



Biến nạp (Transformation)

Bởi:

Nguyễn Lâm Dũng

PGS. TS. Phạm Thành Hồ

Biến nạp (Transformation)

Hiện tượng và điều kiện

Hiện tượng *biến nạp* được Griffith phát hiện ở vi khuẩn *Diplococcus pneumoniae* (nay gọi là *Streptococcus pneumoniae* - phế cầu khuẩn gây sưng phổi ở động vật có vú) vào năm 1928. Phát hiện này và các nghiên cứu về cơ chế biến nạp có ý nghĩa lịch sử cho sự ra đời của Sinh học phân tử.

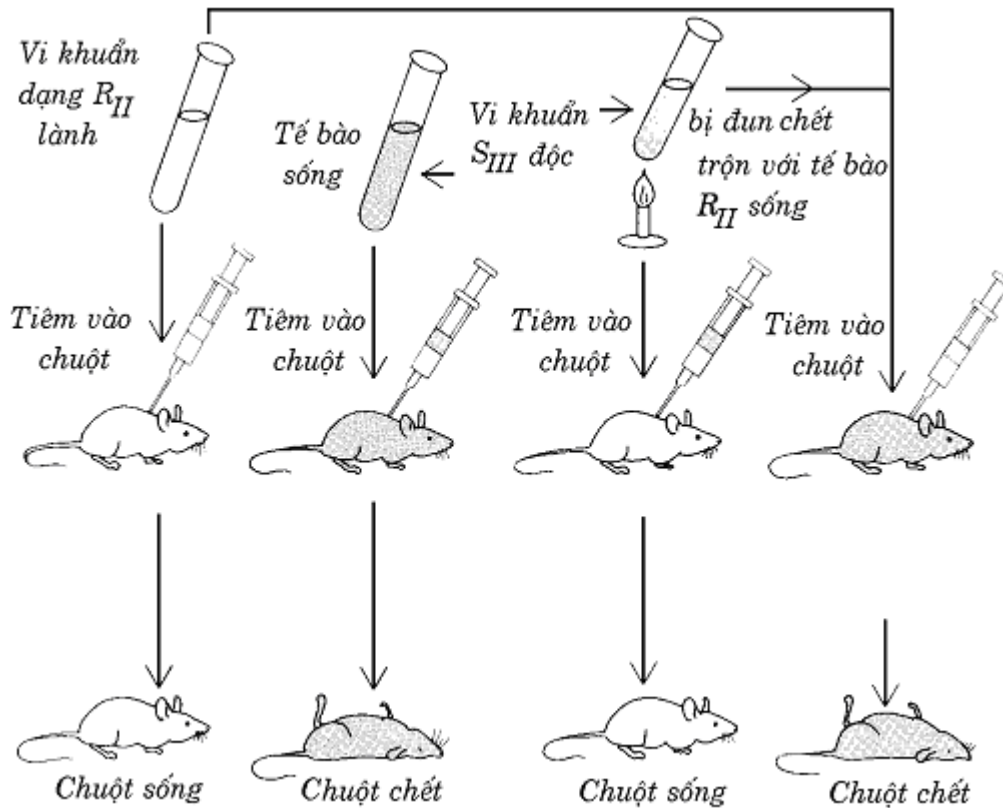
Vi khuẩn này có 2 dạng khác nhau:

– Dạng **SIII**, gây bệnh có vỏ bao tế bào (capsule) bằng polysaccharid cản trở bạch cầu phá vỡ tế bào. Dạng này tạo đốm mọc (khuẩn lạc) láng (Smooth-láng) trên môi trường agar.

- Dạng **RII**, không gây bệnh, không có vỏ bao, tạo đốm mọc nhẵn (Rough-nhẵn).

Thí nghiệm tiến hành như mô tả ở hình dưới.

Biến nạp (Transformation)



Hiện tượng biến nạp. - Tiêm vi khuẩn S sống gây bệnh cho chuột - chuột chết. - Tiêm vi khuẩn R sống không gây bệnh - chuột sống. - Tiêm vi khuẩn S bị đun chết cho chuột - chuột sống. - Hỗn hợp vi khuẩn S bị đun chết trộn với vi khuẩn R sống đem tiêm cho chuột - chuột chết. Trong xác chuột chết có vi khuẩn S và R.

Hiện tượng trên cho thấy vi khuẩn S không thể tự sống lại được sau khi bị đun chết, nhưng các tế bào chết này đã *truyền tính gây bệnh cho tế bào R*. Nó được gọi là *biến nạp* (transformation). Năm 1944, T. Avery, McLeod và McCarty đã tiến hành thí nghiệm xác định rõ tác nhân gây biến nạp. Nếu các tế bào S bị xử lý bằng *proteaz* (enzym phân hủy protein) hoặc *ARN-az* (enzym phân hủy ARN) *hoạt tính biến nạp vẫn còn*, chứng tỏ protein và ARN không phải là tác nhân gây biến nạp. Nhưng nếu tế bào S chết bị xử lý bằng *ADN-az* (enzym chỉ phân hủy đặc hiệu ADN) thì *hoạt tính biến nạp không còn nữa*, chứng tỏ *ADN là nhân tố biến nạp*. Kết quả thí nghiệm có thể tóm tắt như sau:

ADN của S + các tế bào R sống → chuột → chết (có R + S)

Hiện tượng biến nạp là một chứng minh sinh hóa xác nhận rằng ADN mang tín hiệu di truyền.

Như vậy, biến nạp là hiện tượng truyền thông tin di truyền bằng ADN. Trong biến nạp, ADN từ một tế bào vi khuẩn (thể cho) này được truyền sang tế bào vi khuẩn khác (thể nhận). Biến nạp xảy ra khi vi khuẩn nhận ADN ngoại lai và hấp thu vào trong tế bào. Khi tế bào vi khuẩn bị vỡ do bị tan (lysis), ADN vòng tròn của chúng thoát ra môi

Biến nạp (Transformation)

trường thành các đoạn thẳng với chiều dài khác nhau, có khả năng gây biến nạp cho các tế bào nhận khác.

Biến nạp được nghiên cứu kỹ nhất ở các vi khuẩn *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae* và ở một số nhóm vi khuẩn khác.

Hiệu quả của biến nạp phụ thuộc vào 3 yếu tố:

- Tính dung nạp của tế bào nhận.
- Kích thước của đoạn ADN ngoại lai.
- Nồng độ của ADN

Tính dung nạp của tế bào nhận

Một điều quan trọng của biến nạp là *tế bào nhận* phải có trạng thái sinh lý đặc biệt được gọi là *khả năng dung nạp hay khả nạp (competence)*. Tế bào có khả năng hấp thu ADN ngoại lai và được biến nạp (transformable) gọi là *khả nạp (competent)* và đây là tính trạng di truyền. Thậm chí trong các chi (genra) biến nạp, chỉ một số chủng (strains) hay loài là được biến nạp. *Tính khả nạp* trong phần lớn các vi khuẩn biến nạp tự nhiên (naturally transformable) được kiểm soát (regulated) và các protein đặc hiệu tham gia vào hấp thu và tác động đến ADN. Các protein đặc hiệu khả nạp đó gồm *protein gắn ADN liên kết màng* (membrane-associated ADN-binding protein), *autolysin* vách tế bào và các *nucleaz* khác nhau. Ở loài *Bacillus subtilis* dễ biến nạp, các tế bào sản sinh và tiết ra một peptit nhỏ trong quá trình tăng trưởng và sự tích lũy nồng độ cao của peptit này biến tế bào thành khả nạp. Ở *Bacillus*, chỉ 20% tế bào biến thành khả nạp và ở trạng thái này trong vài giờ. Trong khi đó, ở *Streptomyces*, 100% tế bào có thể thành khả nạp, nhưng chỉ trong một thời kỳ ngắn của chu trình tế bào.

Biến nạp tự nhiên hiệu quả cao được phát hiện chỉ ở một ít loài vi khuẩn như *Acinobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria* và *Thermus*. Ngược lại, *E. coli* và nhiều loài vi khuẩn khó biến nạp trong điều kiện tự nhiên.

Tuy nhiên, có thể gây ra sự dung nạp bằng xử lý hóa chất hay tạo những điều kiện nhất định cho sự tăng trưởng của tế bào. Khi xử lý tế bào *E. coli* với ion canxi nồng độ cao, chúng trở thành khả nạp và biến nạp các plasmid thực hiện có hiệu quả.

Những tế bào dung nạp trên bề mặt có các *nhân tố dung nạp (competence factor)*. Chúng đã được tinh sạch một phần và nghiên cứu ở nhiều loại vi khuẩn. Ở *Streptococcus* (trước đây gọi là *Diplococcus) pneumoniae* đã trở thành dung nạp có 30 đến 80 điểm nhận trên tế bào có khả năng gắn với ADN mạch kép hầu như của bất kì nguồn nào. Mặt khác, *Haemophilus influenzae* có một số lượng hạn chế từ 4 đến 8 điểm nhận (receptors), mà những điểm nhận này trước tiên nhận biết ADN mạch kép có các cặp bazơ trình tự

Biến nạp (Transformation)

như sau: 5'AAGTGCGGTCA-3' được gọi là “điểm hấp thụ” (uptake site). Sự kiện là các điểm hấp thụ này đặc biệt chung ở ADN của *Haemophilus* (trên bộ gen có khoảng 600 điểm như vậy) và tương đối hiếm ở ADN của các loài khác đã giải thích vì sao *Haemophilus* chỉ biến nạp giới hạn với các vi khuẩn trong loài.

Phần lớn các vi khuẩn chỉ dung nạp trong một giai đoạn giới hạn của chu trình sống. Trong giai đoạn dung nạp, tế bào tổng hợp một hay nhiều protein được gọi là “các nhân tố dung nạp”, chúng biến đổi màng tế bào để có thể gắn với đoạn ADN ngoại lai. Như vậy, các điểm thụ thể chỉ hiện diện trong giai đoạn *dung nạp*.

Sự hấp thụ ADN

Trong biến nạp, vi khuẩn khả nạp thuận nghịch với ADN. Các tế bào khả nạp có thể gắn ADN nhiều hơn cả 1000 lần so với tế bào không khả nạp.

Điều kiện quan trọng thứ hai để thực hiện được biến nạp là ADN phải có *mạch kép* và đoạn biến nạp phải có trọng lượng phân tử tối thiểu là 400.000 dalton (lớn khoảng 1/200 bộ gen của vi khuẩn), dĩ nhiên đây không phải là giới hạn cao nhất. Số lượng tế bào được biến nạp (transformants - thể biến nạp) tăng tỉ lệ thuận với nồng độ của ADN cho đến lúc mà các *điểm thụ thể* (receptor sites) bão hòa do các đoạn ADN gắn vào (thường khoảng 10 đoạn/tế bào). Ở *Streptococcus pneumoniae* mỗi tế bào có thể gắn khoảng 10 phân tử ADN mạch kép dài 10 – 15 kbp (kilobazơ pairs)/phân tử. ADN được hấp thụ vào tế bào và bị enzym cắt làm giảm trọng lượng phân tử còn khoảng 8 kbp/phân tử và mạch đơn.

Mật độ ADN tối thiểu để có thể phát hiện biến nạp là 0,01 ng/ml, một con số thấp đến nỗi không thể phát hiện bằng phương pháp hóa học.

Điều thú vị là trong biến nạp ở *Haemophilus influenzae*, đoạn ADN phải có chuỗi ký tự 11 bp chuyên biệt để xảy ra quá trình gắn không đảo ngược và thu nhận ADN. Chuỗi này được tìm thấy với tần suất cao bất thường ở bộ gen của *Haemophilus*, bộ gen đã được giải ký tự chuỗi hoàn toàn. Bằng chứng này và việc một số vi khuẩn nào đó có thể biến nạp trong môi trường tự nhiên làm cơ sở cho giả thiết là *biến nạp* không chỉ xảy ra trong phòng thí nghiệm mà còn đóng vai trò quan trọng trong việc truyền gen cho thế hệ sau trong *tự nhiên*. Bằng cách tăng cường trao đổi gen, những vi khuẩn *khả biến tự nhiên* tăng *tính đa dạng* và *tính thích ứng*.

Đoạn ngoại lai và đoạn nội tại

Khi ADN mạch kép xâm nhập vào tế bào, một mạch bị phân hủy. Bất kì đoạn ADN nào từ tế bào cho xâm nhập tế bào nhận, được gọi là *đoạn ngoại lai* (exogenote), ADN nguyên vẹn của tế bào nhận gọi là *đoạn nội tại* (endogenote). Tế bào vi khuẩn nhận đoạn ngoại lai sẽ lưỡng bội ở một phần bộ gen, được gọi là *hợp tử từng phần* (merozygote).

Biến nạp (Transformation)

Tuy nhiên, đoạn ngoại lai mạch đơn không bền vững và bị phân hủy nếu không được gắn vào bộ gen thể nhận. Quá trình trao đổi thông tin di truyền bằng chuyển chỉ một phần vật liệu di truyền từ tế bào này sang tế bào khác được gọi là sự *giao nạp từng phần* (meromixis). Có người cho rằng đoạn ngoại lai đơn mạch được gắn với protein (như protein Rec-A ở *E. coli*), protein này hỗ trợ tìm vùng bổ sung trên đoạn nội tại, làm đứt mạch và gắn đoạn ngoại lai. Các enzym sẽ cắt các đầu tự do (của cả thể cho và thể nhận) và ligaz hàn kín lỗ trống. Khi đoạn ngoại lai đã gắn vào đoạn nội tại thì tế bào không còn là hợp tử từng phần nữa.

Nếu đoạn ngoại lai chứa một alen với đoạn nội tại, thì mạch kép tái tổ hợp sẽ có một hay nhiều chỗ *bất cặp sai* (mismatch base pairs) và đoạn ADN này được gọi là *heteroduplex*. Nếu các tế bào con nhận alen mới, sửa sai (mismatch repair) được thực hiện bằng cách cắt đoạn nội tại và dùng mạch ngoại lai làm khuôn để thay thế. Sự gắn đoạn ngoại lai vào ADN tế bào nhận được thực hiện nhờ *tái tổ hợp tương đồng* (xem sau).

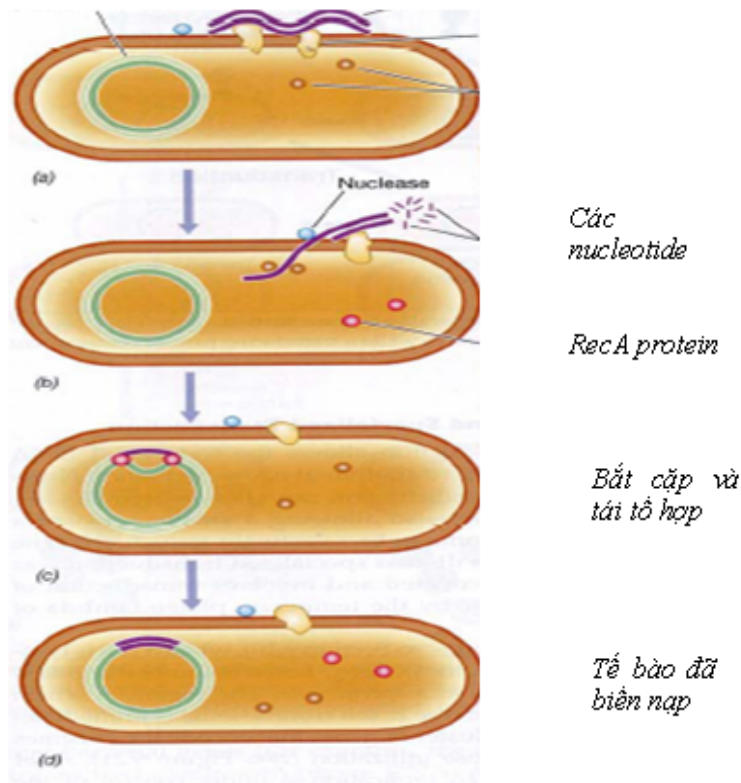
Hai hoặc nhiều hơn các gen liên kết chặt có thể nằm trong đoạn ADN biến nạp. Nếu sự xâm nhập của hai hay nhiều gen vào đoạn nội tại, thì tế bào nhận sẽ được *đồng biến nạp* (cotransformed). Tần số của đồng biến nạp tỉ lệ nghịch tương ứng với khoảng cách giữa các gen cùng biến nạp.

Cơ chế phân tử

Diễn biến của quá trình biến nạp ở cấp độ phân tử được tóm tắt trên sơ đồ hình 20.14. Để dễ hiểu, các giải thích dựa theo ADN của các dòng vi khuẩn S và R trong thí nghiệm của Griffith. Quá trình gồm các giai đoạn chủ yếu:

- *Sự phân hủy ADN tế bào cho*: ADN tế bào cho có thể là của tế bào tự nhiên bị phân hủy hoặc trong thí nghiệm bị gây chế bằng nhiệt độ cao hay tác nhân phá vỡ tế bào.
- *ADN bám vào bề mặt tế bào*: Protein gắn vào ADN.
- *Thâm nhập của ADN*: Sợi ADN mạch kép của dòng vi khuẩn S sau khi chui qua màng tế bào của dòng R thì một mạch S sẽ bị *nucleaz* của tế bào cắt, còn lại một mạch nguyên.
- *Bất cặp (Synapsis) và tái tổ hợp*: Nhờ sự hỗ trợ của *protein RecA* ADN của thể nhận R sẽ biến tính tách rời 2 mạch ở 1 đoạn để bất cặp với đoạn ADN thể cho S vừa chui vào.

Biến nạp (Transformation)



Sơ đồ diễn biến của quá trình biến nạp ở cấp độ phân tử a. ADN bám vào. b. Thâm nhập. c. Bắt cặp và tái tổ hợp. d. –Tế bào biến nạp

Sao chép: Sau khi bắt cặp tạo đoạn lai R - S, phân tử ADN sao chép tạo ra 2 sợi, một sợi kép R-R và sợi kép khác có mang đoạn ADN thể nhận S-S. Kết quả cuối cùng là đoạn gen của SIII chèn vào bộ gen tế bào nhận. Sau phân bào thì một dòng tế bào nhận được ADN ngoại lai vào bộ gen - tế bào được biến nạp. Tế bào đã được biến nạp sinh sản tạo dòng nhận RII mới.