ thể nguyên vẹn có các phân tử mRNA đặc thù, bằng việc tiến hành lai với các mẫu dò đánh dấu



▲ Hình 20.14 Xắc định gene được biểu hiện bằng lai *in situ*. Phôi này của *Drosophila* được ủ với dung dịch chứa các mẫu dò của năm loại mRNA khác nhau. Mỗi mẫu dò được đánh dấu bằng một gốc phát màu hình quang khác nhau. Phôi sau đó được quan sát bằng kính hiển vi huỳnh quang. Mỗi màu cho biết nơi gene tương ứng được biểu hiện qua phiên mã thành mRNA.

tại chỗ, tức là *in situ*. Kỹ thuật này, gọi là **phương pháp lai *in situ***, được dùng phổ biến hơn cả cùng với các mẫu dò được đánh dấu bằng cách gắn thêm các gốc nhuộm phát huỳnh quang (xem Chương 6). Các mẫu dò khác có thể được đánh dấu bằng các thuốc nhuộm khác với các kết quả đẹp một cách ấn tượng (**Hình 20.14**).

Nghiên cứu sự biểu hiện của các nhóm gene tương tác với nhau

Một trong những mục tiêu quan trọng nhất của sinh học hiện nay là tìm hiểu các gene phối hợp với nhau thế nào để hình thành và duy trì hoạt động của một cơ thể. Đến nay, toàn bộ hệ gene của nhiều loài đã được giải trình tự, cho phép có thể nghiên cứu sự biểu hiện của các nhóm gene lớn, nói cách khác là cách tiếp cận hệ thống. Các nhà nghiên cứu dùng các trình tự hệ gene như các mẫu dò để tìm hiểu các gene được biểu hiện thế nào trong các hoàn cảnh môi trường khác nhau, chẳng hạn như ở các mô khác nhau hoặc vào các thời điểm khác nhau của quá trình phát triển. Họ cũng tìm các nhóm gene được biểu hiện theo một cơ chế điều phối chung với mục tiêu là xác định được các mạng lưới biểu hiện của các gene trong toàn bộ hệ gene.

Chiến lược cơ bản trong một nghiên cứu biểu hiện gene mang tính toàn hệ gene như vậy thường gồm việc phân lập các mRNA được hình thành ở mỗi loại tế bào nhất định, rồi sử dụng những phân tử này làm khuôn để tổng hợp nên các cDNA qua phiên mã ngược; sau đó, dùng phép lai acid nucleic để so sánh tập hợp các cDNA này với một tập hợp các đoạn DNA đại diện cho tất cả hoặc một phần của hệ gene. Kết quả phân tích sẽ giúp xác định được các nhóm gene trong hệ gene được biểu hiện đồng thời vào mỗi thời điểm, hoặc trong những điều kiện đặc biệt. Công nghệ DNA cho phép thực hiện được những công việc trên; cùng với việc tự động hoá, chúng ngày càng dễ thực hiện trên quy mô lớn. Các nhà khoa học hiện nay có thể phân tích cùng lúc sự biểu hiện của hàng nghìn gene.

Các nghiên cứu về sự biểu hiện gene ở mức độ toàn hệ gene trở nên khả thi nhờ các **phép thử vi dây DNA** (hay DNA-microarray). DNA-microarray chứa một lượng nhỏ của một số lớn các phân đoạn DNA mạch đơn đại diện cho các gene khác nhau được gắn trên các tấm kính mỏng thành các dãy chứa các ô kích thước rất nhỏ hay một mạng lưới (xem Hình 20.1). (Vi dây DNA còn được gọi là *chip DNA* bởi nó trông giống với chip máy tính.) Lý tưởng nhất là các đoạn DNA trên chip DNA đại diện cho tất cả các gene của một cơ thể. **Hình 20.15** phác thảo các

▼ Hình 20.15 Phương pháp nghiên cứu

Phân tích mức biểu hiện gene nhờ vi dây DNA

ỨNG DỤNG Bằng phương pháp này, các nhà nghiên cứu có thể đồng thời kiểm tra hàng nghìn gene để xác định gene nào được biểu hiện ở mô nào, trong điều kiện môi trường nào, hoặc vào giai đoạn nào của quá trình phát triển. Họ cũng có thể tìm thấy sự điều phối biểu hiện các gene.

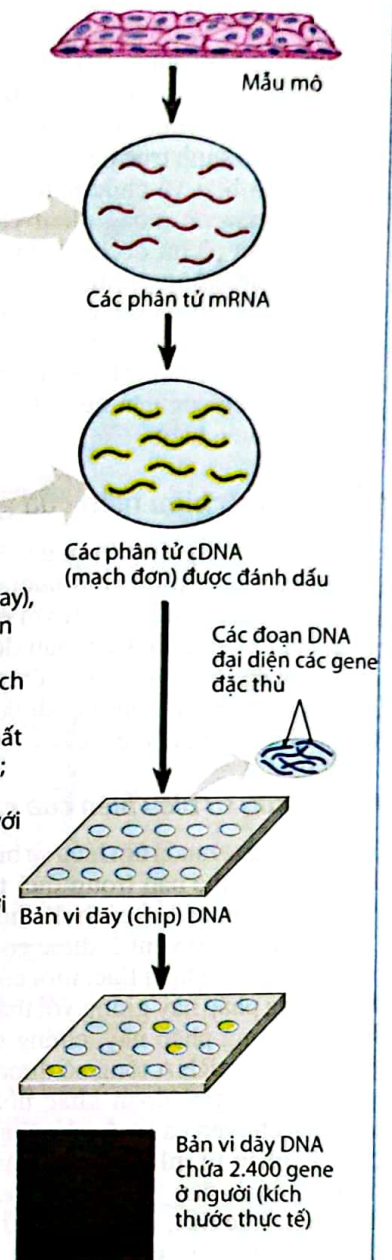
KỸ THUẬT

1 Phân lập mRNA.

2 Tạo ra cDNA từ phản ứng phiên mã ngược, sử dụng các nucleotide đánh dấu huỳnh quang.

3 Chuyển hỗn hợp cDNA lên bản vi dây (microarray), đó là một lam kính hiển vi mà trên đó các bản sao các đoạn DNA mạch đơn từ các gene của một cơ thể sinh vật nhất định được cố định sẵn; mỗi gene chiếm một điểm. Các cDNA sẽ lai với các trình tự DNA trên microarray có trình tự bổ sung tương ứng với chúng.

4 Rửa trôi các cDNA dư thừa; quét bản microarray để thu tín hiệu phát quang. Mỗi điểm phát huỳnh quang (màu vàng) phản ánh gene tương ứng được biểu hiện trong mẫu mô phân tích.



KẾT QUẢ

Cường độ phát quang ở mỗi điểm là thước đo mức biểu hiện của gene ở mẫu mô mà điểm đó đại diện. Theo cách phổ biến hơn cả, hai mẫu khác nhau được kiểm tra đồng thời bằng việc đánh dấu cDNA thu được từ mỗi mô với một màu khác nhau, thường là đỏ và xanh lục. Màu thu được ở mỗi điểm phản ánh mức độ biểu hiện tương đối của một gene nhất định trong cả hai mẫu: Màu xanh lục cho thấy gene chỉ biểu hiện ở mẫu này, còn màu đỏ cho thấy gene chỉ được biểu hiện ở mẫu kia; trong khi đó, màu vàng cho biết gene được biểu hiện ở cả hai mẫu, còn màu đen cho biết gene không được biểu hiện ở mẫu nào (xem ảnh phóng đại ở Hình 20.1).

bước kiểm tra các đoạn DNA trên một chip mà ở đó các phân tử cDNA đã được chuẩn bị từ các mRNA có nguồn gốc từ loại tế bào nhất định được quan tâm nghiên cứu và được đánh dấu bằng thuốc nhuộm phát huỳnh quang.

Nhờ sử dụng kỹ thuật này, các nhà nghiên cứu đã tiến hành phân tích DNA-microarray với trên 90% các gene khác nhau ở loài giun tròn *Caenorhabditis elegans* trong mỗi giai đoạn của quá trình phát triển trong chu kỳ sống của nó. Kết quả nghiên cứu cho thấy: sự biểu hiện của gần 60% số gene thay đổi rõ rệt vào các giai đoạn khác nhau trong quá trình phát triển và nhiều gene được biểu hiện theo kiểu đặc trưng giới tính. Nghiên cứu này ủng hộ cho mô hình được đề xuất bởi nhiều nhà sinh học phát triển; theo đó, sự phát triển của phôi liên quan đến một chương trình điều hoà biểu hiện của các gene một cách hài hoà và phức tạp, chứ không phải chỉ là sự biểu hiện đơn giản của một số ít gene quan trọng. Ví dụ này cũng giúp minh hoạ cho khả năng của DNA-microarray trong việc phản ánh được hồ sơ biểu hiện của các gene trong suốt cuộc đời của một cơ thể.

Bên cạnh việc làm sáng tỏ mối tương tác giữa các gene và cung cấp các đầu mối thông tin về chức năng gene, DNA-microarray còn có thể góp phần làm tăng cường hiểu biết về các bệnh lý khác nhau và chỉ ra các phương pháp chẩn đoán hay liệu pháp điều trị mới. Ví dụ như, nhờ việc so sánh kiểu biểu hiện của các gene ở khối mô ung thư vú với các khối mô vú bình thường đã giúp tìm ra các phác đồ điều trị hiệu quả và có hàm lượng thông tin cao hơn. Cuối cùng, các thông tin từ các phép thử vi dây DNA giúp cung cấp một cái nhìn toàn diện hơn về cách toàn bộ các gene tương tác với nhau để hình thành nên một cơ thể và duy trì các hệ thống sống của chúng.

Xác định chức năng gene

Bằng cách nào các nhà khoa học có thể xác định được chức năng của một gene sau khi chúng đã được tìm thấy bằng các kỹ thuật đã được mô tả đến đây ở chương này? Có lẽ, cách phổ biến nhất là làm bất hoạt gene đó và theo dõi hậu quả trong tế bào hoặc cơ thể. Theo một hướng vận dụng như vậy, được gọi là **phương pháp tạo đột biến in vitro**, một đột biến đặc thù được tạo ra trong gene được nhân dòng, rồi gene đột biến này được đưa vào một tế bào theo cách làm bất hoạt ("knock out") bản sao bình thường của gene đó trong tế bào. Nếu đột biến được đưa vào làm thay đổi hoặc làm hỏng chức năng sản phẩm của gene, thì kiểu hình của tế bào đột biến có thể giúp phản ánh chức năng của protein bình thường đã bị mất. Bằng việc sử dụng các kỹ thuật di truyền và phân tử vào những năm 1980, các nhà nghiên cứu có thể tạo ra được những chú chuột có bất cứ gene nào bị bất hoạt, nhằm nghiên cứu vai trò của mỗi gene đó trong quá trình phát triển và ở cơ thể trưởng thành. Mario Capecchi, Martin Evans, và Oliver Smithies đã được trao giải thưởng Nobel Y học năm 2007 cho những thành công đầu tiên như vậy. Một số dự án hiện nay vẫn đang tiếp tục được triển khai nhằm bất hoạt mọi gene trong số trên 20.000 gene của hệ gene chuột. Những nỗ lực đầy tham vọng này sẽ giúp nâng cao hiểu biết của chúng ta về chức năng của các gene ở động vật có vú.

Một phương pháp mới hơn làm bất hoạt sự biểu hiện của gene được phát triển dựa trên hiện tượng **RNA can thiệp (RNAi)** được mô tả ở Chương 18. Hướng thực nghiệm này sử dụng các phân tử RNA sợi kép được tổng hợp hoá học có trình tự bắt cặp với một gene nhất định để kích hoạt sự phá huỷ bản phiên mã RNA thông tin

của gene hoặc để ức chế dịch mã. Đến nay, công nghệ RNAi đã được sử dụng thành công nhằm làm ngăn cản ("knock down") sự biểu hiện của những gene đặc thù ở tế bào động vật có vú, bao gồm cả các tế bào người nuôi cấy, và đang được dự kiến tiếp tục thử nghiệm trong điều trị một số bệnh nhất định ở người, chẳng hạn như bệnh thoái hoá điểm vàng ở mắt. Ở một số loài khác, chẳng hạn như giun tròn hay ruồi quả, RNAi đã được dùng một cách khá hiệu quả để phân tích chức năng của các gene trên qui mô rộng. Trong một nghiên cứu, RNAi đã được dùng để ngăn cản sự biểu hiện của 86% các gene trong giai đoạn đầu quá trình phát triển phôi ở giun tròn, mỗi gene vào một thời điểm nhất định. Việc phân tích kiểu hình của các cá thể giun phát triển từ những phôi này đã giúp các nhà nghiên cứu phân loại được phần lớn các gene vào các nhóm dựa theo chức năng. Kiểu nghiên cứu về sự biểu hiện gene ở mức độ toàn hệ gene như vậy chắc chắn ngày càng trở nên phổ biến trong các nghiên cứu tìm hiểu về tầm quan trọng của các mối tương tác giữa các gene trong một hệ thống chung - cơ sở của sinh học hệ thống (xem Chương 1).

Các kỹ thuật và phương pháp thực nghiệm đã được đề cập đến đây trong chương này đã giúp chúng ta hiểu nhiều vấn đề liên quan đến các gene và các chức năng sản phẩm của chúng. Các nghiên cứu về DNA ngày càng được tăng cường nhờ sự phát triển của nhiều kỹ thuật hiệu quả cho phép nhân bản toàn bộ cơ thể đa bào. Một mục tiêu của công việc này là để thu được những loại tế bào đặc biệt, gọi là các tế bào gốc, có khả năng phân bào và biệt hoá thành tất cả các loại mô khác nhau. Ở cấp độ nghiên cứu cơ bản, các tế bào gốc cho phép các nhà khoa học dùng các phương pháp DNA đã được nêu ở trên để nghiên cứu về quá trình biệt hoá của các tế bào. Ở cấp độ ứng dụng cao hơn, các kỹ thuật DNA tái tổ hợp có thể được dùng nhằm làm thay đổi các tế bào gốc phục vụ trong y học (để điều trị một số bệnh nhất định). Các phương pháp liên quan đến việc nhân bản các cơ thể và sản xuất các tế bào gốc là chủ đề được nêu ở mục tiếp theo.

KIỂM TRA KHÁI NIỆM 20.2

1. Giả sử bạn tiến hành điện di trên gel một mẫu DNA hệ gene được phân lập từ một người và đã được xử lý bằng một enzyme giới hạn. Sau khi nhuộm gel với thuốc nhuộm liên kết DNA, bạn sẽ quan sát thấy điều gì? Giải thích.
2. Nêu vai trò của sự kết cặp base giữa các mạch acid nucleic trong các kỹ thuật sau đây: thẩm tách Southern, giải trình tự DNA, thẩm tách Northern, RT-PCR và phân tích microarray.
3. **ĐIỀU GÌ NẾU?** Hãy quan sát bản microarray ở Hình 20.1, vốn là hình ảnh phóng đại từ bản microarray ở Hình 20.15. Nếu mẫu được đánh dấu với gốc phát quang màu xanh lục bắt nguồn từ mô bình thường, còn mẫu được đánh dấu với gốc phát quang màu đỏ bắt nguồn từ mô ung thư, thì các điểm màu xanh lục, màu đỏ, màu vàng và màu đen sẽ phản ánh tương ứng điều gì? Trên cơ sở phân tích kiểu biểu hiện của chúng, hãy cho biết những gene nào đáng quan tâm khi nghiên cứu về loại ung thư này.
Câu trả lời có trong Phụ lục A.

Nhân bản các sinh vật giúp sản xuất tế bào gốc phục vụ nghiên cứu và các ứng dụng khác

Song song với các tiến bộ trong công nghệ DNA, các nhà khoa học cũng đã phát triển và ngày càng hoàn thiện hơn các phương pháp nhân bản toàn bộ các cơ thể đa bào từ một tế bào đơn lẻ. Trong bối cảnh này, quá trình nhân bản tạo ra một hay nhiều cơ thể giống hệt nhau về di truyền và giống với cơ thể "thân sinh" cho tế bào đầu tiên. Quá trình này thường được gọi là *nhân bản sinh vật* để phân biệt với quá trình nhân dòng gene và quan trọng hơn là phân biệt với quá trình nhân dòng tế bào, tức là sự phân bào của một tế bào sinh sản vô tính thành một tập hợp các tế bào giống hệt nhau về mặt di truyền. (Đặc điểm cốt lõi chung của tất cả các quá trình nhân dòng và nhân bản là các sản phẩm tạo ra đều giống hệt thân sinh về di truyền. Thực tế thuật ngữ nhân bản và nhân dòng trong tiếng Anh là *clone* bắt nguồn từ thuật ngữ Hy Lạp *klon*, có nghĩa là "nhánh con".) Mỗi quan tâm đương thời về công nghệ nhân bản các cơ thể xuất phát chủ yếu từ tiềm năng của kỹ thuật này trong việc tạo ra các tế bào gốc, tức là các tế bào có thể tạo nên nhiều loại mô khác nhau.

Những nỗ lực trong việc nhân bản các cơ thể động vật và thực vật được bắt đầu khoảng trên 50 năm trước trong các nghiên cứu nhằm trả lời một số câu hỏi cơ bản. Ví dụ như, các nhà nghiên cứu muốn biết liệu tất cả các tế bào trong một cơ thể có các gene giống nhau hay không (một khái niệm được gọi là *tính tương đương của hệ gene*) hoặc liệu các tế bào có mất gene trong quá trình biệt hoá hay không (xem Chương 18). Một cách để trả lời các câu hỏi này là quan sát xem liệu một tế bào đã biệt hoá có thể tái sinh thành một sinh vật hoàn chỉnh hay không - nói cách khác, liệu việc nhân bản một sinh vật có thể xảy ra hay không. Chúng ta hãy bàn luận về những thí nghiệm ban đầu này trước khi tiếp tục xem xét các tiến bộ đương thời trong công nghệ nhân bản các cơ thể và các quy trình tạo ra các tế bào gốc.

Nhân bản thực vật: nuôi cấy các tế bào đơn lẻ

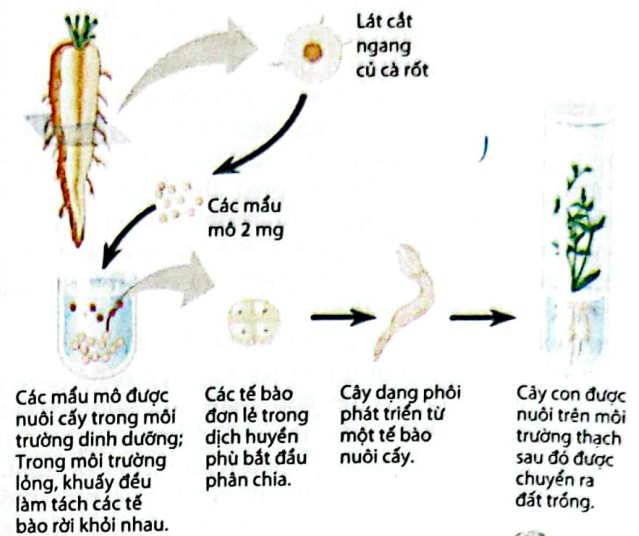
Những thành công đầu tiên trong nhân bản toàn bộ cơ thể thực vật xuất phát từ các tế bào đơn lẻ đã biệt hoá hoàn toàn vào những năm 1950 bởi F. C. Steward và các học trò của mình tại Đại học Cornell, khi tiến hành các nghiên cứu ở cà rốt (**Hình 20.16**). Họ phát hiện ra rằng, các tế bào biệt hoá lấy từ rễ (cây cà rốt) sau khi được nuôi trong môi trường có thể phát triển thành nhiều cây trưởng thành bình thường, mỗi cây đều giống hệt cây thân sinh về mặt di truyền. Kết quả này cho thấy quá trình biệt hoá không nhất thiết là những thay đổi không thể đảo ngược trong vật chất di truyền (DNA). Ít nhất ở thực vật, các tế bào trưởng thành có thể "phân biệt hoá" và phát triển thành mọi loại tế bào có tính chuyên hoá cao của cơ thể. Những tế bào có khả năng như vậy được gọi là có *tính toàn năng*.

Công nghệ nhân bản thực vật ngày nay được sử dụng rộng rãi trong sản xuất nông nghiệp. Đối với một số cây, như cây phong lan, nhân bản vô tính đã trở thành phương pháp sinh sản duy nhất phục vụ thương mại trong thực tế. Ở một số loài cây khác, nhân bản vô tính được dùng để tạo ra những cây có các đặc tính quý, chẳng hạn như khả năng kháng một bệnh thực vật nhất định. Trong thực tế,

Hình 20.16 Tìm hiểu

Một tế bào thực vật đã biệt hoá có khả năng phát triển thành cây hoàn chỉnh không?

THÍ NGHIỆM Thí nghiệm năm 1958, F. C. Steward và các cộng sự tại Đại học Cornell đã kiểm tra khả năng tạo cây hoàn chỉnh của những tế bào tách rời bắt nguồn từ một củ cà rốt đã biệt hoá đầy đủ.



Các mẫu mô được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng; Trong môi trường lỏng, khuấy đều làm tách các tế bào rời khỏi nhau.

Các tế bào đơn lẻ trong dịch huyền phù bắt đầu phân chia.

Cây dạng phôi phát triển từ một tế bào nuôi cấy.

Cây con được nuôi trên môi trường thạch sau đó được chuyển ra đất trồng.

KẾT QUẢ Một tế bào soma (không phải tế bào sinh sản) của cà rốt phát triển thành một cây cà rốt trưởng thành hoàn chỉnh. Cây mới này là bản sao di truyền (sản phẩm nhân dòng) của cây mẹ ban đầu.

Cây trưởng thành

KẾT LUẬN Công nghệ nhân bản thực vật ngày nay được sử dụng rộng rãi trong sản xuất nông nghiệp. Đối với một số cây, như cây phong lan, nhân bản vô tính đã trở thành phương pháp sinh sản duy nhất phục vụ thương mại trong thực tế. Ở một số loài cây khác, nhân bản vô tính được dùng để tạo ra những cây có các đặc tính quý, chẳng hạn như khả năng kháng một bệnh thực vật.

NGUỒN F. C. Steward et al., Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from suspended cells. *American Journal of Botany* 45: 705 - 708 (1958).

ĐIỀU GÌ NẾU? Nếu mỗi tế bào đơn chỉ có khả năng phát triển thành một loại mô chứ không phải thành một cây hoàn chỉnh, thì những nhà nghiên cứu trên đây có thể rút ra kết luận gì?

chính bạn cũng đã có thể là một nhà nhân bản thực vật: nếu như bạn đã từng tiến hành trồng một cây mới xuất phát từ một cành cắt hay cành chiết, thì bạn đã thực hiện việc nhân bản thực vật rồi đấy!

Nhân bản động vật: Sự chuyển nhân tế bào

Các tế bào động vật đã biệt hoá cao nhìn chung không phân chia khi nuôi cấy *in vitro*, và khả năng phát triển thành các loại tế bào khác nhau của một cơ thể mới của

chúng còn ít hơn nhiều. Vì vậy, các nhà nghiên cứu đầu tiên đã phải sử dụng một cách tiếp cận khác để trả lời câu hỏi liệu các tế bào động vật đã biệt hoá có tính toàn năng không. Nghiên cứu của họ được tiến hành bằng cách loại bỏ nhân của một tế bào chưa biệt hoá hoặc đã biệt hoá, rồi thay thế nó bằng một nhân của tế bào đã biệt hoá thông qua một quy trình được gọi là *kỹ thuật chuyển nhân*. Nếu nhân của tế bào cho đã biệt hoá duy trì được tiềm năng di truyền đầy đủ của nó, thì nó có thể điều khiển sự phát triển của tế bào nhận thành tất cả các mô và cơ quan của cơ thể.

Những thí nghiệm đầu tiên như vậy được thực hiện ở ếch vào những năm 1950 bởi Robert Briggs và Thomas King, và sau đó vào những năm 1970 bởi John Gurdon. Những nhà nghiên cứu này đã tiến hành chuyển một nhân từ một tế bào nòng nọc hoặc phôi sang một tế bào trứng đã được khử nhân (không có nhân). Trong các thí nghiệm của Gurdon, các tế bào trứng sau khi được thay thế nhân thường duy trì được khả năng phát triển thành nòng nọc bình thường (Hình 20.17). Tuy vậy, ông cũng phát hiện ra rằng tiềm năng của nhân được chuyển trong việc điều khiển quá trình phát triển bình thường tỷ lệ nghịch với tuổi của tế bào cho: nhân của tế bào cho càng già, thì tỷ lệ nòng nọc phát triển bình thường càng thấp.

Từ những kết quả nghiên cứu này, Gurdon đã kết luận rằng một yếu tố nào đó trong nhân *chắc hẳn* đã biến đổi khi các tế bào động vật biệt hoá. Ở ếch và phần lớn các loài động vật khác, tiềm năng của nhân ngày càng trở nên hạn chế cùng với quá trình phát triển của phôi và biệt hoá các tế bào.

Nhân bản sinh sản động vật có vú

Ngoài nhân bản ở ếch, các nhà nghiên cứu từ lâu cũng đã nhân bản thành công các động vật có vú nhờ sử dụng các nhân hay tế bào từ các loại phôi sớm khác nhau. Nhưng người ta không biết là liệu một nhân từ một tế bào đã biệt hoá đầy đủ có thể tái lập trình để trở thành một nhân thể cho hay không. Tuy vậy, vào năm 1997, các nhà nghiên cứu người Scottish đã làm tổn nhiều giấy mực khi công bố sự ra đời của Dolly, một con cừu được nhân bản từ một con cừu mẹ bằng kỹ thuật chuyển nhân từ một tế bào đã biệt hoá (Hình 20.18, xem trang sau). Các nhà nghiên cứu này đã giải biệt hoá các nhân tế bào cho bằng cách nuôi cấy các tế bào động vật có vú trong môi trường nghèo dinh dưỡng. Sau đó, họ tiến hành dung hợp những tế bào này với các tế bào trứng cừu đã khử nhân. Tế bào lưỡng bội thu được đã phân chia để hình thành các cấu trúc phôi sớm; những phôi này được cấy truyền vào các cơ thể mẹ nuôi. Trong số vài trăm phôi được cấy truyền, một phôi đã phát triển hoàn toàn bình thường, từ đó sinh ra cừu Dolly.

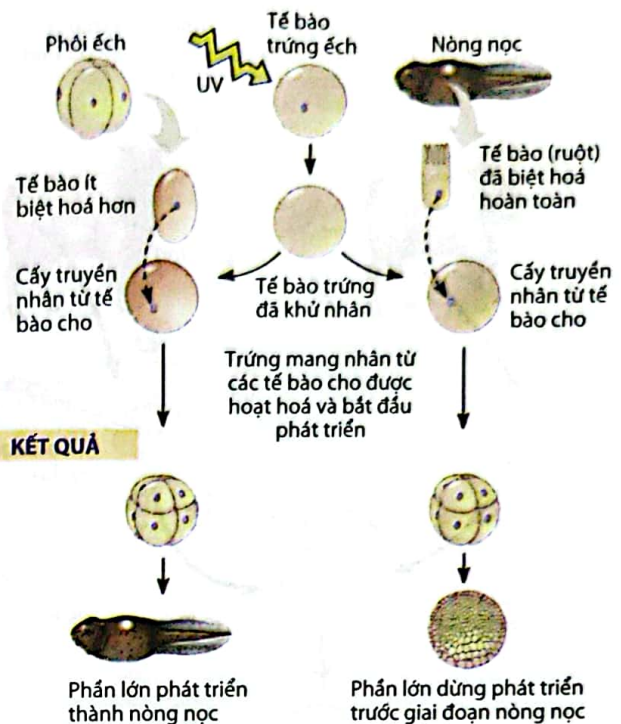
Các phân tích sau đó cho thấy DNA nhiễm sắc thể của Dolly thực sự giống với DNA nhiễm sắc thể của cơ thể cho nhân. (Trừ ngoại lệ là DNA ty thể của Dolly có nguồn gốc từ cơ thể cho trứng.) Vào năm 2003, khi 6 tuổi, Dolly mắc một chứng bệnh phổi phức tạp vốn thông thường chỉ thấy có ở những con cừu nhiều năm tuổi và người ta phải làm nó chết một cách nhẹ nhàng. Cái chết sớm của cừu Dolly, cũng như chứng viêm khớp mà nó đồng thời mắc phải, đã dẫn đến những nghi ngờ cho rằng ở góc độ nào đó những tế bào của cừu Dolly không mạnh khoẻ như những tế bào của một con cừu bình thường; điều này có thể phản ánh một sự tái lập trình hoá không hoàn toàn của nhân gốc được chuyển.

Kể từ năm 1997, các nhà nghiên cứu cũng đã nhân bản được nhiều loài động vật có vú khác, bao gồm chuột,

Hình 20.17 Tìm hiểu

Nhân từ một tế bào động vật đã biệt hoá có thể điều khiển sự phát triển của một cơ thể không?

THÍ NGHIỆM John Gurdon và các cộng sự tại Đại học Oxford, Anh, tiến hành phá hủy nhân của trứng ếch bằng cách chiếu tia UV. Sau đó họ chuyển nhân từ tế bào phôi ếch và nòng nọc vào trứng đã khử nhân.



Khi nhân được truyền bắt nguồn từ một tế bào phôi sớm, tức là tế bào có mức độ biệt hoá thấp, thì phần lớn các trứng sau khi nhận nhân phát triển thành nòng nọc. Nhưng, nếu nhân được truyền bắt nguồn từ một tế bào ruột của nòng nọc đã biệt hoá hoàn toàn, thì chỉ có ít hơn 2% số trứng phát triển thành nòng nọc bình thường; phần lớn trứng còn lại dừng phát triển ở các giai đoạn sớm hơn nhiều.

KẾT LUẬN Nhân từ tế bào ếch đã biệt hoá có thể điều khiển quá trình phát triển của nòng nọc. Tuy vậy, khả năng này giảm dần khi mức độ biệt hoá của tế bào cho nhân ngày càng cao, có lẽ bởi vì trong quá trình này đã có những biến đổi diễn ra trong nhân.

NGUỒN J. B. Gurdon et al., the development capacity of nuclei transplanted from keratinized cells of adult frogs, *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 34:93-112 (1975).

ĐIỀU GÌ NẾU? Nếu mỗi tế bào trong phôi ở giai đoạn bốn tế bào đã được biệt hoá đến mức không còn tính toàn năng, thì kết quả thí nghiệm ở nhánh bên trái của sơ đồ trên sẽ như thế nào?

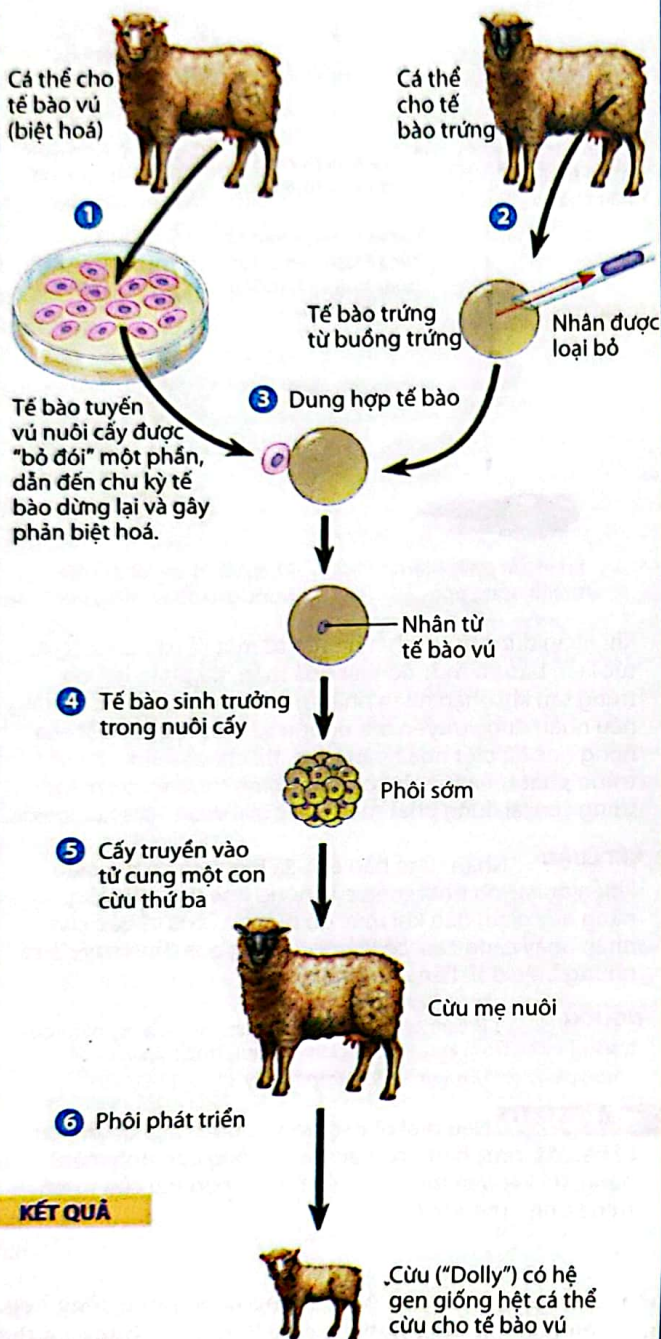
mèo, bò, ngựa, la, lợn và chó. Trong phần lớn trường hợp, mục tiêu của các nhà nghiên cứu là tạo ra những cá thể mới; quá trình này được gọi là *nhân bản sinh sản*. Từ những thí nghiệm đó, chúng ta đã học được nhiều điều mới. Ví dụ, các cá thể động vật được nhân bản thuộc cùng một loài không phải lúc nào cũng có hình dạng và hành vi giống hệt nhau. Trong một đàn bò được nhân bản từ cùng một dòng tế bào nuôi cấy, một số con bò thì dữ dằn trong khi những con khác thì dễ quy phục. Một

Hình 20.18 Phương pháp nghiên cứu

Nhân bản động vật có vú bằng chuyển nhân

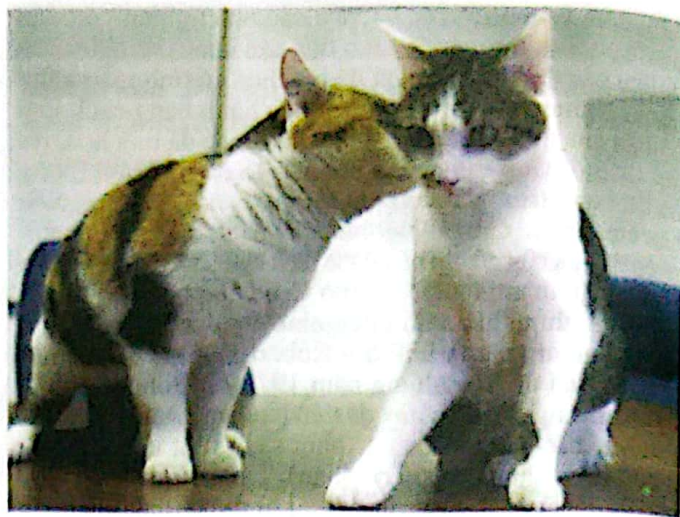
ỨNG DỤNG Phương pháp này được dùng để nhân bản các động vật có vú mà các gene trong nhân của con vật nhân bản giống hệt với các gene trong nhân của cá thể cho nhân.

KỸ THUẬT Được mô tả ở đây là quy trình được dùng để tạo ra cừu Dolly, động vật có vú được nhân bản thành công đầu tiên bắt nguồn từ nhân của một tế bào đã biệt hoá.



KẾT QUẢ

Cấu trúc di truyền của con vật nhân bản là giống hệt cá thể cho nhân nhưng khác với cá thể cho trứng cũng như cá thể mẹ nuôi. (Trong hình trên, cừu cho trứng và cừu mẹ nuôi là cừu "mặt đen Scottish" được vẽ với mặt màu đen.)



▲ Hình 20.19 CC, con mèo được nhân bản đầu tiên, và cá thể thân sinh duy nhất của nó. Cầu vồng (trái) cho nhân để tiến hành quy trình nhân bản và thu được CC (phải). Tuy vậy, hai con mèo không giống y hệt nhau: Cầu vồng có màu lông tam thể điển hình với một số mảng lông màu vàng trên bộ lông và có tính cách "rụt rè", trong khi CC chỉ có lông màu xám xen lẫn màu trắng và tính tình "vui nhộn".

ví dụ khác về hiện tượng không đồng nhất trong các cá thể được nhân bản là con mèo được nhân bản đầu tiên, được gọi tên là CC (Hình 20.19). CC có kiểu hình lông kiểu tam thể (calico cat), giống với cá thể mẹ của mình, nhưng màu sắc và cách phân bố màu thì không giống bởi vì sự bất hoạt ngẫu nhiên của nhiễm sắc thể giới tính X ở các tế bào trong quá trình phát triển của phôi (xem Hình 15.8). Tương tự như vậy, các cặp sinh đôi cùng trứng ở người, cũng là những bản sao nhân bản tự nhiên, cũng có đôi chút khác nhau. Rõ ràng, ảnh hưởng của môi trường và những hiện tượng ngẫu nhiên có thể giữ vai trò quan trọng trong quá trình phát triển.

Sự nhân bản thành công nhiều động vật có vú đã làm tăng tiềm năng nhân bản con người. Các nhà khoa học từ một số phòng thí nghiệm trên thế giới đã đạt được những bước thành công đầu tiên. Theo cách phổ biến nhất, nhân từ tế bào người đã biệt hoá được chuyển vào tế bào trứng chưa thụ tinh đã được khử nhân, rồi trứng được kích thích phân bào. Năm 2001, một nhóm nghiên cứu ở Massachusetts đã quan sát được một số lần phân bào sớm trong những thí nghiệm như vậy. Vài năm sau, các nhà nghiên cứu Hàn Quốc công bố đã nhân bản được phôi tới giai đoạn phôi sớm, được gọi là phôi bì. Thành công trong các kỹ thuật nhân bản ở người cũng đã dấy lên những vấn đề về đạo đức vốn chưa có tiền lệ, khởi nguồn cho nhiều tranh cãi quyết liệt. Sự huỷ bỏ công bố sau đó của Hàn Quốc đã cho chúng ta có thêm thời gian để nhìn nhận lại những vấn đề này.

Các vấn đề liên quan với nhân bản động vật

Trong phần lớn các nghiên cứu chuyển nhân đến nay, chỉ một tỷ lệ nhỏ các phôi được nhân bản có thể phát triển bình thường đến lúc sinh sản. Nhưng cũng giống cừu Dolly, nhiều cá thể động vật nhân bản biểu hiện các khuyết tật. Chẳng hạn, những con chuột nhân bản có xu hướng mắc chứng béo phì, viêm phổi, hồng gan và chết sớm. Các nhà khoa học cảnh báo rằng ngay cả các động vật nhân bản trông có vẻ bình thường cũng nhiều khả năng mang các sai hỏng khó phát hiện.

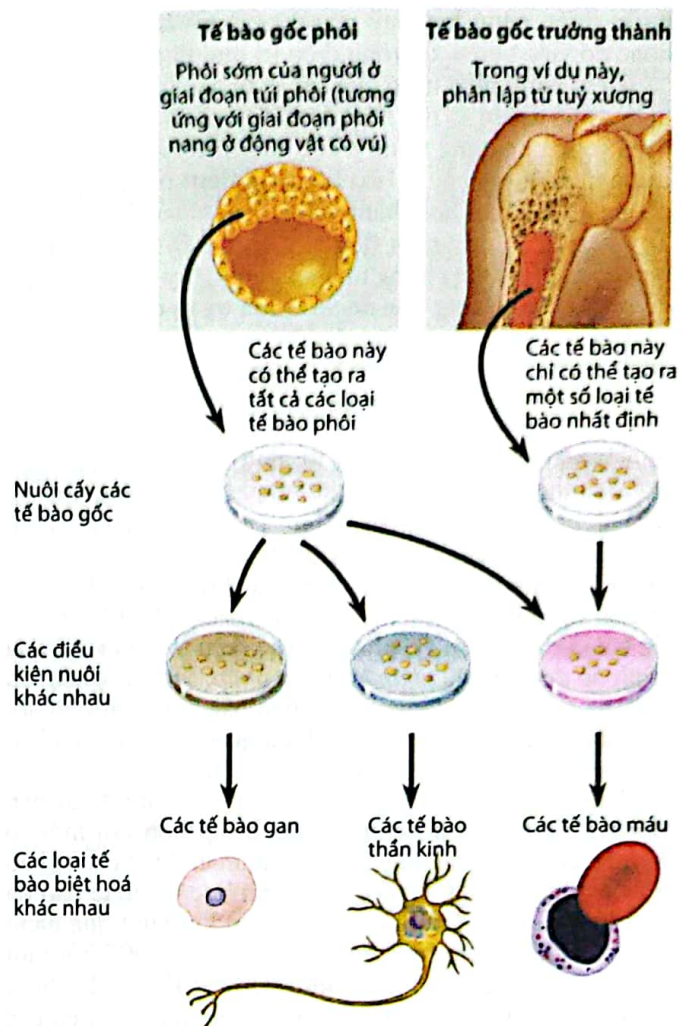
Trong những năm gần đây, chúng ta đã bắt đầu tìm bước làm sáng tỏ một số nguyên nhân giúp giải thích tại sao hiệu quả nhân bản động vật thường thấp, trong khi nguy cơ sai hỏng bất thường thì cao. Trong nhân của tế bào đã biệt hoá đầy đủ, một nhóm nhỏ các gene được biểu hiện, trong khi sự biểu hiện của những gene khác bị ức chế. Sự điều hoà biểu hiện gene này thường dẫn đến những thay đổi về di truyền học biểu sinh trong cấu trúc chất nhiễm sắc, chẳng hạn như sự acetyl hoá histone hay methyl hoá DNA (xem Hình 18.7). Trong quy trình chuyển nhân, nhiều sự thay đổi như vậy cần được đảo ngược ở các nhân thuộc giai đoạn muộn hơn trong các tế bào của cơ thể cho nhân đối với các gene được biểu hiện cũng như bị ức chế, sao cho tương ứng với giai đoạn đầu của quá trình phát triển phôi. Các nhà nghiên cứu đã phát hiện ra rằng DNA trong các tế bào phôi của các phôi nhân bản, giống với các tế bào đã biệt hoá, thường có nhiều mức độ methyl hoá DNA cao hơn so với các tế bào phôi bình thường (không nhân bản) của cùng loài. Điều này cho thấy việc tái lập trình nhân của cơ thể cho cần đến sự tái cấu trúc của chất nhiễm sắc có vẻ xảy ra không triệt để trong các quy trình nhân bản. Do sự methyl hoá DNA giúp điều hoà biểu hiện của gene, việc vị trí methyl hoá trên DNA sai ở nhân tế bào cho có thể ảnh hưởng đến kiểu biểu hiện của các gene cần thiết cho quá trình phát triển phôi bình thường. Trong thực tế, thành công của các nỗ lực nhân bản ở động vật phụ thuộc nhiều vào việc liệu cấu trúc chất nhiễm sắc trong nhân tế bào cho có thể phục hồi trở về trạng thái của một tế bào trứng vừa thụ tinh hay không.

Các tế bào gốc ở động vật

Mục đích chính nhân bản ở người không vì lý do sinh sản, mà để sản xuất các tế bào gốc phục vụ điều trị các bệnh ở người. **Tế bào gốc** là tế bào không biệt hoá tương đối vừa có khả năng sinh sản không hạn định vừa có khả năng biệt hoá thành một hay nhiều loại tế bào chuyên hoá trong các điều kiện phù hợp. Như vậy, các tế bào gốc vừa có khả năng tự bổ sung quần thể của chính nó vừa tạo ra được các tế bào có thể đi vào các con đường biệt hoá khác nhau.

Nhiều tế bào phôi sớm ở động vật mang các tế bào gốc có khả năng biệt hoá thành các tế bào phôi ở mọi giai đoạn khác nhau. Các tế bào gốc có thể phân lập được từ các phôi sớm ở một giai đoạn được gọi là **phôi nang**, hay tương ứng ở người được gọi là **phôi bì** (Hình 20.20). Trong nuôi cấy, **các tế bào gốc phôi (ES)** thường sinh sản không hạn chế và phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy, chúng có thể biệt hoá thành các loại tế bào khác nhau, bao gồm cả các tế bào trứng và tinh trùng.

Cơ thể trưởng thành cũng có các tế bào gốc; chúng làm nhiệm vụ thay thế các tế bào đã biệt hoá không còn khả năng sinh sản khi có yêu cầu. Không giống với các ES, **các tế bào gốc trưởng thành** không có khả năng tạo ra mọi loại tế bào trong cơ thể, mặc dù chúng có thể tạo ra nhiều loại tế bào khác nhau. Ví dụ, một trong các loại tế bào gốc có trong tủy xương có thể tạo ra tất cả các loại tế bào máu (xem Hình 20.20); còn một loại khác có thể biệt hoá thành xương, sụn, mỡ, cơ và tế bào biểu bì lót thành mạch máu. Một điều ngạc nhiên đối với nhiều người là ở não người trưởng thành cũng tìm thấy các tế bào gốc; chúng tiếp tục tạo ra một số loại tế bào thần kinh nhất định trong não. Gần đây, các nhà nghiên cứu đã công bố



▲ **Hình 20.20 Nghiên cứu các tế bào gốc.** Các tế bào gốc động vật có thể được phân lập từ phôi sớm hoặc từ các mô trưởng thành, rồi được nuôi cấy; chúng tự duy trì ở trạng thái tế bào không biệt hoá tương đối. Các tế bào gốc phôi dễ nuôi hơn so với các tế bào gốc trưởng thành và về lý thuyết chúng có thể phát triển thành tất cả các loại tế bào khác nhau của một cơ thể. Phổ loại tế bào mà tế bào gốc trưởng thành có thể biệt hoá đến nay chưa biết đầy đủ.

tìm ra các tế bào gốc ở da, tóc, mắt và tủy răng. Mặc dù các động vật trưởng thành chỉ có một số lượng ít các tế bào gốc, các nhà khoa học đã và đang tiếp tục tìm cách xác định và phân lập được chúng từ các mô, và trong một số trường hợp, nuôi cấy chúng trong phòng thí nghiệm. Trong điều kiện nuôi cấy phù hợp (chẳng hạn, bằng việc bổ sung các yếu tố sinh trưởng đặc thù), các tế bào gốc nuôi cấy từ các động vật trưởng thành có thể biệt hoá thành nhiều loài tế bào chuyên hoá khác nhau.

Các nghiên cứu ở tế bào gốc phôi cũng như ở các tế bào gốc trưởng thành là một nguồn dữ liệu giá trị về quá trình biệt hoá, cũng như có tiềm năng ứng dụng lớn trong y học. Mục tiêu cuối cùng của những nghiên cứu này là cung cấp các tế bào nhằm chữa các cơ quan bị hỏng hay bị bệnh: ví dụ như, các tế bào tụy sản xuất insulin cho người bị bệnh đái tháo đường hay một số loại tế bào thần kinh nhất định cho những người mắc bệnh Parkinson hay múa giật Huntington. Các tế bào gốc trưởng thành ở tủy xương từ lâu đã được dùng làm nguồn cung cấp các tế bào hệ miễn dịch ở các bệnh nhân mà hệ miễn dịch của

họ bị thiếu năng hay suy yếu do các rối loạn di truyền hoặc do việc chiếu xạ trong điều trị ung thư.

Thêm năng phát triển của các tế bào gốc trưởng thành bị hạn chế ở một số mô nhất định. Các tế bào ES có nhiều triển vọng ứng dụng trong y học hơn so với các tế bào gốc trưởng thành bởi các tế bào ES là đa tiềm năng, nghĩa là chúng có thể biệt hoá thành nhiều loại tế bào khác nhau. Tuy vậy, cách duy nhất đến nay có thể thu được các tế bào ES là thu nhận chúng từ phôi người; tuy vậy, điều này cũng gây nên những vấn đề về chính trị và đạo đức.

Các tế bào ES hiện nay thu được từ các phôi được các bệnh nhân điều trị vô sinh hiến tặng hoặc từ các tế bào nuôi cấy lâu dài bắt nguồn từ các tế bào được phân lập từ các phôi hiến tặng. Nếu các nhà khoa học có thể nhân bản phôi người tới giai đoạn phôi bì, thì trong tương lai họ có thể sử dụng các dòng tế bào đó như các ES. Ngoài ra, với một nhân của tế bào cho từ một người mắc bệnh nhất định, họ có thể tạo ra các tế bào ES để điều trị phù hợp với bệnh nhân mà không bị hệ miễn dịch của chính anh ta hoặc cô ta loại bỏ. Khi mục đích chính của quá trình nhân bản là để tạo ra các tế bào ES phục vụ cho điều trị bệnh, thì quá trình đó được gọi là *nhân bản liệu pháp*. Mặc dù phần lớn mọi người cho rằng quá trình nhân bản sinh sản ở người là vi phạm đạo đức, song có nhiều quan điểm khác nhau về đạo đức sinh học trong nhân bản liệu pháp.

Việc giải quyết các bất đồng xung quanh nhân bản động vật gần đây trở nên ít quan trọng hơn bởi một số nghiên cứu mới cho thấy có thể thu nhận được các tế bào ES bằng cách quay lại đồng hồ sinh học ở các tế bào đã biệt hoá đầy đủ. Thành công này, sau khi vượt qua hàng loạt các khó khăn, được công bố vào năm 2007 bởi một số phòng thí nghiệm nghiên cứu trên các tế bào da chuột và sau đó là với các tế bào da ở người. Trong tất cả các trường hợp này, các nhà nghiên cứu đều tiến hành dùng các retrovirus để tải nạp các bản sao bổ sung của bốn gene điều hoà chủ chốt của các “tế bào gốc” vào tế bào đã biệt hoá là tế bào da và chuyển thành công các tế bào da thành các tế bào ES. Mọi kiểm tra sau đó đều chỉ ra rằng các tế bào sau khi phân biệt hoá, được gọi là các *tế bào đa tiềm năng gây tạo* (iPS, *induced pluripotent stem cells*) có thể thực hiện mọi chức năng như các tế bào ES. Việc hoàn thiện các kỹ thuật để điều khiển các tế bào iPS trở thành các loại tế bào đặc biệt là một lĩnh vực đang được tập trung nghiên cứu đã thu được một số thành tựu bước đầu khả quan. Những loại tế bào này cuối cùng có thể được dùng là nguồn cung cấp các tế bào “thay thế” tùy theo yêu cầu đối với người bệnh, mà không cần sử dụng các tế bào trứng hay phôi, nhờ vậy có thể giải toả phần lớn các ý kiến phản đối về mặt đạo đức.

KIỂM TRA KHÁI NIỆM 20.3

1. Nếu bạn nhân bản cây cà rốt, tất cả các cây con (“đồng”) thu được có giống hệt nhau không? Tại sao?
2. Từ những hiểu biết hiện nay, hãy giải thích tại sao tỷ lệ phần trăm nòng nọc phát triển từ hai loại nhân của hai loại tế bào cho trên Hình 20.17 lại không giống nhau.
3. **ĐIỀU GÌ NẾU?** Nếu bạn là một bác sĩ và muốn sử dụng các tế bào iPS để điều trị các bệnh nhân đái tháo đường cấp tính, thì cần phát triển kỹ thuật mới nào?

Câu trả lời có trong Phụ lục A.

KHÁI NIỆM

20.4

Ứng dụng thực tiễn của công nghệ DNA ảnh hưởng đến cuộc sống con người theo nhiều cách

Hiện nay, gần như ngày nào công nghệ DNA cũng xuất hiện trên các bản tin thời sự. Trong đó, phổ biến hơn cả là các chủ đề mới và các triển vọng ứng dụng của nó trong y học, nhưng đó chỉ là một trong nhiều lĩnh vực khác nhau mà công nghệ DNA và kỹ thuật di truyền có thể mang lại lợi ích.

Các ứng dụng trong y học

Một ứng dụng quan trọng của công nghệ DNA là để xác định các gene ở người mà những đột biến liên quan đến chúng gây nên các bệnh di truyền. Việc phát hiện ra các đột biến này có thể giúp định hướng chẩn đoán, điều trị và thậm chí phòng tránh các điều kiện phát sinh bệnh. Công nghệ DNA cũng giúp chúng ta hiểu hơn về các bệnh “không phải là bệnh di truyền”, từ tiểu đường cho đến AIDS, do các gene ở người có ảnh hưởng đến mức độ miễn cảm đối với những bệnh này. Hơn nữa, hầu như tất cả các bệnh đều liên quan đến sự thay đổi mức độ biểu hiện của các gene trong các tế bào bị lây nhiễm và thông thường cả trong các tế bào hệ miễn dịch của người bệnh. Bằng việc sử dụng các phép thử vi dây DNA hoặc một số kỹ thuật khác cho phép so sánh sự biểu hiện của các gene ở mô bình thường và mô bị bệnh (như minh hoạ trên Hình 20.1) các nhà nghiên cứu hy vọng sẽ tìm thấy các nhóm gene được “bật” hoặc “tắt” ở những bệnh đặc thù. Những gene này và sản phẩm của chúng có thể là những đích tác động trong quá trình phòng bệnh và chữa bệnh.

Chẩn đoán bệnh

Công nghệ DNA đã mở ra một chương mới trong lĩnh vực chẩn đoán các bệnh truyền nhiễm, đặc biệt là việc ứng dụng các kỹ thuật PCR và các mẫu dò acid nucleic để theo dõi các tác nhân gây bệnh. Ví dụ: do trình tự hệ gene RNA của virus HIV đã biết rõ, nên kỹ thuật RT-PCR có thể được dùng để nhân bản và đồng thời phát hiện ra RNA của HIV trong các mẫu máu hay mô sinh phẩm (xem Hình 20.13). RT-PCR thường là cách tốt nhất để phát hiện một tác nhân lây nhiễm khó phát hiện.

Các nhà y khoa giờ đây đã có thể chẩn đoán hàng trăm rối loạn di truyền ở người bằng việc dùng PCR với các cặp mồi có gene đích liên quan đến các rối loạn di truyền này. Sản phẩm DNA sau PCR được giải trình tự để phát hiện có hay không các đột biến gây bệnh. Trong số các bệnh gây ra do gene đột biến ở người có bệnh hồng cầu hình liềm, máu khó đông, hoá xơ nang, múa giật Huntington và loạn dưỡng cơ Duchenne. Các cá thể có nguy cơ mắc những chứng bệnh này thường có thể được xác định trước khi các triệu chứng bệnh xuất hiện, thậm chí ngay từ trước khi sinh. PCR cũng có thể được dùng để xác định các cá thể không biểu hiện bệnh, song mang allele lặn có nguy cơ gây bệnh; trong thực tế, PCR đã thay thế phương pháp thấm tách Southern cho mục đích chẩn đoán này.

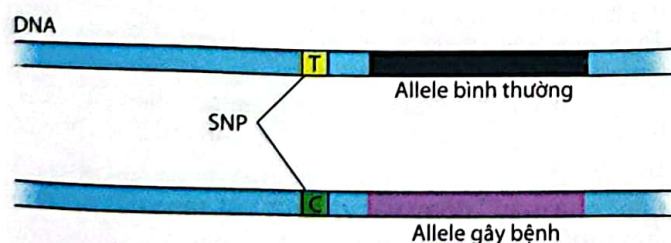
Đối với một số rối loạn di truyền, các nhà y khoa có thể phát hiện ra một allele gây bệnh bất thường bằng việc kiểm tra các *dấu chuẩn di truyền* có liên kết gần với allele gây bệnh. Dấu chuẩn di truyền là sự biến dị của một trình tự DNA có trong quần thể; trong phạm vi một

gene, biến dị của trình tự chính là cơ sở hình thành các allele khác nhau. Cũng giống như các trình tự mã hoá, DNA thuộc vùng không mã hoá tại một locus đặc thù trên một nhiễm sắc thể giữa các cá thể có thể khác nhau đôi chút về trình tự các nucleotide. Mức độ biến dị trong trình tự DNA được gọi là *các dạng đa hình* của nó (bắt nguồn từ tiếng Hy Lạp có nghĩa là "nhiều dạng").

Trong số các dấu chuẩn di truyền được dùng phổ biến nhất ở các quần thể người là các biến dị (đột biến) đơn nucleotide. Các đột biến đơn nucleotide được tìm thấy trong quần thể với tần số từ 1% trở lên được gọi là **các đa hình đơn nucleotide**, hay SNP (đọc là "sníp"). Các SNP xuất hiện trong hệ gene người với mật độ trung bình khoảng từ 100 đến 300 cặp base với mỗi SNP và chúng được tìm thấy ở cả các vùng mã hoá cũng như các vùng không mã hoá của hệ gene. (Như sẽ được đề cập ở Chương 21, hệ gene của chúng ta có 99% trình tự không có vai trò mã hoá protein.)

Một số SNP làm thay đổi trình tự nhận biết của enzyme giới hạn, chẳng hạn như trường hợp khác biệt đơn nucleotide giữa các allele quy định chuỗi β -globin của tế bào hồng cầu bình thường và tế bào hồng cầu hình liềm. Những biến dị này làm thay đổi kích thước các đoạn cắt giới hạn được tạo ra sau khi DNA được xử lý với enzyme (xem Hình 20.10). Kiểu thay đổi trình tự như vậy, có thể xuất hiện trong vùng mã hoá hoặc không mã hoá, được gọi là **đa hình độ dài các đoạn giới hạn - RFLP** (đọc tắt là "Rif-lip"). Từ khoảng 30 năm trước, các nhà khoa học đã mô tả cách dùng kỹ thuật tách Southern để phát hiện ra các RFLP; qua đó, RFLP được nhận ra là một dấu chuẩn di truyền hiệu quả. Để phát hiện ra các SNP, không nhất thiết phải giải trình tự DNA của nhiều cá thể; hiện nay, có thể phát hiện được các SNP bằng việc sử dụng phương pháp PCR hay các phương pháp phân tích microarray có độ nhạy rất cao.

Nhưng bằng cách nào các RFLP và SNP có thể giúp chúng ta chẩn đoán một rối loạn di truyền? Sự có mặt của một allele bất thường có thể được chẩn đoán với mức độ chính xác đáng kể nếu như một dấu chuẩn SNP liên kết chặt với nó được tìm thấy (**Hình 20.21**). Các allele gây bệnh múa giật Huntington và một số bệnh di truyền khác ban đầu được phát hiện chính bởi cách gián tiếp này thông qua các dấu chuẩn RFLP. Nếu như gene và dấu chuẩn liên kết đủ gần, thì khả năng trao đổi chéo giữa gene và dấu chuẩn nhiều khả năng không thể xảy ra trong quá trình phát sinh giao tử. Vì vậy, gene và dấu chuẩn sẽ luôn được di truyền cùng nhau; dù cho dấu chuẩn không phải là một phần của gene. Nguyên tắc như vậy được áp dụng cho tất cả các dấu chuẩn.



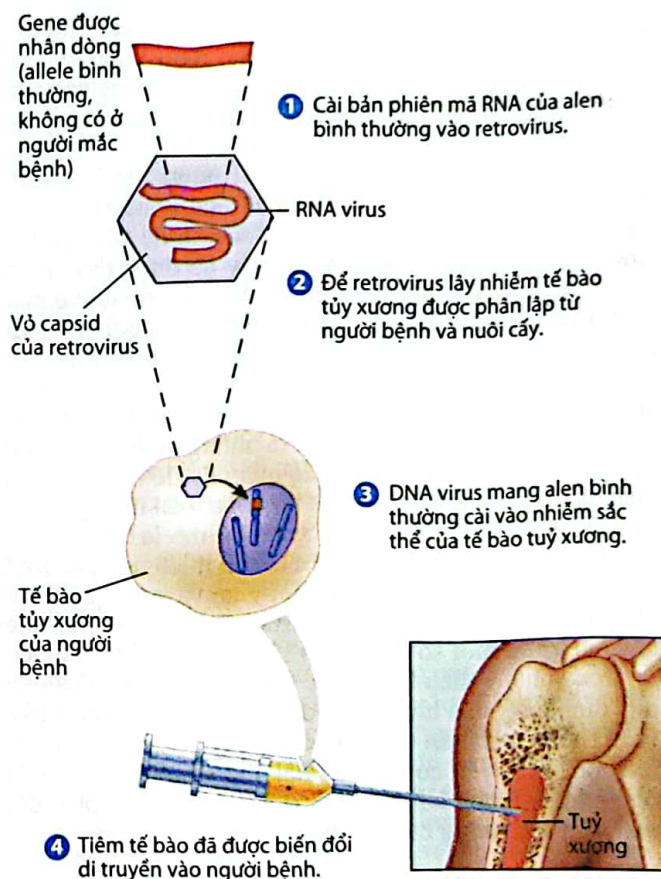
▲ Hình 20.21 Các đa hình đơn nucleotide (SNP) là các dấu chuẩn di truyền về các allele gây bệnh. Sơ đồ này minh họa các đoạn DNA tương đồng từ một gia đình mà một số thành viên mắc một bệnh di truyền. Trong gia đình này, những thành viên khỏe mạnh có T ở một locus SNP nhất định. Nếu một thành viên trong gia đình có C ở locus đó, thì xác suất cá thể đó đồng thời mang allele gây bệnh là rất cao. (Trên hình chỉ minh họa một mạch đối với mỗi phân tử DNA.)

Liệu pháp gene ở người

Liệu pháp gene, nghĩa là kỹ thuật đưa gene vào trong một cơ thể mắc bệnh vì mục đích trị liệu, có tiềm năng to lớn trong việc chữa trị các rối loạn do một sai hỏng đơn gene gây ra. Về lý thuyết, một allele bình thường thuộc gene bị hỏng có thể được cài vào tế bào soma của mô bị có sai hỏng đó.

Để gene liệu pháp trở nên ổn định trong các tế bào soma, các tế bào tiếp nhận allele bình thường phải là các tế bào có khả năng phân chia suốt đời sống cá thể. Các tế bào tủy xương bao gồm cả các tế bào gốc từ đó hình thành nên tất cả các tế bào máu và hệ miễn dịch là các ứng cử viên tiếp nhận gene liệu pháp phù hợp. **Hình 20.22** phác thảo một quy trình chuyển gene liệu pháp vào một người mà tế bào tủy xương của người đó không còn khả năng tổng hợp một loại enzyme thiết yếu cho sự sống gây ra do một sai hỏng đơn gene. Bệnh thiếu năng miễn dịch kết hợp nghiêm trọng (SCID) là một bệnh có nguyên nhân gây bệnh giống như vậy. Nếu quá trình chuyển gene liệu pháp thành công, tế bào tủy xương của người bệnh sẽ bắt đầu tổng hợp nên loại protein bị thiếu và người bệnh được cứu sống.

Quy trình được vẽ trên Hình 20.22 đã được sử dụng để tiến hành thử nghiệm liệu pháp gene trong điều trị



▲ Hình 20.22 Liệu pháp gene sử dụng vector retrovirus. Một loại retrovirus đã biến đổi trở nên vô hại được dùng làm thể truyền (vector) trong quy trình liệu pháp gene sử dụng khả năng của retrovirus để cài một phiên bản phiên DNA từ hệ gene RNA của nó vào DNA nhiễm sắc thể của tế bào chủ (xem Hình 19.8). Nếu gene ngoại lai do vector retrovirus vận chuyển được biểu hiện, thì tế bào nhận gene và các thể hệ tế bào con của nó sẽ chứa sản phẩm của gene và bệnh được chữa trị. Những tế bào sinh sản suốt cuộc đời, như các tế bào tủy xương chẳng hạn, là những tế bào đích lý tưởng dùng cho liệu pháp gene.

bệnh SCID. Trong một thử nghiệm bắt đầu ở Pháp vào năm 2000, mười em bé mắc bệnh SCID được điều trị bằng một quy trình liệu pháp gene giống nhau. Chín bệnh nhân trong số đó có biểu hiện tiến triển tích cực rõ ràng trong thời gian hai năm sau đó, là một bằng chứng thành công đầu tiên không thể chối cãi của liệu pháp gene. Tuy vậy, sau đó ba bệnh nhân bị mắc chứng bệnh bạch cầu. Trong một thí nghiệm gần đây hơn ở chuột, sự thay thế tương tự của gene tương đồng này ở chuột dẫn đến nguy cơ mắc các bệnh bạch huyết (còn gọi là máu trắng hay ung thư máu) cao. Những kết quả này cho thấy một chức năng nào đó của gene còn chưa biết đầy đủ có thể là nguyên nhân gây bệnh.

Liệu pháp gene cũng đặt ra một số câu hỏi khác về mặt kỹ thuật. Chẳng hạn, làm thế nào điều khiển được hoạt động của gene thay thế để tế bào có thể tổng hợp được một lượng phù hợp sản phẩm của gene vào đúng thời điểm và đúng vị trí? Làm sao chúng ta có thể khẳng định được việc cài gene thay thế vào hệ gene không gây hại cho các chức năng khác của tế bào? Khi những hiểu biết về các yếu tố điều hoà trên DNA và mối tương tác giữa các gene ngày càng sáng tỏ, thì các nhà nghiên cứu sẽ có thể trả lời được những câu hỏi như vậy.

Bên cạnh những thách thức về mặt kỹ thuật, liệu pháp gene còn đặt lên một số vấn đề về đạo đức sinh học. Một số quan điểm phê phán cho rằng sự can thiệp vào các gene ở người dù bằng cách nào cũng là trái luân thường đạo lý. Quan điểm ủng hộ thì lại cho rằng không có sự khác biệt căn bản nào giữa việc chuyển các gene vào các tế bào soma so với việc chuyển chúng vào các cơ quan của cơ thể.

Liệu pháp gene được thực hiện trên các tế bào sinh dục với hy vọng có thể sửa chữa các sai hỏng trong các thế hệ tương lai cũng đặt lên một số vấn đề về đạo đức sinh học. Kỹ thuật di truyền giờ đây đã được thực hiện thường ngày với chuột thí nghiệm, và các vấn đề về mặt kỹ thuật liên quan đến liệu pháp gene ở người rồi sớm muộn sẽ được giải quyết. Vậy, trong trường hợp nào thì chúng ta nên ứng dụng liệu pháp gene ở các dòng tế bào sinh dục? Liệu điều này có chắc chắn dẫn đến sự hiện thực hoá của thuyết ưu sinh, tức là những nỗ lực cố ý làm thay đổi kết cấu di truyền ở các quần thể loài người? Từ viễn cảnh của sinh học, sự loại bỏ hoàn toàn những allele không mong muốn khỏi vốn gene có thể là lợi bất cập hại. Biến dị di truyền là một yếu tố cần thiết giúp cho một loài có thể sống sót cùng với thời gian và vượt qua được các biến cố thay đổi của môi trường. Các allele có thể gây hại trong một số điều kiện này nhưng lại trở nên có lợi trong những điều kiện khác (một ví dụ chính là allele quy định hồng cầu hình liềm, được đề cập ở Chương 14). Liệu chúng ta đã sẵn sàng với các nguy cơ tạo nên những biến đổi di truyền có thể gây hại cho sự tồn tại của loài người trong tương lai không? Có thể chúng ta sẽ phải đối mặt sớm với những câu hỏi này.

Các loại dược phẩm

Công nghiệp dược phẩm thu lợi được nhiều từ các tiến bộ trong các nghiên cứu di truyền học và công nghệ DNA khi chúng được ứng dụng để phát triển các loại dược phẩm hiệu quả trong điều trị bệnh. Tùy theo bản chất của sản phẩm, các dược phẩm có thể được tổng hợp hoặc bằng các phương pháp hoá hữu cơ hoặc bằng công nghệ sinh học.

Tổng hợp các phân tử nhỏ làm thuốc Một sự phát triển thú vị gần đây là việc tổng hợp nên các phân tử nhỏ được

thiết kế nhằm chữa trị một số bệnh ung thư nhất định bằng việc ức chế sự biểu hiện chức năng của một loại protein thiết yếu cho sự tồn tại của các tế bào ung thư. Một được chất, có tên là imatinib (biệt dược là Gleevec), có bản chất là một phân tử nhỏ ức chế hoạt động của enzyme kinase tyrosine thụ thể đặc hiệu (xem Hình 11.7). Sự biểu hiện quá mức của thụ thể này, gây ra bởi một chuyển đoạn nhiễm sắc thể, là nguyên nhân cơ bản gây nên bệnh ung thư bạch cầu thể tủy trường diễn (CML; xem Hình 15.17). Các bệnh nhân mới ở giai đoạn đầu của bệnh CML nếu được điều trị bằng imatinib có biểu hiện thuyên giảm gần như hoàn toàn đối với các triệu chứng của bệnh ung thư này. Các loại thuốc có kiểu hoạt động tương tự cũng đã được dùng thành công trong điều trị một vài dạng của các bệnh ung thư phổi và ung thư vú. Hướng nghiên cứu này chỉ khả thi đối với các dạng bệnh ung thư mà cơ chế phân tử đã được hiểu biết tương đối đầy đủ.

Các sản phẩm dược phẩm có bản chất protein có thể được sản xuất ở quy mô lớn bằng việc sử dụng các tế bào hoặc các cơ thể sinh vật hoàn chỉnh. Hiện nay, nuôi cấy tế bào được sử dụng rộng rãi hơn.

Sản xuất protein bằng nuôi tế bào Trong phần đầu của chương này, chúng ta đã đề cập đến công nghệ DNA và các hệ thống biểu hiện gene để sản xuất một lượng lớn các protein mà trong tự nhiên vốn chỉ tồn tại ở lượng nhỏ. Các tế bào chủ được sử dụng trong những hệ thống như vậy có thể được cải tiến để có thể tiết ra một loại protein mà chúng tổng hợp nên, qua đó làm đơn giản hoá quá trình tinh sạch sản phẩm bởi các phương pháp hoá sinh truyền thống.

Trong số các dược phẩm đầu tiên được “sản xuất” theo cách đó có insulin và hormone sinh trưởng của người (HGH). Ở Mỹ, khoảng 2 triệu bệnh nhân đái tháo đường phụ thuộc vào insulin trong phác đồ điều trị bệnh. Hormone sinh trưởng của người cần được bổ sung cho những đứa trẻ mắc chứng bệnh lùn sau khi sinh do thiếu lượng HGH phù hợp. Một dược phẩm quan trọng khác được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền là yếu tố hoạt hoá plasminogene của mô (TPA). Nếu bệnh nhân được dùng TPA sau một cơn đau tim, thì dược chất này có thể giúp hoà tan các cục máu vón và giảm các nguy cơ đột quỵ sau này.

Các tế bào nuôi cấy cũng có thể được dùng để sản xuất các loại vaccine thúc đẩy hệ miễn dịch bảo vệ cơ thể chống lại các tác nhân gây bệnh đặc thù (xem Chương 43). Mỗi tác nhân gây bệnh thường có một hoặc một số protein bề mặt gây đáp ứng miễn dịch chống lại nó. Loại protein này được tạo ra bởi công nghệ DNA tái tổ hợp có thể hoạt động như vaccine chống lại tác nhân gây bệnh. Theo một hướng khác, kỹ thuật di truyền có thể được dùng nhằm làm biến đổi hệ gene của các tác nhân sinh học gây bệnh, qua đó tạo ra các dạng tác nhân gây bệnh bị suy yếu (giảm động lực); chúng được dùng như các vaccine “sống”.

Các “nhà máy” động vật và thực vật sản xuất protein làm thuốc. Trong một số trường hợp, thay vì sử dụng các hệ thống tế bào *invitro* để tạo ra một lượng lớn các sản phẩm protein, các nhà dược học có thể sử dụng nguyên một cơ thể động vật hoàn chỉnh. Các kỹ thuật mà họ sử dụng đã được chúng ta nói bóng gió khi đề cập đến khả năng tiến hành các kỹ thuật di truyền ở các tế bào sinh dục của người, nhưng ở đây chúng được thực hiện ở động vật chứ không phải ở người. Bằng việc sử dụng các phương pháp này, các nhà khoa học có thể đưa một gene từ một

cơ thể có kiểu gene này vào hệ gene của một cơ thể khác, thông thường là ở một loài khác. Các thể động vật như vậy được gọi là **động vật chuyển gene**. Để thực hiện được việc đó, đầu tiên họ tiến hành thu trứng từ một con cái của loài nhận gene rồi tiến hành thụ tinh trong ống nghiệm. Đồng thời họ tiến hành nhân dòng gene mong muốn lấy từ cơ thể cho gene. Sau đó, họ tiêm DNA đã được nhân dòng trực tiếp vào nhân của các tế bào trứng vừa thụ tinh. Một số tế bào tiếp nhận DNA ngoại lai, được gọi là **gene biến nạp**, vào hệ gene của chúng đồng thời có thể biểu hiện được những gene này. Các phôi sau khi đã biến đổi di truyền được cấy truyền vào một cơ thể mẹ nuôi. Nếu phôi phát triển bình thường thì sẽ thu được một động vật chuyển gene mang gene của một "thân sinh" thứ ba, cá thể này có thể thậm chí thuộc một loài khác.

Nếu giả thiết gene biến nạp mã hoá cho một loại protein cần với lượng lớn, thì các động vật chuyển gene này có thể phục vụ như các "nhà máy" sản xuất được phẩm. Ví dụ, một gene biến nạp mã hoá cho một protein máu người là antithrombin có thể được cài vào hệ gene của dê theo cách mà sản phẩm của gene biến nạp được tiết vào sữa của con vật (**Hình 20.23**). Protein này sau đó được tinh sạch từ sữa, thường thuận tiện hơn so với từ các tế bào nuôi cấy. Các nhà nghiên cứu cũng đã tiến hành cải tiến các con gà chuyển gene nhằm sản xuất được một lượng lớn sản phẩm của gene biến nạp có trong trứng gà. Các công ty công nghệ sinh học cũng đã cân nhắc các đặc tính của mỗi loài động vật để lựa chọn chúng cho công nghệ di truyền. Ví dụ như, dê sinh sản nhanh hơn so với bò, và có thể thu được nhiều protein từ sữa dê hơn so với sữa của các loài động vật có vú khác có tốc độ sinh sản nhanh hơn so với nó, chẳng hạn như thỏ.

Các protein của người được tạo ra từ các nhà máy thuốc động vật chuyển gene được dùng cho người có thể khác biệt với các sản phẩm protein mà người trực tiếp sản sinh, có thể là do những biến đổi không dễ phát hiện diễn ra trong quá trình hoàn thiện protein. Do vậy, những protein này cần được kiểm tra cẩn thận trước khi khẳng định những protein này (hoặc các nguồn nhiễm khác từ gia súc) sẽ không gây ra các phản ứng dị ứng hoặc các tác dụng không mong muốn ở các bệnh nhân sử dụng chúng.

Theo một hướng mới, công nghiệp được đang bắt đầu phát triển các loài cây "sản xuất thuốc", tương tự như các động vật "sản xuất thuốc". Mặc dù trong tự nhiên từ lâu các loài thực vật đã được dùng rộng rãi như các nguồn

được liệu, nhưng giờ đây các nhà khoa học đang tạo ra các cây có thể tổng hợp nên các protein của người để dùng trong y học và các protein của virus để làm vaccine. Năm 2007, Cơ quan Quản lý Thuốc và Thực phẩm Mỹ (FDA) đã thông qua một kế hoạch trồng giống lúa mang các gene mã hoá cho protein sữa trên một diện tích 3.000 mẫu Anh (mỗi mẫu = 0,4 ha) ở Kansas. Protein thu được có thể được dùng như thực phẩm bổ sung nước trong điều trị bệnh tiêu chảy ở trẻ em, một căn bệnh nghiêm trọng ở các nước đang phát triển.

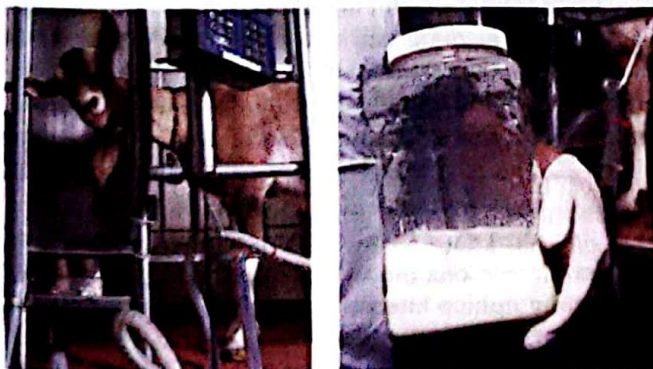
Bằng chứng pháp y và tàng thư di truyền

Trong các vụ án hình sự, các dịch cơ thể hoặc các mảnh mô nhỏ có thể bị bỏ sót trên hiện trường hoặc trên quần áo hoặc tài sản cá nhân của nạn nhân cũng như hung thủ. Nếu như lượng máu, mô hay tinh dịch thu được đủ lớn, thì các phòng thí nghiệm pháp y có thể xác định được nhóm máu hoặc mô dựa trên việc sử dụng các kháng thể để phát hiện ra các protein bề mặt đặc hiệu của chúng. Tuy vậy, những phép thử này thường cần một lượng mẫu tương đối lớn và các mẫu thu được phải còn tươi mới. Ngoài ra, do nhiều người thuộc cùng nhóm máu và mô, nên phương pháp này thường chỉ giúp loại bớt các nghi can, chứ không dùng làm bằng chứng kết tội thuyết phục được.

Ngược lại, phép thử DNA có thể giúp xác định một nghi can là tội phạm với mức độ chắc chắn cao, do trình tự DNA của mỗi người là đặc thù duy nhất (trừ trường hợp sinh đôi cùng trứng). Các dấu chuẩn di truyền biến đổi trong quần thể có thể được đem phân tích ở một người nhất định để xác định một tập hợp các dấu chuẩn di truyền đặc trưng duy nhất của người đó, hay gọi tắt là **tàng thư di truyền**. Thuật ngữ này được các nhà pháp y ưa dùng hơn "dấu vân tay DNA", có lẽ bởi vì họ thường quan tâm nhiều hơn đến các khía cạnh di truyền của các dấu chuẩn này chứ không phải chỉ là kiểu hình các băng điện di đặc thù được tạo ra trên gel, giống như "dấu vân tay", để có thể nhận biết được bằng mắt. Cục điều tra liên bang Mỹ (FBI) bắt đầu ứng dụng công nghệ DNA trong pháp y kể từ năm 1988 bằng việc sử dụng phép phân tích RFLP kết hợp với thẩm tách Southern để tìm sự giống nhau và khác nhau giữa các mẫu. So với các phương pháp trước đó, phương pháp này chỉ cần một lượng các mẫu máu và mô rất nhỏ, chỉ cần khoảng 1.000 tế bào.

Ngày nay, các nhà pháp y thậm chí còn sử dụng một phương pháp nhạy hơn trên cơ sở tính biến dị về độ dài của các dấu chuẩn di truyền được gọi là các **trình tự ngắn lặp lại kế tiếp (STR)**. Đây là những đơn vị lặp lại kế tiếp nhau, mỗi đơn vị lặp lại gồm từ 2 đến 5 nucleotide, ở những vùng đặc thù trong hệ gene. Số lượng của đơn vị lặp lại ở những vùng này có mức độ biến động lớn (có tính đa hình cao) giữa những người khác nhau. Chẳng hạn, một cá thể có thể có trình tự ACAT lặp lại 30 lần ở một locus trong hệ gene, trong khi đó một cá thể khác ở locus này chỉ có 18 lần lặp lại của trình tự ACAT. Bằng sử dụng các cặp mồi được đánh dấu với các gốc phát huỳnh quang có màu khác nhau, người ta có thể nhân dòng các STR nhất định, rồi sau đó phân tích chúng bằng điện di. Do không cần sử dụng phương pháp thẩm tách Southern, nên phương pháp này nhanh hơn so với phân tích RFLP. Và nhờ có bước PCR, phương pháp này có thể sử dụng ngay cả khi chất lượng DNA tinh sạch không cao hoặc khi lượng mẫu thu được rất nhỏ. Một mẫu mô chỉ cần chứa khoảng 20 tế bào có thể là đủ cho việc nhân dòng bằng PCR.

Ví dụ như, trong một vụ trọng án giết người, người ta có thể dùng phương pháp này để so sánh mẫu DNA thu được từ kẻ bị tình nghi, của nạn nhân với một lượng máu

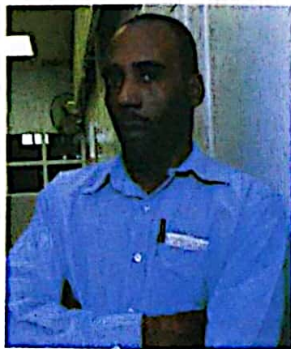


▲ **Hình 20.23** Dê như một "nhà máy thuốc". Con dê biến đổi gene này mang một gene mã hoá protein máu của người là antithrombin, và nó có thể tiết protein này vào sữa. Những bệnh nhân mắc bệnh di truyền hiếm gặp thiếu protein này thường mắc chứng máu vón cục trong các mạch máu của họ. Nhờ dễ dàng tinh sạch từ sữa dê, protein này đang được thử nghiệm như một được phẩm chống máu vón cục.

nhỏ thu được tại hiện trường. Các nhà pháp y chỉ cần kiểm tra một phần nhỏ DNA của hệ gene - thường là 13 locus STR. Mặc dù vậy, chỉ cần lượng nhỏ các dấu chuẩn này cũng đủ cung cấp một hồ sơ di truyền pháp y hiệu quả, bởi vì khả năng hai người khác nhau (trừ trường hợp sinh đôi cùng trứng) có cùng một tập hợp các dấu chuẩn STR giống hệt nhau hầu như chắc chắn không thể xảy ra. Một dự án được tiến hành bởi một tổ chức phi lợi nhuận, có tên gọi là Dự án Vô tội, nhằm tìm ra các vụ kết án oan sai ở Mỹ, đã dùng kỹ thuật phân tích STR với các mẫu máu trong tàng thư thu được tại các hiện trường vụ án để xem xét lại các vụ án cũ. Đến năm 2006, 18 người vô tội đã được giải phóng khỏi nhà tù trên cơ sở các bằng chứng pháp y và pháp lý của dự án này (**Hình 20.24**).

Tàng thư di truyền cũng còn có thể được dùng cho một số mục đích khác nữa. Chẳng hạn, việc so sánh DNA của một người mẹ, một đứa trẻ và một người cha nghi vấn có thể giúp kết luận về người cha đẻ thực sự của đứa trẻ. Đôi khi, việc xác định huyết thống như vậy có ý nghĩa lịch sử. Chính tàng thư di truyền đã cung cấp bằng chứng cho thấy Thomas Jefferson (Tổng thống thứ 3 của Mỹ) hoặc một trong những người đàn ông sinh ra ông (bố hoặc ông nội) là cha của một trong những đứa con của cô người hầu của ông có tên là Sally Hemings. Tàng thư di truyền cũng giúp xác định các nạn nhân trong các vụ tai nạn hoặc thiên tai gây tử vong hàng loạt. Một nỗ lực như vậy lớn nhất đến nay đã được thực hiện là sau vụ tấn

(a) Năm 1984, Earl Washington bị kết án tử hình do phạm tội hiếp dâm và giết Rebecca Williams vào năm 1982. Án tử hình anh ta sau đó được giảm xuống án chung thân vào năm 1993 do có những nghi ngờ mới về các bằng chứng. Đến năm 2000, kỹ thuật phân tích STR được thực hiện bởi các nhà khoa học pháp y phối hợp với Dự án Vô tội đã khẳng định rõ ràng là Earl Washington vô can. Hình này là ảnh chụp Washington ngay trước ngày anh được trả tự do vào năm 2001, tức là sau 17 năm bị cấm tù oan.



Nguồn mẫu	Dấu chuẩn STR1	Dấu chuẩn STR2	Dấu chuẩn STR3
Tinh dịch để lại trên nạn nhân	17,19	13,16	12,12
Earl Washington	16,18	14,15	11,12
Kenneth Tinsley	17,19	13,16	12,12

(b) Trong phân tích STR, các dấu chuẩn STR chọn lọc trong mẫu DNA được nhân dòng bằng PCR, rồi các sản phẩm PCR được phân tách trên gel điện di. Quy trình phân tích sẽ cho biết có bao nhiêu lần đơn vị lặp lại xuất hiện tại mỗi locus STR của mẫu. Mỗi người đều có hai allele tại mỗi locus STR, trong đó mỗi allele chứa một số nhất định đơn vị lặp lại. Bảng số liệu trên cho thấy số đơn vị lặp lại tại ba locus dấu chuẩn STR khác nhau có trong ba mẫu phân tích, gồm mẫu từ tinh dịch để lại trên nạn nhân, mẫu của Earl Washington và mẫu từ một người đàn ông khác có tên là Kenneth Tinsley cũng là một tù nhân song bị kết án vì tội khác không có liên quan. Những số liệu này cùng nhiều số liệu STR khác (không nêu ở đây) đã giúp minh oan cho Washington đồng thời làm Tinsley phải thú nhận đã phạm tội giết Rebecca Williams.

▲ **Hình 20.24** Kỹ thuật phân tích STR đã giúp minh oan và giải phóng một người vô tội khỏi nhà tù.

công khủng bố Trung tâm Thương mại Thế giới ở Mỹ vào năm 2001; hơn 10.000 mẫu sinh phẩm còn lại tại hiện trường của các nạn nhân đã được lưu giữ và so sánh với các mẫu DNA thu được từ đồ dùng cá nhân, ví dụ như bàn chải đánh răng, của các nạn nhân được gia đình cung cấp. Bằng các phương pháp này, các nhà pháp y đã nhận dạng thành công 3.000 cá thể.

Vậy, độ tin cậy của tàng thư di truyền như thế nào? Khi số dấu chuẩn được kiểm tra trong một mẫu DNA càng nhiều, thì độ tin cậy về việc khớp một tàng thư di truyền với một cá nhân nhất định càng cao. Trong điều tra hình sự, việc phân tích đồng thời 13 dấu chuẩn STR có xác suất để hai người khác nhau có tàng thư di truyền giống hệt nhau sẽ rơi vào khoảng giữa một trong số 10^{10} đến một trong số vài nghìn tỷ người. (Để so sánh, chúng ta biết dân số thế giới vào năm 2007 là khoảng 6,6 tỷ người). Xác suất chính xác sẽ còn phụ thuộc vào tần số của các dấu chuẩn này trong quần thể. Thông tin về mức độ phổ biến của các dấu chuẩn trong các chủng tộc người khác nhau cũng có ý nghĩa quan trọng, bởi vì tần số của các dấu chuẩn này có thể biến động đáng kể giữa các nhóm chủng tộc người khác nhau, cũng như giữa một chủng tộc người nhất định với toàn bộ quần thể chung. Khi số liệu về tần số các allele càng đầy đủ và phong phú, các nhà pháp y càng có các số liệu tính toán về xác suất thống kê chính xác hơn. Như vậy, mặc dù vẫn có thể có những sai sót (lỗi của con người) khi phân tích từ các dữ liệu không đầy đủ hoặc từ các bằng chứng thiếu xác thực, song tàng thư di truyền hiện nay nhìn chung được công nhận là những bằng chứng có tính thuyết phục cao bởi các chuyên gia pháp lý cũng như các nhà khoa học.

Làm sạch môi trường

Theo một xu hướng ngày càng tăng, khả năng đáng chú ý của một số chủng vi sinh vật có thể chuyển hoá các hợp chất hoá học càng được khai thác nhiều hơn vào việc xử lý các ô nhiễm môi trường. Nếu nhu cầu cần cho sinh trưởng của những vi sinh vật đó cản trở việc chúng có thể được sử dụng trực tiếp, thì các nhà khoa học có thể chuyển các gene quy định khả năng chuyển hoá có giá trị của chúng vào các loài vi sinh vật khác; những vi sinh vật chuyển gene mới được tạo ra này sẽ được dùng để xử lý các vấn đề môi trường. Ví dụ, rất nhiều vi khuẩn có thể chiết xuất được các kim loại nặng, như đồng, chì và niken từ môi trường sống của chúng và kết hợp những nguyên tố kim loại này vào các hợp chất như sulfate đồng hay sulfate chì; từ những trường hợp này, các nguyên tố kim loại có thể được thu lại một cách dễ dàng. Nhờ vậy, các vi sinh vật được cải biến di truyền có thể trở nên quan trọng trong công nghiệp khai khoáng (đặc biệt ở các mỏ đã được khai thác gần cạn kiệt) đồng thời chúng giúp làm sạch các chất thải độc hại còn lại từ hoạt động khai khoáng. Các nhà công nghệ sinh học cũng đang cố gắng cải biến di truyền các vi sinh vật có khả năng phân giải các hợp chất hydrocarbon chứa clo cũng như các hợp chất gây hại khác. Những vi sinh vật này có thể được dùng trong các nhà máy xử lý nước thải hoặc trong các cơ sở công nghiệp khác mà các chất thải ở đó cần được xử lý trước khi thải ra môi trường.

Theo một cách ứng dụng công nghệ sinh học “cổ điển” hơn, các dạng *nhiên liệu sinh học* có nguồn gốc từ các loài cây trồng như ngô, đậu tương và sắn, được dùng làm nguồn nhiên liệu bổ sung hoặc thay thế cho các dạng nhiên liệu hoá thạch. Trường hợp này không nhất thiết liên quan đến kỹ thuật di truyền. Để có thể tạo ra “ethanol sinh học”, tinh bột được cây trồng tổng hợp tự nhiên được chuyển hoá thành đường, từ đây chúng được

lên men bởi vi sinh vật; một quá trình tương tự cũng có thể tạo ra “dầu diesel sinh học” xuất phát từ dầu thực vật. Cả hai dạng sản phẩm này đều có thể trộn với xăng hoặc dùng riêng làm nguồn nhiên liệu cho các phương tiện vận tải. Những người đề xuất ý tưởng này thì cho rằng các dạng nhiên liệu sinh học như vậy ít ảnh hưởng đến môi trường hơn so với các nhiên liệu hoá thạch; tuy vậy, một số ý kiến khác thì không đồng tình và cho rằng ảnh hưởng tổng thể đối với môi trường khi trồng những loài cây này sẽ lớn hơn nhiên liệu hoá thạch.

Ứng dụng trong nông nghiệp

Các nhà khoa học đang tiếp tục nghiên cứu làm sáng tỏ hệ gene của các loài vật nuôi và cây trồng quan trọng trong nông nghiệp. Trong một số năm qua, họ đã có nhiều nỗ lực sử dụng công nghệ DNA nhằm cải thiện năng suất nông nghiệp.

Ngành chăn nuôi

Các công tác chọn, tạo và nhân giống động vật, hay ngành chăn nuôi, đã khai thác tính biến dị và tái tổ hợp di truyền tự nhiên qua nhiều thế kỷ. Như chúng tôi đã nêu ở trên, công nghệ DNA cho phép các nhà khoa học tạo ra các động vật chuyển gene giúp tăng nhanh hiệu quả của các công tác chọn, tạo và nhân giống vật nuôi. Mục tiêu của việc tạo ra các động vật chuyển gene cũng giống như mục tiêu của các quá trình chọn, tạo giống động vật truyền thống, chẳng hạn như, để tạo ra những con cừu có chất lượng lông tốt hơn, hoặc lợn có nhiều thịt nạc hơn, hoặc một giống bò sớm thành thục sinh dục. Một ví dụ là các nhà khoa học có thể xác định và nhân dòng một gene giúp tăng cường phát triển của cơ (cơ là thành phần chính trong thịt mà chúng ta ăn) ở một gia súc nào đó, rồi chuyển nó sang gia súc khác, hay thậm chí chuyển sang cừu.

Tuy vậy, các vấn đề chẳng hạn như giảm khả năng sinh sản hay trở nên miễn cảm hơn với các tác nhân gây bệnh không phải hiếm gặp ở các động vật chuyển gene mang các gene biến nạp từ người hay các loài động vật khác. Sức sống và việc chăm sóc sức khoẻ vật nuôi là những vấn đề quan trọng cần quan tâm khi phát triển các giống động vật chuyển gene.

Kỹ thuật di truyền ở thực vật

Các nhà khoa học nông nghiệp đã được thiên nhiên “ban tặng” nhiều loại cây trồng mang các gene quy định các tính trạng mong muốn, chẳng hạn như chín chậm hay kháng bệnh. Một đặc điểm nổi bật là nhìn chung các đối tượng thực vật thường dễ cải biến di truyền hơn so với các đối tượng động vật. Với nhiều loại cây trồng, một tế bào hoặc mô duy nhất được nuôi cấy trong môi trường có thể phát triển thành một cây trưởng thành (xem Hình 20.16). Vì vậy, các thao tác di truyền có thể tiến hành ở các tế bào soma bình thường và các tế bào này sau đó được sử dụng để tạo nên một cơ thể (cây) hoàn chỉnh mang các tính trạng mới.

Vector được sử dụng phổ biến nhất để chuyển các gene mới vào các tế bào thực vật là một loại plasmid có tên gọi là **Ti plasmid** có nguồn gốc từ vi khuẩn đất *Agrobacterium tumefaciens*. Plasmid này có khả năng kết hợp một phân đoạn DNA của nó, được gọi là T-DNA, vào DNA nhiễm sắc thể của các tế bào cây chủ. Để dùng làm vector, các nhà nghiên cứu sử dụng “phiên bản” plasmid đã được biến đổi nhằm làm mất khả năng gây bệnh (không còn giống với dạng kiểu dại) đồng thời đã được cải biến mang gene mong muốn nằm giữa hai vùng biên của đoạn T-DNA.

Hình 20.25 phác thảo một phương pháp sử dụng Ti plasmid

Hình 20.25 Phương pháp nghiên cứu

Dùng Ti plasmid tạo cây trồng chuyển gene

ỨNG DỤNG Các gene quy định các tính trạng có giá trị, như kháng sâu, kháng thuốc diệt cỏ, chín chậm, và tăng giá trị dinh dưỡng, có thể được chuyển từ một giống hay một loài sang một giống hay một loài khác nhờ sử dụng vector Ti.

KỸ THUẬT

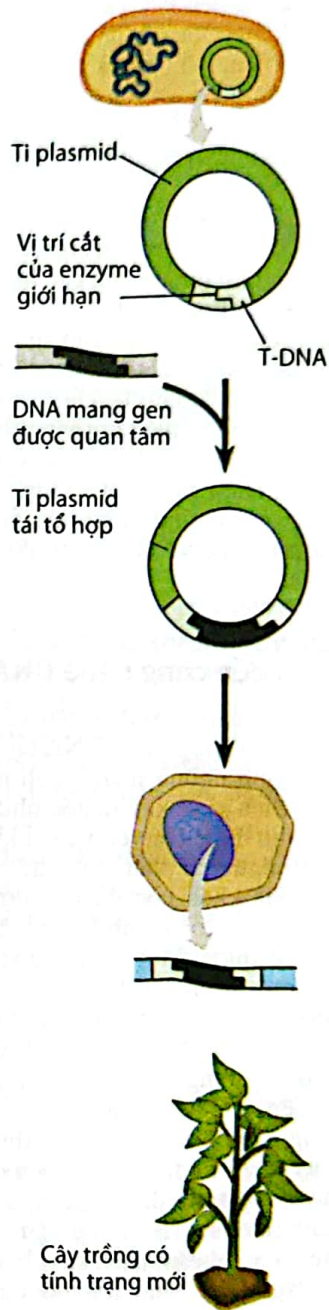
① Ti plasmid được phân lập từ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Đoạn plasmid kết hợp vào hệ gene của tế bào chủ được gọi là T-DNA

② Gene ngoại lai có giá trị được cài vào giữa vùng T-DNA bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả ở Hình 20.4.

③ Các plasmid tái tổ hợp có thể được biến nạp vào tế bào thực vật nuôi cấy nhờ xung điện. Hoặc, các plasmid được chuyển trở lại vi khuẩn *Agrobacterium*, rồi dung dịch huyền phù chứa vi khuẩn này được cho lây nhiễm vào lá của các cây có khả năng biến nạp cao. Khi plasmid của vi khuẩn đã xâm nhập được vào tế bào thực vật, thì T-DNA của nó sẽ kết hợp vào DNA nhiễm sắc thể của tế bào.

KẾT QUẢ Các tế bào mang gene biến nạp có thể tái sinh thành cây hoàn chỉnh biểu hiện tính trạng mới được quy định bởi gene biến nạp.

Agrobacterium tumefaciens



để tạo cây chuyển gene. Các nhà khoa học có thể chuyển các Ti plasmid tái tổ hợp vào tế bào thực vật nhờ xung điện. Theo một cách khác thì plasmid tái tổ hợp có thể được chuyển ngược trở lại *Agrobacterium*; rồi chủng vi khuẩn mang plasmid tái tổ hợp này được tiến hành lây nhiễm vào các tế bào thực vật đang được nuôi cấy hoặc lây nhiễm trực tiếp trên các cây có mức độ miễn cảm cao.

Kỹ thuật di truyền đang nhanh chóng thay thế các chương trình chọn, tạo giống truyền thống, đặc biệt đối với các tính trạng có giá trị cao, ví dụ như kháng sâu bệnh hay thuốc diệt cỏ, nếu chúng được quy định bởi một hoặc một số ít gene. Các cây trồng biến đổi di truyền mang gene của vi khuẩn cho phép chúng kháng thuốc diệt cỏ có thể sinh trưởng tốt trong khi các loài cỏ dại lại bị tiêu diệt, hoặc các cây trồng kháng được với các loài sâu hại sẽ giúp giảm nhu cầu sử dụng thuốc trừ sâu hoá học. Ở Ấn Độ, nhờ việc cài một gene chịu mặn có nguồn gốc từ một giống xoài mọc ven biển vào hệ gene của một số giống lúa nên các cây lúa có thể sinh trưởng được trong điều kiện nước có hàm lượng muối cao hơn ba lần so với nước biển. Tổ chức khoa học thực hiện nghiên cứu này ước lượng khoảng 1/3 diện tích đất được tưới nước có độ mặn cao do việc sử dụng và tưới quá mức các loại phân hoá học, là một nguy cơ đối với nguồn cung cấp lương thực. Vì vậy, các cây trồng có khả năng chịu mặn sẽ có giá trị trên toàn thế giới.

Kỹ thuật di truyền còn có tiềm năng lớn giúp cải thiện giá trị dinh dưỡng của các loài cây trồng. Chẳng hạn, các nhà khoa học đã phát triển được một giống lúa chuyển gene tạo ra các hạt gạo màu vàng chứa β -carotene mà cơ thể chúng ta sử dụng để tổng hợp vitamin A (xem Hình 38.18). Giống lúa “vàng” này có thể giúp phòng chống chứng thiếu hụt vitamin A xảy ra với một nửa dân số thế giới vốn phụ thuộc vào gạo là nguồn lương thực chính. Hiện nay, một số lớn trẻ em ở vùng Đông Nam Á đang mắc chứng thiếu hụt vitamin A có thể dẫn đến suy giảm thị lực và tăng mức độ mắc cảm với một số bệnh lý khác.

Các vấn đề về an toàn sinh học và đạo đức liên quan đến công nghệ DNA

Những quan ngại đầu tiên về các nguy cơ tiềm tàng liên quan đến công nghệ DNA tái tổ hợp hướng vào khả năng phát sinh những mầm bệnh nguy hiểm mới. Chẳng hạn như, điều gì sẽ xảy ra nếu như những gene của các tế bào ung thư được chuyển vào vi khuẩn hoặc virus? Để phòng tránh nguy cơ phát sinh các vi sinh vật độc hại như vậy, các nhà khoa học đã xây dựng một bản hướng dẫn về quản lý an toàn sinh học và đã được thông qua ở Mỹ và một số nước. Một biện pháp an toàn sinh học là tập hợp các quy trình kỹ thuật phòng thí nghiệm nghiêm ngặt được thiết kế để bảo vệ cán bộ nghiên cứu khỏi nguy cơ bị lây nhiễm bởi các vi sinh vật được biến đổi di truyền và để ngăn ngừa khả năng chúng phát tán khỏi phòng thí nghiệm. Ngoài ra, các chủng vi sinh vật được dùng trong công nghệ DNA tái tổ hợp thường được biến đổi trở nên “suy yếu” về di truyền nhằm đảm bảo việc chúng không thể sống trong điều kiện ngoài phòng thí nghiệm. Cuối cùng, một số loại thí nghiệm nhất định có nguy cơ nguy hiểm cao bị cấm triển khai hoàn toàn.

Ngày nay, phần lớn mối quan ngại của công chúng về các nguy cơ gây hại có thể không phải là về các vi sinh vật tái tổ hợp, mà về các cơ thể biến đổi di truyền (GM, *genetically modified organisms*) được dùng làm thực phẩm. Theo nghĩa rộng, một cơ thể GM là cơ thể được chuyển gene nhân tạo từ một loài khác hoặc thậm chí từ một giống khác trong cùng loài. Ví dụ như, một giống cá hồi được biến đổi di truyền bằng cách tiến hành chuyển một gene mã hoá hormone sinh trưởng hoạt động mạnh. Tuy vậy, phần lớn các cơ thể GM đóng góp vào nguồn thực phẩm của chúng ta hiện nay không phải là động vật, mà là các loài cây trồng.

Các cây trồng GM phổ biến nhất ở Mỹ, Argentina và Brazil; tổng cộng diện tích trồng cây GM ở ba nước này chiếm trên 80% tổng diện tích trồng những giống cây trồng như vậy trên toàn thế giới. Ở Mỹ, phần lớn các cây ngô, đậu tương và cải dầu canola là các cây trồng biến đổi gene, và các sản phẩm GM từ những cây trồng này không cần dán nhãn. Tuy vậy, các loại thực phẩm tương tự vẫn đang tiếp tục là chủ đề tranh cãi ở châu Âu, nơi mà cuộc “cách mạng” về GM gặp phải nhiều ý kiến phản đối mạnh mẽ. Nhiều người châu Âu quan ngại về tính an toàn của thực phẩm GM và hậu quả có thể gây ra bởi việc trồng các cây trồng GM. Đầu năm 2000, các nhà thương thuyết từ 130 quốc gia (gồm cả Mỹ) đã đồng ý với bản Nghị định thư về An toàn sinh học đòi hỏi các nhà xuất khẩu phải xác định rõ các cơ thể GM có trong các lô hàng thực phẩm xuất khẩu, đồng thời cho phép các quốc gia nhập khẩu tự xác định liệu các sản phẩm GM có nguy cơ gây hại cho sức khoẻ hay môi trường hay không. Kể từ đó, thỉnh thoảng các nước châu Âu lại từ chối nhập khẩu cây trồng từ Mỹ và các nước khác, dẫn đến các tranh chấp thương mại. Mặc dù chỉ có một số lượng nhỏ các cây GM hiện đang được trồng ở châu Âu, nhưng sự tiêu thụ những sản phẩm từ chúng trên thị trường thường thất bại, và “tương lai” của cây trồng GM ở châu Âu đến nay còn chưa rõ ràng.

Những người ủng hộ quan điểm phải thận trọng với các cây trồng GM lo ngại rằng các cây trồng chuyển gene có thể truyền các gene mới của chúng vào các dạng cây hoang dại trong vùng lân cận. Chẳng hạn, chúng ta biết rằng các loài cỏ và các cây hoà thảo thường trao đổi các gene với các dạng họ hàng hoang dại của chúng qua quá trình giao phấn. Nếu các cây trồng được chuyển gene kháng thuốc diệt cỏ, kháng sâu hoặc kháng bệnh, giao phấn với một cây hoang dại, thì thế hệ con của chúng có thể trở thành “các siêu cỏ” có thể phát triển rất khó kiểm soát. Một nguy cơ tiềm tàng khác, do một nghiên cứu trong phòng thí nghiệm chỉ ra, là một gene biến nạp mã hoá cho một protein trừ sâu lại có thể làm cho cây sản sinh ra những hạt phấn gây độc đối với một số loài bướm. Tuy vậy, các nhà khoa học cùng với Cơ quan Dịch vụ Nghiên cứu Nông nghiệp đã kết luận từ một điều tra trong vòng hai năm rằng các loài bướm không thể phơi nhiễm với các hạt phấn tới mức gây độc được.

Đối với nguy cơ gây hại cho sức khoẻ con người của các cây GM, một số người lo sợ rằng các sản phẩm protein của gene biến nạp có thể dẫn đến các phản ứng dị ứng. Mặc dù có một số bằng chứng về điều này, nhưng những người ủng hộ các cây GM cho rằng những protein này có thể được kiểm tra trước nhằm tránh tạo ra các sản phẩm gây đáp ứng dị ứng.

Hiện nay, các chính phủ và cơ quan quản lý trên toàn thế giới đang trầm trồ với việc làm thế nào vừa thúc đẩy việc ứng dụng công nghệ sinh học trong nông nghiệp, công nghiệp và y học, vừa đảm bảo cho việc các sản phẩm và quy trình mới được tạo ra an toàn. Ở Mỹ, những ứng dụng công nghệ sinh học như vậy được đánh giá về nguy cơ an toàn sinh học bởi các cơ quan quản lý khác nhau, bao gồm FDA, Cơ quan Bảo vệ Môi trường (EPA), Viện Y học Quốc gia (NIH) và Bộ Nông nghiệp. Ngoài ra, những cơ quan quản lý này cùng với công chúng còn phải cân nhắc các khía cạnh đạo đức của công nghệ sinh học.

Những tiến bộ của công nghệ sinh học giờ đây cho phép chúng ta có thể giải trình tự hoàn toàn hệ gene người và nhiều loài sinh vật khác, qua đó cung cấp một kho thông tin khổng lồ về các gene. Chúng ta có thể hỏi những gene nhất định khác nhau như thế nào giữa các loài, cũng như các gene và cuối cùng là các hệ gene đã

tiến hoá như thế nào trong quá trình phát triển của sinh giới. (Đây là những chủ đề sẽ được đề cập đến ở Chương 21.) Cùng lúc đó, tốc độ ngày càng tăng và giá thành ngày càng hạ trong các kỹ thuật xác định trình tự hệ gene của mỗi cơ thể người lại làm nảy sinh các câu hỏi về đạo đức sinh học. Ai sẽ có quyền được theo dõi thông tin di truyền của một người khác? Thông tin đó nên được sử dụng như thế nào? Liệu hệ gene của một người có trở thành một yếu tố xác định tiêu chuẩn tuyển dụng lao động hay bảo vệ cơ thể hay không? Các mối quan ngại về mặt đạo đức cũng như các nguy cơ đối với sức khoẻ và môi trường có thể làm chậm một số hướng ứng dụng của công nghệ sinh học. Cũng luôn có một nguy cơ rằng các quy trình quản lý quá hà khắc sẽ làm cản trở các nghiên cứu cơ bản và các lợi ích tiềm năng của nó. Tuy vậy, sức mạnh của công nghệ DNA tái tổ hợp và kỹ thuật di truyền - nghĩa là khả năng của chúng ta trong việc làm biến đổi nhanh chóng các loài vốn đã tiến hoá qua nhiều thiên niên kỷ - cũng đòi hỏi chúng ta phải triển khai một cách thận trọng và có tính nhân văn.

KIỂM TRA KHÁI NIỆM 20.4

1. Ưu điểm của việc sử dụng các tế bào gốc trong liệu pháp gene là gì?
2. Liệt kê ít nhất ba đặc tính khác nhau mà cây trồng biến đổi gene có thể có được thông qua kỹ thuật di truyền.
3. **ĐIỀU GÌ NẾU?** Nếu bạn là một bác sỹ và có một bệnh nhân có triệu chứng nhiễm virus viêm gan A. Tuy vậy, các triệu chứng lúc ẩn lúc hiện, và bạn không phát hiện được protein virus trong máu bệnh nhân. Biết rằng virus viêm gan A là một virus RNA. Hãy cho biết phân tích nào trong phòng thí nghiệm có thể giúp chẩn đoán chính xác? Giải thích các kết quả có thể thu được. Câu trả lời có trong Phụ lục A.

Ôn tập chương

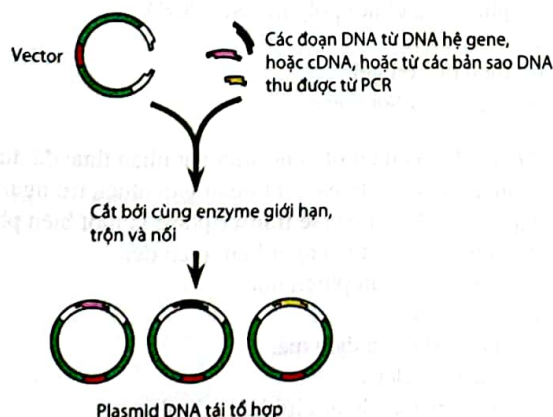
20

TÓM TẮT CÁC KHÁI NIỆM THEN CHỐT

KHÁI NIỆM 20.1

Nhân dòng DNA nhằm thu được nhiều bản sao của một gene hoặc các đoạn DNA khác (tr. 396 – 405)

- ▶ **Nhân dòng DNA và ứng dụng của nó: Khái quát** Nhân dòng DNA và các kỹ thuật khác, được gọi chung là công nghệ DNA, được dùng để thao tác và phân tích DNA nhằm tạo ra các sản phẩm và các cơ thể có những đặc tính hữu dụng mới.
- ▶ **Sử dụng enzyme giới hạn để tạo DNA tái tổ hợp** Các enzyme giới hạn của vi khuẩn cắt các phân tử DNA thành các đoạn ngắn tại các trình tự nucleotide đặc hiệu và thường tạo ra một tập hợp các đoạn DNA sợi kép có các đầu dính mạch đơn. Các đầu dính trên các đoạn DNA lấy từ một nguồn có thể bắt đôi bổ sung với đầu dính trên đoạn DNA từ nguồn khác; DNA ligase có thể tạo liên kết nối các đoạn với nhau tạo nên các phân tử DNA tái tổ hợp.
- ▶ **Nhân dòng gene của sinh vật nhân thực bằng plasmid vi khuẩn**



Các plasmid tái tổ hợp được chuyển trở lại các tế bào chủ; các tế bào chủ phân chia hình thành nên các dòng tế bào. Tập hợp các dòng tế bào như vậy được lưu giữ gọi là thư viện gene.

- ▶ **Biểu hiện các gene của sinh vật nhân thực sau khi đã được nhân dòng** Một số khó khăn về mặt kỹ thuật đã hạn chế sự biểu hiện của các gene sinh vật nhân thực sau khi đã được nhân dòng trong tế bào chủ vi khuẩn. Việc sử dụng các tế bào sinh vật nhân thực nuôi cấy làm tế bào chủ và sử dụng nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men (YAC) làm thể truyền (vector) giúp khắc phục các vấn đề trên.
- ▶ **Khuếch đại DNA trong điều kiện invitro: Phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR)** PCR có thể tạo ra nhiều bản sao của một đoạn DNA đích nhờ sử dụng các mồi bắt đôi bổ sung với hai đoạn đầu của trình tự đích và enzyme DNA polymerase chịu nhiệt.

KHÁI NIỆM 20.2

Công nghệ DNA cho phép nghiên cứu trình tự, sự biểu hiện và chức năng của gene (tr. 405 – 411)

- ▶ **Điện di trên gel và thẩm tách Southern** Các đoạn DNA được cắt bằng enzyme giới hạn có thể phân tách được bằng điện di trên gel. Các đoạn đặc thù có thể nhận biết bằng thẩm tách Southern nhờ dùng các mẫu dò được đánh dấu có trình tự DNA lai được với DNA được cố định trên “màng thẩm tách” của gel.
- ▶ **Giải trình tự DNA** Các đoạn DNA tương đối ngắn có thể được giải trình tự nhờ phương pháp kết thúc chuỗi dideoxygen, hiện nay phổ biến được thực hiện bằng các máy giải trình tự tự động.
- ▶ **Phân tích sự biểu hiện của gene** Sự biểu hiện của một gene có thể phân tích được bằng sử dụng cách dùng phương pháp lai giữa một mẫu dò đánh dấu với các phân tử mRNA đặc thù, hoặc trên gel điện di (thẩm tách Northern) hoặc trực tiếp trên cơ thể sống (lai *in situ*). Theo một cách khác, RNA được phiên mã ngược thành cDNA nhờ reverse transcriptase rồi

cDNA được nhân dòng bằng các môi đặc hiệu (RT-PCR). Kỹ thuật microarray (vi dây) cho phép so sánh đồng thời mức biểu hiện của nhiều gene ở các mô khác nhau, vào các thời điểm khác nhau, hoặc trong các điều kiện môi trường khác nhau.

- **Xác định chức năng gene** Đối với một gene có chức năng chưa biết, việc gây bất hoạt gene đó bằng thực nghiệm rồi quan sát hiệu quả kiểu hình có thể cung cấp dẫn chứng cho biết chức năng gene.

KHÁI NIỆM 20.3

Nhân bản các sinh vật giúp sản xuất tế bào gốc phục vụ nghiên cứu và các ứng dụng khác (tr. 412 – 416)

- **Các nghiên cứu cho thấy sự tương đồng của hệ gene** (tức là các tế bào khác nhau của một cơ thể có hệ gene giống nhau) là ví dụ đầu tiên về nhân bản cơ thể sinh vật.
- **Nhân bản thực vật: Nuôi cấy các tế bào đơn lẻ** Các tế bào đã biệt hoá từ các cây trưởng thành có khả năng tái sinh thành một cây hoàn chỉnh mới.
- **Nhân bản động vật: Sự chuyển nhân tế bào** Nhân từ một tế bào động vật đã biệt hoá đôi khi có thể hình thành nên một cơ thể động vật mới nếu nó được chuyển vào một trứng đã được khử nhân.
- **Các tế bào gốc của động vật** Các tế bào gốc nhất định từ các phôi của động vật hoặc các mô trưởng thành có thể sinh sản và biệt hoá trong điều kiện *in vitro* cũng như trong điều kiện *in vivo*; đây là cơ sở cho các tiềm năng ứng dụng trong y học.

KHÁI NIỆM 20.4

Ứng dụng thực tiễn của công nghệ DNA ảnh hưởng đến cuộc sống con người theo nhiều cách (tr. 416 – 423)

- **Các ứng dụng trong y học** Công nghệ DNA ngày càng được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán các bệnh di truyền và các bệnh khác, đồng thời cung cấp những phương pháp điều trị các rối loạn di truyền hiệu quả và triệt để hơn. Các đa hình đơn nucleotide (SNP) và các đa hình chiều dài các đoạn giới hạn (RFLP) được dùng làm các dấu chuẩn di truyền hiệu quả liên quan đến các allele gây bệnh. Việc sản xuất ở quy mô lớn các hormone protein cũng như các loại protein khác sử dụng trong y học, bao gồm cả các vaccine, trở nên khả thi nhờ công nghệ DNA. Một số protein đang dùng trong điều trị hiện nay được sản xuất bởi các "nhà máy thuốc" động vật và thực vật.
- **Bảng chứng pháp y và tàng thư di truyền** Việc phân tích các dấu chuẩn di truyền như các trình tự ngắn lặp lại kế tiếp (STR) trên phân tử DNA phân lập được từ các mô hoặc dịch cơ thể để lại tại hiện trường các vụ án có thể cung cấp các bằng chứng xác thực chứng minh một nghi can là vô tội hay phạm tội. Những phân tích như vậy cũng rất hiệu quả trong việc xác định huyết thống cũng như xác định danh tính của các thi thể còn lại tại hiện trường các vụ án hoặc sau các thảm họa.
- **Làm sạch môi trường** Các vi sinh vật được biến đổi di truyền có thể được dùng nhằm chiết rút các khoáng chất từ môi trường hoặc giúp phân huỷ các loại rác thải gây độc khác nhau.
- **Ứng dụng trong nông nghiệp** Mục đích của việc phát triển các động vật và thực vật chuyển gene là nhằm nâng cao sản lượng và chất lượng của lương thực và thực phẩm.

- **Các vấn đề về an toàn sinh học và đạo đức liên quan đến công nghệ DNA** Lợi ích tiềm tàng của kỹ thuật di truyền cần được đánh giá đầy đủ và tham chiếu với các nguy cơ gây hại cho con người và môi trường trong quá trình tạo ra các sản phẩm và phát triển các quy trình kỹ thuật.

KIỂM TRA KIẾN THỨC CỦA BẠN

TỰ KIỂM TRA

- Kỹ thuật nào dưới đây thuộc công nghệ DNA *không* phù hợp với ứng dụng của nó?
 - enzyme giới hạn - tạo ra các dấu chuẩn RFLP
 - DNA ligase - enzyme cắt DNA, tạo ra các đầu dính của các đoạn giới hạn
 - DNA polymerase - được sử dụng trong phản ứng chuỗi polymerase để nhân dòng các đoạn DNA
 - reverse transcriptase - tạo ra cDNA từ mRNA
 - điện di - phân tách các phân đoạn DNA
- Phát biểu nào dưới đây *không* đúng khi nói về cDNA được tạo ra từ nguồn vật liệu ban đầu là mô não người?
 - Nó được nhân dòng (khuếch đại) bằng PCR.
 - Nó được dùng để tạo ra một thư viện hệ gene đầy đủ.
 - Nó được tạo ra từ mRNA nhờ sử dụng reverse transcriptase.
 - Nó có thể được dùng làm mẫu dò để phát hiện các gene được biểu hiện ở các tế bào não.
 - Nó thiếu các intron so với các gene ở người.
- Kỹ thuật di truyền thực hiện ở thực vật thuận lợi hơn so với ở động vật, bởi vì
 - các gene ở thực vật không chứa intron.
 - có nhiều loại thể truyền sẵn sàng cho việc truyền DNA tái tổ hợp vào tế bào thực vật.
 - các tế bào soma ở thực vật có thể phát triển thành cây hoàn chỉnh.
 - các gene có thể được cài vào tế bào thực vật nhờ vi tiêm.
 - các tế bào thực vật có nhân lớn hơn.
- Một nhà cổ sinh vật học phát hiện được một mẫu mô từ da hoá thạch của một loài chim (tên gọi là "dodo") đã tuyệt chủng khoảng 400 năm trước. Nhà nghiên cứu này muốn so sánh một vùng đặc thù trên DNA của dodo với DNA của các loài chim đang sống. Kỹ thuật nào dưới đây là hiệu quả hơn cả để làm tăng lượng DNA của chim dodo phục vụ cho việc phân tích?
 - phân tích RFLP
 - phản ứng chuỗi polymerase (PCR)
 - xung điện
 - điện di trên gel
 - thẩm tách Southern
- Sự biểu hiện của một gene sinh vật nhân thực đã được nhân dòng trong tế bào vi khuẩn gặp nhiều trở ngại. Việc dùng mRNA và reverse transcriptase là một biện pháp nhằm hạn chế bớt trở ngại liên quan đến
 - sự biến đổi sau phiên mã.
 - xung điện.
 - sự biến đổi sau dịch mã.
 - lại acid nucleic.
 - nối ghép các đoạn giới hạn với nhau.

6. Công nghệ DNA có nhiều ứng dụng trong y học. Ứng dụng nào dưới đây hiện nay *không* được thực hiện thường xuyên?
- sản xuất các hormone dùng trong điều trị tiểu đường và bệnh lùn bẩm sinh
 - sản xuất các protein của virus làm vaccine
 - chuyển các gene được biến đổi di truyền vào các tế bào giao tử ở người
 - xác định trước sinh các gene gây bệnh di truyền
 - xét nghiệm di truyền các cá thể mang allele gây bệnh
7. Trình tự nào dưới đây trên mạch DNA sợi kép nhiều khả năng là vị trí cắt của enzyme giới hạn hơn cả?
- a. AAGG b. AGTC c. GGCC d. ACCA e. AAAAA
TTCC TCAG CCGG TGGT TTTT
8. Trong các phương pháp DNA tái tổ hợp, thuật ngữ *vector* được dùng để chỉ
- enzyme cắt DNA thành các đoạn giới hạn.
 - các đầu dính của một phân đoạn DNA.
 - một dấu chuẩn RFLP.
 - plasmid có tác dụng chuyển DNA vào trong tế bào.
 - mẫu dò DNA có tác dụng xác định một gene nhất định.
9. Giả sử bạn đang cần tạo ra một thư viện hệ gene cho một loài lợn rừng trên cơ sở sử dụng vector là plasmid vi khuẩn. Sơ đồ màu xanh dưới đây biểu diễn vector, theo đó nó có một vị trí cắt của một enzyme giới hạn đã được sử dụng ở Hình 20.3. Phía trên plasmid này là một vùng trình tự DNA mạch thẳng của lợn rừng. Hãy vẽ một quy trình nhân dòng đoạn trình tự DNA của lợn rừng gồm các bước cần thực hiện đối với cả hai phân tử DNA này. Dùng hai bút màu khác nhau để phân biệt các nucleotide trên DNA của lợn rừng và trên plasmid. Ghi chú các thông tin cần thiết ở mỗi bước.

5' TCCATGAATTCTAAAGCGCTTATGAATTCACGGC 3'
3' AGGTACTTAAGATTTCGCGAATACTTAAGTGCCG 5'

DNA lợn rừng



Plasmid

10. **HÃY VẼ** Giả sử bạn muốn nghiên cứu về crytallin là protein thủy tinh thể ở người. Nhằm thu được một lượng protein đủ lớn, bạn cần phải nhân dòng gene *crystallin*. Để làm điều đó, bạn sẽ thiết lập một thư viện hệ gene hay một thư viện cDNA? Vật liệu nào bạn sẽ dùng làm nguồn cung cấp DNA hoặc RNA?

Đáp án cho câu hỏi trắc nghiệm có trong Phụ lục A.

LIÊN HỆ VỚI TIẾN HOÁ

11. Nếu công nghệ DNA ngày càng được triển khai rộng rãi, thì con đường tiến hoá sau này sẽ có những thay đổi gì so với các cơ chế tiến hoá tự nhiên vốn đã tồn tại và diễn ra trong 4 tỷ năm qua.

TÌM HIỂU KHOA HỌC

12. Bạn hy vọng sẽ nghiên cứu một gene mã hoá cho một protein là chất dẫn truyền thần kinh trong các tế bào não người, và bạn đã biết trình tự amino acid của protein này. Hãy giải thích bằng cách nào bạn có thể (a) xác định được các gene biểu hiện ở một loại tế bào não nhất định, (b) xác định gene nào mã hoá cho chất dẫn truyền thần kinh được quan tâm, (c) tạo ra nhiều bản sao của gene được quan tâm và (d) tạo ra một lượng lớn chất dẫn truyền thần kinh để có thể ứng dụng trong y học.

KHOA HỌC, CÔNG NGHỆ VÀ XÃ HỘI

13. Có hay không nguy cơ về phân biệt đối xử khi áp dụng rộng rãi các xét nghiệm di truyền nhằm xác định các gene "gây hại"? Chính sách gì bạn có thể đưa ra nhằm ngăn ngừa nguy cơ có thể bị lạm dụng này?
14. Sự tài trợ cho các nghiên cứu tế bào gốc luôn nhận được các ý kiến chính trị trái chiều. Tại sao những ý kiến bất đồng về chủ đề này lại nóng bỏng như vậy? Hãy tóm tắt những quan điểm ủng hộ và phản đối đối với các nghiên cứu liên quan đến tế bào gốc, và nêu quan điểm của riêng bạn đối với mỗi vấn đề được đưa ra.