



VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

\*\*\*\*\*

## LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

**ĐỀ TÀI: XÁC ĐỊNH TẦN SUẤT ĐỘT BIẾN ĐIỂM VÙNG  
D – LOOP TRONG HỆ GEN TY THỂ Ở NGƯỜI VIỆT NAM**

<b>Chuyên ngành</b>	<b>: Sinh học thực nghiệm</b>
<b>Mã số</b>	<b>: 60 42 01 14</b>
<b>Người hướng dẫn khoa học</b>	<b>: PGS.TS. LÊ QUANG HUẤN</b>
<b>Người thực hiện</b>	<b>: NGUYỄN THÙY LINH</b>
<b>Lớp</b>	<b>: Cao học K17</b>

Hà Nội – 2015

## MỞ ĐẦU

### 1. Đặt vấn đề

Trong vài năm trở lại đây, hướng nghiên cứu sử dụng ADN ty thể (ADN ty thể) như một chỉ thị sinh học đang được phát triển nhanh chóng trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Bên cạnh đó, những vấn đề về rối loạn ty thể liên quan đến bệnh ty thể, các bệnh chuyển hóa hiếm gặp, lão hóa...được xem là một trong những mục tiêu nghiên cứu cơ bản của di truyền học và y học.

Với nhiều phát minh cũng như các nghiên cứu mới về di truyền từ các thế kỷ trước mà tiêu biểu là việc công bố trình tự hệ gen người hay còn gọi là “trình tự tham chiếu” (Cambridge Reference Sequencing – CRS) được Anderson và cộng sự công bố đầu tiên vào năm 1981 và “trình tự tham chiếu sửa đổi” – rCRS (Andrew và cộng sự. 1991) đã tạo điều kiện thuận lợi cho các nhà khoa học nghiên cứu sinh học mà đặc biệt là những nghiên cứu về loài người. Sau khi có bản đồ gen người, người ta thấy rằng các cá thể người giống nhau đến 99.9% và chỉ khác nhau rất nhỏ (0.1%) về cấu trúc hệ gen. Trong 0.1% khác biệt giữa hai cá thể thì có đến hơn 80% là các đa hình nucleotit đơn (Single Nucleotide Polymorphism và được viết tắt là SNP). Chính vì thế SNP được sử dụng rộng rãi các mảng y dược học, hình sự và cung cấp những kiến thức hữu ích trong quá trình tiến hóa loài người ở các vùng địa lý trong bối cảnh và lịch sử khác nhau.

Việc tìm được danh sách các SNP của người Việt Nam sẽ góp phần hỗ trợ vào nghiên cứu tiến hóa di truyền, đồng thời cũng cung cấp được thông tin về các đột biến có liên quan đến các căn bệnh ung thư, rối loạn ở người. Nhận thức được tầm quan trọng về việc tìm hiểu các dữ liệu di truyền về dân tộc Việt Nam chính vì thế trong khuôn khổ luận văn này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu: **“Xác định tần suất đột biến điểm vùng D – Loop của hệ gen ty thể người Việt Nam”**.

### 2. Mục tiêu:

- Lập được danh sách các SNP trong vùng D – Loop của AND ty thể đặc trưng của người Việt Nam.

### 3. Nội dung đề tài:

- Tách chiết ADN từ các mẫu móng tay
- Giải trình tự gen vùng D – Loop

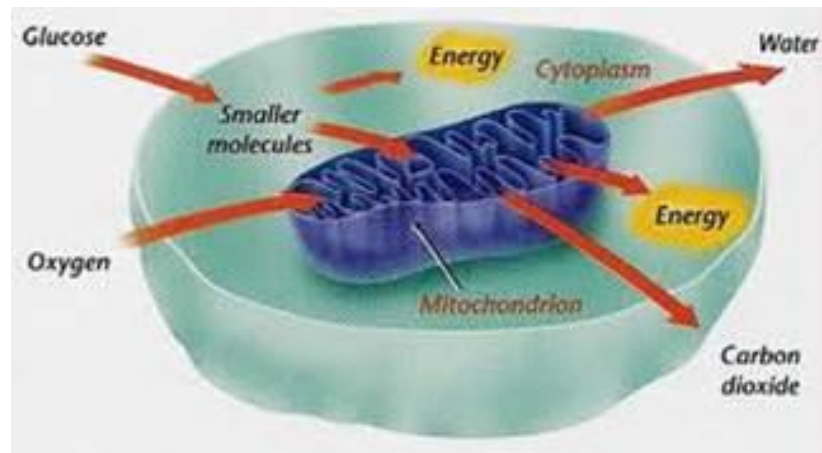
- Phân tích trình tự gen vùng D – Loop ở các mẫu và so sánh trình tự mẫu phân tích với trình tự tham chiếu sửa đổi (rCRS) và tìm đặc trưng SNPs ở chủng người Việt Nam.

## CHƯƠNG I – TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1. Giới thiệu chung về ty thể

Ty thể (Mitochondrion) là bào quan có thể tìm thấy trong gần như tất cả các tế bào có nhân. Số lượng của ty thể trong mỗi tế bào ở mỗi loài là khác nhau. Ty thể là trung tâm hô hấp của tế bào, là nơi sản sinh ra ATP một dạng năng lượng có thể sử dụng cho các phản ứng của tế bào. Không có ty thể các tế bào sẽ phải dựa vào quá trình đường phân kỵ khí để cung cấp tất cả adenosin triphosphat (ATP) cho hoạt động của mình. Ty thể có hệ gen độc lập nên có khả năng tự sinh sản bằng cách phân đôi ty thể mẹ để sinh ra các ty thể con (Alberts B, Johnson A, Lewis J và cộng sự. 2002).

Hình 1.1.



**Hình 1.1. Ty thể**

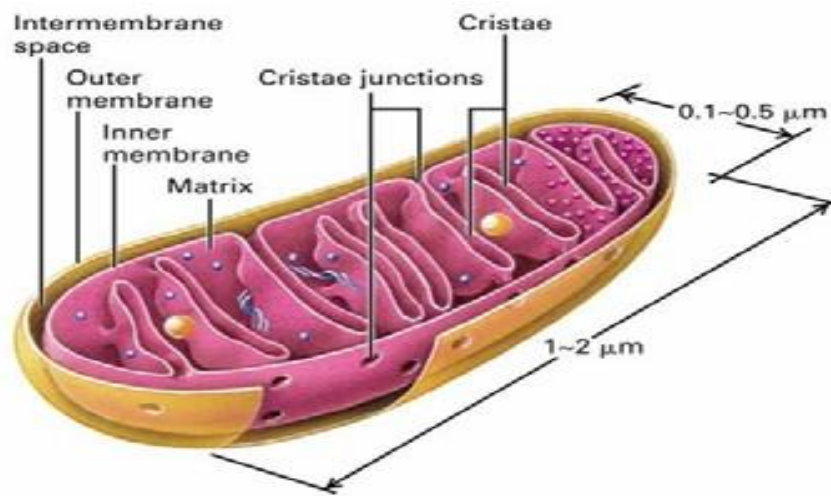
(Thepsychguru.com – 2012)

### 1.1. Cấu tạo và chức năng của ty thể

#### 1.1.1. Cấu tạo

Ty thể là bào quan có hình tròn hoặc hình trụ dài, có kích thước đường kính 0.1 – 0.5  $\mu\text{m}$ , chiều dài 1 – 2  $\mu\text{m}$ . Ty thể có cấu trúc màng kép bao gồm màng ngoài (outer membrane) và màng trong (inner membrane). Màng ngoài chứa các protein tạo kênh lớn (gọi là porin) và cho phép tất cả các phân tử nhỏ hơn 5kDa thấm qua được. Màng trong được cuộn gấp rất phức tạp tạo thành các cấu trúc gọi là mào hoặc răng lược (cristate). Khác với màng ngoài, màng trong chỉ thấm chọn lọc một số ion. Vùng bề mặt khá lớn của màng trong ty thể (intermembrane space) chứa các enzym tham gia vào quá trình oxy hóa - phosphoryl hóa và tổng hợp ATP. Phần chất nền (matrix space) của ty thể chứa các enzym cần thiết cho sự oxy hóa pyruvat và các axit béo, các enzym tham gia vào chu trình axit tricacboxylic (ATC) (Cooper. 2000). Khoang nền cũng

chứa nhiều bản sao của ADN ty thể, các ribosome của ty thể, RNA vận chuyển (tRNA) và nhiều loại enzym cần thiết cho phiên mã và dịch mã của các gen ty thể. Hình 1.2.



**Hình 1.2. Cấu trúc ty thể**  
(*halcpbio.com*)

### 1.1.2. Chức năng của ty thể

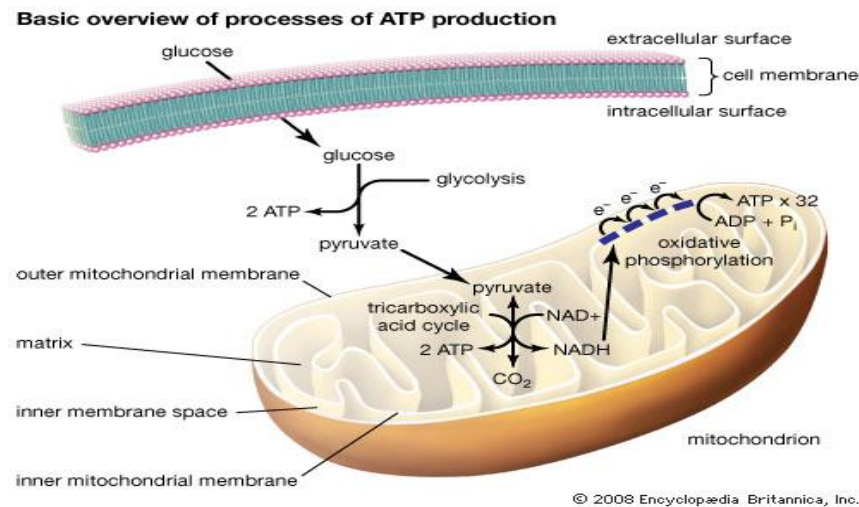
Ty thể là trung tâm giải phóng và chuyển hóa năng lượng của tế bào (photphoryl hóa – oxy hóa). Phần lớn năng lượng được tích lũy trong các nguyên liệu hữu cơ được giải phóng và chuyển thành dạng ATP sử dụng trong pha phân giải hiếu khí diễn ra ở ty thể. Vì vậy ty thể được xem là “nhà máy năng lượng” của tế bào (Dahout, Gonzalez . 2006).

Trong mỗi tế bào số lượng ty thể dao động từ 50 – 1.000. Các tế bào hoạt động mạnh như tế bào cơ và tế bào gan có số lượng lớn ty thể. Ở nơi tế bào hoạt động nhiều thì số vách ngăn lại tăng lên, ứng với số enzym tăng lên. Bên trong tế bào ty thể phân bố ở nơi cần dùng nhiều năng lượng. Ví dụ trong tế bào gan, ty thể nằm chèn mạng lưới nội chất hạt nơi cần nhiều năng lượng cho tổng hợp protein.

Tổng hợp năng lượng trong ty thể thông qua quá trình đường phân. Chỉ một phần rất nhỏ năng lượng dự trữ của gluco được chuyển hóa (2ATP). Sự chuyển hóa cacbohydrat được hoàn tất khi sản phẩm của quá trình đường phân (pyruvat) được chuyển vào trong ty thể và bị oxy hóa từ  $O_2$  thành  $CO_2$ , nước và 36 ATP.

Các protein liên quan trong quá trình oxy hóa – photphoryl hóa đều định vị ở màng trong ty thể, bao gồm các thành phần trong chuỗi truyền điện tử (phức hệ 1 đến

4), enzym  $F_0F_1$  ATP synthase. Quá trình truyền điện tử và tổng hợp ATP được tóm tắt ở hình 1.3.



**Hình 1.3. Sơ đồ tổng hợp ATP trong ty thể**

Ty thể còn có khả năng tổng hợp các chất: photpholipit, axit béo và đặc biệt là protein (protein cấu trúc và các enzym). ADN trong ty thể chịu trách nhiệm tổng hợp phần protein ty thể.

Ty thể có khả năng di truyền độc lập đối với nhân. Tuy nhiên vẫn có sự phối hợp giữa nhân, cơ chất của tế bào chất với cơ chất của ty thể trong quá trình biểu hiện của gen (phiên mã và tổng hợp protein).

## 1.2. Đặc điểm của ADN ty thể người và ứng dụng trong nghiên cứu

Ty thể đóng vai trò quan trọng đối với sự tiến hóa của động vật. Những nghiên cứu phổ biến hiện nay đối với di truyền ở người là trên ADN ty thể (mitochondrial DNA – ADN ty thể). Mặc dù bộ gen ty thể người chỉ bằng 0.0005% so với toàn bộ kích thước bộ gen trong nhân nhưng các SNP được tìm thấy trong gen ty thể có liên quan đến nhiều bệnh chuyển hóa, rối loạn cũng như các đặc trưng ở người và đặc biệt là các SNP ở vùng D – Loop.

### 1.2.1. Đặc điểm của hệ gen ty thể người

Hệ gen ty thể người có chiều dài khoảng 16.569 bp, là một phân tử mạch vòng kín nằm trong chất nền ty thể và có hàng ngàn bản sao trong một tế bào. Phân tử ADN ty thể có hai chuỗi khác nhau về thành phần nucleotit:

- Chuỗi nặng có chứa nhiều Guanin (H – strand), mã hóa cho 28 gen.

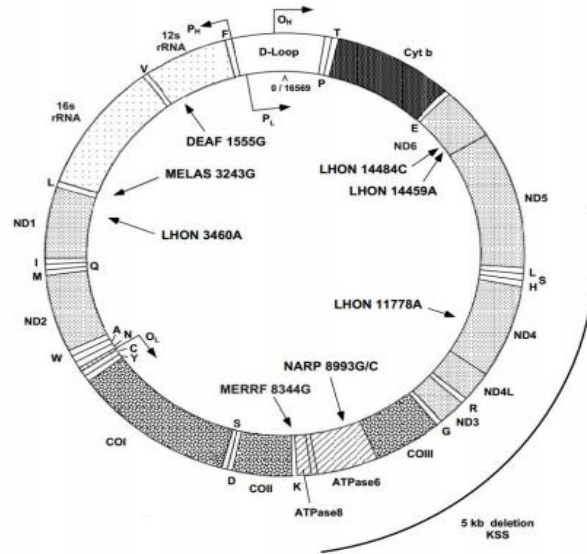
- Chuỗi nhẹ chứa nhiều Cytosin (L – strand), mã hóa cho 9 gen trong tổng số 37 gen của hệ gen ty thể.

Trong 37 gen này có 13 gen mã hóa cho 13 chuỗi polypeptide cần thiết cho hệ thống photphoryl hóa – oxy hóa, bao gồm 7 tiểu đơn vị của phức hệ I (complex I), một tiểu đơn vị của phức hệ III (complex III), 3 tiểu đơn vị của phức hệ VI (complex VI) và hai tiểu đơn vị của phức hệ V (complex V). Số gen còn lại mã hóa cho 22 tRNA, 2 rRNA (12S và 16S) phục vụ quá trình dịch mã của ty thể (Anderson S. 1981). Các chuỗi polypeptit khác cần thiết cho cấu trúc và chức năng của ty thể được mã hóa bởi gen nhân và được tổng hợp trong ribosom của tế bào chất.

Một đặc điểm đáng chú ý là hệ gen ty thể người có rất ít phần trình tự không mã hóa. Chỉ có khoảng 7% gen ty thể người không mã hóa các protein, rRNA, tRNA trong khi phần lớn hệ gen nhân là các vùng ADN không mã hóa (intron). Đoạn ADN ở giữa các gen ty thể hoặc là không có hoặc là ngắn hơn 10 bp. Ở một vài gen thay vì có mã kết thúc mRNA cần được polyadenin hóa để tạo thành mã kết thúc. Khoảng 90% số gen ty thể không mã hóa lại nằm trong vùng điều khiển hay D – Loop. Phần lớn các trình tự liên quan tới quá trình nhân đôi của ADN ty thể hay quá trình phiên mã đều nằm trong hoặc gần vùng D – Loop. Đoạn D – Loop có kích thước khoảng 1.1 kb ADN ty thể có một số vùng bất biến nằm trong vùng D – Loop bao gồm vùng promoter và vùng CSB (Conserved Sequence Block) I, II và III. Vì các trình tự bất biến này đều nằm ở D – Loop và được bảo tồn ở rất nhiều loài động vật có xương sống nên chúng được cho rằng có vai trò quan trọng trong quá trình nhân đôi của ADN ty thể. Ví dụ, CSB I có vị trí ngay gần vùng khởi đầu của quá trình nhân đôi chuỗi nặng (Wallberg and Clayton. 1981). Thêm nữa, vùng D – Loop còn chứa các vùng siêu biến (hypervariable regions) HVI, HVII và HVIII. Những vùng này có tần suất đột biến cao hơn đáng kể so với các vùng khác của hệ gen ty thể (Greenberg. 1983).



## Morbidity Map of the Human mtDNA Genome



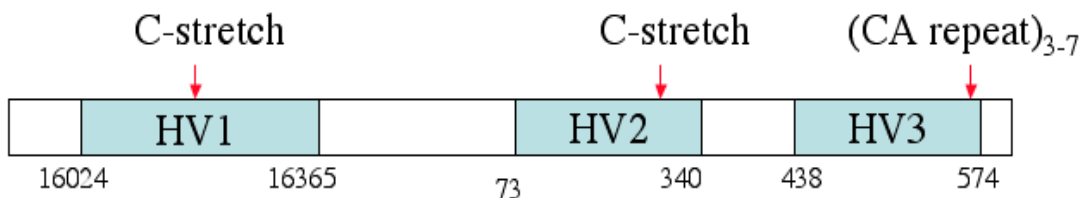
**Hình 1.4. Cấu trúc ty thể người**

(*Innovita research – 2003*)

### 1.2.2. Vị trí và độ dài vùng gen điều khiển D – Loop

Như đã giới thiệu ở trên, vùng gen điều khiển D – Loop có chiều dài xấp xỉ 1.100 bp và chứa các trình tự khởi đầu cho quá trình tái bản hệ gen ty thể và các đoạn điều khiển cho quá trình phiên mã của các gen chức năng trong vùng được mã hóa (Anderson. 1981, Lightowlers. 2001). Hệ thống đánh số bazơ bắt đầu tại điểm gần giữa vùng điều khiển và đi về hai phía, vì thế vùng điều khiển trải dài từ vị trí 16024 đến 16569, sau đó tiếp tục từ vị trí bazơ 1 cho đến 576. Đây là vùng xuất hiện nhiều đột biến nhất với tần số đột biến cao hơn so với các vùng khác của hệ gen ty thể (Horai. 1995, Sorenson, Fleischer. 1996). Hình 1.5

### Mitochondria Control Regions used in Forensic and Genealogy



**Hình 1.5. Vùng điều khiển D – Loop của ty thể người**

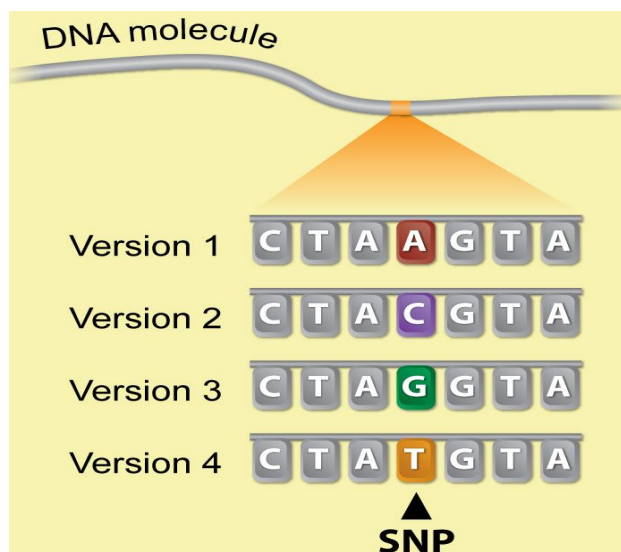
(<http://www.alphabiolab.com>)

- Vùng siêu biến 1 (HV1) kéo dài từ vị trí 16024 đến 16365.
- Vùng siêu biến 2 (HV2) kéo dài từ vị trí 73 đến 340.
- Vùng siêu biến 3 (HV3) kéo dài từ nucleotit 438 đến 574.

### 1.3. Đa hình nucleotit đơn (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs)

#### 1.3.1. Đa hình nucleotit đơn là gì?

Đa hình nucleotit đơn hay còn gọi là SNPs, được định nghĩa là biến thể trình tự ADN xảy ra khi một nucleotit đơn A, T, G hay C trong hệ gen khác biệt so với các cá thể khác trong cùng một loài.



**Hình 1.6. Đa hình nucleotit đơn**

([learn.genetics.utah.edu](http://learn.genetics.utah.edu))

Ở cá thể người, có 99.9% là giống nhau, chỉ 0.1% là khác biệt. Sự khác biệt này có thể là các đặc trưng tính trạng. Ví dụ như các sự phát triển bệnh nào đó ở người hoặc kiểu hình ...

Những biến đổi này có thể không có hại (những thay đổi về kiểu hình), có hại (gây bệnh ung thư, bệnh tim, Huntington's, bệnh tan huyết bẩm sinh), hoặc phát triển sau khi về già (đây là những biến đổi được tìm thấy trong vùng mã hóa và điều hòa gen).

#### 1.3.2. Các vị trí SNP trên gen

SNP có thể nằm trong vùng mã hóa các gen, vùng không mang mã hoặc trong vùng xen giữa các gen. Các SNP trong trình tự mã hóa không nhất thiết sẽ làm thay đổi trình tự các axit amin.