



# Vi khuẩn E.coli là đối tượng mô hình tốt nhất

Bởi:

Nguyễn Lâm Dũng

PGS. TS. Phạm Thành Hồ

## Vi khuẩn E.coli là đối tượng mô hình tốt nhất

*Escherichia coli* (*E. coli*) là vi khuẩn được nghiên cứu kỹ nhất, rất nhiều chủng khác nhau đã được phân lập. Ba dòng thường gặp trong các phòng thí nghiệm di truyền là *E. coli* B (tế bào chủ cho các phage dây T), *E. coli* C (tế bào chủ cho phage một mạch như  $\phi$ X 174) và *E. coli* K12 (tế bào chủ của phage  $\lambda$ ). Do những thuận tiện trong nuôi cấy, nhân giống, thu nhận các đột biến và dễ phân tích các sự kiện di truyền hiếm hoi. Đến nay, nó được coi là *đối tượng mô hình số một của Sinh học phân tử và công nghệ gen*.

## Các dữ liệu di truyền học của E. coli

- Kích thước bộ gen (Genome size): 4,6 Mb
- Nhiễm sắc thể: 1 phân tử ADN vòng tròn
- Số lượng gen: 4.000
- Phần trăm gen tương đồng với người: 8%
- Kích thước trung bình của gen: 1 kb, không có intron
- Các transposon: tùy chủng, ~ 60 bản sao/bộ gen

Kết thúc giải ký tự chuỗi: 1997

## Các phương pháp phân tích di truyền

Ngoài các phương pháp lai để phân tích tái tổ hợp (recombination) và bổ trợ (complementation), có *nhiều kỹ thuật biến đổi di truyền* (Techniques of Genetic Modification):

Vi khuẩn E.coli là đối tượng mô hình tốt nhất

– *Gây đột biến* (Mutagenesis):

- Hóa chất và chiếu xạ: đột biến xoma ngẫu nhiên.
- Dùng transposon: xen đoạn (Insertions) xoma ngẫu nhiên.

– *Chuyển gen* (Transgenesis):

- Trên vector plasmid: tự do hay chèn vào (integratd).
- Trên vector phage: tự do hay chèn vào (integratd).
- Biến nạp: chèn vào.

– *Làm im lặng gen mục tiêu* (Targeted gen knockout):

- Alen không (Null alen) trên vector: thay gen bằng tái tổ hợp.
- Alen được thiết kế (Engineered alen) trên vector: đột biến điểm định hướng (Site-directed mutagenesis) bằng thay gen.

## **E.coli là tế bào chủ căn bản của kỹ thuật di truyền**

Các nghiên cứu trên *E. coli* đã làm cơ sở cho sự ra đời của kỹ thuật di truyền. *E. coli* đóng vai trò chủ yếu trong chuyển gen đến các sinh vật khác. Nó là sinh vật chuẩn để tạo dòng gen (cloning gens) của bất kỳ sinh vật nào. *E. coli* được coi là tế bào vật chủ đơn giản nhất trong công nghệ gen. Vi khuẩn *E. coli* dễ dàng chấp nhận nhiều loại vector chuyển gen như plasmid hay phage qua biến nạp hay tải nạp.

Những protein tái tổ hợp đầu tiên như insulin, xomatostatin và đến nay hàng trăm protein khác được tạo dòng ở *E. coli* đã đi vào sản xuất công nghiệp với thị trường hàng chục tỷ USD/năm.

## **Các đóng góp chủ yếu của E.coli**

– *Đối tượng chủ yếu cho các nghiên cứu:*

- Sao chép, phiên mã, dịch mã và tái tổ hợp.
- Đột biến
- Điều hòa biểu hiện gen (Gen regulation).
- Kỹ thuật ADN tái tổ hợp (recombinant ADN technology).

– *Đóng góp cho nghiên cứu các lĩnh vực khác:* Trao đổi chất của tế bào (Cell metabolism), gen ức chế vô nghĩa (Nonsense suppressors), sự tuyến tính (Colinearity) giữa gen và polypeptit, các Operon, sự đề kháng thuốc dựa vào plasmid (Plasmid-bazod drug resistance) và sự vận chuyển tích cực (Active transport).

Vi khuẩn *E.coli* là đối tượng mô hình tốt nhất

## Các enzym và protein tham gia tổng hợp và cắt nucleic axit

Sao chép ADN được nghiên cứu rất chi tiết ở *E. coli*, mà phần chủ yếu đã nêu ở chương II. Ở đây, một số chi tiết được bổ sung, cụ thể là các phức hợp enzym tách mạch ADN mẹ và tổng hợp các mạch con (bảng dưới). Hàng loạt các enzym và protein, mà phần lớn là các phức hợp protein đa phân, tham gia tổng hợp ADN, phiên mã tạo ARN. Cả tế bào nhân sơ lẫn nhân chuẩn đều có *hoạt tính ADN polymeaz đa năng*.

Một số *ADN polymeaz* hoạt động như những enzym độc lập, nhưng số khác (chủ yếu là *replicaz*) kết nhau thành phức hợp lớn nhiều protein. Tiểu phần (subunit) *tổng hợp* chỉ là một trong nhiều chức năng khác nhau của *replicaz* như tháo xoắn (unwinding), khởi sự tổng hợp mạch mới, ...

Các enzym tham gia sao chép ADN ở vi khuẩn *E. coli*.

Enzym	Gen mã hoá	Chức năng
1. ADN polymeaz III	<i>polC</i> ; <i>ADNE, Q, N, X</i> ;	Enzym polyme hoá chủ yếu
2. ADN polymeaz I	<i>polA-E</i> ; <i>mutD.polA</i>	Cắt mồi ARN, lấp chỗ trống
3. Helicaz	<i>ADN B</i>	Tháo xoắn ở chẻ ba sao chép
4. Primaz	<i>ADN G</i>	Tạo mồi mạch ADN mới
5. Protein gắn điểm khởi sự (Origin-binding protein).	<i>ADN A</i>	Gắn điểm khởi sự sao chép (Ori); tạo thuận lợi cho mở tách mạch.
6. Protein căng mạch <i>SSB</i> (Single-strand binding protein)	<i>ssb</i>	Ngăn các mạch đơn đã tách không chập lại.
7. ADN ligaz	<i>ligA, ligB</i>	Nối các đầu hở trên ADN

Các enzym ADN polymeaz ở vi khuẩn *E. coli*.

Enzym	Gen mã hoá	Chức năng
1. ADN polymeaz I	<i>polA</i> ; <i>ADNE, Q, N, X</i>	Enzym phục hồi chủ yếu. Cắt mồi ARN và lấp kín khoảng trống
2. ADN polymeaz II	<i>holA-E</i> ; <i>mutD</i> .	Enzym phục hồi phụ (minor).
3. ADN polymeaz III	<i>polB</i>	Replicaz, polyme hoá chủ yếu.

Vi khuẩn *E.coli* là đối tượng mô hình tốt nhất

4. ADN polymeaz IV	polC	Phục hồi cấp cứu (SOS repair).
5. ADN polymeaz V	<i>ADN B umuD'</i> 2 C	Phục hồi cấp cứu (SOS repair).

Ở *E. coli* đã tìm ra và biết chức năng của 5 loại ADN polymeaz (bảng trên)

Sự phân hủy nucleic axit cũng đòi hỏi enzym đặc hiệu:

– *Deoxyribonucleaz (ADNaz)* là enzym cắt các liên kết trong phân tử ADN. Nó có thể cắt mạch đơn hay kép. *Gyrax* là một loại enzym topoixomrazcắt ADN làm tháo xoắn.

– *Ribonucleaz (ARNaz)* là các enzym cắt ARN, có thể đặc hiệu đối với ARN mạch đơn hay mạch kép.

Các nucleaz chia thành 2 nhóm:

– *Exonucleaz* cắt từng nucleotit một từ đầu mút của mạch polynucleotit; chúng có thể đặc hiệu đối với đầu mút 5' hay 3' của ADN hay ARN.

- *Endonucleaz* cắt các liên kết bên trong mạch ADN; chúng có thể đặc hiệu đối với ARN hay ADN mạch đơn hoặc mạch kép.

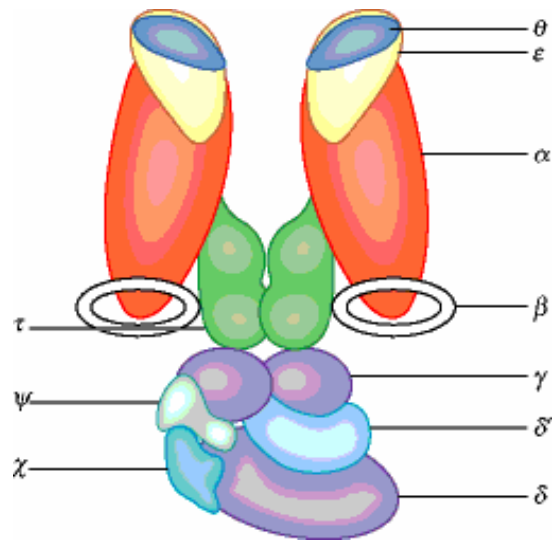
*Cấu trúc và chức năng các tiểu phần của ADN polymeaz III:*

Tất cả các *ADN polymeaz* cùng có những tính chất cấu trúc chung giống nhau. *Replicaz ADN polIII* là một holoenzym 900 kD (kilodalton), một phức hợp gồm hơn 10 phân tử protein (hình 6.12). Đặc biệt là protein vòng  $\beta$  ( $\beta$ -ring) làm móc (clamp) bao ADN ở giữa để trượt về trước mà mạch đơn này không bị bong ra khi được chép.

Ngoài ra, ADN polymeaz phải có khả năng nhận biết 4 loại N như chất phản ứng phụ thuộc vào chỗ được "đọc" trên mạch khuôn.

Sao chép ADN ở *E. coli* diễn ra với tốc độ rất nhanh, có thể đạt đến 50.000 nucleotit/phút. Thật khó hình dung một quá trình phức tạp, được thực hiện chính xác, mà diễn ra với tốc độ nhanh như vậy, chưa kể đến việc làm sao các N tập trung với nồng độ cao đáp ứng kịp thời cho nhu cầu.

Vi khuẩn E.coli là đối tượng mô hình tốt nhất



*Replicaz ADN pol III là một phức hợp gồm hơn 10 protein*