

PHAN CỰ NHÂN

DI TRUYỀN HỌC ĐỘNG VẬT



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

GS. TS. PHAN CỰ NHÂN

DI TRUYỀN HỌC ĐỘNG VẬT



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
Hà Nội - 2001

LỜI NÓI ĐẦU

Khoa học di truyền đạt được những đỉnh cao nhất ngay từ đầu thế kỷ XXI, thế kỷ của sinh học, với các thành tựu nổi bật giải mã hệ gen người, nhân bản vô tính.

Sách di truyền học động vật xuất bản đề cập tới các cơ sở lý thuyết cơ bản về di truyền trên đối tượng động vật, giới thiệu các thành tựu nghiên cứu và ứng dụng thực tiễn trong các lĩnh vực di truyền tế bào, di truyền hoá sinh, các phát hiện mới về cơ chế di truyền phân tử tập tính động vật.

Với những phát triển hiện tại cực nhanh của di truyền phân tử, sách dành ưu tiên cho các hướng mới trong di truyền học động vật, các phương pháp phân tích phân tử, đặc biệt đi sâu vào lĩnh vực công nghệ di truyền động vật, công nghệ ADN tái tổ hợp, công nghệ gen động vật tạo động vật truyền gen, sản xuất sản phẩm sinh học bằng kỹ thuật gen ...

Phân mới nhất của sách nhằm tiếp cận các thành tựu cập nhật của di truyền học những tháng đầu năm của năm 2001, với các lĩnh vực nhân bản vô tính động vật, giải mã hệ gen người.

Sách hy vọng được phục vụ cán bộ giảng dạy, sinh viên các trường đại học, các hệ đào tạo cao học, thạc sĩ, tiến sĩ sinh học, cán bộ giảng dạy, nghiên cứu ở các trường, các viện, nghiên cứu khoa học mặt khác nhằm góp phần tự bồi dưỡng kiến thức di truyền học của đông đảo các thầy, cô giáo ở các trường trung học phổ thông, cao đẳng.

Sách Di truyền học động vật ra đời, chắc chắn còn nhiều hạn chế. Xin rất chân thành cảm ơn những ý kiến đóng góp của bạn đọc.

Tác giả

GS. TS. PHAN CỰ NHÂN

Chương I

CƠ SỞ DI TRUYỀN ĐỘNG VẬT

A. GEN, ALLEN VÀ DÂY ALLEN Ở ĐỘNG VẬT

I. GEN

Ý tưởng về gen bắt đầu xuất hiện từ đầu thế kỷ XX, khi người ta cần nói đến những yếu tố giả thiết, quy định các biến đổi về các tính trạng cụ thể, trông thấy được, có ở thực vật, động vật.

Gregor Mendel đã theo dõi, xác định các biến đổi của tính trạng (như hình dạng, màu sắc các hạt) ở cây lai, kết quả giao phối giữa các dòng đậu Hà Lan và xây dựng thành các định luật Mendel.

Ở thời gian này, Mendel chưa phân biệt được các tính trạng quan sát được (cái mà ngày nay được gọi là kiểu hình-phenotip) với các yếu tố di truyền có trong noãn và hạt phấn, cũng được ông gọi là tính trạng (thực tế, đây là kiểu gen-genotip).

Phải đầu năm 1900, với các công trình được phát hiện lại bởi Hugo de Vries (Hà Lan), Carl Correns (Đức), Erich von Tschermak (Áo) và William Bateson (Anh), người ta đã đặt vấn đề phải phân biệt kiểu hình với các nhân tố vật chất bên trong tế bào sinh dục có chức năng quy định các tính trạng kiểu hình.

Bắt đầu từ đây ra đời khoa học di truyền và thuật ngữ Di truyền học (Genetique, từ chữ Hy Lạp "Genetikos") được William Bateson đề xuất năm 1905. Thuật ngữ "gen" (từ "genos", tức sản sinh, nguồn gốc) và sự phân biệt giữa kiểu hình (phenotype, từ "phainein", biểu hiện) và kiểu gen (genotype) được nêu lên từ 1909 bởi nhà di truyền học và thực vật học Wilhelm Johannsen. Định nghĩa về gen là một yếu tố vật chất quy định tính trạng được gắn với quan niệm gen có hai dạng, gọi là alen, có nguồn gốc từ bố và từ mẹ.

Chính cặp alen này quy định các kiểu gen khác nhau, được biểu hiện qua kiểu hình. Sản phẩm cuối cùng của gen là protein hoặc ARN.

Cùng với sự phát triển của khoa học di truyền học, chức năng của gen cũng ngày càng được làm rõ.

Bendle và Tatum, qua các thực nghiệm di truyền học, đã đưa ra mô hình: "1gen - 1protein".

Ngày nay, gen có thể quy định nhiều tính trạng, mã hoá nhiều protein khác nhau, qua cơ chế nhiều kiểu liên kết khác nhau của các exon nằm trên gen ở sinh vật nhân chuẩn (eukaryote) trong quá trình cắt nối sao mã (RNA- processing). Ví dụ thực nghiệm điển hình là gen calcitonin / neuropeptide. Một gen có thể quy định nhiều tính trạng còn qua cơ chế tổ hợp gen. Một gen a, khi cùng được biểu hiện với gen b, c thì có hiệu quả tác động khác với khi được biểu hiện cùng gen e, f.

Sự tổ hợp của hàng vạn gen trong genom của con người, rõ ràng dẫn tới số lượng khổng lồ các tính trạng khác nhau.

Một cơ chế khác nữa, dẫn tới tính chất gen quy định nhiều tính trạng khác nhau là do trong từng cặp alen của mỗi gen, có alen trội và alen lặn, có nguồn gốc từ bố, hoặc từ mẹ. Sự biểu hiện của hai alen này trong mỗi gen có khi có khác nhau cũng dẫn tới các tính trạng khác nhau. Ví dụ thực tế, đột biến gen β trong hemoglobin, gen Thalassemie ở đồng hợp thể, gây hiệu quả trầm trọng, khác với dạng dị hợp thể β -Thalassemie, chỉ dẫn tới hàm lượng hemoglobin F tăng khác thường.

Đột biến HbS, do đột biến gen β dẫn tới đổi vị trí một axit amin, ở dạng đồng hợp thể SS gây hậu quả nghiêm trọng, quái thai, chết thai, chết sơ sinh, nhưng ở dạng dị hợp thể Ss thì không biểu hiện hậu quả bệnh lý.

Ở mức phân tử, hiệu quả trội hay lặn của một gen đột biến có thể giải thích bằng các cơ chế phức tạp của sự điều hòa sao mã.

Vật chất di truyền ở virus, được phát hiện những năm gần đây đã bổ sung nhiều phát hiện mới về ADN, ARN.

Virut ADN

ADN hai sợi: phần lớn là các thực khuẩn thể, như thực khuẩn thể T₂, λ . ADN 1 sợi: các thực khuẩn thể kích thước bé, như ϕ x 174, S₁₂, ϕ R, fd (vật chủ chính là *E. coli*).

Virut ARN

ARN một sợi : virut động vật, poliovirut

ARN hai sợi : virut thực vật, virut khảm thuốc lá, virut nấm men, reovirut (vật chủ chính là người). Phần lớn virut có hệ gen (genom) đường thẳng như T_2 , λ , virut khảm thuốc lá, poliovirut. Một số virut có hệ gen vòng như ϕ x 174.

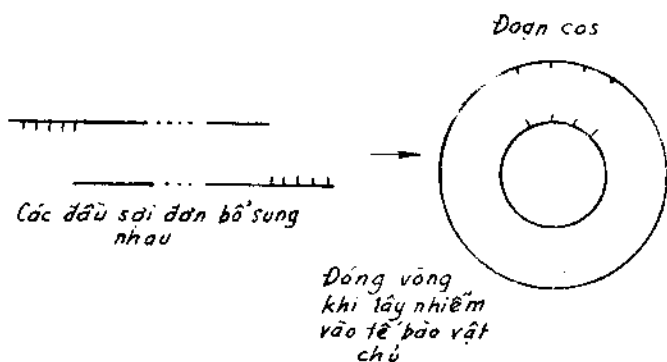
ADN thực khuẩn thể λ . Nhiễm sắc thể phage λ là ADN chuỗi kép, đường thẳng, được kết cuộn trong hạt virut, không có cấu trúc protein kết hợp.

ADN của λ có hai đầu tự do. Ở mỗi đầu dài 12 nucleotid, là một đoạn ADN sợi đơn. Trình tự bazơ ở hai đầu sợi đơn này tương ứng nhau, bổ sung được cho nhau. Pha đầu tiên sau khi ADN của λ xâm nhập vào tế bào vật chủ là sự chuyển đổi phân tử mạch thẳng thành phân tử mạch vòng (h.I.1).

Hai đầu sợi đơn này được kết hợp nhau thành ADN sợi kép. Ở đầu 5' của mỗi đầu sợi đơn ADN được tạo ra những sợi đơn nucleotid, chúng bổ sung chính xác cho nhau và đóng phân tử ADN lại và tạo thành dạng mạch vòng.

Enzym ADN ligaza tạo ra liên kết giữa các nhóm photphat, đóng các khe hở lại.

Hai đầu sợi đơn của ADN λ kết hợp nhau tạo thành đoạn cos (cos sequence)



Hình 1. 1. Nhiễm sắc thể ở Lambda (mạch thẳng chuyển sang mạch vòng khi lây nhiễm vào tế bào vật chủ).

II. ALEN VÀ DÂY ALEN Ở ĐỘNG VẬT

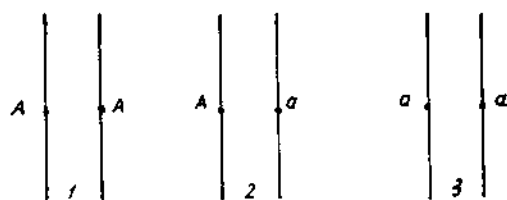
Như ta đã thấy, trong các thí nghiệm di truyền, Mendel gọi hai

trạng thái tương phản, đối lập nhau của cùng một tính trạng (hạt đậu Hà Lan, màu vàng, màu xanh) là cặp tính trạng tương ứng, được quy định bởi các nhân tố (factor) di truyền, *sau này đã được xác định là gen*. Với sự phát triển của khoa học về sau, đặc biệt với học thuyết di truyền nhiễm sắc thể của Morgan, khái niệm mới, lôcut (locus) và alen (allele). Lôcut là khái niệm chỉ vị trí của từng loại gen trên chiều dài nhiễm sắc thể. Alen là các mặt biểu hiện khác nhau của cùng một gen trong một lôcut.

Trong từng cá thể, thuộc thể lưỡng bội, tế bào soma (soma) chứa $2n$ nhiễm sắc thể tồn tại thành từng cặp nhiễm sắc thể tương đồng (homologous).

Trên từng cặp nhiễm sắc thể tương đồng, có nhiều lôcut mang nhiều gen khác nhau. ở mỗi lôcut nằm trên một cặp nhiễm sắc thể, gen trong lôcut ấy bao giờ cũng có 2 alen trên hai nhiễm sắc thể, ví dụ đơn giản nhất đối với một gen A, sẽ có dạng AA (đồng hợp thể trội), aa (đồng hợp thể lặn) và Aa (dị hợp thể).

Như vậy là ở từng cá thể lưỡng bội, tại mỗi lôcut, mỗi gen có 2 alen và chỉ 2 alen mà thôi, nằm trên một cặp nhiễm sắc thể tương đồng (sơ đồ). hai gen A và a chỉ 2 trạng thái đối lập nhau của cùng 1 tính trạng, được gọi là 2 gen tương ứng hoặc 2 gen alen, gen này là alen của gen kia (h.1.2).



Hình 1.2. Sơ đồ minh họa đơn giản các khái niệm lôcut, gen, alen ở các cá thể lưỡng bội.

Thể lưỡng bội 1, 2, 3 → Biểu thị cùng nhiễm sắc thể tương đồng ở ba cá thể lưỡng bội (cùng loại, có cùng một lôcut gen về một tính trạng, với các cặp alen :

AA, aa : Thể đồng hợp

Aa : Thể dị hợp

Rõ ràng, khái niệm alen từ thời Mendel đã được phát hiện, làm sáng tỏ và hoàn chỉnh hơn, qua phát hiện tính chất cặp đôi nhiễm sắc thể ở các sinh vật nhân chuẩn lưỡng bội.

Di truyền học ngày nay đã bổ sung khái niệm alen trên quần thể.

Trên mỗi quần thể, đối với nhiều loại lôcut khác nhau, mỗi lôcut có thể có nhiều alen, không phải chỉ có 2 như trong mỗi cá thể. Trên từng lôcut gen nhất định, ngoài alen trội, alen lặn, còn có nhiều alen trung gian, làm thành một dãy nhiều alen (multiple alleles), nằm trên cùng một cặp nhiễm sắc thể tương đồng, nhưng ở các cá thể khác nhau của cùng một quần thể.

Ngày nay, người ta thừa nhận có thể hình thành dãy nhiều alen trong một quần thể là do đột biến, ở các thời điểm khác nhau trong quá trình tiến hóa. Đột biến xảy ra rất đa dạng, có thể là đột biến thuận nghịch, ví dụ như giữa alen A và a, có thể là từ A đột biến thành A_1 , A_2 , A_3 v. v..., từ a thành a_1 , a_2 , a_3 v. v... (h. I. 3).

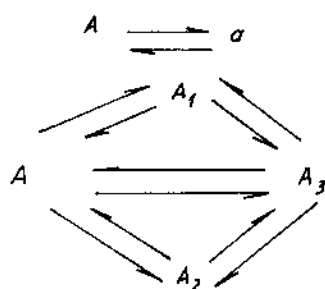
Số lượng các kiểu gen được hình thành trong một quần thể có dãy nhiều alen là do số lượng các alen quy định.

Nếu chỉ có 1 alen A thì hình thành 1 kiểu gen AA, với 2 alen, A_1 và A_2 , thì có thể hình thành 3 kiểu gen, trong đó có 2 đồng hợp thể A_1A_1 , A_2A_2 và 1 dị hợp thể A_1A_2 .

Với 3 alen, A_1 , A_2 , A_3 có thể hình thành 6 kiểu gen, trong đó có 3 đồng hợp thể A_1A_1 , A_2A_2 , A_3A_3 và 3 dị hợp thể A_1A_2 , A_1A_3 , A_2A_3 . Với n alen, sẽ hình thành $\frac{n(n+1)}{2}$ kiểu gen, trong đó có n đồng hợp thể và $\frac{n(n-1)}{2}$ dị hợp thể.

Hiện tượng dãy nhiều alen trong các quần thể sinh vật là một trong những hiện tượng quan trọng trong biến dị di truyền của sinh vật. Mỗi gen có thể biến đổi rất đa dạng, ảnh hưởng rất khác nhau lên sự phát triển của tính trạng.

Dãy nhiều alen làm tăng lên các biến dị tổ hợp của các sinh vật, được hình thành không chỉ do sự phân ly của 1 cặp alen, mà do sự tổ



Hình I. 3. Sơ đồ đơn giản về cơ chế hình thành dãy nhiều alen.

hợp của nhiều gen trong dãy nhiều alen, sự tổ hợp vô cùng đa dạng giữa các alen này với các alen khác, ở các lôcut khác nhau, dẫn đến tính đa hình (polymorphisme) trong sinh giới. Rõ ràng các thành phần khác nhau của dãy nhiều alen sẽ làm biến đổi theo nhiều hướng khác nhau sự phát triển của cùng một tính trạng.

Bảng I. 1. Số lượng các loại kiểu gen được hình thành ứng với số lượng alen

Số alen	Số loại kiểu gen	Số loại đồng hợp thể	Số loại dị hợp thể
1	1	1	0
2	3	2	1
3	6	3	3
4	10	4	6
5	15	5	10
.....			
n	$\frac{n(n+1)}{2}$	n	$\frac{n(n-1)}{2}$

Dãy nhiều alen ở các quần thể sinh vật nói chung, và động vật nói riêng, ngày càng được phát hiện thêm nhiều, trên các loại gen khác nhau, tại các lôcut khác nhau, qua các công trình điều tra cơ bản, và đặc biệt nhờ các phát triển mới, trong phương pháp, kỹ thuật và thiết bị phân tích hiện đại, ngày càng tinh tế và cực nhạy, chính xác.

1. Dãy alen tại lôcut gen hemoglobin người và gia súc

1. 1. Hemoglobin người

Như ta đã biết, đại phân tử hemoglobin (Hb) có thành phần là protein gồm 4 chuỗi polypeptit (chuỗi globin), được liên kết với nhóm hema. ở người, trong quá trình phát triển cá thể, ở giai đoạn phôi, được phát hiện có *hemoglobin phôi (HbE, hemoglobin embryonic)*, với 2 kiểu là Gower I, có cấu trúc phân tử gồm 4 chuỗi epsilon (ϵ_4), hoặc gồm 2 chuỗi dêta và 2 chuỗi epsilon ($\phi_2\epsilon_2$), và Gower II với cấu trúc phân tử 2 chuỗi anpha và 2 chuỗi epsilon ($\alpha_2\epsilon_2$).

Người ta đã xác định hemoglobin này xuất hiện khi phôi 40 ngày tuổi và biến đi để được thay thế bằng dạng khác lúc phôi 70-90 ngày tuổi.

Ở cuối tháng thứ hai của thai, đã bắt đầu xuất hiện một dạng hemoglobin khác là hemoglobin sơ sinh hoặc còn gọi là *hemoglobin thai* (*HbF*, *hemoglobin foetal*), có cấu trúc phân tử gồm 2 chuỗi anpha và 2 chuỗi gamma ($\alpha_2\gamma_2$). Từ tháng thứ 2, 3 đến tháng thứ 9 của thai, hầu hết toàn bộ hemoglobin trong thai là thuộc dạng HbF. Hai dạng HbE và HbF đều là các dạng hemoglobin tử cung.

Ở đời sống ngoài tử cung, từ khi trẻ sinh ra, lớn lên và trong toàn bộ giai đoạn trưởng thành, có dạng hemoglobin trưởng thành (HbA, hemoglobin adult).

Sau khi sinh ra, hàm lượng HbF giảm rõ rệt và tỷ lệ HbA tăng nhanh chóng. Hơn 80% hemoglobin tổng số ở trẻ ba tháng tuổi thuộc dạng HbA.

Ở trẻ em bình thường 5-6 tháng tuổi, chỉ còn 2-3% hemoglobin tổng số là thuộc dạng HbF. Ở trẻ em một tuổi trở lên, chỉ còn HbA. Ở người, HbA ngoài kiểu có cấu trúc phân tử $\alpha_2\beta_2$, còn có kiểu HbA₂, với cấu trúc phân tử 2 chuỗi anpha và 2 chuỗi delta, ($\alpha_2\delta_2$), chiếm khoảng 2% HbA. kiểu $\alpha_2\delta_2$ chủ yếu có ở các khỉ nhân hình (primates).

Các chuỗi polypeptit trong các dạng hemoglobin nêu trên đều do các gen riêng rẽ kiểm soát, thuộc gen cấu trúc.

Lôcut gen anpha xác định sự hình thành chuỗi anpha, gồm 141 axit amin, nằm trên nhiễm sắc thể 16, tồn tại và hoạt động suốt quá trình phát triển cá thể, cả giai đoạn phôi và hậu phôi.

Lôcut gen beta kiểm soát sự hình thành chuỗi beta, gồm 146 axit amin, nằm trên nhiễm sắc thể 11, chỉ hoạt động ở giai đoạn hậu phôi.

1.2. Hemoglobin ở bò và lợn

Trong quá trình phát triển cá thể ở bò và ở một số gia súc khác, người ta cũng phát hiện thấy 3 dạng hemoglobin.

Hemoglobin phôi (HbE) ở bò đã được phát hiện 2 dạng, xuất hiện lúc 4 tuần sau thụ thai và biến đi lúc 6 đến 10 tuần sau khi sinh. (Kleihauer, Stoffler, 1968; Kitchen và ctv, 1970). Bằng kỹ thuật lai phân tử, các tác giả nêu trên đã xác định cấu trúc phân tử của 2 dạng hemoglobin này tương ứng với Hb Gower I và Hb Gower II của người.

Hemoglobin thai (HbF) ở bò xuất hiện lúc 6 đến 8 tuần sau khi thụ

thai và mất đi lúc 8 đến 10 tuần sau khi sinh. Thời gian này có khác nhau ở các giống bò.

Người ta cũng đã thấy có sự thay thế cho nhau giữa HbF và HbA (trưởng thành) trong những tháng đầu sau khi bê sinh ra. Thời gian thay thế HbF hoàn toàn bằng HbA cũng khác nhau giữa các giống bò.

Kết quả phân tích hemoglobin trên bò Việt Nam cho thấy ở bê thuộc các giống bò lai Sind và lai Hà - Ấn, từ 1 - 80 ngày tuổi, bên cạnh dạng HbA, còn phát hiện cả HbF (Phan Cự Nhân, 1970).

Phân tích máu qua các tháng tuổi ở bê nuôi ở Việt Nam, đã phát hiện là HbF giảm theo tuổi tại các tháng đầu và được thay thế dần bằng HbA.

Về cấu trúc phân tử, HbF của bò cũng gồm 4 chuỗi $\alpha_2\beta_2$. Phân tích thành phần axit amin của HbF và HbA của bò cũng cho thấy có sai khác giữa 2 dạng này. Chuỗi gamma của HbF so với chuỗi beta của HbA thì có nhiều xerin, axit glutamic, và lợxin hơn, nhưng đối với lizin, histidin và metionin thì lại ít hơn.

Về cấu trúc phân tử, HbA của bò cũng gồm 4 chuỗi $\alpha_2\beta_2$. Gần đây, người ta cũng phát hiện được nhiều dạng khác nhau của HbA bò.

Ở lợn, trong các giai đoạn phôi sớm, cũng gặp 2 dạng Hb phôi tương tự với Hb Gower I và Hb Gower II ở người (Kleihauer, Stoffler, 1968, Kitchen và ctv, 1970; Đặng Hữu Lanh và ctv, 1977).

Thực nghiệm phân tích ở Việt Nam cho thấy, ở lợn Ỉ Hà Nam Ninh, thời điểm xuất hiện dạng Hb có chuyển động điện di tương ứng với Hb trưởng thành xảy ra lúc phôi 24 ngày, còn ở lợn Đại Bạch là 30 ngày.

Sự thay thế hoàn toàn của dạng HbA cho dạng Hb phôi ở lợn Ỉ Việt Nam xảy ra lúc phôi 40 ngày, trong khi ấy, ở lợn Đại Bạch, muộn hơn, lúc 50 ngày.

Hiện tượng này có thể hợp với quy luật sinh học ở các động vật nhiệt đới, ở lợn có độ thành thực sinh dục sớm hơn (Ỉ Việt Nam) thì quá trình thay thế này cũng sớm hơn so với các giống ôn đới, như lợn Đại Bạch.

Bằng kỹ thuật fingerprint, Kleihauer 1968 cũng phát hiện HbF ở lợn có cấu trúc $\alpha_2\beta_2$.

2. Dây alen tại lôcut gen bêta hemoglobin (β - hemoglobin)

Dãy nhiều alen có thể được làm sáng thêm qua trường hợp về gen bêta, kiểm soát sự tổng hợp chuỗi polypeptit β trong đại phân tử Hb. Gen này có tới 146 codon mã hóa chuỗi polypeptit bêta gồm 146 axit amin. Về mặt lý thuyết, mỗi vị trí trong số 146 axit amin này có thể được thay thế bằng 1 trong số 20 axit amin có trong tự nhiên. Rõ ràng, nếu cho rằng 1 thay thế của riêng 1 axit amin là do 1 đột biến xảy ra ở 1 trong số 146 codon, thì tối thiểu cũng đã có $20 \times 146 = 2920$ alen của gen bêta trong cả quần thể người.

Trong thực tế, khó có thể phát hiện đủ các dạng khác nhau như vậy của gen bêta dù có đi điều tra trên hàng triệu người ở khắp hành tinh.

Để chứng minh thuyết tiến hóa trung tính, M. Kimura, 1971 đã dựa trên các số liệu phân tích thực nghiệm 59 mẫu hemoglobin của người, trong đó có sự thay thế 1 axit amin nào đấy, đã phát hiện 43 mẫu có xảy ra đột biến thay thế vị trí axit amin trên chuỗi β , nhưng không gây ảnh hưởng gì rõ rệt về sinh lý đối với cá thể, ít ra là ở thể dị hợp.

3. Dây alen nhóm máu ở người và gia súc

3. 1. Dây alen nhóm máu O, A, B, AB ở người

Carl Landsteiner, 1900 đã phát minh ra nhóm máu ở người, được giải thưởng Noben năm 1930, có ý nghĩa đặc biệt quan trọng đối với y học trong lĩnh vực truyền máu.

Di truyền học ngày nay đã cho thấy, những sai khác giữa người này và người khác về 4 nhóm máu O, A, B, AB là do dây nhiều alen trong nhiễm sắc thể thường, quy định sự tạo thành kháng nguyên trong hồng cầu.

Như ta đã biết, kháng nguyên (antigen) là loại protein mà khi có mặt trong hồng cầu, sẽ làm tạo thành một loại kháng thể(antibody), đối lập với protein ấy.

Thông thường, kháng nguyên là một loại protein lạ, tức protein của một loài khác, nhưng kháng nguyên nhóm máu do Landsteiner phát hiện lại không thuộc loại này.

Loại kháng nguyên nhóm máu có trong điều kiện tự nhiên và ứng với mỗi kháng nguyên ấy thì có một kháng thể, cũng được tạo thành

trong tự nhiên, có nghĩa là không phải do tiêm kháng nguyên lạ vào mà được hình thành *kháng nguyên nằm trong hồng cầu, còn kháng thể ứng với chúng lại nằm trong huyết thanh*. Nếu người ta tiêm vào huyết thanh những tế bào máu sản sinh một loại kháng nguyên nào đó, mà trong huyết thanh trên có chứa kháng thể đối lập với loại kháng nguyên ấy, thì dưới tác động của kháng thể, các hồng cầu tiêm vào sẽ bị kết tụ hoặc ngưng kết, gây hậu quả rất tai hại.

Kháng thể gây nên sự ngưng kết hồng cầu được gọi là *ngưng kết tổ*, còn kháng nguyên của hồng cầu thì gọi là *ngưng kết nguyên* cùng loài, bởi vì ngưng kết nguyên này gây nên sự tạo thành ngưng kết tổ ở các cá thể cùng loài với nó.

Ở từng người một, chúng ta chỉ có thể thuộc 1 trong 4 nhóm O, A, B, AB nhưng xét trên cả quần thể người, cả toàn bộ loài người, thì có cả một hệ thống gồm 4 loại nhóm máu kể trên.

Di truyền miễn dịch học đã cho thấy tại locus gen nhóm máu thuộc hệ thống O, A, B, AB này, có cả một dãy nhiều alen.

Bảng 1. 2 Các alen tại locus gen nhóm máu thuộc hệ thống O, A, B, AB

Nhóm máu (kiểu hình)	Các alen quy định (kiểu gen)
O	ii
A	I^{A1} hoặc I^A
B	I^{B1} hoặc I^B
AB	I^{AB}

Gần đây người ta còn phát hiện là trong kháng nguyên A của người, không chỉ có 1 loại, mà là 3 loại, được quy định bởi 3 alen: I^{A1} , I^{A2} , I^{A3} . Như vậy là tại locus gen về nhóm máu O, A, B, AB ở người, có cả một dãy 5 alen:

$$I^{A1} \quad I^{A2} \quad I^{A3} \quad I^B \quad i$$

Đây là một ví dụ về sự đa hình cân bằng trong quần thể người, chứng minh cho quá trình củng cố những đột biến ngẫu nhiên, trung tính, không liên quan với tác dụng của chọn lọc tự nhiên, nghĩa là không có lợi, cũng không có hại, một luận điểm trong thuyết tiến hóa trung tính của Kimura, 1971 cho đây là một nguyên lý cơ bản của sự tiến hóa ở cấp phân tử.

Loại đột biến trung tính như trên đã được di truyền học phân tử xác nhận. Các alen I^A , I^B là trội so với alen i là alen lặn.

Ở người có nhóm AB, thuộc kiểu gen $I^A I^B$, trong hồng cầu được tổng hợp cả 2 loại protein kháng nguyên A và B, do đó đây là trường hợp đặc biệt, được gọi là *hiện tượng đồng trội* (codominance). Cả 2 alen kết hợp nhau, nhưng đều được biểu hiện ra kiểu hình. Mối quan hệ giữa các alen I^A , I^B và i được biểu thị như sau:

$$I^A = I^B > i$$

Về dãy alen nhóm máu ở người, ngoài dãy alen về hệ thống nhóm máu O, A, B, AB còn có dãy alen và hệ thống Rhesus (Rh) và hệ thống MN, đã được xác định về mặt di truyền.

Người ta đã thấy, hồng cầu một số người bị ngưng kết bởi huyết thanh thỏ được miễn dịch bằng máu khỉ *Macacus rhesus* - kháng gen của hồng cầu gây nên sự ngưng kết, được gọi là yếu tố Rhesus (Rh).

Máu của người có kháng gen này thuộc loại máu Rhesus dương. Những người này có thể là đồng hợp thể về yếu tố Rhesus (RhRh) hoặc dị hợp thể (Rhrh).

Những người thuộc loại máu Rhesus âm là đồng hợp thể về gen lặn (rhrh)

Di truyền y học đã làm rõ hiện tượng tiêu hồng nguyên bào ở thai (Erythroblastosis foetalis) có cơ sở di truyền về yếu tố Rhesus, dẫn tới thiếu máu, gây tử vong cho thai hoặc trẻ sơ sinh.

Loại thai này có máu Rhesus dương, mẹ lại thuộc Rhesus âm yếu tố Rhesus là do bố truyền lại cho thai.

Do có sự lưu thông máu giữa thai và mẹ, kháng gen Rhesus này của thai, trong nhiều trường hợp, gây nên sự tạo thành kháng thể Rhesus trong máu mẹ. Khi kháng thể này được tích lũy thành lượng lớn trong máu mẹ, nó sẽ đi vào thai và huỷ hoại hồng cầu thai. Lúc đầu, người ta thấy đây chỉ là 1 cặp alen đơn giản, Rh và rh được quy định bởi phản ứng máu Rh dương và Rh âm.

Sau này, người ta đã xác định, một số nhóm máu Rh còn bao gồm các nhóm phụ, và dần dần được phát triển thành một dãy 8 alen thuộc 1 lôcut.

Cho đến nay, người ta đã thấy, lôcut Rh có một dãy nhiều alen,

trong đó một số alen phản ứng không phải với một, mà với nhiều loại kháng huyết thanh khác nhau.

3. 2. Dây alen nhóm máu ở gia súc và gia cầm

Nhiều hội nghị khoa học toàn thế giới về chuyên đề nhóm máu ở động vật đã làm rõ tính đa hình phức tạp trong các dây nhiều alen về hệ thống nhóm máu ở gia súc, gia cầm.

Ở nhiều nước, các tư liệu về cơ sở di truyền của các sai khác trong nhóm máu của đại gia súc có sừng đã được sử dụng để kiểm tra nguồn gốc chính xác của gia súc được biểu thị trong hệ phả của gia súc.

Nhóm máu còn được sử dụng để chẩn đoán về trạng thái đồng hợp thể và dị hợp thể, cùng trứng hay khác trứng trong các trường hợp sinh đôi cùng giới tính ở đại gia súc có sừng.

Bảng số liệu tổng hợp sau đây về kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả cho ta thấy rõ tính đa hình trong các lôcut nhóm máu ở động vật gồm các dây rất nhiều alen về nhóm máu (bảng 1.3).

Bảng 1. 3. Tính đa hình trong các lôcut nhóm máu ở động vật
(Tuyển tập hội nghị chuyên đề Viện hàn lâm khoa học New York, 1961)

Loại động vật	Số lượng các lôcut	Các lôcut có trên 2 alen	Số alen lớn nhất được phát hiện trong 1 lôcut
Đại gia súc có sừng	11	7	300 (lôcut B) 35 (lôcut C) 52 (lôcut B)
Cừu	7	3	5
Lợn	10	4	5
Ngựa	62	1	3
Chó	7	1	2
Thỏ	1	1	21
Gà mái	10	6	

Dây nhiều alen về nhóm máu động vật ngày càng được phát hiện thêm, trên nhiều loại gen, tại nhiều lôcut khác nhau qua các kết quả điều tra cơ bản trên quy mô ngày càng lớn và đặc biệt nhờ các kỹ thuật và phương pháp, thiết bị phân tích ngày càng hiện đại.

4. Dãy alen về gen màu lông ở thỏ

Các nghiên cứu điều tra và phân tích di truyền đã xác nhận ở thỏ có các màu lông khác nhau, rất đa dạng, với kiểu gen khác nhau, thỏ bình thường, lông có màu sắc thuộc kiểu gen C; gen này quy định màu hoang dại của thỏ (màu tự nhiên). Thỏ bạch tạng, thuộc kiểu gen c là lặn so với gen C là trội.

Ngoài dạng c là dạng bạch tạng hoàn toàn, người ta còn thấy ở thỏ, có dạng bạch tạng không hoàn toàn, được gọi là dạng Himalaya, lông trắng nhưng ở chân, đuôi, tai, đỉnh mũi thì có màu đen hoặc hung sẫm, thuộc kiểu gen c^h .

Các phân tích di truyền cho thấy cả 2 dạng bạch tạng và Himalaya đều là alen trội với dạng bình thường, đồng thời tính trạng này trội với tính trạng kia cũng là alen của nhau.

Alen c^h trội với alen màu bình thường C là lặn, nhưng đối với alen bạch tạng c lại là trội.

Ngoài dạng lông nêu trên, người ta còn thấy ở thỏ có dạng lông Chinchilla, thuộc kiểu gen c^{ch}

Dãy 4 alen về màu lông thỏ cho ra một hệ thống các kiểu gen và kiểu hình như sau.

Bảng 1. 4. Alen về màu lông của thỏ

Kiểu gen	Kiểu hình
CC Cc^h Cc^{ch} c	Dạng lông hoang dại
$c^h c^h$ $c^h c$	Himalaya
$c^{ch} c^{ch}$	Chinchilla
cc	Bạch tạng

Người ta cũng thấy, dãy nhiều alen về màu lông còn có ở nhiều động vật có vú khác, như chuột nhắt, chuột cống, chuột lang, mèo.

Nói chung, người ta thừa nhận, đột biến bạch tạng ($C \rightarrow c$) có ở tất cả các động vật xương sống.

B. GEN VÀ SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN

Nghiên cứu thực nghiệm về gen đã có những bước phát triển xa.

nhưng vẫn còn nhiều vấn đề chưa sáng rõ, như :

- ý nghĩa của sự sắp xếp gen trên đường thẳng;
- cấu trúc phân tử của nhiễm sắc thể sinh vật nhân chuẩn;
- chức năng vai trò của một tỷ lệ lớn các ADN vô nghĩa, tức những ADN không tham gia mã hóa protein. Những ADN này thường được phát hiện dưới dạng các đoạn nucleotit đơn lập nhiều lần.

Hóa học của gen, các thành tựu cắt chuỗi ADN với các enzym cắt đặc thù hay còn gọi là enzym giới hạn (restriction enzyme) và nối được các đoạn cắt với nhau, đã được thực hiện thành công trên sinh vật nhân nguyên thủy.

Một lĩnh vực hấp dẫn trong hóa học gen là khả năng của kỹ thuật di truyền được tiến hành qua thao tác gen. Đối tượng của thao tác gen là chuyển những gen mong muốn từ cơ thể này sang hệ gen (genome) của cơ thể khác, tiến hành trên vi sinh vật, gần đây trên sinh vật bậc cao trong đó có động vật có xương sống.

I. CẤU TRÚC GEN

Cấu trúc một gen điển hình nói chung đều có promotor; site trong đó ARN-polymeraza hoạt động để khởi động sao mã. Đôi khi, rất xa gen (200.000 cặp bazơ), có thể thấy các đoạn -khuếch đại (sequences amplificatrices): enhance.s, hoặc các đoạn ức chế (silencers) đối với sao mã. Độ dài gen eukaryote biến đổi chủ yếu tùy theo số lượng và độ dài các intron của đoạn sao mã. Gen mã hóa chuỗi β - hemoglobin (3000 cặp bazơ bao gồm 2 intron, trong 1 polypeptide 146 Aa) là một *gen ngắn* (petit).

Gen dystrophine, một protein suy giảm trong bệnh Myopathie Duchenne, là *gen lớn nhất hiện biết*, có 2, 3. 10^6 cặp bazơ (79 exon ứng 11.000 cặp bazơ, trong 1 protein 3685 Aa) cùng các intron có 2. 10^6 cặp bazơ.

II. SAO MÃ

1. Sao mã từ các gen mã hóa protein

1. 1. Sao mã ARN thông tin (m-ARN) ở sinh vật nhân sơ

Một gen mã hóa protein (gen cấu trúc) ở prokaryota (prokaryote) có thể được chia thành 3 trình tự (sequence): ứng với chức năng của chúng

trong sao mã (h.I.4).

1. Promoter: trình tự khởi đầu sao mã là trình tự đứng kế đoạn đầu gen cho thấy sao mã bắt đầu từ đâu.

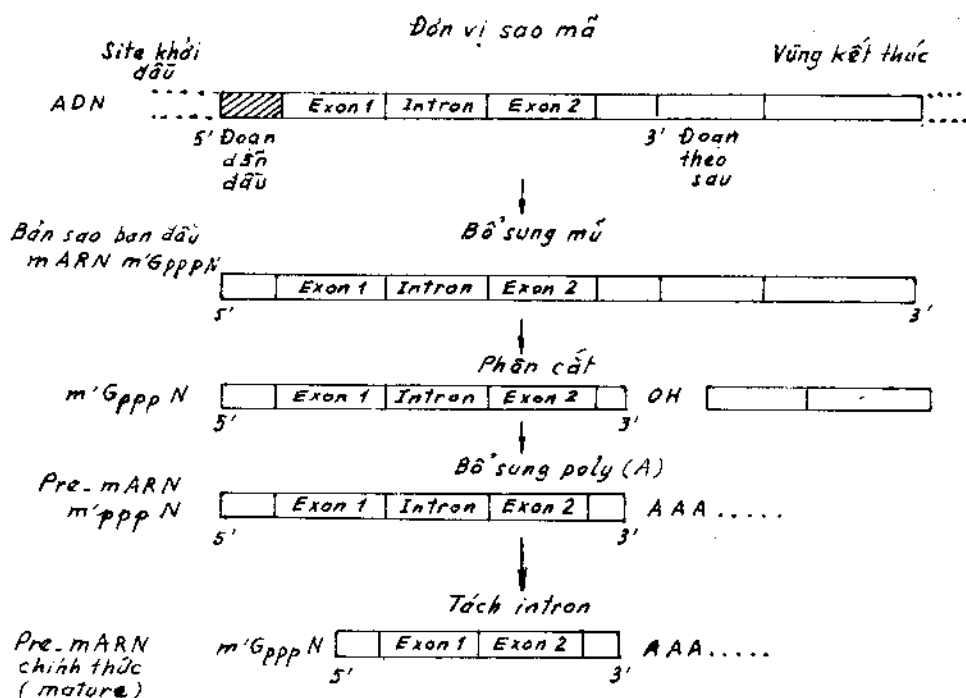
2. Trình tự mã hóa ARN, gồm các cặp bazơ được sao mã nhờ ARN polymeraza, sao thành bản sao sợi đơn *m*-ARN.

3. Terminator: trình tự kế đoạn cuối gen cho thấy điểm kết thúc sao mã.

Thông thường, promoter được xem là ngược dòng gen, terminator là xuôi dòng gen.

1. 2. Sao mã *m*-ARN ở sinh vật nhân chuẩn

Dưới đây là sơ đồ khái quát sao mã tổng hợp *m*-ARN ở sinh vật nhân chuẩn hay eukaryota (eukaryote).



Hình 1. 5. Sơ đồ khái quát sao mã tổng hợp *m*-ARN ở eukaryota.

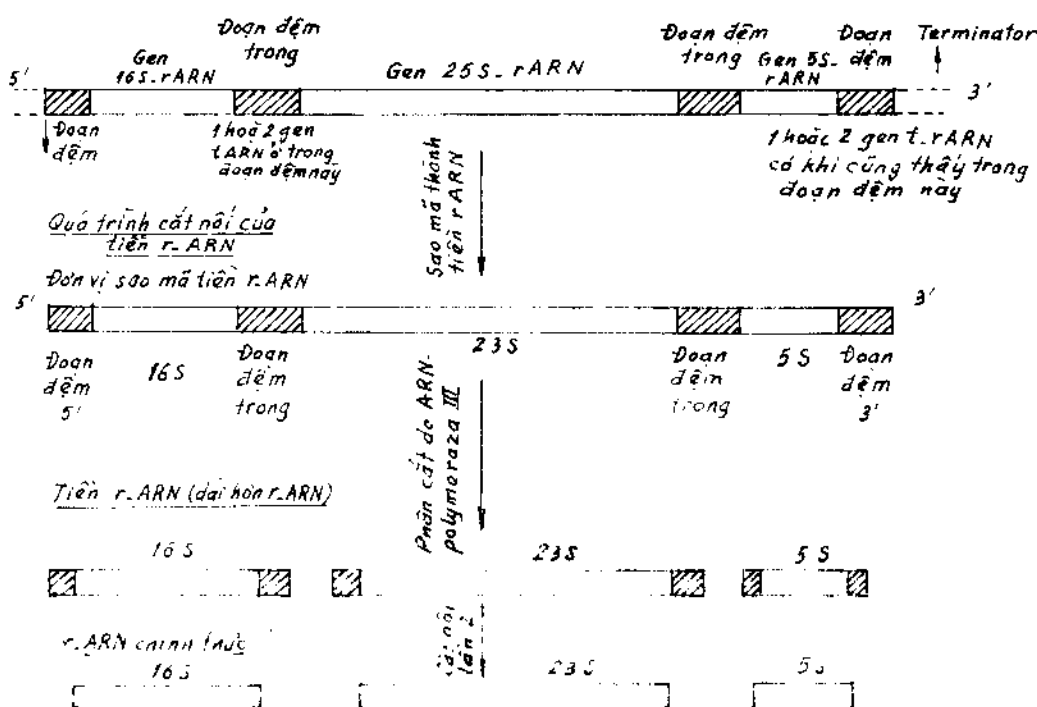
2. Sao mã các loại gen không mã hóa protein

Quá trình sao mã (transcription) được mô tả lâu nay trong các giáo trình đại cương là sự sao mã các gen cấu trúc, tức các gen mã hóa protein. Sau đây là cơ chế sao mã các loại gen khác, các gen không mã hóa protein.

2. 1. Sao mã gen *rARN* ở sinh vật nhân sơ

Ở prokaryote và eukaryote, các vùng ADN mang các gen của *rARN* được gọi là ADN ribosome. (*rADN*). Ở *E. coli*, 3 loại *rARN* có tỷ lệ bằng nhau là được tạo ra do sao mã 3 gen liên kế 16s, 23s và 5s nằm trong *rADN*, được sao thành chỉ một phân tử tiền *rARN* (pre-*rRNA*). Mỗi đơn vị sao mã *rARN* gồm một trong ba loại gen *rARN*. *E.coli* có 7 đơn vị sao mã như trên. Sau đây là cấu tạo chung của một đơn vị sao mã. Trên mỗi đơn vị sao mã, 3 gen *rARN* được xếp theo thứ tự 16s-23s-5s.

Phân tử tiền p30s (gồm cả đoạn đệm) được phân cắt bởi ARN-polymeraza III, tạo ra các phân tử tiền p 16s, p23s và p5s.



Hình 1. 6. Sơ đồ khái quát đơn vị sao mã tổng hợp *r-ARN* ở *E. coli*

Sau đó, enzym đặc thù tách các đoạn dẽm ra, để tạo thành rARN thực thụ (mature) 16s, 23s, 5s, khi tất cả gen rARN đã được sao mã, thì bản sao tiền-rARN được nhanh chóng gắn vào các protein ribosome.

Dưới đây nêu lên sơ đồ khái quát một đơn vị sao mã tổng hợp r-ARN ở vi khuẩn *E.coli* (h.I.6).

III. GEN VÀ SỰ PHÁT TRIỂN

Ở mỗi tế bào cơ thể, chỉ biểu hiện một số gen. Mỗi tế bào đảm nhận những chức năng nhất định, từ đó nó chỉ có sự hoạt hóa của những gen tác động đến trao đổi chất và đến các hoạt động của nó.

Ví dụ, chỉ những tế bào gốc, tế bào ban đầu (cellules souches) của hồng cầu (erythroblaste) mới sản sinh ra hemoglobin, vì sự biểu hiện của gen mã hóa protein này bị kìm hãm trong các tế bào khác.

Trong tuyến yên (*hypophyse*), mỗi loại tế bào sản sinh ra một loại hocmon riêng. Người ta nói, chính cơ chế điều hòa sự biểu hiện của gen bảo đảm cho sự biệt hóa (*differentiation*) tế bào. Trong thực tế, ngay từ khi sản sinh ra tế bào trứng và trong quá trình tế bào trứng phân chia, đã xảy ra sự phân hóa (biệt hóa). Bản thân trứng (tế bào trứng) ở một số loài, như ruồi dấm *Drosophila*, đã là không đồng nhất, nó đã bao gồm các vùng chứa các ARN-thông tin khác nhau, từ đó mà sản sinh ra protein khác nhau. Các lần phân bào tiếp theo vẫn còn giữ tính chất không đồng nhất ấy.

1. Sự điều hòa biểu hiện của gen

Ở eukaryote, sự điều hòa biểu hiện của gen (gene expression) được thực hiện ở các mức độ, các khâu khác nhau:

Điều hoà sao mã (transcriptional control); điều hòa qua cắt- nối ARN (RNA processing control); điều hòa dịch mã ARN (*m*-RNA translation control); điều hòa qua thoái hóa *m*-ARN (*m*-RNA degradation control); điều hòa qua thoái hóa sản phẩm protein. Cơ chế này xảy ra cả ở eukaryote đơn bào và đa bào, phức tạp hơn nhiều so với ở prokaryote, ở eukaryote, không có operon. Tuy nhiên, các gen về những chức năng, hoạt động có liên quan nhau thường được điều hòa phối hợp nhau (h.I.7).

1. 1. Điều hòa sao mã

Các gen mã hóa protein ở eukaryote có cả yếu tố khởi động (promoter elements) và gen tăng cường (enhancers). Có các loại protein đặc biệt bám vào promoter và enhancer để thúc đẩy sự khởi đầu sao mã bằng ARN polymeraza II. Yếu tố promoter nằm ở vị trí ngược chiều sao mã bắt đầu. Enhancer nằm cách một đoạn, hoặc ngược chiều hoặc xuôi chiều. Một số protein điều hòa được phát hiện ở hầu hết hoặc tất cả các loại tế bào. Một số khác chỉ được phát hiện ở một số ít loại tế bào. Một số protein điều hòa, khi bám vào enhancer hoặc promoter thì làm hoạt hóa sao mã, một số khác lại ức chế sao mã. Hiệu quả điều

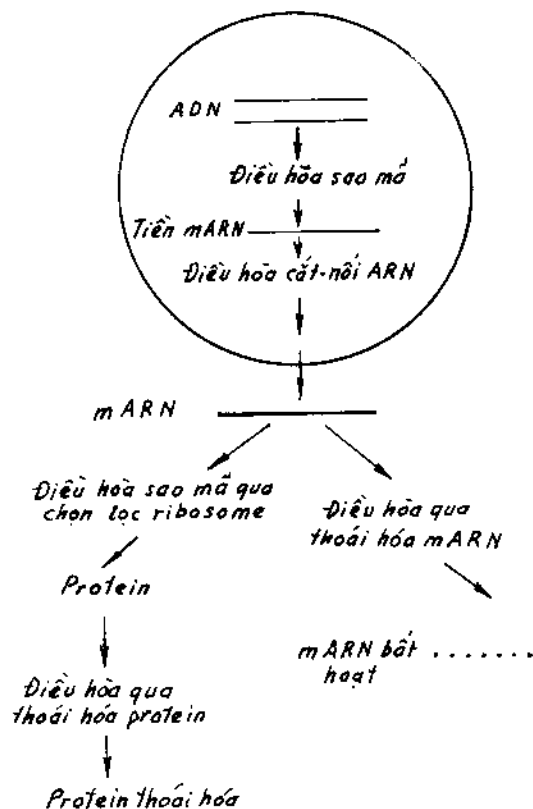
hòa phụ thuộc vào sự tổ hợp các protein bám khác nhau. Nếu có protein điều hòa dương tính bám, thì hoạt hóa sao mã. Nếu protein điều hòa âm tính bám enhancer, và protein điều hòa dương tính bám promoter, thì kết quả phụ thuộc tương tác giữa 2 loại trên. Nếu protein điều hòa âm tính tác động mạnh, thì sẽ ức chế gen.

Vì sự tổ hợp các protein điều hòa xảy ra theo nhiều kiểu khác nhau, nên sao mã cũng được điều hòa theo các dạng khác nhau, dẫn đến nhiều loại tế bào được biệt hóa.

Người ta gọi đây là sự điều hòa phối hợp của gen (*combinatorial gene regulation*).

1. 2. Điều hòa biểu hiện của gen qua cơ chế cắt - nối ARN (RNA-processing control)

Cơ chế này điều hòa sự hình thành ARN trưởng thành từ tiền ARN (precursor-RNA).



Hình 1. 7. Mô hình điều hòa.

Có 2 loại cơ chế điều hòa theo hướng nêu trên:

1. Chọn loại poly (A), tức vị trí poly (A).
2. Chọn kiểu liên kết exon.

Các hạt nhỏ ribonucleoprotein trong nhân (sn RNPs, small nuclear ribonucleoprotein particles) đóng vai trò trong quá trình phân hóa do cắt-nối này, tạo ra m-ARN khác nhau.

a. *Chọn loại poly (A)*. Vị trí đuôi poly (A) được bổ sung. Ví dụ: sự tổng hợp immunoglobulin M (IgM)

b. *Chọn kiểu kết nối exon*. Ví dụ: trong phân hóa giới tính *Drosophila*, thông tin về tỷ số $\frac{X}{A}$ được chuyển qua các gen xác định giới tính, quy định kiểu kết nối exon, thành đực hoặc cái.

1. 3. Điều hòa dịch mã

Các phân tử ARN thông tin là đối tượng của điều hòa dịch mã thông qua chọn lọc ribosom trong số các trình tự mARN (mRNA).

Sự dịch mã phân hóa (biệt hóa) có thể có tác động lớn đến biểu hiện gen. Ví dụ, mARN được tích lũy trong trứng chưa thụ tinh (không thụ tinh, unfertilized eggs). ở trạng thái này, sự tổng hợp protein xảy ra rất chậm... Nhưng, sau khi thụ tinh thì lại tăng mạnh sự tổng hợp protein.

Sự tăng cường tổng hợp nhiều protein này xảy ra không có sự tổng hợp các mARN mới, do đó có thể kết luận ở đây có sự điều hòa dịch mã. mARN tích lũy được gắn với protein, dùng để vừa bảo vệ mARN vừa kích thích dịch mã, chính đuôi poly (A) khởi động cho sự bắt đầu dịch mã.

1. 4. Điều hòa qua thoái hóa mARN

Mọi mARN đều là đối tượng trong điều hòa thoái hóa, trong đó có sự điều hòa tỷ lệ các mARN đứt gãy.

Thông thường thì cả rARN (trong ribosom) và tARN đều khá ổn định.

Ngược lại, mARN có độ ổn định rất sai khác. Một số ổn định, bền vững trong nhiều tháng, một số khác lại thoái hóa ngay sau hàng phút. Độ ổn định của từng loại ARN biến động tùy theo phản ứng với các tín

hiệu điều hòa. Ví dụ, bổ sung một phân tử điều hòa vào một loại tế bào, có thể dẫn tới tăng sự tổng hợp một loại protein hoặc nhiều protein nào đó. Điều ấy xảy ra do tăng cường sao mã của gen tạo ra loại *mARN* ổn định.

Thoái hóa *mARN* trở thành một yếu tố hàng đầu trong điều hòa biểu hiện gen.

Mức sai khác lớn trong thoái hóa *mARN* là do đặc điểm cấu trúc trong từng *mARN*, thường phụ thuộc tương tác giữa nucleaza và cấu trúc bên trong *mARN*.

Các đoạn giàu AU trong vùng không dịch mã 3' (the 3'-untranslated region UTR) của nhiều *mARN* có đời sống ngắn, là yếu tố dẫn tới tính không ổn định trong trao đổi cơ bản. Người ta chưa thật rõ vì sao đoạn giàu AU lại dẫn tới không ổn định *mARN*, nhưng có thể là chúng gây nên sự không ổn định của poly (A).

IV. SỰ BIỂU HIỆN PHÂN HÓA CỦA GEN

Ở sinh vật nhân chuẩn, trong quá trình phát sinh cá thể, từ một tế bào hợp tử, diễn ra cả quá trình phân chia tế bào và quá trình phân hóa (biệt hoá), tạo thành một cơ thể đa bào, trong đó có các tế bào, các tổ chức (mô) các cơ quan khác nhau. Mỗi loại tế bào trong mỗi loại tổ chức của cùng một cơ thể, đều có trạng thái hoạt động gen đặc trưng, ổn định, di truyền, nói cách khác, có sự biểu hiện phân hóa khác nhau của gen.

Tế bào gan, qua bao lần phân bào, vẫn là tế bào gan. Tế bào thần kinh ở động vật có xương sống xuất hiện từ giai đoạn phát triển phôi sớm, được giữ nguyên như không đổi suốt đời.

Các tế bào trong một cơ thể phân hóa khác nhau, không phải do có thông tin di truyền khác nhau, mà là do có sự biểu hiện khác nhau từ cùng một thông tin di truyền, dẫn đến các chức năng, hoạt động khác nhau trong các tổ chức (mô) được tổng hợp một loại protein đặc thù khác nhau.

Mỗi loại tế bào phân hóa có sản phẩm protein đặc trưng, khác nhau, do sự biểu hiện khác nhau của gen, của cùng một genom. Hồng cầu máu có hemoglobin, tuy có enzym proteaza, tế bào thần kinh, tế bào cơ đều có protein khác nhau.

Trong sự biểu hiện phân hóa của gen (differential gene expression), có sự sao mã phân hóa. Mỗi loại tế bào trong mỗi tổ chức có sự sai khác trong sao mã, tùy theo giai đoạn phát triển cá thể; loại tổ chức (mô); vị trí trong cơ thể; điều kiện sinh lý.

Người ta cũng đã chứng minh được cơ chế điều khiển (kiểm soát) sao mã phân hóa, sự sao mã trong cả quá trình phát triển cá thể. Sự phân hóa trong sao mã phụ thuộc: vùng điều hòa, các đoạn ADN điều hòa, gắn với các vùng sao mã của gen; các đoạn nói trên, tác động với protein điều hòa, dẫn tới kích thích hoặc kìm hãm sao mã.

Một số protein điều hòa được tổng hợp, giải mã từ *m*-ARN và các gen hoạt hóa trong một số vùng của phôi đang phát triển. Một số protein điều hòa khác lại được tổng hợp từ *m*-ARN của hợp tử.

Người ta đã phát hiện trứng - noãn ở một số loài như ruồi dấm, bản thân nó cũng không đồng nhất, chứa các vùng mang các *m*-ARN và protein khác nhau các lần phân bào liên tiếp diễn ra trong đó cũng có sự không đồng nhất (heterogenous).

Nhiều gen chỉ sao mã trong một số vùng nhất định của phôi, trong các cơ quan đặc thù hoặc ở những giai đoạn nhất định của quá trình phát triển. Một số *m*-ARN chỉ thấy trong gan, không có trong thận, tuy. Trong phôi, một số *m*-ARN chỉ có ở giai đoạn phôi vị (gastrula) mà không thấy ở các giai đoạn khác trong quá trình phát triển.

Người ta đã có thực nghiệm chứng minh với enzym giới hạn Bam H₁ đã xác định được 2 gen globin ở gà con: gen β_1 - globin, được sao mã trong tế bào máu phôi 5 ngày; gen β_2 - globin, được sao mã trong tế bào máu của phôi 14 ngày.

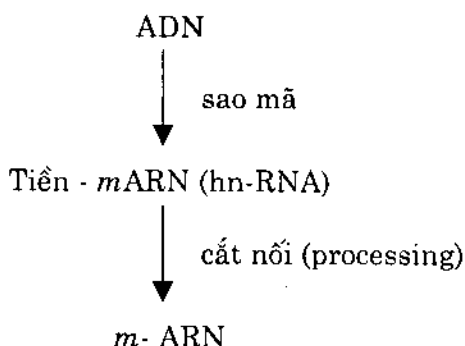
1. Sự sao mã tạo ra tiền *m*ARN

Bản sao ban đầu của ADN trong nhân, cũng bao gồm cả exon và intron, chính là tiền *m*ARN (tiền chất *m*ARN-precursor of *m*RNA) hoặc còn được gọi là ARN không đồng nhất trong nhân (hnARN, heterogeneous nuclear RNA), có chiều dài rất đa dạng, biến động từ 50- 5000 nucleotid khi hình thành *m*-ARN.

Do quá trình cắt- nối, các intron bị thoái hóa, chỉ còn lại các exon, nên tiền *m*ARN này trong nhân có chiều dài gấp hàng 10- 100 lần chiều dài *m*-ARN trong tế bào chất.

Loại hn-ARN hiện chỉ được phát hiện trong tế bào sinh vật nhân chuẩn. Loại này chỉ có trong nhân, được hình thành và thay thế nhanh chóng, chuyển thành *m*-ARN trong tế bào chất qua quá trình cắt nối (sơ đồ).

Hn - ARN chính là nguồn để hình thành *m*-ARN. Nói chung, đến 90% thành phần của hn-ARN bị thoái hóa qua quá trình cắt- nối sau sao mã, chỉ còn lại khoảng 10% là được chuyển thành *m*-ARN trong tế bào chất.



2. Sao mã phân hóa và gen phân đoạn

2. 1. Exon, intron và sao mã phân hoá

2. 1. 1 Cấu trúc exon-intron của gen ở sinh vật nhân chuẩn. Nhiều gen của sinh vật nhân chuẩn và của một số sinh vật nhân nguyên thủy, mang các đoạn không mã hóa (*noncoding sequences*), gọi là intron hoặc còn gọi là đoạn xen (*intervening sequences*), xen giữa và làm gián đoạn mã hóa (*coding sequences*), được gọi là exon.

Gen, bao gồm cả exon và intron, được sao mã tổng hợp ra tiền-*m*ARN trong nhân tế bào. Từ tiền- *m*ARN này trong nhân, thông qua quá trình cắt- nối sau sao mã (RNA-processing hoặc pre-*m*RNA processing), sẽ hình thành *m*-ARN tế bào chất, có hoạt tính. Loại gen này, có cấu trúc gồm exon và intron, được gọi là loại gen phân đoạn (*split gen*), có trình tự mã hóa không liên tục còn gọi là loại gen khảm (*mosaic gene*). Cho đến nay người ta cũng chưa hiểu thật rõ về chức năng của các intron, cũng như về lý do vì sao các loại gen này bị gián đoạn, không liên tục.

Người ta giả thiết là intron có vai trò như các khoảng trống xen

giữa các exon, tạo thuận lợi cho sự tái tổ hợp giữa các exon. Người ta cũng thấy, không phải tất cả mọi gen ở sinh vật nhân chuẩn đều mang intron. Ví dụ, gen histon nhím biển và 4 gen sốc nhiệt ở *Drosophila* là những gen đầu tiên được phát hiện là không mang intron. Sau đó nhiều gen ở động vật bậc cao và thực vật bậc cao cũng được phát hiện là không mang intron. Có ít nhất 4 loại intron, một loại trong đó thuộc lớp GU-AG.

Thí nghiệm của Pierre Chambon phát hiện cấu trúc exon- intron của gen ovalbumin gà. Pierre Chambon (Pháp) là một trong những người đầu tiên phát hiện các đoạn ADN dư thừa, ngày nay gọi là intron, qua nghiên cứu sự điều hòa di truyền trong sinh tổng hợp ovalbumin gà.

Ovalbumin là protein lòng trắng trứng, gồm một chuỗi 386 axit amin, được tổng hợp trong các tế bào đặc biệt của ống dẫn trứng của gà mái thời kỳ đẻ trứng. Sự điều hòa này đặc biệt quan trọng, tác động lên hoạt động hocmon gà mái.

Sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp, người ta tách *m*-ARN của ovalbumin từ tế bào ống dẫn trứng. Khi gà mái đẻ, *m*-ARN của ovalbumin chiếm hơn 50% ARN trong các tế bào này.

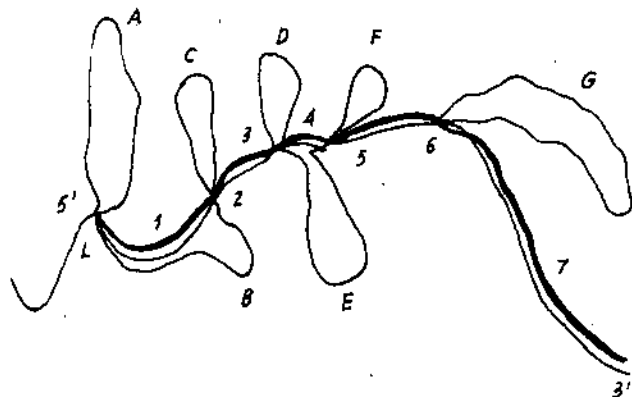
Sử dụng enzym sao ngược, người ta đã tạo được các bản sao ADN phóng xạ của *m*-ARN ovalbumin. Người ta đã phát hiện là các phân tử *m*-ARN đầu tiên *trông nhân*, được sao mã từ gen ovalbumin, là những phân tử lớn hơn *m*-ARN tế bào chất.

So sánh ADN *trong nhân* và ADN phóng xạ tạo ra từ *m*-ARN tế bào chất, Chambon thấy có các đoạn nucleotid dài có mặt trong ADN nhân và trong *m*ARN được sao mã đầu tiên trong nhân, lại không thấy trong *m*-ARN tách từ tế bào chất. Các đoạn nucleotid dài nói trên không mã hóa, làm gián đoạn mã hóa trên ADN. Từ thực nghiệm trên, Chambon đã chứng minh là gen ovalbumin gà mang 7 đoạn xen được gọi là 7 intron, xen kẽ với 8 đoạn mã hóa, được gọi là 8 exon. Các nghiên cứu tiếp sau đã chứng minh có các intron trong nhiều gen của các sinh vật nhân chuẩn khác.

Gen albumin huyết thanh chuột 13 intron. Gen α -2 collagen gà mang 50 intron, có 38.000 bp nhưng sao mã và qua quá trình cắt- nối sau sao mã, cho ra *m*-ARN chỉ dài khoảng 5000 nucleotid người ta đã thu được ảnh chụp qua kính hiển vi điện tử các sao mã của gen ovalbumin gà sau khi cho lai với *m*-ARN ovalbumin trong tế bào chất.

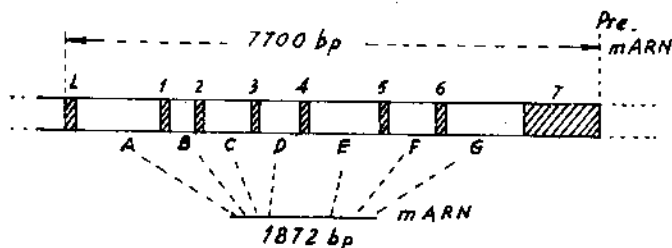
Sơ đồ cho thấy chỉ các đoạn nhỏ của ADN genom được lai với *m*-ARN, từ đây được giải mã thành protein ovalbumin. Đây là các exon.

Giữa các exon, có các đoạn ADN lớn, gọi là *intron*, không có đoạn lai *m*-ARN (h.1.8).



Hình 1. 8. Sơ đồ ADN genom lai với *m*-ARN.

Bản sao ban đầu của gen ovalbumin được gọi là tiền *m*-ARN tức pre *m*ARN, có 7700 bp, chứa cả exon và intron.



8 exon : L và 1-7
7 intron : A-G

m-ARN được cắt- nối sau sao mã (processed) tức pre-*m*ARN này chỉ còn lại các exon, dài 1872bp (h.1.9).

Hình 1. 9. Sơ đồ *m*-ARN cắt nối sau sao mã.

2. 2. Cắt- nối sau sao mã (RNA - processing)

Quá trình cắt- nối (processing) để chuyển từ tiền *m*-ARN thành *m*-ARN bao gồm các khâu:

- Gắn với protein tạo thành các hạt *m*RNP (ribonucleoprotein).
- Gắn thêm mũ 7- methylguanylate vào 5'
- Gắn đuôi poly (A) vào 3' (gắn mũ và thêm đuôi polyadenylation có tác dụng bảo vệ *m*ARN khỏi bị các ribonucleaza phân giải nhanh chóng).
- Cắt intron và kết nối các exon. Hầu hết các khâu của quá trình

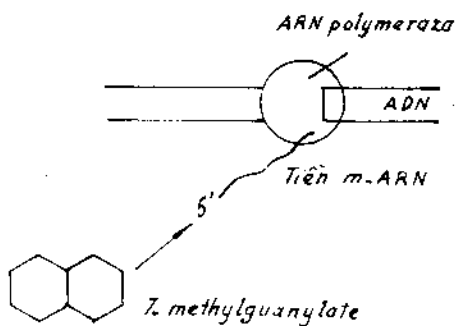
nêu trên đều là các cơ chế cho sự biểu hiện phân hóa của gen.

Các quá trình điều hòa nêu trên cho phép các tế bào có thể hình thành 2 hoặc nhiều các *mARN* khác nhau từ cùng 1 tiền *mARN*, gọi chung là kiểu kết nối khác nhau. Kiểu kết nối khác nhau này kiểm tra sự biểu hiện của gen ở nhiều loài sinh vật, qua các giai đoạn phát triển cá thể nói cách khác, là kiểm tra sự phát triển cá thể (control of development by alternative splicing) kiểu kết nối khác nhau thường tạo ra các *mARN* với các vùng giải mã khác nhau, từ đó mà hình thành các loại protein khác nhau. Tuy nhiên một số *mARN* được kết nối khác nhau.

- **Gắn với các protein.** Tiền *m-ARN* ở eukaryote, sau khi hình thành, được gắn với các protein, tạo thành một chuỗi các hạt sát nhau, đường kính khoảng 20nm, gọi là ribonucleoprotein không đồng nhất của nhân hoặc là *ribonucleosome*. Mỗi ribonucleosome gồm khoảng 700 nucleotid của ARN quấn quanh các hạt protein (Beyer và Osheim, 1990).

Kiểu sắp xếp này tương tự như kiểu sắp xếp của ADN trong nucleosome (ADN quấn quanh octamer histon). Chức năng của ribonucleosome đến nay vẫn chưa thật rõ. Có thể cho rằng, chúng giữ cho sợi đơn ARN mới sinh không thể có hiện tượng lai giữa các sợi.

- **Gắn mũ (hoặc chóp, cap).** Sau khi phân tử tiền *m-ARN* được tổng hợp, đầu 5' của nó được kéo dài, nối, gắn thêm một cái mũ, do tác động enzym. Đây là 7- methylguanozin triphosphat (7- methylguanylate). Cụ thể là 7m G₃PPP. Ở đây có sự methyl hóa (methylation), gắn thêm 1 hay nhiều nhóm methyl (-CH₃) vào bazơ hoặc thành phần đường của nucleoside. Ví dụ, guanosine vào 7- methylguanosine. Guanin được methyl hóa ở vị trí 7 và C₅ của riboza gắn với 3 gốc photphat (h.1.10).



Hình 1. 10.

- **Chức năng của mũ.** Nucleotid ở đầu có cấu trúc đặc biệt, làm tăng khả năng kết hợp *m-ARN* với riboxom.

Mũ bảo vệ cho bản sao tiền *m*-ARN khỏi bị các nucleaza phân giải, ở đầu 5' không được bảo vệ.

Sau khi được cắt- nối (processing), *m*ARN đi vào tế bào chất, mũ còn làm nhiệm vụ khởi động cho sự giải mã của nhiều phân tử *m*ARN. Mũ (chóp) vẫn được giữ lại ở *m*ARN trưởng thành.

• **Gắn (bổ sung) đuôi poly (A) ở đầu 3' (polyadenylation).** Đầu 3' của phần lớn các tiền *m*-ARN không phải chỉ đơn giản là được hình thành bởi vùng sao mã.

Tiền *m*-ARN được cắt bởi endonucleaza (phức hợp enzym), tại một đoạn nucleotid đặc thù, gọi là tín hiệu polyadenylation, tín hiệu này ở động vật có vú gồm AAUAAA và một đoạn GU (h.1.11).

Chức năng đuôi poly (A) :

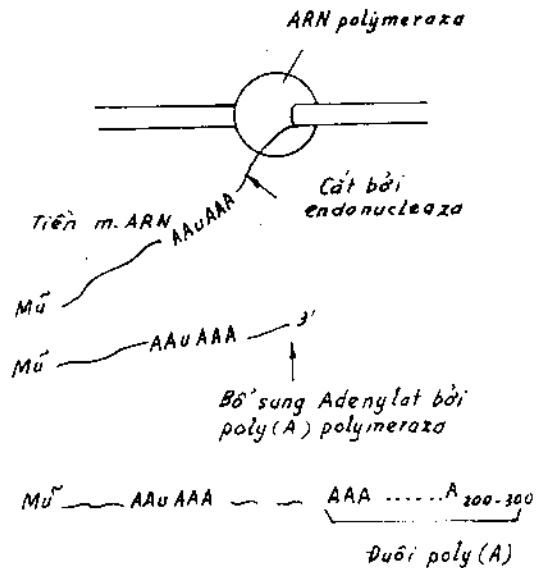
- Đuôi poly (A) : 100- 300 nucleotid adenin.

- Hiện tượng polyadenylation của *m*-ARN là một quá trình động học, được tiếp tục sau khi *m*ARN đi ra tế bào chất và giữ vai trò quan trọng trong điều hòa giải mã, bảo vệ và điều hòa hoạt động sao mã. Đối với phần lớn *m*ARN, đuôi poly (A) cũng cần cho sự di chuyển qua lại giữa nhân và tế bào chất và để bảo vệ chống bị enzym phân giải được bổ sung vào đầu 3' của hầu hết *m*ARN nhân chuẩn sau sao mã.

2. 3. Cắt intron

Mỗi intron có đầu 5' gọi là splice donor site và đầu 3' gọi là splice acceptor site, ở 1 loại intron, ở mỗi đầu, có đoạn 2 nucleotid (dinucleotid) rất ổn định được gọi là đoạn chuẩn (consensus sequence).

5' GU AG 3'. Đây là loại intron GU- AG (trong ADN là GT-AG)



Hình 1. 11. Sơ đồ tiền *m*-ARN cắt bởi endonucleaza ở động vật có vú.

Mỗi intron bao gồm 102 - 104 nucleotid. Các đoạn chuẩn này rất giống nhau trong các intron của động vật có xương sống và của các sinh vật. Nói cách khác, các dinucleotid GU và AG ở những site này gần như không đổi (trong pre- *mRNA*) ở một số ARN nhân nhỏ (sn- ARN, small nuclear RNA), trong thành phần enzym cắt- nối có các trình tự dinucleotid bổ sung, tương ứng với các đoạn chuẩn trong intron.

Enzym cắt- nối kết hợp với sn- ARN, tạo ra phức hợp sn-RNP (ribonucleotid protein nhân nhỏ). Một sn RNP bám vào đầu 5' (splice donor site), sn-RNP kia bám vào một điểm nhánh (branchpoint sequence) *gần đầu 3'* (splice acceptor site).

Cả 2 sn-RNP này, cùng với các snRNP khác và các protein điều hòa, hợp thành phức hợp RNP, gọi là *spliceosome*.

Spliceosome tách intron ở đầu 5' (donor site) và nối đầu tự do kia (đầu 3') của intron vào điểm nhánh. Kết quả là intron được bẻ cong thành hình thông lọng (lariat formation).

Cuối cùng, intron được *tách ra từ đầu 3'* (acceptor site) và hai exon liền kề với intron trên sẽ được nối nhau.

Nói cách khác, snRNP đã gắn đầu 5' và đầu 3' của một intron và tách intron ra hay còn gọi là cắt intron (intron removal).

Intron bị cắt ra sẽ thoái hóa. Người ta đã chụp được qua kính hiển vi điện tử, các spliceosome, tách bằng sắc kí cột, cố định với glutaraldehyd.

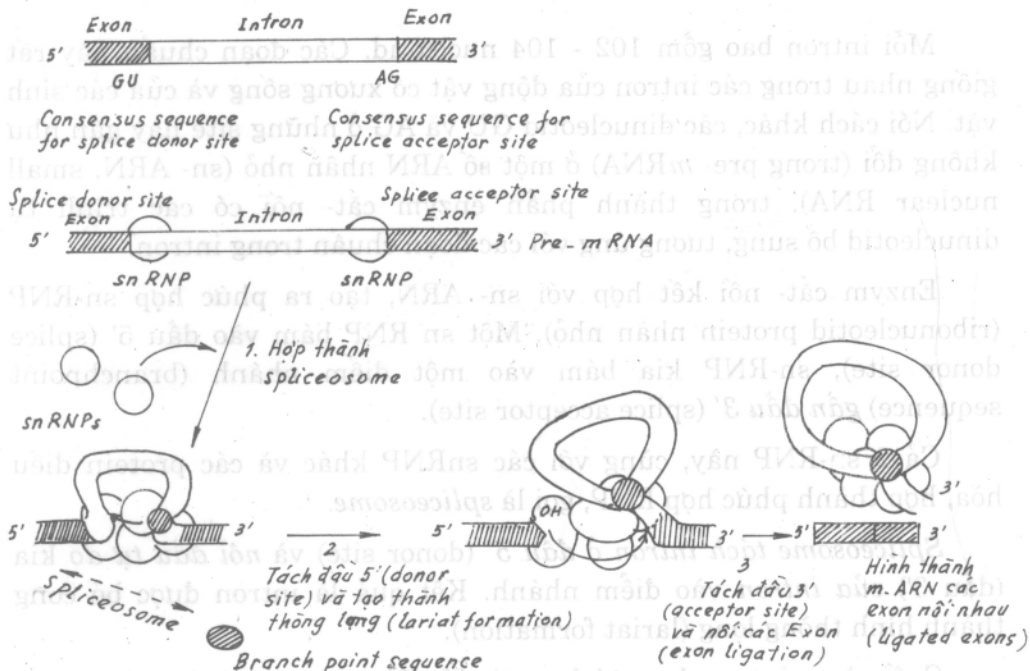
2. 4. Nối các exon

Các exon liền kề nhau (tức nằm 2 đầu của intron cắt ra) được nối nhau, và theo cơ chế này, hình thành *m-ARN* (chỉ gồm exon mà thôi) từ tiền- *mARN* (pre-*mRNA*).

Các exon được nối nhau với độ chính xác cao, bởi vì chỉ cần mất hoặc thêm nucleotid sẽ dẫn đến thay đổi khung đọc (reading frame) các bộ ba 3 nucleotid trong *m-ARN* (h.I.12).

2. 5. Khái quát sao mã ở eukaryota và cắt- nối sau sao mã (eukaryote gene transcription and RNA- processing)

Vùng giải mã (transcribed region) trải dài từ điểm khởi đầu sao mã (transcription startpoint), xuôi dòng theo sau promotor (P), cho đến



Hình 1. 12. Cơ chế cắt intron nối exon

điểm kết thúc sao mã (transcription endpoint).

Pre- *m*ARN có mũ (cap) ở đầu 5' và được tách ra phía sau tín hiệu polyadenylation, từ đó đầu 3' được kéo ra gắn thêm đuôi poly (A). Các intron A, B được tách ra và các exon 1, 2, 3 được nối nhau.

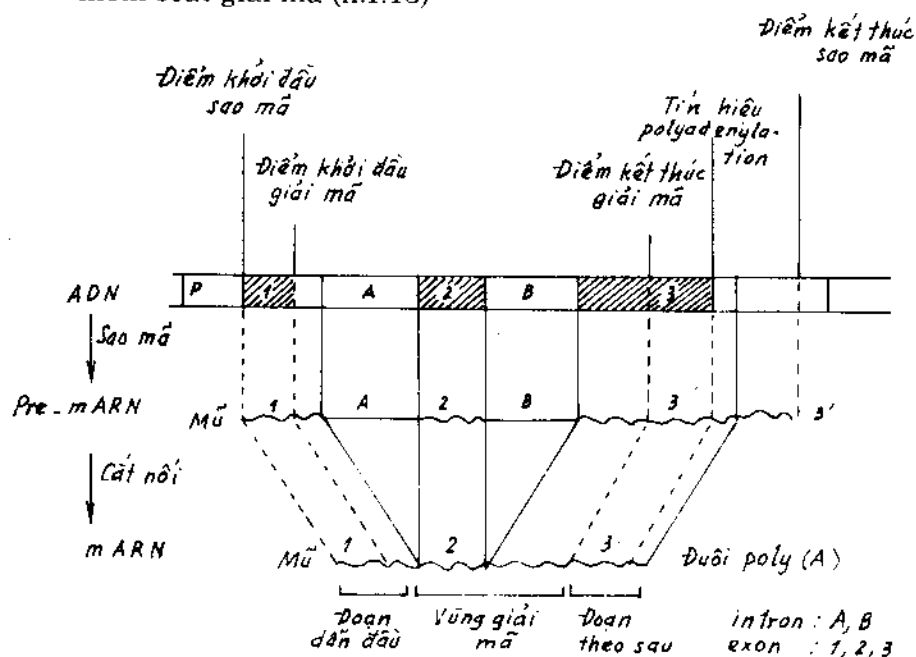
Vùng giải mã của *m*ARN trải dài từ điểm khởi đầu giải mã (translation initiation site) cho đến điểm kết thúc giải mã (translation termination site). Giữa mũ (cap) và điểm khởi đầu giải mã có một đoạn ARN không giải mã gọi là đoạn dẫn đầu (leader sequence). Cũng như thế, có một đoạn theo sau không giải mã nằm giữa điểm kết thúc giải mã và phần đầu của đuôi poly (A).

Như vậy, sau cắt nối, *m*ARN được hình thành, bao gồm:

- một mũ
- vùng dẫn đầu 5' không giải mã
- vùng giải mã (translated region or coding region)
- vùng theo sau 3' không giải mã
- đuôi poly (A)

Đoạn dẫn đầu và đoạn theo sau có một số chức năng:

- định khu *mARN* (localisation)
- điều hòa
- kiểm soát giải mã (h.I.13)



Hình I. 13. Mô hình khái quát sao mã ở eukaryota và cắt - nối sau sao mã.

2. 6. Gen calcitonin/ neuropeptide và sao mã phân hóa

Người ta đã phát hiện ở chuột gen mã hóa cho 2 protein khác nhau ở 2 loại tổ chức, calcitonin ở tuyến cận giáp và neuropeptide ở não.

Hormon calcitonin được tổng hợp trong tuyến cận giáp (parathyroid glands), có chức năng điều hòa calcium và cả photpho trong máu.

Neuropeptide, cũng được mã hóa, tổng hợp từ cùng 1 gen với calcitonin, nhưng lại là protein có trong các neuron não và trong tuyến dưới đồi thị (pituitary gland), có chức năng môi giới thần kinh (neuromediator). Hai loại protein nêu trên được giải mã từ hai loại *mARN* khác nhau, nhưng được hình thành từ cùng 1 loại tiền- *mARN*, kết quả của quá trình cắt- nối sau sao mã (processing), trong đó có 2 cơ

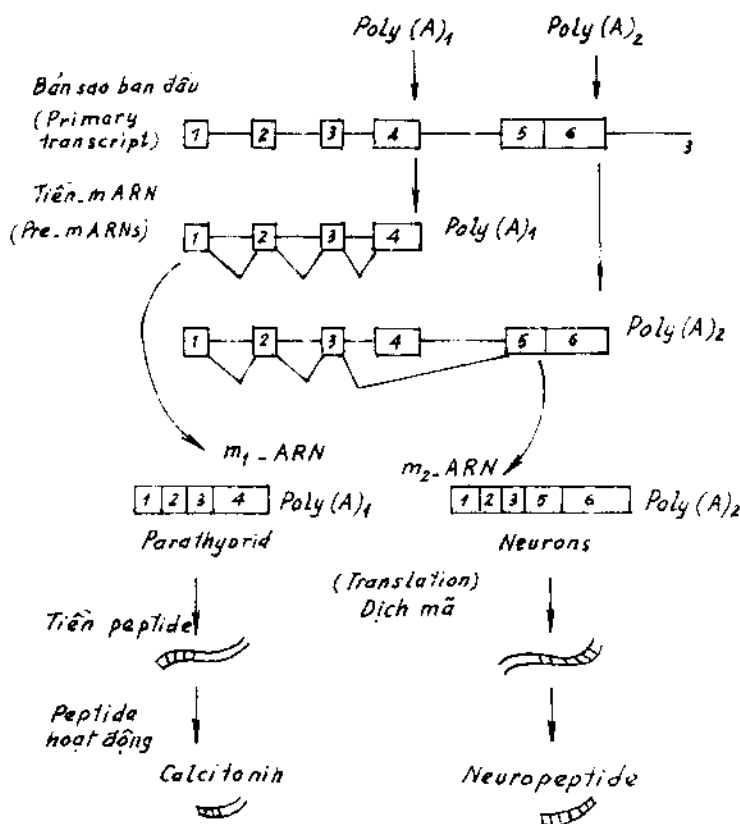
chế quyết định : bổ sung đuôi poly (A) vào 3'-OH (poly adenylation) và kết nối xen kẽ (alternative splicing).

Gen calcitonin/ neuropeptide, cũng như tiền- *m*ARN sao mã từ gen này, gồm 6 exon và 2 đuôi poly (A) 3exon đầu (1, 2 và 3) được sử dụng như nhau trong hai loại tổ chức, tuyến cận giáp và neuron. Tuyến cận giáp sử dụng đuôi poly (A)₁ nằm trong exon 4 và liên kết exon 1 với 2, với 3 và 4.

Neuron sử dụng đuôi poly (A)₂ nằm trong exon 6, và liên kết exon 1, với 2, với 3 và với 5, 6.

Sự bổ sung đuôi poly (A) khác nhau và sự kết nối exon theo cách khác nhau từ cùng 1 tiền- *m*ARN đã dẫn đến tạo thành 2 loại *m*-ARN khác nhau, *m*₁-ARN calcitonin trong tuyến cận giáp và *m*₂-ARN neuropeptid trong neuron (h.I.14).

Phát hiện thực nghiệm về gen calcitonin/ neuropeptid làm rõ cơ chế sao mã phân hóa. Rõ ràng có sự phân hóa trong sao mã, hình thành 2 loại *m*-ARN từ cùng 1 loại gen, dẫn đến tổng hợp ra 2 loại protein khác nhau trong 2 loại tổ chức của cơ thể.



Hình I. 14. Hai kiểu nối exon ở gen calcitonin/ neuropeptid

3. Các kiểu kết nối khác nhau của exon

3.1. Sự chi phối phát triển giới tính ở *Drosophila*

3.1.1. Tỷ số X : A. Hầu hết các loài động vật đều có cơ chế di truyền quy định giới tính. Ở ruồi dấm và động vật có vú, con cái có XX và 2A trong tế bào lưỡng bội. Con đực có XY và 2A.

Người ta có thể hiểu nhầm về sự tương ứng này ở động vật có vú và ruồi dấm.

Ở động vật có vú sự có mặt gen trên Y sẽ quy định phát triển thành con đực hay con cái.

Ở ruồi dấm *Drosophila*, nhiễm sắc thể Y chỉ có vai trò thứ yếu. Y ở ruồi dấm chỉ chứa một vài gen và không tham gia gì vào xác định được giới tính. Dấu hiệu chủ yếu quy định ở ruồi dấm là tỷ số X:A, tức số lượng X so với A trong tế bào lưỡng bội.

Cá thể ruồi dấm có 1X và 2A, sẽ có tỷ số X:A = 0,5 và là con đực.

Cá thể có 2X và 2A sẽ có tỷ số X:A = 1 và là ruồi cái.

Tỷ số X:A được xác định qua sản phẩm của 2 gen liên kết X, *sisterless-a+* và *sisterless-b+* (J.W Erickson và T. W. Cline, 1993). Càng có nhiều X thì sản phẩm của *sisterless* càng lớn.

Một hệ thống các gen điều hòa truyền dấu hiệu về tỷ số X:A sang một loạt các gen *realizator* (hoặc gen *effector*), kiểm tra sự phân hóa giới tính ở ruồi dấm *Drosophila* và dẫn tới hình thành hoặc trứng hoặc tinh trùng.

Tỷ số X:A dẫn tới sự phát triển các tính trạng giới tính soma ở *Drosophila*, như: cơ quan sinh dục; hình thái phần cuối bụng (con đực đen đều, con cái có ngấn); gai giới tính ở chân trước con đực.

Các gen điều hòa chủ yếu: *sexlethal+* gene; *transformer+* gen; *doublesex+* gene (Baker, 1989).

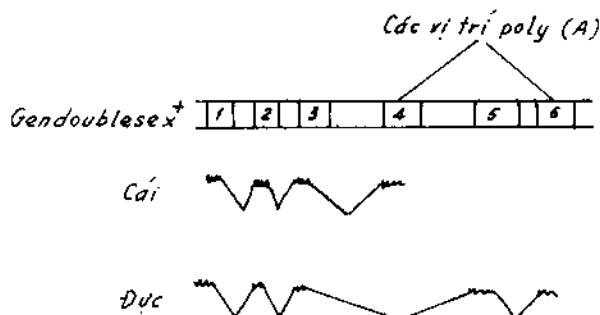
Các gen này hợp thành một hệ thống điều hòa, trong đó protein được mã hóa bởi từng gen sẽ quy định kiểu kết nối exon của tiền *m*-ARN. Bản sao ban đầu (tiền *m*-ARN) của các gen nêu trên là giống nhau giữa con đực và con cái.

3.1.2. Gen *doublesex+*. Phân tích phân tử (molecular analysis) đã cho thấy, gen *doublesex+* mã hóa 2 loại *m*-ARN.

- Một loại *m*-ARN đặc thù ở con cái, ức chế hướng phát triển đực *m*-ARN mà hoạt động kém thì hình thành các ruồi cái đột biến, và dẫn tới trung gian tính, vừa có cả cơ quan sinh dục đực và cái, kèm các tính trạng giới tính thứ cấp.

- Loại *m*-ARN kia đặc thù ở con đực, thì ức chế hướng phát triển cái *m*-ARN này hoạt động kém sẽ tạo ra con đực đột biến và dẫn tới trung gian tính.

Hai loại *m*-ARN nêu trên đều được hình thành do kiểu kết nối khác nhau (alternative splicing), với các dấu hiệu poly (A) khác nhau (h.I.15).



Hình I. 15. Hai kiểu kết nối exon quy định giới tính *Drosophila*

m-ARN con cái: do kết nối exon 1, 2, 3, 4

m-ARN con đực: do kết nối exon 1, 2, 3, 5, 6

C. DI TRUYỀN GIỚI TÍNH ĐỘNG VẬT

I. THỰC NGHIỆM LỊCH SỬ XÁC ĐỊNH GEN NẴM TRÊN NHIỄM SẮC THỂ GIỚI TÍNH

Đầu thế kỷ XX, với tế bào học và di truyền tế bào, các nhà khoa học đã làm rõ cơ sở tế bào học của hiện tượng di truyền, phát hiện cơ chế tế bào học, gián phân, giảm phân, thấy rõ bộ nhiễm sắc thể các loài, trong đó phát hiện ra các nhiễm sắc thể giới tính, phân biệt đực, cái qua X và Y.

Thí nghiệm của Thomas Hunt Morgan, 1910, lai thuận và lai nghịch ruồi dấm mắt đỏ và ruồi dấm mắt trắng, đã là cơ sở thực nghiệm đầu tiên chứng minh gen nằm trên nhiễm sắc thể. Ruồi bố và ruồi mẹ khác nhau về nhiễm sắc thể giới tính, XY và XX. Qua lai thuận và lai nghịch, màu mắt của ruồi con F_1 khác nhau, tùy thuộc ruồi mắt trắng là bố hay mẹ. Nếu bố thuộc mắt trắng thì ruồi con F_1 toàn đỏ. Nếu mẹ là

mắt trắng, bố mắt đỏ, thì ruồi con F_1 lại không như trên, con đực có mắt trắng và con cái có mắt đỏ.

Sai khác về màu mắt của ruồi con F_1 gắn liền với sai khác trong ruồi mắt trắng dùng làm bố mẹ, tức gắn với sai khác về nhiễm sắc thể giới tính ở bố, mẹ. Sự kiện trên chứng minh rõ ràng, màu sắc mắt do gen nằm trên nhiễm sắc thể quy định, ở đây là trên nhiễm sắc thể X theo đúng sơ đồ lai.

Lai thuận	Mẹ x Bố	Lai nghịch	Bố x Mẹ
	WW w		W ww
	Đỏ Trắng		Đỏ Trắng
F_1	Ww W	Đực- w	Cái- Ww
	Đỏ Đỏ	Trắng	Đỏ

II. GIỚI TÍNH Ở ĐỘNG VẬT

Khái niệm về *nhiễm sắc thể giới tính* do Morgan phát hiện đầu tiên. Nhiễm sắc thể giới tính khác với nhiễm sắc thể thường không chỉ về mặt bản chất di truyền mà còn cả về mặt tế bào học. Nhiễm sắc thể giới tính thường xếp thành cặp nếu số lượng trong bộ nhiễm sắc thể của loài là chẵn (XX, XY v. v...) và chỉ là một chiếc lẻ nếu số lượng nhiễm sắc thể của loài là lẻ (XO, v. v...)

Giới tính cũng như các tính trạng di truyền khác trong cơ thể sinh vật, được quy định bởi nhiều gen, nằm trên nhiễm sắc thể giới tính cũng như trên nhiễm sắc thể thường, và sự phân ly giới tính được tiến hành có chịu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường. Ở một số ít loài, giới tính được xác định trước thụ tinh, từ trong sự phân hóa của các loại trứng. Ở một số loài khác, người ta thấy, trong quá trình phát triển cá thể sinh vật, lúc hợp tử mới hình thành và phát triển, chưa có sự phân hóa rõ rệt đực, cái, do đó có khả năng làm thay đổi được hướng phân ly đực, cái, thậm chí có thể làm biến đổi tỷ lệ đực cái khi sinh. Khả năng điều khiển tính đực cái trong quá trình phát triển cá thể cũng như khả năng làm biến đổi tỷ lệ đực, cái có tầm quan trọng lớn về mặt thực tiễn, đã được ứng dụng rộng rãi trong chăn nuôi.

1. Cơ chế nhiễm sắc thể xác định giới tính

Thuyết di truyền nhiễm sắc thể ra đời đã làm rõ bản chất hiện tượng di truyền giới tính, phát hiện được cơ chế bên trong quyết định giới tính và giải thích được một vấn đề quan trọng bậc nhất trong sinh học là hiện tượng, trong tự nhiên tỷ lệ đực cái nói chung đều theo tỷ lệ 1:1.

Nhìn chung trong các loài động vật, nhiễm sắc thể giới tính có hai dạng.

- Dạng XX - XY: ở ruồi dấm, người, động vật có vú và một số động vật khác.

- Dạng XX - XO: ở chim, bướm v. v...

Thuyết nhiễm sắc thể về cơ chế xác định tính đực, cái ở sinh vật cho rằng gen điều khiển sự phát triển tính đực, cái là nằm trong nhiễm sắc thể giới tính. Cơ chế phân ly và tổ hợp các nhiễm sắc thể giới tính là cơ sở tế bào học của sự hình thành tính đực, cái. Do cơ chế sinh học khách quan này, bất kỳ dạng nào của các loài động vật khác nhau, tạo ra thế hệ sau đều theo tỷ lệ đực, cái xấp xỉ 1:1.

Người ta thường nêu bằng chứng về cơ chế nhiễm sắc thể xác định giới tính qua các dạng đực, cái lẫn lộn và dạng giới tính trung gian, phát hiện ở ruồi dấm và một số sinh vật khác. Ở đây cơ thể được xem như một thể khảm có cả tính đực và tính cái.

Để nghiên cứu hiện tượng này, người ta sử dụng phương pháp đánh dấu một số gen lặn nằm trên nhiễm sắc thể giới tính.

Một dạng đực cái lẫn lộn đã được phát hiện ở gà Plimut. Trên một cơ thể gà plimut có vân, thuần chủng, màu lông nửa bên phải cơ thể sáng hơn nửa bên trái, ứng với dạng đồng hợp thể về gen màu lông vân (BB) ở bên phải và dạng bán dị hợp thể ở bên trái (B-)

Về kích thước, phần bên phải vượt phần bên trái theo mức như gà trống (XX) vượt gà mái (XY) về sinh trưởng.

Ở phía bên phải, phát triển hơn, có tinh hoàn, ống dẫn tinh. Còn ở phía bên trái, kém phát triển hơn có buồng trứng, ống dẫn trứng và ống dẫn tinh không hoàn chỉnh.

Về cơ chế, đây là hiện tượng ở giai đoạn đầu của sự phát triển, cá thể này phát triển theo hướng đực (XX), sau đó tiêu biến đi một X, kéo

theo đó là cả gen lông màu có vân. Hiện tượng này xảy ra ở giai đoạn phát triển rất sớm, dẫn tới hình thành một số tế bào có bản chất di truyền giống cái, cuối cùng tạo ra dạng đục cái lẫn lộn đối xứng hai bên.

2. Giới tính do độ đa bội

Sáu bộ thuộc cánh màng (kiến, ong ...) có nhiều loài không có nhiễm sắc thể giới tính, trong đó con đục sinh ra trình sinh tức là sinh ra từ trứng không thụ tinh, từ đó cơ thể thuộc dạng đơn bội, như trường hợp ong mật, là ong đục thuộc dạng đơn bội $n = 16$.

Ong mẹ (hoặc ong chúa) và ong thợ đều là ong cái, sinh ra từ trứng thụ tinh, do đó cơ thể thuộc lưỡng bội $2n = 32$.

Ở ong đục, chỉ hệ tế bào sinh sản là đơn bội, hệ tế bào soma được phục hồi trở lại số lưỡng bội, nên có kích thước và sức sống bình thường. Khi hình thành tế bào giao tử, tế bào sinh sản của con đục đã là đơn bội nên không giảm phân. Giới tính ở đây rõ ràng được quy định bởi trạng thái đơn bội hay lưỡng bội.

Ong mẹ (ong chúa) có thể đẻ ra trứng thụ tinh hoặc không thụ tinh là tùy tình hình cụ thể của đàn, cho nên tỷ lệ ong đục được điều chỉnh theo yêu cầu sinh sản của quần thể. ví dụ khi cần nhân đàn hay thay ong chúa thì tăng số ong đục lên.

Ong thợ cũng là ong cái- sự khác nhau giữa ong thợ và ong chúa là do, từ những ngày đầu, sau khi từ trứng nở ra, chúng nhận được chế độ thức ăn khác nhau.

Trong mỗi lô trứng do ong chúa đẻ ra, trứng không thụ tinh phát triển thành ong đục, còn trứng thụ tinh sẽ được phát triển thành ong chúa (ong cái), có khả năng sinh sản bình thường, hay ong thợ. cũng là ong cái nhưng không có khả năng sinh sản, là tùy thuộc điều kiện thức ăn. Thức ăn bình thường của ong là một chất keo trắng nhạt, do một loại tuyến đặc biệt ở đầu ong thợ tạo thành. Ấu trùng cái, mà số phận sẽ thành ong thợ, chỉ nhận được thức ăn đặc biệt trong 2-3 ngày và đạt được trạng thái trưởng thành phải mất 21 ngày từ khi trứng nở.

Đối với ong chúa tương lai thì khác, tuy cũng là ấu trùng cái, nhưng lô tổ ong của chúng lại được ong thợ xây to ra. Trong giai đoạn ấu trùng, chúng nhận được thức ăn đặc biệt suốt năm ngày liền, do đó trở thành ong chúa trưởng thành chỉ 6 ngày sau khi ấu trùng nở ra từ trứng. Ong

chúa có kích thước vượt hẳn các ong khác cùng lứa nhưng phát triển trong điều kiện bình thường, do đó mà ong chúa có khả năng sinh đẻ. Ong chúa có thể, trong một ngày, đẻ ra một số lượng trứng bằng trọng lượng cơ thể của nó. Sức đẻ trứng đặc biệt lớn này có thể có là nhờ trong thời kỳ đẻ trứng, ong chúa vẫn tiếp tục nhận được thức ăn đặc biệt.

Ong thợ sẽ trưởng thành bất thụ, nhưng nếu từ mấy ngày đầu được chuyển sớm sang khoang ong chúa, chúng sẽ phát triển thành ong chúa.

Ong dục chỉ giao phối một lần với ong cái trong thời gian bay giao hoan, sau đó chết. Sự giao phối này đảm bảo đủ một số lượng tinh trùng cho suốt đời ong chúa, kéo dài khoảng 4- 5 tuổi.

3. Giới tính do môi trường

Thuyết sinh lý xác định giới tính cho rằng sinh vật có bản chất lưỡng tính, mang cả hai tiềm năng di truyền về sự phát triển theo hai giới đực, cái. Ở phôi động vật, mầm sinh dục là lưỡng tính, trong quá trình phân hóa giới tính, được phát triển thành hoặc loại mô sinh dục cái, hoặc loại mô sinh dục đực, là tùy hướng phát triển, hoặc lớp ngoài của mầm sinh dục cortex, thành buồng trứng, hoặc lớp trong là medulla, thành tinh hoàn. Quá trình phân hóa giới tính ở nhiều động vật chịu ảnh hưởng của hormon tuyến nội tiết, của hormon lớp cortex và medulla của mầm sinh dục, khác nhau về tính chất và thời gian tác động ở cá thể đực, trội thuộc về hormon medulla, ở cá thể cái trội thuộc về hormon cortex. Hoạt động tiết các loại hormon này được kiểm tra bởi các gen.

Ở một số động vật hạ đẳng, sự phân hóa giới tính tùy thuộc điều kiện môi trường. Gen về mặt giới tính của con đực và con cái cân bằng nhau và kích thích của môi trường sẽ dẫn tới sự phát triển cho hướng đực hoặc cái. Có thể nêu ví dụ ở một loài giun biển là *Bonnelia viridis*. Con đực rất bé, kích thước chỉ bằng 1/ 1000 của con cái, sống trong ống sinh sản của con cái. Con đực sống ký sinh, chỉ làm nhiệm vụ thụ tinh cho trứng, do đó trừ cơ quan sinh dục ra, các bộ phận khác của con đực đều ở dạng thoái hóa. Ấu trùng nở ra từ trứng thụ tinh, sống ở dạng bơi lội tự do. Khi một ấu trùng chuyển từ dạng này sang dạng bám vào giá thể, nó sẽ được phát triển thành cá thể cái, có kích thước lớn, vòi dài và to.

Nếu ấu trùng khác chuyển từ bơi lội sang bám vào vòi cá thể cái, nó

sẽ phát triển thành cá thể đực, sống ký sinh trong vòi của cá thể cái. Nếu đưa cá thể đực này chuyển sang cho bám vào giá thể, nó lại được phát triển thành cá thể cái.

Giới tính còn có thể thay đổi ngay trong đời sống cá thể. Ở một loài sán dây biển, mới đầu là thuộc dạng đực, khi trưởng thành cho ra tinh trùng. Khi có trên 20 đốt nó trở thành con cái, đẻ trứng. Nếu do đói hay tổn thương, số đốt trở lại còn dưới 20 đốt, thì nó lại trở thành con đực. Ở đây, rõ ràng giới tính thay đổi hai chiều, phụ thuộc số lượng đốt trên cơ thể.

4. Điều hòa giới tính ở động vật

4.1. Điều hòa giới tính ở cá

Ở một số loài cá nhiệt đới, trong cùng một loài có thể có loài có cả hai hệ thống xác định giới tính. Người ta có thể dùng phương pháp chọn cặp lai để làm thay đổi tỷ lệ đực, cái ở thế hệ con, chọn cặp lai giữa các dòng cá tự nhiên, khác nhau về tính dị giao tử.

Cá *Tilapia mossambica* ở châu Phi thuộc giống dị giao tử cái (♀♀XY và ♂♂YY) còn cá rô phi Malaixia thuộc giống dị giao tử đực (♂♂XY và ♀♀XX). Kết quả lai giữa các dòng cá này có khác nhau trong hai trường hợp chọn cặp lai

Trường hợp 1 :

♀ châu Phi XY	x	♂ rô phi Malaixia XY
1 ♀♀XX	2 ♂♂XY	1 ♂♂YY

Trường hợp 2 :

♀ rô phi Malaixia XX	x	♂ châu Phi YY
100% ♂♂XY		

Phép lai thứ hai cho ra thế hệ con toàn cá đực rất có giá trị kinh tế. Nuôi toàn rô phi đực sẽ thu hoạch sản lượng cao hơn, do cá đực lớn nhanh hơn, đồng thời loại trừ được hậu quả mất cân đối giữa mật độ quá đông (do cá sinh sản quá nhanh) trong điều kiện sống ở ao hồ bé hẹp.

4.2. Điều hòa giới tính ở tôm

Astaurop đã sử dụng phương pháp sinh sản đơn tính tạo ra tôm

thuộc giới tính mong muốn, tác động lên cơ chế phân ly nhiễm sắc thể trong quá trình tạo thành tế bào sinh dục.

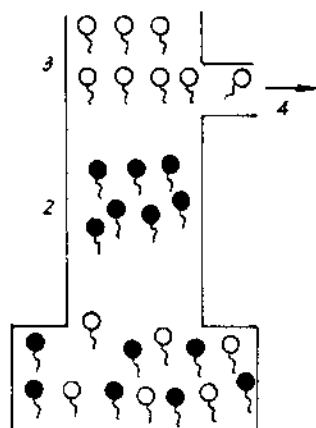
Để tạo tầm cái (XY) ông dùng nhiệt độ cao (45°C) trong 18 phút, tác động lên quá trình hình thành tế bào sinh dục (noãn bào) ở con cái, làm kìm hãm sự phân ly nhiễm sắc thể, chuyển hai lần giảm phân bình thường thành một lần nguyên phân. Kết quả là trong các tế bào trứng hình thành vẫn còn trọn vẹn cặp XY và toàn bộ nhiễm sắc thể thường. Những tế bào trứng này phát triển không qua thụ tinh, cho toàn tầm cái đều là bản sao của một tầm cái ban đầu. Để tạo tầm đực, Astaurop dùng tia Rongen với liều lượng lớn và nhiệt độ cao (40°C) trong 35 phút, tác động lên trứng tầm. Nhân của tế bào trứng này bị huỷ hoại, không tham gia vào tạo thành phôi. Khi thụ tinh các tế bào trứng này, thường có nhiều tinh trùng xâm nhập (hiện tượng thụ tinh đa tinh trùng). Hạch của hai tinh trùng nào đấy sẽ kết hợp nhau tạo thành hạch thụ tinh. Sau đó, tế bào trứng vẫn tiếp tục phát triển và cho ra toàn tầm đực, có XX và tổ hợp lưỡng bội nhiễm sắc thể thường.

Trong trường hợp tạo toàn tầm cái ở trên, trong tế bào phôi không xảy ra giảm phân, do đó tầm con nở ra mang toàn bộ bộ nhiễm sắc thể của mẹ, hoàn toàn giống mẹ. Đặc tính tốt của các cá thể tầm giống đầu đàn sẽ được nhân lên trong vô số thế hệ. Phương pháp này đã được sử dụng rộng rãi trong chọn giống tầm.

4. 3. Điều hòa giới tính ở động vật có vú và gia cầm

Đây là phương pháp có hiệu quả để tác động lên tỷ lệ đực cái, tách riêng hai loại tinh trùng, loại mang X và loại mang Y, sau đó cho thụ tinh bằng loại này hoặc loại kia theo yêu cầu đặt ra về tỷ lệ đực cái.

Trước đây, người ta đã dùng phương pháp điện di để tách riêng hai loại tinh trùng mang X và mang Y của lợn, nhưng các tinh trùng được tách qua điện di, đưa vào thụ tinh nhân tạo cho tỷ lệ thụ thai thấp. Gần đây, người ta đã sử dụng hệ thống gradient mức biến đổi



Hình 1. 16. Tách hai loại tinh trùng X và Y bằng hệ thống gradient

1. Hai loại tinh trùng mang X và Y; 2. Loại X bơi chậm;
3. Loại Y bơi nhanh; 4. Tách loại Y cho thụ tinh.

anbumin huyết thanh bò (bovine serum albumin, BSA) để tách hai loại tinh trùng X và Y của bò (h.I.16) (Ericson, 1982 Hagele, 1984). Người ta còn dùng phương pháp miễn dịch học để phát hiện một yếu tố đặc biệt, có trên bề mặt tế bào của tinh trùng mang Y, để tách riêng hai loại tinh trùng X và Y. Yếu tố đặc biệt là kháng nguyên H, Y.

III. XÁC ĐỊNH GIỚI TÍNH Ở ĐỘNG VẬT CÓ VÚ

Cơ chế xác định giới tính ở động vật có vú liên quan với những sai khác đặc thù trên bề mặt tế bào. Người ta đã phân biệt hai dạng xác định giới tính ở động vật có vú:

- Xác định giới tính sơ cấp hay xác định qua tuyến sinh dục.
- Xác định giới tính thứ cấp hay xác định qua tế bào soma.

1. Xác định giới tính qua tuyến sinh dục

Sự phân hóa của tinh hoàn hay buồng trứng từ một tuyến sinh dục non chưa phân biệt đực, cái, được thực hiện bởi những gen quy định tính đực nằm trên nhiễm sắc thể Y. Những gen này tổng hợp protein gọi là kháng nguyên H-Y, có trên bề mặt của mọi tế bào mang nhiễm sắc thể Y.

Sự có mặt của kháng nguyên đặc thù tính đực trên bề mặt tế bào như trên, đầu tiên được phát hiện qua các nghiên cứu ghép da giữa các cá thể trong những dòng chuột cận huyết mức độ cao.

Ghép da giữa các chuột cái và giữa các chuột đực trong cùng một dòng là được chấp nhận. Da chuột cái ghép lên da chuột đực cũng được chấp nhận, nhưng da chuột đực ghép lên chuột cái lại không được chấp nhận. Như vậy là chuột đực có một vài kháng nguyên không có trong các chuột cái cùng kiểu gen.

Vì sự sai khác di truyền giữa chuột đực và chuột cái này chỉ là do có nhiễm sắc thể Y ở con đực, do đó có thể kết luận kháng nguyên nói trên được quy định bởi các gen trên nhiễm sắc thể Y. Trên Y phải có hơn một gen quy định kháng nguyên H-Y, bởi vì người ta thấy ở một số trường hợp cấu trúc lại nhiễm sắc thể liên quan đến Y dẫn tới kiểu hình trung gian tính nhưng vẫn có kháng nguyên H-Y.

Gen kháng nguyên H-Y hoạt động rất sớm trong quá trình phát

triển cá thể, kháng nguyên này xuất hiện ở phôi chuột 8 tế bào. Mọi tế bào của cơ thể đều có kháng nguyên này, chức năng của nó chỉ để kích thích hình thành tinh hoàn trong tuyến sinh dục non chưa phân hóa giới tính. Khi thiếu kháng nguyên trên, tuyến sinh dục sẽ phát triển thành buồng trứng.

2. Xác định giới tính qua tế bào soma

Đây là kết quả của sự phát triển tuyến sinh dục dưới ảnh hưởng của kết cấu nhiễm sắc thể của cơ thể.

Tinh hoàn phát triển, tiết ra hormone steroid, chạy khắp các tế bào của phôi, khởi đầu cho hướng phát triển theo giới dục trong các tế bào soma, bao gồm cả tế bào soma của tuyến sinh dục. Khi không có tín hiệu hormone trên thì lại phát triển theo hướng cái.

Sự phát triển hướng dục tiến hành dưới sự kiểm soát của một gen trên nhiễm sắc thể X (Tf_m) quy định tổng hợp loại protein gắn testosterone, có trong tế bào chất của mọi tế bào ở con dục cũng như con cái. Đây là một loại protein điều hòa, được hoạt hóa khi gắn vào testosterone (mỗi phân tử tác động), đi vào nhân tế bào và kích thích hoạt động các gen phân hóa giới dục.

Các đột biến của gen Tf_m này được phát hiện ở nhiều loài trong đó có cả người, gây nên hội chứng là "chứng mái hóa tinh hoàn". Các tế bào của những phôi đột biến Tf_m/Y hoàn toàn không chịu ảnh hưởng của tác động gây phát triển hướng dục của testosterone. Kết quả là, thai được phát triển các tính trạng sinh dục thứ cấp bên ngoài của cá thể cái rõ nét hơn so với của cá thể dục. Tuy vậy, bên trong thì tinh hoàn vẫn phát triển rõ nét hơn buồng trứng. Tinh hoàn tiết ra loại hormone dục khác, kìm hãm sự phát triển của vòi Fallope và tử cung, dẫn đến hình thành âm đạo dị tật.

IV. BA LOẠI TÍNH TRẠNG GIỚI TÍNH

Về di truyền giới tính, người ta phân biệt ba nhóm tính trạng thuộc 3 loại khác nhau.

1. Tính trạng giới hạn bởi giới tính

Đây là những tính trạng chỉ được biểu hiện ở cá thể dục hoặc cá thể

cái, nhưng không phải do gen liên kết giới tính. Nói cách khác, những tính trạng này là do gen nằm trên nhiễm sắc thể thường, chứ không phải nhiễm sắc thể giới tính. Hoạt động của các gen này, sự biểu hiện của chúng thành tính trạng đã bị giới hạn bởi giới tính.

Trong tự nhiên, ta thấy có sự sai khác giữa giống đực và giống cái về kích thước, màu sắc. Nuôi gà thịt thì gà trống lớn nhanh hơn gà mái, trong cùng thời gian và chế độ thức ăn giống nhau.

Năm 1990. North M.O. đã đưa ra nhiều số liệu về đặc điểm này, lúc mới nở gà trống nặng hơn gà mái 1%. Tuổi càng tăng, sai khác càng lớn.

- 2 tuần tuổi: hơn 5%;
- 3 tuần tuổi: hơn 11%;
- 5 tuần tuổi: hơn 17%;
- 6 tuần tuổi: hơn 20%;
- 7 tuần tuổi: hơn 23%;
- 8 tuần tuổi: hơn 27%.

Chăn nuôi bò sữa thì cần bê cái, trái lại, nuôi bò thịt thì lại cần bê đực, liên quan đến tính trạng đa gen, chỉ được biểu hiện ở giới kia, như tính trạng sản lượng sữa, trứng v. v... Nuôi gà trứng rõ ràng phải tạo giống gà mái đẻ nhiều.

Các tính trạng đẻ nhiều trứng, tiết nhiều sữa v. v... do nhiều gen trên nhiễm sắc thể thường quy định nhưng được biểu hiện ở cá thể cái, như vậy cũng không có nghĩa là các cá thể đực của những giống tốt này không mang các gen quý ấy.

Có những sai khác mang tính chất di truyền giữa giống đực và giống cái, như gà trống có cựa, ở một số động vật có vú, chỉ có con đực mới có sừng. Loại tính trạng này trước đây được gọi là tính trạng sinh dục thứ cấp.

Hiện tượng hẹp ống dẫn trứng ở gà mái và hẹp ống dẫn tinh ở gà trống đều do gen quy định. Gen này gây chết cho gà mái nhưng lại không ảnh hưởng gì nhiều đến sức sống của gà trống. Gà mái bị hẹp ống dẫn trứng, trứng không đi qua được đoạn hẹp, quay lại khoang bụng, tích lũy ở đấy, kéo theo hiện tượng viêm màng bụng, làm cho gà chết.

2. Tính trạng được quy định, kiểm tra bởi giới tính

Đây là loại tính trạng mà sự biểu hiện trội hay lặn của chúng là do giới tính quy định, nói cách khác loại tính trạng mà sự biểu hiện của cùng một kiểu gen được rõ nét hơn ở giới này so với giới kia. Ở người, hiện tượng hói trán mang tính di truyền, thường gặp ở đàn ông nhiều hơn đàn bà.

Gen H quy định tính hói là trội so với gen h, quy định trạng thái bình thường. Ở đàn ông, gen H hoạt động như gen trội, còn ở đàn bà, vì bị hormone giới tính nữ kìm hãm, nên hoạt động như gen lặn. Do đó, tuy có cùng kiểu gen Hh, nhưng ở đàn ông sẽ hói, còn ở đàn bà thì lại không.

Tương tự như trên, ở dê, tính trạng có râu được quy định bởi một gen, có ở cả hai giới, nhưng chỉ ở dê đực mới có râu, dê cái không râu.

Hiện tượng phát triển sừng ở cừu cũng được kiểm tra bởi giới tính. Nòi cừu Dorset-Horns ở Mỹ, đực hay cái đều có sừng, nhưng sừng ở cừu đực to hơn, dài hơn và xoắn nhiều vòng hơn cừu cái. Người ta cho rằng, dưới tác động của hormone sinh dục, ở cá thể đực, gen có sừng hoạt động như gen trội, ở cá thể cái bị kìm hãm nên hoạt động như một gen lặn.

3. Tính trạng liên kết với giới tính

Đây là loại tính trạng được quy định bởi gen nằm trên nhiễm sắc thể giới tính, tuân theo các quy luật riêng, không giống các tính trạng do gen nằm trên nhiễm sắc thể thường.

Các tính trạng do gen nằm trên X không có alen tương ứng trên Y (ở dạng đực XY), tuân theo quy luật di truyền chéo như gen lông vằn ở gà, gen về tốc độ mọc lông ở gà v. v... Ở người, đã phát hiện trên 150 tính trạng thuộc loại này, như bệnh mù màu, đã phát hiện hàng trăm năm nay, chính là do gen lặn trên X.

Bệnh máu khó đông đã được phát hiện ít nhất có 3 dạng, trong đó có 2 dạng do gen lặn nằm trên X và 1 dạng, ít gặp hơn, do gen lặn trên nhiễm sắc thể thường, đã được phát hiện và nghiên cứu nhiều ở chó.

Về các gen nằm trên Y, người ta phân biệt 2 loại, có đặc điểm di truyền khác nhau: có những gen chỉ có trên Y; có những gen có mặt cả ở Y và X.

Những gen chỉ có trên Y, không có alen tương ứng trên X, dù là trội

hay lặn, đều được biểu hiện ra kiểu hình, theo cơ chế bán dị hợp. Gen này chỉ được truyền lại từ bố cho con trai, tuân theo quy luật di truyền thẳng. Người ta gọi đây là sự di truyền theo dòng bố (holandric inheritance), chỉ được biểu hiện ở giống đực.

Ở người, gen quy định tính trạng có túm lông ở tai, có "màng bơi" ở tay, dính ngón 2 và 3, gen về mí mắt thứ ba ... đều là những gen nằm trên Y, tuân theo quy luật di truyền thẳng. Ở ruồi dấm *Drosophila melanogaster*, nhiễm sắc thể Y mang gen cần cho sự phát sinh tinh trùng. Cho đến nay, thông báo về những loại gen nằm trên Y còn rất ít.

V. ỨNG DỤNG TRONG TẠO GIỐNG GIA CẦM

1. Tạo giống gà phân biệt được trống, mái từ mới nở qua màu sắc lông

Màu lông vằn ở gà Plimut xám, gà Lơgo và của nhiều giống gà khác, được đặc trưng bởi các giải trắng là những vùng không có melanin. Nếu không có những giải lông thiếu sắc tố như vậy thì gà có lông màu đen.

Màu lông vằn này do gen trội không hoàn toàn B, nằm trên X; gà trống (XX) thuần chủng, đồng hợp thể (BB) thuộc giống Plimut vằn, có các giải trắng rộng hơn do đó màu lông sáng hơn gà mái (XY), bán dị hợp thể (B-). Ở gà trống dị hợp thể (Bb), các giải trắng hẹp hơn, do đó màu lông cũng sẫm hơn giống gà lông có màu.

Người ta cho lai giữa gà mái (XY) giống Plimut xám, lông vằn với gà trống Rod-Island đỏ. Do đặc điểm di truyền chéo, ở những gà trống mới nở ra, mà sau này sẽ biểu hiện lông vằn, thì trên đầu có vệt trắng. Ở gà mái mới nở, không có bản chất di truyền lông vằn, thì vết trắng nhỏ kia không có. Nhờ vậy, người ta phân biệt được những gà lai này về giới tính, ngay ở 1 ngày tuổi.

Rõ ràng, gà trống con F1 mang kiểu hình mẹ, còn gà mái con F1 thì mang kiểu hình của bố. Ở Anh, người ta dùng gà trống Rod-Island đỏ, nhưng không dựa vào đặc điểm lông không vằn, mà căn cứ vào ánh vàng của màu lông (ss). Khi cho lai gà trống Rod-Island với gà mái Sút-séc màu sáng có lông ánh bạc (S-) người ta cũng thấy có sự di truyền

chéo. Ở F_1 , tất cả gà trống (Ss) có ánh bạc, tất cả gà mái có ánh vàng, phân biệt được ngay sau khi nở.

Hiện nay, được phổ biến rộng rãi một phương pháp nhanh và chính xác để xác định giới tính gà con 1 ngày tuổi là căn cứ vào cấu tạo của huyết gà.

2. Phân biệt gà con mới nở về giới tính qua tốc độ mọc lông

Tốc độ mọc lông là tính trạng di truyền được quy định bởi alen K và k, liên kết giới tính, đầu tiên được A. S. Xêrêbrôpski chứng minh.

Ở gà con 8-10 ngày tuổi, thuộc kiểu gen kk (♂) hoặc k- (♀), lông đuôi mọc dài 1,2 cm và lông cánh mọc dài tận mút đuôi.

Gà con thuộc kiểu gen KK, Kk (♂) hoặc K- (♀), ở lứa tuổi ấy vẫn còn chưa có đuôi, lông cánh vẫn còn rất ngắn.

Cho lai giữa gà trống mọc lông sớm với gà mái mọc lông muộn, sẽ cho ra gà trống con mọc lông muộn (Kk) và gà mái con mọc lông sớm (k-). Người ta có thể phân loại gà con trống, mái 8 ngày tuổi chính xác trên 95%, theo độ dài của những lông cánh mọc đầu tiên.

Người ta đã đưa gen k vào nhiều dòng gà sử dụng trong sản xuất gà dò (gà broiler), bởi vì gen này bảo đảm cho gà con không bị bệnh "lưng trần" ở tuổi xuất chuồng bình thường.

Về mặt di truyền học, các alen K và k rất quan trọng vì chúng ảnh hưởng đến chức phận (sinh trưởng) rõ rệt hơn là đối với hình thái.

Gà lai trứng nâu (Goldline 54, Issa Brown, Babkob 380, Moravia), có đặc tính phân biệt giới tính lúc mới nở (autosexing) qua màu lông hoặc tốc độ mọc lông cánh, là những gà lai giữa 4 dòng.

D. BẢN ĐỒ DI TRUYỀN

I. BẢN ĐỒ LIÊN KẾT HOẶC BẢN ĐỒ DI TRUYỀN

- Căn cứ số liệu về tần số trao đổi chéo giữa hai gen một, để xác định khoảng cách và vị trí tương đối của các gen dọc nhiễm sắc thể.

- Bản đồ di truyền ở vi khuẩn cũng trên nguyên tắc tương tự bằng cách dùng kỹ thuật ngắt quãng tiếp hợp ở *E.coli*.

1. Bản đồ di truyền tế bào

Bản đồ di truyền tế bào dựa trên mối liên quan giữa các kiểu hình với các biến đổi, sắp xếp lại trên nhiễm sắc thể, các chuyển đoạn, mất đoạn.

2. Bản đồ vị trí (bản đồ hình thể, bản đồ giới hạn, physical map) hoặc bản đồ phân tử (molecular map)

Dựa vào các vị trí cắt dành cho enzym giới hạn, tức dựa trên đa hình độ dài các đoạn cắt RFLP (restriction fragment length polymorphism) sai khác giữa các cá thể, các ADN của cá thể là do sai khác về các đoạn cắt ra, tức về địa điểm vị trí cắt, do enzym cắt giới hạn. Bản đồ di truyền của vi rút, dựa trên số liệu giải trình tự nucleotid từng ADN.

3. Lập bản đồ các điểm giới hạn

Cắt 1 đoạn ADN (ví dụ 15kb) bằng một số enzym giới hạn (BamHI, EcoRI, PstI), riêng lẻ hoặc tổ hợp.

Các đoạn sinh ra được điện di trên gel agarose và được xác định kích thước. Từ các số liệu trên, xác định vị trí tương đối các điểm cắt.

Bảng I. 5. Vị trí tương đối các điểm cắt

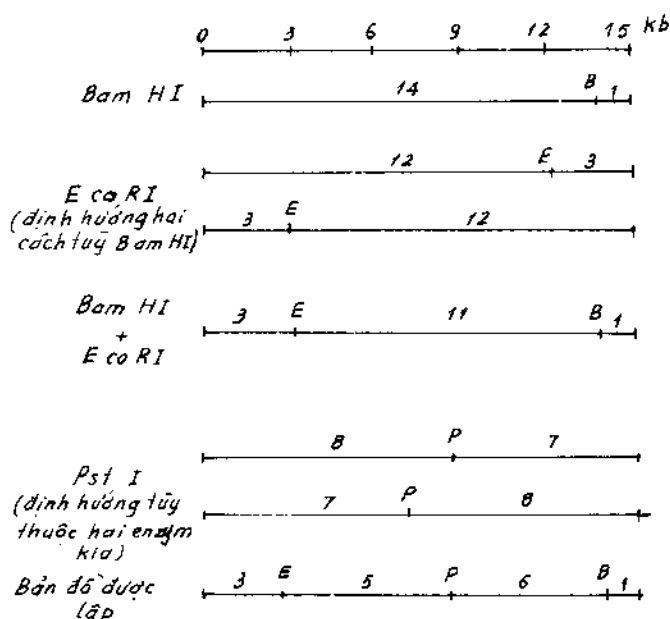
Loại enzym giới hạn	Bam HI	EcoRI	PstI	BamHI + EcoRI	Bam HI + Pst I	Eco RI + Pst I	Bam HI + Eco RI + Pst I
Các đoạn được cắt ra	14 1	12 3	8 7	11 3 1	8 6 1	7 5 3	6 5 3 1

Sẽ lập bản đồ điểm cắt của BamHI, EcoRI và PstI đối với đoạn ADN 15kb.

Vì mỗi enzym riêng rẽ cho ra 2 đoạn, có thể kết luận đoạn ADN này có 1 điểm cắt đối với mỗi enzym. Nếu cắt bởi tổ hợp 2 enzym, thì bản đồ

sẽ có thêm 1 điểm cắt (nhận được 3 đoạn cắt).

Nếu cắt bằng 3 enzym phối hợp, sẽ có 3 điểm cắt với 4 đoạn (h.I.17).



Hình I. 17. Lập bản đồ các điểm giới hạn.

II. BẢN ĐỒ GEN CỦA VẬT NUÔI

Trên vật nuôi, như lợn, bò, cừu, gia cầm v. v..., những năm gần đây, đã được tiến hành nhiều công trình thực nghiệm, xây dựng bản đồ gen (gene mapping).

Qua bản đồ gen, người ta sẽ nắm được cơ chế kiểm soát di truyền các phức hợp tính trạng như sinh trưởng, sinh sản của gia súc, gia cầm. Xác định được cơ sở phân tử của từng tính trạng, của từng kiểu hình. Bên cạnh các phương pháp hóa sinh, sinh lý, một yêu cầu đặt ra là thấu hiểu cơ chế sâu xa hình thành các loại kiểu hình.

Phương pháp xác định các thông số hoá sinh, sinh lý của gia súc, gia cầm, cho đến nay đã được thay đổi, phát triển, nhưng cũng chỉ đáp ứng những yêu cầu nhất định.

Ngược lại, công nghệ di truyền phân tử (molecular genetic

technology) cho phép xem xét toàn bộ genom đối với các vùng nhiễm sắc thể (như các lôcut tính trạng số lượng, QTL, quantitative trait loci), xác định mối quan hệ với các kiểu hình.

Do đó, xây dựng bản đồ gen ngày nay đã được thừa nhận rộng rãi là một phương pháp chủ yếu để nghiên cứu di truyền sinh vật, bao gồm các loài vật nuôi.

1. Bản đồ gen của lợn (*Sus scrofa*)

Genom của lợn những năm qua, đã được nghiên cứu sâu, rộng qua các công trình hợp tác quốc tế. Chương trình lập bản đồ gen của lợn gần 20 phòng thí nghiệm ở châu Âu hợp tác với các phòng thí nghiệm ở Mỹ và Úc. Người ta đã xây dựng bản đồ gen trên các giống da dạng di truyền.

Các giống lợn đã được sử dụng để tiến hành lai gồm có 3 loại:

- giống lợn thực phẩm Âu châu (như Đại bạch, Large White hoặc Pietrain).
- giống lợn Trung quốc (Meishan)
- giống lợn rừng châu Âu (Wild boar).

Như ở một số trung tâm nghiên cứu theo hướng bản đồ gen, người ta đã cho lai thuận nghịch giữa Large White và Pietrain, tạo ra lợn lai F_1 , sau đó cho tự giao để tạo các lợn F_2 dùng xây dựng bản đồ gen.

Người ta cũng đã tạo được 3 thế hệ F_2 tự giao giữa lợn rừng và lợn thương phẩm (Ellegren, 1993).

Đối với lợn các thế hệ được tạo ra nhanh, cung cấp các thực nghiệm khá thuận lợi, số lứa đẻ lớn, có thể trên 10, khoảng cách thế hệ tính từng năm, mỗi năm có thể trên 2 lứa đẻ. Số liệu ban đầu cho thấy độ dài của bản đồ di truyền của lợn vào khoảng 20 Morgans.

Lợn có đặc trưng là có kiểu nhân rất phân tán (polydisperse) gồm 18 cặp autosom và cặp XY, khá phù hợp với kỹ thuật xây dựng bản đồ hình thể (bản đồ vật lý, physical mapping) như lai *in situ* (lai tại chỗ).

Các nghiên cứu gần đây về hàm lượng ADN trong các nhiễm sắc thể cho thấy genom đơn bội của lợn được ước tính có chiều dài vào khoảng 2770 mega bazơ (megabase) (Schmitz, 1992).

Kết quả thực nghiệm xây dựng bản đồ gen qua lai *in situ* hơn 200

doạn ADN ứng với các gen đã biết, đã làm cơ sở khách quan để xác định các vị trí gen trên mỗi cánh nhiễm sắc thể.

Từ các tư liệu thực nghiệm rút ra được, người ta đã lập được *thư viện gen đặc thù* cho nhiễm sắc thể số 1, 6 và 13 (Miller, 1992).

2. Bản đồ gen của bò

Cũng như ở lợn, các công trình xây dựng bản đồ gen của bò (*Bos taurus*, *Bos indicus*) được hình thành qua hợp tác quốc tế rộng rãi.

Một chương trình xây dựng bản đồ gen bò (BovMalP) ở châu Âu, do EC tài trợ, do các phòng thí nghiệm chủ yếu là của EC, hợp tác với các phòng thí nghiệm của Mỹ, châu Phi và Israel.

Một bản đồ liên kết ở bò đã được xây dựng từ các số liệu phân tích trong các quần thể bò đồng huyết ở Mỹ, châu Phi và Úc (Barendse, 1994). Bản đồ này bao gồm 202 lôcut đa hình, trong đó có 144 là vệ tinh cực nhỏ (*microsatellite*)

Genom bò được ước tính có 28 Morgans, trong đó phát hiện được các lôcut đa hình trong số 24 trên 29 autosom và trên nhiễm sắc thể giới tính.

Qua lai in situ (tại chỗ), người ta đã định khu được nhiều lôcut trên nhiễm sắc thể, trong đó tối thiểu cho 55 gen, đã xác định được vị trí của gen quy định tính trạng có sừng, không sừng, ở nhiễm sắc thể số 1, gen quy định bề dày của móng. Đã xác định được cơ sở di truyền của các hội chứng do đơn gen như gen double-muscling ở bò Bỉ (Georges, 1990) hội chứng weaver ở bò nâu Thụy Sĩ (Georges, 1993) khác với lợn và gà, bò thường là đơn thai (đẻ một, monoparous), khoảng cách thế hệ dài.

III. THƯ VIỆN BỘ GEN

1. Khái niệm chung

Thư viện bộ gen (genomic library) (hoặc ngân hàng bộ gen, lưu trữ bộ gen) là tập hợp tất cả các trình tự ADN cấu thành bộ gen (genome), đã được gắn vào vector, lưu giữ trong thư viện bộ gen có thể được thiết lập từ bất kỳ loại tế bào nào, là tập hợp các dòng, mỗi dòng mang tối thiểu 1 bản sao của mỗi trình tự ADN.

Quá trình thiết lập thư viện bộ gen:

- Tách chiết ADN bộ gen.
- Cắt ADN trên thành những đoạn có kích thước nhất định bằng các enzym cắt giới hạn (RE).
- Gắn các đoạn này vào 1 vector tạo ra vector tái tổ hợp.
- Đưa vector tái tổ hợp vào vật chủ (có thể là vi khuẩn, như *E.coli*, nấm men v.v...)
- Tế bào chủ này được nuôi cấy, hình thành những dòng, đây là thư viện bộ gen.

2. Phương pháp xây dựng thư viện bộ gen

Sử dụng kỹ thuật và công nghệ ADN tái tổ hợp để tạo thư viện bộ gen.

2.1. Gắn ADN vào vector

2.1.1. Dùng vector là phage. Khi số mẫu ít, các đoạn ADN ngắn, 10-20 kb.

- Tạo ra phage tái tổ hợp, và đưa vào tế bào vật chủ, như vi khuẩn.
- Tế bào vi khuẩn bị phá vỡ.
- Dòng tái tổ hợp được phát hiện dưới dạng các đĩa phân giải trên một thảm vi khuẩn.

Ví dụ: Dùng vector là thực khuẩn thể M_{13} . M_{13} là một thực khuẩn thể của *E.coli*, đặc trưng cho loại vi khuẩn F^+ .

Genom của phage này thuộc dạng sợi đơn ADN, vòng, khoảng 6,4 kb. Khi phage này lây nhiễm vào vi khuẩn, ADN sợi đơn của nó được chuyển thành ADN sợi kép, dạng tái bản (replicative form, RF). RF được hình thành với số lượng lớn các bản sao của nó trong cơ thể vi khuẩn chủ, sẽ được sử dụng làm khuôn mẫu để tổng hợp ra các thể hệ ADN phage. Người ta cho các vi khuẩn đã lây nhiễm phage M_{13} phát triển trên đĩa agar. Sau khi trên đĩa đã phát triển nhiều tập đoàn vi khuẩn, người ta bọc đĩa vào một màng lọc. Vi khuẩn phát triển từ các tập đoàn. Các phage xuất hiện trên bản, sẽ bám vào màng lọc và tiếp tục tái bản. Màng lọc nay được xử lý với NaOH để làm sinh tan vi khuẩn và làm biến tính ADN. Màng lọc được đặt vào chân không (vacuo) để ADN bám vào cơ chất.

2.1.2. Dùng vector là cosmide thay phage. Khi các đoạn ADN dài, 35-45 kb.

Cosmide chứa là loại vector để tạo dòng ADN đoạn dài. Cosmide các site cos của phage λ , được đóng gói trong phần đầu của λ , có 1 gốc tái bản plasmid, do đó có thể tái bản như plasmid. Cos là đoạn tận cùng liên kết của ADN mạch thẳng của phage λ .

2.2. Đưa vector tái tổ hợp vào vật chủ

2.2.1. Vào nấm men. Công nghệ lưu trữ gen nhiễm sắc thể trong nấm men YAC (yeast artificial chromosome). Một lưu trữ gen YAC ở bò đã được thiết lập, có kích thước trung bình đoạn xen là 750kb (Libert, 1993).

Đối với vật chủ là nấm men, có một số khó khăn:

a. Khó phân lập ADN tách dòng, vì tế bào nấm men có thành tế bào cứng, phân tử ADN đường thẳng dài, dễ bị đứt gãy trong quá trình tách chiết từ tế bào nấm men.

b. Đoạn xen lớn, dẫn tới dạng khảm (Anderson, 1993), hay bị mất đoạn.

2.2.2. Vào vi khuẩn. Công nghệ lưu trữ gen nhiễm sắc thể trong vi khuẩn BAC (bacterial artificial chromosome). Người ta đã dùng BAC thay cho YAC, có thể duy trì ổn định các đoạn ADN của genom loại hơn 300 kb (Shizuya, 1992). Một hệ thống BAC dựa trên yếu tố F của *Escherichia coli*.

Yếu tố F có khả năng duy trì ổn định và truyền lại cho các thế hệ tế bào của quần thể vi khuẩn. Mức độ dạng khảm ở BAC thấp hơn ở YAC nhiều yếu tố F thuận lợi cho việc tạo dòng các đoạn ADN lớn, có thể mang và duy trì ADN xen đoạn lớn hơn 1 megabase (Low, 1987).

Số liệu từ thư viện bộ gen BAC ở người cho thấy hiệu quả biến nạp gấp 10-100 lần lớn hơn ở YAC. Thao tác với ADN tách dòng ở BAC dễ hơn ở YAC vì ADN vòng plasmid khó đứt gãy hơn. Người ta đã xác định ADN người trong hệ thống BAC được rất ổn định sau 100 thế hệ (Shizuya, 1992). Hệ thống BAC tỏ ra là một hệ thống thuận lợi để tách dòng các đoạn ADN lớn, dùng lập bản đồ gen (bản đồ vị trí, physical map).

Để tạo thư viện bộ gen BAC ở bò, người ta dùng mẫu máu, tách

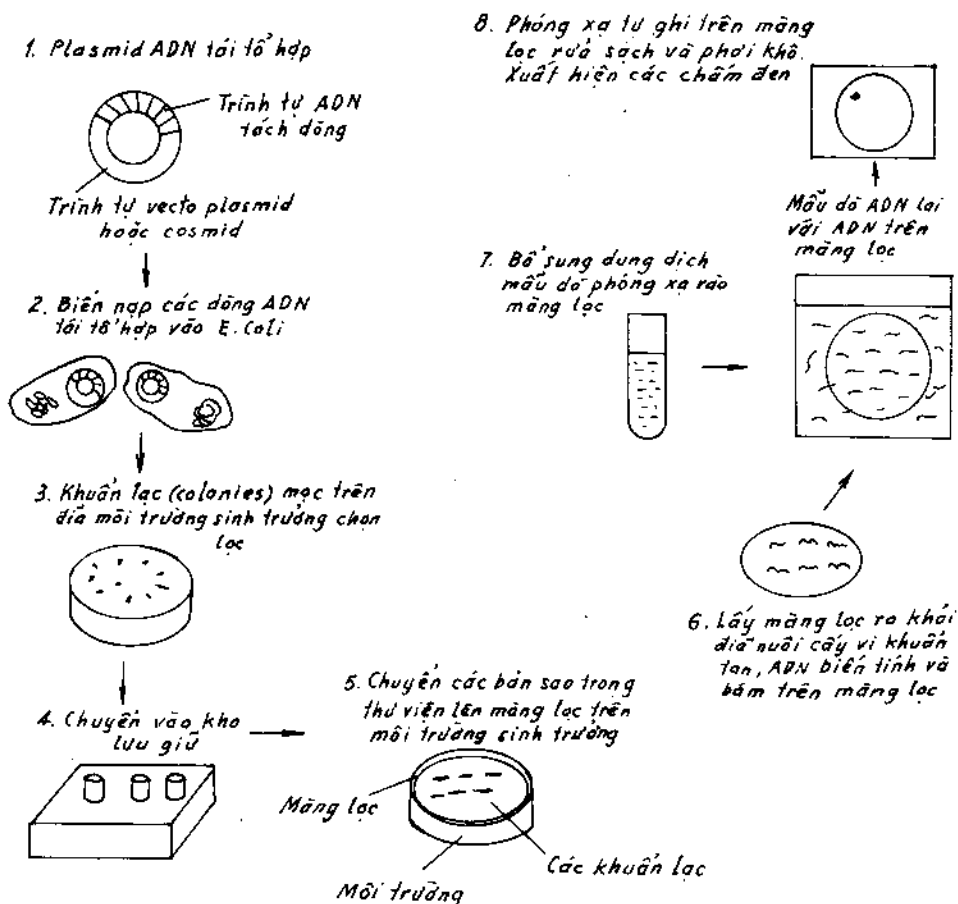
bạch cầu, phân lập ADN bằng phân giải (lysis), phân huỷ proteinaza và rửa sạch ADN, cắt đoạn bằng Hind III và Hind I và điện di trên gel.

Các đoạn ADN thích hợp được tách khỏi gel để xây dựng thư viện bộ gen BAC.

ADN có kích thước phù hợp được chọn ra, gắn vào vector pBelo BAC II (Shizuya, 1992) và biến nạp vào các tế bào Electro Max DH 10B (Gibco BRL) qua xung điện.

Các dòng BAC này được lưu giữ trong các đĩa phân giải ở -80°C .

3. Phương pháp phát hiện các dòng cần tìm nằm trong một thư viện bộ gen (screening)



Hình 1. 18. Sơ đồ phát hiện dòng ADN trong thư viện bộ gen dùng plasmid hoặc cosmid làm vector.

Từ một thư viện bộ gen đã có, để phát hiện một dòng cần tìm, tức dòng tái tổ hợp, người ta có thể dùng nhiều phương pháp khác nhau.

Phương pháp thông dụng hiện nay là sử dụng mẫu dò oligonucleotide.

Phương pháp này cho phép phát hiện dòng cần tìm của một bộ gen, khi đã xác định được một tỷ lệ nhỏ trình tự axit amin của protein do gen nói trên mã hóa.

Protein này được tách chiết, làm tinh sạch, xác định vài trình tự ngắn (15-20 axit amin).

Trong số nhiều trình tự tương ứng, chọn ra một trình tự oligonucleotide phù hợp nhất. Trình tự này được tổng hợp ra với số lượng lớn, đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ.

Mẫu dò oligonucleotide được cho lai với thư viện bộ gen qua phương pháp lai *in situ* (lai tại chỗ). Dòng tái tổ hợp tức các đoạn ADN được bắt cặp với mẫu dò sẽ được phát hiện bằng phóng xạ tự ghi (radioautography) (h.I.18).

4. Lai tại chỗ

Hai yêu cầu quan trọng cần đặt ra trong kỹ thuật này là: bảo vệ được toàn vẹn thư viện bộ gen; bảo toàn được các trình tự axit nucleic đích (target sequences), tức các dòng cần phát hiện. Để đưa mẫu dò vào, phải xử lý màng tế bào (nếu là lai tại chỗ trên tiêu bản nhiễm sắc thể tế bào kỳ giữa), để có thể thẩm thấu, mẫu dò khuếch tán qua được, xử lý tế bào với paraformaldehyde. Dùng các nhân tố tạo bắt cặp như glutaraldehyde. Hầu như mọi loại tế bào hoặc mô, đều có thể tiến hành lai phân tử tại chỗ, bao gồm các tế bào biểu bì, tế bào thu nhận qua ly tâm hoặc mẫu cắt bọc paraffine.

Trước khi cho lai tại chỗ (*in situ* hybridization), axit nucleic trong tế bào phải được biến tính; các tiêu bản, slide phải được xử lý trước, sau đó mới đưa mẫu dò vào tế bào.

Các điều kiện cực thuận cho lai tại chỗ, như thời gian, nhiệt độ v.v... được xác định đối với từng đối tượng axit nucleic đem lai. Ví dụ, để lai axit nucleic của virus, thường phải qua đêm, ở nhiệt độ 37°C hoặc ở nhiệt độ cao hơn.

VI. THƯ VIỆN GEN TỪNG NHIỄM SẮC THỂ

1. Thư viện gen nhiễm sắc thể (specific library) của lợn

Lợn là gia súc cho thịt và hiện nay là một mô hình trong nghiên cứu sinh y học (biomedical). Nhiều thực nghiệm đã được tiến hành phân lập các chỉ thị (marker) di truyền để xác định sự di truyền của các locus tính trạng số lượng liên quan với các đặc điểm năng suất chủ yếu. Một loại chỉ thị di truyền đang được tập trung nghiên cứu là các *trình tự vệ tinh nhỏ* (microsatellite sequence), bởi vì các trình tự vệ tinh nhỏ này được phân bố ngẫu nhiên và có nhiều trong toàn bộ genom lợn (Johansson, 1992; Anderson, 1993; Rohrer, 1994). Vệ tinh nhỏ (microsatellite): hoặc còn gọi là *yếu tố lặp lại* (repeat element) như dG-dT)_n (dC-dA)_n, được *phân bố ngẫu nhiên* trong genom nhiều loại động vật (Slettan, 1993).

Các yếu tố lặp lại này có tính đa hình về độ dài rất lớn, để được phân loại, xác định qua PCR, dùng thuận lợi để xây dựng bản đồ di truyền.

1. 1. Xây dựng thư viện gen nhiễm sắc thể số 6 của lợn

Dùng bạch cầu máu ngoại vi, được kích thích bởi PHA (phytohemagglutinin). Nuôi cấy tách từng nhiễm sắc thể sau khi nhuộm với Hocchst 33258 và chromomycin A₁. ADN được tách từ nhiễm sắc thể 6, được phân cắt bằng *Sal* 3A, tách dòng vào pBluescript SKIII và khuếch đại qua PCR.

Các đoạn ADN 300- 600 bp được tách ra từ ADN khuếch đại và tách dòng để tạo ra thư viện gen của nhiễm sắc thể 6. Thư viện gen này mang 17 dòng.

Hiện đã tách được (phát hiện được, screen) nhiều đoạn lặp vệ tinh nhỏ (CA)_n, đã được dùng để xây dựng bản đồ gen chi tiết của lợn về một vùng mang các gen mã hóa các tính trạng năng suất cao về thịt, trong đó đã được phát hiện gen về hội chứng căng thẳng ở lợn (porcin stress syndrome, PSS).

Gen PSS, gen ryanodine receptor (ryr 1), gen calcium release channel (CRC, kênh thải canxi), thuộc một locus gắn với các gen về tính trạng số lượng ở lợn (Otsu, 1991).

Hội chứng stress còn làm tăng khả năng gây chết đột ngột ở lợn. Sự di truyền gen PSS có ảnh hưởng đến một loạt các tính trạng năng suất như hàm lượng thịt nạc cao cấp, thịt mỡ, thân (Welb, 1985).

Người ta cho rằng, các tính trạng thịt ở lợn là kết quả của một hoặc nhiều gen liên kết với gen PSS. Gen PSS đã được định khu trong nhiễm sắc thể 6 của lợn (6p11 → q21). (Harbitz, 1990).

2. Xây dựng thư viện gen nhiễm sắc thể của bò qua vi khuẩn (bovine bacterial artificial chromosome library) - BAC

Công nghệ *nhiễm sắc thể nhân tạo qua nấm men, YAC (Yeast artificial chromosome)* trước đây đã được phát triển để tạo ra các ADN xen đoạn lớn (Barke, 1987). *Một lưu trữ gen YAC ở bò* đã được thiết lập, có kích thước trung bình đoạn xen là 750 kb (Libert, 1993).

Tuy nhiên, đối với lưu trữ gen YAC, có một số khó khăn.

Đầu tiên, hiệu quả tạo dòng chậm (Smith, 1990).

Thứ hai, khó phân lập ADN tách dòng, bởi vì các tế bào nấm men có thành tế bào cứng và phân tử ADN đường thẳng dài dễ bị đứt gãy trong quá trình tách chiết từ tế bào nấm men.

Thứ ba, các dòng YAC thường là dạng khảm, bao gồm các đoạn ADN từ các vùng khác nhau của genom đích (target genom) (Greau và Olson, 1990).

Đoạn xen càng lớn, nó càng thuộc dạng khảm (Anderson, 1993). Cuối cùng, ở YAC còn thường bị mất đoạn (Anderson, 1993). Dạng khảm và mất đoạn gây nhiều khó khăn lớn.

Để thay cho YAC, thì *BAC (bacterial artificial chromosome)*, tức *lưu trữ gen nhiễm sắc thể nhân tạo qua vi khuẩn* có thể tạo dòng và duy trì ổn định các đoạn ADN của genom hơn 300 kb (Shizuya, 1992). Hệ thống *vector BAC dựa trên yếu tố F của Escherichia Coli*.

Yếu tố F có khả năng duy trì ổn định và truyền lại cho các thế hệ tế bào của quần thể vi khuẩn.

Yếu tố F không chỉ mã hoá các gen tự sao, mà cũng gồm 2 gen, *parA* và *parB*, kiểm tra số lượng bản sao cho 1 tế bào (Villets, 1987). Số lượng bản sao cho 1 tế bào thấp sẽ làm giảm khả năng tái tổ hợp giữa

các plasmid và bước đầu nghiên cứu còn cho thấy *mức độ dạng khảm ở BAC thấp hơn YAC nhiều*.

Yếu tố F thuận lợi cho việc tạo dòng các đoạn ADN lớn, nó có thể mang và duy trì ADN xen đoạn lớn hơn 1 megabase (Low, 1987).

Số liệu từ lưu trữ gen BAC ở người cho thấy biến nạp có hiệu quả 10-100 lần lớn hơn ở men bia. Thao tác với ADN tách dòng ở BAC dễ hơn ở YAC vì ADN vi khuẩn xoắn hơn, ADN vòng plasmid khó đứt gãy hơn.

ADN người trong vector BAC được rất ổn định sau 100 thế hệ (Shizuya, 1992). Hệ thống BAC tỏ ra là 1 hệ thống thuận lợi để tách dòng các đoạn ADN lớn dùng lập bản đồ gen.

Để tạo lưu trữ gen BAC ở bò, người ta dùng *mẫu máu* từ bò đực thuần Angus. Tế bào bạch cầu được tách ra, phân lập ADN bằng phân giải (*lysis*), phân huỷ proteinaza K và rửa ADN. ADN có trọng lượng phân tử lớn được phân giải (*digested*) từng phần bằng cắt giới hạn. Điều kiện phân giải cực thuận được xác định qua *điện di trên gel trường xung* (*pulsed field gel*) và các đoạn ADN thích hợp được tách khỏi gel để xây dựng bộ lưu trữ gen BAC. Có 2 enzym cắt giới hạn được dùng để xây dựng lưu trữ gen BAC: *Hind III* và *Hind I*. ADN có kích thước chọn lựa được gắn vào vector *pBelo BACII* (Shizuya, 1992)IM và biến nạp vào các tế bào *Electro Max DH 10B* (Gibco BRL) qua xung điện.

Người ta sử dụng cách chọn dòng xanh-trắng để phát hiện các dòng có chứa ADN plasmid và các đoạn xen. Các dòng BAC này được lưu giữ trong các đĩa phân giải ở -80°C .

3. Xác định vị trí gen somatostatin trên nhiễm sắc thể bò 1q²³-q²⁵ qua lai tại chỗ

Somatostatin có tác động lên hoạt động tiết hormone sinh trưởng và các hormone khác. Somatostatin đã được định vị trên nhiễm sắc thể của người, nhiễm sắc thể số 3. 3q 28 (Zabel, 1983). Tiêu bản nhiễm sắc thể bò được thiết lập từ máu một bò đực Charolais (59, XY 1; 29tt), tức một bò đực đồng hợp thể về chuyển đoạn 1; 29. Các slide có các chỉ số nguyên phân tốt được bảo quản ở 4°C , tối thiểu 2 tuần.

Một số bản trung kỳ được hiện bằng R (Verma và Babu, 1989) để bảo đảm vị trí bằng chính xác của tín hiệu lai.

Để lai phân tử tại chỗ, người ta dùng mẫu dò genom somatostatin của người, được đánh dấu phóng xạ với tritium. Kỹ thuật lai tại chỗ được tiến hành theo phương pháp Pardue (1985), kèm một số cải tiến. Slide được đặt vào 2XSSC trong 30 phút ở 65°C, khử nước (dehydrated) với alcohol, sau đó rửa trong 2XSSC ở nhiệt độ trong phòng. ADN nhiễm sắc thể bò được biến tính 0.07 N NaOH, qua 3 phút ở nhiệt độ trong phòng, và khử nước với alcohol. Lai tại chỗ được tiến hành trong 1 phòng âm, 18 giờ ở 40°C.

Sau khi lai, mẫu được rửa 3 lần 7 phút trong 2XSSC ở nhiệt độ trong phòng, 1 lần 15 phút trong 2X SSC ở 65°C và 10 lần 10 phút trong 2XSSC, sau đó khử nước, trước khi cho vào phóng xạ tự chụp.

Slide được phủ một lớp huyền dịch nhạy cảm tia xạ, dùng trong phóng xạ tự ghi (autoradiographic emulsion) và để ở nhiệt độ trong phòng 7-12 ngày. Cho tia xạ tác động lên huyền dịch.

Sau phóng xạ tự ghi, slide được phóng đại, nhuộm Giemsa, đem quan sát, phân tích dưới kính hiển vi, các điểm lai (points of hybridization), tức các hạt được hiện lên, nằm trong lớp huyền dịch, ngay ở các vị trí có các đoạn lai. Khi phát hiện một hạt (grain), ở đây là trên nhiễm sắc thể 1; 29, hạt này được ghi lên một idiogram theo tiêu chuẩn quốc tế ISCNA (1989), theo vị trí của nó dọc nhiễm sắc thể. Dùng test Zmar (Eweus, 1992) để xác định ý nghĩa thống kê.

Đây là phương pháp được sử dụng rộng rãi hiện nay để xây dựng bản đồ vị trí (physical map) ở nhiều loài.

Nghiên cứu sự tiến hoá của cấu trúc genom qua so sánh các bản đồ vị trí gen, qua mối liên quan của các gen tương đồng (orthologous) ở các loài khác nhau. Người ta đã xác định gen uridine monophosphat synthase (UMPS) nằm trên nhiễm sắc thể số 3 của người, 3q13 (Qumsiych, 1989). Cùng gen này, nhưng của bò, lại nằm trên nhiễm sắc thể số 1 1q31 (Ryan, 1994) và 1q34- q36 (Friedl, 1994). Các số liệu nêu trên cho thấy có sự tương đồng (homology) giữa nhiễm sắc thể 1 của bò và cánh dài nhiễm sắc thể 3 của người.

Về gen somatostatin cũng là một dẫn liệu về sự tương đồng nêu trên, gen somatostatin ở bò nằm trên nhiễm sắc thể số 1, cũng gen này ở người là nằm trên nhiễm sắc thể số 3.

Các tư liệu thực nghiệm nêu trên về các gen tương đồng cho phép giả thiết là có sự định hướng đảo ngược (inverted orientation) của nhiễm sắc thể 3 của người với nhiễm sắc thể 1 của bò.

Chương II

DI TRUYỀN TẾ BÀO ĐỘNG VẬT

A. DI TRUYỀN HỌC TẾ BÀO

Di truyền học tế bào (cytogenetics) là một lĩnh vực nghiên cứu trong đó các đặc điểm di truyền và đặc điểm phân tử của gen được nghiên cứu song song với các đặc điểm tế bào học của nhiễm sắc thể và của ADN nhiễm sắc thể, qua sử dụng kính hiển vi.

Các tư liệu song song về di truyền học và tế bào học hoặc các thông tin về di truyền tế bào học cung cấp cho ta các bằng chứng độc lập qua đó một số kết luận, khẳng định về hệ thống di truyền có thể được minh họa khách quan hơn và chính xác hơn.

Các nguyên lý bao trùm di truyền học tế bào suốt thời kỳ hoàng kim của nó, từ giữa 1920 đến 1940, ngày nay được vận dụng trong các nghiên cứu hiện đại, ở mức toàn bộ nhiễm sắc thể, thấy được qua kính hiển vi ánh sáng, và ở mức ADN qua kính hiển vi điện tử, cùng các kỹ thuật liên quan.

Sự hồi sinh, phát triển lâu của di truyền học tế bào từ 1960, xuất phát từ nhiều phương pháp mới, cho phép đi sâu quan sát, nghiên cứu, phân tích nhiễm sắc thể và ADN nhiễm sắc thể.

Các rối loạn về cấu trúc và các biến đổi về số lượng trong genom là nguồn cung cấp các dạng chủ yếu của hệ thống nhiễm sắc thể trong đó hoạt động di truyền được bộc lộ và mô tả.

Các biến đổi của nhiễm sắc thể làm cơ sở vững chắc cho thuyết nhiễm sắc thể của di truyền và từ đó mà khẳng định được gen là các đoạn nucleotid trong phân tử dài ADN xoắn kép.

Nhiều dạng rối loạn bất thường của nhiễm sắc thể hoặc các biến đổi

về số lượng được xem là rất quan trọng trong tiến hóa các loài, cũng như giúp cho ta xác định được từng cá thể, cơ thể.

Các biến đổi cấu trúc của nhiễm sắc thể cung cấp cho ta các hệ thống tư liệu để xây dựng bản đồ gen của người trên từng nhiễm sắc thể.

Đối với y học, di truyền học tế bào y học là một lĩnh vực rất quan trọng trong chẩn đoán, xét nghiệm. Sử dụng các kỹ thuật tinh vi để phân tích ở mức phân tử các genom của sinh vật nhân chuẩn, người ta có thể thu được các thông tin về nhiều gen mà với phương pháp phân tích di truyền thì không bao giờ có được, bởi vì các đột biến hầu như không thể xác định được trong những lôcut này.

Phương pháp lai phân tử, phương pháp phân tích chuỗi kép dị hợp (heteroduplex analysis) bằng kính hiển vi điện tử và một số phương pháp hiện đại khác đã nêu ra nhiều triển vọng mới để có thể phân tích tinh vi hơn cấu trúc genom.

Từ đó, genom của sinh vật nhân chuẩn ngày nay cũng đã có thể được phân tích đi sâu chi tiết, tinh vi, điều mà trước đây người ta cho là chỉ có thể tiến hành trên vi khuẩn và virus.

Các nghiên cứu phát hiện về nhiễm sắc thể sinh vật nhân chuẩn vào cuối 1800 đã dẫn tới sự phục hồi, công nhận các định luật di truyền của Mendel vào năm 1900, và từ đó hình thành học thuyết di truyền nhiễm sắc thể của Sutton.

Tính chất song song giữa đặc điểm của gen qua phân tích di truyền và đặc điểm của nhiễm sắc thể qua nghiên cứu với kính hiển vi, đã được thiết lập, làm cho di truyền tế bào học trở thành một lĩnh vực phát triển đi sâu của di truyền học.

B. DI TRUYỀN TẾ BÀO HỌC PHÂN TỬ

Phương pháp chủ yếu của di truyền học tế bào học phân tử (molecular cytogenetics) là:

- lai phân tử (molecular hybridisation);
- các kỹ thuật phát triển lai tại chỗ (*in situ* hybridization);

- quan sát trực tiếp ADN và nhiễm sắc thể trên kính hiển vi điện tử.

Phát hiện gen vùng tạo hạch nhân (NOR) cũng như tổ chức của các gen lặp lại (repeated genes) *r*-ARN là một ví dụ.

Thành tựu rõ nhất của di truyền học tế bào phân tử là nghiên cứu *r*-ADN một bộ phận của genom mã hóa *r*-ARN.

Thể đột biến đã được phát hiện là dòng xenopus mất hạch nhân (anucleolate) làm đối tượng thực nghiệm chứng minh vùng tạo hạch nhân (nucleolar organising region) là một site gồm gen *r*-ARN. Qua lai phân tử và lai tại chỗ trên xenopus và các loài khác, người ta đã định vị được *r*-ADN trong genom và tính toán được số các bản sao của gen *r*-ARN.

Các nghiên cứu phân tích đã từng bước làm rõ các vấn đề:

Gen *r*-ARN được sắp xếp như thế nào trong các ADN lặp lại ở vùng tạo hạch nhân? Chúng sắp xếp theo thứ tự nào? Các vùng của ADN có nằm giữa các gen lặp lại *r*-ARN không? Gen *r*-ARN có phải là một trình tự liên tục (continous sequence) các thông tin mã hóa *r*-ARN không?

Oscar Miller, 1969, quan sát bằng kính hiển vi điện tử ADN của ribosom hoạt hoá (tức *r*-ADN, cũng là gen *r*-ARN), trong quá trình đang xảy ra sao mã *r*-ARN, đã cho thấy các gen *r*-ADN được sắp xếp theo thứ tự nhưng bị phân đoạn bởi các vùng ADN không sao mã (nontranscribing spacer DNA region, tức noncoding DNA "spacers"). Các ADN không sao mã xen giữa các gen *r*-ADN trong ADN lặp lại. được Miller gọi là ADN "spacer", chức năng chưa rõ, nhưng ADN spacer có đặc tính khác các loại trình tự ADN lặp lại khác đã được nghiên cứu. Rõ nhất là chúng không có chức năng mã hoá và do đó không sao mã. Donald Brown đã phân tích cấu trúc của nucleotid ADN trong *r*ADN của xenopus, bằng lập bản đồ biến tính và lập bản đồ cấu trúc kép dị hợp (denaturation mapping and heteroduplex mapping) qua kính hiển vi điện tử.

Ross Imman đã chứng minh là các ADN virus có thể được giải mã qua biến tính, trong đó các vùng giàu A-T được tách riêng với các vùng giàu G-C, vì các vùng A-T kém bền vững hơn và được tách thành mạch đơn nhanh hơn các vùng G-C. Các cặp A-T có liên kết đôi hydro, còn các cặp G-C có liên kết 3, bền vững hơn trong điều kiện biến tính.

Xử lý bằng nhiệt và alkali, dễ gây biến tính *r*-ADN của xenopus.

Brown đã phát hiện một trình tự *r*-ADN lặp lại chứa đồng thời các vùng biến tính và vùng không biến tính. Qua xác định kích thước các vùng này trên kính hiển vi điện tử, đã phát hiện là các vùng biến tính ứng với các ADN spaces, trong khi ấy các vùng sợi kép ứng với các trình tự gen *r*-ADN.

Kích thước gen khoảng 0,8 μm và kích thước spacer dài khoảng 4 μm .

Từ đây, người ta chứng minh được spacer là các vùng giàu A-T nằm giữa các gen *r*ADN giàu G-C hơn.

Liệu các loài *xenopus* khác nhau có cùng những trình tự nucleotid trong *r*-ADN không? Người ta đã phát hiện là những vùng mã hoá đều như nhau vì các trình tự *r*-ARN của các loài khác nhau đều phải có cấu trúc thành phần base như nhau hoặc tương tự, khi người ta cho nóng chảy biến tính và sau đó cho kết hợp lại thành cấu trúc kép dị hợp (heteroduplex) giữa trình tự *r*-ADN của *Xenopus laevis* và *Xenopus mulleri*, người ta sẽ qua kính hiển vi điện tử so sánh trực tiếp được những sai khác và tương đồng của phân tử kép lại. Như ta đã biết, ở eukaryote, có 4 loại ARN: 28S gồm 4500 nucleotid; 18S gồm 1900 nucleotid; 5,8S gồm 200 nucleotid; 5S gồm 200 nucleotid. (S là đơn vị hệ số lắng, swedberg unit).

Di truyền tế bào học phân tử đã sử dụng nhiều kỹ thuật mới trong kỹ thuật nhiễm sắc thể (chromosome engineering). Từng nhiễm sắc thể được tách ra qua: hình thái, kích thước hoặc trình tự ADN riêng, như trường hợp nhiễm sắc thể người.

Phương pháp có hiệu quả nhất để tách riêng từng nhiễm sắc thể là phương pháp Flow cytometry. Các nhiễm sắc thể trong tế bào ở pha nguyên phân của chu kỳ tế bào, được nhuộm với thuốc nhuộm huỳnh quang. Các nhiễm sắc thể tách ra, được cho qua một chùm tia laser, nối với một máy dò ánh sáng. Hệ thống này sẽ phân loại và tách vùng trên nhiễm sắc thể dựa trên các sai khác nhuộm màu và hệ phân giải ánh sáng.

C. NGHIÊN CỨU HÌNH THÁI NHIỄM SẮC THỂ

Hình thái nhiễm sắc thể được xác định qua các tiêu bản kỳ giữa của tế bào soma. Chiều dài nhiễm sắc thể, chiều dài tương đối các cánh để

xác định vị trí hạt trung tâm (tâm động) (centromere location) v. v., cũng như các đặc điểm chung của gen cấu tạo nhân nhỏ (hạch nhân) (nucleolar organiser), tất cả làm thành các đặc thù của nhiễm sắc thể. Sự phát triển của phương pháp nhuộm phân hóa (hiện băng, banding techniques), làm hiện lên các băng chính và băng xen (interband) trên nhiễm sắc thể tế bào soma, cho ta khả năng xác định chính xác từng nhiễm sắc thể riêng rẽ của cá thể, nhất là khi giữa các nhiễm sắc thể khác nhau lại có sự tương ứng, giống nhau về hình thái, kích thước.

Hình thái nhiễm sắc thể theo vị trí tâm động (centromere location)

Tâm ngọn (ở đầu)	Aerocentric
Tâm giữa	Metacentric
Tâm gần giữa, tâm lệch	Submetacentric
Tâm mút	Telocentric

CÁC CHỈ SỐ DI TRUYỀN TẾ BÀO

Để phân tích hình thái nhiễm sắc thể, người ta đã đưa ra các chỉ số di truyền tế bào. Dưới đây là các chỉ số quan trọng.

1. Các chỉ số để thiết lập nhiễm sắc thể đồ (idiogramme)

1. 1. Chỉ số tâm động (centromeric index)

I^c để xác định một nhiễm sắc thể theo hình thái

$$I^c = \frac{\text{chiều dài trung bình cánh ngắn}}{\text{chiều dài trung bình toàn bộ nhiễm sắc thể}} \times 100$$

1. 2. Chiều dài tương đối của nhiễm sắc thể: L^R

$$L^R = \frac{\text{chiều dài trung bình của mỗi nhiễm sắc thể}}{\text{chiều dài trung bình toàn bộ đơn bội nhiễm sắc thể}} \times 100$$

1. 3. Vị trí tâm động (centromere location)

được biểu thị qua tỷ số cánh dài trên cánh ngắn của nhiễm sắc thể (arm ratio) q/p q : cánh dài; p : cánh ngắn.

1. 4. Số lượng cánh của nhiễm sắc thể

Ví dụ: Có 16 NST tâm cân

42 NST tâm mút

thì $N^P = 32 + 42 = 74$. (NST: nhiễm sắc thể)

2. Vị trí tâm động (centromere location) đã được xác định theo Levan, 1964

M	Chính giữa	Median point	1
m	Vùng giữa	Median region	1 - 4,7
Sm	Vùng gần giữa	Submedian region	1,7 - 3
S ₁ - t	Vùng gần tận	Subterminal region	
	và		3 - 7
	Vùng tận	Terminal region	

3. Công thức kiểu nhân

Công thức kiểu nhân cần nêu rõ, trong 2n nhiễm sắc thể có bao nhiêu :

M :	Metacentric	Tam cân (tâm giữa)
Sm :	Submetacentric	Tâm lệch
St :	Subterminal	Tâm lệch mút
T :	Telocentric	Tâm mút

D. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU NHIỄM SẮC THỂ ĐỘNG VẬT

I. PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY TẾ BÀO ĐỘNG VẬT (TISSUE CULTURE) ĐỂ LÀM TIÊU BẢN NHIỄM SẮC THỂ

1. Điều kiện

Để có thể đo, đếm, phân tích, xếp loại nhiễm sắc thể tiến tới xác lập kiểu nhân, người ta phải có tiêu bản nhiễm sắc thể kỳ giữa (metaphase).

Đối với đối tượng là con người, phương pháp nuôi cấy được tiến hành trên lympho bào máu ngoại vi, như máu lấy ở tĩnh mạch.

Trên đối tượng gia súc, bò, trâu, lợn v. v..., người ta cũng sử dụng phương pháp như trên, nuôi cấy máu *in vitro*.

Ở bò, máu được lấy ở tĩnh mạch cổ hay tim. Trên lợn, ở Việt Nam chúng ta đã bắt đầu có cải tiến, lấy máu từ tĩnh mạch nằm sâu trong móng mắt. (Phan Đăng Dương, 1993), hoặc từ tĩnh mạch tai, có nhiều ưu điểm hơn so với các phương pháp trước đây, thời gian lấy mẫu nhanh, ít chảy máu sau khi thao tác.

Mục tiêu kỹ thuật nuôi cấy là tạo điều kiện để *kích thích sự đồng bộ hoá (synchronisation)*, để có nhiều tế bào nguyên phân ở kỳ giữa trong môi trường nuôi cấy nhân tạo.

Nguyên lý chung là cho tế bào bạch huyết (lymphocyte) tiếp xúc với chất *Phytohemagglutamin* (PHA), chúng sẽ được tăng *khả năng phân chia*. Tế bào to ra, ưa kiềm, được biệt hóa vùng sáng quanh nhân, đây là hiện tượng lymphoblast hoá (nguyên bào bạch huyết). Khi tế bào đang phân chia trong môi trường nuôi cấy, người ta dùng colchixin để ức chế ở giai đoạn kỳ giữa. Tế bào được cố định, đưa lên lam kính, để tế bào vỡ tung, giải phóng làm bung các nhiễm sắc thể, rời nhau ra, sau đó là nhuộm màu.

Tiêu bản nhiễm sắc thể được phân tích, quan sát hình thái, đo, đếm, chụp ảnh hiển vi, để trình bày kiểu nhân (karyotype), đồng thời cắt, xếp loại, thiết lập nhân đồ (karyogram, idiogram) theo quy ước quốc tế.

2. Làm tiêu bản nhiễm sắc thể ở tế bào tuỷ xương

Tiêu bản nhiễm sắc thể có thể tiến hành xác lập trên tế bào tuỷ xương, với các kỹ thuật phù hợp từng đối tượng.

Trên chuột nhắt trắng (*Mus musculus*), người ta phải tiêm colchemid vào màng bụng chuột trước khi làm tiêu bản 2- 4 giờ, với tác dụng để colchemid làm ngừng phân chia tế bào ở kỳ giữa. Người ta mổ lấy xương đùi chuột, cắt bỏ hai đầu xương, dùng bơm tiêm dung dịch Hanks qua ống tuý để rút tế bào tuỷ.

3. Nuôi cấy máu *in vitro* ở bò

Người ta kích thích sự đồng bộ hóa (synchronisation) khi nuôi cấy để có nhiều tế bào nguyên phân ở kỳ giữa.

3. 1. Nguyên lý

Khi tế bào bạch huyết của máu tiếp xúc với chất phytohemagglutinin (PHA) thì có khả năng phân hóa mạnh. Tế bào to ra, ưa kiềm, biệt hóa vùng sáng quanh nhân gọi là hiện tượng nguyên bào bạch huyết (lymphoblast) hóa. PHA kích thích các lymphocyte trở lại đời liên vòng để sinh ra kháng thể. Khi tế bào phân chia, dùng colchixin ức chế ở giai đoạn kỳ giữa (cần lượng colchixin hợp lý). Cố định từng tế bào trên phiến kính.

3. 2. Phương pháp nuôi cấy máu bò vi lượng (micro)

Bơm tiêm, tráng heparin, lấy máu tĩnh mạch cổ hay tim. Lấy vào lọ nuôi gồm:

- | | |
|-----------|--------|
| - Parker | 6ml |
| - Serumbê | 2ml |
| - PHA | 1 giọt |
| - Máu bò | 6 giọt |

Đưa vào phích đá (khi cần di chuyển) 1 - 1 giờ 30 phút. Chuyển vào tủ ấm 37°C - Nuôi 72 giờ. Nhỏ vào mỗi lọ 2 giọt colchixin để nuôi tiếp 2 giờ. Ly tâm 800 vòng/ phút trong 5 phút. Hút bỏ phần trên và gậy choáng bằng dung dịch G.C (nồng độ thích hợp). Để tủ ấm tiếp 10 phút, ly tâm bỏ phần trên, thay bằng 2-3ml dung dịch cố định Carnoy. Để nhiệt độ bình thường 10 phút, ly tâm loại phần trên. Cố định từng tế bào trên phiến kính đã làm bằng lạnh. Nhuộm Giemsa hay Bleuunna.

4. Nuôi cấy tế bào bạch huyết trâu ở dê

Lấy 8 giọt máu ngoại vi, cho vào một ống đựng 4ml RPMI hoặc F₂ medium, 1ml huyết thanh bê và 0.1ml phytohemagglutinin. Ủ ở nhiệt độ 37°C trong 72 hoặc 96 giờ. Đưa xử lý với 0,0004 colchixin/ 10ml nước cất trong 30 phút và đem nhuộm với Giemsa trong 4 phút.

5. Nuôi cấy tế bào người và làm tiêu bản nhiễm sắc thể để tiến hành lai tại chỗ (*in situ* hybridization)

Lấy 1.0ml máu ngoại vi có xử lý heparin, cho vào 9.0ml RPMI 1640 medium, bổ sung 15% huyết thanh bê (CM) và 0.1ml phytohemagglutinin (M form) (Gibco laboratories, Grand Island, New York). Sau khi ủ

72 giờ, bổ sung methotrexate (10^{-5} M) (Lederle, Pearl River, New York) và ủ tiếp 17 giờ. Rửa ly tâm (1200 rpm) trong 8 phút, rửa 2 lần với dung dịch muối cân bằng Hank's (HBSS), và ủ lại trong 5 giờ trong CM có chứa thymidine (10^{-5} M) (Sigma, St. Louis, Missouri). Bổ sung colcemid (13.5×10^{-6} M) trong 15 phút trước khi thu hoạch. Chọn lọc tế bào, ly tâm, xử lý lại trong 0.075 M KCl trong 15 phút ở 37°C và cố định 3 lần trong methanol-axit axetic (acid acetic) tuyệt đối (3:1). Hong nhuộm sắc thể để khô trong không khí, đưa vào lại tại chỗ.

II. NHIỄM SẮC THỂ Ở CÁC ĐỘNG VẬT BẬC CAO

1. Nhiễm sắc thể ở một số động vật bậc cao gia súc, gia cầm

Bảng II.1. Số lượng bội (2n) nhiễm sắc thể ở một số loài động vật

Loài	2n
Người (<i>Homo sapiens</i>)	46
Động vật	
Tinh tinh (<i>Anthropopithecus</i>)	48
Bò (<i>Bos taurus</i>)	60
Bò u (<i>Bos indicus</i>)	60
Lợn (<i>Sus scrofa</i>)	38 hoặc 40
Ngựa (<i>Equus caballus</i>)	66
Chó (<i>Canis familiaris</i>)	78
Mèo (<i>Felis domesticus</i>)	38
Thỏ (<i>Lepus cuniculus</i>)	44
Gà (<i>Gallus gallus</i>)	78
Ngan (<i>Carina moschata</i>)	80
Vịt nhà (<i>Anas platyrhynchos</i>)	80
Bồ câu (<i>Columba livia</i>)	80
Ông mắt (<i>Apis mellifera</i>)	32-16
Chuột nhà (<i>Mus musculus</i>)	40
Ếch (<i>Rana esculenta</i>)	26
Ruồi dấm (<i>Drosophila melanogaster</i>)	8
Ruồi (<i>Musca domestica</i>)	12
Gián (<i>Blatta orientalis</i>)	48
Giun đất (<i>Lumbricus terrestris</i>)	36
Giun đũa (<i>Ascaris megalocephala</i>)	2-4

Bảng số liệu trên đây cho thấy rõ, số lượng nhiễm sắc thể không mang ý nghĩa tiến hóa.

Người ta đã thấy các loài sinh vật khác biệt nhau về mặt tiến hóa, không phải là ở số lượng nhiễm sắc thể, mà chủ yếu là về bản chất vật chất di truyền, thành phần gen chứa trong bộ nhiễm sắc thể.

2. Nhiễm sắc thể ở các động vật bậc cao

Tinh tinh, (Chimpanzee, *Pan troglodytes*) và người (*Homo sapiens*), là thuộc các giống (genus) *Pan* và *Homo*, nhưng Gorilla Orangutan rất giống nhau về các đặc điểm giải phẫu và sinh lý, cũng như về thành phần ADN và protein. Khi so sánh bộ nhiễm sắc thể hiện bang của người và của một số động vật bậc cao, như tinh tinh (Chimpanzee), Gorilla Orangutan, người ta thấy có những điểm giống nhau khá cơ bản, kèm theo một số chi tiết về cấu trúc lại nhiễm sắc thể.

Số nhiễm sắc thể của người là $2n = 46$, ở các động vật bậc cao kể trên là $2n = 48$. Người ta đã xác định được các cặp cùng nguồn, và cấu trúc chung của nhiễm sắc thể được đối chiếu bằng với bang giữa các cặp.

Bộ nhiễm sắc thể hiện bang cho ta thấy, hai nhiễm sắc thể tâm ngọn (acrocentric) của các động vật bậc cao kể trên có cùng các bang với nhiễm sắc thể tâm lệch (tức tâm gần giữa, submetacentric) số 2 của người, dẫn tới sự tương đương của con số 46.

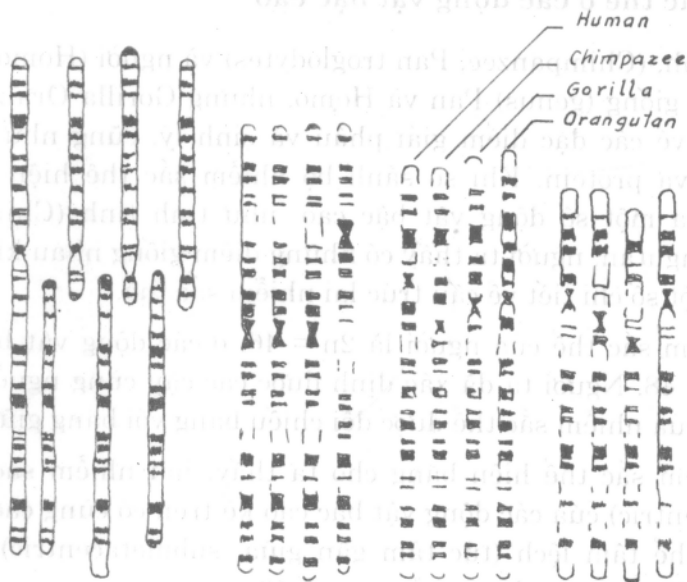
Nhiễm sắc thể số 2 của người là dài, thuộc tâm lệch, ứng với hai nhiễm sắc thể tâm ngọn của Chimpanzee, Gorilla, Orangutan, khi hai nhiễm sắc thể này được kết hợp nhau, sẽ hình thành một nhiễm sắc thể giống với nhiễm sắc thể số 2 của người.

Các bộ nhiễm sắc thể hiện bang còn cho thấy, người có quan hệ tiến hóa gần với Chimpanzee hơn so với Gorilla, và còn hơn nhiều so với Orangutan.

2. 1. Nhiễm sắc thể ở bò

Nhiều công trình nghiên cứu nhiễm sắc thể và kiểu nhân của các giống bò, bò ôn đới (*Bos taurus*), bò u nhiệt đới (*Bos indicus*), v. v., đều xác nhận, bò có số lượng bộ nhiễm sắc thể $2n = 60$, trong đó 29 cặp nhiễm sắc thể thường (autosome) là loại tâm ngọn (acrocentric), còn nhiễm sắc thể X thuộc loại tâm lệch giữa (submetacentric), (Gupta, 1974; Benamin và Bhat, 1977; Ford, 1980). Nhiễm sắc thể Y ở bò *Bos indicus* thuộc dạng tâm mút và tâm lệch giữa, còn ở bò *Bos taurus* lại thuộc dạng tâm giữa (metacentric) (Kieffer và Cartwright, 1968).

Ở Việt Nam, công trình nghiên cứu của Phạm Đức Lộ, 1980 cho thấy ở bò Việt Nam, $2n = 60$. Kiểu nhân được xếp thành 6 nhóm nhiễm sắc thể, từ lớn đến bé:



Hình II. 1 Nhiễm sắc thể của người và động vật bậc cao.

Trên mỗi cặp, từ trái sang phải, là nhiễm sắc thể của người, Chimpazee, Gorilla, Orangutan.

- **nhóm A** : gồm 2 cặp số 1 và số 2, có độ dài bằng nhau, 4,85 - 5,58 micromét (μm) tâm điểm đỉnh.

- **nhóm B** : gồm 6 cặp từ số 3 đến số 8, có độ dài ngắn dần, 3,8 - 4,55 μm , thuộc dạng tâm điểm đỉnh.

- **nhóm C** : gồm 6 cặp từ số 9 đến số 14, dài 2,95 - 3,7 μm , tâm điểm đỉnh.

- **nhóm D** : gồm 12 cặp, từ số 15 đến số 26 dài 1,94 - 2,77 μm , tâm điểm đỉnh.

- **nhóm E** : Gồm 3 cặp, từ số 27 đến số 29, nhỏ nhất, dài 1,34 - 1,79 μm .

- **nhóm nhiễm sắc thể giới tính**, XX hoặc XY; X thuộc dạng tâm giữa, dài 5,39 μm . Y dài 1,5 μm .

2.2. Nhiễm sắc thể ở trâu

Năm 1956, Bhattacharya và Datt là những người đầu tiên xác định số lượng bội nhiễm sắc thể ở trâu là $2n = 48$.

Ngay sau đó, 1974, Fisher, sử dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào, lại phát hiện ở trâu có cả số lượng bội nhiễm sắc thể $2n = 50$.

Chakrabarti, 1977, cũng phát hiện ở trâu có 24 cặp autosome, bao gồm 5 cặp dạng tâm lệch giữa và 19 cặp dạng tâm ngọn. Nhiễm sắc thể X ở trâu là nhiễm sắc thể tâm ngọn dài nhất.

Nhiễm sắc thể Y cũng thuộc dạng tâm ngọn, nhưng về hình thái, khó phân biệt với nhiễm sắc thể thường (autosome), cặp bé nhất. Yadav và Balkrishnan, 1982, cho hiện bằng C, khá rõ nét ở các nhiễm sắc thể tâm lệch giữa, phát hiện một dạng thể khảm (chimaeric) XX/XY và một trâu Murrah có thể ba (trisomy) XXX, bị rối loạn buồng trứng. Người ta cũng phát hiện được một trâu có đảo đoạn quanh tâm (pericentric inversion) ở nhiễm sắc thể tâm lệch giữa số 4.

2.3. Nhiễm sắc thể và kiểu nhân của lợn

Lợn nhà có nguồn gốc từ lợn rừng *Sus scrofa*, là một trong các gia súc đã được nghiên cứu phát hiện các đặc trưng của nhiễm sắc thể và kiểu nhân, thông qua phương pháp nuôi cấy bạch cầu và kỹ thuật hiện băng,

Năm 1972, Gustavsson, Hansen, Berger, đã nghiên cứu kiểu nhân hiện băng của lợn. Những năm sau, nhiều kỹ thuật băng khác nhau đã được áp dụng trên nhiều giống lợn, và kiểu nhân băng của lợn ngày càng được mô tả chi tiết hơn, nhiều sai lệch, cấu trúc lai trên nhiễm sắc thể lợn đã được phát hiện (Gustavsson, Popescu, ... 1984).

Kiểu nhân của lợn, được nghiên cứu chi tiết đã làm cơ sở để thiết lập bản đồ gen của lợn, qua phương pháp lai tế bào soma (Gellin, 1980).

Năm 1988, một tiêu chuẩn quốc tế về hiện băng kiểu nhân của lợn đã được công bố (Committee, 1988).

Từ lâu, nhiều kỹ thuật hiện băng đã được áp dụng trên nhiễm sắc thể lợn.

Băng Q (Gustavsson, 1972), băng G (Berger, 1972) đã đưa ra được các dấu hiệu đặc trưng của các cặp nhiễm sắc thể lợn, như số băng, vị trí các băng, giúp cho việc sắp xếp thứ tự các nhiễm sắc thể trong kiểu nhân được chính xác hơn.

Băng T (Dutrillaux, 1973) đã giúp cho việc phân biệt được nhiễm sắc thể số 9 và nhiễm sắc thể giới tính X, vì hai nhiễm sắc thể này

tương đối giống nhau về hình thái, kích thước (Fries, 1980; Hensen, 1980).

Băng C (Sumner, 1972) với các hóa chất nhuộm đặc hiệu, đã giúp phân biệt được các dạng khác nhau ở vùng tâm động, giàu dị nhiễm sắc chất. Ngoài tâm động ra, ở vùng xa tâm động của nhiễm sắc thể Y, cũng bắt màu đậm với băng C.

Ở lợn, kỹ thuật nhuộm bạc (silver staining), dùng AgNO_3 cũng phát hiện vùng NOR (nuclear organiser region) ở nhiễm sắc thể lợn (Mayr, 1981).

Ở Việt Nam, đã tiến hành hiện băng G nhiễm sắc thể và kiểu nhân lợn Móng Cái, lợn Đại Bạch, và lợn lai Đại Bạch x Móng Cái (Tô Cao Ly, Lê Minh Sát, 1998).

2.4. Nhiễm sắc thể của gia cầm

Tiêu bản nhiễm sắc thể gia cầm (gà, vịt,...) có thể được tiến hành trên tế bào phôi và tế bào tuỷ lông.

Ở gà (*Gallus gallus*), về bộ nhiễm sắc thể có nét riêng biệt, là bên cạnh số nhiễm sắc thể chính (nhiễm sắc thể lớn, macro chromosomes), còn có nhiều các vi nhiễm sắc thể, rất bé nhỏ, khó đếm chính xác (micro chromosomes). Số lượng bộ nhiễm sắc thể chính ở gà là $2n = 78$.

Hutt, 1964, và Hutt, Jull, Card, Nesheim đã xác định, gà trống có 78 nhiễm sắc thể, với nhiễm sắc thể giới tính là ZZ, gà mái có 77 nhiễm sắc thể, nhiễm sắc thể giới tính ZO.

Sau đó, với các tiến bộ trong kỹ thuật di truyền tế bào, người ta đã xác định con cái thuộc dị giao tử, với cặp nhiễm sắc thể giới tính là ZW. Nhiễm sắc thể Z thuộc dạng cân tâm (tâm giữa, metacentric), về kích thước là ứng với nhiễm sắc thể số 5 (theo trình tự kích thước từ lớn đến bé)

Hiện băng C làm nổi rõ các tâm động trên tất cả các nhiễm sắc thể chính.

Đối với vịt nhà (*Anas platyrhynchos*) và ngan (*Cairina moschata*), Hutt, 1964 và Bloom, 1969, đều xác định, số lượng bộ nhiễm sắc thể ở vịt và ngan là $2n = 80$. Vịt Việt Nam cũng có $2n = 80$ (Lê Minh Sát, 1993).

III. PHƯƠNG PHÁP NHUỘM PHÂN HÓA NHIỄM SẮC THỂ

1. Kỹ thuật hiện băng

Với sự phát hiện nhiễm sắc thể khổng lồ, di truyền tế bào học đã mở rộng được khả năng kiểm tra về mặt tế bào học các quá trình di truyền. Nghiên cứu tế bào học nhiễm sắc thể khổng lồ tuyến nước bọt ruồi dấm đã cho phép xác định đúng vị trí của hàng loạt gen trên nhiễm sắc thể để thiết lập bản đồ tế bào học. Mỗi nhiễm sắc thể khổng lồ của tuyến nước bọt ruồi dấm *Drosophila* chứa ADN nhiều gấp hàng 1000 lần so với nhiễm sắc thể tế bào sinh dục trong giảm phân. Các nhiễm sắc thể khổng lồ này được hình thành do sự tái bản của từng phân tử ADN trong mỗi tế bào sinh dục, thường được tái bản hàng chục lần nhưng không đi kèm sự phân ly của các sản phẩm tái bản ấy cho nhiễm sắc thể khác. Mỗi nhiễm sắc thể khổng lồ chứa khoảng 210 hoặc 1021 phân tử ADN, được liên kết nhau theo chiều dọc, hình thành nhiễm sắc thể nhiều sợi (polytene chromosome). Với kỹ thuật hiện băng mới ra đời, người ta đã nêu lên giả thuyết "một gen - một băng (band)" ở nhiễm sắc thể khổng lồ tuyến nước bọt ruồi dấm *Drosophila*.

Nhiều phân tích về di truyền học và tế bào học các vùng đặc biệt của nhiễm sắc thể tuyến nước bọt ruồi dấm *Drosophila melanogaster* đã làm rõ mối tương quan 1:1 giữa các gen và các băng (còn được gọi là các hạt nhiễm sắc, chromomeres).

B.H. Judd và cộng sự, trong một công trình nghiên cứu rất chi tiết, đã xác định được một số lớn các đột biến trong vùng của nhiễm sắc thể X, gồm 16 gen trong một đoạn của nhiễm sắc thể chứa 15 băng tách bạch nhau.

Cũng tương tự như vậy, nhiễm sắc thể số 4 của ruồi dấm *Drosophila* chứa 63 gen, thì cũng bao gồm từ 33 - 50 băng phù hợp với giả thuyết "một gen - một băng".

Kỹ thuật hiện băng (banding techniques) còn được gọi là nhuộm phân hóa được bắt đầu từ 1969, do T.C. Hsu nêu ra là một lĩnh vực mới của di truyền học tế bào, bao gồm các phương pháp, kỹ thuật nhuộm màu hiện đại đối với nhiễm sắc thể, làm nổi rõ các băng (band), nhuộm màu đậm, và các băng xen (interband), nhuộm màu nhạt, băng phụ (subband).

Băng được xem là từng phần của nhiễm sắc thể, được hiện lên, hoặc

đậm hơn, hoặc sáng hơn so với các phần kế bên, do tác dụng của các loại thuốc nhuộm đặc trưng khác nhau, tạo ra các giới hạn để phân biệt đặc thù sai khác giữa các nhiễm sắc thể.

Ngày nay, phương pháp hiện băng đã phát triển, hoàn thiện, hình thành nhiều kỹ thuật mới, hiện đại, với nhiều kiểu băng khác nhau, tùy theo từng đối tượng, vật liệu và tùy hóa chất nhuộm màu đặc trưng, trong đó thông dụng và ra đời sớm nhất, là *băng G*, được dùng cho nhiều loài nhất.

Tác dụng của phương pháp hiện băng là, trong các trường hợp có các nhiễm sắc thể khác nhau, nhưng về kích thước và hình thái lại giống nhau, thì chỉ sau khi nhuộm phân hóa, người ta mới phân biệt được chúng qua số lượng, thành phần và vị trí các băng được hiện lên.

Ngày nay, kỹ thuật hiện băng được sử dụng nhiều trên các động vật, vật nuôi, so sánh các kiểu băng trong các động vật có vú, chim, bò sát, lưỡng thê, cá, rất có ý nghĩa để nghiên cứu về di truyền giống, về chủng loại phát sinh. Mỗi quan hệ di truyền giữa các quần thể động vật, vật nuôi, có thể được xác định qua so sánh đặc thù của các băng hiện trên nhiễm sắc thể.

Kỹ thuật hiện băng có vị trí đặc biệt quan trọng để nghiên cứu sâu sắc hình thái nhiễm sắc thể (chromosome morphology) và hình thái kiểu nhân (karyomorphology) của các loài động vật, các giống vật nuôi.

Các băng hiện lên trên nhiễm sắc thể, được quy định *đánh số thứ tự từ tâm động* (centromere) *đi ra, dọc cánh ngắn* (p) và *cánh dài* (q) của nhiễm sắc thể.

1.1. Băng G

Băng G được nhuộm với thuốc nhuộm Giemsa, có tác dụng kết quanh các vùng có ADN, với đặc thù là phản ứng với *HCl* và *NaOH* có khác so với các vùng không hiện băng. Các băng G hiện lên, làm rõ các mức độ kết cuộn, cuộn xoắn khác nhau của ADN trong các vùng khác nhau của nhiễm sắc thể, giúp ta xác định chính xác từng nhiễm sắc thể và những phần nào của nhiễm sắc thể thuộc diện được cấu trúc lại.

Băng G được sử dụng phổ biến trên nhiễm sắc thể người, với các kỹ thuật ngày càng cải tiến.

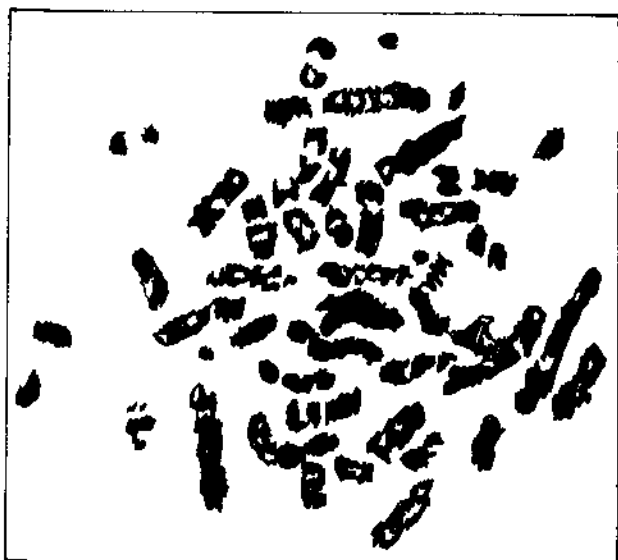
Tiêu bản nhiễm sắc thể được giữ ở tủ ấm 1-2 ngày, sau đó cho vào

dung dịch hỗn hợp natricitrat 0,03 M và NaCl 0,3 M, ở nhiệt độ 60°C, trong 120 - 150 phút. Tráng tiêu bản trong dung dịch đệm photphat pH 6,8-7,0, ở nhiệt độ 20- 25°C. Dung dịch đệm photphat là hỗn hợp dung dịch Na_2HPO_4 0,03 M và Kb_2PO_4 0,3 M. Sau đó, nhuộm tiêu bản trong dung dịch *Giemsa* 4%, pha trong đệm photphat [96ml dung dịch đệm photphat (phosphate buffer solution) + 4ml *Giemsa* mẹ (*Giemsa* stock solution)]. Sau khi nhuộm 5 phút, tiêu bản được tráng và rửa trong dung dịch đệm photphat.

Nhiều tác giả đã có các cải tiến, thay đổi các chi tiết nhỏ cũng như hoá chất khi hiện băng G trên nhiễm sắc thể của gia súc, lợn, bò.

Phương pháp hiện băng G chuẩn ở bò cho ra 310 băng (Lim, 1977; Ford, 1980)

Ở Việt Nam, công trình nghiên cứu kiểu nhân (karyotype) các giống lợn nội và lợn ngoại nuôi ở Việt Nam, đã tiến hành hiện băng G trên nhiễm sắc thể lợn Móng Cái. (Tô Cao Ly, Lê Minh Sát, Dương Thu Hương, 1998) (h.II.2 và h.II.3).



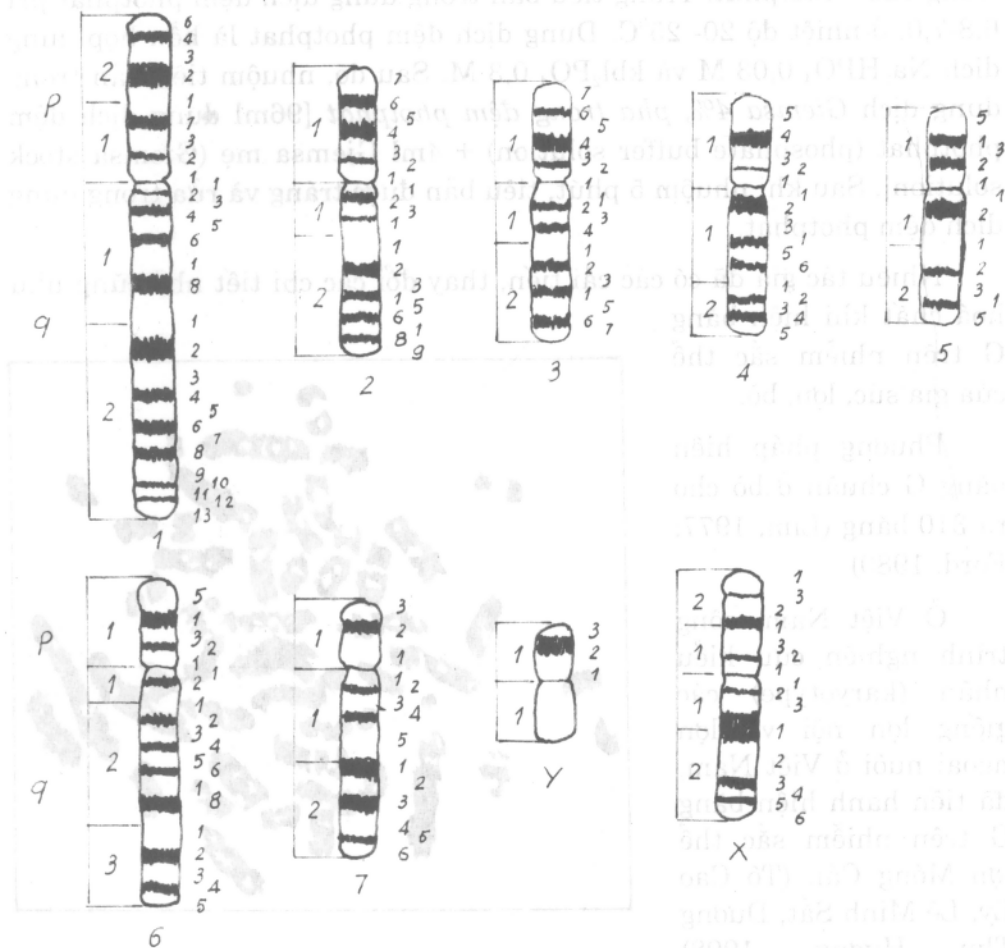
Hình II. 2. Băng G kiểu nhân lợn Móng Cái.

1.2. Băng C

Băng C thu được bằng nhuộm *Giemsa* tiêu bản nhiễm sắc thể, sau khi được xử lý trước bằng HCl và NaOH. Băng C có tác dụng làm hiện lên các vùng quanh tâm động (centromere) và các vùng chứa dị nhiễm sắc chất (heterochromatin), là những vùng chứa ADN lặp lại cao độ.

Để hiện băng C, tế bào được xử lý với 0,2 N HCl ở 20°C trong 1 giờ, sau đó xử lý với barium hydroxid bão hòa trong 10 phút, ở 25°C.

Tiêu bản được ủ trong đệm Strenseu, pH 6,8, trong 17 giờ ở 20°C, sau đó nhuộm *Giemsa* 2% trong 30 phút.



Hình II. 3. Idiogram băng G nhuộm sắc thể lợn Móng Cái.

1.3. Băng Q

Băng Q được phát triển từ lâu, qua nhuộm màu, nhuộm sắc thể với thuốc nhuộm quinacrine huỳnh quang. Các băng Q giàu các cặp A-T. Qua hiện băng G và băng Q, người ta đã xác định được đặc tính riêng của từng nhiễm sắc thể trong bộ 46 nhiễm sắc thể của người.

1. 4. Băng R

Trong kỹ thuật hiện băng R, nhuộm sắc thể được nhuộm sau khi xử

lý với đệm photphat pH 6.5 ở 87°C, để làm biến đổi ("làm tan") từng phần phân tử ADN thành dạng sợi đơn. Quá trình này làm giảm độ đậm màu của các phần nói trên. Các băng R đặc trưng cho các vùng nhiễm sắc thể chứa nhiều các cặp G- C nhất. Băng R cũng cho ra cùng kiểu như băng Q, nhưng ở dạng âm tính. Các băng Q ứng với các băng xen R và các băng xen Q ứng các băng R.

Các băng R có thể được nhuộm màu, hoặc với Giemsa, hoặc với acridine orange, là loại thuốc nhuộm cho ra, hoặc màu lục, hoặc màu cam huỳnh quang, phụ thuộc trạng thái ADN ở dạng chuỗi kép hay chuỗi đơn. Từ những năm 1980, phương pháp hiện băng đã được cải tiến, hoàn thiện hơn nhiều, như trên bò, lợn, ngựa, người ta dùng kỹ thuật hiện băng RBA.

1.5. Băng RBA

Đây là băng R, được bổ sung thêm BrdU (bromodeoxyuridine) và Acridine orange.

BrdU cho vào môi trường nuôi cấy tế bào, sẽ làm tăng kích thước của nhiễm sắc thể ở tiền trung kỳ (prometaphase) (D. Di. Beardine, Cytogenetics and cell genetics, 39, 1985) và (Leopoldo Iannuzzi, Gustavsson, ... 1989).

Trong phương pháp mới cải tiến này, người ta cũng nuôi cấy máu ngoại vi 72 giờ trong môi trường McCoy's 5A, có thêm huyết thanh 20%, kèm yếu tố chống vi khuẩn và chống nấm, cũng như tác nhân gây phân bào.

Sau 72 giờ, người ta cho thêm vào lọ nuôi cấy trong 14 giờ (tức qua đêm), hoặc thymidine (0.3 µg/ ml), hoặc methotrexate (0.05 µg/ ml), để kích thích sự đồng bộ hóa (synchronisation) tế bào.

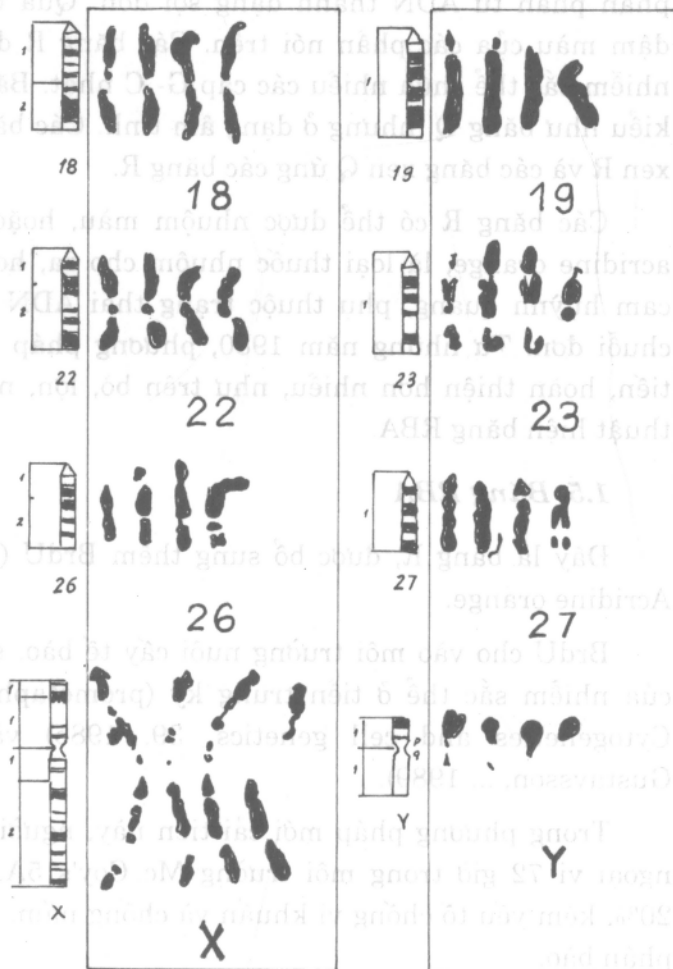
Đưa tế bào vào nguyên phân với BrdU (20 µg/ ml). Cố định tế bào 3 lần trong methanol : acetic acid (3:1), sau đó nhuộm với acridine orange (0.2%).

Berardino, 1985, sử dụng phương pháp hiện băng RBA trên bò (*Bos taurus L.*), đã đạt kết quả tốt là, sự đồng bộ hóa tế bào nguyên phân với thymidine hoặc methotrexate, trong điều kiện thí nghiệm của ông, cho

ra phần lớn các tế bào là ở tiền trung kỳ (prometaphase) và đầu trung kỳ (early metaphase), chỉ có một tỷ lệ thấp các bản hậu kỳ (1 - 2%) (late prophase).

So với các phương pháp hiện băng RBA trước ở bò, thì pha tiền trung kỳ ở đây đã cho phép tăng gần 50% tổng số băng, từ 351 lên 521.

Nếu so sánh với phương pháp hiện băng G chuẩn ở bò, cho ra 310 băng (Linn, 1977; Ford, 1980), thì số băng trong phương pháp hiện băng RBA mới và cải tiến này được tăng lên là gần 70% (h.II.4).



Hình II. 4. Băng RBA ở bò.

2. Phương pháp nhuộm bạc băng NOR (băng N)

NOR (nucleolus organiser region) là vùng gen tạo hạch nhân, được hiện băng bằng phương pháp nhuộm bạc (silver nitrate staining). Đây là vùng nhiễm sắc thể tổng hợp ra *r*-ARN. *r*-ARN trước khi đi ra ribôxôm được tập trung ở vùng này, còn được gọi là nhân con.

Để hiện băng nhiễm sắc thể giới tính của người, phương pháp

nhuộm bạc đã được sử dụng. Tiêu bản phơi khô không khí, đầu tiên được xử lý đệm borat, pH 9,1. Sau đó nhỏ lên mỗi tiêu bản 3 - 4 giọt dung dịch nước nitrat bạc 50%, có chứa 0,03% formalin.

Khi kết tủa bạc đã ổn định, tiêu bản được để lạnh, rửa nước cất và nhuộm trong đệm 1% Giemsa.

C. M. Tuck- Muller (Mỹ), 1984, đã đưa ra phương pháp phối hợp hiện băng C và nhuộm bạc các nhiễm sắc thể trung kỳ, sử dụng trypsin để hiện băng NOR của nhiễm sắc thể.

Đầu tiên, người ta nhúng tiêu bản vào HCl loãng để tách cặn tế bào chất dính quanh nhiễm sắc thể, sau đó đem xử lý với hydroxide Ba bão hòa và ủ qua đêm trong citrate Na. Sau khi xử lý băng C, người ta dùng phương pháp nhuộm bạc 2 bước để nhuộm NOR của nhiễm sắc thể. Nhuộm bạc được kéo theo xử lý trypsin để tách các phần bạc kết tủa bên ngoài các cánh của nhiễm sắc thể, làm cho các băng C nhuộm được với Giemsa.

Phương pháp trên đây đều cho kết quả tốt như nhau. Khi dùng tiêu bản gián phân nhiễm sắc thể mới chuẩn bị cũng như chuẩn bị từ trước, và cho kết quả nhuộm thích hợp cả với dị nhiễm sắc chất và vùng NOR hoạt động ở trung kỳ trên tiêu bản.

NOR của chuột đen (*R. rattus*) được phát hiện ở vùng mút cánh gần các cặp 3,8, 13 và vùng mút cánh dài nhiễm sắc thể 10 (*R. Belcheva*, 1984). NOR của gia súc nằm ở đoạn cùng của 5 cặp nhiễm sắc thể thường (autosome).

3. Phương pháp phân tích, xác định băng

Người ta vẫn phân tích, xác định số lượng, xếp loại các băng và băng phụ (subbands), băng xen (interbands), cơ bản theo hệ thống ISCN, hệ thống quốc tế về danh pháp di truyền tế bào học (International System for Cytogenetic Nomenclature).

Nhiều hội nghị quốc tế đã quy định thống nhất hệ thống băng chuẩn để phân loại các băng, cách xác định vị trí các băng trên 2 cánh của nhiễm sắc thể. Một hội nghị quốc tế về tiêu chuẩn hóa kiểu nhân hiện băng của vật nuôi đã được tiến hành tại Anh năm 1976, đã đi sâu thảo luận và thống nhất về băng chuẩn G.

Trật tự băng được phân tích trực tiếp dưới kính hiển vi hoặc trên

ảnh chụp tiêu bản nhiễm sắc thể. Khi cần so sánh trật tự băng trên tiêu bản dưới kính hiển vi với trật tự băng trên ảnh chụp, người ta có thể dùng Camera truyền hình ảnh trực tiếp từ kính hiển vi ra ngoài. Phương pháp đo được tiến hành bằng trắc vi thị kính và trắc vi vật kính hoặc đo trên ảnh chụp với độ phóng đại tương ứng.

Cấu trúc nhiễm sắc thể được xác định qua số lượng, kích thước, sự phân bố các vùng dị nhiễm sắc chất.

E. HIỆN TƯỢNG ĐA HÌNH VÀ HIỆN TƯỢNG DỊ HÌNH NHIỄM SẮC THỂ

I. HIỆN TƯỢNG ĐA HÌNH NHIỄM SẮC THỂ

Rất nhiều các thực nghiệm, điều tra đã phát hiện tính đa hình nhiễm sắc thể (chromosomal polymorphism) ở giới động vật.

Ngay trong một loài, giữa các quần thể, các cá thể và giữa các tổ chức (mô) của một cơ thể, cũng có khác nhau về số lượng nhiễm sắc thể, ở 3 mức độ:

- a. Sai khác giữa các tế bào trong một cơ thể: mức độ cá thể hay thể khảm (chimaera);
- b. Sai khác giữa các cá thể trong quần thể: mức độ quần thể.
- c. Sai khác giữa các quần thể hay loài phụ trong phạm vi một loài: mức độ loài (Kirpichnikov, 1987).

Cũng theo tác giả trên, hiện tượng đa hình nhiễm sắc thể là do thay đổi số lượng nhiễm sắc thể, nguyên nhân có thể do các cơ chế liên kết (fusion) hay tách (fission) tâm động (centromere), do xảy ra chuyển đoạn Robertson (Robertson translocation)

Đa hình nhiễm sắc thể xảy ra ở các loài động vật có mức độ khác nhau. Orlov, 1974, xác định mức độ đa hình nhiễm sắc thể ở động vật có vú là 4% tổng số loài, trong khi đó, ở cả mức độ đa hình nhiễm sắc thể lại rất thấp, 1% tổng số loài. Ở trâu, Bhattachaya và Dutt, 1956 phát hiện $2n = 48$, sau đó Fisher, 1974 lại phát hiện $2n = 50$. Người ta cũng đã phát hiện thể khảm XX/XY ở trâu Murrah (chimaeric in Murrah buffalo).

II. HIỆN TƯỢNG DỊ HÌNH NHIỄM SẮC THỂ

Hiện tượng dị hình nhiễm sắc thể (chromosomal heteromorphism) đã được nghiên cứu và phát hiện trên nhiều đối tượng động vật.

Nhiều dị dạng nhiễm sắc thể (chromosome abnormality) đã được phát hiện, kèm theo tần số xuất hiện, có liên quan đến khả năng sinh sản, như dạng thể khảm $1n/2n$ (haploid/diploid chimaerism) ở nhiều đối tượng gia súc. Ở gia cầm, gà, vịt, nhiều dị dạng nhiễm sắc thể của phôi, đã được phát hiện, có liên quan rõ rệt với tỷ lệ chết phôi.

Henrisson, Backstron, 1964 đã phát hiện có sự chuyển đoạn nhiễm sắc thể ở lợn Landrace Thụy Điển, từ nhiễm sắc thể số 4 lên nhiễm sắc thể số 14, làm giảm khả năng sinh sản xuống 56%.

Boscher, 1982, cho thấy có các sai biến nhiễm sắc thể đã làm giảm khả năng sinh sản của lợn xuống 50%.

Các hiện tượng đảo đoạn quanh tâm (pericentric inversion), hiện tượng tam bội (trisomy) đều đã được phát hiện trên các giống gia súc.

Trong nghiên cứu kiểu nhân của gia súc, gia cầm, vật nuôi, người ta chú ý nhiều đến hiện tượng chuyển đoạn Robertson, dẫn tới các biến đổi về số lượng nhiễm sắc thể, có liên quan đến khả năng sinh sản của động vật, đồng thời rất có ý nghĩa để nghiên cứu chủng loại phát sinh, nguồn gốc, mối quan hệ di truyền giữa các giống vật nuôi, gia súc.

Ở cá, các số liệu về sai hình nhiễm sắc thể (chromosomal aberrations), các hiện tượng chuyển đoạn nhiễm sắc thể, kèm theo các tần số xuất hiện, đã làm cơ sở để người ta sử dụng cá như một monitor sinh học, để nghiên cứu hậu quả của các tác nhân gây đột biến tồn tại trong môi trường sống của cá, ở sông ngòi, biển cả. Manna, Som, 1982, Mukherjee, 1983, đã sử dụng cá Tilapia, như một monitor về tác nhân gây đột biến trong môi trường.

Cũng từ các cơ sở nêu trên, đã ra đời một lĩnh vực hoàn toàn mới và hấp dẫn là hướng nghiên cứu di truyền học tế bào ung thư ở cá.

III. SỰ TIẾN HOÁ CỦA KIỂU NHÂN

Người ta đã nêu lên một cơ chế mới về sự biến đổi số lượng nhiễm sắc thể trong quá trình tiến hóa của kiểu nhân các loài.

Giả thiết nêu lên bốn nhân tố sau đây.

1. Người ta đã bắt gặp các cá thể dị hợp thể về 2 trao đổi đoạn giữa các cánh của 3 nhiễm sắc thể.

2. Có sự hình thành đa trị (multivalent) trong các kiểu nhân dị hợp trong quá trình giảm phân giữa các nhiễm sắc thể có trao đổi đoạn và các nhiễm sắc thể tương đồng không trao đổi đoạn.

3. Sự phân ly sai lệch của các nhiễm sắc thể từ các đa trị nêu trên dẫn tới thể giảm bội (hypoploid) ($n - 1$) và các thể dư bội (hoặc siêu bội, hyperploid ($2n + 1$), xen kẽ nhau.

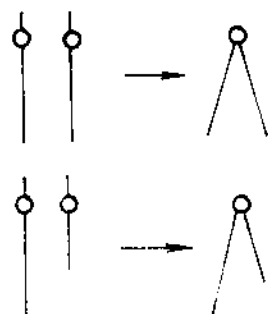
4. Sự kết hợp các giao tử $n - 1$ hoặc $n + 1$ cho ra các cá thể có kiểu nhân đồng hợp với số lượng nhiễm sắc thể biến đổi ($2n + 2$ hoặc $2n - 2$).

Cơ chế nêu trên không gặp khó khăn như khi giải thích các biến đổi trên bằng chuyển đoạn Robertson.

Các giải thích như đã trình bày được phát hiện qua thực nghiệm trên *Vicia faba*.

Cơ chế dung hợp tâm đã được phát hiện bằng thực nghiệm cũng góp phần trong nghiên cứu tiến hóa kiểu nhân. Người ta đã thấy, dị bội thể có thể xảy ra do có thêm hoặc mất đi nhiễm sắc thể do quá trình dung hợp tâm (centric fusion).

Thông thường xảy ra hiện tượng 2 nhiễm sắc thể tâm mút được hợp tâm để tạo thành một nhiễm sắc thể lớn hơn, hoặc cân tâm, hoặc lệch tâm, tùy trường hợp 2 nhiễm sắc thể tâm mút có cánh lớn bằng nhau hoặc 2 cánh lớn dài ngắn khác nhau, theo sơ đồ đơn giản hóa sau đây:



Nói chung, cả 2 hạt trung tâm (centromere) của 2 nhiễm sắc thể tâm mút đều được lưu lại trong một vùng chung 2 hạt trung tâm của nhiễm sắc thể mới được hình thành.

Trước đây, một thời gian dài, người ta cho rằng một trong 2 hạt trung tâm nêu trên bị tiêu biến trong quá trình hợp tâm. Gần đây, bằng kính hiển vi điện tử, người ta xác định lại là cả 2 trung tâm vẫn còn lại và cũng được chứa trong một vùng hạt trung tâm của nhiễm sắc thể lớn mới tạo thành qua dung hợp tâm.

Hiện tượng dung hợp tâm được chứng minh qua nhiều phát hiện của nhiều tác giả, cho thấy ở nhiều loài động vật không xương sống, trong một số quần thể, có các cá thể có cùng một số lượng nhiễm sắc thể như nhau, nhưng lại có số cánh nhiễm sắc thể khác nhau trong genom.

Thực tế trên chính là do có dung hợp tâm xảy ra, làm giảm số lượng nhiễm sắc thể, nhưng vẫn giữ nguyên số lượng cánh của nhiễm sắc thể.

Hiện tượng dung hợp tâm có ý nghĩa lớn trong sự tiến hóa kiểu nhân, thấy rõ trong nhiều nhóm động vật và một số thực vật có hoa. Ý nghĩa tiến hóa của hiện tượng dị hợp thể xảy ra do dung hợp tâm biểu hiện ở sự biến đổi tạo ra các tổ hợp kiểu gen mới và biến đổi trong tần số tái tổ hợp.

Trong các loài có số nhiễm sắc thể lớn hơn, thì chính sự tổ hợp ngẫu nhiên đã giải thích vì sao chúng có tỷ lệ các tổ hợp mới về kiểu gen cao hơn trong quần thể. Nếu cùng các gen như trên cũng có trong các loài có số nhiễm sắc thể ít hơn, thì trao đổi chéo sẽ tạo ra các kiểu tái tổ hợp về những gen này. Cho nên, các loài có nhiễm sắc thể ít hơn, có xu hướng ít biến đổi hơn so với các loài cũng có các gen như trên nhưng số nhiễm sắc thể lớn hơn.

Trong những điều kiện nhất định, sự biến động di truyền thấp sẽ có ưu thế hơn. Dung hợp tâm nếu có xảy ra, sẽ được duy trì giữ lại trong các quần thể như vậy, vì ưu thế chọn lọc hướng về các biến đổi di truyền thấp.

IV. KỸ THUẬT NHIỄM SẮC THỂ

1. Tạo toàn cá cái bằng mẫu sinh lưỡng bội hóa, một lĩnh vực quan trọng trong công nghệ nhiễm sắc thể

Kỹ thuật mới được ứng dụng trong công nghệ nhiễm sắc thể, công nghệ giới tính cá, vật nuôi, là phương pháp trình sản, phụ sinh và mẫu sinh nhân tạo, đặc biệt có vị trí quan trọng trong di truyền chọn giống vật nuôi, trên các đối tượng cá, tôm, trong đó có cá chép, cá chạch, cá trắm cỏ, cá hồi, cá bơn.

Kỹ thuật nhiễm sắc thể (chromosome engineering) đặc biệt được sử dụng trong nghề nuôi tôm, được xem như một cuộc cách mạng về giống trong nghề ươm tôm.

Trình sản (parthenogenesis) có từ chữ Hy Lạp Parthenos (cô gái trinh) và genesis (sự phát sinh), còn được gọi là trình sinh, bao gồm trình sinh tự nhiên (natural parthenogenesis) và trình sinh nhân tạo (artificial parthenogenesis), trong đó có phụ sinh và mẫu sinh.

Phụ sinh (androgenesis), từ chữ Hy Lạp Andros (người đàn ông), còn được gọi là đơn tính sinh đực, là trường hợp sau khi thụ tinh, nhân của tế bào trứng bị suy liệt, hợp tử còn lại mang đặc điểm di truyền do nhân của giao tử đực quyết định.

Mẫu sinh (gynogenesis) từ chữ Hy Lạp Gyne (người đàn bà), còn được gọi là đơn tính sinh cái, là trường hợp sau thụ tinh, nhân của tinh trùng bị suy liệt, hợp tử chỉ mang tính di truyền do nhân của tế bào trứng quyết định.

Các kỹ thuật trong hai lĩnh vực nói trên bao hàm cả việc cho phối hợp một giao tử đực này với một giao tử đực khác hoặc một giao tử cái này với một giao tử cái khác.

Mẫu sinh tự nhiên thường thấy ở cá tiêu biểu là cá diếc bạc (*Carassius carassius auratus*), trong tự nhiên toàn cá cái và tam bội. Diếc bạc cái giao phối với chép đực, diếc vàng, một số cá khác, nhưng không bao giờ xảy ra lai giống. Sau khi xâm nhập vào trứng diếc bạc, nhân tinh trùng đều bị thoái hóa, tiêu biểu, chỉ có nhân nguyên cái diếc bạc tham gia vào sự phát triển cá thể, qua nguyên phân.

Diếc bạc mẫu sinh thường là tam bội, trong quá trình tạo noãn, không có giảm phân, do cơ chế giảm phân bị rối loạn, bộ tam bội giữ nguyên qua các thế hệ. Trứng vẫn là tam bội, được thụ tinh bởi tinh trùng cá khác, nhưng sau đó nhân tinh trùng bị loại thải. Mọi cá con sinh ra chỉ là bản sao của cá mẹ. Trong mẫu sinh nhân tạo, người ta cho chiếu xạ tinh trùng. Do độ mẫn cảm với các loại tia của nhân cao hơn nhiều so với của tế bào chất, nên có thể làm huỷ diệt nhân mà không ảnh hưởng gì tới khả năng thụ tinh của tinh trùng.

Mẫu sinh nhân tạo được tiến hành với mục đích tạo ra các dòng toàn cái, phát triển từ trứng thụ tinh bởi tinh trùng đã bị loại bỏ nhân. Tinh trùng chỉ còn lại tác dụng để kích thích trứng phát triển, nguyên liệu di truyền chính của tinh trùng không còn tham gia gì vào quá trình phát triển phôi. Người ta còn gọi đây là *hình thức sinh sản vô tính ở động vật*, nhưng có khác sinh sản vô tính ở thực vật, vì thế hệ sau được phát triển từ trứng đã thụ tinh, cho nên thực chất đây là biến dạng của sinh sản hữu tính.

Dùng mẫu sinh nhân tạo, có thể chỉ qua 2-3 thế hệ là có thể tạo được các dòng đồng hợp thể, trong khi đó, nếu dùng phương pháp cận phối thì phải tới 10-15 thế hệ.

Các dòng đồng hợp thể này rất quan trọng, cần thiết không chỉ cho chọn giống, như chọn giống cá v. v..., mà còn cho di truyền, như xây dựng bản đồ gen, xác định vốn gen (gene pool), tách các thể đột biến, xác định tần số trao đổi chéo v. v...

Mẫu sinh nhân tạo có hiệu quả lớn trong công nghệ giới tính cá, điều hòa giới tính, tạo các dòng cá toàn cái, làm tăng tỷ lệ cá cái trong đàn.

Trong kỹ thuật về mẫu sinh, thì kỹ thuật nhiễm sắc thể (chromosome engineering), qua thao tác (manipulation) trên nhiễm sắc thể, đã được phát triển từ các công trình ở đầu thế kỷ 20, theo hướng dùng bức xạ ion hóa, tác động lên tinh trùng ếch.

Hertwig, 1911, cho thụ tinh trứng ếch bằng các tinh trùng đã bị bức xạ, với mục đích nghiên cứu mối tương quan giữa liều lượng bức xạ tác động lên tinh trùng với tỷ lệ phôi sống sót. Trứng được phát triển đơn độc, không cần vật chất di truyền của con đực.

Dùng bức xạ ion hóa để triệt tiêu nhân của tinh trùng cá, thường cần liều cao, dùng tia γ hoặc tia X. Sau này, người ta có tiến bộ kỹ thuật dùng tia tử ngoại UV (ultraviolet).

2. Kỹ thuật mẫu sinh lưỡng bội hóa ở cá

Nhiều tác giả đã xác nhận, trong mẫu sinh, các phôi sống được phần lớn thuộc đơn bội, được phát triển chỉ bằng bộ đơn bội nhiễm sắc thể trong tiền nhân (pronucleus) của cá cái.

Chỉ một tỷ lệ nhỏ các phôi là có dạng lưỡng bội với trạng thái bề ngoài bình thường. Tần số thấp các dạng lưỡng bội có thể được nâng lên bằng cách xử lý trứng ngay sau thụ tinh, với các kỹ thuật khác nhau, như choáng lạnh.

Các phôi (hợp tử) hình thành trong mẫu sinh có thể được lưỡng bội hóa bằng cơ chế dùng choáng lạnh (cold shock) kim hãm giảm phân I, trong thời gian choáng lạnh, một pha tương ứng sau giảm phân I được giữ nguyên, thôi vô sắc biến đi, và sau choáng lạnh, hai bộ nhiễm sắc thể hợp lại thành nhân lưỡng bội. Có thể kim hãm giảm phân I bằng kỹ

thuật phá hủy thể cực thứ 2 trong giảm phân II, Golovinskaia, 1968, đã chứng minh sự kìm hãm thể cực thứ hai là nguyên nhân dẫn tới lưỡng bội hóa trong mẫu sinh ở cá.

Công trình luận án của Trần Thị Thuý Nga, 1986, đã thành công, bằng phương pháp choáng lạnh, tạo được cá chép và cá trê phi toàn cái. Nhiệt độ gây choáng lạnh với cá trê và cá chép Việt Nam là 5°C. Thời điểm tối ưu để gây choáng lạnh đối với cá trê là 10 phút sau thụ tinh, đối với cá chép là 15 phút sau thụ tinh. Thời gian kéo dài quá trình gây choáng lạnh, tối ưu đối với cá trê phi là 30 phút, đối với cá chép là 40 phút.

Những cá mẫu sinh lưỡng bội hóa được tạo ra đã được tác giả kiểm tra qua các dấu hiệu di truyền về kiểu vây, màu sắc và các chỉ tiêu hình thái khác của cá, đều mang đặc điểm di truyền của cá mẹ và tất cả đều là cá cái.

Kỹ thuật choáng nóng (heat shock) được dùng có hiệu quả trên cá hồi. Đây là kỹ thuật ngày nay được dùng rộng rãi để gây mẫu sinh lưỡng bội và tạo ra cá đa bội.

Nhiệt độ gây nóng tối ưu đối với cá hồi 28°C. Đối với các loài cá khác, lại có các nhiệt độ tối ưu thích hợp khác. Đối với kỹ thuật mẫu sinh lưỡng bội hóa, còn có liệu pháp áp lực thủy tĩnh hóa, được dùng đầu tiên trên lưỡng thể, hiện đang được thăm dò trên cá.

Người ta còn có thể tạo dạng mẫu sinh lưỡng bội qua thao tác nhiễm sắc thể với hóa chất cản phân bào, như dùng cytochalsin-B. Phương pháp này có hiệu quả đối với loại trứng bé như của nhuyễn thể, hiện khó sử dụng trên trứng cá, do trứng cá có màng phức tạp, ngăn cản sự xâm nhập của hóa chất.

F. NGHIÊN CỨU DI TRUYỀN TẾ BÀO HỌC NGƯỜI

I. PHƯƠNG PHÁP DI TRUYỀN TẾ BÀO

Phương pháp di truyền tế bào (cytogenetics) trong di truyền y học và di truyền học người là phương pháp chẩn đoán bệnh di truyền, trên cơ sở phân tích tế bào học phối hợp với phân tích hệ phả để làm nổi rõ hình ảnh tế bào học liên quan với hiệu quả kiểu hình. Những năm gần

dây phương pháp nuôi cấy mô, nuôi cấy bạch cầu máu, cùng với phương pháp nhuộm đặc trưng hay nhuộm phân hóa, tức kỹ thuật hiện băng (banding techniques) đã cho phép xác định chính xác các dị dạng nhiễm sắc thể, các hiện tượng lệch bội lẻ do không phân ly nhiễm sắc thể trong giảm phân, cũng như các hiện tượng cấu trúc lại nhiễm sắc thể, dẫn đến nhiều bệnh di truyền đa dạng và hiểm nghèo. Di truyền tế bào cũng còn cho phép nghiên cứu sự già của các tổ chức (các mô) trên cơ sở nghiên cứu động thái theo tuổi của cấu trúc tế bào, xác định tác động gây đột biến của các nhân tố môi trường, phóng xạ, hoá chất độc v. v..., tác động lên con người.

Hiện tượng lệch bội lẻ các nhiễm sắc thể giới tính ở người, dẫn đến nhiều bệnh di truyền như hội chứng Turner, hội chứng Klinefelter v. v... đều có thể được phát hiện nhờ phân tích nhiễm sắc chất sinh dục (sex chromatin), tức thể Barr.

Di truyền tế bào y học chính là một lĩnh vực đặc biệt quan trọng trong y học thực hành. Đối với nghiên cứu cơ bản di truyền học đại cương, di truyền phân tử, các phân tích về mặt di truyền tế bào những biến đổi cấu trúc nhiễm sắc thể đã cung cấp hệ thống các tư liệu quan trọng để xây dựng bản đồ gen của người.

Các nghiên cứu hiện đại trong nghiên cứu di truyền tế bào như lai tế bào soma, lai phân tử, phân tích chuỗi kép dị hợp (heteroduplex analysis) bằng kính hiển vi điện tử, phương pháp hiện băng v. v... đã mở ra nhiều triển vọng mới để phân tích cấu trúc hiển vi trong hệ gen của người.

Gần đây, quốc hội Mỹ đã tài trợ cho đề án nghiên cứu hệ gen của người do J. D. Watson (giải Nobel 1962) chủ trì.

II. NGHIÊN CỨU NHIỄM SẮC THỂ VÀ KIỂU NHÂN

1. Kỹ thuật hiện băng

Kiểu nhân của người thường được nghiên cứu trên các tiêu bản bạch cầu nuôi cấy hoặc các nguyên bào sợi (fibroblast) được bảo quản hoặc nuôi cấy. Các tế bào đưa vào nuôi cấy được kích thích để phân chia nguyên phân và dùng colchixin để làm ngừng quá trình phân chia ở kỳ giữa.

Ngày nay, nói chung người ta vẫn dùng phương pháp làm tiêu bản nhiễm sắc thể kỳ giữa nguyên phân của J.Tio và A. Levan, 1964 kèm theo các cải tiến thích hợp. Chính các phương pháp này đã góp phần cải chính con số lưỡng bội nhiễm sắc thể người, không phải là 48 mà là $2n = 46$, trong hội nghị tế bào học quốc tế 1956 tại Denver.

Trên cơ sở hệ thống phân loại của Levan, 1964, (ngày nay đã có nhiều bổ sung), người ta đã đi sâu nghiên cứu hình thái nhiễm sắc thể và hình thái kiểu nhân (karyomorphology), dựa vào *hệ thống danh pháp quốc tế về di truyền tế bào người*, 1978 (ISCN, 1978: International System for Human Cytogenetics Nomenclature). Hiện tượng đa hình nhiễm sắc thể (chromosomal polymorphism), dị hình nhiễm sắc thể (chromosomal heteromorphism) phân biệt dạng lưỡng bội bình thường và dạng thể ba (trisomic), đều được xác định trên cơ sở các chỉ tiêu di truyền tế bào, các chỉ số để xây dựng nhiễm sắc thể đồ (idiogramme), chỉ số tâm động I^C (centromeric indice), chiều dài tương đối của nhiễm sắc thể (L^R , relative length), tỷ số cánh dài trên cánh ngắn của nhiễm sắc thể q/p (centromere location), số lượng cánh nhiễm sắc thể (NF) v. v...., được xem là các marker (chỉ thị) di truyền tế bào để phát hiện các dị dạng, các chuyển đoạn, các biến đổi số lượng nhiễm sắc thể.

2. Các quy định về danh pháp và ký hiệu

Năm 1971, hội nghị quốc tế về hệ thống *danh pháp chuẩn* đối với nhiễm sắc thể người đã được họp tại Pari có các quy định mới. Tại hội nghị này mới xác định được về mặt tế bào học, toàn bộ 46 cặp nhiễm sắc thể người.

2.1. Số lượng nhiễm sắc thể

Số lượng nhiễm sắc thể thường dư thừa được đặt sau tổng số nhiễm sắc thể và nhiễm sắc thể giới tính đếm được, thêm dấu (+) hoặc dấu (-), đặt trước tên của nhiễm sắc thể dư thừa.

Ví dụ: $47 XX + 21$ là kiểu nhân của một phụ nữ có thể ba ở nhiễm sắc thể 21.

- Đàn ông có 1 nhiễm sắc thể X dư thừa : $47, XXY$

Ví dụ, các dạng Klinefelter

47, XXY (2n + 1)

48, XXXY (2n + 2)

48, XXYY (2n + 2)

49, XXXXY (2n + 3)

- Phụ nữ bị Turner

45, X (2n - 1)

2.2 Hiện tượng cánh của nhiễm sắc thể

Hiện tượng cánh dài ra hoặc ngắn đi, được ký hiệu bằng dấu cộng (+) hoặc dấu trừ (-) đặt ngay sau ký hiệu của nhiễm sắc thể.

Ví dụ : 46, XX, 1q + là kiểu nhân của một phụ nữ 46 nhiễm sắc thể, có cánh dài của nhiễm sắc thể số 1 được kéo dài thêm.

Ví dụ : 47, XX, +14p + là kiểu nhân của một phụ nữ, có 47 nhiễm sắc thể, do thêm nhiễm sắc thể 14, kèm theo có hiện tượng cánh ngắn của nhiễm sắc thể này kéo dài ra. (q : cánh dài và p : cánh ngắn).

2.3. Các biến đổi cấu trúc nhiễm sắc thể

Các biến đổi này được ký hiệu :

- mất đoạn : def (deficiency)

- lặp đoạn : dup (duplication)

- đảo đoạn : inv (inversion)

- chuyển đoạn : t (translocation)

- nhiễm sắc thể vòng. Ví dụ 46, XX, r (18) biểu thị kiểu nhân một phụ nữ 46 nhiễm sắc thể, trong đó có 1 nhiễm sắc thể vòng số 18 (do có hai chỗ đứt và các đầu đứt ra cùng gặp nhau, tạo thành vòng).

2.4. Công thức 46, X, i (Xq)

Công thức này là kiểu nhân của một phụ nữ 46 nhiễm sắc thể, trong đó có 1 nhiễm sắc thể X bình thường và một nhiễm sắc thể đều (isochromosome, i: có 2 cánh giống nhau về di truyền và về hình thái) đối với cánh dài của X.

2.5. Các băng trong kỹ thuật hiện băng

Các băng này được quy định đánh số thứ tự từ thể trung tâm

(centromere) đi ra, dọc cánh ngắn (p) và cánh dài (q) của nhiễm sắc thể.

2.6. Nhiễm sắc thể tái tổ hợp

Nhiễm sắc thể tái tổ hợp được quy ước như 46 rec (3) là kiểu nhân 46 nhiễm sắc thể có nhiễm sắc thể số 3 tái tổ hợp, (rec-recombination).

Kỹ thuật hiện băng được sử dụng để nghiên cứu kiểu nhân của người, nhất là các loại băng G và băng Q, đã góp phần làm rõ đặc thù các nhiễm sắc thể của người. Ngày nay, kỹ thuật hiện băng cũng được áp dụng trên các động vật, so sánh các kiểu băng trong các quần thể động vật có vú, chim, bò sát, lưỡng thê, cá, rất có ý nghĩa để nghiên cứu chủng loại phát sinh.

Mối quan hệ giữa các quần thể vật nuôi có thể được xác định qua so sánh các đặc thù nhiễm sắc thể.

Với kỹ thuật hiện băng, các nghiên cứu về hình thái nhiễm sắc thể và hình thái kiểu nhân có ý nghĩa rất lớn đối với vấn đề chủng loại phát sinh.

Tinh tinh (Chimpanzee, *Pan troglodytes*) và người, (*Homo sapiens*) về mặt phân loại là thuộc các giống (genus) khác nhau, *Pan* và *Homo*, nhưng rất giống nhau về các đặc điểm giải phẫu và sinh lý, cũng như về thành phần ADN và protein. So sánh về nhiễm sắc thể đã cho thấy có những điểm giống nhau khá cơ bản, kèm theo một số nét cấu trúc lại của nhiễm sắc thể.

Số nhiễm sắc thể của người là 46, tinh tinh là 48. Người ta đã xác định được các cặp cùng nguồn, và cấu trúc chung của nhiễm sắc thể được đối chiếu băng với băng giữa các cặp. Hai nhiễm sắc thể tâm ngọn (acrocentric) của tinh tinh có cùng các băng với nhiễm sắc thể tâm lệch (submetacentric, tâm gần giữa) của người, dẫn tới sự tương đương của 46 ở hai loài.

A. D. Stock đã tiến hành so sánh rất chi tiết giữa các băng nhiễm sắc thể của hai loài và đã phát hiện ba sai khác về cấu trúc sau đây:

1. Nhiễm sắc thể số 2 của người là dài và lệch tâm, nhưng lại ứng với hai nhiễm sắc thể tâm ngọn của tinh tinh khi hai nhiễm sắc thể của tinh tinh được kết hợp nhau, gần thể trung tâm của cánh ngắn của nhiễm sắc thể này và gần điểm cuối (telomere) của cánh ngắn của nhiễm sắc thể kia, hình thành một nhiễm sắc thể giống như nhiễm sắc thể số 2 của người.

2. Các nhiễm sắc thể 4,5,9,12,17 và 18 của hai loài sai khác nhau bởi một đảo đoạn đơn quanh tâm.

3. Nhiễm sắc thể 1 và 9 của 2 loài có sai khác nhỏ đặc thù trong thành phần dị nhiễm sắc chất.

Qua so sánh trên, chúng ta thấy, ở mức loài, thì hình thái nhiễm sắc thể là một chỉ tiêu rất tốt để nghiên cứu các biến đổi chủng loại phát sinh.

Trong công tác giống gia súc, các chỉ tiêu về hình thái nhiễm sắc thể và hình thái kiểu nhân rất cần thiết để kiểm tra các dị dạng về sinh sản nhất là khi sử dụng thụ tinh nhân tạo và kiểm tra qua đời sau. Một bò đực có thể sử dụng cho tinh cho hàng ngàn bò cái, khả năng truyền lại các dị tật di truyền, nếu có là vô cùng lớn.

III. HIỆN TƯỢNG BẤT HOẠT

Nhiễm sắc thể, về mặt cấu trúc, hình thái cũng như hoạt tính di truyền là không đồng nhất giữa các đoạn trên chiều dài của nó. Trên một nhiễm sắc thể, có đoạn mang *dị nhiễm sắc chất* (heterochromatin), đoạn khác lại mang đồng nhiễm sắc chất, hoặc nguyên nhiễm sắc chất (euchromatin). Đoạn dị nhiễm sắc chất được nhuộm màu nhanh hơn, giữ màu lâu hơn, kết dính xoắn trước các đoạn khác, không mang gen hoặc mang ít gen, hầu như không có hoạt tính di truyền. Đoạn nguyên nhiễm sắc chất bắt màu chậm hơn so với đoạn dị nhiễm sắc chất, thực chất là bắt màu bình thường, ngưng kết dính xoắn bình thường, mang gen, có hoạt tính di truyền.

Nhiễm sắc thể Y và các vùng quanh tâm động trên nhiễm sắc thể thường gồm dị nhiễm sắc chất.

Trạng thái cuộn xoắn trong từng đoạn của nhiễm sắc thể, không có hoạt tính di truyền, được gọi là heteropycnosis. Ở vùng dị nhiễm sắc chất, ADN không bao giờ được biểu hiện và phần này của nhiễm sắc thể xem như giữ vai trò cấu trúc trong vận động của nhiễm sắc thể trong nguyên phân và giảm phân.

Ngày nay, người ta phân ra 2 loại : dị nhiễm sắc chất ổn định (constitutive), có ở mọi cơ thể tế bào (quanh tâm động nhiễm sắc thể, v.v..) và dị nhiễm sắc chất nhất thời (facultative) ở một giới và ở một số giai đoạn phát triển cá thể.

Năm 1948, Murray Barr đã phát hiện, trong khoảng 60- 70% nhân gian kỳ của phụ nữ và động vật có vú là con cái, có các đoạn như trên, gọi là vật thể giới tính, tức nhiễm sắc chất sinh dục (sex chromatin), còn được gọi là thể Barr. Thể Barr không thấy ở đàn ông và động vật có vú là con đực, được phát hiện ở hầu hết các loại tổ chức (mô) như mô thần kinh, mô da, biểu mô, cơ trơn, gan, các tuyến, dễ phát hiện thấy ở tế bào màng nhầy khoang miệng, dễ bắt màu, nằm áp sát màng nhân.

Để làm tiêu bản thể Barr, phương pháp đơn giản nhất là dàn tế bào niêm mạc miệng, dùng tế bào niêm mạc âm đạo thì rõ hơn, to hơn và nhiều hơn, còn có thể dùng tế bào chân tóc, tế bào da, tế bào nước ối.

1. Giả thuyết M. Lyon về nguồn gốc thể Barr

Nhiều nghiên cứu về bất thường giới tính đã chứng minh là số lượng thể Barr kém một so với số lượng nhiễm sắc thể X có mặt trong tế bào.

Đàn ông bình thường chỉ có một nhiễm sắc thể X nên không có thể Barr. Đàn bà bình thường có 2 X thì có một thể Barr.

Bằng phương pháp phóng xạ tự chụp, theo dõi quá trình tự nhân đôi của nhiễm sắc thể ở gian kỳ, Conings, 1967 đã thấy là tế bào của nữ bình thường có 1 trong 2 nhiễm sắc thể X được nhân đôi chậm hơn tất cả các nhiễm sắc thể khác là 2 giờ 30 phút. Ở tế bào bất thường 3X, có thể phát hiện 2 nhiễm sắc thể X tự nhân đôi chậm. Như vậy là số nhiễm sắc thể X tự nhân đôi chậm có liên quan với số thể Barr.

Trên cơ sở các dấu hiệu liên quan giữa số nhiễm sắc thể X với số thể Barr, các tác giả đã kết luận nguồn gốc thể Barr là từ một nhiễm sắc thể X.

Trong các thuyết về nguồn gốc thể Barr, thuyết của Lyon, 1962, được thừa nhận phổ biến nhất, được gọi là giả thuyết về *quá trình Lyonisation* (giải thích được hiện tượng thực tế là thừa nhiễm sắc thể X chỉ gây hậu quả tương đối nhỏ, trong khi ấy chỉ cần thừa một nhiễm sắc thể khác (trừ nhiễm sắc thể nhỏ nhất), lại có hậu quả nghiêm trọng, có cả tử vong).

Giả thuyết Lyon nêu các điểm chính sau đây:

1. Thể Barr bắt nguồn từ một nhiễm sắc thể X, dị nhiễm sắc hóa (ức chế), bất hoạt di truyền, không có sao mã trên X này.

2. Nhiễm sắc thể X bất hoạt này, có thể hoặc từ bố, hoặc từ mẹ. Sự ức chế đầu tiên trong mỗi tế bào phôi xảy ra một cách ngẫu nhiên, có tế bào bị ức chế nhiễm sắc thể X của bố, có tế bào lại bị ức chế nhiễm sắc thể từ mẹ.

3. Hiện tượng bất hoạt này xảy ra sớm khi phôi phát triển đến khoảng 12-14 ngày, trong các tế bào phôi, 1 trong 2 nhiễm sắc thể X bị ức chế, trở nên dị nhiễm sắc hóa. Từ đó về sau, tất cả các tế bào sản sinh ra đều mang 1 nhiễm sắc thể X bất hoạt. Gần đây đã có tài liệu công bố, hiện tượng này xảy ra ở ngày thứ 3 sau thụ thai. Thuyết Lyon phù hợp với thực tế là trong thời gian đầu có thai, trong nhân tế bào chưa phát hiện thấy thể Barr. Sau thời gian ấy, trong nhân tế bào thai nữ mới xuất hiện thể Barr, tồn tại ở gian kỳ, dạng xoắn chặt, co ngắn.

Như vậy là phôi ngay từ ngày thứ 3 trở đi, đã có thể phân biệt nam nữ bằng phương pháp tế bào học. Theo thuyết Lyon, ở đàn bà bình thường, chỉ 1X hoạt động và các tổ chức (mô) trong cơ thể đều thuộc dạng khảm, trong một số dòng tế bào thì X từ mẹ hoạt động, trong các dòng khác, lại X từ bố hoạt động.

Ở đây, có vấn đề cân bằng di truyền ở nam và nữ. Bentler cũng đã chứng minh, thể Barr là một nhiễm sắc thể X, không có hoạt tính sinh lý. Nữ có 2X, nam chỉ có 1X. nếu tất cả nhiễm sắc thể X đều hoạt động, thì ở nữ, hàm lượng enzym do nhiễm sắc X sản xuất ra phải nhiều gấp đôi nam. Trong thực tế, lượng enzym do nhiễm sắc thể X sản ra ở cả hai giới đều bằng nhau.

Muller, 1963 đã nêu lên là sự không cân đều về mặt di truyền giới tính này (nữ 2X, nam 1X) đã được khắc phục bằng một quá trình lập nên trong tiến hoá, được gọi là *"sự bù đắp về liều lượng gen"*. (Gene dosage compensation), trong quá trình ấy, một trong hai nhiễm sắc thể X của tế bào soma ở cá thể cái là không có hoạt tính di truyền.

Trạng thái không hoạt động của một nhiễm sắc thể X chỉ xảy ra trong tế bào soma, không xảy ra ở tế bào sinh dục, có thể là *kết quả của các biến đổi nhất định trong tiến hóa*, trong quá trình phân hóa thành tế bào sinh dục và tế bào soma ở giai đoạn đầu của sự phát sinh phôi (Hansen, Melander, 1963). Hiện tượng bất hoạt của X giải thích vì sao trong các trường hợp nữ XXX, XXXX và nam XXXY, XXXXY ít bị tác hại lớn cho khả năng sống, bởi vì các nhiễm sắc thể X thừa đều bất hoạt.

nên không gây rối loạn lớn cho sự cân bằng gen của cơ thể.

2. Chứng minh thực nghiệm giả thuyết Lyon

2.1. Di truyền tế bào học đã xác định tốc độ tự sao ADN của các nhiễm sắc thể

Trong hạch tế bào nuôi cấy của thận bê với timidin đánh dấu (H^3 timidin), đã chứng minh một trong hai X được đánh dấu H^3 timidin đậm hơn và còn tiếp tục hấp thụ timidin xâm nhập vào, trong khi ấy các nhiễm sắc thể thường và nhiễm sắc thể X thứ hai đã chấm dứt quá trình này.

Ở những người có bệnh dạng XO/ XX/ XXX, thì các tế bào 45 nhiễm sắc thể ít khi chứa nhiễm sắc thể X hấp thụ timidin như trên, tế bào 46 nhiễm sắc thể khi nào cũng có 1X, còn tế bào 47 nhiễm sắc thể nói chung có 2X như trên.

Về mặt di truyền học, giả thuyết Lyon đã làm rõ một hiện tượng quan trọng trong đời sống là ở đàn ông, nhiễm sắc thể X bao giờ cũng có hoạt tính, ở phụ nữ, 1X là từ mẹ, 1X là từ bố, trong đó có 1X bất hoạt theo nguyên tắc ngẫu nhiên, do đó mà con gái sinh đôi cùng trứng phải khác nhau nhiều hơn là con trai sinh đôi cùng trứng.

2.2. Chứng minh về hóa sinh và bệnh lý

Ở phụ nữ dị hợp thể về gen thiếu glucose-6-phosphatdehydrogenaza, có 2 nhóm hồng cầu: một nhóm có loại enzym trên; một nhóm không.

Các nghiên cứu hóa sinh cho thấy, hai loại enzym trên khác nhau về tốc độ trong điện di, 1 nhanh 1 chậm. Trong hồng cầu đàn ông có loại này hoặc loại kia, còn ở đàn bà có thể phát hiện đồng thời cả 2 loại trên một người.

Những dấu hiệu hóa sinh như trên đã chứng minh, sự bất hoạt của 1X mang gen quy định enzym glucose- 6-phosphatdehydrogenaza là ngẫu nhiên, ở dòng tế bào này thì chỉ có loại chậm, ở dòng tế bào khác chỉ có loại nhanh, trên cùng một cơ thể nữ (Davidson, 1963).

Sự di truyền của bệnh thiếu gamma-globulin cũng liên kết giới tính, gen này nằm trên X. Ở phụ nữ dị hợp thể về gen này, khoảng 2/3

bạch cầu nuôi cấy có hình thành gamma-globulin, còn 1/3 thì không (Hirschleorn, Firschein, 1964).

Oarr, 1962 đã phát hiện ở bệnh nhân có bộ nhiễm sắc thể XO/XX/XXX, một bộ phận các tế bào có một thể Barr, một bộ phận có 2 thể Barr, và 1 bộ phận khác lại không có.

Dray, 1964, phát hiện ở bệnh nhân XXXY cũng có 2 thể Barr ở một số tế bào.

3. Ứng dụng

Các thực nghiệm nêu trên cho phép kết luận là số lượng thể Barr bằng số lượng nhiễm sắc thể X trừ đi 1. Rõ ràng, nghiên cứu thể Barr cho ta một chìa khoá để phát hiện bản chất những trường hợp rối loạn số lượng nhiễm sắc thể X, để suy ra được số lượng X từ số lượng thể Barr.

Thuyết Lyon về thể Barr có ý nghĩa lớn cả về lý thuyết và thực tiễn, được ứng dụng để xác định giới tính, xác định sớm giới tính của phôi, để chẩn đoán y học, xác định các giới tính các bệnh nhân rối loạn về cấu tạo bên ngoài của cơ quan sinh dục, phán đoán dạng quái thai, dị hình, dị tật khi thai còn non tháng.

Giả thuyết Lyon giải thích được bản chất, cơ chế hình thành màu lông mèo tam thể. Ở mèo, màu lông đen do gen B, màu đỏ vàng do alen b, cả hai gen alen này đều nằm trên X (liên kết giới tính). Mèo dị hợp thể Bb có cả 2 màu trên. Mèo cái có thể là đồng hợp thể BB (đen), đồng hợp thể bb (vàng), dị hợp thể Bb (tam thể). Mèo đực, trong Y không mang gen này, thì không có dạng đồng hợp thể hay dị hợp thể về các gen này, mà chỉ thuộc dạng bán dị hợp thể (hemizygous) về gen B và b. Người ta đã thấy, mèo đực tam thể rất ít gặp, nếu có cũng là bất dục.

Theo giả thuyết Lyon, mèo tam thể ở mèo cái là kết quả của hiện tượng 1X bất hoạt (thể Barr), từ giai đoạn sớm của quá trình phát triển cá thể, ở một số dòng tế bào này thì X này bất hoạt, ở dòng khác thì X kia bất hoạt. Mèo cái tam thể mang cả gen B và b. Nếu X bất hoạt mang gen màu vàng (b), thì mọi tế bào bắt nguồn từ dòng tế bào này đều có X kia hoạt động bình thường, mang gen B, hình thành màu đen. Ngược lại, nếu X bất hoạt lại mang gen màu đen (B), thì mọi tế bào sinh ra từ

dòng này lại có X kia hoạt động bình thường, mang gen b, cho ra lông vàng.

Giả thuyết Lyon cho rằng, cả hai dạng bất hoạt này đều xảy ra trên một cá thể, dẫn đến màu tam thể có ở mèo.

Trong chăn nuôi, người ta dùng thể Barr làm một chỉ thị (marker) để chẩn đoán bê vô sinh ngay sau khi mới đẻ ra. Trong trường hợp bê sinh đôi khác giới (1 đực, 1 cái), nếu con đực có thể Barr, chứng tỏ có hệ nối mạch giữa 2 thai sinh đôi này (freemartin) và bê cái sẽ là vô sinh, do cơ chế trao đổi hormone qua máu lưu thông giữa 2 thai.

4. Những phát hiện mới về cơ chế phân tử bất hoạt X

Ngày nay người ta thấy, hình như hiện tượng bất hoạt X thực chất là một sự sửa đổi *điều chỉnh* (modification) *cấu trúc cơ sở* (structure de base) của nhiễm sắc thể.

Như ta biết, nhiễm sắc thể bao gồm cấu trúc cơ sở là nucleosome, trong đó *ADN được gắn* (quấn quanh) với histon, *làm chức năng cơ bản* là những protein cấu trúc. *Cấu trúc cơ sở* này tạo nên nhiễm sắc chất (chromatin). Cấu trúc nhiễm sắc chất có 2 dạng khác nhau: đồng nhiễm sắc chất (euchromatin), dạng mở, duỗi xoắn và dị nhiễm sắc chất (heterochromatin), dạng kết xoắn, cô đặc. Nhìn chung, đồng nhiễm sắc chất gắn với hoạt tính di truyền, dị nhiễm sắc chất gắn với bất hoạt di truyền.

Dạng kết xoắn của dị nhiễm sắc chất làm cho gen không hoạt động được, bằng cách ngăn cản các yếu tố protein cần cho sao mã (transcription).

Trong một tế bào điển hình có khoảng 70% nhiễm sắc chất là thuộc dạng heterochromatin, ứng với phần bất hoạt trong gen (genome).

Nhiễm sắc thể X bất hoạt là một ví dụ về vấn đề này. Sự tự nhân đôi (duplication) của nhiễm sắc thể này xảy ra chậm hơn trong chu kỳ phân bào. Chính các nghiên cứu làm rõ hiện tượng bất hoạt của X là dựa trên các phát hiện gần đây về bản chất của dị nhiễm sắc chất.

Ở ruồi dấm *Drosophila melanogaster*, thường gặp một hiện tượng di truyền khá đặc biệt, là sự biến đổi màu sắc mắt do hiệu quả vị trí, cụ thể là sự biến đổi thể khảm do hiệu quả vị trí (position effect

variegation). Hiện tượng này là do bất hoạt của một số gen nằm trên phân đồng nhiễm sắc chất, khi các gen này, do một nguyên nhân nào đó, lại nằm kế ngay một đoạn dị nhiễm sắc chất.

Trường hợp như trên có thể xảy ra do một sự sắp xếp lại nhiễm sắc thể, như khi có chuyển đoạn hoặc đảo đoạn nhiễm sắc thể, một đoạn nhiễm sắc chất chuyển vị trí trên nhiễm sắc thể. Có thể nêu ví dụ về sự kiểm soát di truyền đối với màu sắc của mắt.

Ruồi thường có mắt đỏ (kiểu dại), nhưng ruồi đột biến mang gen mắt trắng, ở những ruồi đột biến này đôi khi mắt trắng lại có chấm đỏ. Từ 1955, B. H. Judd đã phát hiện các chấm đỏ trên là do sự sắp xếp lại nhiễm sắc thể, đặt gen đột biến mắt trắng nằm kế sát ngay đoạn dị nhiễm sắc chất. Dị nhiễm sắc chất lúc này có thể truyền lan sang đoạn nhiễm sắc thể đối chỗ, làm cho gen mắt trắng trở nên có phần bất hoạt. Hiệu quả vị trí này xảy ra sớm trong quá trình phát triển của mắt, và sự lan truyền dị nhiễm sắc chất có thể khác nhau giữa các tế bào, dẫn đến mắt phát triển có cả vết màu đỏ (kiểu dại) và trắng (kiểu đột biến).

Để làm rõ cơ chế hiện tượng truyền lan của dị nhiễm sắc chất, K. D. Tartof và cộng sự ở Trung tâm ung thư Mỹ, đã nghiên cứu các gen thúc đẩy hoặc kìm hãm quá trình nói trên, như các gen kiểm soát số lượng vết đỏ trong các mắt trắng của ruồi đột biến. Họ cũng đã phát hiện một hệ thống đặc biệt các protein tham gia tạo thành dị nhiễm sắc chất.

Theo mô hình họ nêu lên, vào những năm 1980, thì sự kết xoắn của dị nhiễm sắc chất được xúc tác bởi sự hình thành liên tục hệ thống các protein nói trên, dọc theo chiều dài của sợi nhiễm sắc chất. Mô hình còn nêu lên là sự hình thành một loại protein đặc thù trong hệ thống trên có vai trò thúc đẩy sự hình thành các loại khác, dẫn tới sự truyền lan dần vùng kết xoắn của dị nhiễm sắc chất. Bình thường, thì sự lan truyền của dị nhiễm sắc chất bị ngăn chặn bởi một "vật cản", hiện chưa rõ bản chất, tồn tại trong nhiễm sắc thể.

Nhiều công trình thực nghiệm đã thừa nhận mô hình của Tartof. Ví dụ, một loại protein đặc thù trong hệ thống protein nói trên, mang tên protein 1 của heterochromatin (HP_1), được phát hiện 1987 bởi nhóm S.C.R.Elkins, ở Trường đại học Tổng hợp Washington. Trong các nhiễm sắc thể ruồi dấm, protein HP_1 gắn liền hẳn với dị nhiễm sắc chất.

Có đủ thực nghiệm (trên ruồi dấm đột biến mắt trắng) cho phép giả

thiết là hiện tượng bất hoạt của nhiễm sắc thể X được hình thành và phát triển tiến hóa từ các cơ chế bất hoạt gen và sự tạo thành dị nhiễm sắc chất ở sinh vật nguyên thủy. Quan niệm này được khẳng định thêm nhờ các nghiên cứu của P.B.Singh, Cambridge, Anh, 1989 phát hiện ở động vật có vú các protein gắn giống protein 1 của heterochromatin (HP₁) của ruồi dấm.

Người ta cũng có các bằng chứng trực tiếp cho thấy hiện tượng biến đổi màu sắc mắt ở ruồi dấm do hiệu quả vị trí và hiện tượng bất hoạt X ở động vật có vú là có sự tương đồng.

Năm 1963, L.B.Russell, Mỹ cùng B.M.Cattanach, Oxford đã quan sát thấy chuột đột biến về màu sắc cũng tương tự như ở ruồi dấm.

Do có sắp xếp lại nhiễm sắc thể (chuyển đoạn) mà có sự trao đổi đoạn giữa nhiễm sắc thể X và một autosome, hiện tượng bất hoạt được lan truyền từ nhiễm sắc thể X sang đoạn của autosome gắn liền.

Một vấn đề được đặt ra để giải quyết, bằng cách nào một tế bào có thể tiến hành biến đổi đồng nhiễm sắc chất thành dị nhiễm sắc chất, quá trình này xảy ra trong quá trình bất hoạt X ở những ngày đầu phát sinh phôi.

Russell, 1965 đưa ra giả thuyết có "một trung tâm bất hoạt X" hoặc Xic, mang một gen, điều khiển quá trình bất hoạt. Thực nghiệm được tiến hành trên chuột, mang chuyển đoạn giữa X và một autosome, do đó trong tế bào có 2 nhiễm sắc thể lai, một mang một phần của X gắn một đoạn của autosome, nhiễm sắc thể lai kia mang phần còn lại của X cùng đoạn còn lại của autosome. Nhưng khi Russell tìm cách phát hiện trạng thái bất hoạt X trong các tế bào, thì chỉ thấy xảy ra ở một trong hai nhiễm sắc thể lai.

Đến 1978, sau khi nghiên cứu tiếp một số lớn các chuyển đoạn khác nhau, Russell đi đến kết luận là nhiễm sắc thể bất hoạt luôn luôn có một vùng biến động, nằm ở giữa nhiễm sắc thể X. Vùng này mang một trung tâm điều khiển sự bất hoạt. Hiện tượng bất hoạt lan toả từ điểm này, theo hai hướng dọc nhiễm sắc thể.

Bình thường thì 2 nhiễm sắc thể X trong một tế bào là có xác xuất bất hoạt bằng nhau. Khi cho lai giữa các dòng chuột thí nghiệm, 1981, Cattanach đã phát hiện có một gen, thời ấy còn chưa được xác định cụ thể, có thể làm chức năng định hướng bất hoạt ở một X. Gen này, được

đặt tên là "yếu tố kiểm soát X" hoặc Xce, về sau được xác định là nằm trong cùng vị trí với trung tâm bất hoạt của Russell, nói cách khác Xce với Xic là một, có cùng một gen.

Nhiều thực nghiệm tiếp theo, chứng minh cho sự có mặt của trung tâm bất hoạt, qua nghiên cứu tế bào phôi cái của chuột được nuôi cấy. Các tế bào này (được gọi là tế bào phôi gốc hoặc ES) còn mang cả 2 nhiễm sắc thể X hoạt hóa, tức là những tế bào được tách ra từ phôi rất non chưa xảy ra bất hoạt X.

Trong một số điều kiện nuôi cấy đặc biệt, những tế bào này cho ra nhiều loại tế bào, sự phân hóa xảy ra này có kéo theo sự bất hoạt của một X. Năm 1985, S.Rastan, Anh hợp tác với E.Robertson, Cambridge, đã nghiên cứu nhiều dòng tế bào ES, mỗi dòng có một X đã bị xén đi 1 đoạn. Họ đã thấy rằng sự bất hoạt không hề xảy ra trong các tế bào có một X bị xén mất vùng trung tâm bất hoạt. Rõ ràng sự có mặt của vùng trung tâm bất hoạt trên 2 nhiễm sắc thể X là cần thiết để có thể xảy ra bất hoạt. Điều đó càng giải thích vì sao hiện tượng bất hoạt không hề xảy ra ở các tế bào đực. H.F.Willards, Trường đại học Tổng hợp Stanford, đã xác định vị trí trung tâm bất hoạt trên nhiễm sắc thể X của người và tiến hành phân lập gen này từ người. Họ dùng phương pháp tách dòng vị trí, khoanh nhỏ một vùng nhiễm sắc thể mang gen cần nghiên cứu, xây dựng bản đồ phân tử chi tiết và cuối cùng tách gen từ vùng này.

Năm 1991, nhóm của Willards, đã tình cờ phát hiện là trung tâm bất hoạt X ở người ứng với một gen đã được phân lập từ nhiều năm về trước. Gen này hoạt hóa (tức được sao mã thành ARN, ngay trên một nhiễm sắc thể X bất hoạt). Đây là một phát hiện bất ngờ, bởi vì bình thường thì chỉ những gen nằm trên nhiễm sắc thể hoạt hóa mới có khả năng sao mã sang ARN. Gen đặc biệt này có tên là XIST (X-inactive specific transcript).

Chỉ sau đó ít tháng, người ta lại phân lập được một gen tương tự từ chuột, gọi là Xist. Gen này nằm trong trung tâm bất hoạt, cũng chỉ hoạt động trên nhiễm sắc thể X bất hoạt.

Các thực nghiệm kiểm tra lại đã xác định hai gen này, XIST ở người và Xist ở chuột, đều có cấu trúc tương tự nhau, đều được sao mã thành một phân tử ARN, lớn hơn các ARN sao mã từ các loại gen khác. Giải trình tự nucleotid của hai gen này, cho thấy chúng giống nhau đến

70%. Các nghiên cứu bổ sung đã phát hiện các gen tương tự ở các động vật có vú khác (bò, lợn, khỉ, cừu và chó). Chỉ có khác là, nếu nói chung các gen đều được sao mã, dịch mã, tổng hợp ra protein, thì ARN của gen Xist này không mã hóa một protein nào cả. ARN này nằm lại trong nhân tế bào, còn sự tổng hợp protein thì lại xảy ra trong tế bào chất. Người ta giả thiết rằng ARN của Xist bản thân nó cũng là một thành phần của tín hiệu bất hoạt, lan toả dọc theo nhiễm sắc thể. Nếu giả thiết này là đúng, thì rõ ràng còn có thêm một chức năng hoàn toàn mới của các phân tử ARN.

Năm 1992, J. Lawrence ở Trường đại học Tổng hợp Massachusetts cùng nhóm Willard sử dụng một kỹ thuật dùng kháng thể huỳnh quang để có thể trông thấy được phân tử ARN đặc biệt nằm trong nhân tế bào. Bằng kỹ thuật này, họ đã quan sát thấy ARN của Xist, nằm trong nhân tế bào, sát vùng Barr của nhiễm sắc thể X bất hoạt.

G. CÔNG NGHỆ TẾ BÀO ĐỘNG VẬT

TẾ BÀO LAI VÀ KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG

1. Sản xuất vacxin tổng hợp bằng công nghệ tế bào

1.1. Kỹ thuật tế bào lai

Kỹ thuật tế bào lai (hybridoma) đã mở ra một con đường mới trong miễn dịch học, để sản xuất hàng loạt vacxin.

Hybridoma được tạo ra trong phòng thí nghiệm bằng cách cho lai giữa loại tế bào sinh kháng thể với loại tế bào ung thư.

Trước đây, phương pháp cổ truyền để sản xuất vacxin dùng tiêm chủng là tiêm kháng nguyên vào cơ thể động vật và thu được kháng thể, tạo thành trong huyết thanh, làm thành kháng huyết thanh. Chất lượng kháng huyết thanh phụ thuộc hàm lượng kháng thể và các tạp chất còn lại.

Gần đây, người ta cũng đã tạo kháng thể bằng nuôi cấy tế bào, nhưng theo hướng này, phải định kỳ làm lại sau mỗi lần thu hoạch, vì trong điều kiện nuôi cấy, do tình trạng các tế bào dễ tiếp giáp nhau, nên thường các tế bào chỉ phân chia một số lần sau đó không còn tiếp tục

nữa. Hiện nay, với công nghệ di truyền, người ta đã giải quyết được khó khăn nêu trên, đã phát hiện và sử dụng một loại tế bào nuôi cấy có khả năng phân chia liên tục, không ngừng.

Như ta đã biết, sự phân ly nhiễm sắc thể trong quá trình sinh sản ở tế bào nuôi cấy được tiến hành qua nguyên phân. Thường thì một dòng tế bào là con, cháu sinh ra từ một tế bào, do đó được gọi là dòng (clone) hay từ một số tế bào của một loại tổ chức.

Để có các dòng tế bào có khả năng phân chia liên tục, người ta đã sử dụng loại tế bào ung thư. Khả năng sinh sản lâu dài, phân chia liên tục của tế bào ung thư nuôi cấy có liên quan với khả năng tăng sinh (proliferation) của tế bào ung thư trong cơ thể sống.

Người ta đã lợi dụng tiềm năng phát triển liên tục này của tế bào ung thư, cho lai tế bào ung thư với một loại tế bào động vật có vú có chức năng sản sinh kháng thể, đã tạo được loại tế bào lai nuôi cấy, có thể sinh sản liên tục, lâu dài, tạo ra khối lượng lớn kháng thể. So với các loại kháng thể thu được thông thường qua cừu, ngựa, thỏ..., thì loại kháng thể này tuyệt đối tinh khiết.

Quá trình này được gọi là lai tế bào trong nuôi cấy, được khái quát là sự dung hợp giữa một tế bào có khả năng tái bản liên tục với một tế bào kháng thể. Hiện nay, nhiều phòng thí nghiệm đã sử dụng phương pháp cho lai tế bào lách của chuột nhắt đã được miễn dịch chống kháng nguyên chọn lựa (tạo được kháng thể) với tế bào u ung thư "myeloma" của tuỷ xương. Tế bào lai tạo ra, có khả năng phân chia bình thường, liên tục, tạo ra một loại kháng thể với khối lượng lớn, đặc trưng cho một dòng tế bào, vì vậy được gọi là kháng thể đơn dòng.

1.2. Kháng thể đơn dòng

Kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody) hiện nay được dùng để chống thụ thai, làm tiệt sinh ở gia súc, là phương tiện rất nhạy và đơn giản để chẩn đoán có thai, lao, hủi, và còn được dùng để chẩn đoán dị căn ung thư nếu có gắn thêm đồng vị phóng xạ.

Sử dụng kháng thể đơn dòng đã nhanh chóng thay thế các phương pháp miễn dịch và huyết thanh học thông thường, trong các xét nghiệm như:

- a. Xác định mức hormone để đánh giá chức năng tuyến nội tiết.

b. Phát hiện một số protein có ý nghĩa để chẩn đoán khối u hoặc một số điều kiện đặc biệt trước khi sinh đẻ.

c. Xác định vi khuẩn và virus gây bệnh.

d. Phát hiện các thuốc bị cấm trong máu như trường hợp cầu thủ thi đấu, kiểm tra nồng độ thuốc trong máu và các tổ chức nhằm đảm bảo liều thuốc dùng không vượt quá ngưỡng gây độc.

Kháng thể đơn dòng còn được dùng để:

a. Ước chế phản ứng thải loại khi ghép cơ quan (ghép thận, truyền tủy).

b. Miễn dịch hoá thụ động chống lại kháng nguyên tham gia vào sinh sản (chống thụ thai bằng phương pháp miễn dịch).

c. Định vị khối u với những kháng thể đặc hiệu.

Nhờ tính đặc hiệu và chính xác cao, sử dụng dễ dàng, kháng thể đơn dòng đã tạo ra một hướng phát triển mạnh mẽ nhất của công nghệ tế bào. Kháng thể đơn dòng cũng được dùng để chẩn đoán và thử nghiệm điều trị carcinoma gan nguyên phát. Sau khi phát hiện ra α -foet-protein trong máu, có thể loại bỏ khối u ngay từ giai đoạn rất sớm (Nouchi, 1985). Người ta dùng iốt phóng xạ gắn vào kháng thể đơn dòng, sau đó công phá đặc hiệu tế bào ung thư trong gan.

Kháng thể đơn dòng gần đây nhất còn được dùng để phát hiện AIDS/ hội chứng suy giảm miễn dịch (acquired immuno deficiency syndrome).

Người ta đã thành công, tiêm kháng thể đơn dòng cho bò cái, cừu cái, cừu được hàng loạt gia súc sơ sinh khỏi chết do *Colibacillus enteritis*.

Chương III

DI TRUYỀN HÓA SINH ĐỘNG VẬT

A. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP HÓA SINH TRONG NGHIÊN CỨU DI TRUYỀN HỌC ĐỘNG VẬT

I. PHƯƠNG PHÁP ĐIỆN DI AXIT NUCLEIC

1. Nguyên tắc

Điện di (electrophoresis) axit nucleic được dùng để phân tích định tính và thu nhận mẫu axit nucleic, dựa trên đặc tính cấu trúc của axit nucleic. Axit nucleic là các đại phân tử tích điện âm, đồng đều trên khắp bề mặt, do đó khi chịu tác động của một điện trường, chúng sẽ di chuyển về cực dương của điện trường. Tính linh động của phân tử axit nucleic trong bản gel dưới tác động của một điện trường, được tính:

$$\log U = \log U_0 - KrC$$

$\log U_0$: tính linh động của phân tử trong môi trường lỏng;

Kr : hằng số làm chậm (retardation coefficient) do cấu trúc gen và khối lượng phân tử axit nucleic quy định;

C : nồng độ của gel.

Tính linh động của phân tử axit nucleic phụ thuộc 2 chỉ tiêu: khối lượng phân tử tức số lượng nucleotid hay cặp nucleotid (trong ADN mạch kép); nồng độ các chất cấu thành gel.

2. Điện di ADN trên gel agarose

Sản phẩm cắt của ADN được điện di trên gel agarose (hoặc polyacrylamid) sẽ tạo thành các dải băng khác nhau. Agarose là một loại polymer tách từ rong biển, cấu tạo bởi 2 monomer là D-galactose và

3,6 anhydro-L-galactose. ADN mang điện tích âm, di chuyển từ - đến + . Tốc độ di chuyển phụ thuộc: kích thước phân tử; dạng cấu trúc ADN; nồng độ agarose trong gel; điện thế ; nhiệt độ; thành phần chất đệm điện di...

ADN của nhân rất lớn, có số đoạn cắt rất nhiều. Chênh lệch về trọng lượng phân tử và kích thước các đoạn rất nhỏ do đó tạo thành giải dải liên tục (smear).

Gel agarose được dùng để phân tích những đoạn có kích thước 0,5-20 kb, được để trên một giá thể nằm ngang, sau khi đun tan để nguội. Giá có lắp lược. Rút lược ra sau khi gel đã đông lại, đặt gel nằm ngang trong buồng điện di, chứa dung dịch đệm. Điện di được thực hiện theo phương nằm ngang. Các axit nucleic trong gel agarose được hiện hình dưới tia tử ngoại (UV) nhờ ethidium bromide, có khả năng gắn xen giữa các bazơ của axit nucleic và phát huỳnh quang dưới tác dụng của UV. Ethidium bromide được cho vào gel trước khi đổ. Sau điện di, gel được chiếu sáng bằng UV ($\lambda \approx 300$ nm), axit nucleic hiện vạch đỏ da cam. Để ước lượng kích thước các trình tự axit nucleic trong gel agarose, người ta dùng yếu tố đánh dấu trọng lượng phân tử (molecular weight marker - MWM) là 1 tập hợp nhiều trình tự ADN, có kích thước đã biết (thang ADN tức ADN ladder). Thông thường người ta dùng thang ADN là thực khuẩn thể λ được thủy giải bởi enzym giới hạn Hind III.

Điện di trên gel còn được dùng để làm tinh sạch và thu nhận mẫu. Sau khi điện di, các vạch tương ứng với ADN cần tinh sạch, sẽ được phát hiện và thu nhận theo các phương pháp sau:

1. Phần agarose chứa các vạch do được cắt ra, cho vào 1 dung dịch đệm thích hợp. ADN sẽ được thu nhận sau khi đã khuếch tán từ gel agarose vào dung dịch đệm.

2. Một giếng nhỏ được khoét trên bản gel agarose ngay trước vạch chấm ADN. Giếng này được bơm đầy dung dịch đệm. Trong điện trường, ADN di chuyển vào giếng chứa đầy dung dịch đệm và được thu nhận.

3. Dùng gel agarose đặc biệt (nusieve hay seaplaque) có điểm nóng chảy rất thấp (65°C). Sau điện di, vạch ADN được cắt ra, ủ trong 1 dung dịch đệm ở 65°C. Khi agarose đã hoàn toàn tan chảy, ADN được thu nhận, sau các công đoạn tách chiết và rửa.

3. Điện di ADN trên gel polyacrilamid

Phương pháp này được dùng để tách các đoạn kích thước nhỏ, dưới

1000 cặp bazơ, thao tác phức tạp hơn so với gel agarose, do đó chỉ dùng cho những mục đích đặc biệt. Công dụng của phương pháp này là: tinh sạch các oligonucleotid tổng hợp; xác định trình tự ADN; tách các đoạn ADN nhỏ dưới 500 cặp bazơ. Gel được để giữa 2 tấm thủy tinh. Phương điện di là phương thẳng đứng.

B. DI TRUYỀN HÓA SINH ĐỘNG VẬT

Như ta đã biết, qua các giai đoạn di truyền học Mendel, di truyền học nhiễm sắc thể Morgan, đến ngày nay di truyền học được đi sâu ở mức phân tử. Người ta đã có đủ cơ sở thực nghiệm để thừa nhận *gen là các đoạn của phân tử ADN*, kiểm tra sự tổng hợp một protein, một enzym tương ứng, qua đây tác động lên trao đổi chất, hình thành các tính trạng trong quá trình phát triển cá thể, theo sơ đồ chung nhất: gen-protein-tính trạng.

Rõ ràng, qua thực nghiệm và kết quả theo dõi, phân tích, người ta đã thừa nhận cơ chế xuất hiện trong quần thể bò lang trắng đen, những con bê đỏ, là do kết quả của các quá trình hóa sinh do gen điều khiển, dẫn đến tạo thành, không phải là melanin đen, mà là melanin đỏ.

Cơ chế tác động của gen để hình thành tính trạng sinh giới, của động vật là vấn đề rất thời sự, đã có nhiều thành tựu nghiên cứu, nhưng cho đến nay còn là vấn đề đang phải tiếp tục làm rõ.

Khó khăn chủ yếu trong vấn đề này là do chưa và rất khó xác định được mọi thành phần, mọi gen trong genom các loài, ngay cả trên các đối tượng đã được nghiên cứu lâu nhất và nhiều nhất về mặt di truyền.

Đối với các loại gen trong sinh vật, động vật, quy định các loại tính trạng, người ta chỉ có thể xác định chúng rõ rệt, cụ thể, khi chúng được biểu hiện ra ngoài, khi thực sự có biểu hiện gen. Ví dụ, chỉ khi do đột biến mà thấy xuất hiện một số con lợn chân khoèo, hậu môn bít, hòn cà (dịch hoàn) ẩn, vv... như đã thấy ở lợn I Việt Nam và một số đàn lợn các nước, thì người ta mới theo dõi qua nhiều thế hệ và xác định được đây là các tính trạng di truyền, do gen quy định, những gen này nói chung được gọi là **gen gây chết**.

Một khó khăn nữa, là đối với nhiều loại gen quy định sự phát triển

các tính trạng quan trọng, các cơ quan, các tổ chức trong cơ thể, khi đột biến, chúng kéo theo những hậu quả nghiêm trọng, nhưng vì có những cá thể mang đột biến này bị chết từ khi còn trong thai non tháng (quái thai, dị hình v.v...), do đó người ta không thể xác định được cụ thể các loại gen nói trên.

Cho đến nay, nói chung, đối với mỗi loài, người ta cũng chỉ mới xác định được cụ thể một phần trong toàn bộ kiểu gen, một bộ phận trong toàn bộ thông tin di truyền của loài, phần ấy nói chung còn chiếm tỷ lệ rất bé so với toàn bộ thông tin di truyền của các loài sinh vật. Ngay từ trước khi phát hiện lần thứ hai các định luật Mendel (1900), đã có một số công trình nghiên cứu bước đầu về di truyền học hóa sinh.

Năm 1909, A.Garrod đã xuất bản cuốn sách "Sự rối loạn bẩm sinh về trao đổi chất" trên cơ sở các bài giảng ở Trường đại học Tổng hợp London. Trước đó mười năm (1899) Garrod đã nghiên cứu một bệnh di truyền, mà ngày nay người ta gọi là bệnh Ancaptonuria, một bệnh rối loạn trao đổi chất ở người, có thể phát hiện qua màu nâu của nước tiểu. Nước tiểu này, khi ra không khí, được biến thành màu đen.

Năm 1902, Bateson và năm 1907, Garrod đã chứng minh là bệnh này do một gen lặn, thường xảy ra trong một số gia đình có người cùng dòng máu lấy nhau. Có 5 gia đình, trong 25% số người mắc bệnh này, đều là những người anh chị em họ lấy nhau, thuộc dạng đồng hợp thể về gen lặn nêu trên.

Bệnh bẩm sinh này lúc tuổi còn bé thì chưa ảnh hưởng nhiều đến sức khỏe, nhưng lớn lên thì có nhiều biến loạn cơ thể, chất ancapton tiết ra theo nước tiểu. Chất ancapton khi ra ngoài, được oxy hóa bởi oxy không khí, biến thành một hợp chất sẫm màu, không tan và kết tủa.

Ở người bình thường, có đủ các loại enzym trong cơ thể, biến ancapton thành axit axetoaxetic, cuối cùng được phân giải thành CO_2 và H_2O . Có thể nói, các công trình nghiên cứu của Garrod đã mở đầu cho sự ra đời của di truyền học hóa sinh.

Năm 1912, Goldschmidt đã có nhiều công trình đặt nền móng cho lĩnh vực di truyền học hóa sinh, nghiên cứu phương thức gen điều khiển và định hướng sự phát triển từ trứng thụ tinh đến cá thể trưởng thành.

Nghiên cứu của Goldschmidt trên ngài đơn (*Limantria dispar*) về các dạng trung gian tính đã cùng một số công trình của các tác giả khác,

xác nhận sự phát triển cá thể (ontogenesis) là do gen điều khiển, thông qua hệ thống enzym, chính những enzym này cũng được tổng hợp dưới sự kiểm soát của các gen trên.

Di truyền học hóa sinh-sinh lý liên quan khá chặt chẽ với ngành sinh lý học và phôi sinh học của sự phát triển.

Nhiều nghiên cứu về sau trên đối tượng ruồi *Drosophila melanogaster* đã góp phần làm sáng tỏ cơ chế di truyền và cơ chế hóa sinh của sự phát triển cá thể.

Các công trình về phôi sinh học trên các dạng đột biến ở chuột cũng đã dẫn tới phát hiện được bản chất tác động gây hại của các gen đột biến, vị trí và thời điểm của hoạt động các gen này trong quá trình phát triển phôi, trong thời kỳ hậu phôi, gây nên rối loạn trong các phản ứng hóa sinh của quá trình trao đổi chất. Một số gen đột biến tác động ngay từ những giai đoạn phát triển sớm, một số khác chỉ biểu hiện ở các giai đoạn về sau. Những đột biến gen này làm kìm hãm sự tổng hợp các enzym tương ứng, xúc tác cho các phản ứng hóa sinh trong trao đổi chất.

Các rối loạn enzym, rối loạn trật tự chuỗi phản ứng hóa sinh, nếu xảy ra trong các giai đoạn phát triển sớm của cơ thể sẽ dẫn đến hậu quả nghiêm trọng và sâu sắc hơn so với các trường hợp xảy ra ở những giai đoạn cuối của phát triển cá thể.

I. ĐỘT BIẾN HÓA SINH Ở VI SINH VẬT

Vi sinh vật là đối tượng rất thuận lợi để nghiên cứu di truyền học hóa sinh, trong đó đối tượng được nghiên cứu nhiều nhất là *Neurospora crassa*, do Beadle và Tatum, 1941 (giải Nobel năm 1958), sau đó là đến các đối tượng khác như nấm (nấm men, *Aspergillus*, *Ophiostoma*). Gần đây, các công trình theo hướng trên được tiến hành trên vi khuẩn, trong đó có công trình nổi tiếng của Lederberg, giải Nobel năm 1958.

Để sinh trưởng, phát triển, nói chung vi sinh vật cần các nguồn glucit, nitơ, muối vô cơ v.v... Từ các thức ăn này, vi sinh vật sẽ tổng hợp ra axit amin, nucleotit, lipid và các chất hữu cơ khác.

Trong trường hợp một vi sinh vật không có khả năng tổng hợp một loại chất nào đó, thì nó chỉ có thể sống, sinh trưởng, phát triển bình

thường nếu được bổ sung thêm loại chất ấy từ ngoài vào môi trường thức ăn của chúng. Các nghiên cứu thực nghiệm trên *Neurospora* và trên các đối tượng khác, đã dẫn đến phát hiện các loại đột biến như trên, được gọi là đột biến hóa sinh.

Những vi sinh vật có khả năng tổng hợp nên các loại chất trong cơ thể, từ vô số các chất vô cơ, các liên kết đơn giản, từ đó sinh trưởng phát triển bình thường, thì được gọi là thể tự dưỡng.

Đối với các thể đột biến hóa sinh, chúng chỉ có thể sinh trưởng, phát triển bình thường nếu được bổ sung vào môi trường tối thiểu của chúng các loại chất mà tự chúng không tổng hợp được, do đó được gọi là thể dị dưỡng. Ở *Neurospora*, người ta đã phát hiện được nhiều thể đột biến hóa sinh dị dưỡng. Các thể đột biến này mất khả năng tổng hợp những loại chất nhất định như axit amin, vitamin, bazơ purin, pyrimidin.

Các công trình đã chứng minh cơ sở của các rối loạn nêu trên là do đột biến của hàng trăm gen nằm ở các vị trí khác nhau trên 7 nhiễm sắc thể của *Neurospora*.

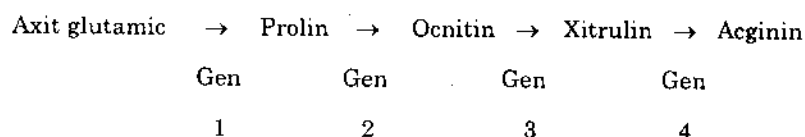
1. Các đột biến hoá sinh trong chuỗi sinh tổng hợp acginin ở *Neurospora*

Neurospora được nuôi cấy dễ dàng trong ống nghiệm và nhân lên theo hình thức vô tính. Môi trường tối thiểu của *Neurospora* gồm nước, một số axit và muối vô cơ, glucit (như glucoza), nguồn nitơ (như nitrat amon) và một loại vitamin là biotin. Từ các nguyên liệu trên, *Neurospora* có thể tổng hợp nên 20 axit amin khác nhau, tổng hợp được các loại vitamin (trừ biotin), purin, pyrimidin v.v...

Trong các thể đột biến của *Neurospora* phát sinh dưới tác động của tia Rơng-en hoặc các tác nhân gây đột biến khác, nhiều cá thể không mọc được trong môi trường tối thiểu. Muốn chúng sinh trưởng, phát triển được, phải thêm vào môi trường tối thiểu các chất đặc thù mà bản thân thể đột biến không tổng hợp được. Bằng phương pháp nghiên cứu đột biến, người ta đã xác định được các giai đoạn khác nhau trong trao đổi chất bình thường ở *Neurospora*. Người ta đã tạo được ở *Neurospora* hơn 50 thể đột biến dị dưỡng, không có khả năng tổng hợp acginin. Các thể đột biến này cần được bổ sung vào môi trường tối thiểu các chất thuộc

dạng tiền acginin, để có thể sinh trưởng, phát triển.

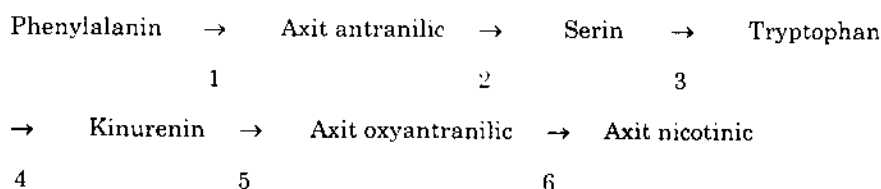
Bằng thực nghiệm như trên, người ta đã làm rõ chuỗi phản ứng hóa sinh tổng hợp acginin ở *Neurospora*.



Mỗi phản ứng hóa sinh trong chuỗi được xúc tác bởi một enzym đặc thù, do gen tương ứng kiểm tra.

Đột biến gen 4 làm rối loạn ở khâu cuối cùng là khâu dẫn đến hình thành acginin. Gen 3 đột biến làm kìm hãm sự tạo thành xitrulin. Cũng như thế, đột biến gen 2 làm kìm hãm sự tạo thành ocnitin, và đột biến gen 1 làm kìm hãm sự hình thành prolin.

Qua thực nghiệm, người ta cũng phát hiện các đột biến hóa sinh dẫn đến rối loạn các enzym xúc tác cho các phản ứng hóa sinh trong chuỗi sinh tổng hợp tryptophan và axit nicotinic ở *Neurospora*.



Qua nghiên cứu các đột biến hóa sinh ở *Neurospora*, người ta đã chứng minh, các rối loạn di truyền, kìm hãm tổng hợp enzym xúc tác các phản ứng hóa sinh, có thể xảy ra ở 1 trong 6 khâu của chuỗi sinh tổng hợp.

Ví dụ, nếu ở dòng *Neurospora* phát sinh đột biến ở khâu số 3, thì quá trình tổng hợp sẽ bị đình chỉ sau khi tạo thành serin, dẫn đến không có khả năng tạo ra tryptophan, cũng như axit nicotinic.

II. CHUỖI SINH TỔNG HỢP MELANIN VÀ BỆNH BẠCH TẠNG

Các thực nghiệm di truyền hóa sinh đã làm rõ các chuỗi phản ứng và các đột biến hóa sinh tương ứng trong quá trình sinh tổng hợp melanin ở người và động vật, theo sơ đồ tổng quát:

Axit phenylpyruvic



Phenylalanin → Tirozin → 3,4 dioxypyphenylalanin → Melanin

1 2 3

Ở người, bệnh phenylketon niệu, ứ đọng phenylalanin trong máu, là một bệnh lý di truyền, do đột biến gen ở vị trí số 1 trong sơ đồ, dẫn đến thiếu enzym phenylalanin hydroxylaza, là enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa phenylalanin thành tirozin.

Ở những trẻ sơ sinh có triệu chứng này, gan không có khả năng tổng hợp lượng enzym nêu trên, và có hiện tượng thải nhiều xeton trong nước tiểu.

Enzym này bị rối loạn, làm kìm hãm sự chuyển hóa phenylalanin, dẫn đến tình trạng ứ đọng phenylalanin trong máu, đồng thời lại làm tăng lên sự phân giải phenylalanin thành axit phenylpyruvic. Hàm lượng axit phenylpyrruvic cũng được tăng lên trong máu và ra ngoài theo đường nước tiểu. Phenylalanin và axit phenylpyruvic ứ đọng trong máu, khi lên não sẽ đầu độc tế bào thần kinh, dẫn đến si đần, có trường hợp trầm trọng là trạng thái diên do rối loạn hệ thần kinh trung ương.

Phù hợp với cơ chế trong sơ đồ nêu trên, rối loạn enzym này do gen đột biến ở vị trí số 1 đồng thời cũng còn kéo theo cả trạng thái rối loạn hình thành sắc tố melanin.

Người ta đã có phương pháp xét nghiệm hàng loạt nước tiểu trẻ mới đẻ ở nhà hộ sinh qua chỉ thị màu, nếu phát hiện thấy triệu chứng nêu trên sẽ cho trẻ một khẩu phần đặc biệt, không có phenylalanin, thì có thể hạn chế được hậu quả của đột biến.

1. Bach tang ở đông vật

Thực nghiệm di truyền hóa sinh đã làm rõ cơ chế của bệnh này, do đột biến của gen kiểm tra các enzym xúc tác quá trình tổng hợp melanin. Sắc tố lông, da ở các loài động vật có khác nhau. Riêng ở động vật có vú, sắc tố lông, da là do melanin.

Ở gà, ngoài sắc tố nói trên, còn có sắc tố màu vàng là xantophin, được tạo thành từ thức ăn. Ở các loài động vật không đẻ trứng, xantophin chỉ có ở máu, mỡ (như ở cừu, thỏ); một số động vật khác xantophin có ở da.

Qua thực nghiệm, người ta thấy sự hình thành sắc tố melanin diễn ra suốt quá trình phát triển cá thể, không tùy thuộc vào lứa tuổi. Đây là một lĩnh vực rất thuận lợi để nghiên cứu di truyền học hóa sinh-sinh lý, vì trong chuỗi sinh tổng hợp này, mối quan hệ từ gen đến sản phẩm cuối cùng tương đối đơn giản.

Sắc tố melanin được hình thành, như theo sơ đồ đã nêu ở trên, là do chất 3,4 - dioxyphenylalanin không màu, bị enzym oxy hóa. Dịch tế bào trong giai đoạn hình thành sắc lông, phản ứng với chất 3,4-dioxyphenylalanin và có màu đen. Các thí nghiệm trên chuột của Russel, năm 1948, đã chứng minh, trong da chuột có enzym dioxyphenylalanin-oxydase, enzym này oxy hóa 3,4-dioxyphenylalanin thành melanin.

Thực nghiệm của Russel cũng đã cho thấy, trong chiết xuất của phần da trắng ở các con vật lang đen, enzym này không hoạt động, khác với ở các phần da có màu.

Nhiều phân tích di truyền trên động vật đã xác nhận, bạch tạng ở động vật là do gen lặn (Cole, Peterson, 1941). Nhiều trường hợp bạch tạng đã được nghiên cứu trên bò, thường do có giao phối cận huyết.

Ở Việt Nam, đã thấy có nhiều trường hợp, nghé bạch tạng sinh ra từ các cặp trâu đen.

III. CƠ SỞ DI TRUYỀN HÓA SINH MỘT SỐ RỐI LOẠN TRAO ĐỔI CHẤT Ở ĐỘNG VẬT

Để làm ví dụ về các rối loạn quá trình trao đổi chất do gen điều khiển, người ta đã làm rõ cơ chế di truyền bệnh porfirin bẩm sinh ở gia súc.

Bệnh này do rối loạn trao đổi chất, hình thành quá nhiều sắc tố do porfirin, tích lũy lại trong máu, xương, răng, răng có màu hồng, nước tiểu có màu hung đỏ, do porfirin đọng lại trong ngà răng, hàm lượng porfirin tăng trong phân và nước tiểu.

Jorgensen, Wich, 1955, phát hiện triệu chứng này ở bò Đan Mạch, Anh và xác định do gen lặn trên autosom.

Những động vật bị bệnh rất nhạy cảm ánh nắng mặt trời, dễ bị bỏng nắng khi tiếp xúc ánh nắng mặt trời. Những vùng da trắng, không lông, chỗ bỏng có thể loét sâu, thành sẹo, như xung quanh mắt, hố mũi, dọc lưng v.v... Nói chung, ở động vật lông trắng, da bị bỏng nắng mặt

trời nặng hơn so với động vật lông có màu, lông đen. Bệnh này cũng được phát hiện ở bò Socgoc (Nam Phi, Anh, Đan Mạch), bò Honstein-Friezian (Mỹ), bò đen và bò đỏ Jamaïque. Bệnh này cũng được phát hiện trên lợn (Đan Mạch, Niu Di Lân), nhưng có khác ở bò là, biểu hiện chậm hơn, ít nhạy cảm ánh nắng mặt trời hơn.

Thực nghiệm di truyền hóa sinh cũng đã phát hiện các sai khác mang bản chất di truyền giữa các gia súc, gia cầm về khả năng sử dụng thức ăn, nói chung là biểu hiện của những sai khác trong các quá trình trao đổi cơ bản do gen kiểm soát.

Những sai khác này dẫn đến các đặc điểm sai khác trong sinh trưởng, phát triển, trong khả năng chuyển hóa thức ăn thành thịt, sữa, trứng v.v..., khác nhau giữa các dòng, các giống gia súc, gia cầm, các cá thể, phụ thuộc không chỉ chế độ khẩu phần, nuôi dưỡng, chăm sóc, mà có mặt quan trọng là do bản chất di truyền.

Rất nhiều thực nghiệm khảo sát đã phát hiện sai khác di truyền giữa các giống gà về khả năng sử dụng các loại thức ăn dinh dưỡng đặc thù. Hiện tượng kìm hãm quá trình sử dụng riboflavin (vitamin B₂) là một rối loạn về trao đổi chất, ở những gà có đột biến gen dẫn đến không có khả năng truyền lại vitamin này cho thế hệ sau qua trứng, vitamin này có trong thức ăn của gà.

Một thực nghiệm khác phát hiện ở nhiều gà mái, cùng ăn một loại khẩu phần, nhưng lại sai khác nhau về hàm lượng tiamin (vitamin B₁) trong trứng đẻ ra. Người ta đã thấy, tiamin dự trữ trong máu của gà mái đẻ, sẽ đi vào trứng, do đó những sai khác về hàm lượng tiamin trong trứng là chỉ tiêu trực tiếp đánh giá khả năng sử dụng vitamin này của gà, đưa vào qua thức ăn.

Năm 1964, Hutt đã chứng minh được ưu thế này của giống gà Logo so với các giống gà nặng cân khác.

Bảng III.1. Hàm lượng tiamin trong trứng của một số giống gà cao sản

Giống gà	Số dòng	Hàm lượng tiamin trong 100g noãn hoàng trứng (mg)
Lông trắng	13	198
Rốt đỏ	5	138
Plimut sao	3	134
Niu Gemsia	4	146

Ngay giữa các dòng khác nhau của gà Logo trắng, người ta cũng phát hiện các sai khác về hàm lượng tiamin. Các số liệu thực nghiệm nêu trên, rõ ràng chứng minh rằng, đặc điểm trao đổi chất sai khác giữa các giống và dòng gà là cơ sở di truyền, do gen điều khiển. Người ta cũng phát hiện những sai khác rõ rệt giữa các giống gà về khả năng sử dụng vitamin D và E, về nhu cầu đối với magiê (Mg) cần cho sự phát triển bình thường của xương và những axit amin như metionin và acginin, bảo đảm cho sự phát triển bình thường của cơ thể.

IV. DI TRUYỀN HỌC HEMOGLOBIN VỚI CÔNG TÁC GIỐNG GIA SÚC

1. Cấu trúc, chức năng di truyền của hemoglobin

Hemoglobin ở người và động vật có chức năng chủ yếu là vận chuyển oxy, qua khả năng liên kết thuận nghịch với oxy. Khả năng này càng ngày càng được hoàn thiện trong quá trình tiến hóa của các loài.

Ở sinh vật nguyên thủy, khả năng tiếp nhận oxy của môi trường dinh dưỡng (như nước biển) là 0,5 ml/100ml. Khả năng này của máu động vật có vú, là môi trường dinh dưỡng trực tiếp của tế bào động vật, đã tăng lên 50 lần (25ml/100ml).

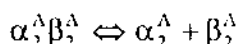
Chức năng của hemoglobin đã được phát triển qua sự tiến hóa, chủ yếu qua các bước phát triển cao của sắc tố hô hấp để hình thành hemoglobin, sau đó là bước định khu hemoglobin trong các tế bào biệt hóa, cụ thể là hồng cầu.

Đại phân tử hemoglobin có trọng lượng phân tử khoảng 66.700 (ở người), bao gồm 4 nhóm hem, chứa sắt, gắn với 4 chuỗi globin là phần protein của phân tử hemoglobin. Bốn chuỗi globin gồm 2 nhị hợp, tức các protein dưới dạng 2 cặp chuỗi α và 2 cặp chuỗi β (ở người trưởng thành).

Chuỗi polipeptit α gồm 141 axit amin, chuỗi β gồm 146 axit amin và đều có trọng lượng phân tử khoảng 1700. Mỗi chuỗi polipeptit gắn với một hem tương ứng tạo thành một monome, tức chất đơn phân, và cả đại phân tử gồm 4 monome, tạo thành polyme, tức chất trùng hợp hoặc đa hợp. Vì đại phân tử hemoglobin chứa các loại polipeptit khác nhau, nên người ta gọi đây là loại protein dị trùng hợp.

Trong các dung dịch hemoglobin, các tetrame ($\alpha_2\beta_2$) ở trạng thái cân bằng động với các dime ($2\alpha\beta$) và các monome ($2\alpha + 2\beta$).

Trong thực nghiệm, người ta có thể tách được hemoglobin A (HbA) của người trưởng thành, bình thường thành các dime riêng biệt và sau đó lại cho kết hợp lại, theo phản ứng thuận nghịch sau đây:



Sự phân ly thành các dime luôn luôn là đối xứng. Tetramer phân ly thành các dimer ở những vị trí tiếp xúc $\alpha_1\beta_2$ và $\alpha_2\beta_1$. Hem là vùng pocfirin có nguyên tử sắt ở giữa. Cấu trúc của hem không biến đổi, giống nhau ở mọi phân tử hemoglobin.

Vì vậy trong nghiên cứu di truyền học hemoglobin, người ta chỉ đề cập tới các hiện tượng liên quan đến phần protein của đại phân tử hemoglobin, mà người ta gọi là globin. Với trypsin là chất xúc tác đặc thù cho sự thủy phân lizin và acginin với các nhóm amin của các axit amin khác, người ta có thể cắt đoạn đại phân tử hemoglobin để nghiên cứu, những đoạn polipeptit nhỏ còn được gọi là peptit. Phương pháp sắc ký giấy sẽ cho phép xác định được các peptit nêu trên, có tốc độ di chuyển khác nhau trên giấy sắc ký.

Bằng phương pháp sắc ký kết hợp các phân tích khác, người ta đã phát hiện bản chất di truyền các rối loạn trong chức năng hoạt động bình thường của hemoglobin ở người.

Một loại bệnh di truyền do đột biến gen được phát hiện từ những năm giữa thế kỷ XX này, đó là các bệnh di truyền về hemoglobin dị dạng, điển hình là bệnh hồng cầu liềm (hồng cầu khuyết). Phân tích hemoglobin máu các bệnh nhân này, năm 1949, L. Paulin phát hiện thấy ở đây là dạng Hb^S, khác với Hb^A bình thường về tốc độ di chuyển trong điện trường thấy rõ qua điện di.

Năm 1957, V.M. Ingram đã phân tích thành phần hóa học và xác định được sai khác về cấu trúc hóa học giữa Hb^S dị dạng này với Hb^A bình thường. Một trong 30 đoạn của chuỗi bêta trong phân tử Hb có sự thay đổi vị trí 1 axit amin, axit glutamic ở vị trí số 7 trong đoạn này của Hb^A được thay bằng valin. Đây là biến đổi ở mức phân tử, do đột biến từ trong cấu trúc gen. Từ sai khác về bản chất hóa học, valin có tính chất

diện khác với axit glutamic, kéo theo các biến đổi về sinh lý. Hemoglobin của tế bào hình liềm bị khử oxy, trở thành không hòa tan, hình thành những bó sợi hình ống quánh đặc. Những sợi này làm biến dạng hồng cầu, làm hồng cầu dễ vỡ và quan trọng hơn là làm cho hồng cầu khó lưu thông trong các mao mạch. Khả năng vận chuyển oxy của hemoglobin giảm đi. Triệu chứng nghiêm trọng nhất là nguy cơ tử vong của bệnh nhân do hiện tượng tắc mạch tại các điểm nối mạch và trong các nội quan (ngheen mạch, trombosis).

Hồng cầu khuyết, không hoàn chỉnh, dễ bị phân hủy (vỡ hồng cầu), dẫn đến thiếu máu nghiêm trọng. Từ đó, sự tạo huyết phải tăng lên gấp bội, buộc tủy phải hoạt động mạnh hơn, do đó sưng lên.

Trong thực tế, những người đồng hợp thể về gen trội đột biến này (SS) thường chết sơ sinh, trong giai đoạn 3 tháng đến 2 tuổi.

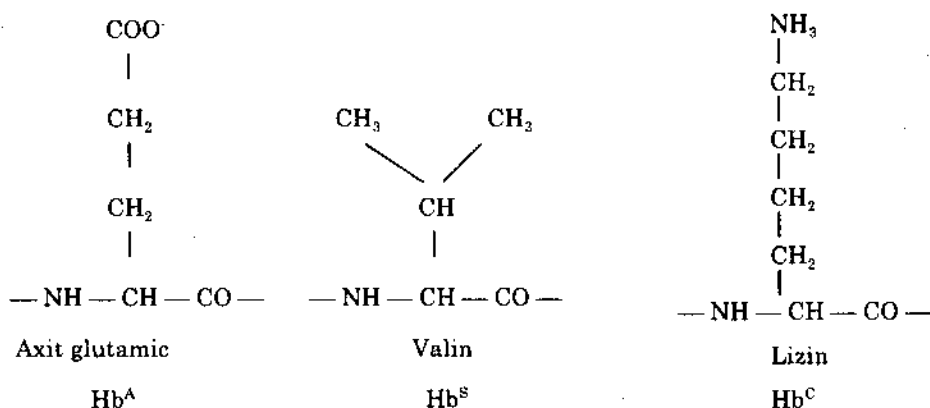
Bảng III.2. Kết quả phân tích sắc ký, so sánh giữa Hb^A và Hb^S

Trình tự các axit amin một đoạn	Hemoglobin Hb ^A	Hemoglobin Hb ^S
1	Histidin	Histidin
2	Valin	Valin
3	Lơxin	Lơxin
4	Lơxin	Lơxin
5	Treonin	Treonin
6	Prolin	Prolin
7	Axit glutamic	Valin
8	Axit glutamic	Axit glutamic
9	Lizin	Lizin

Một số liệu điều tra trong các cặp vợ chồng đều có kiểu gen dị hợp thể Ss (Ss x Ss) đã cho thấy, trong số 409 con sinh ra có 263 trẻ bị hồng cầu liềm, 146 còn lại bình thường. Ở đây, rõ ràng tỷ lệ 3:1 được thay bằng tỷ lệ 2Ss : 1ss, chứng tỏ gen đột biến trội ở dạng đồng hợp thể có tác dụng gây chết, các cá thể SS đều bị tử vong từ khi còn non tháng.

Người ta cũng phát hiện một dị dạng hemoglobin khác là Hb^C, là do một biến đổi phân tử, axit glutamic của Hb^A được thay bằng lizin trong Hb^C.

Sự thay đổi gốc axit amin trong các dị dạng hemoglobin ở người:



Về dị dạng hemoglobin, ngoài Hb^A, Hb^C vừa nêu, còn nhiều dạng khác, như dạng Thalassemia, còn gọi là bệnh thiếu máu vùng biển, khi ở dạng đồng hợp thể, thường gây cho trẻ em bị thiếu máu trầm trọng, do vỡ hồng cầu, kéo theo sưng tỳ, sưng gan, số lượng hồng cầu giảm, hàm lượng hemoglobin giảm, dễ chết sớm. Gen về Thalassemia dẫn tới trạng thái là sự tổng hợp hemoglobin dạng sơ sinh (hemoglobin foetal, HbF), không chấm dứt sau khi sinh như ở trẻ em bình thường.

Ở Việt Nam, theo tổng kết của Viện huyết học và truyền máu, bệnh viện Bạch Mai, có phổ biến dạng dị hợp thể β -Thalassemia, thuộc thể β -Thalassemia với F tăng là chủ yếu. Bệnh này di truyền theo quy luật trội, do gen trên nhiễm sắc thể thường, không liên quan giới tính.

2. Di truyền học đa hình hemoglobin

2.1. Đa hình hemoglobin trong phát triển cá thể

Hiện tượng đa hình hemoglobin trong quá trình phát triển cá thể ở người được xác định qua 3 dạng hemoglobin có cấu trúc phân tử khác nhau, xuất hiện ở 3 giai đoạn, phôi, thai và trưởng thành.

2.1.1. Hemoglobin phôi (embryonic hemoglobin, HbE)

Năm 1954, H. Drescher, Kunger phát hiện HbE ở thai 3 tháng tuổi; sau đó năm 1956 J. Halbrecht cũng nêu lên kết quả tương tự.

Năm 1964 Huchns đã đi sâu, xác định có 2 dạng HbE khác nhau, đấy là Hb Gower I và Hb Gower II.

Hb Gower II được xác định rõ hơn, gồm 2 chuỗi polypeptit α và 2 chuỗi polypeptit ϵ , với công thức $\alpha_2 \epsilon_2$.

Hb Gower I có thể có 2 kiểu cấu trúc phân tử, hoặc là thuộc một loại chuỗi ϵ (công thức ϵ_4), hoặc gồm 2 chuỗi ϵ và 2 chuỗi ϕ , với công thức $\phi_2 \epsilon_2$.

Về sau, Hecht, năm 1967 và Capp, năm 1970, phát hiện thêm một dạng hemoglobin đặc trưng của giai đoạn phôi, gọi là Hb Portland I, có công thức cấu trúc là $\gamma_2 \phi_2$.

Chuyển động điện di của Hb Portland I rất khó phân biệt với hemoglobin trưởng thành.

Ở gia súc (bò, lợn, v.v...) người ta cũng phát hiện được hiện tượng đa hình hemoglobin trong quá trình phát triển cá thể.

Hemoglobin phôi (Hb^E) được phát hiện ở bò (Kleihauer, Stoffler, 1968 và Kitchen, 1970) với 2 dạng, xuất hiện ở phôi bò lúc 4 tuần sau thụ thai và biến đi hoàn toàn khoảng 6-10 tuần sau khi sinh.

Qua lai phân tử, các tác giả nêu trên đã xác định, về mặt cấu trúc phân tử, hai dạng này tương ứng với Hb Gower I (ϵ_4 hay $\phi_2 \epsilon_2$) và Hb Gower II ($\alpha_2 \epsilon_2$) ở người.

Ở lợn, người ta cũng phát hiện hai dạng hemoglobin phôi, tương tự với Hb Gower I và Hb Gower II ở người. (Kleihauer, Stoffler, 1968; Kitchen, 1970; Đặng Hữu Lan, 1977).

Công trình thực nghiệm ở Việt Nam, cho thấy ở lợn Ỉ, các dạng hemoglobin phôi không chỉ có ở giai đoạn phôi 30 ngày tuổi như ở lợn ô n dơi (Đại Bạch ...) mà còn có từ giai đoạn sớm hơn (20-25 ngày tuổi sau thụ thai). Các dạng hemoglobin phôi ở lợn Ỉ Việt Nam được thay thế hoàn toàn bởi các dạng hemoglobin khác lúc phôi 40 ngày tuổi, trong khi ấy, ở lợn Đại Bạch là lúc phôi 50 ngày tuổi.

Đây có thể là một đặc thù trong đa hình phát triển hemoglobin ở các giống lợn, phù hợp với quy luật sinh học nhiệt đới, gia súc và động vật nhiệt đới có độ thành thực sinh dục sớm hơn, thì quá trình thay thế dạng hemoglobin phôi cũng sớm hơn so với các giống ôn đới.

2.1.2. Hemoglobin thai hoặc hemoglobin sơ sinh (foetal hemoglobin, HbF)

Ở người, trong thai ở cuối tháng thứ hai, HbE giảm rõ rệt và HbF

xuất hiện, với tỷ lệ phần trăm tăng nhanh. Từ đầu tháng thứ ba đến khi sinh, hầu như toàn bộ hemoglobin tổng số của thai là HbF, chỉ khoảng 5% thuộc hemoglobin trưởng thành.

Sau khi sinh, hàm lượng tương đối của HbF giảm nhanh và tỷ lệ phần trăm hemoglobin trưởng thành tăng rõ rệt. Hơn 80% hemoglobin tổng số của trẻ 3 tháng tuổi là Hb trưởng thành. Ở trẻ con khỏe mạnh, bình thường, từ 5-6 tháng tuổi, chỉ còn 2-3% Hb tổng số là thuộc HbF.

HbF bắt đầu được biết đến từ năm 1866, bởi Korber. HbF có cấu trúc phân tử $\alpha_2\gamma_2$, trong đó chuỗi α giống với α của hemoglobin trưởng thành. Chuỗi γ là đặc trưng cho HbF. HbF có khả năng kháng kiềm cao hơn Hb trưởng thành, về quang phổ cực tím, chuyển động điện di và biểu hiện sắc ký đều có khác Hb trưởng thành. Trong HbF trưởng thành không có izoloxin như trong HbF.

Như phần trên đã thấy, ở bệnh *Thalassemia*, sự tổng hợp HbF không chấm dứt sau khi sinh như trẻ em bình thường. Qua kiểm tra máu dây rốn trẻ em bình thường và kiểm tra HbF ở trẻ bị *Thalassemia*, và ở trẻ bị các dị dạng HbF, Schroeder, năm 1970 đã phát hiện ít nhất có 2 gen cấu trúc mã hóa chuỗi polypeptit γ bình thường. Tại vị trí axit amin 136 của chuỗi γ , một dạng γ chứa gly (G γ), còn dạng kia chứa Ala (A γ). Khi trẻ sinh ra, có tỷ lệ G γ : A γ vào khoảng 3:1, tỷ lệ này duy trì cho đến 2-3 tháng tuổi.

Ở gia súc cũng có HbF. HbF ở bò xuất hiện lúc thai 6-8 tuần tuổi và mất đi lúc 8-10 tuần sau khi sinh. Thời gian này có sai khác giữa các giống bò.

Sau khi sinh, HbF giảm dần và Hb trưởng thành tăng lên, có sự thay thế dần HbF bằng Hb trưởng thành trong những tháng đầu sau khi sinh của bò. Thời gian thay thế hoàn toàn HbF bằng Hb trưởng thành có khác nhau giữa các giống bò, ở bò lang trắng đen là 110 ngày tuổi, ở bò Geesay 120 ngày (Mecurieva, Mikle, 1969). Hàm lượng HbF ở bê sai khác theo tuổi lớn lên và cả theo giới tính. Nhìn chung, ở giai đoạn bê 2-45 ngày tuổi, hàm lượng HbF ở bê cái lớn hơn bê đực (Mikle, 1969). Kết quả phân tích bê nuôi ở Việt Nam, đã cho thấy, ở bê lai Sind và lai Hà-Ấn, 1-80 ngày tuổi, bên cạnh dạng Hb trưởng thành, đã phát hiện HbF, giảm theo tuổi lớn lên của bê và được thay thế dần bằng Hb trưởng thành. Quá trình thay thế này có khác nhau giữa các giống bò, có thể có liên quan với thành thực sinh dục sớm, muộn. (Phan Cự Nhân,

1970). Về mặt cấu trúc phân tử, HbF của bò cũng có công thức $\alpha_2\gamma_2$.

Thành phần axit amin của HbF và Hb trưởng thành của bò cũng có sai khác. Cấu trúc chuỗi của HbF và của Hb trưởng thành ở bò không có sai khác gì trong trình tự sắp xếp axit amin. HbF chỉ khác HbA (trưởng thành) về 1 chuỗi, ở HbF là γ , ở HbA là β . So sánh với chuỗi β , thì chuỗi γ có nhiều xerin, axit glutamic, lóxin hơn, nhưng lại ít hơn về lizin, histidin, metionin. Trong trình tự axit amin của chuỗi γ và chuỗi β có 20 gốc khác nhau. Khi diện di trên giấy với dung dịch đệm pH kiềm, HbF chuyển động nhanh hơn so với HbA nhưng chậm hơn HbB một ít. HbA và HbB là 2 dạng Hb trưởng thành ở bò. Các thực nghiệm trong và ngoài nước đều thừa nhận, ở những giống bò sớm thành thực hơn, thì qua các lứa tuổi lớn lên của bê, hàm lượng HbA tăng nhanh hơn để thay thế HbF. Năm 1964, S.Mikle khi so sánh bò Jecsay có độ thành thực sinh dục sớm hơn bò Hà Lan, đã xác nhận hàm lượng Hb trưởng thành tăng và thay thế HbF nhanh hơn ở bê Jecsay so với bê Hà Lan. Năm 1968, Pinco nghiên cứu quá trình thay thế HbF bằng Hb trưởng thành ở bò Castrom, đã thấy trong những ngày đầu sau khi đẻ, ở bê có HbF chiếm hầu hết khối lượng Hb của hồng cầu, khoảng 84%, đến 60 ngày tuổi giảm xuống còn 21,6%, đến 90 ngày tuổi thì chỉ còn lại một dấu vết nhỏ và đến 105 ngày tuổi thì mất hoàn toàn.

Năm 1963, Mikle cho là, trong những ngày mới sinh, HbF ở bê chiếm 75,5%, sau đó giảm dần và đến 110 - 120 ngày tuổi thì không còn nữa. Năm 1968, Kleihauer Stoffler cho rằng HbF ở bê biến mất khoảng lúc 10 tuần tuổi sau khi sinh. Năm 1970, Phan Cự Nhân phân tích trên các đàn bê ở Việt Nam, ở các lứa tuổi 1 ngày (phân tích máu ngay sau khi đẻ), 6 ngày, 15 ngày, 1 tháng, 2-3 tháng trên bê lai Sind, bê lai Hà-Ấn, bê lai giữa dục nâu Thụy sĩ và cái lai Sind, đã phát hiện được dạng HbF bên cạnh dạng Hb trưởng thành trong máu bê 1-80 ngày tuổi. Ở bê mới đẻ, HbF chiếm 50-65% hemoglobin tổng số, Hb trưởng thành chiếm 35-40% (Phan Cự Nhân, Tập san di truyền học, Viện hàn lâm khoa học Liên Xô, t.6, số 5, 1970). Hb trưởng thành ở bê 1 ngày tuổi lai Sind cao hơn ở bê Hà Lan (chỉ 24%) cho thấy quá trình thay thế HbF bằng Hb trưởng thành ở bê lai Sind là nhanh hơn bê Hà Lan (giống ôn đới).

Trên đối tượng lợn (*Sus scrofa*), kết quả nghiên cứu thực nghiệm của các tác giả công bố còn có khác nhau về HbF. Năm 1968, Kleihauer, Stoffler dùng kỹ thuật fingerprint, đã nêu lên kết quả phát hiện được HbF ở lợn, cũng có công thức cấu trúc là $\alpha_2\gamma_2$. Đến năm 1970, Kitchen

lại thông báo là không phát hiện được HbF ở lợn. Các thực nghiệm nghiên cứu ở Việt Nam, trên lợn Ỉ và trên lợn Đại bạch, phân tích hemoglobin phôi, ở phôi 40 ngày tuổi của lợn Ỉ và phôi 50 ngày tuổi của lợn Đại bạch, đối chiếu với các phân tích trên máu lợn sơ sinh và lợn trưởng thành qua điện di trên giấy, trên gen tinh bột, trên thạch đều chưa phát hiện được HbF.

Năm 1957, Robinson cho rằng, bằng điện di trên thạch có pH axit, có thể dễ dàng phân biệt HbF ($\alpha_2\gamma_2$) với ($\alpha_2\beta_2$).

Công trình thực nghiệm ở Việt Nam, theo kỹ thuật này, với đệm xitrat pH 6,2 cũng không phát hiện được HbF.

Một phương pháp khác là huyết sắc tố kháng kiềm, so sánh dịch dung giải hồng cầu các giống lợn nói trên ở Việt Nam, không dựa trên sai khác về điện tích và trọng lượng phân tử của các chuỗi polypeptit γ và β , vẫn đạt kết quả âm tính.

2.1.3. Hemoglobin trưởng thành (HbA)

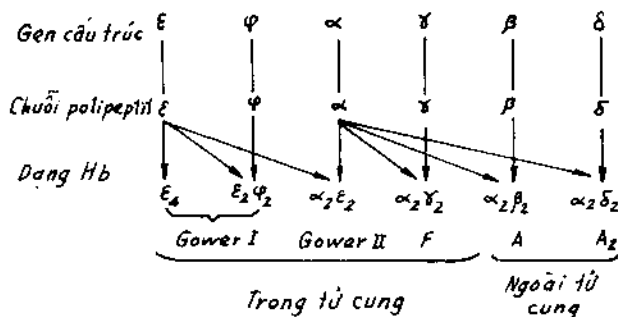
HbA xuất hiện từ trong thai và tồn tại suốt cho đến hết đời. HbA có cấu trúc phân tử $\alpha_2\beta_2$. Như vậy, về mặt phát triển cá thể của các chuỗi polypeptit trong phân tử Hb, ta thấy chuỗi α là chuỗi hình thành và tồn tại suốt quá trình phát triển cá thể, từ trong phôi ($\alpha_2\varepsilon_2$), đến thai ($\alpha_2\gamma_2$), đến tuổi trưởng thành ($\alpha_2\beta_2$). Chuỗi ε_2 chỉ có trong giai đoạn phôi, chuỗi γ chỉ xuất hiện ở giai đoạn thai. Sau này, người ta còn phát hiện, Hb trưởng thành, ngoài dạng phổ biến là HbA với cấu trúc phân tử $\alpha_2\beta_2$ còn có dạng HbA₂ với cấu trúc phân tử $\alpha_2\delta_2$ (2 chuỗi anpha và 2 chuỗi delta).

Theo quan điểm hiện nay về các cơ chế điều hòa sự tổng hợp sinh học protein, có thể nêu ra sơ đồ quá trình tổng hợp các dạng hemoglobin trong quá trình phát triển cá thể. Theo các loại cơ chế về một mô hình operon trong điều hoà tổng hợp sinh học protein, trong điều hoà sự biểu hiện của gen trong quá trình phát triển cá thể, người ta cho rằng ở trong sự tổng hợp và thay thế các chuỗi polypeptit của đại phân tử Hb trong quá trình phát triển cá thể, cũng có vai trò của các chất cảm ứng, chất kích thích, chất ức chế (h.III.1).

Ở người bình thường, quá trình này diễn ra có tính quy luật, phù hợp với hoạt động của các operon trong hệ thống sinh tổng hợp hemoglobin.

Chỉ ở một số bệnh lý, như *Thalassemia* đã nói ở trên, thì quy luật trên mới bị vi phạm, ở người trưởng thành vẫn tồn tại mãi HbF, có thể do sự bất hoạt của các operon và các thành phần operon trong toàn bộ hệ thống. Đối với chọn giống vật nuôi, gia súc, người ta đã vận dụng, xem các đặc điểm

sai khác giữa các giống về quá trình tổng hợp, thay thế các chuỗi polypeptit hemoglobin là những chỉ thị di truyền rất quan trọng để đánh giá phẩm giống, qua đặc thù trao đổi chất.



Hình III.1. Sơ đồ quá trình tổng hợp các dạng hemoglobin trong quá trình phát triển cá thể

2.2. Đa hình di truyền hemoglobin

Ở phần trên, ta đã nêu lên một khía cạnh trong hiện tượng đa hình hemoglobin, đây là đa hình trong quá trình phát triển cá thể. Các khảo sát điều tra trong tự nhiên cũng như các thực nghiệm phân tích, còn cho ta nhiều dẫn chứng thực tế về những khía cạnh khác của đa hình, đây là đa hình di truyền, đa hình tiến hóa v.v..

Cấu trúc phân tử các dạng hemoglobin khác nhau, với thành phần các chuỗi polypeptit đa dạng, khác nhau đã là cơ sở khách quan của hiện tượng đa hình di truyền hemoglobin, ngày nay đã được làm rõ về nguyên nhân xuất hiện các cơ chế duy trì trong tự nhiên.

Hiện tượng đa hình di truyền hemoglobin phát sinh trước hết là dưới ảnh hưởng của đột biến, của chọn lọc tự nhiên, đồng thời đối với các quần thể, còn do tác động của chọn lọc nhân tạo, trong đó có vai trò của dịch gen, tức sự phân bố đột biến trong quần thể dưới ảnh hưởng của các quá trình di truyền tự động, hình thành các động thái tần số gen khác nhau.

Rất nhiều loại hemoglobin dị dạng được phát hiện ở người cũng là một bằng chứng khách quan, trong đó đã phát hiện rất nhiều trường hợp do đột biến điểm, đột biến thay đổi axit amin trong các chuỗi polypeptit.

Người ta đã phát hiện và làm rõ cơ chế, trong các dị dạng, HbC, Harlen có 2 axit amin thay thế trên chuỗi β ($\alpha_2\beta_2^{6\text{ val}, 73\text{ Asn}}$), HbX có 2 axit amin thay thế trên 2 chuỗi ($\alpha_2^{68\text{ lys}}\beta_2^{9\text{ val}}$). Đột biến dị dạng hemoglobin ở người còn do mất đoạn, mất một hoặc nhiều axit amin trên chuỗi polypeptit. Ví dụ: Hb Freiburg, bị mất 23 Val ở chuỗi β , Hb Gun Hill, mất hẳn 5 axit amin.

Đa hình di truyền còn được biểu hiện ở cơ chế tập hợp một loại chuỗi thành tetrame trong cấu trúc phân tử Hb, có thể do sự kim hãm của một loại chuỗi polypeptit trong các dạng bình thường, dẫn đến chỉ còn lại một loại chuỗi độc nhất như Hb Bart's (γ_4) và HbH (β_4).

2.2.1. Đa hình di truyền hemoglobin ở gia súc

Tính đa hình di truyền hemoglobin đã được phát hiện ở đại gia súc có sừng, ở bò, cừu v.v., nói chung không liên quan đến bệnh lý (Pinco, 1968).

Trên đối tượng bò, phân tích đa hình di truyền hemoglobin đã cho phép có thể dựa vào đây, xác định các sai khác giữa các giống bò. Cho đến nay người ta xác nhận, kiểu hemoglobin và tần số hemoglobin là đặc trưng cho các giống gia súc, có thể được sử dụng để tìm hiểu nguồn gốc gia súc, mối quan hệ di truyền giữa các giống, mối quan hệ với tính trạng sức sản xuất.

Trên cơ sở các kết quả phân tích trên nhiều giống bò, người ta đã nêu lên thuyết về 2 alen trong locut gen hemoglobin, thừa nhận sự phân bố theo 2 gen alen, quy định 2 kiểu hemoglobin ở dạng đồng hợp thể, AA và BB, và một kiểu dị hợp thể AB (Cabannes, 1955; Grimes 1957).

Ba kiểu hình Hb nêu trên do sự tổ hợp của 2 alen trên 1 locut nằm trên nhiễm sắc thể thường, được di truyền đồng trội.

Năm 1964, Carr phát hiện thêm alen thứ ba ở các giống bò châu Phi đây là HbC. Crockett, 1963 cũng phát hiện được HbC ở giống bò Ấn Độ. Năm 1965, Naik đã phát hiện 2 dạng khác là HbX và HbA + khillary ở bò zebu Ấn Độ. HbX giống với kiểu Hb mà Crockett, năm 1962, đã phát hiện ở Mỹ, trên bò thịt có nguồn gốc Ấn Độ, bò Braman. Năm 1965, Osterhoff, Van Harden phát hiện ở bò châu Phi các dạng phụ HbA₁, HbA₂, HbA₃. Năm 1966, Braend lại phát hiện thêm một dạng mới nữa, là HbD, chuyển động điện di chậm hơn HbA. HbD có ở bò Socgoc lùn Tây Phi.

Sai khác giữa HbA và HbB là về vị trí, sắp xếp các axit amin trong chuỗi polypeptit, tuy về thành phần axit amin thì đều như nhau. Sai khác còn được biểu hiện về hàm lượng các loại axit amin, như ở bò Ấn Độ, đã phát hiện hàm lượng xystein, lyzin, valin, alanin đều có khác nhau giữa HbA và HbB.

Giữa 2 loại chuỗi α và β trong HbA ở bò, cũng sai khác nhau về số gốc axit amin, ở chuỗi β nhiều hơn chuỗi α , tương ứng với sai khác này trong HbA ở người (α có 141 axit amin, β có 146 axit amin). Chuỗi β chứa nhiều axit glutamic, axit aspartic, valin, leucin, prolin, nhiều hơn so với ở chuỗi α .

Khi so sánh chuỗi α trong HbA và α trong chuỗi HbB, người ta thấy đều có trình tự axit amin và thành phần axit amin giống nhau. Giữa HbA và HbB chỉ sai khác nhau về vị trí, thứ tự axit amin trong chuỗi β , cụ thể như:

Chuỗi	Vị trí 15	Vị trí 18	Vị trí 119
β^A	glyxin	lizin	lizin
β^B	serin	histidin	axit aspartic

Công trình nghiên cứu thực nghiệm trên các giống bò nuôi ở Việt Nam cũng cho thấy rõ tính đa hình di truyền hemoglobin. (Phan Cự Nhân, 1972).

Bò lang trắng đen (gốc Hà Lan) chỉ có kiểu HbA (100%), bò Sind thuần chỉ có kiểu HbB (100%). Bò vàng Việt Nam có cả ba kiểu, HbA với tần số gen 0,857, HbB 0,143. Bò lai Sind, là bò lai giữa bò Sind (Ấn Độ) với bò vàng Việt Nam, có HbB là chủ yếu 95% cùng HbA 5%. Ở bò lai Hà-Ấn F_1 (1/2 máu bò Hà Lan) có cả HbA, HbB, HbAB, với tần số gen HbA 0,850 và HbB 0,150. Bò lai Hà-Ấn F_2 (3/4 máu Hà Lan) có tần số gen HbA 0,850 và HbB 0,150. Bò lai Hà-Ấn F_3 , với 7/8 máu bò Hà Lan thì 100% thuộc HbA.

Trên đối tượng lợn nhà (*Sus scrofa domestica*), Borak 1958, Kristjansson 1960, chỉ phát hiện được một kiểu Hb ở lợn trưởng thành.

Ở Việt Nam, Trần Đình Miên, năm 1973, khảo sát trên lợn Lang Hồng và lợn Landrace, Phan Cự Nhân, năm 1977 làm thực nghiệm phân tích trên lợn I Hà Nam Ninh, cũng chỉ phát hiện được một kiểu Hb trưởng thành.

Nhưng trên lợn rừng Châu Âu (*Sus scrofa*), Buschman, năm 1964, đã phát hiện được hai kiểu Hb trưởng thành.

Các số liệu thực nghiệm ở nhiều nước trên thế giới và ở Việt Nam đều đã thừa nhận, kiểu hemoglobin ở gia súc, bò, lợn, v.v... là những tính trạng di truyền ổn định, thuộc loại tính trạng chất lượng. Cũng như các tính trạng về nhóm máu ở người và gia súc, tính trạng hóa sinh-sinh lý khác như kiểu transferrin (Tf), albumin, postalbumin trong huyết thanh, v.v..., tính trạng kiểu hemoglobin hồng cầu có bản chất di truyền, không phụ thuộc thức ăn, điều kiện nuôi dưỡng, chăm sóc, khí hậu v.v... được di truyền theo quy luật Mendel, từ đó có thể qua genotype, qua biểu hiện của các tính trạng này, mà đánh giá, xác định genotype, xác định phẩm giống gia súc, vật nuôi.

Số liệu thực nghiệm ở Việt Nam trên các đàn bò Hà Lan, Sind thuần, lai Sind và lai Hà-Ấn F₁ đã chứng minh cho bản chất di truyền kiểu hemoglobin ở bò.

Bảng III.3. Sự di truyền các kiểu hemoglobin ở bò nuôi tại Việt Nam
(Phan Cự Nhân, 1970)

Kiểu Hb ở bố mẹ	Số cặp bố, mẹ	Kiểu Hb ở đời con		
		A	B	AB
HbA x HbA	8	8		
HbB x HbB	5		5	
HbA x HbB	2			2
HbA x HbAB	2	1		1

Qua số liệu thực nghiệm trên đây, ta cũng thấy rõ tính trạng về kiểu hemoglobin được di truyền theo quy luật đồng trội, như trong trường hợp HbA x HbB → HbAB.

3. Ứng dụng trong công tác giống gia súc

Nghiên cứu di truyền học hemoglobin được ứng dụng trong công tác giống gia súc, để tìm hiểu nguồn gốc động vật, mức độ giống nhau và khác nhau về mặt di truyền giữa các giống, các dòng gia súc, cấu trúc di truyền các quần thể gia súc, theo mức độ đồng hợp thể và dị hợp thể.

Nhiều công trình phân tích kiểu hemoglobin ở gia súc đã góp phần phát hiện các sai lầm ghi trong sổ giống về nguồn gốc gia súc, từ đó mà kéo theo các sai lầm về đánh giá phẩm giống, giá trị gây giống của gia súc, giá trị của các dòng, hiệu quả của các tổ hợp máu khi lai v.v...

Năm 1964, Mikle đã công bố, khi kiểm tra 159 bò lang trắng đen, phát hiện 154 con có HbA, 5 con có HbAB. Soát lại cẩn thận hệ phả đã làm rõ các số liệu trên, chính 5 con có HbAB là các con lai, không thuần.

Cho đến nay, người ta thừa nhận, phân tích kiểu Hb bò, gia súc là phương pháp khách quan để xác định nguồn gốc gia súc, nguồn gốc các giống lai. Kiểu Hb và tần số các alen trong đó là đặc trưng cho từng giống bò, có thể góp phần xác định mối quan hệ di truyền giữa các giống. Nhiều giống bò châu Âu chỉ có kiểu HbA, như bò Holstein - Frise, Aberdeen - Angus, đỏ Đan Mạch v.v...

Tần số alen Hb^B cao được nhận thấy ở bò có nguồn gốc Ấn Độ, như giống bò Gecsay. Gần đây, người ta phát hiện alen Hb^C ở các giống bò có nguồn gốc châu Phi và Ấn Độ.

Số liệu kiểu Hb của bò vàng Việt Nam cho thấy, bò vàng Việt Nam có kiểu Hb ngả về HbA, đồng thời có cả HbB và HbAB (tần số HbA = 0,857 và HbB = 0,143), đặt ra vấn đề cần tiếp tục đi sâu để tìm hiểu nguồn gốc bò vàng Việt Nam, làm cơ sở khoa học vững chắc cho công tác tạo giống bò mới của Việt Nam.

Nhiều công trình thực nghiệm cũng đã phát hiện mối liên quan giữa tính đặc trưng kiểu Hb với các tính trạng năng suất. Năm 1968, Pinco phát hiện mối liên quan giữa kiểu Hb với sức sản xuất sữa ở bò. Bò có kiểu HbB và HbAB có hàm lượng mỡ sữa cao hơn ở bò có HbA. Bò Đan Mạch, bò Gecsay là những giống bò kỷ lục thế giới về hàm lượng mỡ sữa, đều có kiểu HbB và HbAB.

Ở Việt Nam, năm 1972, Phan Cự Nhân cũng phát hiện bò lai Sind có hàm lượng mỡ sữa cao, 5-6%, cũng có dạng HbB là chủ yếu, với tần số gen HbB = 0,913.

Tuy nhiên, về mặt phương pháp, ngày nay người ta đã tiến lên, đánh giá mối liên quan với năng suất, không chỉ của riêng chỉ tiêu của Hb, mà của tổ hợp cộng gộp với một số chỉ tiêu hóa sinh khác, như số liệu của Pinco. Sapiro năm 1969, đã xác nhận, giống bò Castrom, có tổ hợp HbAB và TfDD (transferrin DD), có sản lượng sữa cao hơn so với bò có tổ hợp HbAA và TfAD.

V. DI TRUYỀN HỌC ISOZYM

Enzym là những protein có khả năng xúc tác đặc biệt cho các phản ứng hóa học trong hệ thống sống. Enzym có trong mọi tế bào sống, được gọi là chất xúc tác sinh học.

Isozym là các dạng khác nhau của một enzym (Hunter và Markert, 1957). Đó là các protein có hoạt tính cùng một loại enzym, nhưng lại khác nhau về nhiều đặc tính lý, hóa. Có thể nói isozym là biến dạng của một enzym, khác nhau về cấu trúc bậc một do các locut gen khác nhau cùng xác định enzym ấy, hoặc do các alen khác nhau trên một locut của một enzym.

Allozym là các biến dạng tương ứng của một isozym (Prakash, 1969; Lewentin, 1969).

Các phân tử enzym có nhiều biến dạng trong các quần thể tự nhiên, là do đột biến, dẫn đến thay thế các axit amin trong cấu trúc bậc một của chuỗi polypeptit.

Từ cơ sở nói trên, người ta đã sử dụng phương pháp điện di trên các loại gel (agarose, tinh bột thủy phân, polyacrylamid), cùng với phương pháp nhuộm hóa tế bào đặc trưng, để phát hiện các biến dạng khác nhau của enzym, phát hiện các isozym, các allozym.

Trường hợp một enzym, một protein đặc biệt do nhiều locut khác nhau quy định, hình thành các isozym, có thể do hiện tượng lặp đoạn của một locut ban đầu, kéo theo sự phân hóa (biệt hóa) của locut ấy theo nhiều hướng (Watts, 1968).

Các isozym có thể hình thành do các alen khác nhau của cùng một locut enzym. Các isozym này được gọi là allozym. Nhiều công trình nghiên cứu đã xác định được tính đa hình di truyền của isozym ở động vật, vật nuôi, gia súc, sâu bọ. Các hệ thống isozym đa hình là các mô hình rất thuận lợi cho nghiên cứu, do bản chất di truyền tương đối đơn giản và hầu hết được biểu hiện di truyền đồng trội. Từ các dẫn liệu về đa hình isozym, người ta có thể xác định kiểu gen của cá thể, phát hiện mức độ dị hợp của quần thể. Sử dụng các isozym, tức các biến dạng của enzym người ta có thể xem đây như là một chỉ thị của gen, nghiên cứu quan hệ họ hàng, nguồn gốc các quần thể vật nuôi, gia súc. Dựa trên tần số alen, người ta xác định được khoảng cách di truyền, tương đồng di truyền giữa các quần thể.

Bằng phương pháp điện di, các cấu trúc khác nhau của enzym, các isozym, allozym có thể được biểu hiện trên điện di đồ.

Nếu phân tử enzym có cấu trúc đơn phân, do 2 alen đồng trội xác định, thì những cá thể đồng hợp tử sẽ có 1 cấu tử (A_1 hoặc A_2) còn cá thể dị hợp tử có 2 cấu tử (A_1A_2). Nếu phân tử enzym thuộc cấu trúc nhị phân, thì trên điện di đồ, thể đồng hợp có một cấu tử A_1A_1 hoặc A_2A_2 và thể dị hợp có 3 cấu tử (A_1A_1 , A_2A_2 , A_1A_2).

Cấu tử có tốc độ di chuyển trung gian là kết quả của sự kết hợp 2 chuỗi polypeptit do 2 alen khác nhau của một locus gen kiểm soát.

Nếu phân tử enzym có cấu trúc tứ phân, tức do 4 chuỗi polypeptit tạo thành, thì các cá thể đồng hợp tử có một cấu tử ($A_1A_1A_1A_1$ hoặc $A_2A_2A_2A_2$) còn cá thể dị hợp tử sẽ biểu hiện thành 5 cấu tử ($A_1A_1A_1A_1$, $A_2A_2A_2A_2$, $A_1A_2A_2A_2$, $A_1A_1A_2A_2$, và $A_1A_1A_1A_2$) (sơ đồ 1).

Ở một số trường hợp, phân tử enzym do 1 locus gen có 2 alen quy định, nhưng trong đó chỉ một alen có hoạt tính, biểu hiện màu bình thường trên điện di đồ, alen thứ 2 gọi là "alen không", không biểu hiện hoạt tính enzym, không biểu hiện màu trên điện di đồ.

Như vậy trong trường hợp này, trên điện di đồ sẽ có 3 kiểu hình, 2 kiểu hình đồng hợp thể gồm một kiểu hình có một cấu tử nhuộm màu rõ nét và một kiểu không có màu, một kiểu dị hợp thể là một cấu tử nhuộm màu nhạt và mảnh, mỏng (sơ đồ 2 của h.III.2.).

Các cấu trúc đa hình đã nêu ở trên của phân tử enzym là do các cơ chế có số lượng locus khác nhau, số lượng alen khác nhau.

Tính đa hình của cấu trúc phân tử enzym còn do các cơ chế biến đổi sau giải mã, tức các biến đổi sau khi các chuỗi polypeotit của enzym đã được tổng hợp. Các chuỗi polypeptit của phân tử enzym, có thể được tổ hợp với nhau, tạo thành cấu tử đa phân. Trong các cấu tử đa phân này, nếu các thành phần đều giống nhau, thì chúng hợp thành cấu tử đồng polime. Nếu các thành phần trong cấu tử đa phân khác nhau, tức do các alen khác nhau hoặc các locus khác tạo thành, thì sản phẩm sẽ là cấu tử dị polyme.

Như trong sơ đồ 1, trong trường hợp enzym có cấu tử dime, thì hình thành 3 cấu tử gồm 2 đồng polyme, và 1 dị polyme, trường hợp enzym thuộc tetrame, thì hình thành 5 cấu tử gồm 2 đồng polyme và 3 dị polyme.

Bằng phương pháp điện di, các cấu trúc khác nhau của enzym, các isozym, allozym có thể được biểu hiện trên điện di đồ.

Nếu phân tử enzym có cấu trúc đơn phân, do 2 alen đồng trội xác định, thì những cá thể đồng hợp tử sẽ có 1 cấu tử (A_1 hoặc A_2) còn cá thể dị hợp tử có 2 cấu tử (A_1A_2). Nếu phân tử enzym thuộc cấu trúc nhị phân, thì trên điện di đồ, thể đồng hợp có một cấu tử A_1A_1 hoặc A_2A_2 và thể dị hợp có 3 cấu tử (A_1A_1 , A_2A_2 , A_1A_2).

Cấu tử có tốc độ di chuyển trung gian là kết quả của sự kết hợp 2 chuỗi polypeptit do 2 alen khác nhau của một locut gen kiểm soát.

Nếu phân tử enzym có cấu trúc tứ phân, tức do 4 chuỗi polypeptit tạo thành, thì các cá thể đồng hợp tử có một cấu tử ($A_1A_1A_1A_1$ hoặc $A_2A_2A_2A_2$) còn cá thể dị hợp tử sẽ biểu hiện thành 5 cấu tử ($A_1A_1A_1A_1$, $A_2A_2A_2A_2$, $A_1A_2A_2A_2$, $A_1A_1A_2A_2$, và $A_1A_1A_1A_2$) (sơ đồ 1).

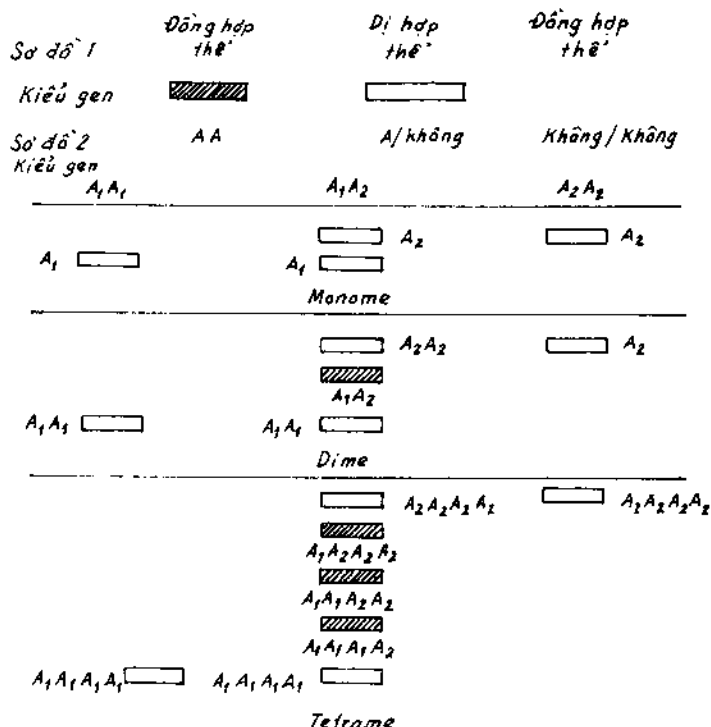
Ở một số trường hợp, phân tử enzym do 1 locut gen có 2 alen quy định, nhưng trong đó chỉ một alen có hoạt tính, biểu hiện màu bình thường trên điện di đồ, alen thứ 2 gọi là "alen không", không biểu hiện hoạt tính enzym, không biểu hiện màu trên điện di đồ.

Như vậy trong trường hợp này, trên điện di đồ sẽ có 3 kiểu hình, 2 kiểu hình đồng hợp thể gồm một kiểu hình có một cấu tử nhuộm màu rõ nét và một kiểu không có màu, một kiểu dị hợp thể là một cấu tử nhuộm màu nhạt và mảnh, mỏng (sơ đồ 2 của h.III.2.).

Các cấu trúc đa hình đã nêu ở trên của phân tử enzym là do các cơ chế có số lượng locut khác nhau, số lượng alen khác nhau.

Tính đa hình của cấu trúc phân tử enzym còn do các cơ chế biến đổi sau giải mã, tức các biến đổi sau khi các chuỗi polypeotit của enzym đã được tổng hợp. Các chuỗi polypeptit của phân tử enzym, có thể được tổ hợp với nhau, tạo thành cấu tử đa phân. Trong các cấu tử đa phân này, nếu các thành phần đều giống nhau, thì chúng hợp thành cấu tử đồng polime. Nếu các thành phần trong cấu tử đa phân khác nhau, tức do các alen khác nhau hoặc các locut khác tạo thành, thì sản phẩm sẽ là cấu tử dị polyme.

Như trong sơ đồ 1, trong trường hợp enzym có cấu tử dime, thì hình thành 3 cấu tử gồm 2 đồng polyme, và 1 dị polyme, trường hợp enzym thuộc tetramere, thì hình thành 5 cấu tử gồm 2 đồng polyme và 3 dị polyme.



Hình III.2 a. Sơ đồ 1-enzym có 1 alen thường và 1 "alen không".

b. Sơ đồ 2- điện di đồ các enzym, monome, dime, tetrame.

Trong tự nhiên, phần lớn các động vật, vật nuôi, gia súc, sâu bọ v.v...đều có các hệ isozym đa hình, được phát hiện qua điện di đồ. Ví dụ, trong các mô (tổ chức) của động vật có xương sống có 2 lôcut lactate dehydrogenaza khác nhau. Mỗi lôcut mã hóa các chuỗi polypeptit, các chuỗi này tổ hợp với nhau tạo ra tetrame.

Năm 1972, Schmidt và Engel đã chứng minh ở cá chép *Cyprinus carpio*, enzym aspartat amonotransferaza do 2 lôcut gen xác định là lôcut A và lôcut B. Lôcut A có 3 alen A, A' và A'', từ đó hình thành 3 kiểu gen chính của loài cá này là AABB, AA'BB và AA''BB.

Ở cá chình biển *Atlantic Anguilla anguilla*, người ta phát hiện enzym dime-phosphoglucose-isomeraza do 1 lôcut Pgi có 4 alen là A,B,C,D, từ đó mà hình thành 4 kiểu gen đồng hợp thể AA, BB, CC, DD và 6 kiểu gen dị hợp thể AB, AC, AD, BC, BD và CD.

Nghiên cứu di truyền học isozym từ lâu đã sử dụng để đi sâu vào các lĩnh vực hóa sinh học và di truyền học, được xem như một phương tiện di truyền học ứng dụng trong động vật học. Các allozym được sử dụng như các chỉ thị di truyền dùng trong nhiều lĩnh vực thực tiễn, để xác định bản chất di truyền, đánh giá vốn gen của các quần thể động vật, vật nuôi, mức độ thuần chủng, mức độ dị hợp thể của các giống nội, giống ngoại nhập nội, xác định cấu trúc di truyền quần thể của các loài, nghiên cứu phân loại, mối quan hệ tiến hóa giữa các loài.

Nghiên cứu isozym cũng được sử dụng trong phương pháp lập bản đồ gen. Như đã biết, một trong các phương pháp lập bản đồ gen là lai tế bào soma khác loài. Trong tế bào lai xa được hình thành trong nuôi cấy, chỉ còn lại nguyên vẹn số nhiễm sắc thể của một trong hai loài bố, mẹ, nhiễm sắc thể của loài kia tiêu biến hầu hết, chỉ còn lại một hoặc một số ít nhiễm sắc thể.

Phân tích kiểu hình enzym có mặt trong tế bào lai giúp ta xác định được thành phần và vị trí các gen trên nhiễm sắc thể tương ứng còn lại trong tế bào lai.

Ngày nay, bản đồ phân bố các lôcut gen ở nhiều loài động vật có vú đã được thiết lập bằng kỹ thuật nêu trên.

Phương pháp điện di enzym bằng xenluloza axetat đặc biệt thích hợp với thực nghiệm lai tế bào soma vì chỉ cần lượng rất ít vật mẫu để phân tích.

Các kết quả điện di allozym được sử dụng trong việc xác định quan hệ họ hàng, do sự có mặt của các alen đồng trội, di truyền theo kiểu đơn gen. Kết quả các phép lai di truyền, trừ các trường hợp có đột biến, đều phù hợp với sự phân ly Mendel thể hiện trên phân bố tần số alen và phân bố kiểu gen ở đời sau. Do đó, kỹ thuật allozym có thể được sử dụng như một nghiệm pháp để xác định sự phù hợp trong mối quan hệ bố mẹ và con cái. Nghiệm pháp này có thể xét về cả hai bố, mẹ hoặc chỉ riêng bố hoặc mẹ và xét sự tương hợp giữa anh chị em.

Xác định quan hệ họ hàng như trên được ứng dụng trong khoa học hình sự và trong nhiều lĩnh vực sinh học, rất cần như trong các trường hợp xác định rõ mối quan hệ giữa các bố mẹ hờ và con cái.

Trong sinh học, di truyền chọn giống gia súc, vật nuôi, phương pháp allozym được sử dụng trong các trường hợp thụ tinh nhiều lần thụ

tính nhiều tính trùng, qua kiểm tra trên con cái, xác định được nguồn gốc con vật v.v...

Trong thế giới sinh vật, thường có những loài, những động vật ẩn kín như khó phân biệt về biểu hiện hình thái bên ngoài. Người ta có thể tìm cách phát hiện, như nghiên cứu nhiễm sắc thể, xác định pheromon, phân biệt giọng tiếng kêu, phát hiện tập tính v.v... Bên cạnh đó, kỹ thuật điện di allozym là một phương pháp có hiệu quả, được sử dụng trong các trường hợp mà các phương pháp xác định thông thường không đạt hiệu quả.

Chương IV

DI TRUYỀN PHÂN TỬ TẬP TÍNH Ở ĐỘNG VẬT

A. CƠ SỞ DI TRUYỀN VÀ DI TRUYỀN PHÂN TỬ TẬP TÍNH Ở ĐỘNG VẬT

I. CƠ SỞ DI TRUYỀN TẬP TÍNH CHUYỂN ĐỘNG HƯỚNG TRỌNG LỰC Ở *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Hirsch và Th. Dobzhanski, qua thực nghiệm, đã chứng minh, *ruồi dấm có các tập tính di truyền rất khác nhau, trong đó rõ nhất là phản ứng với trọng lực (response to gravity).*

Bình thường, trong các loài *Drosophila* nuôi thí nghiệm, hầu hết các cá thể đều có chuyển động âm tính hướng trọng lực (negative geotaxis), tức khi cho ruồi vào một ống nghiệm thẳng đứng, ruồi bay lên cao, ngược chiều trọng lực.

Riêng quần thể tự nhiên ban đầu *Drosophila pseudoobscura* được Dobzhansky tiến hành thực nghiệm tập tính chuyển động hướng trọng lực (geotaxis) thì bao gồm đủ các cá thể thuộc 3 trạng thái: chuyển động hướng trọng lực âm tính (bay lên cao), dương tính (bay xuống thấp) và trung tính (bay ở lưng chừng giữa ống nghiệm), với tỷ lệ 3 trạng thái gần như ngang nhau.

Dobzhanski cho phối giữa các cá thể ruồi chuyển động rõ nét dương tính với nhau và giữa các cá thể chuyển động âm tính rõ nét nhất với nhau. Sau quá trình chọn lọc và cho nhân giống thuần qua 15 thế hệ, thu được toàn bộ các cá thể, hoặc chuyển động dương tính hướng trọng lực, hoặc chuyển động âm tính hướng trọng lực.

Hirsch và Enleumeyer-Kimling, tiến hành các thực nghiệm theo

phương pháp như trên, cũng thu được những kết quả tương tự trên ruồi dấm *Drosophila melanogaster* và đã chứng minh rằng, *phản ứng với trọng lực ở ruồi dấm D.melanogaster được quy định bởi một số gen nằm trên 3 nhiễm sắc thể X, II và III của ruồi dấm!*

Trong quần thể tự nhiên ruồi dấm, không chọn lọc, nhiễm sắc thể II và X quy định chuyển động dương tính hướng trọng lực và nhiễm sắc thể III quy định chuyển động âm tính hướng trọng lực. Có những cá thể có các mức độ rất khác nhau về chuyển động hướng trọng lực, từ rất âm tính đến rất dương tính.

Các sai khác trên là một ví dụ hùng hồn về tính đa dạng sinh học tự nhiên (natural diversity), tạo cho các loài khả năng biến đổi linh hoạt, thích nghi với các biến đổi muôn hình muôn vẻ của môi trường.

II. CƠ SỞ DI TRUYỀN PHÂN TỬ VÀ DI TRUYỀN TIẾN HÓA TẬP TÍNH ĐỘNG VẬT

1. Tập tính nhận biết mùi ở các loài động vật có vú

Cơ chế di truyền phân tử của tập tính nhận biết mùi ở các loài động vật có vú đã được từng bước làm rõ qua thành tựu mới, phát hiện các gen thụ quan khứu giác, gen nhận biết mùi (olfactory receptor genes) ở các loài thú thuộc các bộ ăn thịt (*Carnivore*), bộ guốc lẻ (*Perissodactyl*) như ngựa, bộ guốc chẵn (*Artiodactyl*), gặm nhấm, dơi. Sự tiến hóa của các gen thụ quan khứu giác gắn liền với mức tinh vi, nhạy bén của khả năng nhận biết mùi của các loài nêu trên.

Nghiên cứu gần đây nhất của Laurie-Issel-Tarver, 1997 (California), đã phân tích so sánh 4 họ phụ (subfamilies) trong họ gen (gene family) thụ quan khứu giác ở loài chó, đối chiếu với các loài có vú khác, đã bước đầu xác định được các biến đổi của họ gen này trong quá trình tiến hóa của động vật có vú.

Tác giả đã mô tả cụ thể 4 gen thụ quan khứu giác được phát hiện ở chó (*Canis familiaris*) là: CfOIF₁, CfOIF₂, CfOIF₃, CfOIF₄, mỗi gen trên thuộc về một họ phụ gen thụ quan khứu giác ở chó. Các họ phụ gen này có quy mô 2-20 gen. Cả 4 gen nói trên (và những thành phần khác của 4 họ phụ) đều được biểu hiện ở biểu bì khứu giác của chó, không phát hiện thấy ở phổi, gan, noãn sào, lá lách, tinh hoàn, lưỡi. Những họ phụ này được xác định qua phương pháp lai phân tử axit nucleic, cụ thể ở đây là

phương pháp lai Southern blot (lai ADN, do Southern, 1975) ADN của genom, cho lai giữa các gen trong một họ phụ. Bốn họ phụ gen khứu giác nói trên được xác định trong bản đồ di truyền, thuộc về 3 nhiễm sắc thể khác nhau của chó. Các thực nghiệm đi sâu phân tích phân tử cũng đã phát hiện có sự tương ứng giữa các gen nêu trên với các gen thụ quan khứu giác ở người.

Công trình nghiên cứu đã sử dụng các phương pháp lai phân tử với các mẫu dò từ chó (dog probe), phương pháp tách bộ gen lưu trữ của người, tức thư viện bộ gen (screening human genomic libraries), đã xác định gen khứu giác ở người HsOIF₁ ứng với gen CfOIF₁ ở chó đến 88%, nằm trong nhiễm sắc thể 11 của người. (*Homo sapiens*). Gen khứu giác HsOIF₃ của người cũng ứng với gen CfOIF₃ ở chó, tương ứng 86%, nằm trong nhiễm sắc thể số 7 của người.

Khi liên hệ so sánh các gen thụ quan khứu giác của chó với các loài khác nhau trong động vật có vú, công trình nghiên cứu của Issel- Tarver và Rice, 1996, đã cho thấy, số lượng lớn và sự đa dạng của họ gen thụ quan khứu giác bảo đảm cho động vật có vú nhận biết và phân biệt được hàng nghìn chất mùi khác nhau.

Số lượng lớn và sự đa dạng này cùng với vai trò quan trọng của khứu giác trong lịch sử tự nhiên của động vật có vú, làm cho các gen khứu giác trở thành lĩnh vực hấp dẫn đặc biệt các nghiên cứu phân tích so sánh.

Rõ ràng khứu giác là một bộ phận rất quan trọng trong đời sống động vật có vú, có vai trò trong tập tính xã hội của động vật, tìm kiếm thức ăn, phản ứng với môi trường biến đổi.

Động vật có vú sai khác nhau về mức độ cảm nhận mùi, sự nhạy cảm và khả năng phân biệt mùi vị của khứu giác. (Moulton, 1996; Stoddart, 1996).

Sai khác về mức độ tinh tế của khứu giác phụ thuộc nhiều yếu tố khác nhau. Một yếu tố là cấu tạo (vị trí và kích thước) của biểu bì thần kinh khứu giác trong mũi.

Trong số động vật có vú thì cơ quan khứu giác đặc biệt được phát triển ở hầu hết các thú ăn thịt, thú guốc lẻ, guốc chẵn, gặm nhấm và dơi. Cơ quan khứu giác bị thu bé lại rõ nhất là ở người, động vật cấp cao (primate), động vật có vú sống ở nước (Moulton, 1967). Người có khoảng

10cm² biểu bì khứu giác, trong khi ấy chó Đức Shepherd có 95-169 cm² (Moulton, 1967). Sai khác về khả năng nhận biết mùi còn thể hiện ở tỷ lệ não bộ dành cho khứu giác.

Cũng với các sai khác trên về mặt cấu tạo, giải phẫu, thì giữa các động vật có vú còn sai khác nhau về số lượng và mức đa dạng của họ gen thụ quan khứu giác trong genom.

Một số sai khác di truyền về mặt này có thể là do chọn lọc tự nhiên dựa trên khả năng khứu giác. Các gen thụ quan khứu giác thường được tổ chức thành từng cụm gen liên kết chặt chẽ với nhau (Sullivan, 1996).

Có hiện tượng trao đổi chéo không đều (unequal crossing-over) giữa các gen trong họ, dẫn đến là tăng hoặc giảm số lượng gen trong họ, như đã thấy ở các gen α - globin của động vật cấp cao (primate) (Zimmer, 1980).

Các hiện tượng và cơ chế di truyền nêu trên được xác định qua so sánh các đoạn, số lượng và vị trí trong bản đồ di truyền của các gen tương đồng (orthologous genes), tức những gen đồng dạng ở các loài khác nhau.

Các thực nghiệm đó góp phần tìm hiểu các biến đổi của các gen này trong quá trình tiến hóa của động vật có vú, liên quan với chủng loại phát sinh và sinh thái các động vật có vú khác nhau.

Khi so sánh 4 họ phụ gen thụ quan khứu giác giữa các loài, những biến đổi trong số lượng, người ta cho rằng hầu như toàn bộ các họ phụ gen này đã được hình thành từ trước khi có sự phân ly của các động vật có vú, cách đây 60-100 triệu năm.

Tập tính nhận biết mùi các chất hoà tan trong nước thấy rõ ở cá hồi. Cá hồi rất nhạy cảm với hiện tượng nhiễm bẩn nước, có thể phát hiện chất hòa tan không quá vài chục phần triệu gam trên một lít nước. Các nhà khoa học Pháp đã phát hiện trung khu nhận dạng mùi trong não bộ cá này, nhất là mùi trong các chất độc hòa tan trong nước dòng nước thải công nghiệp. Căn cứ sự thay đổi thông số của các xung động thần kinh ghi nhận được tại trung khu này, có thể xác định loại chất hòa tan kèm nồng độ của nó.

Người ta cắm sẵn điện cực vào trung khu khứu giác cá hồi, nối với một máy thu cực nhạy đặt trên bờ, kèm một máy tính điện tử. Các nơ-ron khứu giác của cá Hồi có thể "thông báo" bằng các xung động của

chúng về sự có mặt một chất độc nào đó trong nước với nồng độ mà các phương pháp phân tích thông thường khó phát hiện (G. Grep 1983).

2. Tập tính sinh sản về pheromon hydrocarbon biểu bì

Cách ly sinh sản là một trong những nguyên nhân đầu tiên dẫn tới hình thành loài mới ở động vật, gắn liền với sự chọn lọc giới tính.

Người ta đã nghiên cứu phát hiện cơ sở di truyền phân tử của một tập tính dẫn tới cách ly sinh sản ở ruồi dấm *Drosophila*, dựa trên sai khác, trong một loại pheromon là hydrocarbon biểu bì.

Cũng giống như nhiều loài sâu bọ, ruồi dấm *Drosophila* có một lớp carbon trên bề mặt biểu bì. Hợp chất này có tác dụng bảo vệ cho da của con vật không bị khô; ở một số loài như loài hai cánh (*Diptera*), loài cánh phấn (*Lepidoptera*) như bướm, cánh cứng (*Coleoptera*), (như bọ rùa, xén tóc, cánh cam...). Chất này có vai trò như một pheromon của con cái, dùng dẫn dụ kích thích con đực cùng loài.

Nghiên cứu thực nghiệm gần đây của A.Coyne (1996) đã phát hiện sai khác mang bản chất di truyền về lớp hydrocarbon biểu bì của ruồi cái thuộc hai loài thân thuộc (siblings species) *Drosophila sechellia* và *Drosophila mauritiana*. Ở *D. sechellia*, hợp chất này là 7,11- hepta cosadiene (7,11-HD, trong khi đó ở *D.mauritiana* là 7-tricosene (7-T).

Người ta đã phân tích, xác định được cơ sở di truyền của sai khác này với một sai khác về tập tính sinh sản, dẫn tới cách ly sinh sản giữa các loài.

Các nghiên cứu về tập tính qua thực nghiệm truyền ghép hydrocarbon (hydrocarbon transfer) đã cho thấy, loại feromon này có vai trò lớn trong cách ly sinh sản giữa ruồi đực *D. mauritiana* và ruồi cái *D. sechellia*.

Người ta đã xác định, sai khác giữa các loài về pheromon hydrocarbon biểu bì là do các biến đổi tiến hóa, tối thiểu của 6 locus gen, tất cả đều nằm trên nhiễm sắc thể số III của ruồi dấm.

Sự khu trú của hệ gen này trên nhiễm sắc thể số III cũng được xác định qua các phân tích di truyền khác trên ruồi dấm *Drosophila melanogaster*, về các sai khác hydrocarbon ở ruồi cái, qua nhiều công thức lai khác nhau.

Thực nghiệm truyền ghép hydrocarbon (hydrocarbon transfer)

Coyne, 1994 đã tiến hành thực nghiệm, nhốt ruồi cái thí nghiệm chung với ruồi cái loài khác (loài "cho", tức "donor" species) trong một số ngày. Kết quả cho thấy ruồi cái thí nghiệm đã tiếp thu một lượng lớn hydrocarbon của ruồi cho. Rõ ràng, hợp chất pheromon hydrocarbon này đã được truyền ghép trực tiếp cho nhau giữa các cá thể ruồi. Người ta sử dụng phương pháp vừa nêu trên để truyền ghép hydrocarbon giữa các ruồi cái *D.sechellia* và *D. mauritiana* và quan sát kết quả qua theo dõi xem các ruồi đực đã thay đổi hướng dẫn dụ những ruồi cái mới được truyền ghép hydrocarbon này như thế nào, từ đó mà xác định vai trò của sự sai khác pheromon này trong cách ly sinh sản.

Bản chất hóa học của các pheromon nêu trên được phân tích qua tách chiết hydrocarbon biểu bì và cho chạy sắc ký khí (gas chromatography). Sai khác về hydrocarbon biểu bì giữa các loài của ruồi dấm *Drosophila*, dẫn tới cách ly sinh sản, đã được nghiên cứu đầu tiên bởi Cobb và Jallon, 1990, qua thiết lập mối *tương quan giữa tập tính dẫn dụ khác loài với pheromon*.

Cobb và Jallon phát hiện thấy *ruồi đực* của hai loài *lưỡng tính giới tính* (sexually dimorphic) về hydrocarbon (ruồi đực có 7-T và ruồi cái có 7,11- HD), đã dẫn dụ, *theo đuổi ruồi cái của mọi loài*. Một kết luận được rút ra là ruồi đực thuộc các loài lưỡng hình có *tập tính về phản ứng với hydrocarbon ở phạm vi rộng lớn so với ruồi đực thuộc loài đơn hình* (monomorphic).

Giả thuyết nêu trên của Cobb và Jallon đã được xác minh qua thực nghiệm truyền ghép hydrocarbon giữa các ruồi cái của các loài khác nhau, giữa *D. melanogaster*, *D. simulans* và *D.sechellia*.

3. Tính lưỡng hình giới tính trong tập tính phản ứng tránh benzaldehyde ở *Drosophila melanogaster*

Các thực nghiệm về cơ sở di truyền phân tử tập tính động vật đã bước đầu cho thấy, hệ số di truyền về phản ứng với mùi ở động vật là thấp vì đây là một loại tính trạng hình thành do chọn lọc tự nhiên.

Mối tương quan giữa sức sống, sức hoạt động của động vật với tập tính nhận biết mùi là không rõ, có thể là do khối lượng các lôcut về phản ứng với mùi ít liên quan với số lượng các lôcut về sức sống.

Thực nghiệm cho thấy, lôcut gen tác động lên các biến đổi tự nhiên về phản ứng với mùi của benzaldehyde là không như nhau giữa ruồi đực và ruồi cái *Drosophila melanogaster*. Có các gen khác nhau giữa ruồi đực và ruồi cái, chỉ phối sự biến đổi trong tập tính nhận biết mùi.

Người ta cho là có thể có sự phân li trong tiến hóa, sự phân hóa, biệt hóa (differentiation) về tập tính nhận biết mùi ở ruồi đực và ruồi cái. Tính lưỡng hình giới tính (sexual dimorphism) thể hiện ở quần thể *Drosophila melanogaster* tự nhiên, về phản ứng với benzaldehyde qua hiện tượng ruồi đực phản ứng tránh benzaldehyde mạnh hơn ruồi cái.

Về đặc điểm này, nhiều loài sâu bọ khác cũng có tính lưỡng hình giới tính về hình thái râu ăngten nhận biết mùi (Hildebrand, 1985; Lofstedt, 1993) và về các protein bám pheromon đặc thù, như ở một số loài bướm đêm, (moth) (Vogt, 1990).

Về mặt di truyền học, ta thấy rõ tính lưỡng hình giới tính về phản ứng với mùi vị ở động vật, rất phù hợp với các sai khác trong sự biểu hiện gen, trong sự biểu hiện phân hóa của gen (differential gene expression), thấy rõ ở nhiều mặt, trong đó có cả hình thái khác nhau giữa đực và cái, thấy rõ giữa ruồi dấm *Drosophila melanogaster* đực và cái, ở *Drosophila melanogaster*, lưỡng hình giới tính về tập tính nhận biết mùi được biểu hiện rõ ở hiện tượng, ruồi đực dùng tập tính cảm thụ mùi để phát hiện con cái, còn ruồi cái lại dùng khả năng nhận biết mùi để chọn vị trí để trứng thích hợp, hoặc tránh nơi không thích hợp.

Nói chung, người ta thấy rõ, sự biến dị di truyền và tính lưỡng hình giới tính về tập tính nhận biết mùi ở động vật, gắn với chọn lọc môi trường, nơi ở và gắn với tập tính sinh sản, chọn đôi giao phối, chọn đôi lứa, phù hợp với sự tiến hóa trong cách ly sinh sản bộ phận.

4. Nghiên cứu di truyền tập tính cảm thụ magie của *Paramecium*

Magie là một yếu tố cần thiết cho hoạt động bình thường của hàng trăm loại enzym trong tế bào sống. Người ta cho rằng, sự thẩm thấu, trao đổi tự do của magie giữa các tế bào có thể là một yếu tố điều hòa quan trọng hoạt động sống của các tế bào trong cơ thể.

Paramecium là một động vật đơn bào, một protist động, có khả năng hấp thụ hàm lượng tương đối lớn Mg^{2+} đi vào tế bào, chỉ trong vòng phần nghìn của giây (Preston, 1990). Tốc độ và chiều hướng bơi

của *Paramecium* phụ thuộc tiềm năng của màng tế bào.

Bằng phương pháp di truyền học, người ta đã tạo được thể đột biến "Chameleon" ở *Paramecium*, có sức cảm thụ mạnh đối với Mg^{2+} . Người ta làm thực nghiệm, chuyển *Paramecium* tự nhiên (dạng hoang, wild type) từ dung dịch không có Mg^{2+} (0mM Mg^{2+}) sang dung dịch 5mM Mg^{2+} , *Paramecium* sẽ bơi ngược lại (ngược hướng chuyển động tự nhiên, bình thường, *Paramecium* bơi về cực âm) trong 10-15 giây (Preston, 1994). Thực nghiệm như trên với thể đột biến Chameleon (Cha), chúng cũng bơi ngược lại, nhưng lâu hơn, gần 30 giây.

Các phân tích về điện sinh lý đã dẫn đến giả thiết là tập tính này được biến đổi ở thể đột biến Cha, do tác động đặc thù của ion Mg^{2+} , kích thích tăng thẩm thấu Mg^{2+} qua màng tế bào. Hiện tượng này cũng tương tự như trường hợp thể đột biến Cha tăng cảm thụ với niken, vì Ni^{2+} cũng có khả năng thẩm thấu vào tế bào theo cách như trên.

Các phân tích về tập tính cho thấy thể đột biến Cha cũng có phản ứng tương tự với Na^+ . Có khả năng là locus Cha đã mã hóa một yếu tố điều hòa đặc biệt, làm tăng khả năng hấp thụ Mg^{2+} và Na^+ .

Phương pháp gây đột biến được sử dụng cho *Paramecium* là xử lý hóa chất N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) hoặc xử lý chiếu xạ.

Phương pháp phát hiện và chọn lọc thể đột biến về tập tính tăng cảm thụ Mg^{2+} được tiến hành qua kỹ thuật theo dõi chuyển động hướng điện cực (galvanotactic technique). Người ta dùng khoảng 200ml tế bào *Paramecium* đã được xử lý gây đột biến, rửa sạch trong dung dịch không có Mg^{2+} , sau đó ly tâm để tách riêng tế bào.

Đưa các tế bào *Paramecium* này vào một ống có 2 điện cực, chứa dung dịch Mg^{2+} , cho dòng điện chạy qua dọc ống. Bình thường, trong tự nhiên, dạng hoang dại, thì *Paramecium* chuyển động về phía cực âm, khi bơi trong dung dịch không có Mg^{2+} . Với thí nghiệm này, trong ống có dung dịch chứa Mg^{2+} , *Paramecium* đã phản ứng với Mg^{2+} bằng cách bơi ngược lại và tiến thẳng về cực dương. Sau khoảng 20 giây, hầu hết mọi tế bào *Paramecium* được hồi phục lại sau kích thích của Mg^{2+} , lại bắt đầu bơi về phía cực âm.

Các nghiên cứu đi sâu về di truyền phân tử đã cho thấy tập tính bơi của *Paramecium* là do tiềm năng của màng tế bào, được kiểm soát bởi

sự chuyển động qua nhiều lớp khác nhau của kênh ion.

Người ta đã phát hiện có hơn 20 alen điều hòa hoạt động của các kênh này. Đột biến của các alen này dẫn tới hình thành các kiểu hình mới giống như thể đột biến Cha.

III. CƠ SỞ DI TRUYỀN TIẾN HÓA TRONG TẬP TÍNH ĐỘNG VẬT

Trong quá trình tiến hóa của động vật, chọn lọc tự nhiên đã có tác động, bảo tồn những kiểu tập tính thích nghi nhất. Nhiều tập tính động vật chịu ảnh hưởng rõ của các biến dị di truyền, các đột biến gen, đồng thời cũng có những sai khác, biến đổi trong tập tính của loài là kết quả trực tiếp của các sai khác, *biến đổi môi trường*. Chính tác động qua lại giữa động vật với môi trường đã dẫn tới kết quả *tiến hóa thích nghi* liên quan mật thiết với *tiến hóa cơ quan thụ cảm*.

1. Tiến hóa trong tập tính nhận biết mùi

Người ta thấy rõ tập tính ở động vật và người có những biến đổi, phát triển, tiến hóa rõ rệt trong quá trình lịch sử lâu đời của sự phát triển sinh giới. Một trong các hướng tiến hóa rõ nét nhất trong tập tính là sự tiến hóa thích nghi.

Các thực nghiệm theo nhiều hướng, trong đó có cả thực nghiệm di truyền phân tử gần đây, cho thấy rõ hệ gen thụ quan khứu giác ở động vật phát triển tiến hóa rất nhanh và rõ nét, dẫn đến hiện tượng phát toả do thích nghi (adaptive radiation) xuất hiện nhiều loài hoàn toàn mới từ kiểu thích nghi. Trong quá trình tiến hóa theo hướng này, đã xuất hiện các động vật có xương sống, với môi trường sống phân hóa rõ rệt, loại sống nước, loại sống cạn, với tập tính nhận biết mùi (olfactory behaviour) cũng được phân hóa, phát hiện được mùi hòa tan trong nước và mùi từ các chất bay hơi.

Sự tiến hóa thích nghi được biểu hiện rõ ở thụ quan khứu giác của động vật. Một ví dụ điển hình trong lĩnh vực này là sự tồn tại đồng thời cả hai dạng thụ quan khứu giác ở lưỡng thê *Xenopus laevis*, dạng dưới nước và dạng trên cạn (Freitag, 1995).

Khả năng nhận biết, phát hiện mùi ở các loài động vật được hình thành, phát triển, tiến hóa, gắn liền với quá trình biến đổi, phát triển.

tiến hóa của các cơ quan thụ cảm khứu giác, đặc biệt rõ ở các loài động vật có xương sống.

Các thực nghiệm gần đây nhất về phân tích di truyền phân tử, đã cho thấy rõ, sự tiến hóa về mức độ tinh tế, nhạy cảm về khả năng phát hiện mùi ở nhiều loài động vật có xương sống gắn liền với mức độ tiến hóa của thụ quan khứu giác, của các gen thụ quan khứu giác. Các *gen nhận biết mùi trong thụ quan khứu giác (olfactory receptor genes)* đã được xác định ở nhiều loài thú khác nhau, điển hình là ở chó, bộ ăn thịt (Carnivore), ở ngựa, bộ guốc lẻ, dơi, bộ guốc chẵn (Artiodactyl).

Sai khác, mức độ tiến hóa về khả năng nhạy cảm tinh tế của khứu giác còn phụ thuộc và gắn với nhiều yếu tố tiến hóa khác nhau, như sự biến đổi tiến hóa trong cấu tạo, vị trí, kích thước của biểu bì thần kinh khứu giác trong mũi.

Cơ quan khứu giác bị thu bé lại, rõ nhất là ở động vật có vú sống nước, ở động vật bậc cao (primate) và đặc biệt rõ là ở người (*Homo sapiens*).

Người có khoảng 10cm^2 biểu bì khứu giác, trong khi ấy ở các loài chó, như chó săn, chó quốc phòng, chó đặc cấp có thể có $95\text{-}169\text{cm}^2$ biểu bì khứu giác (Moulton, 1967).

Sai khác về khả năng nhận biết mùi còn thể hiện ở tỷ lệ đại não thuộc trung khu khứu giác.

Đặc biệt, các phân tích phân tử về hệ gen các loài động vật có vú còn cho thấy giữa các loài này có sai khác về số lượng và mức đa dạng trong họ gen (families) trong thụ quan khứu giác, trong genom, sai khác này trong tiến hóa có thể gắn liền yếu tố chọn lọc tự nhiên dựa trên khả năng khứu giác, liên quan đến chủng loại phát sinh và sinh thái các loài động vật có vú khác nhau trong quá trình tiến hóa của động vật có vú.

2. Tiến hóa trong tập tính chuyển động hướng ánh sáng

Động vật có tập tính chuyển động quang hướng, hướng ánh sáng (phototaxis) với khả năng định hướng tới nguồn sáng. Ở các động vật bậc thấp, ở nguyên sinh động vật (*Protozoa*), động vật đơn bào, tập tính này còn rất đơn giản. Trùng roi (*Euglena*) có tập tính hướng ánh sáng dương tính (positive phototaxis), bao giờ cũng bơi về phía có nguồn sáng, để quang hợp ánh sáng mặt trời.

Euglena viridis có một cơ quan thụ cảm ánh sáng ở ngay gốc của roi (flagellum) trên cơ thể con vật. *Euglena viridis* không bơi thẳng đến nguồn sáng ngay, mà bơi theo đường vòng, đi quanh hướng chính của tia sáng, đi tìm tới nguồn sáng. Đây là tập tính chuyển động vòng tới tia sáng (klinotaxis).

Ở những động vật thấp khác, có cả "đôi mắt" đã tiến hóa ở hai bên, thì lại phản ứng theo cách chuyển động thẳng tới nguồn sáng. Cả hai mắt đều tiếp xúc với nguồn sáng, các thụ quan quang học nhận kích thích ngang nhau từ nguồn sáng. Người ta gọi đây là Tropotaxis. Ngược lại với *Euglena* có chuyển động quang hướng dương tính, thì ấu trùng ruồi dấm *Drosophila melanogaster*, lại có tập tính chuyển động quang hướng âm tính (negative phototaxis). Ấu trùng ruồi dấm bao giờ cũng quy tụ xa nguồn sáng. Cơ quan thụ cảm ánh sáng của chúng được phân bố ở đầu trước của cơ thể.

Chuyển động quang hướng dương tính và âm tính là những dạng nguyên thủy nhất trong khả năng và tập tính định hướng tới nguồn sáng. Những động vật nói trên đây chỉ cảm thụ được tia sáng ở các góc 0° và 180° .

Sự tiến hóa của các loài động vật về mặt tập tính quang hướng đã đi theo hướng phát triển, đi lên theo hướng có khả năng cảm thụ tia sáng ở nhiều góc độ khác nhau, có thể định hướng ánh sáng ở nhiều góc độ, chuyển động tới nguồn sáng theo nhiều hướng (menotaxis). Sự tiến hóa trong tập tính này ở động vật là rất quan trọng đối với hoạt động sống, khả năng thích nghi của động vật, vì trong thiên nhiên, nguồn sáng thay đổi vị trí muôn màu muôn vẻ. Điển hình về tập tính này ở mức độ tiến hóa cao là la bàn định hướng mặt trời (sun compass orientation) ở ngành chân khớp (*Arthropoda*) và chim (birds). La bàn định hướng mặt trời chính là nhân tố cảm thụ môi trường ngoài, được kết hợp với nhân tố bên trong, nhân tố di truyền, tạo thành cơ chế sinh học, trong tập tính quang hướng, chuyển động hướng ánh sáng, dẫn tới khả năng định hướng, định vị ở nhiều loài sinh vật. Trong tập tính di cư của các loài chim, loài cá, v.v... cơ chế định hướng, định vị được hoàn thiện trong tiến hóa, đến mức "gần như chính xác tuyệt đối".

Cơ chế trên đây được tổng hợp qua não, tạo thành bản năng của sinh vật, tạo nên la bàn định hướng ở một số loài, giúp cho động vật xác định được phương hướng để vượt được các đoạn đường cực dài, hàng

ngành cây số, di cư, làm tổ, đẻ trứng, tránh rét v.v...

Chim hải âu, di cư từ Bắc cực xuống Nam cực để tránh rét, xa hàng 50.000 km dòng dãi hàng 6 tháng trời, chỉ cần một sai lệch nhỏ về phương hướng cũng đủ làm chim chết gục dọc đường.

Nhạn biển Bắc cực (*Sterna arctica*) sống ở cực Bắc, đến mùa sinh sản thì di cư xuống phía Nam, ấm áp để làm tổ, đẻ trứng, vượt chặng đường dài hàng nghìn cây số. Chim con nở ra, lớn lên, đủ lông cánh, lại cũng có khả năng vượt những chặng đường dài, xa lạ đối với chúng, theo đúng đường bay của bố mẹ, tìm về nơi đất tổ.

Các thực nghiệm với kỹ thuật hiện đại, sử dụng thiết bị vệ tinh, theo dõi các chim được đeo vòng, đã làm rõ và khẳng định khả năng kỳ diệu này trong tập tính một số loài, như chim, hươu, rùa biển, cá v.v...

Chim ruồi, mỏ rất dài, hút mật hoa, bay về Nam Mexico, đường dài tới 6500km. Lươn biển, từ ngoài khơi, di cư vào dòng nước ngọt, sau đó lại quay ra đại dương nơi quê hương. Cá trích, cá mòi v.v... từ biển di cư vào sông để trứng, bảo đảm an toàn, sau đó lại quay ra biển.

Ngược lại, loài cá chình (*Anguilla*) ở Tây Âu, Bắc Mỹ, sống ở nước ngọt, trong sông, đến mùa đẻ trứng lại quay ra biển, để ở tầng nước sâu, có sẵn thức ăn là tảo biển. Cá con nở ra, lớn lên lại biết tìm về quê hương nước ngọt của tổ tiên. Rùa biển, vượt hàng 3500km, qua Thái Bình Dương, tìm nơi đẻ trứng, đẻ xong lại quay về chốn cũ. Các loài hươu, hễ ở Bắc cực Canada, đông lại trở về Nam, xa hàng nghìn kilômet.

Về mặt tiến hóa trong tập tính quang hướng, người ta đã xác định là giữa khả năng chuyển động hướng ánh sáng thô sơ, chỉ phản ứng ánh sáng ở các góc độ 0° và 180° , tức quang hướng âm tính và dương tính, tiến lên mức khả năng phản ứng chuyển động theo ánh sáng ở nhiều góc độ khác nhau (menotaxis), thì có một dạng phản ứng ánh sáng trung gian, tức chuyển động phản ứng với ánh sáng xuyên qua (transverse phototaxis), được phát hiện ở nhiều loài giáp xác (crustaceans). Thực nghiệm cho thấy, phản ứng chuyển động theo ánh sáng có thể bị ảnh hưởng bởi trạng thái và cường độ tia sáng chiếu ngang qua.

Người ta làm thí nghiệm, cho *Daphnia* hoặc *Artenia* hoặc *Mysis* vào một bể kính, chiếu nguồn sáng xuyên qua, và cho thay đổi từng nấc một, cường độ tia sáng, các con vật nêu trên sẽ bơi ra phía bề mặt của

bể kính, theo chiều hướng khác nhau. Nếu ta tăng cường độ nguồn sáng, chúng sẽ bơi theo nhiều hướng, đi xuống đáy bể kính.

3. Tập tính ở các động vật cao cấp, linh trưởng

Quá trình tiến hóa của tập tính nói chung được thể hiện rõ, khi nghiên cứu tập tính của con người.

Tập tính của người có những đặc điểm riêng trong tiến hóa. Con vật hành động chủ yếu theo bản năng, con người hành động theo trí tuệ. Nghiên cứu tiến hóa của tập tính trên con người có nhiều khó khăn không thể áp dụng đối với con người, những phương pháp nghiên cứu tiến hóa của tập tính động vật, Không được phép tiến hành trên con người các loại thí nghiệm trực tiếp trên động vật, chỉ có thể dựa vào các số liệu ngẫu nhiên, các tư liệu thu được một cách gián tiếp.

Nhiều nhà tập tính học đi theo hướng nghiên cứu tập tính ở khi nhân hình, khỉ hâu, gần con người, như tập tính xã hội ở khỉ, mối quan hệ mẹ-con, tình thương của khỉ mẹ đối với con. Bước đầu, người ta đã thấy, các tập tính khởi thủy ở con người, các tập tính đơn giản, chưa phức tạp của con người, đều có ở động vật.

Các loại cử động được gây ra do kích thích đơn giản từ phản xạ đầu gối của thai, cảm giác người mẹ thấy thai đạp, tùy theo tư thế của thai, nằm đầu xuôi hay ngược theo dạ con người mẹ, các cử động từ khi lọt lòng mẹ, ngáp, khóc, nháy mắt, vận động chân, tay, v.v...cho đến các tập tính phức tạp như đút thức ăn cho con đã thấy ở nhiều loài chim, dạy con ăn, dạy con đớp mồi, vỗ mồi v.v... đều đã có ở báo, hổ, sư tử, khả năng bắt chước, học tập làm theo, đã có ở nhiều loại thú, nhất là linh trưởng.

Con người, với nền văn minh, khoa học kỹ thuật tiên tiến, phát triển nhanh, có định hướng và dự báo cho tương lai của mình, thì động vật cũng đã có những tập tính thuộc dạng khởi thủy của sự lo xa như con người. Hiện tượng này thấy rõ ở tập tính dự trữ thức ăn cho mùa đông của nhiều loài thú, tha mồi về dự trữ trong tổ ong, tổ mối, tổ kiến v.v...(như vườn nấm trong tổ mối).

Sự tiến hóa của tập tính có thể được minh họa rõ nét qua quá trình phức tạp hóa dần của nhiều loại tập tính. Tập tính sinh sản, tập tính lứa đôi như nhiều loài chim sống một trống một mái "thủy chung", tập tính giao phối đều có ở các loài động vật, chủ yếu do nhu cầu bẩm sinh

lưu truyền nòi giống, liên quan trực tiếp với sự tiết hocmon sinh dục. Con người, ngoài các yếu tố như trên, còn có thêm yếu tố tình cảm, quan hệ tình yêu v.v...

Tập tính kiếm ăn của các loài khỉ, dẫu là khỉ nhân hình, khỉ hầu, đã vượt lên so với các loài thú khác, nhưng vẫn là còn đơn giản, chỉ là hái lượm, cắn, xé, bẻ cành v.v.. không thể chuyển nhảy vọt sang chế tạo công cụ lao động, có thiết bị máy móc hiện đại để nâng cao năng suất chế tạo thức ăn.

Tập tính con người mất dần tính bẩm sinh đơn thuần, do sự phát triển đặc thù của bộ não con người, đạt trình độ vượt xa hẳn so với các loài động vật, ngay cả so với các loài khỉ gần người.

Trong sự tiến hóa của tập tính, so với tổ tiên thời nguyên thủy, con người đã vượt lên xa hẳn, với các cơ chế di truyền xã hội, với các cuộc cách mạng xã hội, cách mạng khoa học kỹ thuật, với các bước tiến hóa trong bộ não, từ đó con người đã ngày càng làm chủ trong tập tính của mình, điều không thể có ở các loài động vật, kể cả các loài khỉ gần người.

Gần đây nhất, được công bố một phát hiện mới, đặc biệt quan trọng, giúp khoa học làm rõ thêm quá trình tiến hóa trong tập tính động vật, tập tính xã hội của các động vật cao cấp. Bộ phim khoa học trong tuyển tập phim "Wild life" (cuộc sống hoang dã), đã công bố một cuốn phim mang tựa đề "New Chimpanzees" (Những loài tinh tinh mới phát hiện). Người ta đã quay được cảnh trong rừng sâu, các con tinh tinh dùng từng khúc gỗ chắc, đập các hạt cây vỏ rất cứng để tách hạt ra ăn, đập hạt trên nền là các gốc cây, rễ cây to lộ trên mặt đất, theo đúng quy cách đập bằng búa, đe. Những hạt cứng này, con người ta thử đập vỏ, tách hạt cũng mất hàng 25 phút mới thành công. Một số con tinh tinh khác, lại đã biết nhặt các hòn đá sắc cạnh, to, đủ nặng, để đập hạt cứng. Cũng trong cảnh tự nhiên này, người ta còn quay được hình ảnh con tinh tinh mẹ dạy cho con, từng bước, biết cách đập hạt cứng như trên.

Về quan hệ, tình thương mẹ-con ở các loài động vật xã hội, người ta cũng đã quay được hình ảnh, một tinh tinh con bị chết, con tinh tinh mẹ ngồi cạnh đã cầm xác tinh tinh con, đưa lên hôn, đúng cử chỉ thương xót, từ giã đứa con bất hạnh. Từ những thực tế xảy ra trong rừng sâu hoang dã, người ta đã nêu lên vấn đề trí tuệ của loài tinh tinh, có 97% số gen giống với người. Các nghiên cứu gần đây về khỉ đột Gorilla ở

Trung Mỹ đã phát hiện nhiều hiện tượng về loài khỉ này, góp phần để có thể ngày càng làm sáng tỏ hơn vấn đề tiến hóa trong tập tính động vật cao cấp, đặc biệt từ các loài linh trưởng, tiến hóa lên con người.

Các khảo sát về nếp vân tay, chân của khỉ đột, đặc biệt các xét nghiệm, về thành phần máu, cho thấy giữa máu của khỉ đột Gorilla với của người, không có gì khác nhau.

Nhiều thực nghiệm, nuôi khỉ con trong gia đình, cùng chung sống với con người, cũng như các điều tra, theo dõi cuộc sống các gia đình khỉ đột Gorilla trong rừng hoang, cho thấy, ở khỉ đột Gorilla, không chỉ có tài bất chước như từ xưa đến nay con người đã thán phục mà về mặt thần kinh còn có được một mức độ cao hơn bất chước, thể hiện trong các yếu tố tình cảm, tình thương mẹ-con, trong các mối quan hệ biểu hiện hàng ngày giữa khỉ với con người chung sống trong một gia đình.

Các tư liệu thực nghiệm về hiện băng (banding technique) bộ nhiễm sắc thể, so sánh giữa người với các động vật cao cấp, các khỉ nhân hình, đã cho thấy người có quan hệ tiến hóa gần với tinh tinh (Chimpanzee) hơn so với Gorilla và với Orangutan.

Qua tiến hóa, tập tính con người đã hoàn toàn ở một cấp độ khác hẳn và vượt lên, do các yếu tố hoàn toàn mới, yếu tố xã hội. Cơ sở sinh lý và cơ sở di truyền chiếm tỷ lệ bao nhiêu trong tập tính của loài người, câu hỏi này chỉ có thể được làm rõ từng bước qua các nghiên cứu tổng hợp về cả hai mặt, di truyền và môi trường, phối hợp đồng thời các nghiên cứu về sinh học, tâm lý học, xã hội học v.v...

Chương V

PHÂN TÍCH PHÂN TỬ TRONG NGHIÊN CỨU DI TRUYỀN ĐỘNG VẬT

A. PHÂN LẬP (TÁCH CHIẾT) ADN

I. CÁC NGUYÊN TẮC VÀ PHƯƠNG PHÁP TIẾN HÀNH

1. Tách từ sản phẩm biểu hiện. Phương pháp này tách chiết ADN từ *m*-ARN hoặc protein

1.1. Từ *m*-ARN

- Dùng enzym sao ngược:

m- ARN → cADN mạch đơn (ss c DNA)

→ cADN mạch kép (ds c DNA)

- Các gen tổng hợp từ *m*-ARN gọi là gen bổ trợ, khác gen gốc là không mang intron.

1.2. Từ protein

- Từ trình tự Aa → trình tự nucleotid

- Tạo đoạn mồi (primer) để dò tìm đoạn gen mong muốn.

Cần chiết xuất thế nào để giữ nguyên vẹn cấu trúc nguyên của nó và thu được ADN tinh sạch.

2. Trên đối tượng thực vật

ADN tổng số được tách chiết bằng nhiều phương pháp: ure, perchlorate/phenol chloroform tùy đối tượng và điều kiện.

2.1. Yêu cầu

- Thành tế bào được phá vỡ để giải phóng các thành phần trong tế bào: nghiền mô trong nitơ lỏng,

- Màng tế bào phải bị phá hủy để giải phóng ADN vào đệm chiết. Dùng các chất tẩy (1)

- ADN phải được bảo vệ tránh bị cắt bởi các enzym nucleaza: dùng EDTA, là hợp chất có khả năng liên kết với ion Mg^{++} , một yếu tố cần cho hoạt động của nucleaza (qua đó, nucleaza bị ức chế).

Chargaff và Zamônop, 1948, dùng Na xitrat 0,05 M đưa vào tế bào để kết dính với Mg^{++} , ức chế enzym deoxyribonucleaza.

- ADN sau khi chiết xuất, phải tinh sạch, không lẫn các chất ức chế enzym như polysaccharide.

Đối với những cây có nhiều hợp chất phenol, người ta loại bỏ chúng bằng cho thêm PVP (polyvinyl poly pyrrolidine) trong đệm chiết.

3. Trên đối tượng động vật

3.1. Đầu tiên, người ta dùng nồng độ muối cao để sơ bộ tách ADN ra khỏi protein của sinh vật nhân chuẩn, sau đó dùng chloroforme alcol isoamyl để chiết ADN. Thông thường dùng mô chứa nhiều ADN, loại rất ít ARN hay polysaccharide như: nhân tuyến ức - Thymus của bê, tinh trùng, dịch hoàn cá.

3.2. Loại bỏ các thành phần không mong muốn trong mẫu, chủ yếu là các protein

- Mẫu được lắc thật mạnh trong dung dịch phenol: chloroforme, có tác dụng làm biến tính protein, nhưng không hòa tan axit nucleic.

- Protein biến tính không còn hòa tan trong dung dịch có chứa axit nucleic, sau khi ly tâm sẽ tủa thành một lớp nằm giữa pha nước và pha phenol: chloroforme.

- Pha nước có chứa axit nucleic được thu nhận.

3.3. Làm sạch, tinh khiết và tủa ADN:

Trường hợp ADN tuyến ức bê, có các bước sau đây:

(1) Các hỗn hợp chất tẩy này (detergent) phá vỡ màng tế bào và màng nhân, giải phóng ADN ra môi trường đồng thời phân hủy các protein liên kết với ADN.

- tuyến ức bê còn tươi;
- 1 V NaCl 0,9%, nghiền thành dung dịch;
- ly tâm 6000 vòng/phút - bỏ dịch lấy cặn;
- 1 V NaCl 0,9% lặp lại như trên.

3.3.1. Kỹ thuật rửa ADN

- 5 V NaCl 10%, khuấy mạnh ở 0°C, 48 giờ;
- ly tâm 6000 vòng/ phút - lấy dịch bỏ cặn;
- 1V methanol chiết dịch, bỏ cặn, lấy tủa;
- làm khô trong chân không ở 25°C;
- nghiền thành bột;
- hòa tan với 10 V NaCl 10%, khuấy mạnh;
- ly tâm chậm, phá vỡ nhũ tương.

3.3.2. Tạo dịch lỏng

- 1 V chloroforme - alcol- isoamyl- làm đi làm lại 9 lần; loại protein, loại kết tủa.

- Methanol 1V, loại dịch, lấy kết tủa. ADN khá tinh khiết và nguyên vẹn.

3.3.3. Chú ý

- Nếu cần chế phẩm ADN, dùng enzym ribonucleaza để làm tiêu ARN trong chế phẩm

- Nếu cần chế phẩm *mARN* để tổng hợp *cADN*, có thể tinh sạch tiếp *mARN* bằng oligo (dT)-cellulose, chất này bám vào các đuôi poly (A) của các *mARN* nhân chuẩn. sẽ tăng được hàm lượng *mARN*, còn ADN, *rARN*, *tARN* lẫn vào sẽ được loại bỏ.

4. Nguyên tắc và kỹ thuật chung trong rửa axit nucleic

4.1. Mục đích: thu nhận axit nucleic dưới dạng cô đặc

- một mặt để bảo vệ khỏi sự phân hủy của enzym;

- mặt khác để hòa tan trong dung dịch theo nồng độ mong muốn.

Thông thường có hai phương pháp rửa axit nucleic như sau:

4.2. Tủa trong ethanol (ethylic alcohol)

Thực hiện trong môi trường có lực ion cao (nồng độ muối cao), và nồng độ ethanol cao (2,5 dung tích ethanol trong 1 dung tích mẫu), nhiệt độ thấp tạo thuận lợi cho việc tủa. Hầu hết axit nucleic được tủa.

4.3. Tủa trong isopropanol

- không cần muối;
- thể tích isopropanol/thể tích mẫu : 1/1;

- ADN trọng lượng phân tử thấp không bị tủa, do đó có thể được loại ra theo phương pháp này. Cả 2 phương pháp trên sẽ được thu nhận bằng ly tâm. Cặn tủa được rửa trong ethanol 70% để loại bỏ các muối hoặc các dấu vết isopropanol còn dính trên mẫu.

B. BIẾN TÍNH VÀ HỒI TÍNH ADN

I. BIẾN TÍNH ADN

Khi ADN bị tác động bởi các tác nhân khác nhau như tác nhân vật lý (tác động nhiệt, đun nóng) hoặc tác nhân hóa học (dung dịch kiềm, formamide, ure), ADN sẽ bị biến tính (denaturation) các liên kết hydro giữa hai sợi đơn của ADN bị đứt gãy và hai sợi đơn tách nhau ra. Hiện tượng biến tính xảy ra ở nhiệt độ biến tính (melting temperature, T_m). T_m cao hay thấp, tùy thuộc vào thành phần bazơ của ADN và các điều kiện sử dụng trong biến tính. T_m phụ thuộc tỷ lệ các cặp bazơ G-C.

Mỗi cặp bazơ G-C có 3 liên kết hydro, do đó bền vững hơn cặp bazơ A-T, chỉ có 2 liên kết hydro. Do đó, loại ADN có nhiều cặp bazơ G-C hơn thì càng cần nhiều năng lượng hơn để tách sợi đơn của ADN. Hàm lượng G-C tăng 1%, thì T_m phải tăng 0,4°C.

Khi ADN ở trong một dung dịch có các điều kiện phù hợp về sinh lý, thì T_m thường trong khoảng 85-95°C. Loại ADN có 40% G-C, tiêu biểu cho genom của động vật có vú, thường biến tính ở T_m khoảng 87°C, trong các điều kiện sinh lý phù hợp. Loại ADN có 60% G-C sẽ biến tính ở T_m khoảng 95°C trong các điều kiện tương tự.

II. HỒI TÍNH ADN

Nếu nhiệt độ hạ xuống chậm dần, với các điều kiện thí nghiệm thích hợp, thì phân tử ADN lại được hồi tính (renaturation), các bazơ trong hai sợi đơn lại được liên kết nhau theo nguyên lý bổ sung để hình thành trở lại chuỗi xoắn kép. Nếu nhiệt độ hạ đột ngột, sẽ không xảy ra hồi tính.

Cả hai quá trình biến tính và hồi tính ADN có thể được theo dõi bằng quang phổ kế (spectrophotometer) cho phép đo lượng ánh sáng đi qua dung dịch. Khi ADN bị biến tính, nó hấp thụ nhiều ánh sáng hơn khoảng vài bước sóng so với khi còn ở dạng sợi xoắn kép. ADN mạch kép hấp thụ ánh sáng yếu hơn ADN mạch đơn.

Trong phân tử ADN lai, sự giảm mật độ quang học (OD, optical density) 260nm tương ứng với sự tăng số lượng các phân tử lai, do sự bắt cặp trở lại của hai mạch đơn bổ sung. Các giá trị OD được đo bằng quang phổ kế.

C. TÁCH RIÊNG NHAU ADN SỢI KÉP VÀ ADN SỢI ĐƠN

Phương pháp này tiến hành bằng cột hydroxyapatite (HAP) hoặc màng lọc nitrocellulose. HAP là những tinh thể photphat Ca, được sử dụng như một giá thể. Ở nồng độ muối cao, chỉ ADN sợi kép mới bám vào cột HAP, còn ADN sợi đơn thì không bám, sẽ thu nhận tách ra.

Sau đó, nếu tăng nồng độ photphat lên, ADN đã gắn giá thể cũng sẽ tách ra, được thu nhận riêng. Trên nguyên tắc này, nếu ta cho hỗn hợp ADN sợi kép và ADN sợi đơn đi qua một cột chứa hydroxyapatite, thì hai loại ADN này sẽ được tách riêng nhau. Ví dụ, nếu có một ADN đã biến tính và sau đó bắt đầu cho hồi tính, các đoạn có sức bắt cặp cao hơn sẽ bắt đầu được hồi tính trước và trở thành sợi kép sớm hơn, trong khi ấy vẫn còn những sợi đơn khác chưa hồi tính. Với kỹ thuật trên, sẽ được tách riêng ra sợi đơn và sợi kép.

Như trên đã nói, dùng quang phổ kế sẽ tính được tỷ lệ phần trăm các phân tử ADN mới được lai. Nitrocellulose cũng có những đặc tính như đã nêu ở trên và các màng lọc nitrocellulose có thể cũng được dùng để tách các sợi ADN kép khỏi sợi đơn.

D. ENZYM GIỚI HẠN VÀ KỸ THUẬT CẮT ĐOẠN ADN

I. KHÁI NIỆM

Nhờ có enzym giới hạn (restriction enzym, RE), các vi khuẩn có thể cắt ADN của virus lây nhiễm vào mà không ảnh hưởng gì đến ADN của bản thân chúng.

Ở phần lớn các enzym cắt, các điểm (site) cắt đều là đối xứng nhau. Trình tự bazơ từ 5' → 3' trên một mạch ADN giống với trình tự bazơ từ 5' → 3' trên mạch bổ sung.

Vì mỗi enzym giới hạn đều cắt ADN tại một site cắt đặc thù cho enzym ấy, nên số lượng các điểm cắt trên từng phân tử ADN là phụ thuộc thời gian enzym này có mặt ở ADN ấy.

Trong một số trường hợp, cùng một site cắt lại được nhận biết và cắt bởi nhiều enzym từ các vi khuẩn khác nhau, được gọi là isochizomer (iso: cùng, schizo : cắt). Có mối quan hệ rõ nét giữa số lượng các cặp nucleotid trong site cắt với tần số điểm cắt của ADN.

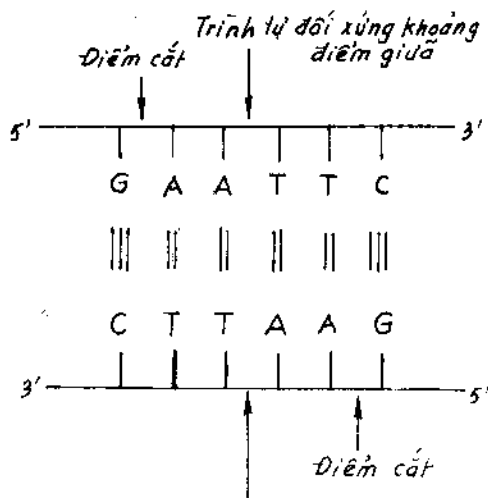
Một enzym nhận biết đoạn cắt 4 cặp nucleotid sẽ có tần số cắt lớn hơn enzym nhận biết đoạn cắt 6 cặp nucleotid.

$$\left(\frac{1}{256} \text{ so với } \frac{1}{4096} \right)$$

$$\left(\frac{1}{4} \right)^4 \quad \left(\frac{1}{4} \right)^6$$

Enzym giới hạn có 3 nhóm: I, II, III tùy đặc tính cắt; nhóm II được sử dụng rộng rãi nhất, nhóm duy nhất được sử dụng trong các thao tác sinh học phân tử. RE có khả năng cắt ADN thành nhiều đoạn trọng lượng phân tử và kích thước khác nhau.

• *Nhóm RE I*. Khi enzym nhận biết được trình tự, sẽ di chuyển trên



phân tử ADN đến cách đó khoảng 1000-5000 nucleotid và giải phóng khoảng vài chục nucleotid.

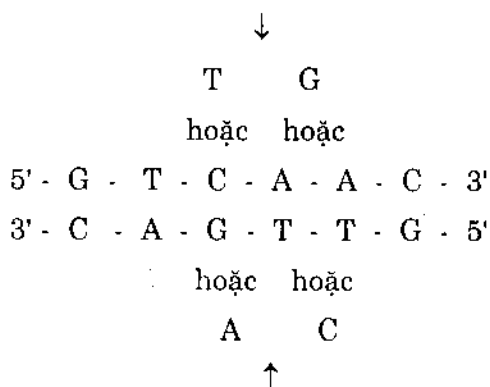
- **Nhóm RE II.** Enzym nhận biết được trình tự và cắt ngay ở vị trí ấy.

- **Nhóm RE III.** Enzym nhận biết một trình tự và cắt ADN ở vị trí cách đó khoảng 20 nucleotid.

II. CÁC KIỂU CẮT CỦA ENZYM GIỚI HẠN

1. Một enzym giới hạn đầu tiên

Enzym này được đặc trưng bởi site giới hạn dưới đây, gọi là Hind II tách từ vi khuẩn *Haemophilus influenzae*. Năm 1970, Hamilton Smith đã xác định site giới hạn này như sau:

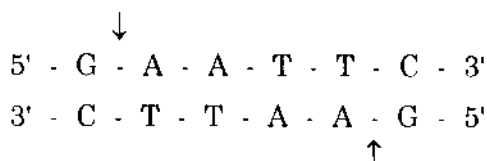


Mũi tên chỉ site cắt. Chú ý tính đối xứng của site. Các đầu tận cùng 3' của hai sợi là giống nhau, cũng như các đầu 5'.

Smith phát hiện sự sửa đổi của site do methyl hóa adenin, một bazơ được di chuyển từ site bị cắt.

2. Một enzym giới hạn thứ hai

Enzym này tách các đầu dính (adhesive ends), là ECoRI chiết từ *E.coli*



Ta cần chú ý đến tính đối xứng của site. Các chỗ cắt của ADN do EcoRI làm tách ra các đầu tận cùng sau:



Dạng enzym giới hạn này là một công cụ quan trọng trong công nghệ ADN tái tổ hợp. Các đầu dính lại được nối lại cùng nhau, nếu cùng 1 enzym giới hạn được dùng để cắt ADN từ hai nguồn khác nhau, ví dụ như từ hai loài, thì mọi ADN bị cắt đều sẽ có cùng các dạng đầu dính như nhau.

Với thao tác này, người ta bổ sung một đoạn nucleotid adenin vào một sợi ADN thuộc một nguồn này và một đoạn nucleotid thymidin vào một sợi ADN thuộc một nguồn khác.

Theo cách này, đầu dính - A - A - A - sẽ kết hợp một cách tự nhiên với đầu dính - T - T - T -. Bằng phương pháp này, các phân tử ADN tái tổ hợp giữa hai loài bất kỳ có thể được sinh ra trong ống nghiệm. Với các công trình về enzym giới hạn, đã có nhiều giải Nobel, như cho Hamilton Smith, Werner Arber, David Nathans.

Ngoài vai trò trong kỹ thuật di truyền, enzym giới hạn còn là một phương tiện để phân tích tổ chức của ADN. Chúng đặc biệt được sử dụng đối với sinh vật bậc cao, trong đó hàm lượng ADN quá lớn là một khó khăn trong việc xác định được từng vùng của ADN.

Các enzym giới hạn khác nhau có thể được dùng để cắt các site khác nhau nhưng rất đặc thù, cắt ADN thành các đoạn rất đặc thù và có khả năng tái sinh. Khi một đoạn nào đó của ADN đã được xác định, người ta có thể phân lập và nghiên cứu.

Một phương pháp để xác định là dùng mẫu dò (probe) ADN. Theo kỹ thuật này, quá trình được tiến hành qua các bước, làm tinh khiết sản phẩm *m*-ARN của một gen và tạo ra một bản sao ADN đánh dấu phóng xạ (cADN) từ *m*-ARN với enzym sao mã ngược. Bản sao cADN đánh dấu là mẫu dò đối với gen mà từ đó đã sản ra *m*-ARN, bởi vì mỗi sợi là bổ sung với một sợi của ADN ban đầu.

Bằng cách làm biến tính và hồi tính đồng thời mẫu dò cADN và đoạn giới hạn của ADN mang gen nghiên cứu, các sợi bổ sung của cả hai sẽ được lai nhau. ADN lai này có thể được xác định bằng dấu phóng xạ do mẫu dò cung cấp. Cũng cần nhắc lại phát hiện lịch sử của S.Luria

trên *E.coli* B/4 nhiễm phage T₂, cho thấy *E. coli* B/4 có enzym giới hạn, cắt ADN của T₂ từ đó T₂ không có khả năng phát triển tiếp sau khi xâm nhập.

2.3. Tóm lại

Tính chất chung, chức năng di truyền của RE là bảo vệ vi khuẩn, chống lại các phage và có đặc hiệu vị trí, có khả năng nhận biết và cắt các ADN tương ứng tại các site đặc hiệu cho ra các đầu dính có trình tự nucleotid đặc trưng.

III. ỨNG DỤNG ENZYM GIỚI HẠN

1. Tạo ADN tái tổ hợp

2. Nghiên cứu các hệ gen

- Lập bản đồ một số hệ gen: như bản đồ gen Φ X174, SV 40

3. Dùng enzym cắt chẩn đoán bệnh trong y học

Phương pháp này dùng để phát hiện bệnh di truyền.

- Một số đột biến di truyền ảnh hưởng đến các điểm dành cho enzym cắt giới hạn

- Phân biệt được kiểu gen bình thường (kiểu đại) với các gen đột biến bằng cách:

- + Cắt "mẫu ADN" của hệ gen bằng enzym giới hạn thích hợp.
- + Phân tách các đoạn ADN trên gen điện di (qua độ dài ngắn khác nhau của các đoạn).
- + Chuyển các đoạn lên màng lọc.
- + Cho lai với mẫu đánh dấu (probe) thích hợp (dùng ARN), như đánh dấu phóng xạ (thường là 32p).
- + Ảnh phóng xạ tự ghi cho thấy vị trí các dòng ADN bổ trợ với mẫu ARN.
- + Các dòng này được tách ra để nghiên cứu.
- + Chọc ối, lấy tế bào phôi, và phân tích chẩn đoán như trên, phát hiện các khác biệt trong mẫu xử lý enzym giới hạn.

4. Tính chất rất đặc hiệu của enzym cắt

Enzym này được sử dụng để tìm hiểu mối quan hệ di truyền, nguồn gốc các quần thể.

Bảng V.1. Đặc điểm một số enzym giới hạn

	Tên enzym	Cách đọc	Vi khuẩn mang enzym	Đoạn nhận biết và vị trí cắt
Enzym có đoạn cắt 6 cặp nucleotid	Bam HI	"bam-H-một"	<i>Bacillus amyloliquefacien</i> H	↓ 5' GGATCC 3' 3' CCTAGG 5' ↑
	Eco RI	"echo-R-một"	<i>E.coli</i> RY 13	↓ GAATTC CTTAAG ↑
	Hind III	"hin-đ-ba"	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	↓ AAGCTT TTCGAA ↑
Enzym có đoạn cắt 4 cặp nucleotid	Hae-III	"hay-ba"	<i>Haemophilus egyptius</i>	↓ GGCC CCGG ↑
	Sau 3A	"sow-ba-A"	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A	↓ GATC CTAG ↑
	Not I	"not-một"	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	↓ GCGGCCGC CGCGGCGC ↑

E. PHƯƠNG PHÁP PCR

PCR (polymerase chain reaction) đầu tiên được sử dụng năm 1985, do Karl Mullis. Đây là kỹ thuật *in vitro* cho phép nhân nhanh một gen mong muốn lên hàng triệu lần trong một thời gian ngắn (tạo dòng *in vitro*, không cần hiện diện của tế bào). Người ta có thể khuếch đại số lượng bản sao của một trình tự ADN đích, nhân *in vitro* một vùng ADN

nằm giữa hai vùng trình tự ADN đã biết khoảng 100 lần thông qua nhiều chu kỳ gồm ba bước:

- biến tính ADN;
- bắt cặp với mỗi;
- tổng hợp mạch mới nhờ ADN polymeraza;

Có thể xác định trực tiếp trình tự một ADN được khuếch đại bằng PCR thông qua tạo dòng. PCR có ưu thế, phân tích với lượng vật chất di truyền cực nhỏ (sợi tóc, vệt máu khô...) được dùng vào mục đích khác nhau của nông nghiệp, y học, và các ngành khoa học khác.

CÁC YẾU TỐ CẦN THIẾT TRONG PCR

Đoạn khuôn (template) - ADN mẫu

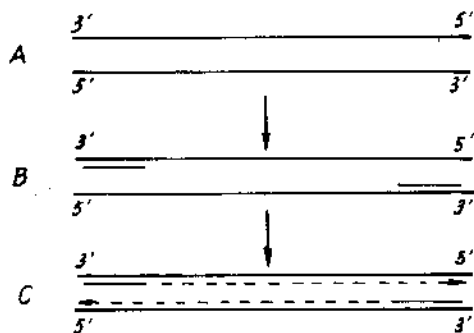
- Có thể là mạch đơn hay mạch đôi của chuỗi ADN hoặc ARN thường dài hơn 300 bp, được biết trước trình tự ở hai đầu, để thiết kế mỗi.

PCR được hình thành dựa vào đặc tính sau đây của ADN polymeraza:

- Mỗi có khả năng bắt cặp bổ sung với một đầu của mạch khuôn và ADN - polymeraza sẽ nối dài mỗi để hình thành mạch mới.

- Nếu ta cung cấp 2 mỗi chuyên biệt bắt cặp bổ sung với 2 đầu của một trình tự ADN ta sẽ chỉ tổng hợp đoạn ADN nằm giữa 2 mỗi (h.V.1).

PCR có phản ứng khuếch đại tối ưu xảy ra trên ADN thật tinh sạch, nhưng nhiều kỹ thuật chẩn đoán bằng PCR vẫn đạt kết quả tốt với ADN thu nhận trực tiếp từ dịch tế bào. Lượng ADN mẫu có thể giảm ($1\text{ }\mu\text{g} \rightarrow 100\text{ }\mu\text{g}$) nếu sử dụng các polymeraza hiệu quả cao.



Hình V.1. Một chu kỳ PCR

- A: Biến tính
B: Bắt cặp mỗi (lại)
C: Kéo dài (elongation): tổng hợp mới

Giảm lượng mẫu ADN ban đầu còn có lợi:

- Hạn chế các khuếch đại "kỳ sinh", tạo các sản phẩm phụ không mong muốn.

- Ưu thế PCR: cho phép khuếch đại cả các mẫu ADN không bảo quản tốt, đã bị phân hủy từng phần (vết máu lâu ngày, tinh dịch khô, hóa thạch, tóc, móng tay người chết...).

Mặc dầu kích thước ADN khuôn không phải là yếu tố quan trọng, nhưng nếu dùng ADN hệ gen có phân tử lượng cao, người ta thường cắt thành từng đoạn nhỏ hơn bằng enzym giới hạn như NotI hay Sfi I.

- Thông thường lượng ADN làm khuôn cho một phản ứng nên:

 - < 1 microgram đối với ADN tổng số.

 - < 1 nanogram đối với ADN tách dòng.

Đoạn mồi

- Đoạn mồi (primer) là chỉ tiêu quan trọng nhất để đạt khuếch đại đặc trưng và có hiệu quả cao. Chọn mồi là giai đoạn quyết định của PCR, phải tuân thủ một số nguyên tắc:

- Mồi gồm một mồi xuôi (sens primer) và một mồi ngược (antisens primer). Xuôi và ngược là so với chiều sao mã của gen.

- Trình tự của mồi được chọn sao cho không thể có sự bắt cặp bổ sung giữa mồi xuôi và mồi ngược và không có bắt cặp bổ sung giữa các phần khác nhau của một mồi (trình tự của chúng không được hỗ trợ cho nhau).

- Tm của mồi xuôi và mồi ngược không cách nhau xa.

- Mồi chọn phải đặc trưng cho trình tự ADN cần khuếch đại, không trùng với các trình tự lặp lại trên gen. Trình tự nằm giữa hai mồi xuôi và mồi ngược không quá lớn. PCR sẽ tối ưu trên những trình tự < 1 kb.

Nói cụ thể hơn: mồi là những đoạn oligonucleotid, mạch đơn, dài 6 - 100 bp, có trình tự bổ sung với trình tự bazơ của hai đầu đoạn khuôn để khởi đầu quá trình tổng hợp ADN. Mồi cần mang tính đặc thù, để tăng tính đặc hiệu của phản ứng. Mồi càng dài, khả năng tổng hợp chính xác đoạn ADN đích càng lớn. Số lượng 4 loại bazơ nitơ trong mồi nên xấp xỉ nhau, tránh những vùng trình tự không bình thường, như polypurin

hoặc polypyrimidin hay trình tự lặp đi lặp lại.

Các nucleotid (dNTP)

- Là hỗn hợp 4 loại dATP, dTTP, dGTP, dCTP, làm nguyên liệu cho phản ứng tổng hợp ADN. Ngoài ra, có thể sử dụng một số nucleotid đã được thay đổi như gắn thêm biotin hoặc dioxigenin..., tùy thuộc mục đích sử dụng sản phẩm PCR.

Nồng độ dNTP thường dùng khoảng 100 μM (20 - 200 μM mỗi chuỗi nucleotid). Tuy nhiên, với nồng độ thấp (10 - 100 μM) thì Tag ADN polymeraza (*Thermus aquaticus*) hoạt động chính xác hơn. Nồng độ cao dễ xảy ra khuếch đại kỳ sinh. Hơn nữa, nồng độ tối ưu của chúng phụ thuộc rất nhiều yếu tố như (phải xác định cho từng phản ứng qua nhiều thử nghiệm):

- Nồng độ MgCl_2 , nồng độ ion Mg^{++} .
- Nồng độ đoạn mồi.
- Độ dài sản phẩm được khuếch đại.
- Số chu kỳ phản ứng PCR

Sự mất cân bằng trong thành phần các nucleotid làm tăng lỗi sao chép của polymeraza.

Enzym ADN polymeraza chịu nhiệt

Giai đoạn đầu của PCR, enzym được sử dụng là đoạn klenow của ADN polymeraza I. Enzym này không chịu nhiệt, nên thao tác phức tạp và hiệu quả thấp. Phải thêm enzym mới vào phản ứng sau mỗi lần biến tính vì enzym cũ đã bị nhiệt phân hủy. Nhiệt độ lai hạ thấp khiến sự khuếch đại kỳ sinh xảy ra cao.

Giai đoạn sau này đã có cải tiến:

- Vì phản ứng PCR có giai đoạn cần nhiệt độ cao tới 90°C, nên phải sử dụng loại enzym ADN polymeraza bền vững với nhiệt độ cao. Người ta đã phát hiện một ADN polymeraza chịu nhiệt, được tách chiết từ một vi khuẩn suối nước nóng *Thermus aquaticus*, nước suối nóng 94°C - 100°C (Tag polymerase)

Tag ADN polymeraza không bị phá hủy ở nhiệt độ cao, nhiệt độ biến tính và xúc tác sự tổng hợp từ đầu đến cuối quá trình phản ứng. Tag ADN polymeraza có trọng lượng phân tử 94 kDa, có hoạt tính 5' - 3' exonucleaza và hoạt động tốt nhất ở 70°C - 80°C. Trong 1 giây, trung bình nó gắn được 75 nucleotid. Ngoài ra, còn một số enzym đáp ứng yêu cầu trên như VentTM ADN polymeraza, Pfu ADN, UIT maTM ADN.

- Ngày nay nhiều polymeraza chịu nhiệt khác đã sử dụng với chức năng chuyên biệt hay hoàn thiện hơn như Tth polymeraza, tách từ *Thermus thermophilus*, có khả năng hoạt động như một enzym sao mã ngược khi có mặt ARN khuôn và ion Mn⁺⁺.

Nhưng khi có ADN khuôn và ion Mg⁺⁺, Tth pol lại xúc tác phản ứng khuếch đại ADN. Enzym này cho phép khuếch đại bản mẫu là ARN thông qua sự hình thành cADN.

Dung dịch đệm

Thành phần dung dịch đệm (buffer) có thể thay đổi tùy loại enzym được sử dụng, quan trọng nhất là ion Mg⁺⁺. Nó hình thành một phức hợp hòa tan với dNTP, rất cần cho quá trình liên kết các dNTP, xúc tác cho enzym polymeraza, làm tăng nhiệt độ nóng chảy (T_m) của ADN mạch kép.

Nồng độ MgCl₂ trong hỗn hợp phản ứng cuối cùng biến đổi từ 0,5 - 5,0 mM, nồng độ tối ưu là 1 - 1,5 mM. Trong một số trường hợp, nồng độ này có thể thay đổi.

Nồng độ MgCl₂ có ảnh hưởng lớn tới hiệu quả và tính đặc thù của phản ứng. Ngoài Mg⁺⁺, còn một số chất như AMSO, DMSO, formamide được thêm vào nhằm tạo sản phẩm PCR có kích thước lớn.

Số lượng chu kì của phản ứng PCR

Trong thực tế, không vượt 40 chu kì cho một phản ứng, vì phản ứng PCR diễn ra qua hai giai đoạn:

- Giai đoạn đầu: Số lượng bản sao tăng theo cấp số nhân, tỉ lệ với lượng mẫu ban đầu.

- Giai đoạn sau đó, hiệu quả khuếch đại giảm hẳn do:

- + Phân hủy và cạn kiệt các thành phần của phản ứng.

- + Xuất hiện các sản phẩm phụ ức chế phản ứng.
- + Các bản sao vừa tổng hợp không kết hợp với mẫu mà lại bắt cặp nhau.
- Số chu kì phản ứng tùy thuộc số lượng bản mẫu ban đầu
- + Số bản mẫu là 10^5 thì cần 25-30 chu kì.
- + Số bản mẫu $10^2 - 10^3$ thì số chu kì phải là 35-40.

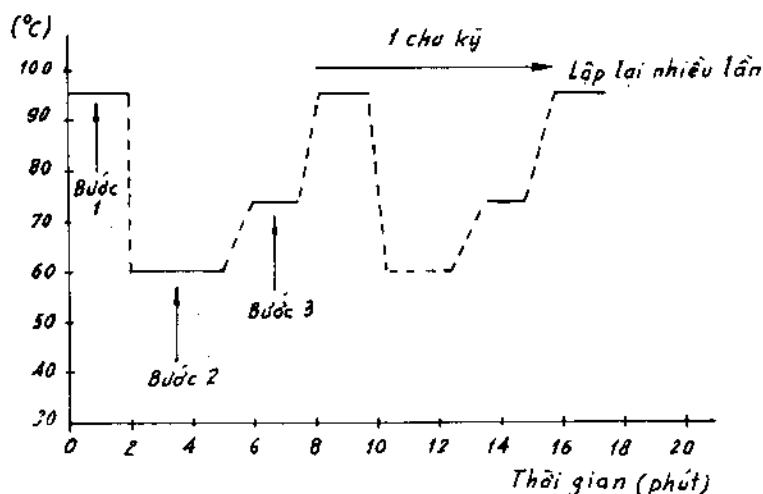
Thiết bị và dụng cụ cho PCR

Cần đáp ứng yêu cầu thay đổi nhiệt độ thật nhanh và chính xác, tránh tối đa sự bốc hơi nước, có thể tiến hành PCR ngay trên mô và tế bào.

Mỗi kiểu thiết bị có đặc điểm khuếch đại riêng nên mọi thí nghiệm của một nghiên cứu cần tiến hành trên cùng một loại. Ống nghiệm dùng của một nghiên cứu phải cùng một kiểu vì đặc tính truyền nhiệt của các ống cũng như nhiệt độ tiếp xúc giữa ống và bộ phận tỏa nhiệt của thiết bị có ảnh hưởng lớn đến quá trình khuếch đại.

Diễn biến một chu kỳ PCR

Gồm 3 bước (h.V.2.)



Hình V.2. Quá trình thay đổi nhiệt độ trong phản ứng PCR

Bước 1. Giai đoạn biến tính (denaturation)

ADN được biến tính ở nhiệt độ cao hơn T_m của phân tử, thường là $94^{\circ}\text{C} - 95^{\circ}\text{C}$ trong 30 giây - 1 phút ($93^{\circ}\text{C} - 100^{\circ}\text{C}$).

Nếu tỷ lệ $G + C > A + T$ thì nhiệt độ càng phải cao.

Bước 2. Giai đoạn lai (hybridization)

Nhiệt độ được hạ thấp (thấp hơn T_m của các môi) cho phép các môi bắt cặp với khuôn.

Nhiệt độ này dao động $40^{\circ}\text{C} - 70^{\circ}\text{C}$ ($37^{\circ}\text{C} - 75^{\circ}\text{C}$) tùy thuộc T_m của các môi sử dụng và kéo dài 30 giây - 1 phút.

Bước 3. Giai đoạn tổng hợp, kéo dài (elongation)

Nhiệt độ tăng lên 72°C ($72^{\circ}\text{C} - 75^{\circ}\text{C}$) enzym Tag ADN polymeraza hoạt động, quá trình tổng hợp ADN diễn ra trên những đoạn có môi gắn vào. Thời gian tùy độ dài của trình tự ADN cần khuếch đại.

Sau mỗi chu kỳ, giai đoạn 72°C được tăng thêm từ 1" - 2", vì lượng primer ngày càng giảm, trong khi lượng ADN làm khuôn càng tăng, hơn nữa enzym polymeraza hoạt động ngày càng kém do tác động nhiệt độ.

Ở vòng cuối cùng, giai đoạn này được tăng thêm vài phút để tất cả các mạch ADN nếu bị tổng hợp thiếu hụt sẽ được tổng hợp hoàn toàn. Sau mỗi vòng, lượng ADN đó lại tăng lên gấp đôi, sau n vòng sẽ có 2^n phân tử ADN. Phải tính toán và dự đoán trước lượng ADN cần tổng hợp để cho lượng primer vào phù hợp (thường 10^6 phân tử ADN, cần 10^5 phân tử primer).

Ưu điểm của PCR và ứng dụng

Chỉ cần thời gian ngắn (vài giờ) đã cho một lượng ADN lớn.

1. Dùng xác định sự có mặt của gen trong tế bào với độ chính xác cao.

2. Tạo mẫu dò

- Sản xuất nhanh một lượng lớn mẫu dò đánh dấu, khi thực hiện phản ứng với cặp môi chuyên biệt và các nucleotid đánh dấu.

3. Khuếch đại số lượng các ARN

- Do Tag polymeraza không hoạt động trên ARN nên người ta sử

dụng kỹ thuật phối hợp với RT - PCR (reverse transcriptase - PCR)

- Trước hết, ADN được chuyển thành cADN nhờ enzym sao mã ngược. Mỗi sử dụng trong giai đoạn này có thể là mỗi 'ngược' của PCR giai đoạn sau, có thể là oligonucleotid ologodT (để bắt cặp với đuôi poly A của các mạch mARN) mà cũng có thể là các hexanucleotid (trình tự gồm 6 nucleotid) bắt cặp ngẫu nhiên với một trình tự ngắn trên ARN. Sau đó cADN được khuếch đại nhờ Tag polymeraza. Cũng có thể sử dụng Tth polymeraza cho cả hai giai đoạn

4. Định lượng so sánh một sản phẩm thu nhận từ nhiều nguồn gốc khác nhau

Kỹ thuật RT - PCR cho phép nghiên cứu các mARN tồn tại với hàm lượng rất thấp, không thể phát hiện bằng các phương pháp cổ điển như Northern blot.

5. PCR có thể giúp phân biệt được gen đột biến do mất đoạn (deletion), thêm đoạn (insertion) hay đột biến điểm (point mutation)

6. Dùng để định lượng so sánh bằng cách cho tiến hành khuếch đại đồng thời trình tự đích và một trình tự chứng có nồng độ đã biết.

Kỹ thuật *in situ* RT - PCR

Là kỹ thuật mới phát triển, cho phép khuếch đại các ARN, ngay trên mô và tế bào, được tiến hành trên lát cắt mô, tế bào, cố định trên lame. Trong thiết bị *in situ* PCR cũng dùng để khuếch đại trực tiếp một trình tự ADN từ lát cắt mô và tế bào.

Thu nhận kết quả

Sản phẩm ADN thu được qua PCR có thể được phân tích bằng điện di (như các gel agarose, 1% agarose pha với ethidium bromid 0,5 µg/ml). Sau đó, đem quan sát trên đèn cực tím UV.

Dùng ADN của thực khuẩn thể lambda, được cắt bởi enzym giới hạn Hind III làm chuẩn để so sánh và ước đoán số cặp bazơ của các phân tử ADN được nhân.

F. GIẢI TRÌNH TỰ NUCLEOTIT TRONG ADN

1977, Frederick Sanger, lần đầu tiên giải được trình tự nucleotit của một genom hoàn chỉnh của thực khuẩn thể ϕ X174, và được giải Nobel về công trình này năm 1980. Ngay sau đó một thời gian ngắn, sau khi giải được trình tự ϕ X174, các nhà di truyền đã thông báo tiếp về kết quả giải trình tự một đoạn nucleotit hoàn chỉnh trong ADN (sequencing) của virus Simian 40 (SV 40).

Sự phát triển của kỹ thuật di truyền (genetic engineering) cắt phân tử ADN thành các đoạn nhỏ hơn và tạo dòng nó (cloning) thành vô số bản sao, về nguyên tắc là đã cho phép có thể xác định trình tự của bất kỳ một gen nào tách ra.

Allan Maxam và Walter Gilbert đã đoạt giải Nobel cùng Sanger về thành tựu đưa ra một phương pháp giải trình tự ADN.

Sau đây là phương pháp tiếp theo sau đó tạo được một tập hợp các đoạn ADN giống nhau bằng enzym giới hạn (restriction enzym) và được đánh dấu tại một đầu bằng tách ra một photphat và thay vào đấy là một phóng xạ. Sau đó hỗn hợp các ADN đánh dấu giống nhau được tách ra thành 4 phần riêng biệt. Mỗi phần được xử lý về mặt hóa học khác nhau để cho chỉ một bazơ như C (cytosine) chẳng hạn, bị tác động và sợi ADN bị cắt ở vị trí ấy. Quyết định trong phương pháp này là kỹ thuật xử lý hóa học được điều khiển để sao cho không phải mọi bazơ trên sợi ADN đều bị tác động và những C bị tác động cũng là theo tính chất ngẫu nhiên. Ví dụ, giả thiết có một đoạn 10 nucleotit, trong đó bazơ ở đầu 5' được đánh dấu phóng xạ, biểu thị bằng khoanh tròn (trên hình)

5' (G) - A - T - C - A - G - C - T - A - G 3'

C bị cắt ngẫu nhiên, dẫn tới kết quả sau:

(G) - A - T - C - A - G

T - A - G

(G) - A - T

A - G - C - T - A - G

Hỗn hợp các đoạn nucleotit trên đây được đặt lên một gel và cho chạy điện di, sẽ được tách nhau ra, do chiều dài tương đối của chúng khác nhau. Đoạn ngắn hơn sẽ di chuyển trên gel xa hơn so với đoạn dài

hơn. Vị trí các đoạn phóng xạ di chuyển có thể được dễ dàng xác định qua đánh dấu phóng xạ, sẽ cho ta biết số nucleotit chứa trong đoạn đánh dấu.

Cũng phương pháp này, lặp lại đối với 4 bazơ sẽ cho ra một thang các đoạn, từ đó có thể dễ dàng đọc trực tiếp trình tự các nucleotit trên các vạch.

1. LAI PHÂN TỬ ADN

Phương pháp lai phân tử ADN cho phép ước tính được mức độ giống nhau về các đoạn bazơ của ADN giữa các loài khác nhau. Thông thường, ADN một loài này được đánh dấu bằng chất đồng vị, trộn với ADN một loài thứ hai, biến tính, ủ trộn sẽ được hình thành ADN lai từ 2 loài. Sự hình thành các phân tử ADN lai này được phát hiện qua tính chất của đồng vị. Mức độ lai phụ thuộc sự giống nhau của các đoạn bazơ trong ADN của 2 loài.

1. Phương pháp phát hiện sự có mặt của gen qua lai phân tử

1.1. Phương pháp lai axit nucleic (Southern blotting)

Đây là kỹ thuật chuyển và cố định ADN đã biến tính từ gel agarose lên màng lai do Southern, 1975 thường dùng để chỉ cả công đoạn lai ADN trên với mẫu dò. ADN vẫn giữ được vị trí tương đối của nó.

- Nguyên lý là: với ưu thế, phát hiện gen lạ ngay cả khi chỉ có một vài bản sao (copy).

- Thẩm thấu: dung dịch đệm từ phía dưới được thấm lên trên do mao dẫn, kéo theo ADN trong gel di chuyển lên màng.

- Cấu trúc đặc biệt của màng giữ lại ADN mà vẫn cho dung dịch đệm đi qua (giấy bắt ADN).

- Hai loại màng thông dụng:

 - + Màng nylon

 - + Màng nitrocellulose

ADN được làm biến tính ngay trên gel, rồi chuyển lên màng lai nhờ

đó, có thể lai được mẫu dò theo nguyên tắc bổ trợ.

- ADN trước khi chuyển lên màng, được depurinate nhằm cắt gãy những đoạn lớn hơn để chuyển dễ dàng lên màng.

- Sau khi chuyển lên màng, ADN được cố định lên màng bằng tia UV, được lai với mẫu dò đánh dấu phóng xạ.

- Sau quá trình lai, người ta rửa màng lai để loại các mẫu dò không bắt cặp chuyên biệt với ADN cố định trên màng.

- Dùng kỹ thuật phóng xạ tự ghi để định vị các phân tử lai (ADN bộ gen + mẫu dò).

- Đặt một phim nhạy cảm với tia áp sát màng lai. Các phân tử lai (có mẫu dò đánh dấu phóng xạ) tác động lên phim, thành chấm đen trên phim. Mẫu dò (ADN probe) là đoạn ADN được đánh dấu trước khi đem lai.

1.2. Có hai phương pháp đánh dấu

Có hai phương pháp đánh dấu là dùng đồng vị phóng xạ (radioactive) và không dùng đồng vị phóng xạ (non-radioactive).

Dùng đồng vị phóng xạ P^{32} được sử dụng nhiều. Có mặt hạn chế là: gây hại, nhiễm độc, khó bảo quản. P^{32} có thời gian bán rã ngắn (14 ngày), do đó probe không thể dùng lại. Phải đánh dấu probe cho mỗi lần lai.

Không dùng đồng vị phóng xạ: dùng dioxigenin, biotin, hóa chất huỳnh quang: không nguy hiểm, dễ tồn, có hiệu quả hơn. Dioxygenin là một loại steroid, chiết từ lá, hoa cây họ Mao địa hoàng (*Digitalis purpurea*) liên kết với dUTP tại vị trí số 5 trong vòng pyrimidine qua 11 cầu nối carbon, tạo thành phức hợp Dig-dUTP. Với nguyên liệu dNTP có Dig - dUTP dưới sự xúc tác của enzym klenow ADN polymeraza, mẫu dò sau khi được biến tính sẽ tổng hợp mạch bổ trợ có chứa Dig- dUTP.

Như vậy chúng được đánh dấu, đem lai với ADN trên màng. Từ khay, dung dịch đệm được hút lên bởi lớp giấy thấm Whatman dày, di chuyển theo lực mao dẫn lên phía trên. Khi đi qua gel agarose, dung dịch đệm sẽ kéo theo axit nucleic và chuyển chúng lên màng lai.

Hiện nay, ngoài kỹ thuật chuyển nhờ lực mao dẫn (như trên) còn có

kỹ thuật chuyển nhờ dòng điện và chuyển trong chân không, có hiệu quả cao hơn nhưng đòi hỏi kỹ thuật đặc biệt.

1.3. Ứng dụng của phương pháp lai axit nucleic

- Lập bản đồ giới hạn của một gen
- Phát hiện đa dạng trình tự (fragment polymorphism) của cùng một gen ở các chủng hay các cá thể khác nhau, qua so sánh bản đồ giới hạn của chúng.
- Phát hiện đột biến mất đoạn, đột biến điểm, tái tổ hợp trên một gen, vì chúng làm thay đổi bản đồ giới hạn.

2. Phương pháp Northern blot

Northern blot là phương pháp xác định kích thước và hàm lượng một mRNA đặc trưng trong một hỗn hợp ARN; là phương pháp chuyển và cố định ARN từ gel agarose lên màng lai; theo nghĩa rộng, là cả công đoạn lai ARN cố định trên màng lai với mẫu dò.

Các bước:

- ARN (đã được biến tính) được phân tích theo kích thước nhờ điện di trên gel agarose, có chứa các chất làm biến tính.

- Các chất làm biến tính có tác dụng làm các liên kết yếu quy định cấu trúc bậc hai của ARN không thể hình thành trở lại, sau khi ARN đã biến tính, do đó không cản trở sự di chuyển và sự phân tách các ARN trong gel.

- Chuyển ARN lên màng lai. ARN cố định trên màng lai, được đem lai với mẫu dò có đánh dấu phóng xạ

- Các phân tử lai được phát hiện nhờ phóng xạ tự ghi.

Kiểm tra sự có mặt sản phẩm protein của gen biến nạp

3. Phương pháp lai thăm protein - kỹ thuật Western blotting

Người ta điện di protein trên gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfat - polyacrylamid gel electrophoresis) để tách protein theo trọng lượng phân tử.

+ Thấm protein sang giấy bắt protein (nitrocellulose hoặc CCA-papier).

+ Lai với kháng thể đơn dòng, có đánh dấu phóng xạ- phản ứng dương tính nói lên sự có mặt của protein do gen lạ tổng hợp.

+ Có thể sử dụng kỹ thuật miễn dịch enzym (ELISA) hoặc miễn dịch phóng xạ (RIA) để phát hiện protein của gen lạ trong động vật.

H. DẤU VÂN ADN

Như ta đã biết, ADN mang thông tin di truyền đặc trưng cho loài, cho từng cá thể, rất ổn định suốt quá trình phát triển cá thể.

Trong khoa học hình sự, đối với con người, cũng như nếp vân tay, chỉ số ADN có tính chuyên biệt cá thể rất cao, được sử dụng trong tử thi pháp y di truyền học trong tàng thư ADN.

Chỉ số ADN có ưu thế hơn hẳn các chỉ tiêu kiểu thường dùng, như nhóm máu, kiểu protein huyết thanh, enzym hồng cầu, kiểu hemoglobin, hệ kháng nguyên bạch cầu người, HLA (human leucocyte antigens).

Xác suất để chỉ số ADN của 2 người hoàn toàn giống nhau còn thấp hơn 10^{-20} , vì thế dấu ấn ADN được di truyền rất ổn định (Jeffreys, 1980). Người ta có thể thu được dấu ấn ADN từ các vết máu, tinh dịch, từ các mẫu khô để hàng 4 năm vẫn còn hiệu quả (Jeffreys, 1986).

Phương pháp lấy dấu ấn ADN hay dấu vân ADN (DNA-fingerprint) là phương pháp chính xác hơn nhiều so với các phương pháp di truyền học truyền thống để xác định cá thể, mối quan hệ huyết thống, để chẩn đoán, phân tích các bệnh di truyền.

Bằng nghiệm pháp dấu ấn ADN (DNA-fingerprint) người ta đã phát hiện các tính trạng siêu đa hình (superpolymorphic) trên tiêu bản của từng người riêng rẽ rất sai khác nhau, chỉ trừ trường hợp đồng sinh cùng trứng (sinh đôi cùng trứng, monozygotic twins) (Vassart, 1987). Trong cùng một giống bò, người ta cũng qua phương pháp trên, phát hiện được đặc điểm riêng từng con.

Tính chất đa hình cũng đã được phát hiện trên ADN của ngựa, chó (Vassart 1987). Tính chất đặc thù của ADN được thể hiện rõ qua hiện tượng thực tế là hầu như mọi người đều có nét riêng, khác nhau về đặc điểm thành phần ADN (về bộ các băng được tách ra của ADN, qua điện di), đặc điểm riêng này được di truyền theo định luật Mendel.

Chỉ số ADN này có tính cá thể rất cao và được di truyền rất ổn định, có thể dễ nhận dạng từng con người cụ thể, để xác định mối quan hệ di truyền, quan hệ gia đình.

Ngày nay, chỉ số ADN đã được sử dụng không chỉ trong khoa học hình sự, để xác định tội phạm, tìm ra thủ phạm trong các vụ xảy ra do tệ nạn xã hội (cướp của, giết người, hiếp dâm,...) xác định quan hệ dòng máu, bệnh di truyền, chính xác hơn nhiều so với các phương pháp di truyền đã có trước đây, mà còn sử dụng trong các vụ tai nạn máy bay, hàng trăm nghìn người không còn nguyên xác, người ta cũng phải dùng đến phân tích chỉ số ADN để nhận ra nạn nhân cụ thể.

Một thủ phạm giết người, hiếp dâm, để lại chút ít dấu vết (như máu, tinh dịch, tóc v.v...) trên hiện trường nơi xảy ra hành động tội phạm, phân tích ADN từ các tế bào trên các mẫu nói trên, đều có thể xác định, tìm ra tội nhân..

Sử dụng các kỹ thuật hiện nay trong kỹ thuật di truyền, cắt đoạn, chạy điện di, khuếch đại bằng PCR (phản ứng chuỗi dùng polymeraza), v.v...người ta sẽ xác định được đặc thù và chỉ số từng ADN.

Kết quả phân tích điện di ADN của 9 người không có quan hệ gì với nhau, cho thấy ADN của mỗi người có đến trên 10 băng, nhưng không có bộ băng ADN nào giống nhau (h.V.3) trong số 9 bộ băng từ

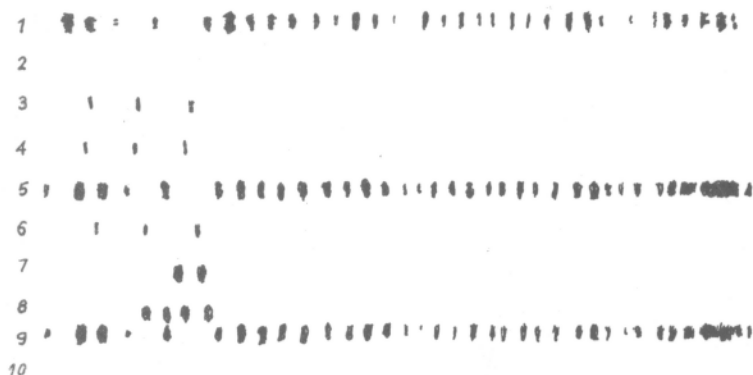


Hình V.3

Bộ băng ADN của 9 người không có quan hệ gì với nhau (từ số 1 đến 9) và của 2 người đồng sinh cùng trứng (số 10, 11).

số 1 đến 9, nhưng về hai bộ băng số 10 và 11 là của 2 người đồng sinh cùng trứng, thì lại giống nhau.

Người ta đã nêu lên tư liệu thực tế, dùng chỉ số các bộ băng ADN để xác định thủ phạm trong một vụ hiếp dâm. Có hai người đàn ông A và B thuộc diện bị tình nghi phạm tội, đã được lấy mẫu phân tích và đối chiếu với mẫu của người phụ nữ bị hiếp. Trong hình V.4, băng 1, 5 và 9 là ADN chỉ thị (marker DNA s), 2 là của ADN máu người bị tình nghi A, 3 là của ADN tách từ mẫu tinh dịch còn dính lại trên quần người phụ nữ, 4 là của ADN máu người bị tình nghi B, 6 là của ADN tách từ vết lau trong âm đạo người phụ nữ, 7 là của



Hình V.4. Kết quả xét nghiệm so sánh các dải băng ADN để tìm ra thủ phạm hiếp dâm.

1. ADN chỉ thị
2. Người bị tình nghi A
3. Tinh dịch (dính ở quần người phụ nữ)
4. Người bị tình nghi B
5. ADN chỉ thị
6. Vết lau âm đạo người phụ nữ
7. Nạn nhân (người phụ nữ bị hiếp dâm)
8. ADN chứng
9. ADN chỉ thị
10. Chứng: không có ADN

ADN máu người phụ nữ, 8 là của ADN chứng (control DNA), 10 là chứng không có ADN..

Qua phân tích thực nghiệm, hiện rõ trên kết quả khách quan, rõ ràng băng số 4 có các băng giống hệt băng số 3 ở tinh dịch còn dính lại trên quần người nữ và băng số 6 trong vết lau ở âm đạo người nữ- Xét nghiệm này khẳng định B là thủ phạm.

Chương VI

CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN ĐỘNG VẬT

A. KHÁI NIỆM CHUNG

I. CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN

Công nghệ di truyền (genetic technology) là giai đoạn phát triển cao nhất hiện nay của công nghệ sinh học (biotechnology), tiếp nối các giai đoạn công nghệ vi sinh, công nghệ tế bào.

H. A. Fitzhugh, 1983 và R. Frankham, M. R. Gillings đã nêu lên khái niệm chung về các lĩnh vực lý thuyết và ứng dụng thực tiễn của công nghệ di truyền. Như ta đã biết, trong các hướng công nghiệp hiện đại, điện tử, tin học, rôbốt, thì công nghệ sinh học có vị trí mũi nhọn trong toàn bộ cuộc cách mạng công nghệ những năm gần đây.

Công nghệ sinh học là lĩnh vực liên quan đến nhiều ngành khoa học tự nhiên: di truyền, hóa sinh, sinh lý, vi sinh và kỹ thuật, trong đó có kỹ thuật lên men, tự động hóa trong kỹ thuật sản xuất, công nghệ hóa học, vi sinh học v. v...

Có thể nêu khái niệm tóm tắt, công nghệ sinh học nói chung là lĩnh vực sản xuất trên quy mô công nghiệp, trong đó nhân tố tham trực tiếp và quyết định là các tế bào sống, nói cách khác, đây là lĩnh vực ứng dụng cơ sở sinh học hiện đại vào công nghiệp.

Ở đây, mỗi tế bào sống hoạt động như một lò phản ứng nhỏ, sử dụng tế bào sống để chuyển một chất này thành một chất khác, tạo ra sản phẩm nhờ các quá trình sinh học xảy ra trong tế bào sống. Tiềm năng trong các tế bào và tổ chức sống được dùng để tạo ra sản phẩm dùng trong kỹ nghệ.

Công nghệ vi sinh đã qua các giai đoạn công nghiệp lên men cổ

truyền, cho đến ngày nay là công nghiệp lên men hiện đại, đã và đang được ứng dụng rộng rãi, sản xuất kháng sinh, vaccin, axit amin, vitamin, enzym, dẫn tới phát triển hiện nay của thời đại enzym.

Công nghệ tế bào có lịch sử ra đời từ những năm 1930, với thành công đầu tiên của White, nuôi cấy mảnh mô thực vật trong môi trường nhân tạo. Có thể hình dung cụ thể khái niệm chung về công nghệ tế bào là từ các mẫu thân, lá, rễ, từ các tế bào đơn, tế bào trần (protoplast), từ hạt phấn, phôi v. v..., đem nuôi cấy trong ống nghiệm sẽ phát triển thành mô sẹo (callus), thành phôi soma, sau đó được tái sinh thành cây hoàn chỉnh. Công nghệ tế bào dẫn tới hiệu quả thực tiễn vô cùng lớn lao, nhân giống nhanh và kinh tế các giống quý, vượt xa phương pháp nhân giống tự nhiên, cổ truyền.

Công nghệ di truyền, hay còn gọi là *công nghệ sinh học hiện đại*, thực tế chỉ mới ra đời từ 1977, là lĩnh vực tổng hợp chung các kỹ thuật di truyền (genetic engineering). Trung tâm của công nghệ di truyền là **công nghệ ADN tái tổ hợp** (recombinant DNA technology), tổng hợp các kỹ thuật tái tổ hợp ADN, các kỹ thuật cụ thể, vi thao tác gen (micromanipulation), sửa đổi, phân lập gen (isolation of gene), thủy phân, cắt gen (bằng enzym giới hạn, restriction enzyme), dung hợp gen (gene fusion), chuyển ghép gen (transfer of gene), trực tiếp hoặc qua thể tải (vector).

Về kỹ thuật di truyền (genetic engineering), Rutledge, Seidel, 1983 đã định nghĩa, "kỹ thuật di truyền là các kỹ thuật dẫn tới khả năng biến đổi định hướng gen hoặc tần số kiểu gen của một quần thể, hoặc làm tăng về căn bản khả năng sinh sản của cá thể để góp phần nâng cao vốn gen và vốn hợp tử của quần thể". Kỹ thuật di truyền cũng chỉ mới ra đời từ những năm 1970, cũng có thể quy vào các thao tác gen, để điều chỉnh, sửa đổi hoặc tạo ra các gen mới, từ đó có thể tạo ra các cơ thể mới, theo các phương thức đặc biệt, phương thức "short-cutting" (cách làm tắt, đỡ tốn kém). Về vị trí, hiệu quả, tác dụng, người ta đã so sánh kỹ thuật di truyền, công nghệ di truyền với kỹ thuật điện tử, hạt nhân.

Với công nghệ di truyền, người ta đã có khả năng điều khiển và điều hòa, quá trình tái tổ hợp ADN, tạo nhiều sản phẩm có ích như hormon sinh trưởng, vaccin, các protein từ các vi khuẩn (chủ yếu từ *E.coli*), insulin, proinsulin, các độc tố cao cấp như botulinum (có botulin, chất gây ngộ độc thịt), nọc độc từ côn trùng, rắn v. v....

Nói chung, công nghệ di truyền, trong đó có kỹ thuật di truyền, có công nghệ ADN tái tổ hợp, dựa trên các thành tựu lý thuyết và thực nghiệm của sinh học phân tử, sinh học tế bào, đã cung cấp đủ tư liệu cho phép các nhà khoa học có thể điều chỉnh cấu trúc và chức năng hoạt động của các hệ thống sống trong vi sinh vật, cây trồng, vật nuôi.

Người ta xem đây là cuộc cách mạng xanh lần thứ hai, vào giữa những năm 70, có ưu thế là bỏ qua được lai chéo, không còn chỉ dựa trên lai hữu tính và thụ phấn chéo, vượt qua được hàng rào sinh học của các trường hợp lai khác loài, lai xa, khắc phục được sự tương khắc sinh dục (sexual incompatibility), làm tăng tính đa dạng di truyền (genetic diversity), tính đa dạng sinh học, đã bị giảm sút do tình trạng phá hủy sinh cảnh tự nhiên, giảm được sự đe dọa do sâu bệnh ở một số cây trồng có nền di truyền quá đơn thuần.

Ở đây, được sử dụng là các ADN tái tổ hợp, tức ADN được tạo ra từ các đoạn ADN thuộc các loài sinh vật hoàn toàn xa nhau và được tạo dòng trong các tế bào vi khuẩn.

II. CÔNG NGHỆ ADN TÁI TỔ HỢP

1. Kỹ thuật plasmid (plasmid engineering)

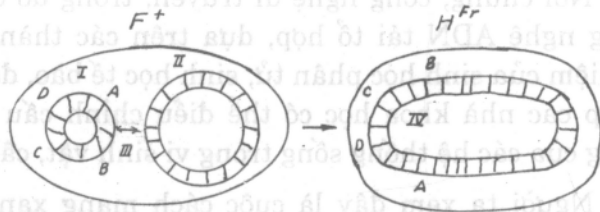
1.1. Khái niệm về plasmid

Plasmid là những cấu trúc di truyền nằm trong tế bào chất vi khuẩn, nằm ngoài nhiễm sắc thể, có khả năng tự sao một cách độc lập với nhiễm sắc thể. ADN của plasmid dạng vòng, mạch kép. Plasmid thường tái bản đồng thời với sự phân bào bằng cơ chế theta, gọi thế vì các phân tử tái bản giống như chữ Hylạp theta (θ). Tái bản bắt đầu từ một điểm mở đầu và đi theo hai chiều quanh vòng tròn, do đó còn gọi là tái bản hai chiều (bidirectional). Plasmid được truyền lại cho thế hệ sau ở một trong hai trạng thái:

- Độc lập trong tế bào chất hoặc
- Cài xen vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn theo cơ chế trao đổi chéo đơn như ở *E.coli* H^{Fr} các plasmid này được gọi là một episom (h.VI.1).

Yếu tố F ở *E.coli* là một episom. Khi đã gắn vào nhiễm sắc thể, nó không còn tái bản độc lập, mà được tái bản cùng nhiễm sắc thể vi khuẩn. Plasmid có khả năng cho ra những thế hệ sau, với các tính chất

đặc biệt, kháng chất kháng sinh và nguyên tố nặng. Các plasmid có ích thường mang gen kháng chất kháng sinh với những site enzym cắt giới hạn, có thể mang từ 2 đến 30 gen. Có khoảng 12 loại plasmid khác nhau đã được phát hiện ở *E.coli*.



Hình VI.1. Cơ chế xen cài của plasmid vào nhiễm sắc thể *E.coli* H^{Fr} qua trao đổi chéo đơn.

Năm 1973, lần đầu tiên người ta khám phá *in vitro* có sự kết hợp giữa một ADN lạ với ADN plasmid, khi cả hai loại ADN này đều bị cắt bởi cùng một loại enzym cắt giới hạn và sau đó được nối lại nhờ enzym ligaza T₄, tạo ra plasmid tái tổ hợp, mang ADN tái tổ hợp.

2. Vectơ tách dòng (cloning vector) và tách dòng ADN (cloning of DNA)

2.1. Có 3 loại vectơ chủ yếu

Các loại vectơ dùng để tách dòng các trình tự ADN trong tế bào vi khuẩn như sau:

- plasmid; thực khuẩn thể (bacteriophage); cosmid. Ba loại trên sai khác nhau về hai đặc điểm:
- cách thức thao tác để tách dòng một đoạn ADN;
- hàm lượng tối đa ADN có thể được tách dòng trong đó mỗi loại đều được thiết kế cấu tạo theo cách riêng trong các phòng thí nghiệm.

2.2. Vectơ tách dòng plasmid *E.coli*

Loại này có ba đặc điểm:

2.2.1. Đoạn ori cho phép plasmid tái bản trong *E.coli* vì nó cung cấp trình tự ADN được nhận biết bởi enzym tái bản của tế bào.

2.2.2. Một dấu chuẩn để chọn lọc (selectable marker) để phân biệt tế bào có plasmid với các tế bào không mang plasmid.

Một dấu chuẩn để chọn lọc thường dùng là gen Amp^R kháng ampicillin.

Khi cho biến nạp plasmid mang gen Amp^R vào một tế bào *E.coli* mẫn cảm ampicillin (Amp^S), vi khuẩn này sẽ trở nên kháng Amp. rất dễ nhận biết khi chúng vẫn mọc được trong môi trường có thêm ampicillin.

2.2.3. Các site cắt chỉ bởi 1 enzym giới hạn để gắn các trình tự ADN tách dòng.

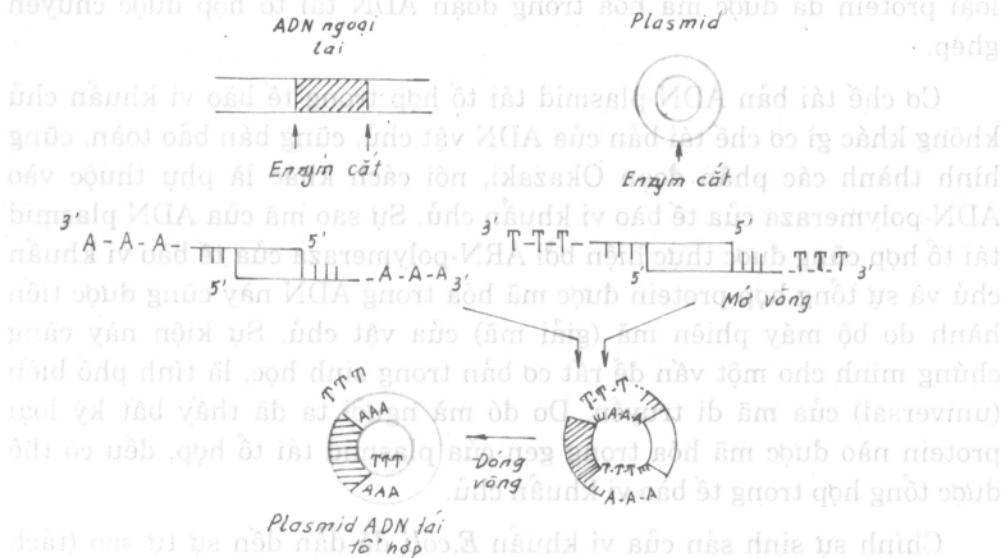
Tách dòng được thực hiện qua bước cắt plasmid tại một site nêu trên với enzym giới hạn tương ứng và gắn vào đó đoạn ADN được cắt bởi cùng loại enzym trên.

3. Plasmid tái tổ hợp

Một kỹ thuật đã thành công và quan trọng vào bậc nhất trong công nghệ di truyền là khả năng lắp ghép ADN lạ vào ADN vòng của plasmid. Để tách dòng (cloning) một đoạn ADN lạ, đoạn đó phải được dính vào vector tách dòng. Plasmid là loại vector tách dòng lý tưởng.

Có hai phương pháp để gắn ADN lạ vào plasmid:

- phương pháp sử dụng đầu dính;
- phương pháp tổng hợp các đầu bổ trợ ở cuối các phân tử ADN.



Hình VI. 2. Cơ chế hình thành plasmid tái tổ hợp.

Vấn đề lắp ghép, xen một ADN lạ vào ADN vòng của plasmid phụ thuộc vào hoạt động của endonucleaza cắt giới hạn. Khi chọn được một enzym thích hợp và một plasmid chỉ có một đoạn ADN được nhận biết bởi endonucleaza cắt giới hạn, người ta có khả năng làm mở vòng ADN plasmid để hình thành ADN sợi dài.

Sau khi ADN lạ được kết hợp vào ADN plasmid tạo thành plasmid tái tổ hợp, ligaza của tế bào vật chủ sẽ đóng vòng bằng cách hình thành các liên kết photphodiester đồng hoá trị (h.VI.2).

4. Cơ chế tái bản của ADN plasmid tái tổ hợp trong tế bào vi khuẩn chủ

Plasmid tái tổ hợp sau khi tạo thành, được biến nạp vào tế bào vi khuẩn, hiện nay thường dùng nhất là *E.coli*. Các tế bào *E.coli* phải được xử lý CaCl_2 làm chúng hấp thụ được plasmid. Công trình của Mandel và Higa, 1970 đã cho thấy các muối Ca giúp những đoạn ADN tương đối lớn vẫn có thể xâm nhập dễ dàng vào *E.coli*. Sự tồn tại của plasmid trong tế bào vi khuẩn có thể được phát hiện nhờ tính bền vững với chất kháng sinh của tế bào vi khuẩn do các gen đặc hiệu mà plasmid mang đến. Khi đã xâm nhập vào tế bào vi khuẩn chủ, plasmid tái tổ hợp có khả năng tái bản, được truyền lại cho thế hệ sau của tế bào vật chủ qua cơ chế phân bào và điều khiển tổng hợp ra các polypeptit plasmid đặc thù, các loại protein đã được mã hóa trong đoạn ADN tái tổ hợp được chuyển ghép.

Cơ chế tái bản ADN plasmid tái tổ hợp trong tế bào vi khuẩn chủ không khác gì cơ chế tái bản của ADN vật chủ, cũng bán bảo toàn, cũng hình thành các phân đoạn Okazaki, nói cách khác là phụ thuộc vào ADN-polymeraza của tế bào vi khuẩn chủ. Sự sao mã của ADN plasmid tái tổ hợp cũng được thực hiện bởi ARN-polymeraza của tế bào vi khuẩn chủ và sự tổng hợp protein được mã hóa trong ADN này cũng được tiến hành do bộ máy phiên mã (giải mã) của vật chủ. Sự kiện này càng chứng minh cho một vấn đề rất cơ bản trong sinh học, là tính phổ biến (universal) của mã di truyền. Do đó mà người ta đã thấy bất kỳ loại protein nào được mã hóa trong gen của plasmid tái tổ hợp, đều có thể được tổng hợp trong tế bào vi khuẩn chủ.

Chính sự sinh sản của vi khuẩn *E.coli* đã dẫn đến sự tự sao (tách dòng) của ADN tái tổ hợp của plasmid. Quá trình này *sản sinh ra nhiều*

bản sao của phân tử ADN tái tổ hợp và được gọi là tách dòng phân tử (molecular cloning). Tế bào nhận được dùng phổ biến cho đến nay là tế bào vi khuẩn đường ruột *Escherichia coli*, phân chia rất nhanh, cứ khoảng nửa giờ lại phân đôi, từ đó có thể sản sinh hàng ngàn triệu tế bào trong từng thời gian ngắn, qua đó plasmid tái tổ hợp xâm nhập vào chúng cũng được nhân lên rất nhanh và sản xuất ra một khối lượng lớn các chất tương ứng với các gen lạ đã được xen vào ADN plasmid.

5. Ứng dụng của công nghệ ADN tái tổ hợp

Ứng dụng lớn nhất của plasmid trong công nghệ di truyền là các đoạn ADN tách dòng từ các cơ thể khác nhau, có thể được lắp ghép vào ADN plasmid và ADN plasmid tái tổ hợp này lại có thể tái bản trong tế bào vi khuẩn chủ. Bằng kỹ thuật này người ta có thể tạo hàng loạt các loại ADN để sản xuất các protein cần thiết. Việc sản xuất đại trà nhiều loại sản phẩm quan trọng, ngày nay đã bán trên thị trường, bằng công nghệ di truyền, lại được thực hiện trong hệ thống các nhà máy "tỷ hon", tức các tế bào vi khuẩn, hiện dùng phổ biến là *E.coli*, và đặc biệt nhất là lại có năng suất "khổng lồ", tạo sản phẩm hàng loạt theo kiểu công nghiệp hiện đại.

5.1. Sản xuất insulin bằng kỹ thuật plasmid

Insulin bán trên thị trường hiện nay để chữa bệnh đái tháo đường (diabetes) chính là được sản xuất bằng kỹ thuật di truyền, kỹ thuật tái tổ hợp ADN.

Insulin là loại hormone của tuyến tụy có chức năng điều hòa glucose trong máu, tác động lên tế bào gan để tăng cường chuyển hóa glucose thừa trong máu thành glucogene là đường dự trữ. Khi nồng độ glucose trong máu tăng lên quá ngưỡng. Trường hợp insulin tự nhiên trong cơ thể không đủ sẽ bị bệnh diabetes, glucose phải thải ra qua đường nước tiểu.

Gen phụ trách sản xuất insulin trong cơ thể người được tách dòng, chuyển ghép vào tế bào vi khuẩn *E.coli* thông qua vector là plasmid. Gen tái tổ hợp của plasmid hoạt động bình thường, sản sinh ra trong tế bào vi khuẩn *Coli* loại insulin giống như loại sinh ra trong cơ thể người (Goeddel, 1979). Sự biểu hiện của gen insulin trong *E.coli* đòi hỏi phải có thêm promotor C_1 của gen mã hóa alcoholdehydrogenaza. Tại Hội nghị

di truyền học quốc tế lần thứ 15 họp ở Niu Deli, Ấn độ, từ 12- 21 tháng 12- 1983. Sarang Narang đã thông báo, tổng hợp được 2 gen mã hóa 2 chuỗi polypeptit A và B của insulin người và đưa vào tế bào vi khuẩn *E.coli* để sản xuất insulin, thông qua kỹ thuật tạo plasmid tái tổ hợp.

5.2. Dùng plasmid tái tổ hợp sản xuất somatostatin

Itakura, H.Boyer, 1977 đã thành công tổng hợp hocmon somatostatin trong tế bào vi khuẩn.

Somatostatin là loại hocmon đặc biệt, bình thường thì được tổng hợp trong não động vật và người, tại vùng dưới đồi thị (hypothalamus) với một hàm lượng cực nhỏ. Somatostatin có vai trò điều hòa hocmon sinh trưởng và insulin đi vào máu, kiểm tra sự tổng hợp 2 loại hocmon nói trên.

Gen mã hóa somatostatin được tổng hợp *invitro*, được gắn vào ADN vòng plasmid, sau đó đưa vào tế bào vi khuẩn *E.coli*. Cứ 7,5 lít vi khuẩn nuôi cấy có thể cho ra 5 milligam somatostatin nguyên chất. Khối lượng này trước đây muốn có, đòi hỏi phải tiến hành hàng năm trên nguyên liệu lấy từ gần nửa triệu não cừu.

Plasmid tái tổ hợp cũng được ứng dụng sản xuất hocmon sinh trưởng ở bò để tăng lượng sữa, tạo ra sinh vật "ăn cận đầu", xử lý phế thải có độc tố.

5.3. Sản xuất interferon

Interferon được phát hiện từ 1957 nhưng phải đến 1982 mới là thời kỳ sản xuất interferon bán trên thị trường bằng kỹ thuật di truyền.

Năm 1957, Ideks và Linderman, người Anh, đã phát hiện ở các tế bào mắc bệnh do virus, một hợp chất đặc biệt mang tên interferon. Từ đó người ta đều phát hiện trong cơ thể mắc bệnh do bất kỳ virus nào cũng đều có interferon.

Interferon là một loại protein đặc biệt, được tổng hợp trong các tế bào động vật có xương sống, có vai trò bảo vệ cơ thể động vật khi bị nhiễm bệnh do virus, chống lại sự xâm nhập của virus. Interferon là loại protein tương đối đơn giản, chịu được nhiệt độ cao 65°, là sản phẩm của tế bào sống nên bản thân nó không độc. Chương trình sinh tổng hợp interferon được mã hóa trong gen, nhưng sự tổng hợp chỉ xảy ra khi có

virut xâm nhập cơ thể hay dưới tác động của một số hợp chất hóa học đặc biệt.

Người ta phân biệt 3 loại interferon:

- Interferon anpha (α): do bạch cầu sản sinh khi có virut xâm nhập.
- Interferon beta (β): do tế bào mô trắng sản xuất khi có virut xâm nhập.
- Interferon gamma (γ): do bạch cầu, qua phản ứng của hệ miễn dịch.

Interferon không tác động trực tiếp lên virut mà tác động lên các tế bào, để các tế bào này tổng hợp ra một loại protein có khả năng kìm hãm sự phát triển của virut xâm nhập cơ thể. Hiện nay, người ta phát hiện ra được 5 loại protein này, khi virut xâm nhập ồ ạt vào cơ thể như khi có nạn dịch virut, thì interferon tự nhiên không đủ để chống lại virut.

Trước đây, interferon được tách từ bạch cầu để chống cúm, chữa viêm gan, nhưng rất đắt. Nếu tách từ máu ra để lấy interferon, thì dù có tách từ máu toàn bộ loài người cũng không đủ để chữa bệnh cho một người trong 1 năm.

Các thành tựu của kỹ thuật di truyền, thao tác trên gen bạch cầu, gen của tế bào nguyên sợi, gen hệ miễn dịch v. v... đã mở ra cuộc cách mạng trong nghiên cứu cấu trúc và hoạt động của interferon và đến nay đã có interferon bán trên thị trường, sản xuất bằng công nghệ di truyền.

Người ta đã tách dòng gen interferon từ trong cơ thể sống và ghép vào ADN trực khuẩn *E.coli* để vi khuẩn này sản xuất interferon.

Tách dòng và tạo dòng gen interferon ở người là việc cực kỳ khó vì *m*-ARN chỉ khoảng 0,1% tổng số *m*-ARN mã hóa các loại protein khác. Tuy vậy, ngày nay người ta cũng đã tách được các gen của các chất kích thích miễn dịch gồm interferon- γ và intokulin- 2.

Interferon gen là công trình của C. Weissman (Thụy sĩ).

5.4. Công nghệ ADN tái tổ hợp trong y học

5.4.1. Sử dụng RFLP như các marker (dấu chuẩn) di truyền

Một đột biến điểm có thể làm mất đi hoặc tăng lên một điểm cắt của enzym giới hạn; xen đoạn, mất đoạn có thể làm thay đổi vị trí tương đối của điểm cắt của enzym giới hạn.

Nếu RFLP nằm giữa hoặc kề sát một gen gây bệnh, thì có thể theo

đôi gen khuyết tật bằng nhìn vào RFLP. Dùng Southern cùng mẫu dò để lai với vùng ADN cần quan tâm.

RFLP giúp xác định vị trí nhiều gen:

- Huntington: nhiễm sắc thể	4
- Teo cơ:	7
- Hồng cầu liềm:	11
- Retinoblastoma:	13
- Alzheimer:	21

5.4.2. Dùng mẫu dò oligonucleotid phát hiện được khuyết tật do đoạn xen, đoạn mất và đột biến điểm, nhưng không biết chính xác bản chất khuyết tật gen.

5.4.3. Liệu pháp gen có hai phương pháp:

- Đưa gen lành vào tế bào soma của mô bị tổn thương, vẫn được chấp nhận.

- Đưa vào tế bào phôi (dòng phôi). Nguy cơ có thể làm biến đổi vốn gen của loài người, không được chấp nhận.

Một vài nước như Anh, Mỹ chuẩn bị văn bản pháp lý cho phép thao tác gen trên tế bào phôi với mục đích nghiên cứu và phục vụ chữa bệnh.

III. CÔNG NGHỆ GEN ĐỘNG VẬT

1. Truyền gen qua vectơ virus Lambda

1.1. Lambda là một thực khuẩn thể ôn hòa

Thực khuẩn thể (bacteriophage) này đã được nghiên cứu nhiều nhất, có nhiều đặc điểm quan trọng, độc đáo. Vật chất di truyền nói chung của virus là ADN hoặc ARN. Như ta đã biết, virus sinh sản bằng cách chuỗi axit nucleic của chúng vào tế bào vật chủ, trong đó chúng sinh sản.

Trong trường hợp là virus ADN, thì ADN được dùng làm khuôn mẫu cho ra ADN mới và khuôn mẫu để sao chép ra *m*-ARN.

Trong trường hợp là virus ARN, thì ARN dùng làm khuôn mẫu hình thành thêm ARN và cả ra *m*-ARN. *m*-ARN ở đây mã hóa các protein vỏ của virus, vỏ này có thể chỉ gồm một loại protein lắp đi lắp lại, như virus

khảm thuốc lá TMV, hoặc nhiều loại khác như các thực khuẩn thể T, với các đuôi phức tạp (tail).

Virut dùng các vật chất thô của tế bào vật chủ, như nucleotit và axit amin, ATP của tế bào và các nguồn năng lượng khác, cũng như bộ máy trao đổi chất của tế bào, vì vậy bắt buộc virut phải ký sinh, không thể sống ngoài tế bào.

Số lượng gen trong virut dao động lớn giữa các loại. Thực khuẩn thể nhóm T (lớn) mang khoảng 100 gen, chiếm khoảng 1/100 kích thước tế bào *E.coli*. Thực khuẩn thể loại bé như ϕ x 174, chỉ chứa khoảng 1/100 ADN của T4. Có nhiều thực khuẩn thể ARN còn bé hơn, vì chúng có các gen trùm nhau (overlapping genes), cho nên có trường hợp chúng mã hóa cho 4 protein chỉ với 3600 nucleotit của sợi đơn ARN.

Trong một số virut ARN động vật, cũng như thực khuẩn thể ARN, ARN của chúng được dùng làm khuôn mẫu, để có thêm ARN và cả để tổng hợp ra *m*-ARN.

Trong một số virut ARN khác, thì ARN này lại mã hóa một enzym gọi là *transcriptaza ngược* (enzym sao chép ngược), nó tổng hợp ra ADN từ khuôn mẫu ARN. Transcriptaza ngược này chỉ được phát hiện trong tự nhiên ở các loại retrovirut (từ chữ Latinh retro, là quay ngược lại, sao ngược).

Với cả virut ADN và virut ARN, chu kỳ lây nhiễm kết thúc khi các axit nucleic được bao lại trong vỏ protein mới được tổng hợp và hạt virut được giải phóng khỏi tế bào vật chủ, sẵn sàng để bắt đầu tiếp tục một chu kỳ lây nhiễm tiếp theo.

Về đặc điểm gây tan của thực khuẩn thể, ta thấy có những đợt lây nhiễm virut có thể xuất hiện đột ngột trong một dòng tế bào vi khuẩn, bề ngoài không bị lây nhiễm. Những dạng này được gọi là *tiềm tan*, do khả năng của virut có *mối quan hệ lâu dài với tế bào vật chủ, tồn tại tiềm tàng qua nhiều thế hệ tế bào, trước khi bắt đầu một chu kỳ lây nhiễm*. Những virut này được gọi là *virut ôn hòa*.

Những phage như trên được gọi là *prophage* (tiềm virut). Prophage thoát ra từ tế bào vật chủ một cách tự phát ở 1 trong số 10.000 lần phân bào. Vật chủ khi bị lây nhiễm, *ADN của chúng đứt từng đoạn* và khi virut rời khỏi tế bào vật chủ, chúng có thể mang theo một số đoạn của ADN vật chủ thay cho bản thân ADN của chúng. Nếu thực khuẩn thể thuộc loại khuyết dưỡng thì người ta có thể phát hiện các tái tổ hợp này.

ADN lambda có một số đặc điểm độc đáo. Đầu tiên, khi chuỗi kép ADN của virus được *kết cuộn trong hạt virus*, thì nó là dạng đường thẳng, tức có 2 đầu tự do *khi được giải phóng ra khỏi tế bào vật chủ*, thì 2 đầu dính lại, ở đầu 5' của mỗi sợi đơn ADN được tạo ra những sợi đơn nucleotit, chúng bổ sung chính xác cho nhau và đóng phân tử ADN lại thành dạng vòng. Ở đây, enzym ADN ligaza, tạo ra liên kết giữa các nhóm photphat, đóng các khe hở lại.

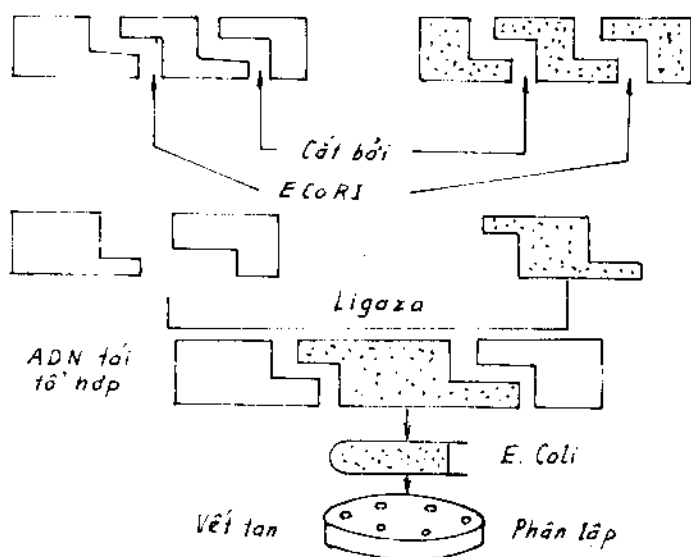
Sự xâm nhập và gắn của ADN lambda vào nhiễm sắc thể vi khuẩn phụ thuộc 2 vị trí (site) gắn một trên nhiễm sắc thể *E.coli* và một trên ADN lambda. Quá trình gắn được xúc tác bởi một enzym đặc biệt, lambda integraza, nó nhận mặt cả 2 đoạn, đưa cả 2 mạch xoắn ADN vòng đi vào với nhau và tiến hành các phản ứng cắt và đóng. Enzym này được mã hóa bởi virus lambda.

ADN lambda gồm một số operon hoạt động theo từng đoạn. Operon đóng khi lambda đang ở trạng thái tiền virus, khi mở operon thứ nhất là lúc mở đầu chu kỳ tan. Lambda cũng mã hóa một protein ức chế khi nó ở trạng thái tiền virus. Sau đây, là sơ đồ chuyển ghép gen tế bào vi khuẩn qua vector là virus lambda.

Người ta cho ADN lambda và ADN tế bào cho (ADN lạ) cùng bị cắt bởi enzym hạn chế ECoRI.

Để thu được ADN tái tổ hợp, người ta trộn lẫn hai loại ADN trên cùng với enzym nối ligaza.

Đưa hệ gen tái tổ hợp này vào tế bào vi khuẩn *E.coli*, khi thấy trên đĩa Petri có vết tan, chúng ta vi khuẩn *E.coli* đã có hệ gen tái tổ hợp xâm nhập vào (h.VI.3).



Hình VI.3. Sơ đồ thực nghiệm chuyển ghép ADN vào *E.coli* qua vector là virus lambda.

1.2. Vector lai phage-plasmid

Các ADN sợi đơn cung cấp một loại vật chất di truyền cực thuận cho các thực nghiệm giải trình tự ADN. Một số vector được xây dựng để cung cấp một cơ chế sinh học giản đơn để tinh chế ra một lượng lớn các sợi đơn của các gen tách dòng.

Vector (vector) được sử dụng tốt nhất là vector lai, gồm các thành phần của cả plasmid và ADN phage. Những vector này tái bản trong tế bào *E.coli* như là các plasmid ADN sợi kép bình thường. Để hiểu thêm về các vector lai phage-plasmid, ta nói lại về các phage bé mang ADN sợi đơn, trong đó, điển hình là M_{13} , f_1 và fd .

Vật chất di truyền của chúng là ADN sợi đơn giống hệt như ở $\phi x 174$. Genom của các phage này tái bản theo cơ chế lăn đai thùng giống như ADN của $\phi x 174$. Các virion (hạt virus) của M_{13} , f_1 và fd dài, dạng sợi, giống $\phi x 174$.

Các phage ADN sợi đơn lây nhiễm các tế bào bằng cách chuỗi vào qua lông F. Những phage này chỉ lây nhiễm các tế bào F^+ hoặc F^{Hfr} , không lây nhiễm tế bào F^- .

1.3. Chuyển ghép gen vào tế bào người nuôi cấy qua vector là virus lambda

Năm 1972, Merril, Geler và Petrician đã công bố công trình chuyển ghép gen từ tế bào vi khuẩn sang tế bào của người, loại tế bào nuôi cấy.

Người bị bệnh galactosemia, không có khả năng động hóa galactose, do đột biến gen về enzym α -D-galactose-1-phosphate uridyl transferaza (GPUR). Gen này là một phần trên operon galactose, tổng hợp ra enzym GPUR, có chức năng biến galactose-phosphate thành uridyl-diphosphate-galactose.

Enzym này cũng có trong tế bào *E.coli*. Các chủng *E.coli* cũng có chủng đột biến, không có GPUR. Những chủng đột biến này, ở mức độ đáng kể, cũng có những rối loạn trao đổi chất tương tự như ở người bệnh galactosemia (galactose-huyết).

Thí nghiệm được tiến hành qua các bước sau đây:

- Bằng tải nạp, cho thực khuẩn thể lambda lây nhiễm vào tế bào *E.coli*, là tế bào vốn có enzym GPUR. Lambda xâm nhập vào tế bào

E.coli, qua tái tổ hợp di truyền với tế bào vật chủ, sản sinh những thể hệ lambda mới mang ADN tái tổ hợp, tức bao gồm cả vật chất di truyền của *E.coli*, cụ thể là có cả gen tổng hợp enzym GPUT.

- Cho lambda mới tạo này vào môi trường nuôi cấy các xơ nguyên bào của bệnh nhân galactose huyết. Người ta chọn xơ nguyên bào, những tế bào của mô liên kết, vì trong điều kiện phòng thí nghiệm, các tế bào này phát triển mạnh ngoài cơ thể người.

- Kết quả cho thấy, các tế bào nuôi cấy của người bệnh có được các tính chất mới, đồng hóa được galactose, hoạt tính của GPUT trong đó còn lại đều hơn 40 ngày, trong thời gian ấy, có 8 lần phân bào. Người ta đã làm thực nghiệm kiểm tra, cho lây nhiễm với lambda thường và với lambda dạng đột biến, bị bất hoạt về transferaza, kết quả là cho ra ARN đặc thù của lambda bình thường, không thấy có hoạt tính transferaza.

Thực nghiệm trên cho thấy triển vọng dùng virus nhân tạo để chữa các bệnh di truyền do rối loạn các enzym đặc thù.

1.4. Sử dụng kỹ thuật di truyền để chữa các bệnh di truyền bằng biện pháp gen (gene therapy).

Người ta dùng hai phương pháp:

1.4.1. Phương pháp ex vivo

- Nuôi cấy tế bào từ mô người bệnh.
- Chuyển gen để sửa vào mô nuôi cấy, thông qua virus (retroviral vector)
- Tế bào đã được sửa, lại được đưa lại vào mô cơ thể qua tiêm. Khả năng tế bào này bị đào thải miễn dịch là bé.
- Là phương pháp hiện được sử dụng chính.

1.4.2. Phương pháp in vivo

- Đưa trực tiếp gen "lạnh" vào cơ thể, ở dạng được bọc trong túi mỡ (liposome) thông qua retrovirus; hoặc tiêm dịch ADN đã cải biến vào cơ thể.
- Khả năng vật liệu di truyền này đưa vào bị cơ thể đào thải khá lớn.

2. Truyền gen ở động vật

2.1. Biến nạp gen ở động vật có vú

Đưa vào trứng ở giai đoạn tiền nhân (pronucleus) (giai đoạn nhân tinh trùng và trứng chưa hòa hợp, tế bào chưa phân chia và phân hóa). Gen lạ sẽ có mặt ở tất cả các loại tế bào, kể cả tế bào sinh sản.

2.2. Các công đoạn

2.2.1. Tách chiết, phân lập gen biến nạp (gen cấu trúc)

- từ sản phẩm biểu hiện : *m*-ARN hoặc protein

2.2.1.1. Từ *m*-ARN

- dùng enzym sao ngược:

m-ARN → cADN mạch đơn (ss cDNA)

→ cADN mạch kép (ds cDNA)

Các gen tổng hợp từ *m*-ARN gọi là gen bổ trợ, *khác gen gốc không mang intron*.

2.2.1.2. Từ protein

- từ trình tự Aa → trình tự N

- tạo đoạn mồi (primer) để dò tìm đoạn gen mong muốn.

2.2.2. Tạo tổ hợp gen biểu hiện được

- Gắn gen cấu trúc với promotor thích hợp

2.2.3. Tạo ra và thu nhận trứng tiền nhân

- Sử dụng kích dục tố, gây rụng nhiều trứng hoặc nuôi cấy trứng để tạo hàng loạt trứng chín. Thụ tinh nhân tạo để có trứng tiền nhân.

2.2.4. Biến nạp tổ hợp gen (gen cấu trúc + promotor).

3. Các phương pháp biến nạp gen

3.1. Phương pháp vi tiêm (microinjection)

Đây là phương pháp tiêm ADN một cách cơ học vào tế bào phôi trần hoặc tế bào nguyên. Phương pháp này có ưu điểm: ADN được đưa vào chính xác, có thể vào tận nhân. Có thể quan sát được quá trình tiến hành nhưng phương pháp này cũng có hạn chế: mỗi lần tiêm, chỉ được

một tế bào, thao tác khá tinh tế, đòi hỏi kỹ thuật tinh xảo. Phương pháp mới chủ yếu thành công trên động vật.

Hệ thống máy vi thao tác gồm: kính hiển vi soi ngược Olympus, hệ vi thao tác, hệ vi tiêm. Hammer, 1985, đã tiêm lượng cực nhỏ ADN vào các tế bào phân hóa, các phôi của một số loài, nhím biển (sea urchin), ruồi dấm, chuột nhắt. Một số gen đã được tiêm vào chuột nhắt thành công, bao gồm vùng promotor/ regulator.

Methallothionein- I (MT), dung hợp với gen cấu trúc của hocmon sinh trưởng hoặc của chuột đồng, hoặc của người. Các chuột nhắt được chuyển gen như trên đã được mang gen biểu hiện bình thường, có lượng hocmon sinh trưởng lạ trong huyết thanh và chúng sinh trưởng tốt. Các gen trên được nhập ổn định vào dòng tế bào phôi, làm cho kiểu hình được di truyền lại.

Do ý nghĩa khoa học và giá trị kinh tế của các động vật được tạo ra do chuyển gen, có thêm gen lạ, giúp các nhà khoa học đã bắt đầu nghiên cứu tiêm vào các động vật lớn lượng cực nhỏ gen dung hợp (MT- hGH), tiêm vào tiền hạch hoặc hạch trứng của thỏ, cừu, lợn, được gây rụng trứng. Các tác giả đã thông báo đạt được sự chuyển gen ở cả 3 loài nói trên, có sự biểu hiện gen (gene expression) trong thỏ, lợn được chuyển gen.

Người ta cũng đã tiêm lượng cực nhỏ những đoạn ADN tái tổ hợp vào chuột, cụ thể là ADN virus SV40 tinh khiết (simian virus 40), vào xoang phôi non của chuột ở giai đoạn túi phôi (blastocyst), kết quả cho thấy, khoảng 40% số tổ chức của cơ thể chuột được tạo ra từ phôi nói trên, có chứa các đoạn ADN đặc thù của SV40 (Jaenish, 1974).

Người ta cũng đã thành công chuyển ghép gen của chuột vào vi khuẩn, từ đó vi khuẩn có khả năng sản sinh ra enzym có hoạt tính sinh học, loại enzym này thông thường là do cơ thể chuột tổng hợp nên. Người ta cũng đã chuyển ghép gen tổng hợp hemoglobin ở thỏ vào tế bào thận của khỉ non. Những tế bào này của khỉ, thông thường không tổng hợp được hemoglobin, nhưng sau khi được chuyển ghép gen nói trên, đã có khả năng tạo ra hemoglobin.

T. Sakata, Nhật, 1985, đã thông báo, gen interferon của người (Hul FN) - α_2 và β_1 , được tạo dòng vào plasmid vector pBR32, sau đó được tiêm trực tiếp vào nhân của noãn bào *Xenopus laevis*. Hoạt tính kháng

virut của Hul FN đã được phát hiện ở các noãn bào trong môi trường nhân tạo, sau khi tiêm 48 giờ.

Thành công thực nghiệm này chứng tỏ kỹ thuật tiêm lượng cực nhỏ ADN của vector plasmid, có chứa ADN tạo dòng vào nhân của noãn bào *Xenopus*, là một kỹ thuật quan trọng để xác định ADN tạo dòng, chứa các đoạn nucleotit đủ để chứng tỏ có hoạt tính sinh học.

3.2. Biến nạp bằng súng bắn gen

ADN được tạo quanh các viên đạn bằng kim loại nặng và được bắn thẳng vào các mô tế bào. Đây là kỹ thuật tương đối hiện đại, có hiệu quả đối với cây một lá mầm, đã thành công trên: lúa (Christon P, 1995), ngô (Oard J, 1993), đậu, thuốc lá (Kabuta H, 1992), hướng dương (Vallejos RH... 1990), hoa hồng (Hsia CN, 1996).

Hạn chế của phương pháp này là: tần số biến nạp thấp; thường nhận được cây biến nạp ở dạng khảm; đòi hỏi kinh phí lớn. Người ta thường sử dụng phương pháp này để nghiên cứu sự biểu hiện tạm thời của gen, có thể áp dụng được cho mọi loại tế bào. Hiệu quả của nó phụ thuộc vào yếu tố vật lý, sinh học, hóa học, môi trường. Ví dụ: đặc tính hóa học và vật lý của viên đạn kim loại, quá trình bọc ADN vào đạn, luồng khí thổi v.v... Khả năng xâm nhập của gen lạ vào tế bào đích phải không gây ảnh hưởng tới sinh trưởng, phát triển của chúng. Người ta đã có cải tiến, dùng thiết bị helium với tính năng động cao, thay viên đạn wolfram bằng đạn vàng.

3.3. Kỹ thuật điện biến nạp (electroporation)

Một dòng điện có điện áp cao, có khả năng tạo các lỗ thủng trên màng tế bào, làm ADN từ môi trường xâm nhập được vào bên trong.

3.4. Kỹ thuật canxi photphat

Dựa trên sự hình thành một phức hợp ADN-canxi (DNA-calcium), để được tế bào thu nhận qua cơ chế thực bào.

4. Tạo tổ hợp gen biểu hiện được trong tế bào động vật

4.1. Gen cấu trúc phải được gắn thêm promotor

Promotor (đoạn gen khởi đầu): để tạo ra tổ hợp gen biểu hiện được trong tế bào động vật. Gen promotor có nguồn gốc từ động vật, như

metallothionein (MT) thymidine kinaza (TK), hoặc từ virus động vật như SV40 (simian virus). Promotor phải thích hợp với hệ thống hoạt động của gen cấu trúc, do đó mỗi gen cấu trúc có một promotor nhất định.

4.2. Công trình vi tiêm trên động vật của Palmiter (1982)

Công trình này sử dụng tổ hợp gen hormon sinh trưởng gồm:

- gen cấu trúc hormon sinh trưởng (người hGH, chuột)
- gen khởi động promotor metallothionein chuột
- plasmid (vector)

4.2.1. Một số loại promotor đã được dùng hiện nay là:

- mMT : mammalian metallothionein
- SV 40 : simian virus
- AFP: antifreeze protein promotor.

4.2.2. Các điều kiện cơ bản để vi tiêm gen

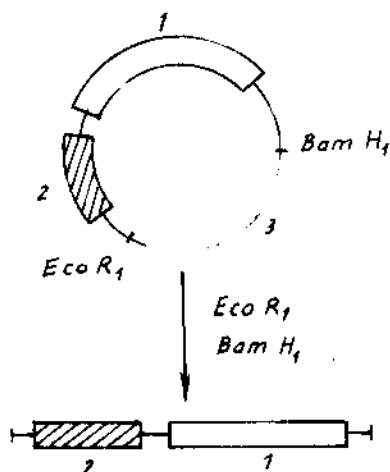
Một số điều kiện cực thuận để nâng cao tần số xâm nhập gen:

- Nồng độ ADN tiêm vào cơ thể là một yếu tố để nâng hiệu quả xâm nhập gen.

Cực thuận là:

- nồng độ 1-2 ng β L⁻¹ ADN hoặc:
- 100- 1000 bản sao của đoạn ADN.

Một phân tử dài ADN sẽ đạt hiệu quả hơn khi tiêm vào nếu được cắt ra với endonucleaza.



Hình VI. 4. Sơ đồ của plasmid vòng:

- mang gen hormon sinh trưởng chuột (1);
- promotor metallothionein của nó, tức gen metallothionein chuột (2);
- gen plasmid (3).

Cắt mở vòng bởi enzym cắt, thành phân tử đường thẳng (Palmiter, 1982).

Tiêm vào nhân đạt hiệu quả hơn là vào tế bào chất. Tiêm ADN vào hạch nhân (nucleus) của phôi 2 tế bào cũng đạt kết quả tạo động vật truyền gen. Dòng chuột được tiêm cũng ảnh hưởng tới hiệu quả tiêm (chọn dòng).

4.2.3. Các sự kiện xảy ra ngay sau khi tiêm

- Đầu tiên: sao mã của gen lạ có thể xảy ra ở giai đoạn đầu của phân cắt, kéo theo giảm ít ADN lạ trong 24 giờ sau khi tiêm (Chen, 1986). Hoạt động enzym chuyển các đoạn ADN tiêm vào sang dạng xoắn.

Gây động dục đồng thời:

Cho ăn progestin tổng hợp có hoạt tính (altrenogest: nồng độ 15mg cho 1,8kg thức ăn mỗi ngày, mỗi con). 5 - 9 ngày bắt đầu vào ngày 12- 16 của chu kỳ động dục (estrus cycle) (Webel, 1978)

Rụng trứng xảy ra ngay 5 ngày sau lần cho ăn progestin cuối cùng.

Gây siêu bài trứng:

2000 đơn vị gonadotropin huyết thanh ngựa cái có chữa (PMSG, pregnant mare's serum gonadotropin) tiêm dưới da 24 giờ sau lần cho ăn altrenogest cuối cùng. 78 giờ sau, tiêm tiếp vào bắp 1000 đơn vị chorionic gonadotropin của người (HCG).

Sử dụng biện pháp trên, sẽ có trung bình: 14- 28 trứng rụng, ứng với: trường hợp tự nhiên và trường hợp gây siêu bài noãn. Thụ tinh nhân tạo 24, 36 và 48 giờ sau khi có HCG.

Chuột được truyền gen sẽ tạo somatostatin trong tuyến yên sau (Low, 1985).

Phôi được vi tiêm phải truyền cấy ngay cho các con cái động dục đồng thời để tránh làm giảm sức sống của phôi cấy (Ebert, 1986). Đối với lợn, phôi được vi tiêm, lợn sinh ngay 116 ngày sau cấy phôi. Lấy mẫu máu ở tai để tách ADN và phân tích dot blot để xác định con vật nào có mang gen vi tiêm. Southern blot được tiến hành trên ADN tách từ hồng cầu ngoại vi để xác định cấu trúc tổ hợp gen vi tiêm. Northern blot được tiến hành trên *m*-ARN để xác định sao mã đặc thù ở mô của gen vi tiêm. Nuôi lợn truyền gen để nhân dòng, xác định các biến đổi kiểu hình do truyền gen.

5. Tính ổn định của các tổ hợp gen (fusion genes)

Sự biểu hiện của gen truyền chưa phải là được ổn định từ thế hệ này qua thế hệ khác ở động vật truyền gen. Hiện tượng này được phát hiện đầu tiên ở chuột truyền gen mang tổ hợp gen metallothionein-thymidine kinaza (Palmiter, 1982).

Nhiều tác giả đã cho rằng hiện tượng thiếu ổn định trong biểu hiện của gen truyền có thể có liên quan với các biến đổi có thể xảy ra trong sự methyl hóa của gen truyền từ thế hệ này cho thế hệ khác. Thêm vào đó, cũng phát hiện được hiện tượng sắp xếp lại (rearrangement) của gen truyền (Palmiter, 1982), có thể dẫn tới sự đa dạng trong biểu hiện của gen truyền, từ thế hệ này qua thế hệ khác. Các biểu hiện nêu trên đã được khảo sát qua:

- tạo các động vật truyền gen giống hệt nhau bằng kỹ thuật chẻ phôi (embryo splitting techniques) qua một thí nghiệm mới đây về truyền gen ở lợn.

Hợp tử thụ tinh của lợn được tiêm một số tổ hợp gen gồm:

- gen cấu trúc hormone sinh trưởng lợn (pGH);
- promotor moloney murine của virus leukemia (MLV), bệnh bạch cầu.

Hợp tử trên được cấy vào một con cái nhận, sinh ra được 2 lợn con dực. Cả 2 lợn con này đều mang tổ hợp gen truyền trong genom. Được phân tích dot blot, đã cho thấy có khoảng 20 bản sao của tổ hợp gen truyền. Mọi con vật được truyền gen đều mang các site khác nhau truyền vào (Palmiter, 1986).

Southern blot từ các con vật khác nhau nói trên đều có cùng tính chất, khi sử dụng enzym thủy giải cắt tổ hợp gen truyền. Hai con dực truyền gen mang tổ hợp gen MLV- pGH đều có Southern blot giống nhau khi ADN được thủy giải bởi 7-endonuclease khác nhau (3 trong số đó không có các site có trong đoạn tiêm vào). Hơn nữa, cả hai con vật trên đều có sự sắp xếp lại gen truyền theo cùng một kiểu.

Người ta thu được các thai lợn giống nhau (Marrable, 1971):

- có thể do sau khi vi tiêm tổ hợp gen và sau khi xâm nhập được vào genom, thì phôi được chẻ (split) và cho ra các cá thể giống hệt nhau;

- những sai khác kiểu hình giữa 2 cá thể này có thể phản ánh các biến đổi trong sự biểu hiện của tổ hợp gen truyền.

Một vấn đề cần tiếp tục nghiên cứu là mức ổn định ngắn hoặc dài và sự biểu hiện của gen lạ truyền vào.

6. Chuyển gen hoocmon sinh trưởng vào động vật

Gen hoocmon (hormon) sinh trưởng người trong tổ hợp MThGH đã được tách dòng ở chủng *E.coli*. Chủng vi sinh *E.coli* mang tổ hợp MThGH: của các phòng thí nghiệm như Trung tâm quốc tế kỹ thuật gen và công nghệ sinh học New Dehli.

Tách chiết và đánh giá tổ hợp MThGH tách dòng ở *E.coli*

- * Chủng vi sinh *E.coli* đông khô
- * Được hòa tan trong nước cất vô trùng.
- * Cấy vào 2 đĩa thạch với 2 môi trường khác nhau:

- ISP1:

Bacto trypton	5 g/l
Bacto yeast extract	3 g/l
H ₂ O cất	11 g/l

- LB: (Luria Bertoni)

Bacto trypton	10 g/l
Bacto yeast extract	5 g/l
NaCl	10 g/l
H ₂ O cất	950 ml
pH	7.0

- * Ủ qua đêm 37°C
- * Dùng que nuôi cấy vô trùng, lấy 1 khuẩn lạc (colony) trong đĩa trên, nhúng vào 10 ml dung dịch ISP1 hoặc LB chứa ampicillin.
- * Ủ trong nhiệt độ 37°C qua đêm, với máy lắc 200 vòng/ phút
- * Sáng ngày sau, lấy 25 ml môi trường ISP1 hoặc LB, đưa vào bình dung tích 100 ml chứa ampicillin + 0.1 ml dung dịch nuôi cấy trên

* Ủ nhiệt độ 37°C, lắc 200 vòng/ phút cho đến khi dung dịch nuôi cấy đạt OD₆₀₀ = 0,6

* Lấy 25 ml dung dịch này cho vào 500 ml môi trường ISP1 hoặc LB, ủ tiếp, lắc 200 vòng / phút 37°C cho đến khi OD₆₀₀ = 0,4

* Đổ 2,5 ml dung dịch chloramphenicol vào dung dịch nuôi cấy, nồng độ cuối cùng là 170µ /ml.

* Ủ 37°C, lắc mạnh 12- 16g.

Thu sinh khối, tách và tinh sạch ADN plasmid

* Thu tế bào vi khuẩn bằng ly tâm 4000 vòng/ phút, trong 15 phút. ở 4°C.

* Rửa tế bào vi khuẩn bằng hòa sinh khối trong 100 ml dung dịch STE lạnh

- Đệm STE

NaCl	0.1 M
Tris HCl	10 mM
EDTA	1 mM

* Ly tâm 5000 vòng/ phút, trong 15 phút, ở 4°C để thu lại tế bào vi khuẩn.

* Hòa toàn bộ sinh khối vi khuẩn từ 500 ml dung dịch nuôi cấy trong 10 ml dung dịch I có chứa 5 mg/ ml lysozym. (Tách plasmid bằng phân huỷ kiềm và lysozym; phá màng tế bào bằng lysozym).

* Để ở nhiệt độ trong phòng 5 phút để lysozym phá huỷ màng tế bào.

* Thêm 20 ml dung dịch II- lắc nhiều lần. Để trong đá 10 phút để phá ADN bộ gen nhân của tế bào.

* Thêm 15 ml dung dịch lạnh, lắc mạnh. Đặt trên đá 10 phút để phá huỷ protein.

* Ly tâm 20.000 vòng/ phút, 20', 4°C. Thu dịch trong, bỏ cặn.

* Lấy mỗi ống 18 ml dịch trong + 12 ml sopropamol trộn đều, nhiệt độ trong phòng 15 phút.

* Ly tâm 12.000 vòng/ phút, 30 phút, nhiệt độ trong phòng để tách lipid.

* Bỏ phần dịch, thu phần kết tủa.

* Rửa bằng ethanol 70%, nhiệt độ trong phòng. Loại hết ethanol bằng làm khô nhẹ trong bình chân không

* Hoà tan lại trong 8 ml dung dịch TE (pH 8,0)

- Đệm TE

Tris HCl pH 8,0 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM.

* Tính nồng độ ADN bằng mật độ quang học OD

* Độ tinh sạch ADN được xác định bằng tỷ lệ: OD_{260/280}

Đánh giá tổ hợp plasmid bằng điện di agarose

* Cho 0,8g agarose vào 100 ml đệm 1 x TAE

* Đun trên bếp cách thuỷ đến tan agarose. Hạn chế bay hơi nước khi đun để tránh tăng nồng độ agarose. Độ dày gel 5mm, sau 30- 40 phút khi gel đã đông cứng thì đổ TAE ngập khuôn rồi gỡ lược ra.

* Đặt mẫu ADN vào giếng

* Giếng đầu tiên cho 1 μ ADN chuẩn (tỷ lệ 1/10 dung dịch màu)

* Các giếng tiếp theo cho các mẫu ADN (có tỷ lệ 1/10 dung dịch màu)

* Cho nhẹ nhàng mẫu ADN vào từng giếng

* ADN mẫu phải pha loãng với đệm TE + dung dịch màu

Chế độ điện di U = 40 V

I = 80 mA

t = 1- 1,5 giờ

* Nhuộm ADN bằng EtBr (ethidium bromide)

* Bản gen được lấy ra nhẹ nhàng khỏi khuôn. Ngâm vào dung dịch chứa EtBr nồng độ 0,5 μ / ml trong 30- 45 phút.

* Rửa bản gel bằng nước sạch 2 lần, mỗi lần 15- 20 phút.

* Quan sát, chụp ảnh dưới ánh sáng tử ngoại UV: soi trên đèn cực tím UV để xác định độ tinh sạch của ADN.

* So sánh với mẫu ADN chuẩn để xác định kích thước của ADN tách được.

* Chụp ảnh bằng phim đặc hiệu cho ánh sáng tử ngoại.

Một công trình điển hình đã được công bố là thành công vi tiêm ADN tinh khiết của khỉ SV40 vào xoang noãn bào của chuột và đã chứng minh là các bản sao ADN tiêm vào đã có mặt trong các cơ quan của cơ thể chuột.

Công trình tiếp đó là đã vi tiêm loại plasmid tái tổ hợp, gồm các đoạn ADN của virus Herpes, virus SV40 gắn trên vector là plasmid vi khuẩn pBR₃₂₂, tiêm thẳng vào trứng thụ tinh của chuột. Chuột con sinh ra từ các hợp tử nói trên, có các đoạn mang ADN lạ đặc thù mới chuyển vào.

Công trình vi tiêm gen insulin của người vào cho chuột, tiêm thẳng vào trứng thụ tinh của chuột, được tiến hành qua vector plasmid.

Plasmid được tạo dòng này gồm một vùng của genom người có kích thước 12,5 kb, gồm toàn bộ gen insulin cùng vector plasmid vi khuẩn pBR₃₂₂ có kích thước 4,3kb. Phôi được vi tiêm nói trên đã phát triển trong tử cung chuột cái nhận nuôi, chuột này mang thai chữa dễ bình thường.

Nói chung, ADN được vi tiêm phải tiến hành trên phôi các giai đoạn sớm, giai đoạn phát triển đầu tiên của phôi, hoặc trên giao tử, tinh trùng, trước khi thụ tinh sẽ dẫn đến khả năng mọi tế bào của cơ thể, mọi tế bào sinh dục sẽ tiếp thu được ADN lạ tiêm vào. Biến nạp gen, vi tiêm ADN trên động vật có vú cũng đã mở ra khả năng truyền các gen kháng bệnh sẵn có trong genom một số động vật của các loài động vật, nhất là các động vật hoang dã, vượt qua được hàng rào sinh học giữa các loài xa nhau về mặt phân loại.

Sử dụng các gen mã hóa các kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody), sẽ dẫn tới làm bất hoạt các tác nhân gây bệnh trong cơ thể động vật, gia súc.

Những đoạn ADN được chọn ra, từ thành phần của gen sinh vật nhân chuẩn, được gắn vào một đoạn của plasmid vi khuẩn, đã được vi tiêm vào tiền nhân (pronucleus) của hợp tử chuột.

Các thí nghiệm đầu tiên của Gordon và cộng sự (1980) đã chứng minh là các phân tử ADN tái tổ hợp, khi được truyền vào tiền nhân (pronucleus) của phôi chuột, sẽ được giữ lại trong phôi đang phát triển.

Chuyển cấy hợp tử đã được vi tiêm vào các con em nuôi hộ (con vật

nhận) không những sẽ tạo ra các động vật truyền gen mà còn tạo được những con vật có khả năng sao mã ADN tiêm vào để sản sinh các sản phẩm protein nguyên (authentic) như *herpes thymidine kinase* (Brinster, 1981).

Các phòng thí nghiệm đã thừa nhận việc sử dụng kỹ thuật vi tiêm để tạo ra động vật truyền gen có các gen mới được biểu hiện như:

- gen β -globin (Stewart, 1982; Wagner, 1981);
- hormon sinh trưởng chuột (Palmiter, 1982);
- transferrin gà (MC Knight, 1983);
- immunoglobulin (Brinster, 1983);
- insulin người (Van der Putten, 1984);
- α -fetoprotein (Krumlauf, 1985).

Kết quả các thí nghiệm trên đã chứng tỏ rõ là vi tiêm gen lạ vào tiền nhân của trứng thụ tinh chuột đem lại kết quả là gen được chuyển vào và được biểu hiện trong các tổ chức con vật.

7. Công nghệ gen tạo giống vật nuôi mới

7.1. Ngành chăn nuôi trong thế kỷ XXI có nhiều giống vật nuôi mới sẽ ra đời bằng công nghệ gen

Trong tạo giống vật nuôi, gia súc cổ truyền, người ta chủ yếu sử dụng phương pháp lai tạo, chọn lọc để cải tạo nguồn gen, nâng cao năng suất, hiệu quả chăn nuôi. Tuy nhiên, do quá trình lai tạo tự nhiên, các động vật lai như trên vẫn còn mang luôn cả các gen không mong muốn, do tổ hợp 2 bộ nhiễm sắc thể nguyên vẹn của tinh trùng con bố và tế bào trứng con mẹ. Một hạn chế nữa là lai tạo tự nhiên như trên chỉ tiến hành được giữa các cá thể trong loài; lai xa, lai khác loài gặp nhiều khó khăn, thường bất thụ do sai khác nhau về bộ nhiễm sắc thể, cả về số lượng lẫn hình thái, giữa bố và mẹ, do cấu tạo cơ quan sinh dục, tập tính sinh dục v. v..., giữa các loài không phù hợp nhau.

Công nghệ gen động vật ra đời, cho phép vượt qua được các khó khăn trên. Có nhiều kỹ thuật, phương pháp khác nhau trong công nghệ gen động vật, để cải tạo các nguồn gen, tạo ra giống mới có các đặc tính di truyền mong muốn, trong đó phổ biến là kỹ thuật truyền gen, vi tiêm ADN (tiêm lượng cực nhỏ ADN tinh khiết). Người ta phải thu nhận

trứng ở giai đoạn tiền nhân (pronucleus) bằng kỹ thuật cho rụng nhiều trứng (siêu rụng trứng, siêu bài trứng). Bằng kỹ thuật vi tiêm, người ta đưa gen lạ, gen mới vào nhân của tinh trùng trong hợp tử.

Nuôi cấy hợp tử trong ống nghiệm cho đến giai đoạn phôi dâu hoặc phôi bào (blastocyte), rồi chuyển cấy vào tử cung con vật nhận, được gây chửa giả. Với các kỹ thuật tiên tiến nêu trên của công nghệ sinh học hiện đại trên vật nuôi, cụ thể là công nghệ gen vật nuôi, người ta đã tạo được các vật nuôi, gia súc có tốc độ lớn nhanh, hiệu suất sử dụng thức ăn cao, tạo các giống gia súc vật nuôi có sức chống bệnh.

Hiện nay có nhiều triển vọng hơn cả là công trình vi tiêm Mx vào lợn, tạo được giống lợn miễn dịch với bệnh cúm (influenza).

Người ta cũng đã thành công, vi tiêm gen IgA vào lợn, cừu, mở ra khả năng tạo được các giống vật nuôi miễn dịch được với nhiều bệnh. Một hướng mới, đầy triển vọng, là vi tiêm một số gen của vi sinh vật vào cơ thể vật nuôi, như đưa gen mã hóa enzyme xúc tác tổng hợp axit amin cystein vào cừu, để tạo giống mới cho năng suất lông cao gấp nhiều lần. Người ta cũng đã tiến hành đưa gen tổng hợp threonine và lysine có nguồn gốc vi sinh vật vào vật nuôi, làm tăng hiệu quả sử dụng thức ăn.

7.2. Tạo giống vật nuôi cung cấp nội quan ghép cho người

Truyền gen ở động vật, vật nuôi sẽ có vị trí đặc biệt quan trọng trong chăn nuôi ở thế kỷ XXI, có thể trở thành một hướng tạo các giống động vật có các đặc tính di truyền mới, mà trong chọn giống thông thường, phải trông chờ vào đột biến tự nhiên không phải luôn luôn có được.

Hiện nay, trên thế giới đã hình thành một thị trường mới, khá độc đáo, mua, bán, kinh doanh các động vật thí nghiệm được truyền gen, tạo ra các động vật mô hình để nghiên cứu các bệnh của người. Đối tượng có triển vọng nhất về mặt này, hiện nay là con lợn. Lợn được truyền gen mới sẽ trở thành một giống vật nuôi độc đáo, cung cấp nội quan ghép cho người. Kỹ thuật truyền gen đã được sử dụng thành công trên nhiều đối tượng động vật. Trên 10 loài động vật đã được ứng dụng nghiên cứu về công nghệ gen: bò, lợn, cừu, dê, thỏ, gà, cá hồi, cá lóc.

Người ta đã có khả năng truyền cấy gen lạ vào cơ thể động vật, ở các pha khác nhau của giai đoạn phôi, giai đoạn thai, và cả ở giai đoạn trưởng thành.

Đầu tiên, người ta thành công tiêm lượng cực nhỏ ADN tinh khiết của virus SV40 vào xoang phôi bào của chuột và đã phát hiện sự có mặt các bản sao ADN nói trên trong các cơ quan của chuột. Chuột con đẻ ra cũng có chứa các đoạn đặc thù của ADN lạ tiêm vào.

Người ta cũng đã thực nghiệm thành công, truyền gen insulin của người vào cho chuột. Phương pháp cụ thể là vi tiêm phân tử ADN tái tổ hợp mang gen insulin của người vào hợp tử của chuột. Sau đó, người ta tách phôi từ cơ thể chuột và chuyển ghép vào tử cung một chuột cái nuôi hộ.

Cho đến nay, trong kỹ thuật truyền gen ở động vật, thì kỹ thuật vi tiêm dung dịch ADN vào một trong các tiền nhân của phôi là phương pháp có hiệu quả nhất trên động vật có vú, các loài thú, và hiện là phương pháp độc nhất được sử dụng.

Người ta phân lập gen, tách gen khỏi cơ thể sống, vi tiêm vào các phôi của vật nuôi, thường là phôi thu nhận được qua kỹ thuật gây rụng nhiều trứng, sau đó chuyển cấy các phôi này vào tử cung các mẹ nuôi.

Gần đây, người ta cũng đã thử nghiệm thành công, truyền gen trực tiếp ADN vào tinh trùng trước khi cho thụ tinh. Đã có thực nghiệm, chỉ đơn giản cho hỗn hợp dung dịch ADN với tinh trùng, kết quả cho thấy, ADN đã xâm nhập được vào tinh trùng.

Các kỹ thuật truyền gen trên động vật, vật nuôi đã thu được nhiều kết quả thực tiễn. Vi tiêm hormone sinh trưởng của chuột cống vào chuột nhắt, đã tạo được chuột nhắt "khổng lồ".

Lợn được tiêm gen về hormone sinh trưởng, sẽ giảm mỡ, nhưng lại sử dụng có hiệu quả hơn khẩu phần ăn. Người ta cũng đã thành công, truyền gen tạo tơ nhện vào tằm, sử dụng tơ nhện này ở tằm để làm quần áo cách nhiệt, bền, đẹp. Người ta cũng thành công vi tiêm gen insulin bò, giống hormone sinh trưởng, đưa vào gia súc tạo được giống gia súc cho thịt không dính mỡ (đưa vào lợn, cừu, dê, gà). Dùng nội quan lợn ghép cho người, giải quyết được khó khăn mua nội quan người sống quá đắt (thận, v. v...), lấy nội quan từ tử thi người bị nạn không có nhiều.

Kỹ thuật ghép nội quan cho bệnh nhân, ghép thận, truyền ghép tuỷ, ghép da v. v... đã trở thành kỹ thuật phổ biến trong y học hiện đại, được tiến hành thành công khá nhiều ngay ở Việt Nam, tại các bệnh viện lớn, các viện quân y. Để khắc phục khó khăn nêu trên, trong việc tìm kiếm,

chạy mua nội quan của người sống để ghép khi cần thiết, người ta đã có phương hướng, dùng nội quan của động vật. Việc ghép các cơ quan của động vật cho người, gặp khó khăn lớn là sự không dung nạp của các cơ quan, do sự không phù hợp nhau về mặt tổ chức học.

Đối tượng có triển vọng nhất để cung cấp nội quan ghép cho người là con lợn. Kỹ thuật truyền gen mới cho lợn có thể dẫn tới "nhân hóa" các cơ quan của lợn, qua đó có thể loại trừ các phản ứng loại thải sau khi ghép cơ quan. Phương hướng của chăn nuôi và của y học hiện đại thế kỷ XXI, là cái tạo một số vật nuôi như lợn, cừu, trong đó lợn là đối tượng thuận lợi nhất cho kỹ thuật truyền gen, để biến lợn thành một đối tượng cung cấp cơ quan để ghép cho người. Dùng con lợn làm đối tượng động vật để sử dụng nội quan của chúng ghép cho người, có những mặt ưu thế, ngay cả khi so sánh với những động vật gần người như linh trưởng.

Lợn là vật nuôi phổ biến, có số lượng chăn nuôi rất nhiều ở các nước, kích thước phủ tạng của lợn tương đương với phủ tạng của người. Các công trình thử nghiệm bước đầu đã cho thấy phủ tạng của lợn phù hợp với công việc cấy ghép hơn so với các động vật khác. Gần đây nhất, ở Mỹ đã cấy ghép thận lợn đã được "truyền gen" cho một bệnh nhân suy thận, kết quả thu được khá khả quan.

Một khó khăn lớn về mặt sinh học, là trong màng tế bào của tất cả các loài động vật, trừ ở khỉ và ở người, đều có galactose. Hệ thống miễn dịch của người khi tiếp nhận galactose từ nội quan ghép, lấy của động vật, sẽ có phản ứng loại thải.

Ngày nay, ở một số nước như Mỹ, Anh, Pháp, Nga, *đang có hướng tạo giống lợn không có galactose trong màng tế bào*, để loại trừ phản ứng đào thải miễn dịch khi cấy ghép nội quan lợn cho người. Người ta còn phải, về cơ bản, tạo được *sự trung hòa miễn dịch*, cho phép cơ thể người tiếp nhận phủ tạng ghép lấy từ lợn, bằng cách "nhân hóa" (humaniser) con lợn: cấy ghép vào lợn các gen của người, để triệt bỏ phản ứng loại thải cơ quan phép xảy ra ở bệnh nhân, sau khi ghép, từ đó cơ thể bệnh nhân mới dung nạp được nội quan ghép.

Gần đây nhất, người ta đã công bố rộng rãi trên thông tin đại chúng, thành tựu tạo ra một giống lợn mới mang gen của người, tức đã được "nhân hóa" giống lợn này dùng vào hướng cung cấp nội quan để ghép cho người bệnh.

7.3. Công nghệ gen động vật sản xuất các loại protein quý, đặc hiệu

Công nghệ gen động vật đã có nhiều thành tựu sản xuất các loại protein quý, đặc hiệu, thông qua tuyến sữa của các động vật bậc cao. Những loại protein quý này không thể sản xuất bằng con đường vi sinh vật hoặc qua sinh vật thấp, do các sinh vật này không đủ hệ enzym để sản xuất ra những loại protein quý, phức tạp, các loại protein tái tổ hợp.

Bằng kỹ thuật di truyền, gắn gen cấu trúc với promotor là β -lactoglobulin, *điều khiển sự biểu hiện của gen ở tuyến sữa*, người ta đã sản xuất qua sữa dê, chất hoạt hóa plasminogen mô người (human tissue plasminogen activator), chất làm tăng đông máu. Chất này được tiết ra qua tuyến sữa nhờ promotor β -lactoglobulin. Hãng Genetech Mỹ hàng năm thu được 196,4 triệu USD qua sản xuất protein này.

Phương pháp sử dụng tuyến sữa động vật bậc cao để sản xuất ra các protein quý, đầu tiên được Clark, 1989, đề xuất. Khi đưa tổ hợp gen cấu trúc cùng với promotor β -lactoglobulin vào cừu, chuột, Clark thấy chúng được biểu hiện rất cao ở tuyến sữa. Bằng phương pháp trên, người ta cũng đã tổng hợp được α_1 -antitrypsin người trong sữa của cừu cái (nồng độ 35mg/ml).

Hiện người ta đang có hướng sản xuất hormone sinh trưởng người qua sữa thỏ, giảm được giá thành so với tổng hợp qua vi sinh vật, chu kỳ sinh sản của thỏ cũng ngắn, lượng protein sữa cao. Theo phương pháp trên, yếu tố làm đông máu IX (bloat clotting factor IX) cũng đã được sản xuất qua sữa của cừu, chuột (5mg/ml). Các công trình thực nghiệm và các thành tựu sản xuất thực tiễn nêu trên cho thấy sữa các động vật truyền gen là một hệ thống có ưu thế để sản xuất các protein quý trong cơ thể sống, mở ra một lĩnh vực công nghệ hiện đại sử dụng các gia súc như thỏ, cừu, dê, lợn, bò để sản xuất protein đặc hiệu.

8. Sản xuất vaccin bằng công nghệ gen

Các vaccin (vaccin) thế hệ mới đã được sản xuất, hoặc từ riboxom từng loại vi khuẩn gây bệnh, hoặc từ các mảnh của virus, từ glycoprotein của virus.

Một hướng sản xuất vaccin bằng công nghệ di truyền, kỹ thuật gen, đây là *vaccin chế từ vi khuẩn (hay nấm men) tái tổ hợp*, có mang gen mã

hóa tổng hợp một protein kháng nguyên của một virus hay một vi khuẩn nào đấy.

Trong các loại vaccine sản xuất bằng công nghệ di truyền, có vaccine viêm gan B, vaccine đại kiểu mới, vaccine tả kiểu mới, vaccine sốt rét, phong.

8.1. Vaccine viêm gan B

Virus viêm gan B (HBV) là virus ái gan (hepatotropic) có vỏ ngoài là lipoprotein, gồm 3 protein, vỏ trong (capsid) gồm 1 protein.

Kháng nguyên bề mặt là protein chính của vỏ ngoài, kháng nguyên này được phát hiện trong máu người bị nhiễm.

Lấy gen tổng hợp kháng nguyên của virus viêm gan B ghép vào *E.coli*, sau đó nhân lên ở quy mô công nghiệp các vi khuẩn mang gen tái tổ hợp. Hệ gen của virus được bọc trong capsid, chứa 3200 gốc nucleotit.

ADN của virus HBV có cấu tạo chuỗi kép chỉ trên một phần chiều dài của nó, còn nửa là ADN sợi đơn. Sau khi virus xâm nhập vào tế bào gan, ADN virus sẽ sao mã trong nhân tế bào, tạo ra rất nhiều phân tử ARN nhờ ARN- polymeraza của tế bào chủ.

ARN này gọi là tiền hệ gen chứa 3500 nucleotit, một ARN khác gồm 2100 nucleotit cũng được tổng hợp. Cả hai ARN trên đều mã hóa protein của virus. Các protein capsid bao quanh tiền hệ gen và ADN- polymeraza và được vận chuyển vào bào tương tế bào gan. ARN tiền hệ gen được dịch mã, tạo ra ADN, nhờ một enzym ADN- polymeraza, tác dụng như một transcriptaza ngược của retrovirus. *ADN virus có thể được biến nạp vào nhiễm sắc thể tế bào chủ.*

8.2. Sản xuất vaccine chống bệnh Newcastle ở gia cầm

Newcastle là một dạng bệnh toi gà (Foul pest), do virus gây ra ở gia cầm, chim, đặc biệt là gà.

Virus này thuộc nhóm Paramyxovirus, bao gồm cả virus quai bị. thuộc họ *Paramyxoviridae*. Họ này bao gồm cả virus gây bệnh lợn gạo. Paramyxovirus là virus mang ARN sợi đơn. Mỗi hạt virus (virion) được bao bọc bởi ít ra là 6 protein đặc trưng của virus.

Có 2 glycoprotein kết hợp với lipid trong vỏ virus, đây là haemagglutinin và fusion protein (F). Glycoprotein thuộc loại

haemagglutinin của virus có thể tìm được các thụ quan (receptor) ở bề mặt hồng cầu nhiều loài chim và gia cầm, làm ngưng kết hồng cầu. Năm 1986, người ta đã gắn được gen mã hóa tổng hợp protein F với lipid vỏ của virus và dùng để sản xuất vaccin, loại protein này có khả năng gây miễn dịch.

8.3. Sản xuất vaccin chống bệnh lở mồm long móng

Bệnh lở mồm long móng (foot and mouth disease) là loại bệnh do virus, lây lan rất nhanh, gây bệnh cho khoảng 30 loài động vật móng guốc, đặc biệt nguy hiểm đối với trâu, bò, cừu, lợn.

Khi có dịch, để tránh bệnh lây lan, người ta phải tiêu diệt hàng loạt gia súc bị nhiễm bệnh và thực hiện các biện pháp cách ly nghiêm ngặt.

Vaccin hiện có là có hiệu quả, nhưng sản xuất theo quy mô công nghiệp có nhiều khó khăn, đòi hỏi sử dụng một số lượng lớn các virus có độc lực:

- Nhiều chủng (strain) virus không thể nuôi số lượng lớn để cung cấp kháng nguyên làm vaccin.
- Virus này rất không ổn định, nhất là ở pH nhỏ hơn 7, vì vậy phải luôn luôn giữ trong lạnh.
- Sự đa dạng của các typ virus này (7 typ) và các typ phụ (65 typ phụ) buộc phải sản xuất các vaccin đa trị, như tam trị (trivalent vaccine)

Virus gây lở mồm long móng (FMDV- foot and mouth disease virus) là virus có dạng hình cầu, dưới kính hiển vi điện tử có đường kính 28nm, trọng lượng phân tử 7×10^6 dalton, virus này mang ARN sợi đơn, gồm 8000 nucleotit, được bao bởi một vỏ (capsid) gồm 60 mẫu protein thuộc 4 loại VP₁, VP₂, VP₃ và VP₄.

Năm 1969, theo tờ Tin tức công nghệ di truyền (genetic technology news, 5- 1983), Wild, Burranghs và Brown (Anh) đã dùng enzym trypsin xử lý vỏ protein của virus này, nhận thấy có một trong số các protein của nó có thể tạo được miễn dịch, kích thích sản sinh kháng thể.

Năm 1973, Laporte (INRA, Pháp) đã tinh chế thành công loại protein này và xác định được gen mã hóa protein VP₁.

Kleid, đã đưa vào plasmid pBR₃₂₂ của *E.coli*, một ADN bổ sung mã gen của một ARN dài 2000 nucleotit mã hóa protein VP₁.

Người ta tách dòng (cloning) được gen này trong tế bào *E.coli*, nhờ đó tạo được lượng đáng kể protein virus gắn với một phần protein của vi khuẩn, kháng nguyên là *protein tái tổ hợp* này tỏ ra ổn định, giữ được hiệu quả tạo miễn dịch cả sau khi đun 100°C.

Bò, lợn được tiêm protein này trở nên miễn dịch đối với loại virus này.

Nói chung, sản xuất vaccin tổng hợp là một lĩnh vực phát triển mạnh của công nghệ di truyền và kỹ thuật di truyền.

Hiện nay, người ta đang tạo các chủng vi khuẩn sản xuất kháng thể miễn dịch. Ở Anh, người ta đã tạo được các chủng vi khuẩn tổng hợp kháng thể miễn dịch cúm.

9. Sản xuất các loại hormone sinh trưởng bằng công nghệ gen

Somatotropin (STH) là hormone sinh trưởng ở người (human growth hormone). Đây là kích thích tố sinh trưởng, được tạo ra từ tế bào α của tuyến yên. Bệnh lùn là do thiếu STH. Năm 1980, người ta tiến hành tái tổ hợp gen này, mỗi lít dịch lên men thu được 2,4 mg. Trước đây, để chữa bệnh lùn, phải lấy từ tử thi, mỗi tử thi chỉ cho được 4- 6 mg.

Sinh tổng hợp các hormone sinh trưởng của gia súc bằng các loài vi sinh vật

- Gen hormone sinh trưởng gà đã được đưa vào tế bào vi khuẩn, tổng hợp ra hormone này. Đã sản xuất đủ để thử nghiệm ở Mỹ, làm tăng 15% sức tăng trưởng của gà.

- Hormone sinh trưởng bò (bovine somatotropin) được sản xuất nhờ *E.coli*, bằng kỹ thuật di truyền, tiêm hàng ngày vào cơ thể bò, tăng được 10- 12% sản lượng sữa mà không cần tăng khẩu phần. Đã được sản xuất bán rộng rãi ở Mỹ.

- Hormone sinh trưởng lợn (porcine somatotropin) được tổng hợp bằng kỹ thuật di truyền do hãng Biogen (Mỹ), có tác dụng khi tiêm vào lợn, làm lượng mỡ giảm 70%, trong khi ấy lợn chỉ cần sử dụng 70% lượng thức ăn nuôi bình thường.

IV. LAI PHÂN TỬ-KỸ THUẬT MỚI ĐỂ CHẨN ĐOÁN NHIỄM KHUẨN

Một thành tựu mới trong chẩn đoán bệnh nhiễm khuẩn mang tính đặc hiệu, đã được phát triển rất nhanh những năm gần đây, là việc sử dụng kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies) và sự phát triển các *mẫu dò gen* (gene probes).

Kháng thể đơn dòng có thể được sử dụng để kiểm tra bất kỳ loại bệnh gì ở gia súc và người. Một ví dụ điển hình là sử dụng kháng thể đơn dòng chống lại loại trực khuẩn *E.coli* gây độc tố đường ruột, có lông (pili) k.99.

Trong nhiều hệ thống mô hình phòng, chữa bệnh mới sử dụng kỹ thuật di truyền, người ta đã cho tách dòng, làm tinh khiết các hoạt chất đặc hiệu như interferon, interkeulin, các yếu tố làm hoại sinh ung thư.

Các kiểu liệu pháp trên đây chính là theo hướng sử dụng ngay cơ chế chống bệnh tự nhiên của động vật để phòng ngừa và chống lại nhiễm khuẩn, với biện pháp kích thích bản thân hệ thống miễn kháng tự nhiên của động vật để chống lại nhiễm khuẩn.

1. Lai phân tử axit nucleic

Lai phân tử axit nucleic được dùng để chẩn đoán các trường hợp nhiễm trùng mà những phương pháp cổ truyền, kinh điển không thể phát hiện được gen gây bệnh.

Để chẩn đoán nhiễm trùng qua lai phân tử, người ta dùng một mẫu dò axit nucleic đặc trưng, cho lai với axit nucleic gen gây bệnh, trực tiếp trên tiêu bản.

Trong các loại phương pháp truyền thống để chẩn đoán nhiễm trùng, thì ngoài phương pháp chẩn đoán huyết học ra, người ta vẫn tiến hành tách gen gây bệnh, khuếch đại chúng trong một hệ thống sinh học và tiếp ngay sau đó là xác định tác nhân gây bệnh qua phân tích các đặc tính kiểu hình.

Để chẩn đoán nhiễm trùng bằng cách xác định trực tiếp gen gây bệnh trên tiêu bản bệnh, ngày nay người ta dùng rộng rãi hai kỹ thuật:

- phát hiện kháng nguyên bằng kỹ thuật miễn dịch học.
- *phát hiện axit nucleic qua lai phân tử.* Lai phân tử cho phép chẩn

đoán các trường hợp nhiễm trùng mà không thể phát hiện được kháng nguyên.. Ví dụ, đối với các *axit nucleic của gen gây bệnh nằm ngoài nhiễm sắc thể hoặc loại hòa nhập, không được biểu hiện rõ qua kiểu hình*, thì phương pháp lai phân tử vẫn cho phép chẩn đoán được.

2. Mẫu dò trong lai phân tử

Như ta biết, ngày nay có hai phương pháp dùng mẫu dò, phương pháp mẫu dò đánh dấu phóng xạ và phương pháp mẫu dò không dùng phóng xạ.

Mẫu dò đánh dấu phóng xạ với hoạt tính đặc biệt cao được dùng để *phát hiện axit nucleic đặc thù của gen gây bệnh trực tiếp trên tiêu bản*.

Các mẫu dò này được dùng rộng rãi để *xác định mức giống nhau giữa các genom*: gen gây bệnh của virus, các đoạn gen nằm ngoài nhiễm sắc thể và đoạn gen của virus hòa nhập trong tế bào, qua đó chẩn đoán nhiễm trùng và các bệnh di truyền.

Nhưng phương pháp lai dùng mẫu dò đánh dấu phóng xạ có những hạn chế như đã nói ở phần trên, nhiều loại đồng vị phóng xạ có thời gian bán rã ngắn (short half- life), khó bảo quản lâu, nên chóng phải hủy bỏ, không thể dùng tiếp cho nhiều lần lai, không an toàn cho người và giá thành đắt.

Mẫu dò không đánh dấu phóng xạ. Người ta dùng *biotin*, tạo các mẫu dò biotin. Sau khi lai, *biotin gắn vào mẫu dò có thể được phát hiện bằng enzym qua phương pháp miễn dịch học hoặc bằng miễn dịch huỳnh quang* mẫu dò biotin được dùng rộng rãi để *phát hiện gen gây bệnh ngay trên tiêu bản bệnh, qua lai tại chỗ (insitu)*.

Hệ thống mẫu dò biotin có nhiều lợi thế:

- được bền vững, ổn định một vài năm ở nhiệt độ 4°C;
- có thể phát hiện axit nucleic ở hàm lượng rất thấp, mức picogram;
- có thể phát hiện rất nhanh qua lai phân tử;
- các nghiệm pháp lai này có thể sử dụng trong điều kiện bệnh viện, cơ sở sản xuất.

3. Sản xuất mẫu dò

Để chẩn đoán nhiễm trùng qua lai phân tử, người ta có 3 phương pháp chính để tạo ra mẫu dò.

- Các đoạn gen hoặc ADN bổ trợ, hoặc ARN của gen gây bệnh có thể được tạo dòng, gắn vào một vector. Tùy theo hệ thống vector được dùng, có thể cho ra mẫu dò ADN hoặc ARN.

- Bản thân gen gây bệnh có thể được khuếch đại, có thể tách chiết axit nucleic ra và đánh dấu để làm mẫu dò.

Nếu đã biết trình tự đoạn gen cần nghiên cứu, thì có thể tổng hợp ra mẫu dò bổ trợ. Ngày nay, người ta đã có *công nghệ tổng hợp các đoạn đồng nhất* (oligomer) chứa 20- 50 nucleotid (Kerschner, 1986).

Việc tạo ra các mẫu dò được tạo dòng, tiến hành qua các bước sau đây:

- phân lập đoạn axit nucleic cần phân tích;
- tạo dòng đoạn trên trong một hệ thống vector thích hợp;
- khuếch đại đoạn này trong hệ thống vật chủ;
- đánh dấu;
- thể hiện hiệu quả của mẫu dò qua lai phân tử.

Việc tạo dòng các dòng axit nucleic để làm mẫu dò trong chẩn đoán bằng lai phân tử, ngày nay được tiến hành qua sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp, trong đó enzym cắt giới hạn đóng vai trò trung tâm.

Cho đến nay, genom của hầu hết các gen gây bệnh đều chưa được xác định trình tự hoặc thiết lập thành bản đồ, phương pháp điển hình hiện nay là cho khuếch đại thành số lượng cần thiết các gen gây bệnh, làm tinh khiết các axit nucleic và cắt đoạn với các enzym cắt giới hạn đặc thù.

Các đoạn ADN thường được gắn vào vector, đưa vào vi khuẩn, ở đây chúng được tái bản và dễ dàng được khuếch đại và làm tinh khiết.

Các phân tử *ARN không thể được trực tiếp tạo dòng, tách dòng.* Đầu tiên chúng phải được chuyển ngành ADN qua enzym sao ngược, tách từ retrovirut. Bản sao cADN này được chuyển thành ADN sợi kép dưới xúc tác của ADN- polymeraza, và sau đó được tạo dòng, tách dòng như thế. Với kỹ thuật mẫu dò, lai phân tử axit nucleic đã được sử dụng rất có triển vọng trong chẩn đoán lây nhiễm ký sinh trùng.

Ngày nay, các mẫu dò ADN đã được tổng hợp để phát hiện và xác định các nhân tố gây bệnh trong nhiễm ký sinh trùng ở động vật có

xương và ở sâu bộ truyền bệnh, như sốt rét (malaria), trypanosomiasis (trypanosom), filariasis.

Kỹ thuật mẫu dò đã có thể phát hiện trực tiếp *Plasmodium* trên tiêu bản máu.

Trong hệ thống mẫu dò này, người ta đã sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp tạo ra thư viện bộ gen (genomic library) của *Plasmodium falciparum* (Barker, 1986).

Kết quả kiểm tra cho thấy mức độ chính xác cao của mẫu dò. Mẫu dò chỉ được lai với tiêu bản máu lấy từ người bị bệnh do *Plasmodium falciparum*, chứ không lai với tiêu bản máu lấy từ người bệnh do một ký sinh trùng khác là *Plasmodium vivax*.

Trong ứng dụng chẩn đoán nhiễm trùng sốt rét hệ thống mẫu dò còn có thể giúp phát hiện các dòng kháng thuốc và dòng mẫn cảm thuốc.

Các phương pháp phân tích genom hiện đại còn được tiến hành ngay trên ADN thai, được tách từ tế bào thai bong ra trong dịch ối, để chẩn đoán trước khi sinh các triệu chứng bệnh lý như thiếu máu do hồng cầu liềm, thalassemia. Một ví dụ thực tiễn là site cắt giới hạn Hpa I thường liên kết với gen hồng cầu liềm trong genom người Mỹ da đen (Kau và Dozg, 1978).

Trong các thành tựu sử dụng lai phân tử để chẩn đoán nhiễm trùng ở gia súc, phải kể đến thực nghiệm dùng lai phân tử (Dot-blot hybridization) phát hiện các axit nucleic của virus herpes bò loại I (bovine herpes virus type- I, BHV- I).

Axit nucleic đích (target nucleic acid species) phải được phân lập từ các tổ chức (mô) của vật chủ trước khi đưa lên màng lọc nitrocellulose. Các mô hoặc tế bào này được làm vỡ bằng các kỹ thuật cơ học hoặc được xử lý hóa chất, với enzyme làm tan màng từ đó tách axit nucleic bằng phenol, dioxoforme.

4. Dùng vectơ là thực khuẩn thể M_{13}

M_{13} là một thực khuẩn thể của *E.coli*, đặc trưng cho loại vi khuẩn F^+ . Genom của phage này thuộc dạng sợi đơn ADN vòng, khoảng 6.4 kb. Khi phage này lây nhiễm vào vi khuẩn, ADN sợi đơn của nó được chuyển thành ADN sợi kép, dạng tái bản (replicative form, RF).

RF được hình thành với số lượng lớn các bản sao của nó, trong cơ thể vi khuẩn chủ, sẽ được sử dụng *làm khuôn mẫu để tổng hợp ra các thể hệ ADN phage*.

Vi khuẩn bị nhiễm phage M_{13} không bị huỷ tiêu (sinh tan) mà lại tiếp tục sản sinh các thể hệ phage mới qua hình thức "bản" các hạt phage mới sinh qua thành tế bào của vi khuẩn.

Người ta đã sử dụng *ADN sợi đơn của phage M_{13} để sản xuất các mẫu dò ADN đặc hiệu*. Qua lai phân tử, người ta có thể tạo ra các cấu trúc tái tổ hợp mang gen gây bệnh đặc hiệu. Người ta cho các vi khuẩn đã lây nhiễm phage M_{13} phát triển trên đĩa agar. Sau khi trên đĩa đã phát triển nhiều tập đoàn vi khuẩn, người ta bọc đĩa vào một màng lọc. Vi khuẩn phát triển từ các tập đoàn, hoặc phage xuất hiện trên bản, sẽ *bám vào màng lọc* và tiếp tục tái bản.

Màng lọc này được xử lý bởi NaOH để *làm sinh tan vi khuẩn* và làm *biến tính ADN*. Màng lọc được đặt vào chân không (vacuo) để *ADN bám vào cơ chất*. *Mẫu dò thiết kế từ genom gen gây bệnh* được đặt vào màng lọc để cho lai. Sau quá trình lai xảy ra, các phân tử lai mang gen gây bệnh được tách ra và đưa khuếch đại.

V. CÔNG NGHỆ TĂNG SINH SẢN

1. Cấy truyền hợp tử

Cấy truyền hợp tử ở động vật có vú đã được đưa vào công nghệ tăng sinh sản (reproductive technology) từ 1970. Công nghệ cấy truyền hợp tử (embryo transfer) là kết quả của những bước tiến lớn trong sinh học phát triển và sinh học phân tử. Các vi thao tác trên phôi các loài vật nuôi đều được tiến hành trong ống nghiệm (*in vitro*), sau khi lấy phôi ra từ động vật cho (donor) và trước khi cấy phôi vào động vật nhận (recipient), bao gồm các thao tác như:

- phương pháp tách phôi thành hai hay nhiều phần;
- phương pháp phối hợp hai hay nhiều phôi thành một thể khảm (chimarea);
- phương pháp làm biến đổi các thành phần trong tế bào của phôi khi mới phát triển.

Kỹ thuật vi thao tác phôi bắt nguồn từ các thao tác trên động vật thí nghiệm (Mont, 1987), trên nền các phát hiện về cơ chế phân hóa phôi sớm; các cơ chế phát triển cá thể được phát hiện ở động vật không xương sống, sau đó đến động vật có xương sống bậc thấp và cuối cùng được ứng dụng trên động vật có vú.

Các thực nghiệm đầu tiên đã chứng minh được là những tế bào phôi (blastomere) tách từ phôi hai tế bào có khả năng được phát triển thành phôi hoàn chỉnh, đồng thời cho kết hợp 2 hợp tử ở chuột có thể hình thành một cơ thể dạng khảm. Thực nghiệm vi thao tác phôi động vật có vú được tiến hành đầu tiên trên thỏ.

2. Bảo quản phôi

Đây là công đoạn tiến hành trước khi cấy truyền phôi vào con vật nhận, tạo điều kiện bảo đảm có thể vận chuyển phôi đi xa, và không cần phải gây động dục đồng thời cho con vật nhận ngay sau khi vi thao tác lấy phôi ra từ vật cho. Trong thực tiễn cấy truyền phôi, bảo quản lạnh phôi được tiến hành trong nitơ lỏng (-196°C) đối với tất cả các vật nuôi, trừ lợn. Ở bò, kỹ thuật đông lạnh phôi có thể dẫn tới kết quả thụ thai khoảng 80% (Leibo, 1986), trong đó đối với phôi nguyên, kết quả cao hơn đối với phôi thao tác do tác động của các yếu tố thao tác khi tách phôi (Picard, 1985).

3. Tạm thời nuôi cấy phôi trong cơ thể sống

Người ta đã tiến hành nuôi cấy tạm thời phôi các gia súc, vật nuôi trong các loại hệ thống sống khác nhau:

- ống dẫn trứng của cừu, chuột, thỏ; tử cung của bò cái; xoang màng bụng (phức mạc, periton) của chuột; xoang ôi phôi gà.

Hầu hết các hệ thống nêu trên đều được sử dụng cùng với các vi thao tác, nói chung đều cần đến kỹ thuật bọc phôi trong một loại chất bảo vệ, thường là agar, để bảo vệ màng trong suốt không bị thương tổn (zone pellucida).

4. Kỹ thuật bọc phôi bằng agar

Người ta dùng dung dịch agar trong 0,9% NaCl. Trước khi thao tác, cho nóng chảy agar, sau đó làm nguội agar ở 39°C , vừa không quá nóng

đối với phôi, nhưng còn có thể nhỏ giọt qua ống nhỏ giọt. Việc bọc agar quanh phôi phải tiến hành rất nhanh, để agar chưa kịp đông lại.

Trước khi bọc vào agar, các phôi đã mở màng trong suốt phải được nhúng vào huyết thanh bê đã được đun ấm. Mục đích của thao tác nêu trên là để không làm tổn thương tế bào phôi.

5. Kỹ thuật nuôi cấy tạm thời phôi trong ống dẫn trứng cừu, thỏ

Người ta lấy một hoặc hai khối agar bọc phôi, chuyển vào ống dẫn trứng của cừu cái, kèm một lượng tối thiểu môi trường. Cừu cái phải được tạm ngừng sinh dục (anestrous), không động dục (diestrous) hoặc không chửa trong thời gian nuôi cấy. Các điều kiện nêu trên có thể xảy ra nếu trước ngày thao tác cấy phôi, người ta tiêm vào tử cung progesteragen. Các phôi bình thường sẽ đi vào tử cung ở giai đoạn 8 đến 16 tế bào.

Đến đây, người ta đã có thể tách phôi khỏi agar. Ống dẫn trứng của thỏ đã được sử dụng rộng rãi để cấy phôi động vật, cấy các hợp tử đã được thụ tinh trong ống nghiệm. Để cấy ống dẫn trứng thỏ, các phôi cần được bọc bởi một lớp mỏng muxin. Thường, người ta dùng ống dẫn trứng của thỏ để nuôi cấy tạm thời phôi lợn. Kỹ thuật nuôi cấy tạm thời phôi trong tử cung của bò được sử dụng để nghiên cứu các pha sớm trong quá trình hình thành thể khảm ở phôi bò. Xoang ối của gà được sử dụng để nuôi cấy phôi của chuột, dê, mèo, bọc trong các khối agarose, chuyển vào xoang ối của phôi gà.

Chương VII

ĐỈNH CAO KHOA HỌC = DI TRUYỀN HỌC 2001

A. NHÂN BẢN VÔ TÍNH ĐỘNG VẬT

I. KHÁI NIỆM CƠ BẢN

Vấn đề tạo dòng vô tính được phát triển ngày nay trong công nghệ sinh học hiện đại, công nghệ di truyền, công nghệ gen, xuất phát từ các khái niệm cơ bản trong sinh học. Như ta biết, từ xưa, người ta đã nêu lên và phân biệt hai hình thức sinh sản trong sinh giới.

Sinh sản vô tính là sự sinh sản trong tự nhiên, không kèm theo tái tổ hợp di truyền, được thực hiện với cơ chế tế bào học là phân bào nguyên nhiễm (mitose), trong đó genom được tái bản nguyên vẹn.

Hình thức sinh sản tiến hóa hơn, ưu việt hơn và phức tạp hơn, đây là sinh sản hữu tính, là sự sinh sản có kèm theo tái tổ hợp di truyền, với cơ chế tế bào học là có cả phân bào nguyên nhiễm và phân bào giảm nhiễm (meiose). Phân bào giảm nhiễm bảo đảm cho tính ổn định, đặc trưng của từng loài sinh vật, bộ nhiễm sắc thể được ổn định ở dạng lưỡng bội $2n$ (đối với sinh vật nhân chuẩn, eukaryote). Tái tổ hợp di truyền dẫn đến tính đa dạng sinh học (biology diversity), đa dạng trong loài, tạo ra một phổ thích ứng rộng của các loài, từ đó bảo đảm cho sự tiến hóa của loài. Sinh sản hữu tính là hình thức sinh sản phổ biến trong sinh giới, trong khi đó, sinh sản vô tính chỉ tồn tại ở những cơ thể có cấu trúc tương đối đơn giản, thấy nhiều ở thực vật, như hình thức sinh sản sinh dưỡng, giâm cành, v. v...

Ở động vật bậc cao, sinh sản vô tính chỉ tồn tại ở giai đoạn phát triển sớm, hoặc dưới hình thức biến dạng của sinh sản hữu tính, như hình thức đơn tính sinh.

II. TẠO DÒNG VÔ TÍNH Ở ĐỘNG VẬT

Nói một cách đơn giản, đây là kỹ thuật nhân nhiều cá thể từ những tế bào vô tính (non- sexual cells).

Năm 1952, Robert Briggs và Thomas King đã thành công trong thí nghiệm sau đây. Hạch của một trứng (noãn bào) của ếch có thể được thay bằng hạch lấy từ một tế bào phôi của một phôi nang (late blastula) của một con ếch khác. Trứng được tiếp tục lớn lên, phát triển ra một con ếch trưởng thành, về mặt di truyền, giống hệt con ếch cho hạch. Bằng kỹ thuật này, người ta có thể sản xuất ra số lượng lớn những con ếch giống hệt nhau về mặt di truyền.

Thành công thực nghiệm nói trên chứng minh cho giả thiết là mỗi tế bào phôi sớm khi hình thành, đã chứa đựng mọi nhân tố cần cho sự phát triển đầy đủ của một cá thể. Với lưỡng cư (ếch nhái), kỹ thuật này cho ra kết quả, với các điều kiện thao tác chính xác không làm tổn thương các tế bào ở giai đoạn phôi nang, rồi lấy hạch của chúng đưa vào một trứng (noãn bào) đã rút hạch ra, hoạt hóa chúng. Các noãn bào đã phát triển thành nòng nọc bình thường. Nhưng với động vật bậc cao, động vật có vú, thì vấn đề còn khó khăn, không phải đơn giản như đối với lưỡng cư, cũng như không dễ dàng như cây cà rốt, cây phong lan, v. v... mọc lên được từ một tế bào nuôi cấy.

Về mặt cơ bản, như ta đã biết, sinh sản vô tính là sự sinh sản không kéo theo tái tổ hợp di truyền, cơ sở tế bào học ở đây là phân bào nguyên nhiễm.

Sinh sản hữu tính là sự sinh sản kéo theo tái tổ hợp di truyền, cơ sở tế bào học là phân bào giảm nhiễm. Hình thức sinh sản này có tính ưu việt hơn, là dạng phổ biến trong sinh giới, qua tái tổ hợp di truyền bảo đảm tính ổn định của loài, đồng thời tạo ra tính đa dạng sinh học (diversity) trong loài, tạo một phổ thích ứng rộng của loài, do đó đây chính là nguyên liệu, cho tiến hóa.

Sinh sản vô tính chỉ tồn tại ở những sinh vật, cơ thể có cấu trúc tương đối đơn giản, còn ở động vật bậc cao, sinh sản hữu tính là hình thức sinh sản phổ biến, còn sinh sản vô tính chỉ thấy ở giai đoạn phát triển sớm hoặc là biến dạng của sinh sản hữu tính.

Ở thực vật, trong sinh sản sinh dưỡng, sinh sản vô tính, như giâm cành, v. v..., dòng vô tính (clone) là tập hợp các cây có xuất xứ từ một cây

(clone là từ chữ Hy Lạp "klon" là cành), hình thành qua sinh sản vô tính.

Nói cách khác, có thể từ một cơ thể ban đầu, tách ra một hay nhiều phần và mỗi phần sẽ phát triển thành một cá thể mới.

Phần tách ra đó có thể là một phần cơ thể, một cơ quan, một cụm tế bào, hoặc chỉ là một tế bào.

Tạo dòng (cloning), tức tạo clone, hay cụ thể hơn là tạo dòng vô tính, bao hàm toàn bộ các kỹ thuật nêu trên, là tạo ra một tập hợp cơ thể giống hệt nhau về mặt di truyền.

Khả năng tạo dòng vô tính dựa trên quan điểm cho rằng mọi tế bào (hàng triệu, tỷ v.v...) của một cơ thể đa bào đều xuất phát từ một tế bào hợp tử ban đầu qua phân bào nguyên nhiễm, do đó nhân của chúng hoàn toàn giống nhau về mặt di truyền.

Trong trồng trọt, trong nghề trồng hoa, kỹ thuật này được dùng nhiều, cho cả các loài thực vật bậc cao.

Nhưng đối với động vật, đặc biệt động vật bậc cao, thì còn quá phức tạp.

Sinh sản vô tính ở động vật cũng xảy ra trong tự nhiên.

Đồng sinh cùng trứng ở người và động vật là một ví dụ, phôi ở giai đoạn sớm đã tách ra thành 2, hoặc 3, 4..., tức sinh 2, 3, 4 con (đồng sinh, cùng trứng).

Một số loài côn trùng, chỉ sinh sản vô tính. Con cái đẻ ra các trứng không giảm phân, các trứng đó phát triển trình sản thành con cái, qua nhiều thế hệ. Mẫu sinh tự nhiên ở cá diếc bạc là một ví dụ điển hình (đã nêu trong mẫu sinh lưỡng bội hóa).

Tuy nhiên, ở đây có khác ở thực vật, sinh sản vô tính này là từ trứng đã được thụ tinh, do đó thực chất đây là sự biến dạng của sinh sản hữu tính.

Công trình tạo toàn tằm cái của Astaurôp (đã nói trong di truyền giới tính), chính là sử dụng kỹ thuật nói trên, tạo dòng tằm vô tính. Kỹ thuật tách chẻ phôi, cấy phôi ở giai đoạn đang phân chia (blastomeres), 2, 4 hoặc 8 tế bào, rồi ghép vào vật "nuôi hộ" đã có thể cho ra nhiều cá thể từ một phôi.

III. VỀ CÔNG TRÌNH TẠO RA CON CỪU DOLLY

Đây là thành công của Wilmut và Campbell (Ecosse, vùng Bắc nước Anh).

Đối tượng nghiên cứu ở đây không còn là những tế bào phôi nang, mà là những tế bào lấy ra từ tuyến vú một cừu cái Finn Dorset, sáu năm tuổi, lông trắng, ở thời kỳ 3 tháng cuối từ khi cừu mang thai, là thời kỳ tế bào tuyến vú đã được biệt hóa (differentiation) cao độ và phát triển.

Dem nuôi cấy *in vitro* các tế bào tuyến vú, để 5 ngày một môi trường nuôi cấy rất nghèo huyết thanh, với mục đích làm cho chu kỳ tế bào giảm từ từ cho tới khi ngừng hoàn toàn. Giai đoạn này được gọi là G_0 . Sau đó, làm giá lạnh trước khi đưa mỗi tế bào tuyến vú vào một noãn (trứng) chưa thụ tinh, đã rút nhân của một cừu cái khác, đầu đen (blackface). Kết quả, một tế bào mới đã được hình thành, phát triển, tạo thành phôi.

Ở đây có sự phối hợp của hai kỹ thuật, một là hoạt hóa trứng đã lấy nhân ra của cừu đen, và hai là làm ngưng chu kỳ sống của tế bào tuyến vú cừu trắng, tức là những tế bào soma đã biệt hóa cao độ, tách từ một cơ thể trưởng thành, ở đây đã thành công trong kỹ thuật dung hợp tế bào (fusion). Thành công này vượt lên các công trình trước đó, từ 1992 đã thất bại, chủ yếu là do các tế bào phôi sử dụng để chuyển nhân không được định vị ở giai đoạn G_0 (như trường hợp tạo cừu Dolly), mà đã phát triển tới G_2 (pha tăng trưởng) hoặc S (pha tái bản, tổng hợp ADN), cản trở sự dung hợp tế bào.

Cừu Dolly sinh ra ngày 5-7-1996, có trọng lượng bình thường, không có biểu hiện dị dạng như các thực nghiệm trước đây. Sống trong tử cung của "mẹ nuôi hộ" lông đen, nhưng cừu Dolly vẫn có lông trắng. Các phân tích, kiểm tra di truyền đã xác nhận Dolly là bản sao của cừu Finn Dorset, cừu đã cung cấp tế bào tuyến vú.

Sau đó, Wilmut và Campbell, còn tạo ra 3 cừu con từ những tế bào một bào thai 26 ngày và 4 cừu con từ những tế bào một phôi mới hình thành được 9 ngày.

Thành công nêu trên chứng tỏ, trong thực nghiệm, đã có một động vật có vú lớn có thể được nhân bản từ tế bào soma mà không cần có tác động gì của tế bào sinh dục, ngoài sinh chất của một noãn bào. Người ta cũng đã thành công nhân bản khỉ và lợn, và gần đây là cả trên người.

dùng các phôi non (14 ngày) cung cấp nguyên liệu cấy ghép, chữa bệnh..

Về chất lượng, nói chung nhân bản từ tế bào soma có thể tạo được cá thể dục hoặc cái ưu việt theo ý muốn. Tuy nhiên, vẫn còn một vấn đề cần tiếp tục kiểm tra, là vai trò của bào chất của trứng (noãn) khi dung hợp với tế bào soma (tuyến vú). Bào chất của trứng, nhận nhân chuyển vào đã khởi động cho sự phát triển phôi, trong đó sẽ phải làm rõ sự chuyển genome mẹ vào genome phôi đã diễn ra như thế nào. Vai trò của bào chất của noãn trong thực nghiệm dung hợp này, hiện nay còn cần được làm rõ, trong đó có sự chuyển đổi phân tử giữa bào chất của noãn với nhân chuyển đến.

Với sự phát triển của công nghệ sinh học hiện đại, công nghệ di truyền, thuật ngữ clone và cloning bao hàm khái niệm mở rộng, dòng gen, tạo dòng và tách dòng gen (molecular cloning), là các kỹ thuật phân lập các gen quan trọng, cần thiết, qua vector đưa các gen này vào cơ thể vật chủ, vi khuẩn, nấm men v. v... biến các vật chủ này thành các nhà máy, tổng hợp các sản phẩm của những gen trên như enzym, hocmon, để sản xuất các sản phẩm sinh học như insulin, interferon, somatostatin v. v...

B. HỆ GEN NGƯỜI

Ngày 12-2-2001, đã công bố chính thức, hệ gen người có 30.000 gen ít hơn nhiều so với dự kiến trước đây (hàng trăm nghìn gen), công bố trước đó 6 tháng (tháng 6-2000), công trình do tập đoàn đa quốc gia (Mỹ, Anh, Pháp, Nhật, Đức, Trung quốc), cùng tập đoàn tư nhân Celera Genomics (Mỹ) đã phát hiện sai khác quan trọng giữa nam và nữ: nam, có Y, mang nhiều gen đột biến hơn X, do đó nam giới mắc nhiều bệnh hơn nữ.

Người ta đã xác định hệ gen người giống 98% so với tinh tinh. Hệ gen loài người có đến 99% là giống nhau giữa các dân tộc, các cá thể, do đó vấn đề hình thành, phát triển nhân cách, thông minh, phải chủ yếu trên cơ sở xã hội, môi trường, tự bồi dưỡng, đào tạo, rèn luyện của từng người để phát triển tiềm năng sinh học của bản thân. Thành tựu đầu tiên được công bố trong 2 tạp chí, Nature (Anh), 12-2-2001 và Science (Mỹ) 2-2001.

Di truyền học người chỉ được phát triển nhanh sau khi có sự ra đời của di truyền Mendel, cho thấy các định luật Mendel có thể được áp dụng trên người. Bước phát triển quan trọng sau đó là sự xuất hiện di truyền học hóa sinh người, vào 1908 với công trình của Garrod, người thấy thuốc hoàng gia Anh, phát hiện các dị tật như khuyết tật bẩm sinh về trao đổi chất, trong đó điển hình là Alcaptonuria.

Garrod nêu lên thuyết một gen- một polypeptid, xác định nhiều dị tật hóa sinh là do gen lặn, nhờ khám phá của Garrod, mà ngay trước 1910 đã có phương pháp chẩn đoán sớm, phương pháp phòng bệnh và trị bệnh, chẩn đoán enzym và ngày nay tiến đến sinh học phân tử.

Hàng vài trăm dị tật ở người đã được xác định về mặt di truyền là do rối loạn enzym đặc thù. Hệ gen của người (hoặc vốn gen, gene pool) mới được nghiên cứu từ 1970, đầu tiên trên autosome.

Trong hội thảo ở Pari, 1971, bắt đầu xác định về mặt tế bào học, tất cả nhiễm sắc thể của người. Sau đó, đã có nhiều phương pháp để nghiên cứu, lập bản đồ gen người:

- lai tế bào soma;
- loại bỏ phân hóa nhiễm sắc thể trong các tế bào lai khác loài;
- lai ADN-ARN;
- suy diễn (deduction) từ các axit amin trong protein;
- mất đoạn nhiễm sắc thể;
- lập bản đồ nhân lặp đoạn.

Ngày nay, đã phối hợp các phương pháp di truyền tế bào để lập bản đồ gen người. Năm 1978, trong sưu tập của Mckusick's, nêu được 2811 gen trội, gen lặn và gen liên kết giới tính.

I. CÁC PHƯƠNG PHÁP LẬP BẢN ĐỒ DI TRUYỀN NGƯỜI

1. Lai tế bào soma ở động vật khác loài

Năm 1960, người ta đã chứng minh, khi nuôi cấy chung tế bào thuộc hai dòng khác nhau, chúng có thể kết hợp nhau tạo thành tế bào lai, chứa bộ gen của hai tế bào ban đầu. Những tế bào lai thu được trong các thí nghiệm đầu tiên là do kết hợp trong nuôi cấy tế bào của các dòng khác nhau trong cơ thể chuột. Sau đó, ngoài các tế bào lai trong loài,

người ta còn thu được các tế bào lai khác loài, như lai giữa chuột nhắt với chuột đồng (*Cricetus cricetus*), chuột nhắt với gà con và cả giữa chuột nhắt (tức chuột nhà, *Mus musculus*) với người.

Ở thực vật, khi nuôi cấy hai dòng tế bào soma khác loài, người ta cũng thấy có sự kết hợp ngẫu nhiên của hai hoặc một số tế bào khác loài. Qua kỹ thuật tế bào trần (protoplast), sự dung hợp hai tế bào trần khác loài ở thực vật đã tạo ra tế bào lai chứa bộ nhiễm sắc thể của hai tế bào gốc.

Trong thực nghiệm lai tế bào người với tế bào chuột trong dịch nuôi cấy, người ta đưa thêm một số chất để xúc tác cho sự dung hợp, như polyetilenglycol, một loại keo hữu cơ hoặc đưa thêm một loại virus đã khử hoạt tính. Virus thường được dùng trong thí nghiệm này là virus Sendai, có một hoặc một số tiểu phần đặc thù, nhờ đó virus có thể dễ dàng kết hợp với thụ quan tế bào vật chủ. Theo cách ấy, tiểu phần này của virus vừa kết hợp với tế bào này, vừa kết hợp với tế bào kia, tạo thành cầu nối giữa hai tế bào nói trên. Do kích thước của tiểu phần này quá bé, nên hai tế bào gần như áp sát nhau, chúng tạo ra một cầu nối màng nguyên sinh giữa hai tế bào, và từ đó đã hình thành thể lưỡng hạch, hai nhân (dikaryon). Sau đó, hai hạch này hòa vào nhau, tạo thành nhân hợp (syncaryon), chứa nhiễm sắc thể của hai tế bào gốc, ban đầu. Gần đây người ta còn dùng xung điện cao áp để thúc đẩy sự dung hợp của hai tế bào.

Qua thực nghiệm lai nêu trên, người ta đã phát hiện, qua một số lần phân bào của tế bào lai, vì nguyên nhân gì thì hiện nay chưa rõ, tế bào lai bị mất đi một cách rất nhanh chóng nhiễm sắc thể của một trong hai loài. Ở tế bào lai chuột nhắt- chuột đồng, thì mất đi nhiễm sắc thể của chuột nhắt. Ở tế bào lai giữa chuột nhắt và người, thì mất đi nhiễm sắc thể của người.

Thường sau 30 thế hệ tế bào, ở dòng tế bào lai chuột nhắt- người, còn lại toàn bộ nhiễm sắc thể của chuột, chỉ còn 7 nhiễm sắc thể của người, đây là con số trung bình, ở một số tế bào, chỉ còn 1-2 cặp nhiễm sắc thể người, nhưng ở một số khác, còn lại đến 20.

Dòng tế bào mà nhiễm sắc thể mất đi gọi là dòng cho dòng kia là dòng nhận. Hiện tượng mất đi nhiễm sắc thể nêu trên rõ ràng không theo quy luật nào cả. Người ta đã ứng dụng kết quả lai xa tế bào soma

để lập bản đồ gen. Nguyên tắc lập bản đồ gen qua lai tế bào soma, là sự có mặt sản phẩm của một gen nào đấy, có tương quan với sự có mặt của nhiễm sắc thể trong tế bào.

Trường hợp đơn giản nhất là, tế bào lai mất đi tất cả nhiễm sắc thể của người, chỉ còn lại độc nhất một nhiễm sắc thể. Từ đó, bất cứ một enzym hay một protein nào khác của người mà được phát hiện trong tế bào lai, đều phản ánh sự có mặt của gen quy định protein nói trên, trên nhiễm sắc thể độc nhất còn lại của người.

Để lập bản đồ gen của người theo phương pháp này, phải có hai điều kiện sau đây:

1) Đầu tiên, tính trạng nghiên cứu được mã hóa bởi gen trên một nhiễm sắc thể của người, phải được phân biệt rõ nét (ở mức tế bào) với tính trạng tương ứng của chuột. Ví dụ: dòng tế bào của người chứa lactadehydrogenaza A đột biến (LDH- A). Enzym này được phân biệt với protein, mã hóa bởi một gen tương ứng của chuột. Hai dạng này dễ dàng được phân biệt bằng điện di trên gel.

2) Khả năng có thể xác định nhiễm sắc thể của người còn lại trong dòng tế bào. Ví dụ, gen LDH- A của người được phát hiện trong các dòng tế bào lai, mà trong đó chỉ còn lại độc nhất một nhiễm sắc thể của người, ví dụ là nhiễm sắc thể số II, thì rõ ràng lôcut LDH- A nằm trên nhiễm sắc thể II này.

Ở đây, còn phải có điều kiện nữa là dòng tế bào lai sau khi đã mất một số nhiễm sắc thể, phải được ổn định, tức là không tiếp tục mất thêm nhiễm sắc thể nào khác nữa.

2. Dùng phương pháp lai phân tử axit nucleic để lập bản đồ gen của người

Từ tế bào người được nuôi cấy, người ta làm tiêu bản nhiễm sắc thể kỳ giữa (metaphase). Dùng nhiệt tác động (85°C trong 10 phút), người ta làm biến tính ADN trong nhiễm sắc thể, giữ nguyên được hình dạng nhiễm sắc thể để tiến hành lai phân tử axit nucleic (lai *in situ*). Người ta dùng một vật dò (probe), tức một gen được tách dòng, ADN đã tách dòng này được đánh dấu phóng xạ, được làm biến tính, sau đó cho ủ với tiêu bản nhiễm sắc thể đã bị biến tính. Các sợi đơn đã đánh dấu của gen tách dòng (của probe) sẽ bắt cặp với gen trên nhiễm sắc thể, có các trình tự bazơ phù hợp (bổ trợ theo nguyên lý bổ sung).

Dùng phóng xạ tự chụp, người ta xác định được vị trí của gen trên nhiễm sắc thể. Sau khi lai, nhiễm sắc thể trên tiêu bản kính hiển vi được đặt vào phim nhạy cảm tia X. Do tác động của đồng vị phóng xạ (như ^{32}P), trên mặt phim xuất hiện các vết đen ở vị trí của vật dò (probe) ADN đánh dấu.

3. Phương pháp dùng đoạn khuyết để lập bản đồ gen của người

Phương pháp dùng đoạn khuyết (annealing of homologous sequences) này dựa trên nguyên tắc là sự có mặt của bất kỳ một đoạn nào trên nhiễm sắc thể, đều phải có liên quan với sự biểu hiện của một số gen trên đoạn ấy.

Trên ruồi dấm *Drosophila*, người ta làm thực nghiệm, phát hiện những đoạn khuyết trên nhiễm sắc thể, qua kính hiển vi. Ở người, cũng đã phát hiện những đoạn khuyết trên nhiễm sắc thể, ứng với một hoặc một số gen nhất định. Trên cơ sở này, người ta xác định được vị trí của các gen trên nhiễm sắc thể.

4. Dấu vân di truyền

In dấu vân di truyền (genetic fingerprinting) ở người dựa trên đặc điểm là hệ gen người có các lôcut đa hình, vùng siêu biến dị (hypervariable regions HVR), có số lượng lớn các đoạn lặp lại trong một trình tự lõi ngắn.

Hiệu quả của biến đổi số các đoạn trình tự lõi lặp lại là sự biến đổi này có thể xem như một kiểu RFLP, ứng dụng trong dấu vân di truyền, khác biệt về chiều dài các đoạn giới hạn được phát hiện bằng Southern blotting với mẫu dò thích hợp, được ứng dụng trong sinh thái học phân tử.

II. ĐOẠN LẶP ADN

Đoạn lặp dài (variable number of tandem repeat: VNTR) từ vài chục đến vài trăm nucleotid; đoạn lặp ngắn (short tandem repeat: STR), đều được phát hiện ở hầu hết các loài, người, động vật, thực vật, có tính đặc trưng riêng của loài.

Giữa các cá thể một loài, đoạn lặp ADN cũng khác nhau và là bội số của đoạn lặp ban đầu, như $(\text{G-C})_n$, $(\text{A-T})_n$ v. v... Trong một cơ thể, một

nửa đoạn lặp có khuôn gốc bố, một nửa từ mẹ, là cơ sở để xác định đặc trưng cá thể và quan hệ huyết thống, nói cách khác là tính đa hình của các locus.

Số lần lặp lại của các đoạn lặp ở từng cá thể là khác nhau, tạo ra chiều dài khác nhau, tạo ra các alen khác nhau. Đây là cơ sở để xác định được chính xác đặc trưng cá thể và quan hệ huyết thống ở mức độ ADN (thể hiện trên các vệt của băng ADN).

Trình tự genom người (draft human genom sequence) có khoảng trên 30.000 gen, trong đó 22.000 đã được xác định từ lâu. Công bố lần thứ nhất về trình tự này là vào tháng 6-2000. Có trung bình khoảng 12 gen trên 1 triệu bazơ (base) của ADN người (ở ruồi dấm là 117, ở giun tròn là 197, ở Arabidopsis là 221).

Một nguyên nhân dẫn đến tình trạng gen người khó phát hiện so với các loại gen khác là do các gen ở người phân đoạn nhiều.

Ở các sinh vật phức tạp hơn vi khuẩn, gen có xu hướng được phân đoạn thành exon và intron. Nói chung, gen ở người có nhiều exon ngắn và các intron dài hơn cỡ trung bình, một số dài hơn 10.000 base. Gen lớn nhất ở người dài 2,4 triệu base, mã hóa protein "dystrophin" của cơ (và các rối loạn dystrophy cơ), nhưng phần lớn trong đó là ADN không mã hóa. Intron ở người biến động nhiều hơn. Phần lớn dài khoảng 87 base, nhưng ở một số lại rất dài, làm cho chiều dài trung bình lên tới hơn 3.300 base. Ngược lại, exon người lại rất bé, có exon chỉ 19 base.

Hơn 91% trình tự phác thảo được tập đoàn công bố là chính xác đến 99,99%, tức chính xác đến 1 base trên 10.000. Hiện tượng phân đoạn của gen người dẫn đến có thể tổng hợp nhiều protein khác nhau từ cùng những gen như nhau, do có kết hợp nhiều exon khác nhau theo nhiều cách khác nhau. Tối thiểu có 35% gen người, khi biểu hiện, có thể đọc theo nhiều con đường.

Từ đó, gen người có thể mã hóa nhiều protein gấp 5 lần so với genom ít uyển chuyển hơn của ruồi dấm hoặc giun tròn. Hơn một nửa genom người, bao gồm trong đó đã biết 47 gen, là có mang yếu tố vận động.

Genom người nhiều yếu tố vận động hơn và nhiều các trình tự ADN lặp hơn so với các genom khác đã biết, mật độ các đoạn lặp biến động lớn. Một vùng 525.000 base của nhiễm sắc thể X có 89% trình tự lặp, là

vùng kết cụm nhất. Ngược lại, cụm "HOX" lại khác hẳn, điều hòa phát triển, có dưới 2% yếu tố lặp lại. Người ta khá ngạc nhiên khi phát hiện có sự truyền trực tiếp các gen vi khuẩn vào người.

Genom người giúp ta hiểu sâu về mức độ phức tạp trong cấu trúc, tập tính, hoạt động tinh thần, học tập, trí nhớ, tính nhân đạo ở con người.

Genom vi khuẩn có khoảng 1,5% đoạn lặp. Đoạn đồng nhiễm sắc chất genom ruồi dấm khoảng 3% đoạn lặp.

Genom người, ngược lại, rất nhiều đoạn lặp, trên 50% bao gồm các đoạn lặp xen đoạn từ yếu tố vận động. Nhiều vùng genom lặp xen đoạn nối tiếp, gấp đôi đối xứng (palindromic) hoặc dạng phân tán, trong đó có đoạn lặp dài (50- 500 kb) với độ giống nhau cao trong trình tự (98-99,9%), có các ghép đôi sai trong tái tổ hợp, tạo ra mất đoạn dẫn tới các hội chứng di truyền.

Người thuộc genom lặp đoạn nhiều (large repeat- rich genom). Ngược lại ở virus, vi khuẩn, ruồi dấm lặp đoạn ít (repeat- poor genom)

1. Về vấn đề đoạn lặp trong genom người

Sinh học phân tử đã chứng minh, kích thước genom không tương quan với độ phức tạp, hoàn thiện của cơ thể, của các loài. Ví dụ *Homo sapiens* có genom lớn hơn nấm men *S. cerevisiae* 200 lần, nhưng lại nhỏ hơn *Amoeba dubia* 200 lần. Nguyên nhân là do genom người có số lượng lớn các trình tự lặp. Ở người, các trình tự có mã hóa protein chiếm dưới 5% genom, các trình tự lặp tối thiểu chiếm 50% và còn nhiều hơn.

2. Có 5 loại trình tự lặp

Các trình tự đó như sau:

2.1. Các đoạn lặp xuất phát từ transposon, thường là các đoạn lặp xen (interspersed)

2.2. Các bản sao ngược bất hoạt (từng phần) của gen tế bào (bao gồm gen mã hóa protein và các trình tự ARN cấu trúc nhỏ), thường là các gen giả cắt nối.

2.3. Các trình tự lặp đơn, bao gồm các lặp trực tiếp của các đoạn tương đối ngắn như (A)n, (CA)n, hoặc (CG)n.

2.4. Các lặp đoạn, gồm khoảng 10- 300 kb, được sao lại từ một vùng này của genom sang một vùng khác.

2.5. Từng cụm các đoạn lặp theo trình tự, như ở hạt trung tâm, tâm mút, cánh ngắn của nhiễm sắc thể tâm mút và các cụm gen ribosom.

Các đoạn lặp là một kho tư liệu về cổ sinh học, là các đầu mối quan trọng về các sự kiện tiến hóa và các lực tiến hóa. Các đoạn lặp cung cấp các phân tích để nghiên cứu quá trình đột biến và chọn lọc, cung cấp công cụ để nghiên cứu di truyền y học và di truyền quần thể. Genom người là genom đầu tiên có nhiều đoạn lặp được được giải trình tự.

III. BẢN ĐỒ BỘ GEN NGƯỜI

Bản đồ bộ gen người với 1,42 triệu nucleotid đơn đã được công bố là công trình được phát hiện đầu tiên bởi 2 dự án: công ty về hệ đa hình nucleotid đơn (single nucleotide polymorphisms, SNP) và các phân tích về các dòng lặp đoạn (clone overlaps) do công ty quốc tế giải trình tự bộ gen người. Bản đồ tích hợp mọi trình tự đa hình nucleotid đơn đã công bố, có mô tả các gen và đặc điểm khác của bộ gen.

Dự tính có 60.000 trình tự đa hình nucleotid đơn nằm trong exon (các vùng mã hóa và các vùng không dịch mã), và có 85% exon là nằm trong 5kb của trình tự đa hình nucleotid đơn gần nhất. Sự đa dạng nucleotid rất biến động trong genom, hoàn toàn phù hợp với mô hình di truyền quần thể chuẩn của lịch sử loài người.

Mật độ cao của trình tự đa hình nucleotid đơn trong bản đồ cho ta cơ sở để xác định biến động chuẩn đơn (haplotype) trong genom và sẽ giúp ta xác định được các gen quan trọng về y sinh học để chẩn đoán và điều trị bệnh. Công trình được công bố trong Nature 15-2-2001 **409**, 928- 933 (2001). (A map of human genom sequence variation containing 1,42 million single nucleotide polymorphisms. The International SNP Map Working Group). Tham gia vào dự án có khoảng 20 trung tâm từ 6 quốc gia (Mỹ, Anh, Pháp, Đức, Nhật, Trung quốc).

Bước đầu giải trình tự và phân tích bộ gen người đã cho thấy là bộ gen người cung cấp một khối lượng khổng lồ các thông tin về phát triển loài người, sinh lý con người, y học và tiến hóa. Người ta đã công bố các kết quả của tập đoàn quốc tế xây dựng phác thảo trình tự của genom

người, các phân tích ban đầu về các dữ liệu, mô tả một số hiểu biết sâu thu thập được từ trình tự hệ gen người.

Sinh học, di truyền học của thế kỷ XX trải qua bốn giai đoạn:

1. Phát hiện cơ sở tế bào của hiện tượng di truyền: nhiễm sắc thể.

2. Cơ sở phân tử của di truyền: chuỗi xoắn kép ADN.

3. Cơ sở thông tin của tính di truyền: phát hiện cơ chế sinh học qua đó tế bào đọc được thông tin trong gen và phát minh công nghệ ADN tái tổ hợp, tạo dòng, giải trình tự.

4. Giải mã các gen đầu tiên và sau đó là các genom.

Trình tự genom của 599 virus và viroid (dạng virus, tác nhân gây bệnh chứa đoạn ngắn ADN). 205 plasmid tự nhiên, 185 cơ quan tử, 31 eubacteria, 7 archaea, 1 nấm, 2 động vật và 1 thực vật.

Hệ gen người

Trình tự phác họa của genom người, được rút ra từ bản đồ vật lý (physical map) với hơn 96% phần đồng nhiễm sắc chất của genom người, đồng thời với trình tự bổ sung, choán khoảng 94% genom người.

Trình tự genom người có tầm quan trọng nhiều mặt, là genom lớn nhất được giải mã sớm, genom đầu tiên trong động vật có xương sống được giải mã, là genom của bản thân loài người chúng ta. Trong genom có sự biến động trong phân bố một số yếu tố trong đó là các yếu tố vận động (transposable elements), hàm lượng GC, các dải CpG và tần số tái tổ hợp (recombination rate), cung cấp cho ta các đầu mối quan trọng về các hoạt động, chức năng trong cơ thể. Ví dụ, cụm gen, HOX quan trọng đối với phát triển, là vùng lặp mà có ít lặp nhất trong genom người, phản ánh một sự điều hòa phối hợp rất phức tạp của các gen trong cụm gen.

Người ta phát hiện khoảng 30.000 gen mã hóa protein trong genom người, chỉ gấp 2 lần giun (worm) hoặc ruồi (fly).

Thực ra phức tạp hơn, với nhiều kết nối tạo ra số lượng lớn các sản phẩm protein. Toàn bộ protein (proteome) được genom người mã hóa là phức tạp hơn so với các động vật không xương sống. Đây là do sự có mặt của các khu vực protein đặc thù của động vật có xương sống. Hàng trăm gen của người xuất hiện là kết quả từ sự truyền gen từ vi khuẩn sang ở

một số mốc trong cây động vật có xương sống. Nhiều gen xuất hiện là từ yếu tố di truyền vận động (transposable elements). Các lặp đoạn ở người hay gặp hơn ở nấm men, ruồi dấm, ruồi hoặc giun. Tần số đột biến trong giảm phân ở nam gấp 2 lần ở nữ, cho thấy số lớn đột biến là xảy ra ở nam giới.

Phân tích di truyền tế bào các dòng được giải trình tự cho thấy các vùng nghèo GC liên quan nhiều với các băng G đậm trong kiểu nhân. Tần số tái tổ hợp có xu hướng cao hơn tại các vùng xa tâm (distal) của nhiễm sắc thể (trong vòng 20 megabases (Mb) và nói chung là trên các cánh ngắn, cho thấy tối thiểu có 1 bất chéo đối với 1 cánh nhiễm sắc thể trong mỗi lần giảm phân. Phát hiện hơn 1,4 triệu trình tự đa hình nucleotid đơn (SNP₁, single nucleotid polymorphisms) trong genom người.

Giải trình tự genom người. Do nhiều tiến bộ công nghệ trong hình thành và phân tích số liệu trình tự. Các biến đổi mới trong thực nghiệm bao gồm: phát hiện trình tự dựa vào huỳnh quang 4 màu, thuốc nhuộm huỳnh quang (fluorescent dyes); terminator đánh dấu thuốc nhuộm (dye- labelled terminator); polymeraza đặc thù cho giải trình tự; giải trình tự chu kỳ (cycle sequencing) và điện di gel mao dẫn (capillary gel electrophoresis).

Công trình phát hiện hệ gen người đã sử dụng công cụ máy tính, phương pháp tự động, các hệ thống rôbot.

Xây dựng phác thảo trình tự genom người đã qua 3 giai đoạn:

- chọn lựa các dòng BAC để giải trình tự;
- giải trình tự các dòng;
- tập hợp các dòng riêng rẽ đã được giải trình tự vào một phác thảo toàn cục của trình tự genom.

Các dòng được chọn lựa từ 8 thư viện gen mang BAC (bacterial artificial chromosome). Các thư viện gen được xây dựng bằng phân giải từng phần (partial digestion) ADN của genom bằng enzym giới hạn.

Thời gian đầu của dự án, cũng dùng các thư viện gen từ các loại vector khác, như cosmid. Các thư viện gen được thiết lập từ ADN của những người tình nguyện cho mẫu (donor) dấu tên (anonymous), theo thoả thuận. Các mẫu được lấy sau khi tham khảo các nhà tư vấn di truyền, được đánh dấu. Mọi ghi chép về đánh dấu, sau đó đều được hủy.

Từ mẫu, chuẩn bị ADN và các dòng tế bào nuôi cấy, ADN từ mỗi dòng BAC được phân giải với enzym giới hạn Hind III và kích thước các đoạn cắt ra được đánh giá qua điện di trên gel agarose. Các đoạn được cắt ra do enzym giới hạn sẽ cho ta "dấu vân" (fingerprint) đối với mỗi BAC, cho phép phân biệt các trình tự BAC khác nhau và mức độ trùng gối gen (overlaps). Dùng dấu vân các đoạn cắt ra để xác định các dòng trùng gối và tập hợp các trình tự BAC vào một tổ hợp dòng dấu vân.

Trong pha pilot (thử nghiệm), người ta đã thấy các site của các trình tự mang gen đánh dấu (sequence tagged sites, STS) trong các bản đồ di truyền và bản đồ vật lý đã thiết lập, có thể được dùng để tìm lại các trình tự BAC từ các vùng đặc biệt. Tổng hợp dòng dấu vân được định vị dọc nhiễm sắc thể bằng cách gắn chúng với các marker STS từ bản đồ di truyền và bản đồ vật lý. Tổ hợp dòng dấu vân được gắn với các STS, đặc thù trước tiên qua lai với mẫu dò và sau đó qua trực tiếp tìm dò các dòng đã giải trình tự. Các dòng đại diện cũng được định vị bằng lai tại chỗ huỳnh quang.

Chọn các dòng từ tổ hợp dòng dấu vân để giải trình tự là theo các tiêu chuẩn đối thay 6 trung tâm, phân lớn đều tập trung vào từng nhiễm sắc thể riêng rẽ, hoặc tập trung vào các vùng lớn của genom. Do đó, các chi tiết thử nghiệm có thể khác nhau giữa các trung tâm. Ví dụ, có khác nhau trong kích thước trung bình các đoạn xen của thư viện gen, khác nhau qua dùng vector tách dòng sợi đơn hay sợi kép, và qua giải trình tự ở 1 đầu hay cả 2 đầu của đoạn xen.

Giữa các trung tâm còn khác nhau về việc dùng huỳnh quang đánh dấu (fluorescent labels) và qua mức độ dùng primer nhuộm hay terminator nhuộm.

IV. YẾU TỐ VẬN ĐỘNG Ở NGƯỜI

Ở động vật có vú, phần lớn các yếu tố vận động (transposable elements) là 1 trong số 4 loại: 3 loại là từ các ARN; 1 loại trực tiếp từ ADN. Chúng gồm các yếu tố xen dài, yếu tố xen ngắn, các transposon đảo nghịch và transposon ADN. Các yếu tố xen dài là những phát hiện xưa nhất và có hiệu quả nhất trong genom sinh vật nhân chuẩn và ở người, chúng dài khoảng 6kb, mã hóa 2 khung đọc mở (open reading frame) đồng nhiễm sắc chất. Các đoạn trong genom người có mật độ yếu

tổ vận động lớn hơn ADN đồng nhiễm sắc chất của ruồi, giun, có transposon xuất hiện cổ xưa hơn nhiều so với các loài khác.

Ở người, 2 họ đoạn lặp LINE₁ (long interspersed 1) và Alu chiếm khoảng 60% các trình tự lặp xen, các loài khác không có các họ đoạn lặp vượt lên như thế. Một số vùng có mật độ lặp lớn lạ thường, như vùng Xp11 525- kb, với mật độ yếu tố vận động trung bình 89%.

V. NHIỄM SẮC THỂ Y CỦA NGƯỜI

Tính chất đoạn lặp xen có thể được sử dụng để nghiên cứu lịch sử tiến hóa của nhiễm sắc thể Y. Các đoạn lặp xen trên nhiễm sắc thể Y có thể được sử dụng để ước đoán tần số đột biến liên quan. Một số tác giả thấy tần số đột biến ở dòng sinh dục nam cao hơn ở nữ (germline) qua so sánh tiến hóa của các gen liên kết X và liên kết Y ở người và vượn (primate) chimpanzee, gorilla.

Nhiều thuyết đã cho rằng tần số đột biến ở dòng sinh dục nam cao hơn, do số lần phân bào để hình thành tinh trùng nhiều hơn so với trứng, và các cơ chế sửa đổi khác nhau giữa tinh trùng và trứng.

C. NHỮNG VẤN ĐỀ ĐƯỢC ĐẶT RA

Thành tựu giải mã toàn bộ hệ gen người cũng đặt ra nhiều vấn đề rất cơ bản cần đi sâu thêm về mặt lý thuyết, đồng thời làm nảy sinh nhiều hướng ứng dụng rất mới mẻ và vô cùng quan trọng, đang được thế giới quan tâm đầu tư nghiên cứu, đồng thời cũng là những mũi nhọn mà nền công nghệ sinh học, công nghệ gen mới mẻ của Việt Nam chúng ta cần đầu tư khai thác, để từ các hướng ứng dụng hiện đại này mà đi lên được nhanh trong nền công nghệ mới. Về mặt lý thuyết trong di truyền học, từ lâu người ta đã biết là tỷ lệ ADN không tham gia mã hóa protein trong các loài rất lớn. Vấn đề đặt ra đối với hệ gen người là 97% ADN không tham gia mã hóa protein trong cơ thể người, liệu phải có những vai trò, tác dụng nhất định trong cơ thể thống nhất, đây là vấn đề di truyền học thế kỷ XXI phải làm rõ.

NHỮNG VẤN ĐỀ XÃ HỘI HỌC TRONG PHÁT TRIỂN DI TRUYỀN HỌC THẾ KỶ XXI

Các nhà khoa học của nhiều nước đã đồng thanh cảnh báo và kiến nghị các chính phủ nhanh chóng công bố các đạo luật, hệ thống luật pháp đi kèm các tiến bộ sinh học mới, để chặn đứng các mưu đồ lợi dụng các thành tựu giải mã hệ gen người, các thành tựu nhân bản vô tính người vào những hướng phi pháp, trái đạo lí sinh học, phản nhân văn, phục vụ các âm mưu chính trị đen tối, chống nhân loại.

Ủy ban văn hóa giáo dục của liên hiệp quốc (UNESCO) đã cho ra đời một Ủy ban quốc tế về đạo lí sinh học (international committee of bioethics, IBC), phối hợp giữa các nước để có các bộ luật quốc tế về các vấn đề nêu trên, như các vấn đề bảo vệ hệ gen người, không thể lợi dụng hệ gen người được giải mã để đi đến có sự phân biệt phản nhân văn, v.v... nhân bản vô tính người đang là vấn đề tranh cãi trên thế giới, vì để thử nghiệm thành công nhân bản vô tính cừu Dolly, đã phải trải qua biết bao thất bại, 177 phôi cừu đã bị hy sinh để đưa đến thành công một con cừu Dolly ra đời, và còn phải tiếp tục theo dõi sự biểu hiện gen ở các thế hệ động vật nhân bản vô tính mà các nhà khoa học cũng chưa làm chủ được, liệu có các biểu hiện không bình thường, các phát triển bất lợi dẫn đến khuyết tật, dị hình bẩm sinh v. v... Mọi vấn đề thử nghiệm như trên có thể tiến hành trên động vật, nhưng đối với con người thì không cho phép.

Một số nhà khoa học Mỹ và Ý đã công bố chương trình khoa học nhân bản vô tính người để tạo những đứa con cho các cặp vợ chồng vô sinh, tình nguyện tham gia chương trình. Nghị viện Anh đã thông qua đạo luật cho phép nhân bản vô tính phôi người phục vụ nghiên cứu, chữa bệnh.

Theo quan điểm và phương hướng khác, Nhật Bản lại công bố nghiêm cấm mọi thử nghiệm nhân bản vô tính người, nghiêm cấm cấy phôi nhân bản trên phụ nữ.

Vấn đề cần đặt ra là khoa học nói chung, di truyền học nói riêng của thế kỷ XXI và của mọi thế kỷ tiếp, là không thể dừng bước, không có "chân tường", nhưng khoa học phải được phát triển theo hướng văn minh nhân loại, phù hợp văn hoá đạo lí con người.

Người ta đã đánh giá thành tựu giải mã hệ gen người là đỉnh cao

trong khoa học, không riêng của thời đại ngày nay, của thế kỷ XX, thế kỷ XXI, mà có thể là thành tựu xuất sắc của toàn lịch sử nhân loại.

Nhưng cùng với phương hướng đi lên tích cực, rõ ràng nhân loại, các chính phủ sẽ phải kịp thời có các biện pháp để chặn đứng các mặt tiêu cực, phản chính trị như đã nêu trên, đồng thời còn phải giải quyết các vấn đề tâm lý xã hội nảy sinh, lạm dụng các thông tin về bộ gen từng người để có phân biệt đối xử, khi tuyển dụng người làm việc, phân biệt trong bảo hiểm sức khỏe, trong đánh giá công việc, những vấn đề tâm lý xã hội phải giải quyết khi chẩn đoán sớm phát hiện gen gây bệnh, hướng giải quyết trong hôn nhân, trong sinh con v. v...

Thành tựu giải mã hệ gen người mở ra nhiều hướng ứng dụng hoàn toàn mới, gắn liền với kinh doanh, phát triển công nghiệp dược phẩm, làm cơ sở khoa học chắc chắn để chế tạo nhiều loại thuốc mới, đặc biệt theo hướng mới là cá thể hóa cách dùng thuốc, dùng thuốc phù hợp đặc trưng cá thể bộ gen của từng người bệnh, vấn đề mà nhiều người cho đây là cuộc cách mạng cá thể hóa y học.

Theo hướng mới được hé mở qua thành tựu về hệ gen người, người bác sĩ, các thầy thuốc sẽ chẩn đoán bệnh, không phải chỉ qua bắt mạch như đông y, không chỉ qua các xét nghiệm hiện đại nhất hiện nay có (chụp cắt lớp, điện não đồ, điện tim, siêu âm, lazer v. v...) mà sẽ phải qua khâu đọc bộ gen người bệnh, qua PCR, qua RFLP, qua các phân tích phân tử để nhận dạng cá thể bệnh nhân, như qua các đoạn ADN lặp, các alen của từng đoạn lặp, tần số alen trong đoạn lặp, sai khác rõ nét giữa người này với người kia, liên quan đến các triệu chứng lâm sàng, các biểu hiện kiểu hình của bệnh lý.

Trong hướng ứng dụng các thành tựu nổi bật của thế kỷ về bộ gen người, Việt Nam chúng ta cần nhanh chóng nhập cuộc, trong các điều kiện sinh thái nhiệt đới độc đáo của đất nước, chúng ta có thể có những đóng góp nhất định, không chỉ cho thực tiễn đất nước, cho y học Việt Nam, cho khoa học hình sự Việt Nam, cho các nghiên cứu dân tộc học Việt Nam, mà còn cho cả các phát triển của lĩnh vực này trên thế giới.

Bước đầu chúng ta, với các thiết bị được đầu tư ban đầu, đã có các công trình mở đường, như dùng kỹ thuật multiplex PCR phát hiện, chẩn đoán nhanh, sớm, chính xác các đột biến mất đoạn ở các bệnh nhân teo cơ (duchenne muscular dystrophy, DMD) ở Việt Nam, dùng kỹ thuật multiplex PCR phát hiện đột biến ở các bệnh nhân β -thalassemia ở Việt

Nam, góp phần rất quan trọng bảo vệ di truyền người Việt Nam, ngăn chặn hoặc làm giảm sự lan truyền gen gây bệnh, qua chẩn đoán phân tử để có tư vấn di truyền y học, tư vấn hôn nhân và sinh đẻ ở Việt Nam.

Để mở đường cho hướng nghiên cứu di truyền người Việt Nam, nghiên cứu các dân tộc ở Việt Nam, chúng ta cũng đã có các công trình thực nghiệm ban đầu, dùng PCR phân tích phân tử 2 lôcut D17S5 và DIS80 để nhận dạng cá thể và xác định quan hệ huyết thống (Lê Đình Lương và ctv, 2000), xác định được sai khác alen và tần số alen của hai lôcut nêu trên, sử dụng kỹ thuật dấu vân ADN (DNA- fingerprint) trong nhận dạng đặc trưng cá thể, theo hướng tiến lên có tàng thư ADN như một số nước đã tiến hành.

Ngành công an Việt Nam, khoa học hình sự ở Việt Nam cũng đã mở ra hướng điều tra, truy tìm, kết luận tội phạm qua phân tích ADN, sử dụng dấu vân ADN, như trường hợp gần đây nhất, trong một vụ bắt trộm trẻ em ở Nam Định đem về nuôi ở Thanh Hóa 7 năm sau mới bị phát hiện, đã phải có sự hỗ trợ của xét nghiệm, chẩn đoán phân tích phân tử mẫu máu và tóc của đứa trẻ đối chiếu với của bố mẹ đẻ. Để nhanh chóng hội nhập quốc tế, bắt kịp các hướng phát triển mũi nhọn của di truyền học thế kỷ XXI này, Việt Nam chúng ta cần khẳng định có đầu tư cả về nghiên cứu cơ bản, đặc biệt đối với các nghiên cứu ứng dụng trên điều kiện riêng của chúng ta; khai thác các thế mạnh của đất nước; nhanh chóng đào tạo đội ngũ các nhà khoa học trẻ, bổ sung và kế cận hiệu quả, có khả năng tiếp thu, khai thác các thành tựu đỉnh cao của thế giới, đưa di truyền học Việt Nam có các bước đi nhanh trong thời đại công nghệ sinh học và công nghệ thông tin hiện nay.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. **Hồ Huỳnh Thuý Dương.** Sinh học phân tử. Nxb. Giáo dục, HN. 1997.
2. **Phạm Thành Hổ.** Di truyền học. Nxb Giáo dục. HN, 2000.
3. **Lê Đình Lương và ctv.** Tạp chí di truyền và ứng dụng. HN, 4-2000.
4. **Lê Đình Lương, Phan Cự Nhân.** Cơ sở di truyền học (tái bản lần thứ 3). Nxb Giáo dục, HN, 2000.
5. **Phan Cự Nhân (chủ biên) Trần Bá Hoàn, Lê Quang Long, Hoàng Thị Sản, Phạm Đình Thái, Mai Đình Yên.** Sinh học đại cương (tập I, II). Nxb. Đại học Quốc gia, HN, 1997.
6. **Phan Cự Nhân.** Cơ sở di truyền tập tính. Nxb. Đại học Quốc gia. HN, 1998.
7. **Phan Cự Nhân (chủ biên), Nguyễn Minh Công, Đặng Hữu Lan.** Di truyền học (tập I, II), Nxb Giáo dục, HN, 1999.
8. **Phan Cự Nhân.** Di truyền học động vật và ứng dụng, Nxb. Giáo dục, HN, 2000.

TIẾNG ANH

1. **Francisco J. Ayala.** Modern Genetics, Amsterdam, 1980.
2. **George J. Brewer.** Introduction to Modern Genetics, New York, 1980.
3. **Helena Curtis.** Biology, New York, 1983.
4. **Peter J. Russell.** Fundamental of Genetics, New York, 1994.
5. **Richard M. Twyman.** Advanced Molecular Biology, Cambridge, 1998.
6. **Robert F. Weaver.** Genetics, London, 1997.
7. **Yun You, ...** Genetics, V.155, N^o2, 6-2000.
Genetics Society of America, New York, 2000.

MỤC LỤC

Trang

Lời nói đầu

3

Chương I

CƠ SỞ DI TRUYỀN ĐỘNG VẬT

A. GEN, ALLEN VÀ DÂY ALLEN Ở ĐỘNG VẬT	5
I. Gen	5
ADN thực khuẩn thể λ	7
II. Allen và dây allen ở động vật	7
B. GEN VÀ SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN	17
I. Cấu trúc gen	18
II. Sao mã	18
III. Gen và sự phát triển	21
IV. Sự biểu hiện phân hóa của gen	24
C. DI TRUYỀN GIỚI TÍNH ĐỘNG VẬT	36
I. Thực nghiệm lịch sử xác định gen nằm trên nhiễm sắc thể giới tính	36
II. Giới tính ở động vật	37
III. Xác định giới tính ở động vật có vú	43
IV. Ba loại tính trạng giới tính	44
V. Ứng dụng trong tạo giống gia cầm	47
D. BẢN ĐỒ DI TRUYỀN	48
I. Bản đồ liên kết hoặc bản đồ di truyền	48
II. Bản đồ gen của vật nuôi	50
III. Thư viện bộ gen	52
IV. Thư viện gen từng nhiễm sắc thể	57

Chương II

DI TRUYỀN TẾ BÀO ĐỘNG VẬT

A. DI TRUYỀN HỌC TẾ BÀO	62
B. DI TRUYỀN TẾ BÀO HỌC PHÂN TỬ	63
C. NGHIÊN CỨU HÌNH THÁI NHIỄM SẮC THỂ	65
Các chỉ số di truyền tế bào	66
D. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU NHIỄM SẮC THỂ ĐỘNG VẬT	67
I. Phương pháp nuôi cấy tế bào động vật (tissue culture) để làm tiêu bản nhiễm sắc thể	67
II. Nhiễm sắc thể ở các động vật bậc cao	70
III. Phương pháp nhuộm phân hóa nhiễm sắc thể	75
E. HIỆN TƯỢNG ĐA HÌNH VÀ HIỆN TƯỢNG DỊ HÌNH NHIỄM SẮC THỂ	82
I. Hiện tượng đa hình nhiễm sắc thể	82
II. Hiện tượng dị hình nhiễm sắc thể	83
III. Sự tiến hóa của kiểu nhân	83
IV. Kỹ thuật nhiễm sắc thể	85
F. NGHIÊN CỨU DI TRUYỀN TẾ BÀO HỌC NGƯỜI	88
I. Phương pháp di truyền tế bào	88
II. Nghiên cứu nhiễm sắc thể và kiểu nhân	89
III. Hiện tượng bất hoạt X	93
G. CÔNG NGHỆ TẾ BÀO ĐỘNG VẬT	102
Tế bào lai và kháng thể đơn dòng	102

Chương III

DI TRUYỀN HÓA SINH ĐỘNG VẬT

A. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP HÓA SINH TRONG NGHIÊN CỨU DI TRUYỀN HỌC ĐỘNG VẬT	105
I. Phương pháp điện di axit nucleic	105

B. DI TRUYỀN HÓA SINH ĐỘNG VẬT	107
I. Đột biến hóa sinh ở vi sinh vật	109
II. Chuỗi sinh tổng hợp melanin và bệnh bạch tạng	111
III. Cơ sở di truyền hóa sinh một số rối loạn trao đổi chất ở động vật	113
IV. Di truyền học hemoglobin với công tác giống gia súc	115
V. Di truyền học isozym	128

Chương IV

DI TRUYỀN PHÂN TỬ TẬP TÍNH Ở ĐỘNG VẬT

A. CƠ SỞ DI TRUYỀN VÀ DI TRUYỀN PHÂN TỬ TẬP TÍNH Ở ĐỘNG VẬT	133
I. Cơ sở di truyền tập tính chuyển động hướng trọng lực ở <i>Drosophila melanogaster</i>	133
II. Cơ sở di truyền phân tử và di truyền tiến hóa tập tính ở động vật	134
III. Cơ sở di truyền tiến hóa trong tập tính động vật	141

Chương V

PHÂN TÍCH PHÂN TỬ TRONG NGHIÊN CỨU DI TRUYỀN ĐỘNG VẬT

A. PHÂN LẬP (TÁCH CHIẾT) ADN	148
I. Các nguyên tắc và phương pháp tiến hành	148
B. BIẾN TÍNH VÀ HỒI TÍNH ADN	151
I. Biến tính ADN	151
II. Hồi tính ADN	152
C. TÁCH RIÊNG NHAU ADN SỢI KÉP VÀ ADN SỢI ĐƠN	152
D. ENZYM GIỚI HẠN VÀ KỸ THUẬT CẮT ĐOẠN ADN	153
I. Khái niệm	153
II. Các kiểu cắt của enzym giới hạn	154
III. Ứng dụng của enzym giới hạn	156

E. PHƯƠNG PHÁP PCR	157
F. GIẢI TRÌNH TỰ NUCLEOTIT TRONG ADN	165
I. Lai phân tử ADN	166
G. DẤU VÂN ADN	169

Chương VI

CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN ĐỘNG VẬT

A. KHÁI NIỆM CHUNG	173
I. Công nghệ di truyền	173
II. Công nghệ ADN tái tổ hợp	175
III. Công nghệ gen động vật	182
IV. Lai phân tử- kỹ thuật mới để chẩn đoán nhiễm khuẩn	203
V. Công nghệ tăng sinh sản	207

Chương VII

ĐỈNH CAO KHOA HỌC: DI TRUYỀN HỌC NĂM 2001

A. NHÂN BẢN VÔ TÍNH ĐỘNG VẬT	212
I. Khái niệm cơ bản	212
II. Tạo dòng vô tính ở động vật	213
III. Về công trình tạo ra con cừu Dolly	215
B. HỆ GEN NGƯỜI	216
I. Các phương pháp lập bản đồ di truyền người	217
II. Đoạn lặp ADN	220
III. Bản đồ bộ gen người	223
IV. Yếu tố vận động ở người	226
V. Nhiễm sắc thể Y của người	227
C. NHỮNG VẤN ĐỀ ĐƯỢC ĐẶT RA	227
Tài liệu tham khảo	231

GS. TS. PHAN CỰ NHÂN

DI TRUYỀN HỌC ĐỘNG VẬT

Chịu trách nhiệm xuất bản:	PGS., TS. TÔ ĐĂNG HẢI
Biên tập :	NGUYỄN KIM LONG
Sửa bài :	NGUYỄN KIM LONG
Vẽ bìa :	HƯƠNG LAN

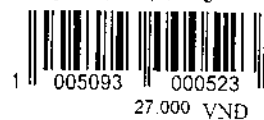
NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
70 Trần Hưng Đạo - Hà Nội

In 1000 cuốn, khổ 16 x 24 tại Xí nghiệp in 19 - 8 số 3 đường
Nguyễn Phong Sắc - Nghĩa Tân - Cầu Giấy - Hà Nội.
Giấy phép xuất bản: số 442 - 27 cấp ngày 5/4/2001.
In xong và nộp lưu tháng 8 năm 2001.

201127



li truyền học dật(dùng mã



27.000 VNĐ

Giá : 27.000đ