

**TRẦN QUỐC DUNG (Chủ biên)
NGUYỄN HOÀNG LỘC-TRẦN THỊ LỆ**

**CÔNG NGHỆ CHUYỂN GEN
(ĐỘNG VẬT, THỰC VẬT)**

Huế, 2006

Mở đầu

Mục đích của công tác chọn giống và nhân giống là cải tiến tiềm năng di truyền của cây trồng, vật nuôi...nhằm nâng cao năng suất, hiệu quả sản xuất nông nghiệp. Trong công tác cải tạo giống cổ truyền chủ yếu sử dụng phương pháp lai tạo và chọn lọc để cải tạo nguồn gen của sinh vật. Tuy nhiên, do quá trình lai tạo tự nhiên, con lai thu được qua lai tạo và chọn lọc vẫn còn mang luôn cả các gen không mong muốn do tổ hợp hai bộ nhiễm sắc thể đơn bội của giao tử đực và giao tử cái. Một hạn chế nữa là việc lai tạo tự nhiên chỉ thực hiện được giữa các cá thể trong loài. Lai xa, lai khác loài gặp nhiều khó khăn, con lai 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 học... giữa các loài không phù hợp với nhau. Gần đây, nhờ những thành tựu trong lĩnh vực DNA tái tổ hợp, công nghệ chuyển gen ra đời đã cho phép khắc phục những trở ngại nói trên. Nó cho phép chỉ đưa những gen mong muốn vào động vật, thực vật...để tạo ra những giống vật nuôi, cây trồng mới..., kể cả việc đưa gen từ giống này sang giống khác, đưa gen của loài này vào loài khác.

Bằng kỹ thuật tiên tiến nêu trên của công nghệ sinh học hiện đại, vào năm 1982 Palmiter và cộng sự đã chuyển được gen hormone sinh trưởng của chuột cống vào chuột nhắt, tạo ra được chuột nhắt “không lồ“. Từ đó đến nay hàng loạt động vật nuôi chuyển gen đã được tạo ra như thỏ, lợn, cừu, dê, bò, gà, cá ...Trong hướng này các nhà nghiên cứu tập trung vào những mục tiêu: tạo ra động vật chuyên sản xuất protein quý phục vụ y học; tạo ra động vật có sức chống chịu tốt (chống chịu bệnh tật, sự thay đổi của điều kiện môi trường...); tạo ra các vật nuôi có tốc độ lớn nhanh, hiệu suất sử dụng thức ăn cao, cho năng suất cao và chất lượng sản phẩm tốt. Động vật chuyển gen còn được sử dụng làm mô hình thí nghiệm nghiên cứu các bệnh ở người để nhanh chóng tìm ra các giải pháp chẩn đoán và điều trị các bệnh hiểm nghèo như ung thư, AIDS, thần kinh, tim mạch...

Những bước phát triển của công nghệ chuyển gen vào thực vật bắt nguồn từ những thành công của công nghệ chuyển gen vào động vật. Kể từ năm 1984, là lúc người ta bắt đầu tạo được cây trồng chuyển gen và đến nay đã có những bước tiến lớn. Nhiều cây trồng quan trọng chuyển gen ra đời như lúa, ngô, lúa mì, đậu tương, bông, khoai tây, cà chua, cải dầu, đậu Hà Lan, bắp cải... Các gen được chuyển là gen kháng vi sinh vật, virus gây bệnh, kháng côn trùng phá hại, gen cải tiến protein hạt, gen có khả năng sản xuất những loại protein mới, gen chịu hạn, gen bất thụ đực, gen kháng thuốc diệt cỏ...

Triển vọng của công nghệ chuyển gen là rất lớn, cho phép tạo ra các giống vật nuôi, cây trồng... mang những đặc tính di truyền hoàn toàn mới, có lợi cho con người mà trong chọn giống thông thường phải trông chờ vào đột biến tự nhiên, không thể luôn luôn có được. Đối với sự phát triển của công nghệ sinh học trong thế kỷ XXI thì công nghệ chuyển gen sẽ có một vị trí đặc biệt quan trọng. Có thể nói công nghệ chuyển gen là một hướng công nghệ cao của công nghệ sinh học hiện đại phục vụ sản xuất và đời sống.

I. Một số khái niệm cơ bản

1. Chuyển gen

Chuyển gen (transgenesis) là đưa một đoạn DNA ngoại lai vào genome của một cơ thể đa bào, sau đó đoạn DNA ngoại lai này sẽ có mặt ở hầu hết các tế bào và được truyền lại cho thế hệ sau. Vì vậy khái niệm chuyển gen chỉ được sử dụng cho thực vật và động vật. Nấm men, vi khuẩn và tế bào nuôi cấy mang một đoạn DNA ngoại lai được gọi là các tế bào tái tổ hợp (recombinant cell) hoặc tế bào biến nạp (transformed cell).

Chuyển gen khác với liệu pháp gen (gene therapy). Có trường hợp các tế bào mầm không mang DNA ngoại lai. Thuật ngữ liệu pháp gen mầm (germinal gene therapy) cũng được sử dụng. Liệu pháp gen mầm này còn chưa được thử nghiệm ở người. Các tế bào mầm này mang DNA ngoại lai và được truyền lại cho thế hệ sau.

Về mặt lịch sử, thuật ngữ GMO (genetically modified organism)-sinh vật biến đổi gen, được sử dụng chủ yếu để chỉ các thực vật chuyển gen được gieo trồng để cung cấp lương thực, thực

phẩm cho con người và động vật. Logic hơn và chính xác hơn, GMO đề cập tới tất cả các cơ thể sống biến đổi di truyền, bao gồm cả vi sinh vật. Thuật ngữ GMP (genetically modified plant)-thực vật biến đổi gen và GMA (genetically modified animal)- động vật biến đổi gen cũng được sử dụng.

Trong thực tế, các đoạn DNA ngoại lai được sử dụng để tạo sinh vật chuyển gen hầu hết là các gen luôn có sẵn một trình tự phù hợp với một promoter làm cho nó biểu hiện thành RNA, nói tổng quát là protein.

Sản phẩm phiên mã của gen có thể là một RNA không được dịch mã thành protein. Đây là trường hợp đối với RNA ngược hướng (antisense RNA), rybozyme và các gen được phiên mã bởi RNA polymerase I và III.

Không nhất thiết là DNA ngoại lai luôn luôn được hợp nhất vào genome của sinh vật chuyển gen. DNA ngoại lai không thể tồn tại trong cơ thể mà không hợp nhất vào trong genome của nó. Một đoạn DNA tự do nhanh chóng bị loại trừ trong chu trình tế bào vì vậy nó sẽ không có khả năng tái bản và truyền lại cho các tế bào con. Tuy nhiên về lý thuyết thì có thể duy trì một đoạn DNA ngoại lai như một nhiễm sắc thể nhỏ (minichromosome) có khả năng tự tái bản và có mặt trong các tế bào con. Một số genome virus có đặc tính này, ví dụ như virus herpes. Một vài đoạn nhiễm sắc thể thường được tìm thấy ở các tế bào khối u, là các nhiễm sắc thể tồn tại trong một thời gian ngắn, mang các yếu tố tái bản và truyền cho các tế bào con.

2. Động vật (Thực vật) chuyển gen

Động vật (Thực vật) chuyển gen là động vật (thực vật) có gen ngoại lai (gen chuyển) xen vào trong DNA genome của nó.

Gen ngoại lai này phải được truyền lại cho tất cả mọi tế bào, kể cả các tế bào sinh sản mầm. Nếu dòng tế bào mầm bị biến đổi, các tính trạng bị biến đổi này sẽ được truyền cho các thế hệ kế tiếp thông qua quá trình sinh sản bình thường. Nếu chỉ có dòng tế bào sinh dưỡng bị biến đổi, chỉ có cơ thể mang các tế bào sinh dưỡng đó bị ảnh hưởng và không di truyền lại cho thế hệ sau. Việc chuyển gen ngoại lai vào động vật (thực vật) chỉ thành công khi các gen này di truyền lại cho thế hệ sau.

Cho đến nay, trên thế giới người ta đã thành công trong việc tạo ra nhiều thực vật, động vật chuyển gen. Ở động vật, không chỉ đối với động vật mô hình (chuột), vật nuôi (bò, lợn, dê, cừu, thỏ, gà, cá...) mà cả những loài động vật khác như khỉ, muỗi và một số côn trùng...

3. Gen chuyển

Gen chuyển (transgene) là gen ngoại lai được chuyển từ một cơ thể sang một cơ thể mới bằng kỹ thuật di truyền.

Các gen chuyển được sử dụng để tạo động vật, thực vật chuyển gen có nguồn gốc từ các loài sinh vật khác nhau: động vật, thực vật, vi sinh vật và cả con người. Ví dụ: gen của người được đưa vào chuột và các vật nuôi khác như lợn, bò, cừu, chim...

II. Mục đích chuyển gen

Nói chung, mục đích của chuyển gen là thêm một thông tin di truyền ngoại lai vào genome, cũng như để ức chế một gen nội sinh. Trong một số trường hợp, sự thay thế một gen hoạt động chức năng bằng một gen hoạt động chức năng khác là cần thiết. Gen ngoại lai có thể là một thể đột biến của gen nội sinh hoặc một gen hoàn toàn khác.

Sự thêm gen có thể được thực hiện để cung cấp sinh vật mang protein mới. Sự thêm gen cũng có thể được sử dụng để nghiên cứu cơ chế hoạt động của một promoter trong toàn cơ thể. Sự kết hợp của gen reporter với promoter là nguyên tắc chung của phương pháp này.

Sự thay thế gen được sử dụng chủ yếu để làm bất hoạt một gen đã biết. Trên thực tế, nó bao gồm sự thay thế gen nội sinh bằng một thể đột biến bất hoạt. Phương pháp này được dùng để cho thông tin về chức năng sinh học của gen như ở trường hợp thêm gen. Thực vậy cả thêm gen và bất hoạt gen có thể gây ra các biến đổi ở sinh vật chuyển gen, mà các biến đổi này có thể được quan sát hoặc đánh giá. Các thể đột biến của gen thay thế có thể cung cấp thông tin bằng một cách thức tinh vi hơn.

Sự thay thế một gen bằng một gen có chức năng khác nhau hoàn toàn là khó hơn nhưng có thể thực hiện để đưa một marker

hoặc một gen chọn lọc vào genome. Vị trí hợp nhất vào genome có thể được chọn lọc đối với khả năng chứa của nó để biểu hiện gen ngoại lai bằng một cách chắc chắn.

III. Nguyên tắc cơ bản trong việc tạo động vật (thực vật) chuyển gen

Nguyên tắc cơ bản trong việc tạo động vật (thực vật) chuyển gen là đưa một hoặc vài gen ngoại lai vào động vật (thực vật) (do con người chủ động tạo ra). Các gen ngoại lai này phải được truyền thông qua dòng mầm vì vậy mọi tế bào kể các tế bào mầm sinh sản của động vật (thực vật) đều chứa vật chất di truyền đã được sửa đổi như nhau.

IV. Cơ chế hợp nhất của DNA ngoại lai vào genome

Trong tất cả các trường hợp, sự hợp nhất của đoạn DNA ngoại lai vào genome được thực hiện với sự tham gia của các cơ chế sửa sai DNA của tế bào. Các protein liên quan với các cơ chế này nhận ra các cấu trúc DNA không bình thường, có thể là sự ghép đôi không tương ứng của hai sợi đơn DNA, các vùng sợi đơn hoặc các vị trí mà DNA ngoại lai liên kết với DNA chủ.

Khi DNA ngoại lai không có trình tự chung với genome chủ, sự nhận biết giữa hai DNA chỉ bao gồm các trình tự DNA ngắn tương đồng ít hoặc nhiều. Sự nhận biết này là cần thiết cho các cơ chế sửa sai hoạt động. Sau đó DNA ngoại lai hợp nhất vào genome nhờ quá trình tái tổ hợp không tương đồng (Hình 1). Sự kiện này là khá hiếm và xảy ra ở các vị trí khác nhau trong genome.

Khi DNA ngoại lai đóng góp một trình tự dài tương đồng với genome chủ thì trình tự này sẽ được nhận biết một cách chính xác. Các cơ chế sửa sai gây ra tái tổ hợp tương đồng nghiêm ngặt làm thay thế gen nội sinh đích bằng DNA ngoại lai. Nếu gen sau bị đột biến thì gen nội sinh được thay thế bằng một gen đột biến (Hình 2). Trong điều kiện tốt nhất, tái tổ hợp tương đồng ít xảy hơn 100 lần so với tái tổ hợp không tương đồng. Sở dĩ như vậy là do số vị trí đối với sự nhận biết không chính thức là lớn hơn nhiều so với sự nhận biết tương đồng. Thông thường sự nhận biết tương đồng là duy nhất trong mỗi genome đơn bội.

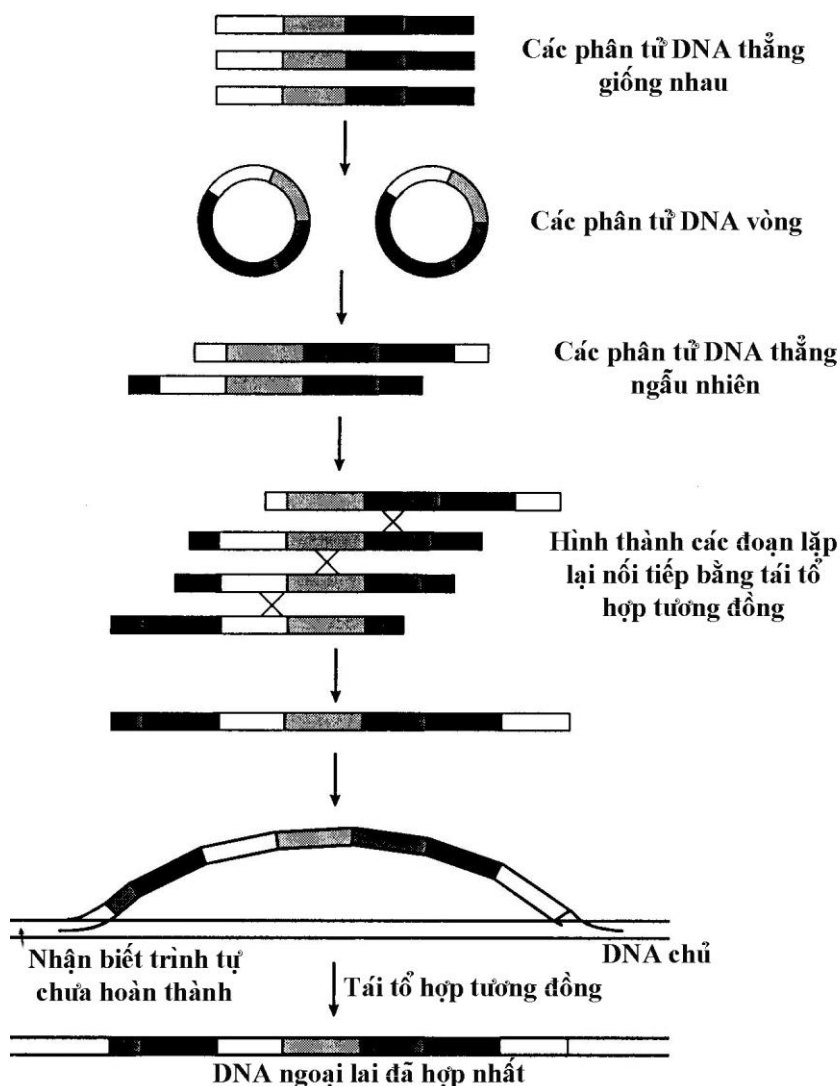
DNA ngoại lai phải đến nhân tế bào để hợp nhất vào genome của nó. Số phận của DNA ngoại lai không giống nhau và phụ thuộc vào việc nó đã xâm nhập vào tế bào chất hoặc vào nhân một cách trực tiếp.

DNA biến nạp vào tế bào nuôi cấy nói chung là dạng plasmid vòng. Plasmid vòng bị phân cắt bởi DNase của tế bào chất tại các vị trí ngẫu nhiên. Phần lớn DNA bị phân hủy trong tế bào chất. Một phần nhỏ đi đến nhân và có thể được phiên mã. Ở dạng này, DNA ngoại lai không ổn định và nó sẽ bị loại trừ khi tế bào phân chia. Một tỉ lệ nhỏ DNA ngoại lai hợp nhất vào genome. Trong quá trình di chuyển từ tế bào chất đến nhân, các đoạn DNA ngoại lai liên kết với nhau để tạo ra dạng polymer gọi là đoạn trùng lặp (concatemer). Trong tế bào chất, các liên kết đồng hóa trị xảy ra một cách ngẫu nhiên giữa các đoạn DNA ngoại lai làm cho các gen sắp xếp lại ở dạng nối tiếp.

Khi DNA được xâm nhập vào nhân một cách trực tiếp, các đoạn DNA này cũng tạo thành các đoạn trùng lặp nhưng thông qua quá trình tái tổ hợp tương đồng. DNA ngoại lai bị phân cắt một cách ngẫu nhiên, tạo ra các đoạn trùng gối lên nhau và tái kết hợp tạo ra một đoạn trùng lặp mà ở đó các gen được xây dựng lại rất tốt. Sau đó các bản sao khác nhau của các đoạn DNA ngoại lai được cấu tạo chủ yếu ở dạng nối tiếp.

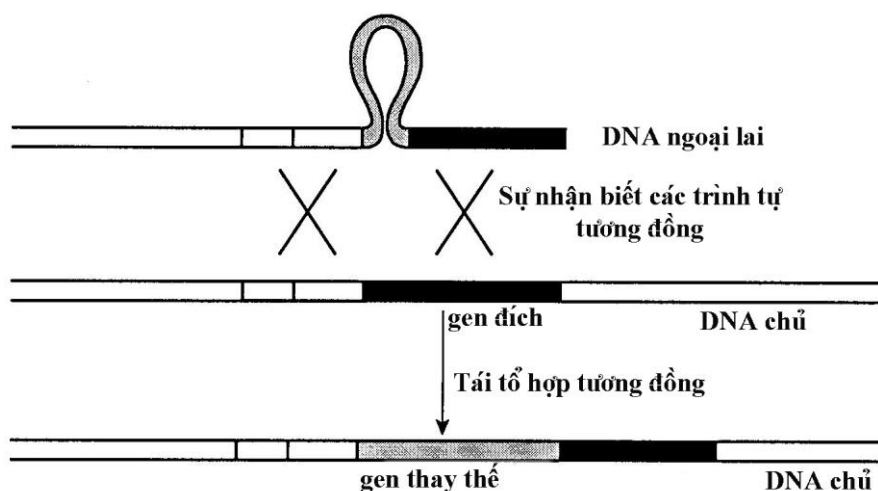
Khi các đoạn DNA khác nhau được xâm nhập đồng thời vào một tế bào, chúng tạo thành các đoạn trùng lặp chứa một vài bản sao của mỗi đoạn. Các đoạn trùng lặp lai (hybrid concatemers) này được hợp nhất vào genome. Vì thế đến bốn gen khác nhau có thể được chuyển đồng thời vào một tế bào.

Nói chung, DNA ngoại lai được hợp nhất dưới dạng đoạn trùng lặp có kích thước khoảng 100kb, thường chứa từ một đến mười bản sao của đoạn DNA gốc. Điều thú vị là khi các đoạn DNA lớn được chuyển vào, đoạn trùng lặp hợp nhất vào thường chứa số bản sao ít hơn mặc dù kích thước tối ưu để hợp nhất vào genome là vào khoảng 100kb.



Hình 1: Các cơ chế hợp nhất ở một vị trí ngẫu nhiên của DNA ngoại lai tiêm vào nhân của tế bào

DNA tiêm vào được cắt ra một cách ngẫu nhiên. Các đoạn DNA này lệ thuộc vào quá trình tái tổ hợp tương đồng tạo ra các polymer (các đoạn trùng lặp) của gen tiêm vào xếp nối tiếp nhau. Các đầu của đoạn trùng lặp bị phân hủy bởi DNase, tạo ra các vùng sợi đơn ngắn nhận biết các vị trí bổ sung trong genome. Trong quá trình tái bản DNA, các cơ chế sửa sai hợp nhất DNA ngoại lai.



Hình 2: Cơ chế thay thế gen bằng tái tổ hợp tương đồng

DNA nhận biết các trình tự tương đồng trong genome một cách chính xác. Cơ chế sửa sai của tế bào gây ra sự thay thế đặc hiệu vùng genome đích bằng các đoạn DNA ngoại lai. Trình tự định vị giữa hai vùng tương đồng được hợp nhất trong khi trình tự nằm bên ngoài các vùng tương đồng lại bị loại ra.

DNA vi tiêm vào nhân hay tế bào chất là ở dạng thẳng bằng cách cắt plasmid ở vị trí chọn trước. Điều này làm giảm cơ hội cắt plasmid tại các vị trí ngẫu nhiên dẫn đến tạo thành các đoạn trùng lặp chứa các gen bị cắt xén bớt.

Các đoạn DNA sử dụng cho chuyển gen được làm thẳng còn do các lý do khác. Cách này làm cho có thể loại bỏ các trình tự plasmid (giàu GC) mà có thể phá hủy các gen chuyển (transgenes). Mặt khác, DNA vòng tiêm vào nhân được hợp nhất với tần số thấp hơn nhiều so với DNA thẳng.

Vì vậy nguy cơ của DNA ngoại lai cơ bản là giống nhau khi chúng được chuyển vào tế bào chất bằng vi tiêm (microinjection), chuyển nhiễm (transfection) với các tác nhân hóa học hoặc biến nạp bằng xung điện (electroporation). Tiêm DNA vào nhân là khó hơn nhưng kết quả là tần số hợp nhất cao hơn nhiều và tình trạng nguyên vẹn của DNA ngoại lai được duy trì tốt hơn. Tiêm DNA vào nhân của phôi không phải luôn luôn có thể thực hiện, đặc biệt là đối với các loài không phải là thú.

Tất cả những phân tích ở trên cho thấy:

- Một gen ngoại lai có thể được tách chiết và sửa đổi bằng kỹ thuật di truyền.
- Gen ngoại lai có mặt trong tế bào cơ thể bao gồm cả tế bào mầm sinh sản có thể truyền lại cho thế hệ sau.