

Chương 12. Di truyền vi khuẩn

Mục lục

Chương 12. Di truyền vi khuẩn	1
12.1. Giới thiệu.....	3
12.2. Deoxyribonucleic Acid	3
12.2.1. Mạch DNA.....	3
12.2.2. Gen	5
12.3. Ribonucleic acid.....	5
12.4. Đột biến	6
12.4.1. Các kiểu đột biến	6
12.4.2. Yếu tố gây đột biến.....	7
12.4.3. Ảnh hưởng của đột biến.....	8
12.4.4. Đột biến gây chết có điều kiện	8
12.5. DNA ngoài nhiễm sắc thể	9
12.5.1. Plasmid.....	9
12.5.2. Đặc điểm xác định của Plasmid.....	9
12.5.3. Các loại plasmid.....	10
12.5.4. Tính lan truyền của plasmid	10
12.5.5. Đặc tính tự nhiên của các yếu tố plasmid	10
12.5.6. Chức năng của yếu tố R.....	11
12.5.7. Chức năng của plasmid.....	12
12.6. Chuyển DNA trong phạm vi tế bào vi khuẩn.....	12
12.6.1. Gen nhảy transposon.....	12
12.6.3. Yếu tố tiếp hợp xen vào	14
12.7. Chuyển DNA giữa các tế bào vi khuẩn	14
12.7.1. Biến nạp	14

12.7.2. Tải nạp	16
12.7.3. Tiếp hợp	18
12.7.4. Tái tổ hợp tần suất cao (Hfr).....	20
15.8. Tái tổ hợp	21

12.1. Giới thiệu

Năm 1906, nhà sinh học người Anh William Bateson (1861 - 1926) đã đưa ra thuật ngữ di truyền học. Theo đó, di truyền học là khoa học nghiên cứu về di truyền và biến dị nhằm hiểu được nguyên nhân giống và khác nhau giữa bố mẹ và con cháu.

Đơn vị của di truyền là gen, gen là một đoạn deoxyribonucleic acid (DNA) mang trình tự thông tin nucleotide mã hoá cho một đặc tính sinh hoá hay sinh lý đặc trưng. Tất cả đặc điểm của di truyền đều được mã hoá ở DNA. Chính vì lý do này mà DNA của nhiễm sắc thể đóng một vai trò quan trọng trong duy trì đặc điểm sinh học từ thế hệ này sang thế hệ khác. Gen mang thông tin để mã hoá tất cả các thành phần cần thiết và hoạt động của sự sống. Ở các đợt phân đôi của tế bào, gen được sao chép và truyền cho thế hệ sau.

Mặc dù di truyền và biến dị trong tế bào đã được quan sát từ rất sớm trong lĩnh vực vi sinh vật học, nhưng mãi sau đó người ta vẫn chưa biết vi khuẩn cũng phải tuân thủ quy luật di truyền. Cho đến thập niên 1950, DNA được công nhận là vật liệu xây dựng của các gen.

Không giống như tế bào eukaryote, vi khuẩn là những tế bào đơn bội ($1n$), nghĩa là chúng chỉ có một bản sao cho một gen. Ngược lại tế bào eukaryote là lưỡng bội ($2n$) hay nói cách khác, eukaryote có cặp nhiễm sắc thể và vì vậy chúng có hai bản sao cho mỗi một gen. Kiểu gen của một sinh vật là bộ sưu tập gen đặc trưng mà sinh vật đó có.

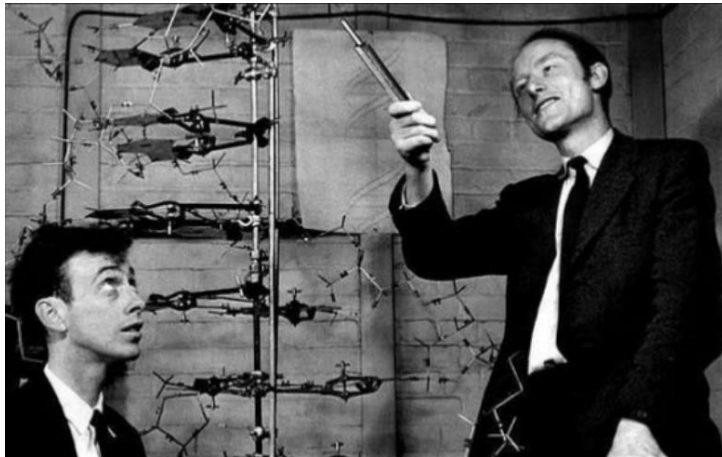
12.2. Deoxyribonucleic Acid

Deoxyribonucleic acid (DNA) là thành phần cơ bản quan trọng của gen, chúng mang thông tin di truyền được mã hóa thành ribonucleic acid và sau đó được dịch mã thành protein cụ thể. Cấu trúc cơ bản của phân tử DNA được Watson (sinh năm 1928) và Crick (1916 - 2004) mô tả lần đầu tiên, từ công trình này họ đã được tôn vinh nhận giải Nobel Y học vào năm 1962. Theo đó, phân tử DNA được cấu tạo từ hai mạch nucleotide bổ sung với nhau và nằm dưới dạng cấu trúc mạch đôi xoắn, có đường kính 2 nm. Mỗi một vòng xoắn đôi này chứa 10 cặp nucleotide và dài 3,4 nm.

12.2.1. Mạch DNA

Mỗi một mạch DNA có khung đường deoxyribose và các nhóm chức phosphate

sắp xếp lần lượt nhau. Khung đường - phosphate được thay thế bằng các base purine và pyrimidine. Có bốn base nitrogen, trong đó có hai purine là adenine và guanine, hai pyrimidine là thymine và cytosine.



Hình 12.1. Ảnh James Dewey Watson (1928) và Francis Harry Compton Crick, ở giữa là mô hình cấu trúc phân tử DNA, từ công trình này họ đã thắng giải Nobel Y học vào năm 1962 cùng với Maurice Hugh Frederick Wilkins (1916 - 2004).

Hai mạch bổ sung được giữ ổn định bằng cầu nối hydrogen giữa các base nitrogen nằm trên mạch đối diện. Cầu nối hydrogen có đặc tính chuyên biệt, chúng chỉ được hình thành giữa guanine và cytosine; giữa adenine và thymine. Guanine và cytosine hình thành cặp base bổ sung; adenine và thymine hình thành cặp base khác.



Francis Harry Compton Crick



James Dewey Watson



Maurice Hugh Frederick Wilkins

Hình 12.2. Ảnh chân dung ba nhà khoa học thắng giải Nobel Y học vào năm 1962 cho công trình: khám phá về cấu trúc acid nucleic và ý nghĩa của nó trong truyền thông tin di truyền ở vật

chất sống (nguồn: www.nobelprize.org).

Vì vậy một phân tử DNA chứa nhiều đơn vị adenine như thymine và nhiều đơn vị guanine như cytosine. Ví dụ khi sự sắp xếp các base dọc theo một mạch là ACTGAG, thì sự sắp xếp của mạch kia là TGA CTC. Tỷ lệ của adenine và thymine đối với guanine và cytosine là một hằng số cho mỗi loài nhưng lại dao động mạnh từ loài vi khuẩn này sang loài vi khuẩn khác.

Trong quá trình sao chép, phân tử DNA sao chép trước tiên bằng cách tháo ra tại

một đầu hình thành dạng giống cái nĩa và sau đó tách các mạch ra tại đầu kia. Sau khi tách mỗi mạch hoạt động như là khuôn để tổng hợp mạch bổ sung, để rồi sau đó hình thành mạch xoắn đôi.

12.2.2. Gen

Gen là một đoạn DNA mang mã di truyền chuyên biệt cho một polypeptide cụ thể. Một phân tử DNA gồm nhiều gen, mỗi gen chứa hàng ngàn nucleotide. DNA của một nhiễm sắc thể vi khuẩn thường được sắp xếp ở dạng tròn và khi duỗi thẳng ra, kích thước của nó dài khoảng 1.000 μ . Độ dài của DNA thường được biểu thị bằng kilobase, 1 kbp = 1.000 cặp base, hay bp. Kích thước DNA của vi khuẩn thường có khoảng 4.000 kbp và bộ gen ở người khoảng 3 triệu kbp.

DNA của vi khuẩn *Escherichia coli* được nghiên cứu nhiều nhất. Bộ gen của *E.coli* là một phân tử DNA vòng, mạch đơn, kích thước khoảng 5×10^6 bp. Trọng lượng phân tử là 2×10^9 . Với kích thước này lượng thông tin di truyền trong vi khuẩn có thể mã hoá khoảng 2.000 protein có trọng lượng phân tử trung bình là 50.000 kDa.

12.3. Ribonucleic acid

Về cơ bản cấu trúc ribonucleic acid (RNA) thì tương tự với cấu trúc DNA ngoại trừ hai điểm khác nhau chủ yếu như sau: (a). Ở phân tử DNA, đường là D-2-deoxyribose; ở RNA, đường là D-ribose. (b). RNA chứa base nitrogen uracil thay vì thymine có trong DNA.

Căn cứ vào cấu trúc và chức năng cơ bản, có thể chia RNA thành ba nhóm: (a). RNA thông tin (mRNA), (b). RNA Ribosome (rRNA) và (c). RNA vận chuyển (tRNA). Kích thước của các phân tử RNA thì dao động từ kích thước nhỏ của tRNA, phân tử này chứa ít hơn 100 base, đến kích thước lớn mRNAs, phân tử này có thể mang thông tin di truyền mở rộng đến vài ngàn base. Ribosome của vi khuẩn có ba loại rRNA với kích thước tương ứng là 120, 1.540 và 2.900 base và có một lượng protein. Các phân tử rRNA ở ribosome eukaryote có phần lớn hơn.

Một vài phân tử RNA có biểu hiện chức năng enzyme (ribozyme). Ví dụ RNA 23S trong tiểu đơn vị ribosome 50S xúc tác hình thành cầu nối peptide trong quá trình tổng hợp protein. Một số phân tử RNA nhỏ (sRNA) có chức năng như là yếu tố điều hoà

hoặc (a) bằng cách liên kết gần đầu 5' của mRNA để ngăn chặn ribosome khỏi quá trình dịch mã thông tin di truyền hoặc (b) bằng cách cặp đôi base trực tiếp với một mạch DNA gần với promoter để ngăn chặn quá trình phiên mã.

12.4. Đột biến

Đột biến là sự biến đổi ngẫu nhiên, không trực tiếp và có khả năng kế thừa thấy được ở DNA trong tế bào. Điều này là do có sự thay đổi về trình tự base của DNA do thêm vào, xoá đi hoặc thay thế một hoặc nhiều base trong trình tự nucleotide của DNA. Quá trình này có thể liên quan đến bất kỳ các gen nào có trong nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Đột biến làm cho một amino acid khác xen vào protein, dẫn đến làm xuất hiện kiểu hình khác.

12.4.1. Các kiểu đột biến

Đột biến là sự kiện tự nhiên xảy ra trong quá trình phân chia tế bào. Tần suất của đột biến trong khoảng 10^{-2} - 10^{-10} / vi khuẩn/ lần phân đôi. Tần suất này xảy ra một cách tự phát hoặc được gia tăng do các yếu tố gây đột biến khác nhau tác động. Đột biến có ba kiểu: (a) thay thế base, (b) đột biến xê dịch khung và (c) đột biến do gen nhảy (transposon) hoặc do chèn trình tự vào.

(a). Đột biến do thay thế base: kiểu đột biến này xảy ra khi một base trong trình tự nucleotide được chèn vào một nơi khác. Điều này xảy ra trong quá trình sao chép DNA hoặc là do lỗi trong chức năng của DNA polymerase hoặc là do yếu tố gây đột biến làm thay đổi cầu nối hydrogen của base đang được sử dụng làm khuôn, vì đặc điểm này dẫn đến base chèn vào sai vị trí. Đột biến do thay thế base có thể có hai kiểu đó là (i) đột biến làm sai nghĩa (*missense mutation*) và (ii) đột biến không làm sai nghĩa (*nonsense mutation*).

(i). Đột biến làm sai nghĩa: là đột biến làm thay thế một base dẫn đến một codon mã hoá cho một amino acid khác được chèn vào.

(ii). Đột biến không làm sai nghĩa: đây là một kiểu đột biến khác mà theo đó sự thay thế một base tạo ra một codon cuối kết thúc sớm quá trình tổng hợp protein. Chức năng thật sự của protein bị phá huỷ trong suốt quá trình đột biến không làm sai nghĩa.

(b). Đột biến làm xê dịch khung: đây là dạng thứ hai của đột biến. Đột biến

này xảy ra khi một hoặc nhiều cặp base được thêm vào hoặc bị xoá đi trong DNA. Vì vậy đột biến này sẽ làm xê dịch khung đọc của ribosome, làm cho sự kết hợp của các amino acid sai lệch theo chiều xuôi. Kết quả đột biến này tạo ra protein không có hoạt tính.

(c). Đột biến do gen nhảy hoặc do trình tự chèn: đây là kiểu đột biến thứ ba xảy ra khi gen nhảy hay trình tự chèn được xen vào DNA. Các quá trình này chèn một đoạn DNA mới làm thay đổi đáng kể gen bị đoạn DNA chèn vào và cũng làm thay đổi các gen gần kề.

12.4.2. Yếu tố gây đột biến

Đột biến xảy ra có thể là do (a) virus, (b) bức xạ hay (c) hóa chất.

(a). Virus: virus của vi khuẩn, yếu tố gây đột biến là thực khuẩn thể (bacteriophage) là ví dụ về virus gây đột biến có tần suất cao do DNA của virus được chèn vào nhiễm sắc thể vi khuẩn. Đột biến có thể xảy ra ở nhiều gen là do DNA virus có thể chèn vào nhiễm sắc thể vi khuẩn tại nhiều vị trí khác nhau. Các đột biến do virus gây ra có thể là hoặc làm xê dịch khuôn hoặc là làm mất đoạn.

(b). Bức xạ: tia X và ánh sáng tử ngoại là những ví dụ về bức xạ có thể gây đột biến nhiễm sắc thể.

Tia X làm tổn hại DNA trong nhiều cách. Chúng gây tổn hại bằng cách tạo ra các gốc tự do có thể tấn công vào base hoặc làm thay đổi chúng ở trong mạch, nhờ đó làm thay đổi cầu nối hydrogen giữa các base. Tia X cũng làm tổn hại DNA bằng cách phá vỡ liên kết cộng hóa trị giúp giữ ribose phosphate với nhau.

Ánh sáng cực tím (UV) là bức xạ tử ngoại gây tổn thương DNA bằng cách liên kết chéo với các base pyrimidine gần kề để hình thành nên các dimer. Ví dụ liên kết chéo của thymine gần kề để hình thành nên các dimer thymine dẫn đến làm cho DNA không có khả năng sao chép.

(c). Hóa chất: nhiều hóa chất như nitrous acid, yếu tố gây alkyl hóa, benzpyrene và các chất tương tự (analog) base như 5-bromouracil gây đột biến trong một số cách khác nhau:

Benzpyrene, hóa chất này thường phổ biến trong khói thuốc lá, chúng liên kết với base DNA và làm đột biến xê dịch khung. Benzpyrene là chất gây ung thư (carcinogen)

cũng như là yếu tố gây đột biến, việc xen vào giữa các base làm biến dạng và xê dịch trình tự nucleotide trong DNA.

Nitrous acid và yếu tố gây alkyl hóa, các yếu tố này hoạt động bằng cách làm thay đổi base đang tồn tại trong DNA. Điều này dẫn đến hình thành cầu nối hydrogen với base sai. Ví dụ adenine không hình thành cầu nối với thymine nhưng lại cặp đôi sai với cytosine.

Các chất tương tự base như 5-bromouracil có khả năng ít liên kết hydrogen hơn so với thymine, vì vậy chúng thường tạo cầu nối với guanine tốt hơn. Điều này dẫn đến sự dịch chuyển từ cặp base AT thành cặp base GC gây ra đột biến. Iododeoxyuridine, thuốc kháng virus cũng hoạt động như là một chất tương tự như cặp base.

12.4.3. Ảnh hưởng của đột biến

Đột biến ở vi khuẩn gây hàng loạt thay đổi về nhiều thuộc tính. Đột biến làm thay đổi tính nhạy cảm với thuốc, cấu trúc kháng nguyên và độc lực của vi khuẩn bị đột biến. Đột biến cũng làm thay đổi tính nhạy cảm của vi khuẩn với bacteriophage, làm thay đổi hình thái khuẩn lạc, khả năng tạo sắc tố của vi khuẩn và tác động đến khả năng tạo capsule hay tiên mao của vi khuẩn. Sự phát triển kháng kháng sinh ở vi khuẩn do đột biến là một vấn đề sức khỏe lớn cần quan tâm.

12.4.4. Đột biến gây chết có điều kiện

Đột biến gây chết xảy ra khi một số đột biến liên quan đến chức năng sống, dẫn đến tạo ra các đột biến không sống được. Mặt khác, đột biến gây chết có điều kiện là một dạng của đột biến gây chết, theo đó đột biến chỉ được biểu hiện dưới một số điều kiện nhất định, dẫn đến tạo ra các thể đột biến còn sống. Điều này là vấn đề quan trọng trong y học vì các chủng đột biến này được sử dụng để điều chế vaccine. Các chủng nhạy cảm với nhiệt độ là ví dụ phổ biến nhất của đột biến gây chết có điều kiện.

Sinh vật nhạy cảm với nhiệt độ có đặc điểm độc đáo đó là cho phép sao chép ở nhiệt độ thấp như ở 32°C nhưng lại không thể phát triển ở nhiệt độ cao hơn như ở 37°C. Điều này là do đột biến đã làm thay đổi về amino acid trong protein thiết yếu, cho phép các sinh vật này biểu hiện chức năng ở 32°C nhưng lại không biểu hiện ở 37°C. Chủng virus cúm gia cầm nhạy cảm với nhiệt độ được sử dụng trong vaccine thực nghiệm là một

ví dụ cho đột biến gây chết có điều kiện. Vaccine cúm gia cầm này chứa virus phát triển ở 32°C, xâm nhiễm vào mũi, có thể sao chép và cảm ứng sự miễn dịch. Nhưng virus này không thể tăng trưởng ở 37°C, vì vậy nó không thể xâm nhiễm vào phổi và không gây ra bệnh viêm phổi.

12.5. DNA ngoài nhiễm sắc thể

12.5.1. Plasmid

Plasmid là DNA ngoài nhiễm sắc thể. Chúng là những đơn vị sao chép (replicon) được xem như là yếu tố di truyền riêng biệt ngoài nhiễm sắc thể ở vi khuẩn. Kích thước của plasmid thường nhỏ hơn nhiều so với nhiễm sắc thể vi khuẩn, dao động từ nhỏ hơn năm kbp đến hơn vài trăm kbp. Tuy nhiên plasmid có kích thước lớn 2 triệu cặp base có thể có ở một số vi khuẩn. Plasmid là phân tử DNA mạch đôi tròn, mã hóa cho những đặc điểm không cần thiết cho khả năng sống của vi khuẩn. Chúng có khả năng sao chép một cách độc lập, không phụ thuộc vào nhiễm sắc thể vi khuẩn. Plasmid cũng có thể xen vào nhiễm sắc thể vi khuẩn và khi đó chúng được gọi là episome. Plasmid hiện diện trong cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm.

12.5.2. Đặc điểm xác định của Plasmid

Plasmid mang các gen như sau:

- (a). Gen kháng kháng sinh mã hóa cho nhiều enzyme.
- (b). Gen kháng ánh sáng cực tím mã hóa cho các enzyme sửa sai DNA.
- (c). Gen kháng kim loại nặng như thủy ngân và bạc được thực hiện qua trung gian enzyme reductase.
- (d). Gen mã hóa cho sợi tơ làm trung gian cho vi khuẩn bám dính lên tế bào biểu mô. Ví dụ gen K88, K99 tìm thấy ở vi khuẩn *E. coli* gây bệnh đường tiết niệu.
- (e). Các ngoại độc tố bao gồm nhiều độc tố đường ruột. Các plasmid mã hóa cho các độc tố gồm độc tố đường ruột không bền nhiệt và độc tố đường ruột bền nhiệt của *E. coli*, độc tố gây tróc vảy của *Staphylococcus aureus*, hemolysin của *Clostridium perfringens* và độc tố uốn ván của *Clostridium tetani*.
- (f). Bacteriocin do một số vi khuẩn Gram âm tạo ra, gây chết cho các vi khuẩn khác. Ví dụ như pyocin do *Pseudomonas pyocyanea* tạo ra và diphthericin do

Clostridium diphtheriae sản sinh ra.

(g). Nhiều enzyme như urease của *Helicobacter pylori* và protease của *Pseudomonas* spp. có đặc tính phân hủy. Các enzyme phân hủy do *Pseudomonas* spp. tạo ra có khả năng làm sạch các hạt dầu và chất thải hóa học gây độc trong môi trường.

12.5.3. Các loại plasmid

Plasmid phụ thuộc vào sự lan truyền của chúng và đặc tính tự nhiên của các yếu tố có thể có các kiểu sau đây:

12.5.4. Tính lan truyền của plasmid

Plasmid phụ thuộc vào sự lan truyền có hai nhóm: (a) plasmid có khả năng lan truyền và (b) plasmid không có khả năng lan truyền.

(a). Plasmid có khả năng lan truyền: là các plasmid có thể được lan truyền từ tế bào này sang tế bào khác theo một quá trình chuyển vật liệu di truyền được gọi là sự tiếp hợp (conjugation). Các plasmid này có kích thước lớn, trọng lượng phân tử dao động trong khoảng 40 - 100 triệu cặp base. Chúng có nhiều hơn hàng tá gen chịu trách nhiệm cho tổng hợp sợi tơ giới tính và tổng hợp enzyme cần thiết cho quá trình chuyển giao của chúng. Thông thường trong một tế bào vi khuẩn có từ 1 - 3 bản sao plasmid.

(b). Plasmid không có khả năng lan truyền: đây là các plasmid không thể lan truyền từ tế bào này sang tế bào khác do chúng không chứa các gen chuyển giao. Chúng là những plasmid nhỏ, trọng lượng phân tử từ 3 - 20 triệu cặp base, thường không có khả năng tiếp hợp và có một lượng bản sao cao, điển hình dao động từ 10 - 60 bản sao/ nhiễm sắc thể. Các plasmid này phụ thuộc vào tế bào vi khuẩn chủ để cung cấp một số chức năng cần thiết cho sao chép và phân bố ngẫu nhiên cho các tế bào con khi phân chia.

12.5.5. Đặc tính tự nhiên của các yếu tố plasmid

Phụ thuộc vào đặc điểm tự nhiên của các yếu tố, plasmid được phân thành các kiểu sau: (a) yếu tố F, (b) yếu tố R và (c) yếu tố Col.

(a). Yếu tố F: plasmid F còn gọi là yếu tố F, là yếu tố lan truyền chứa thông tin di truyền cần thiết cho kiểm soát quá trình giao cấu của vi khuẩn trong suốt giai đoạn tiếp hợp.

Plasmid F của *Escherichia coli* là nguyên mẫu về các plasmid có khả năng sinh sản ở vi khuẩn Gram âm. Các chủng *E.coli* có plasmid F ngoài nhiễm sắc thể được gọi là F^+ và có chức năng như là các thể cho (donor), ngược các chủng thiếu plasmid F được gọi là F^- và hoạt động như là các thể nhận (recipient). Chức năng tiếp hợp của plasmid F được xác định qua ít nhất gồm 25 gen có chức năng lan truyền gọi là các gen tra, được đặt tên theo từ transfer. Các gen xác định (a) sự biểu hiện của sợi tơ (pilus), (b) tổng hợp và truyền DNA trong quá trình giao phối, (c) can dự vào khả năng vi khuẩn F^+ phục vụ thể nhận và (d) các chức năng khác. Plasmid F ở *E. coli* có thể xuất hiện yếu tố di truyền ngoài nhiễm sắc thể hoặc bị xen vào nhiễm sắc thể vi khuẩn.

Cả plasmid F và nhiễm sắc thể vi khuẩn là các phân tử DNA vòng. Vì vậy sự tái tổ hợp giữa chúng sẽ tạo ra phân tử DNA vòng lớn hơn gồm DNA plasmid F được chèn vào nhiễm sắc thể.

(b). Yếu tố R: là yếu tố kháng, ký tự R xuất phát từ resistance có nghĩa là sự kháng, là plasmid ngoài nhiễm sắc thể. Chúng là DNA mạch đôi, dạng vòng. Yếu tố R có hai kích cỡ: dạng plasmid lớn, có lượng phân tử là 60 triệu cặp base và plasmid có kích thước nhỏ, trọng lượng phân tử là 10 triệu cặp base. Plasmid lớn là yếu tố "R" có khả năng tiếp hợp, vì chúng chứa DNA phụ trợ mã hóa cho tiến trình tiếp hợp. Các plasmid nhỏ chỉ chứa các gen "r" và không có khả năng tiếp hợp. Yếu tố R gồm hai hợp phần: yếu tố chuyển kháng (RTF) và yếu tố quyết định kháng (r). RTF chịu trách nhiệm cho sự chuyển giao khi tiếp hợp, trong khi đó yếu tố quyết định kháng r mang chức năng kháng một hay một số kháng sinh.

(c). Yếu tố sản sinh colicin (Col): yếu tố Col là một plasmid giống như yếu tố F trong quá trình tiếp hợp đang diễn ra, dẫn đến tự chuyển giao tại một số lần chuyển các đoạn nhiễm sắc thể. Yếu tố Col mã hóa cho (a). Sự tổng hợp colicin, chất này có tính năng tương tự như kháng sinh, gây chết một cách chọn lọc và chuyên biệt cho vi khuẩn đường ruột và (b). Sự sản sinh diphthericin và pyocyanin ở *Corynebacterium diphtheriae* và *Pseudomonas pyocyanea*, đây là những chất tương tự như colicin.

15.5.6. Chức năng của yếu tố R

Yếu tố R có một số chức năng sau:

(a). Làm lan truyền khả năng đa kháng thuốc ở vi khuẩn. Chúng mang các gen mã hóa cho nhiều enzyme có khả năng phá hủy nhiều kháng sinh và làm biến đổi hệ thống vận chuyển trên màng. Yếu tố R có thể mang một gen kháng kháng sinh hoặc có thể mang hai gen hoặc nhiều hơn gen kháng kháng sinh. Yếu tố R mang nhiều hơn hai gen kháng gây ra nhiều tác động như sau: (i). Trước tiên và trước hết, một vi khuẩn đang mang các gen này sẽ biểu hiện tính kháng nhiều hơn một loại kháng sinh như nhóm penicillin và nhóm aminoglycoside. (ii). Điều quan trọng thứ hai là việc sử dụng một kháng sinh để điều trị thay thế cho một vi khuẩn kháng một kháng sinh này ví dụ như penicillin, sẽ làm cho vi khuẩn kháng kháng sinh khác như nhóm tetracycline, nhóm aminoglycoside, chloramphenicol, erythromycin,

(b). Chúng cũng có thể mang nhiều gen kháng nhiều ion kim loại. Ví dụ gen mã hóa cho enzyme khử ion Hg thành Hg⁰, nhờ đó làm cho vi khuẩn này kháng được tác động của ion Hg.

(c). Chúng cũng mang một số bacteriophage mã hóa cho một số enzyme như endonuclease cắt giới hạn, có chức năng phân hủy DNA mang chức năng giúp cho bacteriophage xâm nhiễm.

15.5.7. Chức năng của plasmid

Nhiều plasmid kiểm soát các thuộc tính gây bệnh quan trọng ở các vi khuẩn gây bệnh. Các thuộc tính này gồm (a) khả năng kháng lại một hoặc một số kháng sinh, (b) sản sinh ra các độc tố và (c) tổng hợp các cấu trúc bề mặt cần thiết cho quá trình bám dính hay kết cụm của vi khuẩn. Một số plasmid thì bí ẩn và chưa phát hiện được tác động nào lên tế bào vi khuẩn cho chúng ẩn náu. Hồ sơ so sánh plasmid là phương pháp hữu dụng để đánh giá mối tương quan của các chủng phân lập để nghiên cứu về dịch tễ học.

15.6. Chuyển DNA trong phạm vi tế bào vi khuẩn

Chuyển DNA trong phạm vi tế bào vi khuẩn có thể xuất hiện là do (a) các gen nhảy (transposon) (b) yếu tố tiếp hợp xen vào và (c) tái sắp xếp lại theo chương trình.

12.6.1. Gen nhảy transposon

Gen nhảy là một kiểu DNA di động có kích thước trong khoảng 2000 - 20.000 bp. Chúng có thể chuyển DNA từ một vị trí của nhiễm sắc thể vi khuẩn đến một vị trí khác

của plasmid. Ý tưởng về yếu tố nhảy hay gen nhảy là do Barbara McClintock (1902 - 1992) đưa ra đầu tiên, bà là nhà khoa học làm việc trong lĩnh vực di truyền học ở bắp, nhận giải Nobel vào năm 1981.

Kiểu chuyển di truyền do yếu tố nhảy được gọi là sự chuyển vị (transposition). Sự chuyển vị khác với sự tái tổ hợp ở chỗ đoạn DNA có thể được chuyển từ một phân tử này sang một phân tử khác mà không có sự đồng dạng về di truyền với yếu tố nhảy hay DNA của thể cho.

Các yếu tố nhảy không xuất hiện một cách độc lập nhưng chúng có đặc tính nhảy từ vị trí này sang vị trí khác trên nhiễm sắc thể hoặc sang plasmid. Chúng cũng có thể nhảy từ một plasmid này sang một plasmid khác hoặc nhảy ngược lại nhiễm sắc thể. Vì vậy chúng được gọi là gen nhảy.

Sự chuyển vị ở prokaryote thường liên quan đến hai bước đó là: (a) tự sao chép và (b) tái tổ hợp. Các yếu tố nhảy từ vị trí này sang vị trí khác nhờ tổng hợp một bản sao DNA của chúng và chèn bản sao này tại vị trí khác trong nhiễm sắc thể vi khuẩn hay trong plasmid.

Không giống như plasmid, các yếu tố nhảy không tự sao chép và phụ thuộc vào sự sao chép của nhiễm sắc thể. Gen nhảy không đòi hỏi sự tương đồng về vị trí tiếp nhận để chúng chuyển vị. Các gen nhảy thường có bốn vùng:

(i). Vùng thứ nhất là trình tự DNA ngắn của các đoạn chèn lặp lại, hiện diện tại đầu cuối. Vùng này đóng vai trò trung gian cho sự xen vào của các yếu tố nhảy vào DNA nhận.

(ii). Vùng thứ hai là gen mã hoá cho enzyme transposase. Các enzyme này làm trung gian cho quá trình cắt và xen vào.

(iii). Vùng thứ ba là gen mã hoá cho yếu tố kìm hãm (repressor), yếu tố này điều hoà sự tổng hợp cả transposase và các sản phẩm của gen ở vùng thứ tư.

(iv). Vùng thứ tư là gen mã hoá cho sự biểu hiện của enzyme. Plasmid có thể chứa một số yếu tố nhảy mang các gen kháng thuốc. Các gen nhảy này mã hoá cho các enzyme kháng kháng sinh, kháng độc tố hay nhiều enzyme biến dưỡng khác. Các gen nhảy này có thể hoặc là gây đột biến ở gen mà theo đó chúng chèn hoặc làm thay đổi sự biểu hiện

của các gen gần kề.

12.6.2. Trình tự chèn:

Hình thức đơn giản nhất của các yếu tố nhảy là các trình tự chèn. Các trình tự chèn này là một dạng của các yếu tố nhảy (transposon), chúng chỉ có một số ít base dao động từ 800 đến 1.500 bp. Trình tự chèn có nhiều bản sao ở đầu cuối của các đơn vị transposon lớn hơn. Các trình tự này gây đột biến bằng cách di chuyển từ một vị trí này đến vị trí khác trong trình tự DNA và được cho là để kiểm soát nhiều phản ứng của tế bào.

12.6.3. Yếu tố tiếp hợp xen vào

Yếu tố tiếp hợp xen vào (ICE) là phương thức chuyển gen theo chiều ngang và là yếu tố di truyền di động có khả năng tự lan truyền. Các yếu tố này trao đổi nhờ sự tiếp hợp nhưng cần thiết để chèn vào nhiễm sắc thể cho mục đích lan truyền. Chúng không thể sao chép một cách tự động. ICE xen vào và sao chép dọc theo nhiễm sắc thể của tế bào chủ, ngược lại plasmid tồn tại bên ngoài nhiễm sắc thể, là những phân tử DNA mạch vòng sao chép hoàn toàn tự động.

12.6.4. Tái sắp xếp theo chương trình

Chuyển DNA trong phạm vi vi khuẩn cũng có thể xảy ra nhờ sự tái sắp xếp theo chương trình. Trong sự tái sắp xếp theo chương trình này làm xuất hiện sự di chuyển của một gen từ vị trí yên lặng, nơi mà gen không có biểu hiện, đến nơi hoạt động ở đó diễn ra sự phiên mã và dịch mã. Nhiều gen yên lặng có trong DNA mã hoá cho nhiều biến thể của kháng nguyên. Gen mới này biểu hiện sự đa dạng kháng nguyên ở vi khuẩn và ký sinh trùng. Cơ chế này chịu trách nhiệm cho sự đa dạng kháng nguyên phát hiện ở *Neisseria gonorrhoeae*, *Borrelia recurrentis* và *Trypanosoma brucei*.

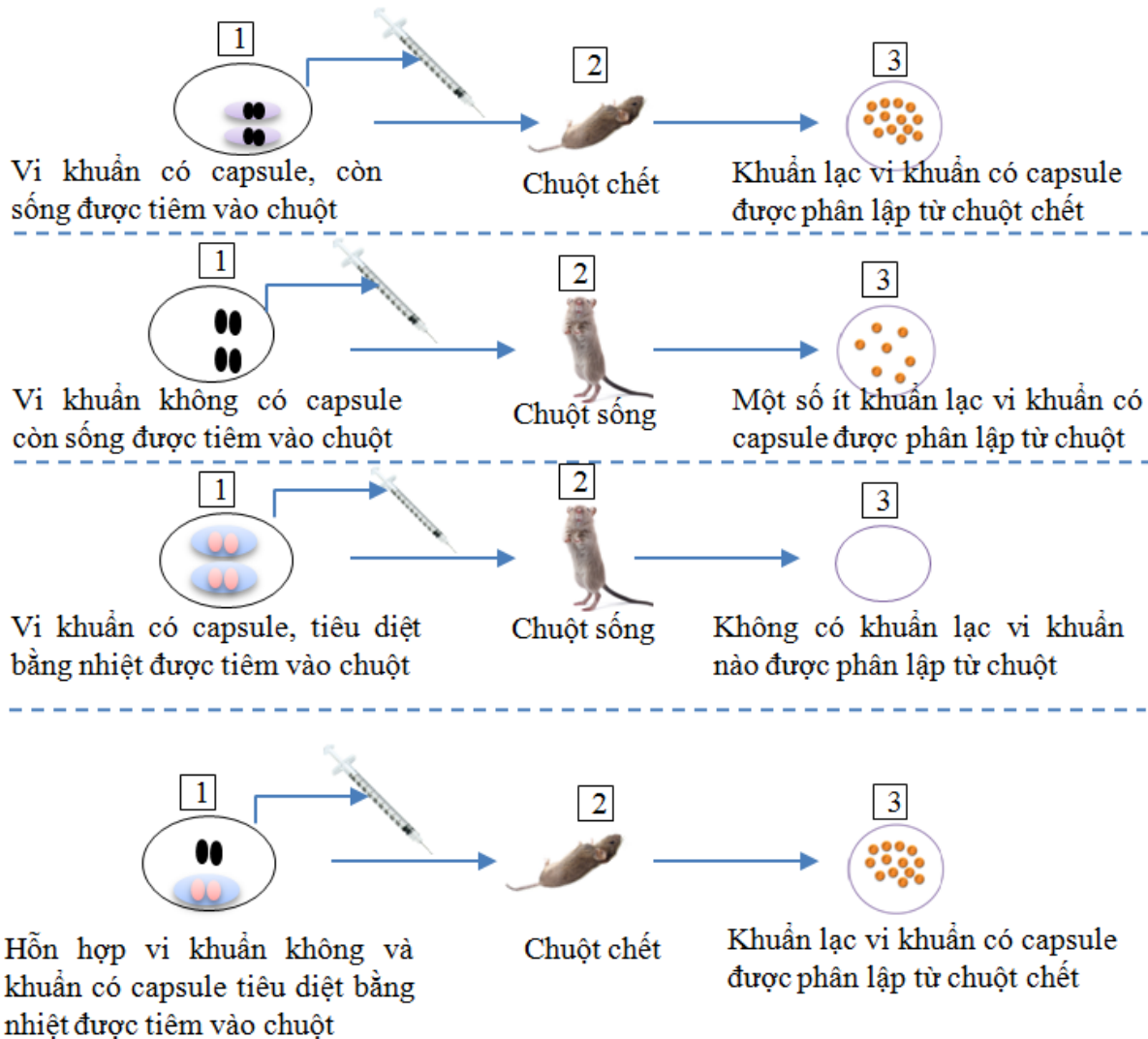
12.7. Chuyển DNA giữa các tế bào vi khuẩn

Thông tin di truyền có thể được chuyển từ một vi khuẩn này sang một vi khuẩn khác. Có ba phương pháp chung để trao đổi di truyền giữa vi khuẩn, đó là: (a) biến nạp, (b) tải nạp và (c) tiếp hợp.

12.7.1. Biến nạp

Biến nạp (transformation) là một quá trình chuyển DNA từ một vi khuẩn này sang vi khuẩn khác. Điều này có thể xảy ra trong tự nhiên hoặc trong phòng thí nghiệm. Trong

tự nhiên, DNA được phóng thích từ vi khuẩn do ly giải, DNA này có thể được vi khuẩn có năng lực khả nạp thu nhận. Quá trình chuyển vật liệu di truyền trong tự nhiên diễn ra nhưng không đóng vai trò trong việc gây bệnh. Trong điều kiện thí nghiệm, DNA có thể được trích từ một vi khuẩn này và đưa vật liệu di truyền vào vi khuẩn khác. Thành tế bào của vi khuẩn trong điều kiện thí nghiệm (*in vitro*) được làm cho dễ thấm hơn để DNA dễ dàng xâm nhập vào nhờ sử dụng các chất như calcium chloride.



Hình 12.3. Sơ đồ minh họa sự lan truyền DNA theo cơ chế biến nạp.

Năm 1922, trong thực nghiệm trên chuột, Griffith (1879 - 1941) đã chứng minh chuột không chết khi tiêm riêng lẻ *Pneumococcus* còn sống, không có capsule và tiêm *Pneumococcus* có capsule nhưng bị tiêu diệt bằng nhiệt. Nhưng khi tiêm hỗn hợp hai

chúng trên vào chuột làm chuột chết. Từ xác chuột chết, ông có thể phân lập được *Pneumococcus* còn sống, có capsule, là chủng độc. Griffith đã chứng minh được một số yếu tố trong *Pneumococcus* còn sống, có capsule, đã bị tiêu diệt bằng nhiệt đã chuyển vật liệu di truyền để các chủng vi khuẩn không có capsule tổng hợp, nên làm cho chúng trở nên độc. Sơ đồ thí nghiệm chứng minh cho nhận định trên được minh họa tại Hình 12.3.

Năm 1944, McLeod và McCarthy đã chứng minh DNA được trích từ chủng *Pneumococcus* nhẵn, có capsule có thể biến nạp vào chủng *Pneumococcus* ráp, không có capsule để biến thành chủng nhẵn có capsule. Họ đã chứng minh nguyên tắc biến nạp DNA. Sử dụng thực nghiệm biến nạp là thực nghiệm đầu tiên làm lộ ra thông tin quan trọng về DNA và là ví dụ đầu tiên về trao đổi di truyền giữa các vi khuẩn.

Một vi khuẩn khác diễn ra sự biến nạp đã được quan sát là *Haemophilus influenzae*. Khi DNA tinh sạch được tiêm vào nhân của tế bào vi khuẩn, quá trình này được gọi là sự chuyển nạp. Sự chuyển nạp thường được sử dụng trong nghiên cứu về kỹ thuật di truyền.

12.7.2. Tải nạp

Tải nạp (transfection) là quá trình chuyển một phần DNA từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác qua trung gian thực khuẩn thể (bacteriophage).

Trong quá trình sao chép virus trong phạm vi tế bào, một mảnh DNA của vi khuẩn được kết hợp vào trong thực khuẩn thể và được chuyển vào vi khuẩn tiếp nhận tại thời điểm xâm nhiễm. DNA của phage trong tế bào vi khuẩn nhận xen vào DNA của tế bào trong quá trình chuyển đổi tiềm tan (lysogenic conversion). Quá trình chuyển đổi tiềm tan này hợp nhất đặc tính mới vào tế bào vi khuẩn; ví dụ bằng cách chuyển đổi tiềm tan này, vi khuẩn không gây bệnh có thể trở nên gây bệnh. Bacteriophage mã hóa cho độc tố gây bệnh bạch hầu, độc tố botulinum, độc tố tả và độc tố gây ban đỏ có thể được chuyển từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác bằng hình thức tải nạp. Có hai kiểu tải nạp đó là: (a) tải nạp không chuyên biệt và (b) tải nạp chuyên biệt. Quá trình tải nạp được minh họa tại Hình 12.4.

Tải nạp không chuyên biệt: kiểu tải nạp này xảy ra khi một đoạn nhỏ vật liệu di truyền của phage được tạo ra trong chu trình sinh tan là khác thường và chứa một đoạn

ngẫu nhiên của bộ gen vi khuẩn thay vì DNA của phage. Mỗi cá thể phage tải nạp mang một bộ gen khác nhau gồm các gen có liên hệ gần, đại diện một đoạn nhỏ bộ gen vi khuẩn. Sự tải nạp qua trung gian quần thể các phage như vậy gọi là sự tải nạp không chuyên biệt (generalized transduction). Mỗi một phần của bộ gen vi khuẩn có khả năng như nhau về chuyển từ vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận.

Tải nạp không chuyên biệt liên quan một cách ngẫu nhiên đến bất kỳ DNA cho nào. Điều này xảy ra là do sau khi bị nhiễm, DNA của tế bào được phân đoạn thành các mảnh DNA tương tự nhau, có kích thước tương tự như DNA của virus, được kết hợp vào trong DNA vi khuẩn. Quá trình này xảy ra ở tần suất khoảng 1/ 1000 virus. Tải nạp chung hay tải nạp không chuyên biệt có thể thành công hoặc chết yếu:

(i). Tải nạp thành công được đặc trưng bằng sự sản sinh ra các tái tổ hợp bền vững, thừa hưởng các gen từ thể cho và giữ lại khả năng biểu hiện chúng.

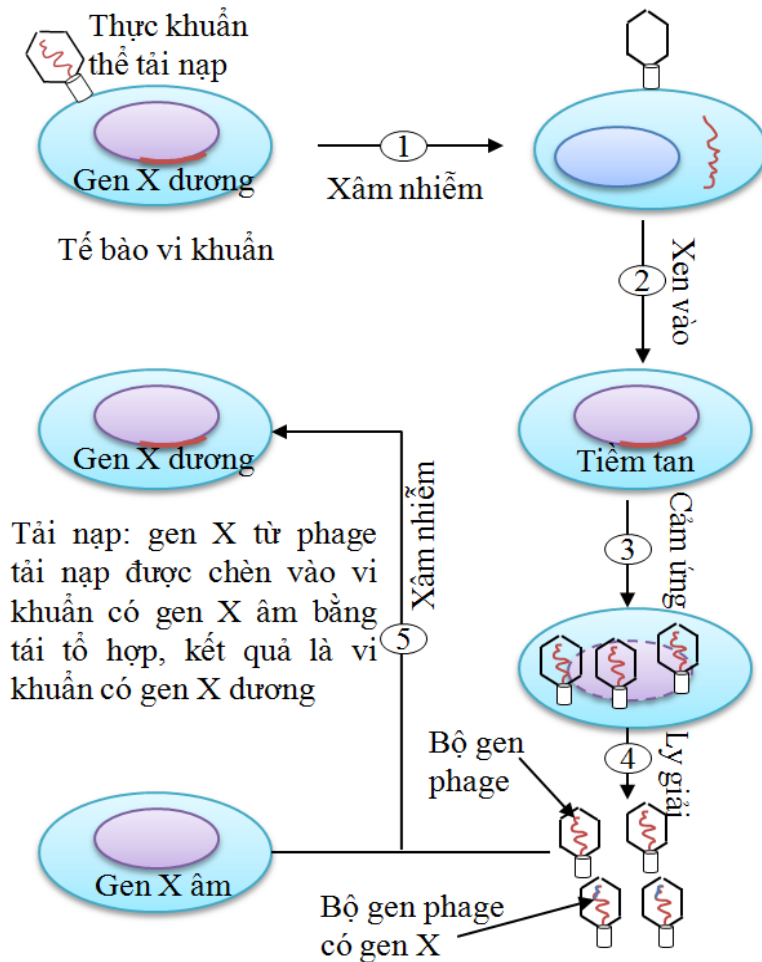
(ii). Tải nạp chết yếu được cho là biểu hiện nhất thời của một hoặc nhiều gen của thể nhận mà không hình thành thế hệ con tái tổ hợp. Đoạn DNA của thể cho không được sao chép trong trường hợp tải nạp chết yếu và chỉ có một vi khuẩn chứa đoạn DNA của thể cho trong số các con được sinh ra từ thể tải nạp ban đầu. Sản phẩm gen của thể cho bị pha loãng dần dần trong tất cả các con khác sau mỗi thế hệ tăng trưởng của vi khuẩn cho đến khi kiểu hình của thể cho không biểu hiện được nữa. Trên môi trường chọn lọc, thể tải nạp chết yếu tạo ra một vài khuẩn lạc có thể dễ dàng phân biệt với các thể nạp bền vững. Tần suất của tải nạp chết yếu thường nhiều hơn từ một đến hai lần so với tần suất của của tải nạp không chuyên biệt. Điều này phản ánh hầu hết các tế bào bị nhiễm do các phage tải nạp không chuyên biệt sẽ không sản sinh ra thế hệ con tái tổ hợp.

Tải nạp chuyên biệt: tải nạp chuyên biệt là kết quả của sự tiềm tan (lysogenization) từ vi khuẩn nhận do phage tải nạp chuyên biệt và sự biểu hiện của các gen thuộc thể cho. Phage tải nạp chuyên biệt chỉ được hình thành khi vi khuẩn cho tiềm tan vào chu trình sinh tan và phóng thích ra các phage con.

Phage tải nạp chuyên biệt hiếm khi là thể tái tổ hợp thiếu một phần bộ gen thông thường của phage. Chúng chứa một phần của nhiễm sắc thể vi khuẩn hiện diện gần kề vị trí bám của tiền phage (prophage). Nhiều phage tải nạp chuyên biệt có khiếm khuyết nên

chúng không thể hoàn thành chu trình sinh tan do sự tăng trưởng của phage vào các tế bào bị nhiễm ngoại trừ thể hỗ trợ phage (helper phage) có mặt để cung cấp các chức năng mà phage còn thiếu.

Phage tải nạp chuyên biệt khác với phage tải nạp không chuyên biệt trong nhiều



trường hợp. Phage tải nạp chuyên biệt chỉ thực hiện qua trung gian khuôn của phage chuyên biệt và chỉ có một số ít gen chuyên biệt của thể cho được truyền cho vi khuẩn nhận.

Hình 12.4. Sơ đồ minh họa sự lan truyền vật liệu di truyền bằng hình thức tải nạp qua trung gian thực khuẩn thể.

Tải nạp không chỉ giới hạn truyền gen vào DNA nhiễm sắc thể mà còn vào plasmid và episome. Tải nạp liên quan đến truyền plasmid

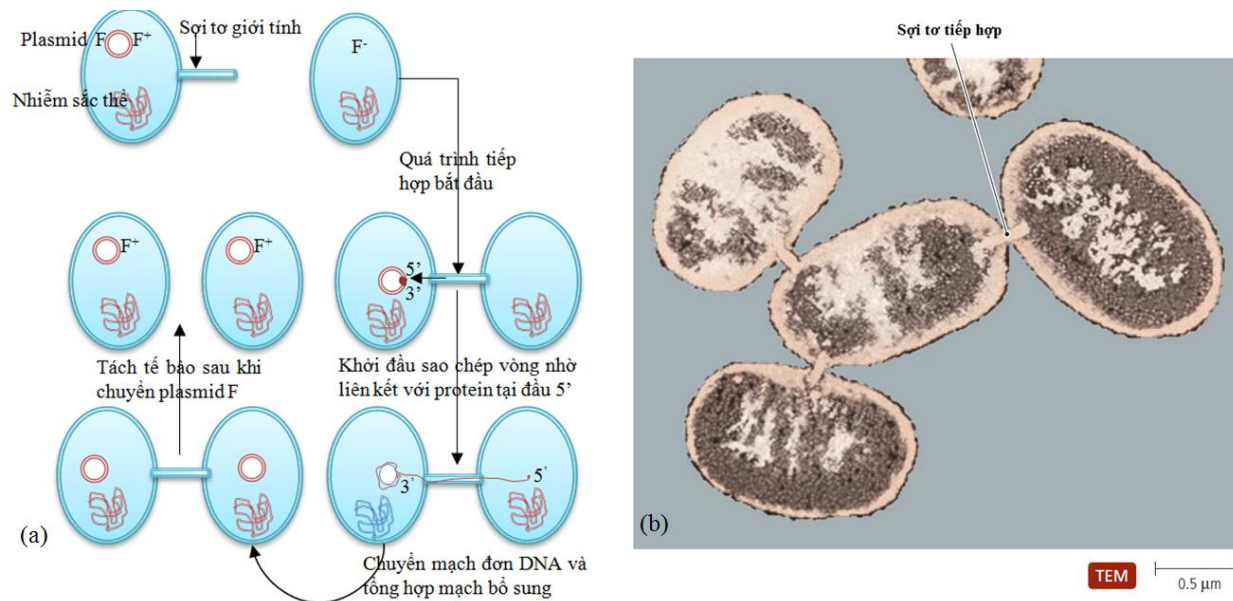
từ một vi khuẩn này sang vi khuẩn khác nhờ sự tải nạp chịu trách nhiệm cho kháng penicillin ở *Staphylococcus*. Tải nạp là một cơ chế xuất hiện rộng khắp để chuyển gen trong số vi khuẩn. Phương pháp này cũng cung cấp công cụ tuyệt vời để xây dựng bản đồ di truyền của vi khuẩn. Tải nạp có thể xuất hiện ở nhiều vi khuẩn có bacteriophage xâm nhiễm. Đôi khi tải nạp có thể xuất hiện trong các tế bào eukaryote.

12.7.3. Tiếp hợp

Tiếp hợp (conjugation) là một quá trình truyền DNA từ vi khuẩn cho đến vi khuẩn nhận trong quá trình giao phối của hai hoặc nhiều vi khuẩn (Hình 12.5). Trong quá trình

tiếp hợp, có sự tiếp xúc trực tiếp giữa tế bào cho và tế bào nhận để hình thành cầu nối nguyên sinh chất giữa hai tế bào và truyền một phần hoặc toàn bộ bộ gen của tế bào cho vào tế bào nhận. Sự tiếp hợp diễn ra giữa các loài có quan hệ gần và xuất hiện ở hầu hết vi khuẩn Gram âm. Sự tiếp hợp cũng xảy ra ở vi khuẩn Gram dương.

Khả năng cho của vi khuẩn được xác định bằng plasmid chuyên biệt có khả năng tiếp hợp được gọi là plasmid có khả năng sinh sản (F^+) hay còn gọi là plasmid giới tính. Plasmid F này kiểm soát quá trình giao phối của vi khuẩn. Sợi tơ là protein quan trọng nhất hình thành nên sợi tơ giới tính hay còn gọi là ống tiếp hợp. Sợi tơ giới tính này tạo ra cầu nối giữa các tế bào đang tiếp hợp. Giao phối xảy ra giữa vi khuẩn đực là thể cho mang yếu tố F (F^+) và vi khuẩn cái là thể nhận không có yếu tố F (F^-). Quá trình tiếp hợp bắt đầu khi sợi tơ của vi khuẩn đực F^+ bám vào thụ thể trên bề mặt của vi khuẩn cái F^- . Sau đó các tế bào này tiếp xúc trực tiếp bằng liên kết của sợi tơ.



Hình 12.5. Sự tiếp hợp, (a). Sơ đồ minh họa quá trình chuyển vật liệu di truyền theo cơ chế tiếp hợp, (b). Ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử truyền suốt (TEM) bốn tế bào *E. coli* đang giao phối với nhau thông qua sự tiếp hợp của sợi tơ giới tính, đây là quá trình tiếp hợp xảy ra trong tự nhiên (nguồn: www.masteringmicrobiology.com).

Tiếp theo quá trình này, enzyme phân cắt DNA của yếu tố F , theo đó một mạch DNA của vi khuẩn được chuyển vào tế bào nhận thông qua cầu nối tiếp hợp. Sự tổng hợp

mạch bổ sung để hình thành plasmid mạch đôi thể F trong cả tế bào cho và tế bào nhận sẽ kết thúc quá trình tiếp hợp. Tế bào nhận sẽ trở thành tế bào đực F^+ có khả năng truyền plasmid đến các tế bào F^- khác.

12.7.4. Tái tổ hợp tần suất cao (Hfr)

DNA mạch dài có thể được chuyển bằng quá trình tiếp hợp. Các chủng Hfr là kiểu tế bào F^+ có plasmid F được xen vào DNA của vi khuẩn. Do đó chúng mất khả năng chuyển nhiễm sắc thể vào tế bào khác. Cả nhiễm sắc thể có thể được chuyển nếu nó được xen vào plasmid F. Trong quá trình này DNA mạch đơn xâm nhập vào thể bào nhận F^- chứa một phần yếu tố F tại đầu cuối, theo sau là nhiễm sắc thể của vi khuẩn và sau đó là phần còn lại của yếu tố F. Các gen vi khuẩn gần kề dẫn đến mảnh của yếu tố F được chuyển thường xuyên nhất. DNA mới mất khả năng tái tổ hợp với DNA của vi khuẩn nhận và trở thành một phần xen vào của vật liệu di truyền. Quá trình chuyển toàn DNA vi khuẩn thường hoàn thành trong khoảng 100 phút.

Trong giao phối giữa vi khuẩn F^+ và F^- , chỉ plasmid F được chuyển vào tế bào thể nhận đạt hiệu năng cao. Các gen nằm trên nhiễm sắc thể được chuyển với hiệu năng rất thấp. Quá trình này được thực hiện quan trọng của các thể Hfr đột biến tự phát trong quần thể F^+ . Trong giao phối giữa Hfr và các chủng F^- , đoạn plasmid F chứa vùng *tra* sẽ được chuyển sau cùng sau khi đã xâm nhập vào nhiễm sắc thể vi khuẩn. Hầu hết các thể tái tổ hợp được tạo ra sau sự giao phối giữa Hfr và tế bào F^- sẽ thất bại trong việc thừa hưởng toàn bộ các gen của plasmid F và có kiểu hình F^- . Trong giao phối giữa các chủng F^+ và F^- , plasmid F sẽ nhanh chóng lan ra trong quần thể vi khuẩn và hầu hết các chủng tái tổ hợp là F^+ .

Sự tiếp hợp cũng xuất hiện ở vi khuẩn Gram dương. Vi khuẩn thể cho Gram dương sẽ tạo ra các yếu tố dính để chúng gắn kết với tế bào nhận, nhưng sợi tơ giới tính lại không có liên quan. Ở một số loài *Streptococcus* spp., vi khuẩn nhận sản sinh và phóng thích ra ngoại bào chất pheromone, tín hiệu hấp dẫn giới tính tạo thuận lợi cho tiếp hợp.

Quá trình chuyển vật liệu di truyền dạng plasmid bằng cơ chế tiếp hợp làm lây lan gen đa kháng kháng sinh trong số các loài vi khuẩn. Plasmid này chịu trách nhiệm cho

kháng kháng sinh gồm hai thành phần có tên là RTF và yếu tố quyết định kháng kháng sinh r (resistance determinant-r). Tính kháng kháng sinh được lan truyền rộng rãi trong số vi khuẩn gây bệnh cũng như vi khuẩn hội sinh ở động vật và người.

Plasmid cũng chịu trách nhiệm cho việc sản sinh colicin, các chất tương tự như kháng sinh làm chết vi khuẩn Gram âm khác. Plasmid này mã hoá cho việc sản sinh colicin, được xem như là yếu tố col và cũng được chuyển bằng sự tiếp hợp.

Sự khác nhau về biến nạp, tải nạp và tiếp hợp được trình bày tại Bảng 12.1.

Bảng 12.1. So sánh giữa biến nạp, tải nạp và tiếp hợp.

Cách thức	Cơ chế	DNA được chuyển
Biến nạp	Tế bào nhận hấp thu DNA tự do được phóng thích vào môi trường	Gen bất kỳ
Tải nạp	Chuyển DNA từ một vi khuẩn này sang vi khuẩn khác bằng bacteriophage	Gen bất kỳ trong tải nạp không chuyên biệt; chỉ các gen được chọn lọc trong tải nạp chuyên biệt
Tiếp hợp	Chuyển DNA từ một vi khuẩn còn sống sang vi khuẩn khác thông qua sợi tơ giới tính	DNA của nhiễm sắc thể hay plasmid

15.8. Tái tổ hợp

Sau khi DNA được chuyển từ một vi khuẩn nhận cho này sang vi khuẩn nhận khác thông qua sự biến nạp, tải nạp hoặc tiếp hợp, DNA này sẽ tổ hợp với nhiễm sắc thể của vi khuẩn bằng một quá trình gọi là sự tái tổ hợp (recombination). Có hai loại tái tổ hợp đó là tái tổ hợp tương đồng và tái tổ hợp không tương đồng. Tái tổ hợp tương đồng diễn ra giữa hai mảnh DNA có vùng tương đồng rộng. Điều này làm dẫn đến hình thành cặp đôi và trao đổi mảnh DNA nhờ các quá trình đứt gãy và hợp nhất. Sự tái tổ hợp không đồng nhất diễn ra giữa hai mảnh DNA có sự đồng nhất ít hoặc gần như không có.