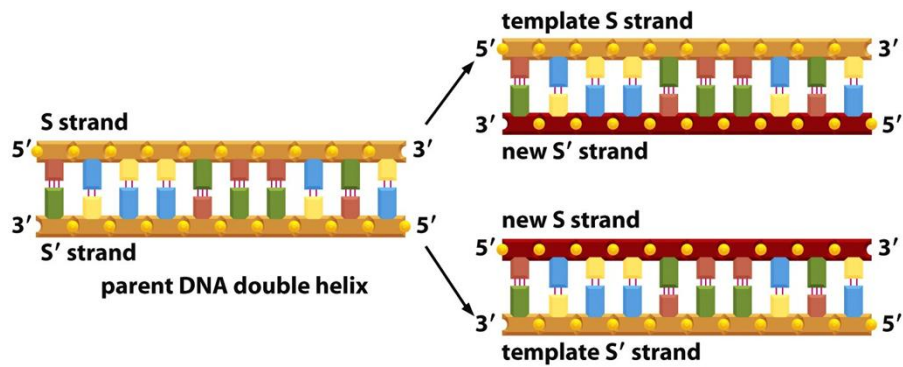




## Chương 3 Quá trình sao chép DNA



24/03/2016 2:56:19 SA

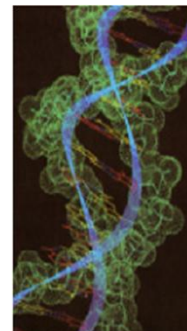
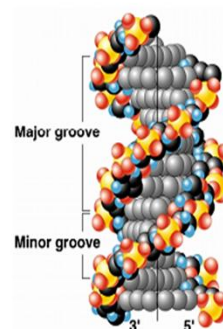
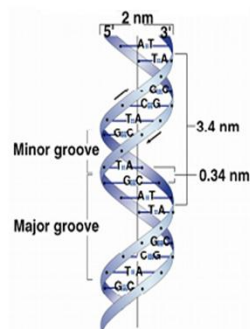
1

Nguyễn Hữu Trí



## DNA là vật liệu di truyền

- ❖ Bằng chứng 1: Thí nghiệm chứng minh có sự biến nạp ở vi khuẩn, 1928.
- ❖ Bằng chứng 2: Thí nghiệm chứng minh DNA là nhân tố biến nạp, 1944.
- ❖ Bằng chứng 3: Thí nghiệm chứng minh vật liệu di truyền của phage T<sub>2</sub> là DNA, 1952.



24/03/2016 2:56:19 SA

2

Nguyễn Hữu Trí



 **Thí nghiệm về biến nạp của Griffith**


Tế bào S sống (control)    Tế bào R sống (control)    Tế bào S chết (control)    Trộn tế bào S chết và tế bào R sống

**KẾT QUẢ**

Chuột bị chết    Chuột vẫn sống    Chuột vẫn sống    Chuột bị chết

Tế bào S sống được tìm thấy trong máu


Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. Publishing as Pearson Benjamin Cummings. All rights reserved.  
24/03/2016 2:56:19 SA    3    Nguyễn Hữu Trí 

 **Năm 1944 nhóm Avery, McCarty, McLeod xác định rõ nguyên nhân gây biến nạp là gì?**


1. Mice + DNA-digesting enzyme + heat-killed S + R ----> Live Mice
2. Mice + RNA-digesting enzyme + heat-killed S + R ----> Dead Mice
3. Mice + Protein-digesting enzyme + heat-killed S + R --> Dead Mice

→ **DNA là nhân tố biến nạp**

**Avery kết luận rằng DNA là vật liệu di truyền**

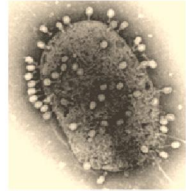


**Oswald T. Avery**

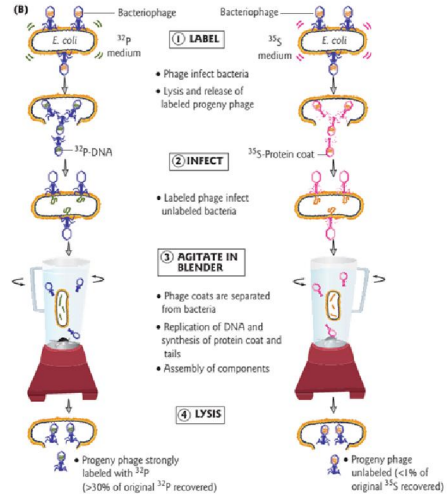
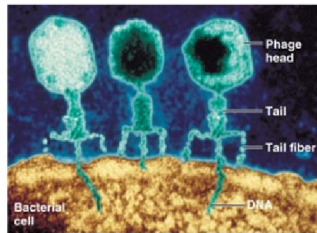
24/03/2016 2:56:19 SA    4    Nguyễn Hữu Trí 



**1952 – Alfred Hershey và Martha Chase kết luận vật liệu di truyền của phage T<sub>2</sub> là DNA.**



Phages on Bacterium



**Hershey và Chase khẳng định rằng DNA là vật liệu di truyền**

24/03/2016 2:56:19 SA

5

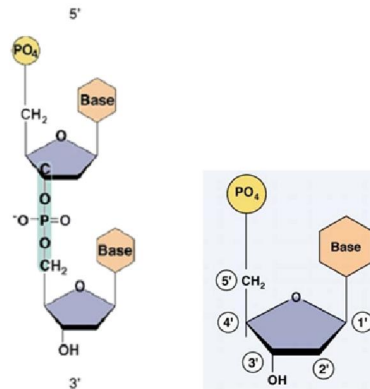
Nguyễn Hữu Trí



**1953 James D. Watson và Francis H. C. Crick công bố cấu trúc chuỗi xoắn kép của DNA**



James Watson và Francis Crick



24/03/2016 2:56:19 SA

6

Nguyễn Hữu Trí





## DNA là vật liệu di truyền

Vật chất di truyền trong cơ thể sinh vật có nhiệm vụ truyền lại tính trạng từ đời trước sang đời sau, trên 3 nguyên tắc:

- Vật chất này phải có **tính bền vững** về thông tin đối với cấu trúc, chức năng, sự phát triển và sự sinh sản của tế bào.
- Có **khả năng tự tái bản** một cách chính xác sao cho tế bào con có thông tin di truyền giống như tế bào mẹ.
- Có **khả năng thay đổi**, giúp sinh vật biến dị, thích ứng, và tiến hóa.

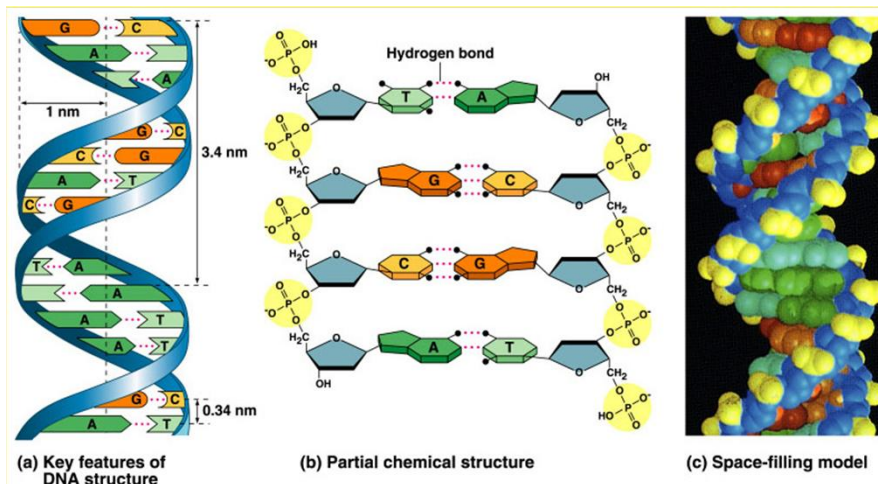
24/03/2016 2:56:19 SA

7

Nguyễn Hữu Trí



## Cấu trúc xoắn kép của DNA (Double helix structure of DNA)



24/03/2016 2:56:19 SA

8

Nguyễn Hữu Trí



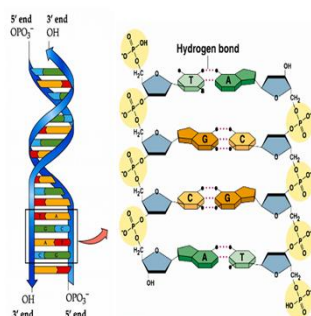


## Đặc điểm của cấu trúc xoắn kép DNA

❖ Phân tử DNA có hai chuỗi dây polynucleotide quấn nhau theo chiều tay phải. Hai dây này đối xứng nhau, cùng song hành theo từng cặp base tương ứng, theo qui ước đầu 5' là gốc, đầu 3' là đuôi. Dây cơ bản còn gọi là dây xương sống được hình thành bởi đường và photphat với những base đính hai bên trong dây.

- Chuỗi xoắn kép cho phép các base purine và pirimidine có cấu trúc phẳng xếp chồng khít lên nhau ở bên trong phân tử DNA, hạn chế sự tiếp xúc của chúng với nước. Chúng đính thẳng góc với dây xoắn.

- Các nguyên tử đường và các nhóm phosphate xoay ra ngoài hình thành liên kết với nước đảm bảo tính ổn định cho phân tử



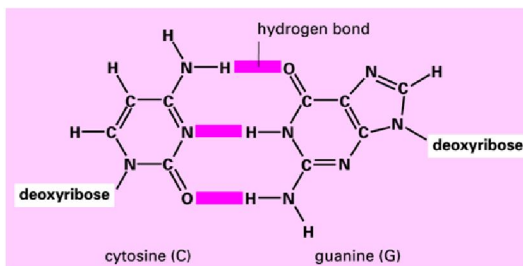
24/03/2016 2:56:19 SA

9

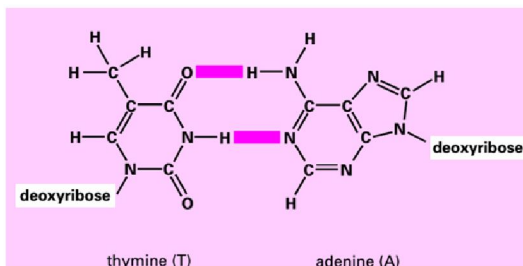
Nguyễn Hữu Trí



cytosine-guanine  
base pair (C≡G)



thymine-adenine  
base pair (T=A)



24/03/2016 2:56:19 SA

10

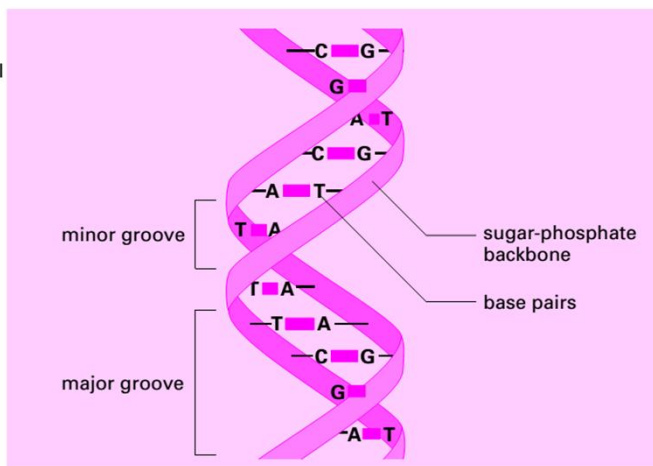
Nguyễn Hữu Trí





## Đặc điểm của cấu trúc xoắn kép DNA

schematic representation of the double-helical structure of DNA



24/03/2016 2:56:19 SA

11

Nguyễn Hữu Trí



## Đặc điểm của cấu trúc xoắn kép DNA

- Những base này ở trên hai dây đối xứng nhau được nối liền bởi cầu nối hydrogen: A-T và G-C. Cầu nối hydrogen rất dễ bị tách ra (ví dụ như nhiệt độ cao) để tạo thành hai dây đơn. Cặp base tương ứng A-T và C-G được gọi bằng thuật ngữ chuyên môn là “complement base pair”. Nối C-G (3 cầu nối) bền hơn nối A-T (2 cầu nối)
- Các cặp base cách nhau 0,34 nm trên dây xoắn DNA. Mỗi một góc quay hoàn toàn (360°) của dây xoắn (helix) có độ dài 3,4 nm. Do đó, mỗi đoạn xoắn như vậy có tất cả 10 cặp base. Đường kính của một góc quay là 2nm.
- Kết quả của cấu trúc dây xoắn kép tạo ra những rãnh chính (major groove) và những rãnh phụ (minor groove). Cả hai rãnh này có kích thước đủ rộng cho phép những phân tử protein tiếp xúc với những base.

24/03/2016 2:56:19 SA

12

Nguyễn Hữu Trí





## Tính ổn định và biến động của DNA

- ❖ Tính ổn định của DNA là kết quả của hai quá trình: sao chép và sửa sai
- ❖ Các biến đổi của DNA: đột biến, tái tổ hợp, các gen nhảy

24/03/2016 2:56:19 SA

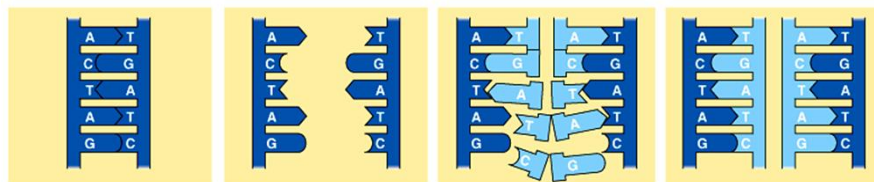
13

Nguyễn Hữu Trí



## Tính ổn định của DNA

- ❖ Cơ chế sao chép bán bảo tồn
- ❖ Các cơ chế sửa sai DNA



24/03/2016 2:56:19 SA

14

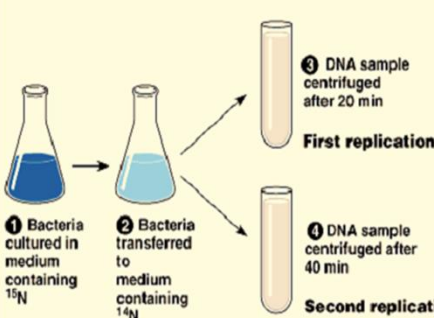
Nguyễn Hữu Trí

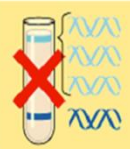
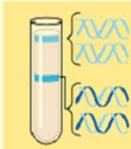





## Thí nghiệm của Meselson và Stahl


### Sự sao chép của DNA có tính chất bán bảo tồn



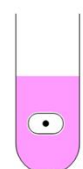
Predictions		
Conservative	Semiconservative	Dispersive
		
		

Đồng vị nặng của Nitơ (không phải đồng vị phóng xạ) được dùng trong thí nghiệm này

24/03/2016 2:56:19 SA
15
Nguyễn Hữu Trí


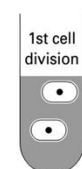


bacteria grown in medium enriched with the heavy isotope <sup>15</sup>N



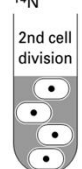
bacteria transferred to medium containing <sup>14</sup>N

1st cell division




bacteria continue to grow in medium containing <sup>14</sup>N

2nd cell division

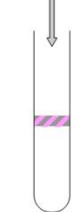


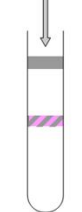
the density of the DNA isolated from the bacteria was analyzed by high speed centrifugation


least dense ↑



most dense ↓





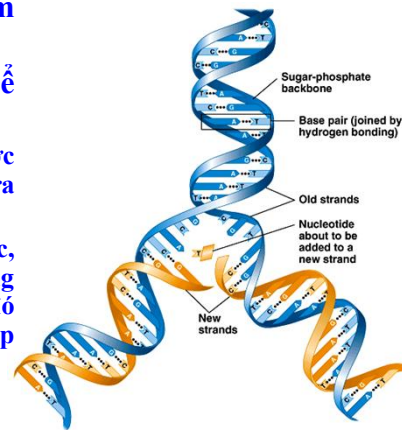
24/03/2016 2:56:19 SA
16
Nguyễn Hữu Trí






## Tổng quan về sự sao chép DNA

- ❖ Chuỗi xoắn kép DNA bao gồm 2 mạch bất cập bổ sung
- ❖ Mỗi mạch có thể làm nền để tổng hợp nên mạch mới
  - Cách thức tái bản như vậy được gọi là mô hình bảo thủ một nửa (semiconservative).
  - Một mạch được tổng hợp liên tục, một mạch được tổng hợp không liên tục (các đoạn ngắn sau đó được nối lại) được gọi là sao chép bán liên tục
  - Cần mỗi RNA primer



24/03/2016 2:56:19 SA

17

Nguyễn Hữu Trí



## Sự sao chép DNA

- ❖ Một mạch được sao chép liên tục hướng vào ngã ba sao chép (replicating fork).
- ❖ Một mạch được sao chép không liên tục tạo ra các đoạn 1-2 kb Okazaki theo hướng ngược lại (hướng ra khỏi ngã ba sao chép).
- ❖ Điều này đảm bảo cả hai mạch được sao chép theo đúng chiều 5' → 3'.

24/03/2016 2:56:19 SA

18

Nguyễn Hữu Trí





## Ngã ba sao chép

- Sự sao chép DNA diễn ra tại vị trí ngã ba sao chép (replication fork)
- Đây là quá trình:
  - Theo một hướng duy nhất – chỉ ba sao chép di chuyển theo một hướng trong khi cái còn lại thì cố định ở origin
  - Theo hai hướng – hai chuỗi ba di chuyển theo hai hướng ngược nhau từ origin
- Hầu hết sự sao chép ở vi khuẩn và ở tế bào eukaryote là theo hai hướng

24/03/2016 2:56:19 SA

19

Nguyễn Hữu Trí



## Cấu trúc sao chép có dạng theta “ $\theta$ ”

- DNA bắt đầu sao chép với sự tạo thành “bubble” – một vùng nhỏ nơi chuỗi gốc (template) được tách ra và DNA con đã được tổng hợp
- DNA được tách mạch tại điểm khởi đầu sao chép (ORI). Mỗi mạch đóng vai trò làm khuôn để tổng hợp mạch bổ sung.
- Ngã ba sao chép (Replication fork) di chuyển theo hai hướng ngược nhau tạo cấu trúc giống kí tự theta ( $\theta$ ).
- Sau khi quá trình sao chép hoàn tất hai mạch được tách ra

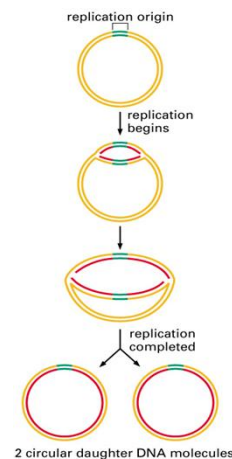


Figure 5-30. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

24/03/2016 2:56:19 SA

20

Nguyễn Hữu Trí



**Sự sao chép DNA ở prokaryote và eukaryote**

① Origin of replication

② Bubble

③ Two daughter DNA molecules

replication begins

replication completed

2 circular daughter DNA molecule

Figure 5-30. Molecular Biology of the

24/03/2016 2:56:19 SA

21

replication at the two ends of each bubble (TEM).

Nguyễn Hữu Trí

**Sự sao chép DNA ở prokaryote và eukaryote**

**Sự sao chép DNA ở vi khuẩn: mỗi nhiễm sắc thể là một replicon**

replication forks

1 μm


Figure 5-6. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

24/03/2016 2:56:19 SA

22


Nguyễn Hữu Trí


**Sự sao chép được tiến hành đồng thời tại nhiều điểm trên phân tử DNA của eukaryote**



**TABLE 5.01** Proteins Involved in DNA Replication in *E. coli*


Protein	Gene	Function
DnaA	<i>dnaA</i>	Initiation of chromosome division; binds to the origin of replication
Helicase	<i>dnaB</i>	Unwinds the double helix
DnaC	<i>dnaC</i>	Loading of DNA helicase
SSB	<i>ssb</i>	Single strand binding protein
Primase	<i>dnaG</i>	Synthesis of RNA primers
RNase H	<i>rnhA</i>	Partial removal of RNA primers
Pol I	<i>polA</i>	Polymerase I; fills gaps between Okazaki fragments
Polymerase III		DNA polymerase III holoenzyme
α	<i>dnaE</i>	strand elongation
ε	<i>dnaQ</i>	kinetic proof-reading
θ	<i>holE</i>	unknown; part of core enzyme
β	<i>dnaN</i>	sliding clamp
τ	<i>dnaX</i>	dimerization of core enzyme
γ	<i>dnaX</i>	loading of sliding clamp
δ	<i>holA</i>	loading of sliding clamp
δ'	<i>holB</i>	loading of sliding clamp
χ	<i>holC</i>	loading of sliding clamp
ψ	<i>holD</i>	loading of sliding clamp
DNA Ligase	<i>lig</i>	Seals nicks in lagging strand
DNA Gyrase		Introduces negative supercoils
α	<i>gyrA</i>	Makes and seals double strand breaks in DNA
β	<i>gyrB</i>	ATP-using subunit
Topoisomerase IV		Decatenation
A	<i>parC</i>	Makes and seals double strand breaks in DNA
B	<i>parE</i>	ATP-using subunit

24/03/2016 2:56:19 SA 23 Nguyễn Hữu Trí 



## *E. coli* DNA Polymerases

- Có ba loại 3 DNA polymerase ở *E. coli*:
  - pol I
  - pol II
  - pol III
- *E. coli* DNA polymerase I xác định đầu tiên. Nó được khám phá năm 1958 bởi Arthur Kornberg.

24/03/2016 2:56:19 SA 24 Nguyễn Hữu Trí 



## DNA Polymerase I

- DNA polymerase I (pol I) là một enzyme linh hoạt với 3 hoạt tính:
  - DNA polymerase
  - 3'→5' exonuclease
  - 5'→3' exonuclease
- Xử lý thủy phân nhẹ cho ra 2 polypeptide
  - Phần Klenow
  - Phần nhỏ hơn

24/03/2016 2:56:19 SA

25

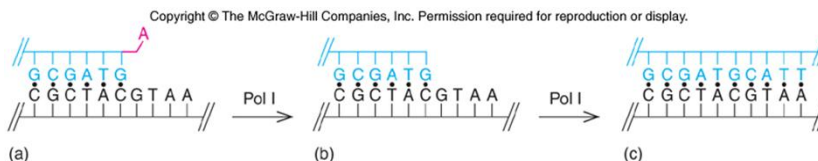
Nguyễn Hữu Trí



## Phần Klenow (Klenow Fragment)

Có 2 chức năng: Polymerase và hoạt tính 3'→5' exonuclease giúp nó có khả năng đọc ngược (proofreading)

- Nếu pol I thêm nt sai, sự bắt cặp giữa các base không đúng
- Pol I dừng lại, exonuclease loại bỏ nt không bắt cặp
- Cho phép quá trình sao chép tiếp tục
- Làm tăng tính trung thực của quá trình sao chép



24/03/2016 2:56:19 SA

26

Nguyễn Hữu Trí

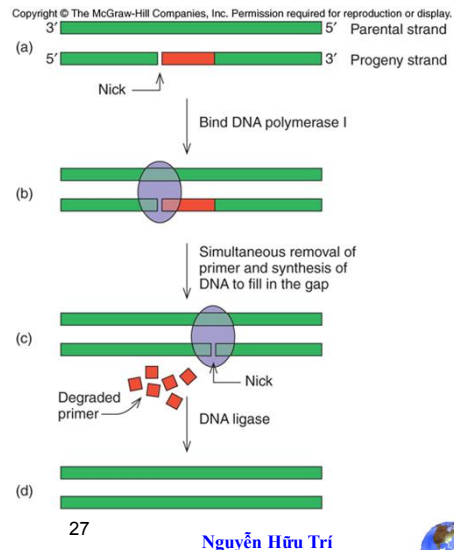




## 5'→3' exonuclease

- Hoạt tính này cho phép pol I cắt tại một đầu của chuỗi DNA đang hình thành
- Loại bỏ và thay thế một chuỗi khi nó đi qua
- Là chức năng cơ bản khi:
  - Loại bỏ primer
  - Sửa chữa cho đứt (nick)

24/03/2016 2:56:19 SA



## Polymerases II và III

- ❖ Hoạt tính của Pol II không liên quan đến sự sao chép của DNA
- ❖ Pol I có vai trò chủ yếu trong sửa sai
- ❖ Chỉ có pol III là cần đến cho quá trình sao chép DNA
- ❖ Pol III là enzyme sao chép ở vi khuẩn

24/03/2016 2:56:19 SA

28

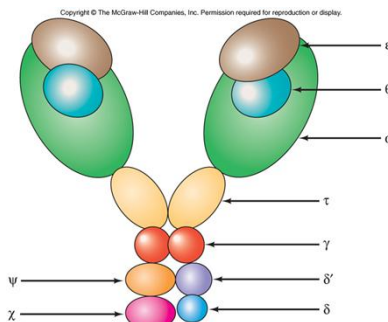
Nguyễn Hữu Trí





## Enzyme Pol III hoàn chỉnh

- ❖ Pol III core được tạo thành bởi:
  - Hoạt tính DNA polymerase nằm trên tiểu đơn vị  $\alpha$
  - Hoạt tính  $3' \rightarrow 5'$  exonuclease tìm thấy trên tiểu đơn vị  $\epsilon$
  - Vai trò của tiểu đơn vị  $\theta$  vẫn chưa rõ
  - Hoạt tính DNA-dependent ATPase nằm trên phức hợp  $\gamma$  chứa 5 tiểu đơn vị
- ❖ Cuối cùng, tiểu đơn vị  $\beta$  thêm vào tạo thành enzyme hoàn chỉnh (holoenzyme). Holoenzyme có chứa khoảng 10 tiểu đơn vị.



Source: Adapted from Henderson, D.R. and T.J. Kelly, DNA polymerase III: Running rings around the fork. *Cell* 84:6, 1996.

24/03/2016 2:56:19 SA

29

Nguyễn Hữu Trí



## Tính trung thực của quá trình sao chép

- ❖ Sự trung thực trong sao chép cần thiết cho sự sống
- ❖ Bộ máy sao chép DNA đã thiết lập một hệ thống sửa sai (proofreading system)
  - Hệ thống này cần mỗi
  - Chỉ nucleotide bắt cặp bổ sung làm mỗi cho pol III hoàn chỉnh
  - Nếu một nucleotide sai thì quá trình sao chép ngừng lại cho đến khi hoạt tính  $3' \rightarrow 5'$  exonuclease của enzyme pol III hoàn chỉnh loại bỏ nó

24/03/2016 2:56:19 SA

30

Nguyễn Hữu Trí





## Các DNA Polymerase của eukaryote

### Tế bào động vật có vú chứa 5 DNA polymerase khác nhau

- Polymerase  $\delta$  và  $\alpha$  có vai trò tham gia sao chép trên cả hai mạch DNA
- Pol  $\alpha$  đóng vai trò trong việc khởi đầu tổng hợp DNA
- Kéo dài cả hai mạch được thực hiện bởi pol  $\delta$

Table 20.3 Probable Roles of Some Eukaryotic DNA Polymerases

Enzyme	Probable Role
DNA polymerase $\alpha$	Priming of replication of both strands
DNA polymerase $\delta$	Elongation of both strands
DNA polymerase $\beta$	DNA repair
DNA polymerase $\epsilon$	DNA repair
DNA polymerase $\gamma$	Replication of mitochondrial DNA

24/03/2016 2:56:19 SA

31

Nguyễn Hữu Trí



## Sự tách mạch

- ❖ Quá trình DNA sao chép cho thấy 2 mạch DNA tại ngã ba sao chép bị tách mạch
- ❖ Không xảy ra tự động khi DNA polymerase làm công việc của nó
  - 2 mạch nền liên kết rất chặt với nhau
  - Cần tốn năng lượng và hoạt động của enzyme để tách chúng
  - Helicase làm tách mạch dsDNA tại ngã ba sao chép được mã hóa bởi gene *E. coli dnaB*.

24/03/2016 2:56:19 SA

32

Nguyễn Hữu Trí







## Single-Strand DNA-Binding Protein

- ❖ Ở prokaryote ssDNA-binding protein gắn chặt với ssDNA hơn với dsDNA
  - Nhờ sự hoạt động của helicase giúp hình thành ssDNA
  - Giữ cho hai mạch không bắt cặp trở lại
- ❖ Bằng cách bọc ngoài ssDNA, SSBs giữ cho nó khỏi bị phân hủy
- ❖ SSBs cần thiết cho quá trình sao chép DNA ở prokaryote

24/03/2016 2:56:19 SA

33

Nguyễn Hữu Trí



## Topoisomerases


- ❖ Chuỗi DNA được tách được gọi là “unzipping”
  - DNA không thật sự giống một dây kéo thẳng mà là một chuỗi xoắn đối song song.
  - Khi 2 mạch DNA được tách ra, mạch này quay vòng quanh mạch kia
- ❖ Helicase có thể tự mình tách và giữ nếu hai mạch của DNA là thẳng và ngắn, ở DNA dạng vòng nảy sinh một vấn đề
  - Khi DNA được tháo xoắn ở một vị trí thì sẽ làm xoắn hơn ở vị trí khác.

24/03/2016 2:56:19 SA

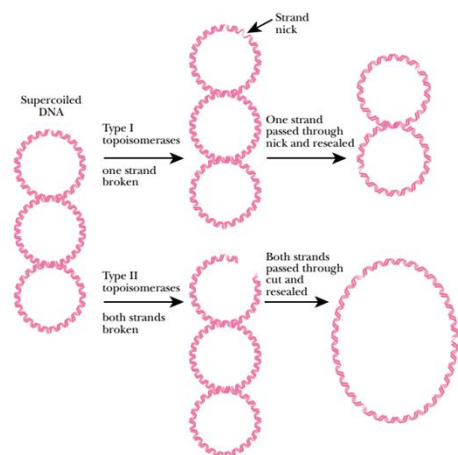
34

Nguyễn Hữu Trí





## Topoisomerase và DNA gyrase



Supercoiled DNA

Type I topoisomerases  
one strand broken


Strand nick


One strand passed through nick and resealed

Type II topoisomerases  
both strands broken

Both strands passed through cut and resealed

Topoisomerase là một nuclease đặc biệt đóng vai trò tháo xoắn để khắc phục sự xoắn tít lại của DNA mạch khuôn.


24/03/2016 2:56:19 SA 35 Nguyễn Hữu Trí 



## DNA Gyrase

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

- Đầu tiên là một enzyme gắn vào chuỗi xoắn kép DNA được gọi là DNA gyrase
- Cho phép mạch DNA xoay và giải xoắn
- Gyrase là một dạng của enzyme lớp topoisomerase II




Direction of DNA synthesis

Helicase

HELICASE

DNA gyrase

DNA GYRASE

24/03/2016 2:56:19 SA 36 Nguyễn Hữu Trí 



## Cơ chế hoạt động của Helicase

- Khi helicase hoạt động nó gắn với những “initiator” và lôi chúng vào DNA đang tái bản.
- Helicase có nhiệm vụ mở xoắn và tách dây đôi thành dây đơn bằng cách sử dụng năng lượng từ quá trình phân giải ATP.
- Sự phân giải ATP làm thay đổi trạng thái của helicase, tạo điều kiện để enzyme di chuyển dọc theo dây DNA để mở xoắn.

24/03/2016 2:56:19 SA

37

Nguyễn Hữu Trí



## Sự khởi đầu (Initiation)

- ❖ Khởi đầu của quá trình sao chép DNA là quá trình tổng hợp primer
- ❖ **Primosome** được dùng để chỉ tập hợp các protein cần thiết cho sự tổng hợp primer cho quá trình sao chép DNA.
- ❖ Tổng hợp primer ở *E. coli* đòi hỏi một primosome gồm có:
  - DnaB DNA helicase
  - DnaG Primase

24/03/2016 2:56:19 SA

38

Nguyễn Hữu Trí



## Primosome

Primosome hình thành tại ORI, trong trường hợp *E. coli* với nhiễm sắc thể vòng tròn, điểm gốc của sự sao chép gọi là *oriC* (245bp)


24/03/2016 2:56:19 SA 39 Nguyễn Hữu Trí

## OriC

Vùng OriC bao gồm hai nhóm trình tự lặp lại với (N là base bất kỳ)

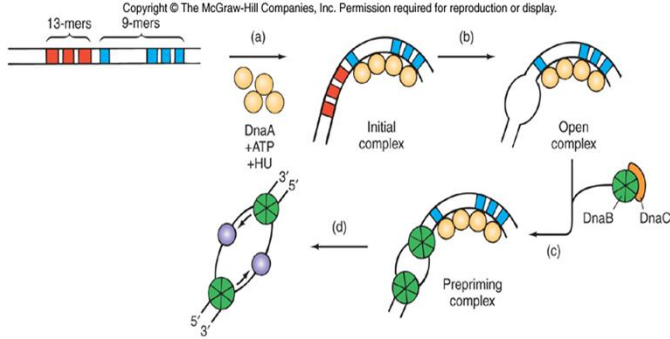
- 3 trình tự lặp lại liên tiếp gồm 13 cặp base GATCTNTTNTTT
- 4 trình tự lặp lại phân tán với 9 cặp base TTATNCANA

24/03/2016 2:56:19 SA 40 Nguyễn Hữu Trí



## Khởi đầu sao chép ở *E. coli*


Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.




- DnaA gắn vào *oriC* tại vị trí 4 trình tự lặp lại 9 base và phối hợp với HU protein tách một đoạn DNA kế cận về phía trái tại tất cả 3 vùng lặp lại 13 base tạo ra một phức hợp mở.
- DnaB helicase là một hexamer gắn vào phức hợp mở nhờ DnaC và tạo thuận tiện cho primase gắn vào để hoàn thành primosome.

24/03/2016 2:56:19 SA

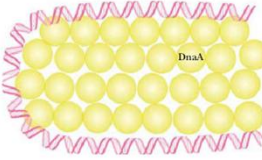
41

Nguyễn Hữu Trí 

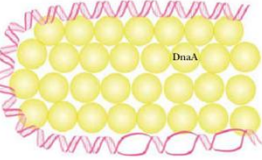


## Khởi đầu sao chép ở *E. coli*

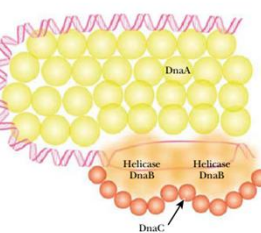
A) DnaA - DNA AGGREGATES



B) REPLICATION BUBBLES FORMS




C) DnaB AND DnaC BIND TO FORM REPLICATION FORKS AND DISPLACE DnaA



- DnaB helicase thay thế cho DnaA và bắt đầu tách mạch DNA để tạo ngã ba sao chép. Một DnaB hexamer thứ 2 tạo một ngã ba sao chép thứ 2 và di chuyển ngược chiều.

24/03/2016 2:56:19 SA

42

Nguyễn Hữu Trí 



## Khởi đầu sao chép ở *E. coli*

- Primosome vẫn gắn replisome (là hệ thống các enzyme của bộ máy sao chép), lập lại việc tổng hợp primer cho các đoạn Okazaki tổng hợp trên mạch chậm (lagging strand)
- DnaB helicase có hoạt tính helicase giúp tháo xoắn DNA khi replisome tiến hành
- DNA gyrase cần thiết để tháo xoắn và SSB protein được gắn vào để ổn định DNA mạch đơn.
- DnaB helicase cũng hoạt hóa primase, là enzyme tổng hợp RNA primer.

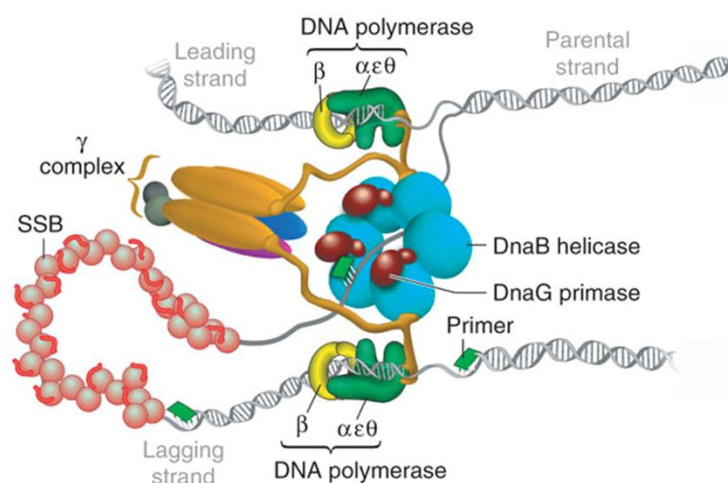
24/03/2016 2:56:19 SA

43

Nguyễn Hữu Trí



## Replisome



24/03/2016 2:56:19 SA

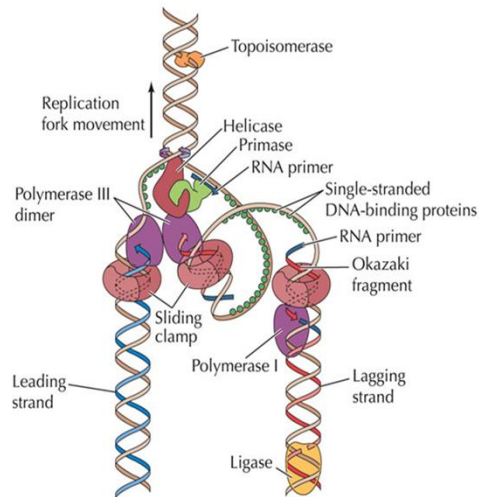
44

Nguyễn Hữu Trí





## Ngã ba sao chép (Replication fork)



24/03/2016 2:56:19 SA

45

Nguyễn Hữu Trí



## Kéo dài (Elongation)

- ❖ Khi một primer được tổng hợp quá trình tổng hợp DNA thực sự bắt đầu.
- ❖ Một cách kết hợp hài hòa trong quá trình tổng hợp mạch sau(lagging) và mạch trước (leading) giữ holoenzyme pol III bám chặt với dây nền.
- ❖ Sao chép là một quá trình diễn ra rất nhanh.

24/03/2016 2:56:19 SA

46

Nguyễn Hữu Trí





## Tốc độ sao chép

- In vitro enzyme pol III tổng hợp DNA với tốc độ khoảng 730 nt/giây, in vivo tốc độ này khoảng 1000 nt/giây
- Đây là enzyme có tốc độ tổng hợp cao cả trong in vitro và in vivo.

24/03/2016 2:56:19 SA

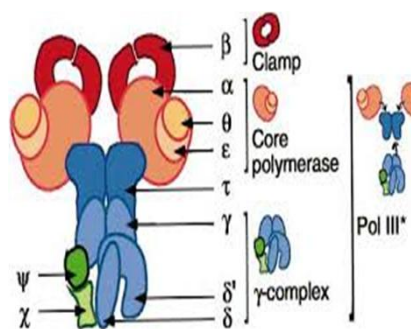
47

Nguyễn Hữu Trí



## Pol III Holoenzyme và quá trình sao chép

- Pol III core có khả năng polymerase rất yếu, sau khi tổng hợp khoảng 10 nt nó bị tách khỏi dây nền (template).
- Như vậy core enzyme thiếu một yếu tố
  - Đó là tác nhân hiện diện trên holoenzyme cho phép nó vẫn liên kết chặt với template
  - Tác nhân đó là một “kẹp trượt”, tiểu đơn vị  $\beta$ -của enzyme hoàn chỉnh (holoenzyme).



24/03/2016 2:56:19 SA

48

Nguyễn Hữu Trí







## Vai trò của tiểu đơn vị $\beta$

- Core được thêm tiểu đơn vị  $\beta$  có thể sao chép DNA tốc độ cao khoảng 1,000 nt/giây
  - Dimer được hình thành bởi tiểu đơn vị  $\beta$  có dạng vòng (ring-shaped)
  - Vòng này bao quanh DNA template
  - Tương tác với tiểu đơn vị  $\alpha$  của core để kết hợp toàn bộ polymerase và template với nhau
- Holoenzyme giữ nó trên dây nền như vào kẹp  $\beta$ .
- Yếu tố giữ cho quá trình sao chép ở Eukaryote là PCNA hình thành một trimer, cũng có dạng vòng bao quanh DNA và giữ DNA polymerase trên template

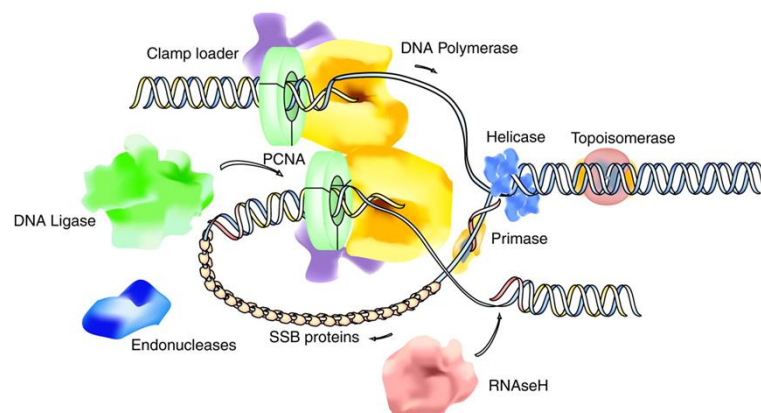
24/03/2016 2:56:19 SA

49

Nguyễn Hữu Trí



## Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)



24/03/2016 2:56:19 SA

50

Nguyễn Hữu Trí





## Yếu tố giúp gắn “kẹp”

- Tiểu đơn vị  $\beta$  cần sự trợ giúp của một phức hợp  $\gamma$  để gắn vào DNA template
  - Phức hợp  $\gamma$  này hoạt động xúc tác trong việc hình thành phức hợp  $\alpha\delta\beta$
  - Nó không liên kết với phức hợp trong suốt quá trình sao chép
- Quá trình gắn “kẹp” là quá trình sử dụng ATP
  - Năng lượng từ ATP thay đổi hình dạng của tiểu đơn vị  $\delta$  giúp nó gắn với tiểu đơn vị  $\beta$
  - Việc gắn này cho phép mở “kẹp” và bao quanh DNA

24/03/2016 2:56:19 SA

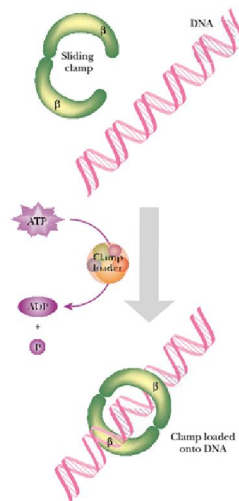
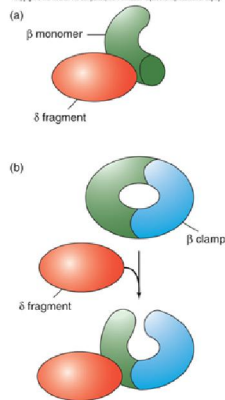
51

Nguyễn Hữu Trí



## Kẹp $\beta$ và Loader

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



24/03/2016 2:56:19 SA

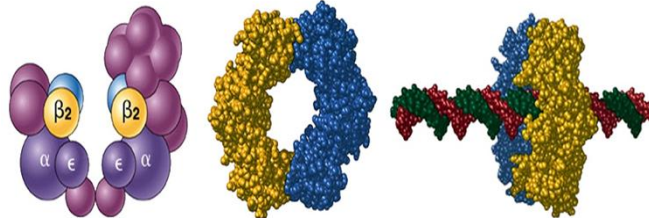
52

Nguyễn Hữu Trí





## Kẹp $\beta$ và Loader



DNA Polymerase III  $\beta_2$  subunits "sliding clamp" DNA moving through DNA Polymerase

24/03/2016 2:56:19 SA

53

Nguyễn Hữu Trí



## Sự tổng hợp mạch sau

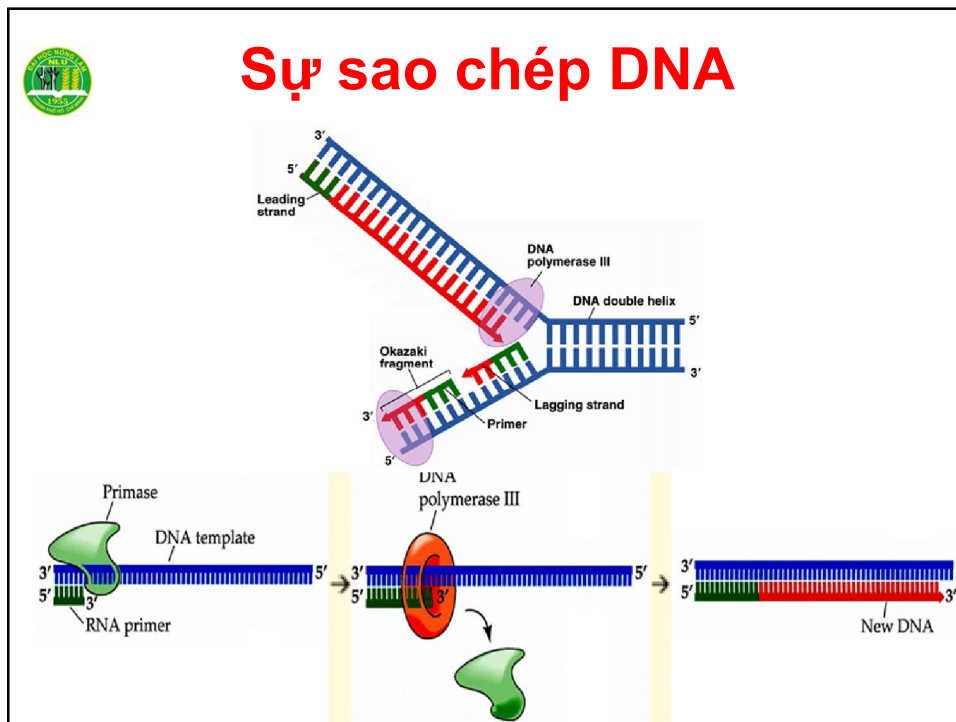
- Pol III holoenzyme là enzyme có 2 đầu, ở đây có 2 core polymerases gắn 2 tiểu đơn vị  $\tau$  với một phức hợp  $\gamma$
- Một core chịu trách nhiệm tổng hợp liên tục ở mạch trước (leading strand)
- Một core khác thực hiện việc tổng hợp gián đoạn ở mạch sau (lagging strand)
  - Phức  $\gamma$  duy trì như một clamp loader để gắn kẹp  $\beta$  vào primer trên DNA template
  - Sau khi được load, kẹp  $\beta$  không còn ái lực với  $\gamma$  complex mà lại liên kết chặt với core polymerase

24/03/2016 2:56:19 SA

54

Nguyễn Hữu Trí





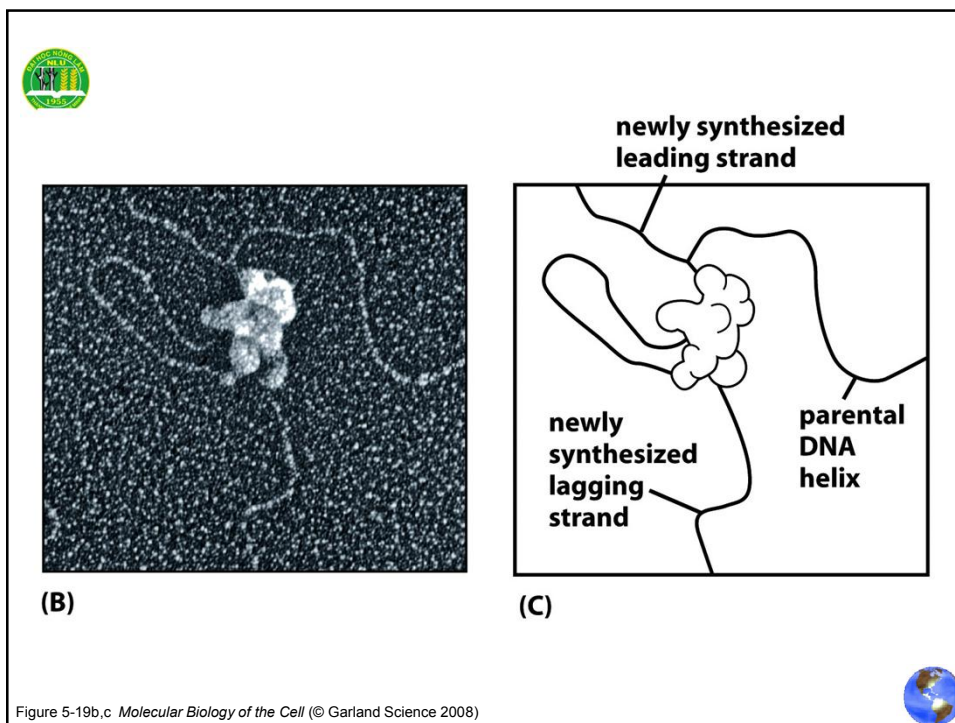
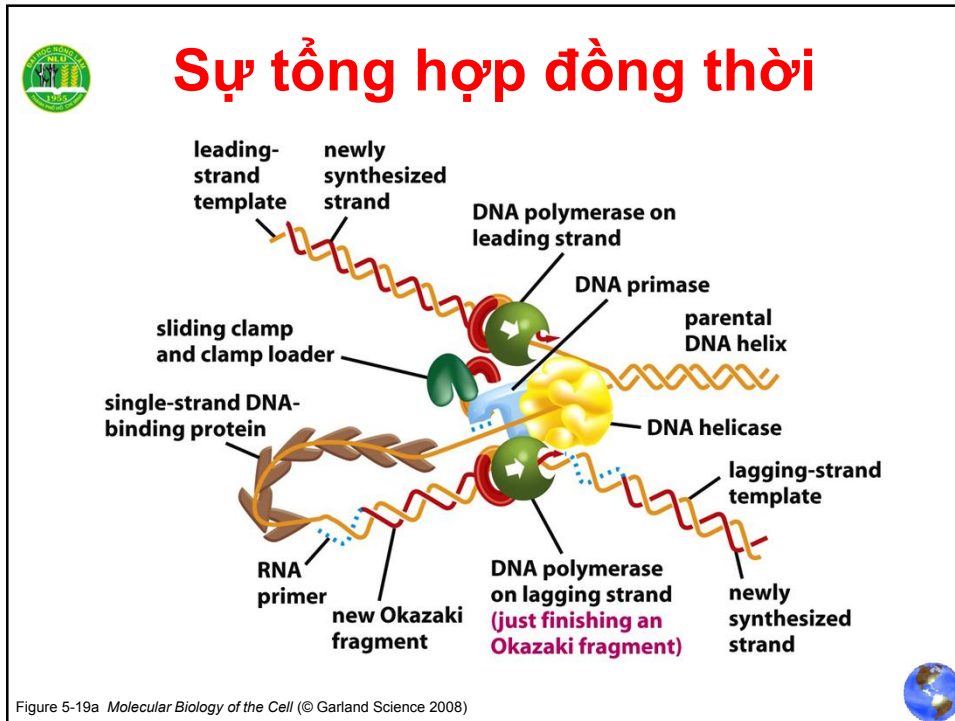
**Sự tổng hợp đồng thời**

- Phức hợp  $\gamma$  và kẹp  $\beta$  giúp core polymerase tổng hợp nhanh một đoạn Okazaki
- Khi đoạn này tổng hợp xong, kẹp  $\beta$  mất ái lực với core
- Hình thành liên kết giữa kẹp  $\beta$  với  $\gamma$  complex với hoạt động tháo kẹp (unload clamp)
- Sau đó lại bắt đầu một chu kì mới

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

The diagram shows four stages (a, b, c, d) of the simultaneous synthesis of Okazaki fragments. In (a), the beta clamp is bound to the DNA. In (b), the beta clamp is released. In (c), the gamma complex is bound to the DNA. In (d), the gamma complex is released, and the beta clamp is bound to the DNA again, ready to start a new cycle.

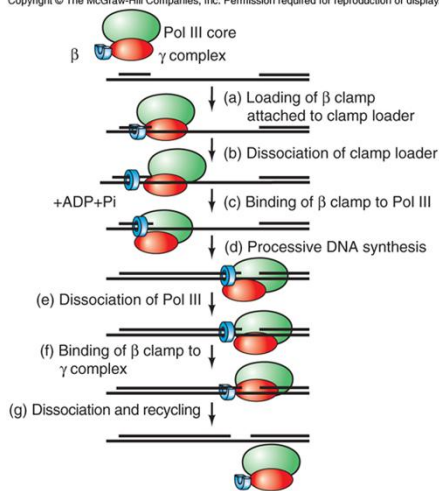
24/03/2016 2:56:19 SA





## Sao chép ở mạch sau

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Source: Adapted from Henderson, D.R. and T.J. Kelly, DNA polymerase III: Running rings around the fork. *Cell* 84:7, 1996.

24/03/2016 2:56:19 SA

59

Nguyễn Hữu Trí



## Sự loại bỏ mồi RNA

- Khi sự tổng hợp DNA hoàn tất, mồi RNA primer cần thiết phải được thay thế bởi deoxyribonucleotide. Ở prokaryote, enzyme DNA polymerase I loại bỏ mồi ribonucleotides sử dụng hoạt tính 5 $\rightarrow$ 3 exonuclease và sau đó sử dụng hoạt tính 5 $\rightarrow$ 3 polymerase. Sự tổng hợp mạch chậm (lagging strand) được hoàn thành nhờ enzyme DNA ligase.

24/03/2016 2:56:19 SA

60

Nguyễn Hữu Trí



**Sự tổng hợp mạch chậm (lagging strand)**

The diagram illustrates the synthesis of the lagging strand in three stages:

- Initial Synthesis:** Parental DNA (5' to 3') is unwound. The lagging strand is synthesized discontinuously as Okazaki fragments, each beginning with an RNA primer.
- Pol I Action:** DNA Polymerase I (Pol I) moves along the strand, replacing the RNA primers with new DNA nucleotides. The RNA nucleotides are discarded.
- Ligation:** DNA ligase seals the nicks between the Okazaki fragments, creating a continuous DNA strand.

24/03/2016 2:56:19 SA 61 Nguyễn Hữu Trí

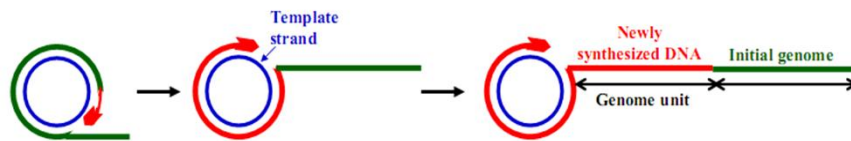
**Kết thúc (Termination)**

- Trong quá trình sao chép của vi khuẩn
  - 2 replication fork tiến đến vùng kết thúc
  - Có chứa vị trí 22-bp terminator liên kết với protein đặc hiệu (terminus utilization substance, TUS)
  - Replicating fork đi vào vùng kết thúc sao chép và dừng lại
  - Tách rời hai mạch con dính vào nhau nếu không tế bào sẽ không phân chia

24/03/2016 2:56:19 SA 62 Nguyễn Hữu Trí



## Kiểu sao chép vòng xoay



Sao chép vòng xoay (Rolling circle) là một kiểu sao chép của DNA trong các DNA mạch vòng (circular template) mà mạch khuôn được sao chép nhiều lần (copied many times).

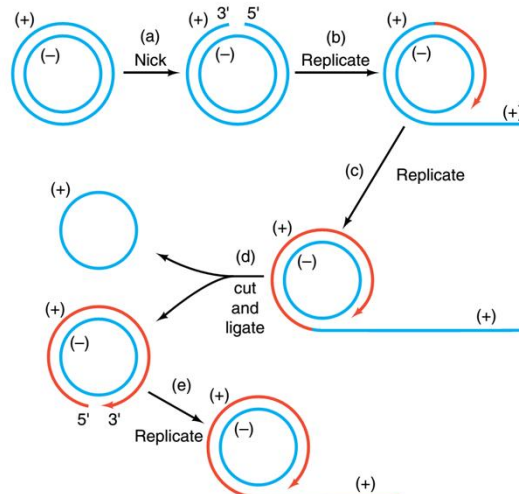
24/03/2016 2:56:19 SA

63

Nguyễn Hữu Trí



## Kiểu sao chép vòng xoay



24/03/2016 2:56:19 SA

64

Nguyễn Hữu Trí







## Sao chép vòng xoay

- DNA dạng vòng có thể sao chép theo cơ chế vòng xoay (rolling circle replication)
  - Một sợi của dsDNA bị cắt (nick) và đầu 3' được mở ra
  - Sử dụng mạch DNA còn nguyên như là một DNA template
  - Đầu 5' bị tách ra
- Phage  $\phi$ X174 sao chép xoay vòng vì vậy khi sao chép đủ chiều dài, chuỗi vòng đơn của DNA được tách ra
- Phage  $\lambda$ , chuỗi tách ra được sử dụng như là template cho sự sao chép gián đoạn, mạch lagging

24/03/2016 2:56:19 SA

65

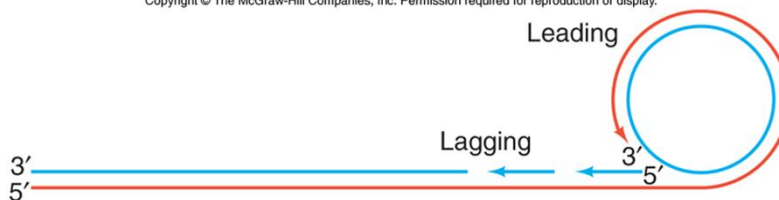
Nguyễn Hữu Trí



## Kiểu sao chép vòng xoay ở Phage $\lambda$

- Khi vòng tròn xoay qua phải
  - Mạch liên tục (leading strand) tiếp tục được kéo dài
  - Mạch gián đoạn (lagging strand) kéo dài một cách gián đoạn
    - Dùng mạch liên tục không xoay làm template
    - RNA primer được dùng tổng hợp đoạn Okazaki
    - Các dsDNA con mới được tổng hợp tạo thành nhiều bộ gen trước khi DNA bị cắt.

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.




24/03/2016 2:56:19 SA

66

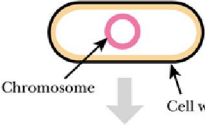
Nguyễn Hữu Trí






## Sự phân chia tế bào mẹ

1. Bacterial cell with circular chromosome

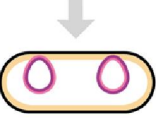


Chromosome      Cell wall

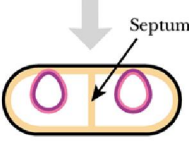
2. Newly replicated DNA



3. Daughter chromosomes attached to membrane




4. Septum forms between chromosomes



Septum


5. Chromosomes in daughter cells




24/03/2016 2:56:19 SA

67

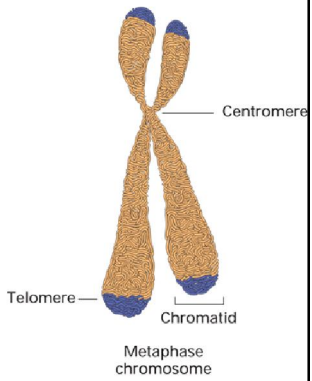
Nguyễn Hữu Trí





## Telomere


- Tất cả eukaryote bảo vệ telomere của chúng khỏi các nuclease và các enzyme ghép nối mạch đôi DNA.
- Telomeres của động vật hữu nhũ hình thành dạng cấu trúc vòng (loop) giúp bảo vệ sợi DNA mạch đơn ở đầu cuối NST.
- Sau mỗi chu kỳ phân chia, NST bị ngắn đi do vài vùng telomere bị mất đi. Tuy nhiên, các vùng gene chức năng không bị ảnh hưởng, vì trong tế bào có sự hiện diện của enzyme telomerase. Đoạn DNA bị mất do sao chép sau đó sẽ được thay thế bởi vài vùng 6 cặp base sau mỗi chu kỳ sao chép.




24/03/2016 2:56:19 SA

68

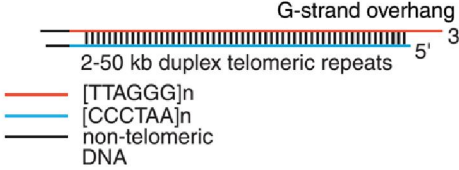
Nguyễn Hữu Trí



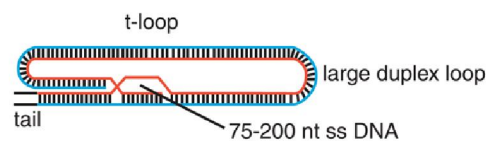


## Cấu trúc của telomere

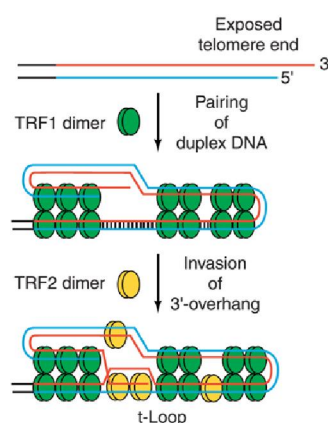
G-strand overhang




t-loop




Exposed telomere end



Ở điều kiện bình thường, telomere tồn tại dưới cấu trúc bậc 2 gọi là T-loop. Cấu trúc T-loop được ổn định bởi các phức hợp protein chuyên biệt






## Telomere

Telomere là cấu trúc tìm thấy ở đầu của NST. Telomere chứa các trình tự lặp lại ngắn (từ 20 đến vài trăm), thông thường là 6 base (TTAGGG, tìm thấy ở động vật có xương sống kể cả con người).

Telomere có tính bảo tồn cao mặc dù có một vài biến đổi nhỏ. Trình tự lặp lại TTAGGG có ở động vật có xương đồng thời cũng thấy ở trùng Trypanosoma, trong khi ở trùng đế dày Paramecium và Tetrahymena, trình tự lặp lại là TTGGGG. Rất nhiều côn trùng có vùng lặp lại 5 base TTAGG, trong khi ở thực vật Arabidopsis có trình tự 7 base lặp lại là TTTAGGG. Tuy nhiên, gần đây nhiều dữ liệu cho thấy vài thực vật 1 lá mầm có trình tự lặp lại là TTAGGG giống ở động vật có xương sống.

24/03/2016 2:56:19 SA
70
Nguyễn Hữu Trí


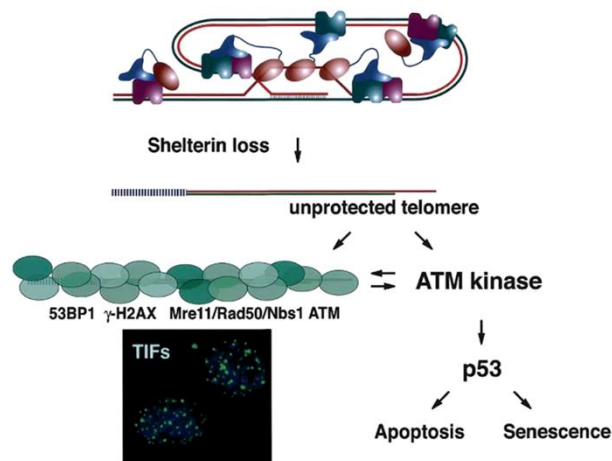


## Vai trò của telomere

- Bảo vệ các gene nằm cuối NST
- Liên quan đến cấu trúc T-loop của telomere:
  - Tránh sự nhận biết mạch đơn
  - Tránh sự nối các đầu NST
  - Tránh quá trình tái tổ hợp NST
- Khởi sự quá trình ngừng phân chia hoặc chết của tế bào



## Vai trò của telomere



**Sự hoạt hóa ngừng phân bào hoặc chết tế bào**





## Telomerase

- Blackburn có một lựa chọn thông minh để nghiên cứu về telomerase: trùng đơn bào có lông *Tetrahymena*. *Tetrahymena* có hai loại nhân (nuclei):
  - (1) nhân nhỏ (micronuclei), chứa toàn bộ genome trong 5 cặp chromosome dùng để di truyền cho thế hệ kế tiếp.
  - (2) nhân lớn (macronuclei), trong đó 5 cặp chromosome bị vỡ ra thành hơn 200 mảnh nhỏ hơn (minichromosome) được dùng để biểu hiện gene.
- Vì những minichromosome có telomere tại đầu cuối của nó nên tế bào *Tetrahymena* có nhiều telomere hơn ở tế bào người, và chúng được duy trì bởi telomerase.

24/03/2016 2:56:19 SA

73

Nguyễn Hữu Trí



## Telomerase

- Năm 1985, Carol Greider và Blackburn thành công trong việc thu nhận dịch chiết có hoạt tính telomerase từ tế bào *Tetrahymena* đang hình thành macronuclei.
- Năm 1987, Greider và Blackburn chứng minh rằng telomerase là một ribonucleoprotein với một RNA và các tiểu đơn vị protein.
- Năm 1989 họ thành công trong việc xác định cấu trúc của *Tetrahymena* telomerase và xác định RNA của nó mang trình tự CAACCCAA bổ sung với trình tự TTGGG trên telomere.

24/03/2016 2:56:19 SA

74

Nguyễn Hữu Trí





## Cấu trúc Telomerase

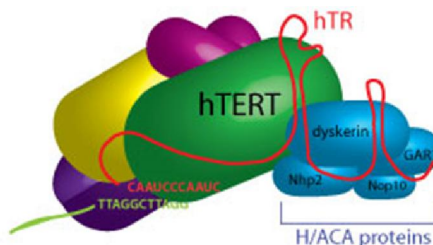
Telomerase là 1 phức hợp ribonucleoprotein đóng vai trò thêm những trình tự lặp lại telomere vào đầu 3' của NST, giúp kéo dài telomere

Telomerase gồm 2 thành phần chính (protein và RNA):

hTERT: là một human telomerase reverse transcriptase nên có thể tạo ra một DNA mạch đơn từ mạch khuôn RNA

Telomerase RNA (hTR or TERC): dùng làm mạch khuôn RNA cho hTERT tổng hợp mạch cDNA

H/ACA box : phức hợp các protein có vai trò hoạt hóa telomerase và ổn định các liên kết



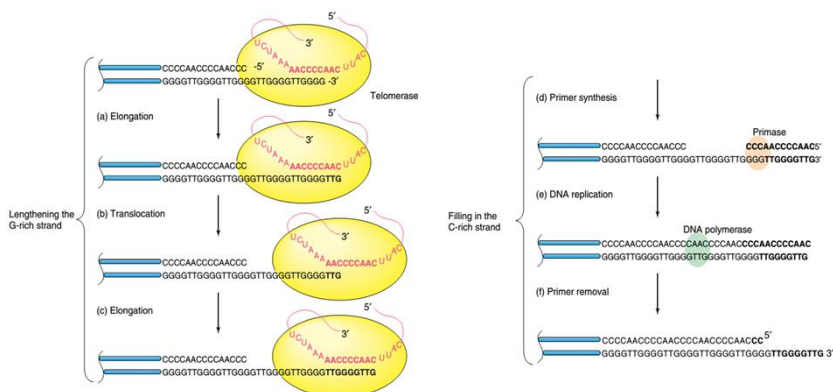
hTR: human telomerase RNA

H/ACA: family of 4 proteins essential for hTR accumulation

hTERT: human telomerase reverse transcriptase

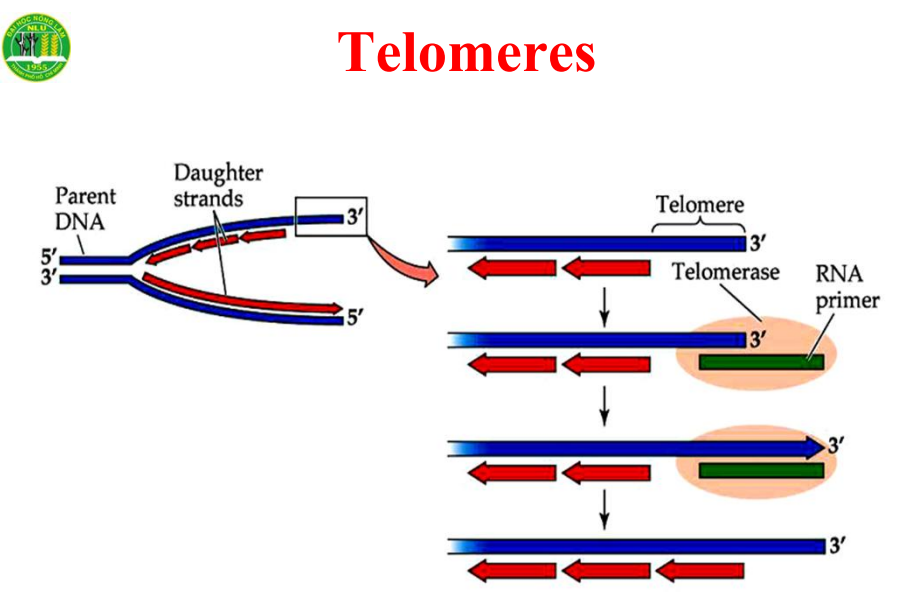


## Telomerase



Telomerase mang một đoạn ngắn RNA, bổ sung với 6 base lặp lại của telomere. Điều này cho phép nó nhận ra telomere để gắn vào. Sau khi telomerase được kéo dài ở đầu 3', mạch bổ sung sẽ được tổng hợp bởi một RNA priming theo sau bởi sự kéo dài bởi DNA polymerase and và nối bằng ligase. Các đoạn telomere lặp lại bảo vệ đầu cuối chromosome khỏi sự phân cắt bởi các exonuclease.






The diagram illustrates the process of telomere synthesis. It starts with a double-stranded DNA molecule where the parent DNA strands are blue and the newly synthesized daughter strands are red. The 3' ends of the daughter strands are shown being extended. This extension is achieved by the action of telomerase, an enzyme complex consisting of an RNA subunit (green) and a protein subunit (orange). The RNA subunit acts as an RNA primer, and the protein subunit catalyzes the addition of DNA nucleotides to the 3' end of the DNA strand. The process is shown in four stages: 1) The initial DNA structure with 3' overhangs. 2) Telomerase binding to the 3' end. 3) The RNA primer hybridizing with the 3' end. 4) The final DNA strand with a longer telomere region.

**Telomeres**

Parent DNA  
Daughter strands  
3'  
5'  
3'  
5'

Telomere  
3'  
Telomerase  
RNA primer  
3'  
3'  
3'

24/03/2016 2:56:19 SA 77 Nguyễn Hữu Trí



**Tính trung thực của quá trình sao chép**

- Sự trung thực trong sao chép cần thiết cho sự sống
- Bộ máy sao chép DNA đã thiết lập một hệ thống sửa sai (proofreading system)
  - Hệ thống này cần mỗi
  - Chỉ nucleotide bắt cặp bổ sung làm mỗi cho pol III hoàn chỉnh
  - Nếu một nucleotide sai thì quá trình sao chép ngừng lại cho đến khi hoạt tính 3'→5' exonuclease của enzyme pol III hoàn chỉnh loại bỏ nó

24/03/2016 2:56:19 SA 78 Nguyễn Hữu Trí



## TÍNH BIẾN ĐỘNG CỦA DNA

- ĐỘT BIẾN VÀ SỬA SAI
- GEN NHẢY
- TÁI TỔ HỢP

24/03/2016 2:56:19 SA

79

Nguyễn Hữu Trí



## CÁC KHÁI NIỆM VỀ ĐỘT BIẾN

- Đột biến là một tiến trình trong đó chuỗi trình tự của những cặp base của phân tử DNA bị thay đổi.
- Đột biến ở mức độ nhiễm sắc thể: là biến dị từ những điều kiện bình thường làm thay đổi số lượng nhiễm sắc thể, hoặc cấu trúc nhiễm sắc thể, gây ảnh hưởng đến giới tính, hoặc nhiều tính trạng khác.
- Đột biến ở mức độ phân tử là đột biến trong chuỗi trình tự của gen ở mức độ từng cặp base, còn được gọi là đột biến gen, hay đột biến điểm vì nó chỉ thay đổi ở một, hoặc một vài cặp base.
- Các loại hình đột biến điểm: đột biến chuyển vị, đột biến chuyển đổi, đột biến sai nghĩa, đột biến vô nghĩa, đột biến đồng nghĩa, đột biến chuyển dịch khung.


24/03/2016 2:56:19 SA

80

Nguyễn Hữu Trí







## Các loại đột biến điểm

**ATGCCCGAAGTG**  
**TACGGGCTTCAC**

**Đột biến chuyển vị**  
(transition mutation)  
purine → purine  
pyrimidine → pyrimidine

**Đột biến chuyển đổi**  
(transversion mutation)  
purine → pyrimidine  
pyrimidine → purine



**ATGCCCAAGTG**  
**TACGGGTTTCAC**

**ATGCCCTAAGTG**  
**TACGGGATTCAC**

**Purines: A và G**

**Pyrimidines: C và T**

24/03/2016 2:56:19 SA
81
Nguyễn Hữu Trí

## Các loại đột biến điểm

AAT DNA  
UUA mRNA  
Leu amino acid

CUA  
Leu

GUA  
Val

AUA  
Ile

UCA  
Ser

UUC  
Phe

UUG  
Leu


UUU  
Phe


UCA  
Ser

UGA  
**Stop**

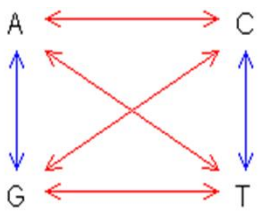
UAA  
**Stop**

24/03/2016 2:56:19 SA
82
Nguyễn Hữu Trí







(a)



(b)


Silent mutation	Missense mutation	Nonsense mutation
TGT → TGC	TGT → TGG	TGT → TGA
Cys → Cys	Cys → Trp	Cys → Stop

24/03/2016 2:56:19 SA 83 Nguyễn Hữu Trí 



## Đột biến và sự biểu hiện

- Đột biến là sự thay đổi trong vật liệu di truyền của tế bào
- Đột biến tự phát có thể xảy ra trong suốt quá trình sao chép của DNA, sự tái tổ hợp, hoặc sửa chữa
- Đột biến do các tác nhân vật lý hay hóa học có thể là nguyên nhân gây đột biến
- Đột biến điểm là sự thay đổi chỉ một cặp base của gene
- Đột biến điểm có thể gây ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của protein

24/03/2016 2:56:19 SA 84 Nguyễn Hữu Trí 



# Đột biến

- Đột biến sai nghĩa (đột biến làm sai dây gốc, missense mutation): là đột biến gen trong đó một cặp base thay đổi làm DNA tạo nên một codon mRNA có một amino acid không tương ứng chèn vào đại phân tử polypeptide.
- Đột biến đồng nghĩa (đột biến im lặng, silent mutation): sự thay đổi một cặp base của một gen nào đó làm thay đổi một codon của mRNA, tạo ra một codon mới nhưng amino acid không thay đổi.
- Đột biến vô nghĩa (đột biến kết thúc dịch mã, nonsense): là đột biến gen trong đó một cặp base thay đổi làm DNA tạo nên một codon mRNA là codon stop (UAG, UAA, UGA)

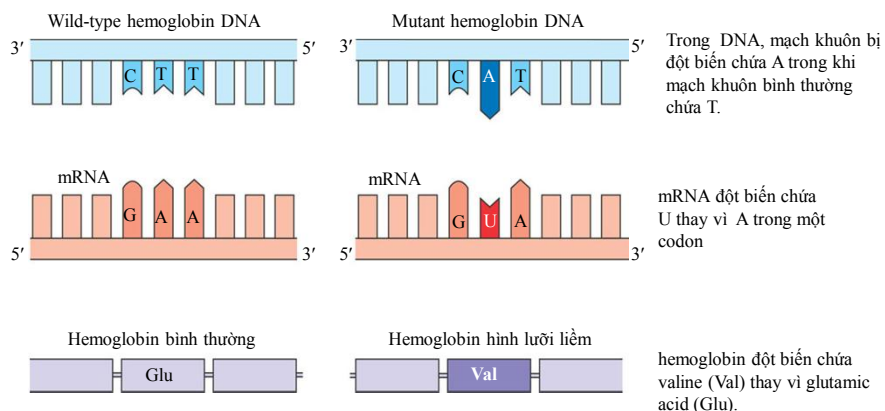
24/03/2016 2:56:19 SA

85

Nguyễn Hữu Trí



## Sự thay đổi chỉ một base của chuỗi làm khuôn dẫn tới việc tổng hợp một protein không bình thường




24/03/2016 2:56:19 SA

86

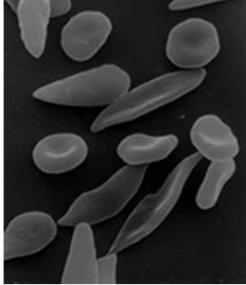

Nguyễn Hữu Trí







**Normal hemoglobin  $\beta$  chain**  
 Valine – Histidine – Leucine – Threonine – Proline – Glutamic acid – Glutamic acid

**Sickle cell anemia hemoglobin  $\beta$  chain**  
 Valine – Histidine – Leucine – Threonine – Proline – **Valine** – Glutamic acid





24/03/2016 2:56:19 SA 87 Nguyễn Hữu Trí 



## Các loại đột biến điểm

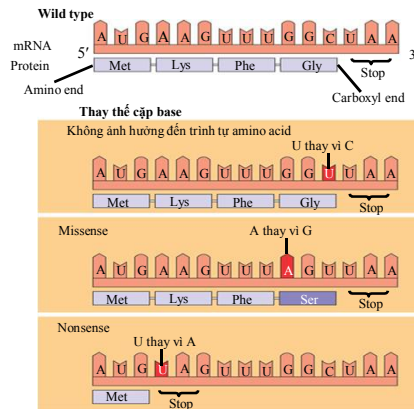
- Đột biến điểm xảy ra trong gene có thể chia thành hai loại chính
  - Thay thế cặp base
  - Chèn hoặc mất một cặp base

24/03/2016 2:56:19 SA 88 Nguyễn Hữu Trí 



# Thay thế base

- Là sự thay thế một base và nucleotide bắt cặp của nó bằng một cặp base khác
  - Có thể gây ra đột biến sai nghĩa (missense) hoặc đột biến vô nghĩa (nonsense)



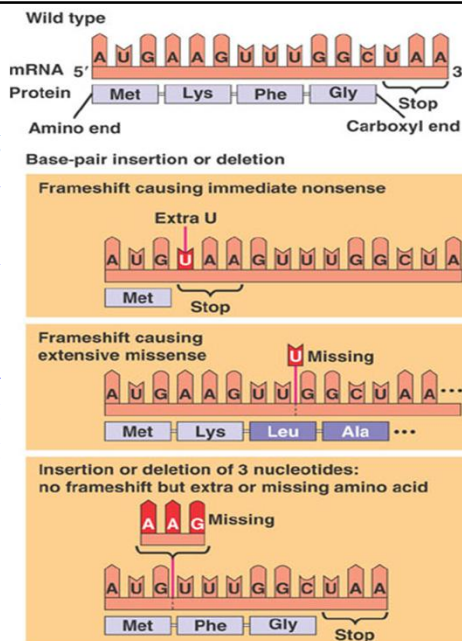
24/03/2016 2:56:19 SA

89

Nguyễn Hữu Trí



Đột biến chuyển dịch khung (frameshift mutation): nếu một hoặc nhiều cặp base được thêm vào hay mất đi trong một gen, khung đọc của mRNA có thể thay đổi vùng dưới (downstream) của khung đọc, tạo ra những amino acid không đúng trong chuỗi polypeptide.



24/03/2016 2:56:19 SA

90

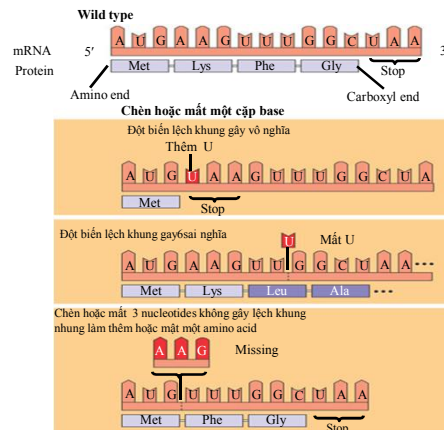
Nguyễn Hữu Trí





## Chèn base và mất base

- Việc thêm hoặc mất một cặp nucleotide trong gene in a gene có thể gây ra đột biến lệch khung (frameshift mutation).



24/03/2016 2:56:19 SA

91

Nguyễn Hữu Trí



## II. NGUYÊN NHÂN GÂY ĐỘT BIẾN

### 1. Đột biến tự phát sinh

- Đột biến trong quá trình sao chép
- Đột biến do những thay đổi hóa học một cách tự phát (đột biến do chuyển hóa)

### 2. Đột biến do kích thích

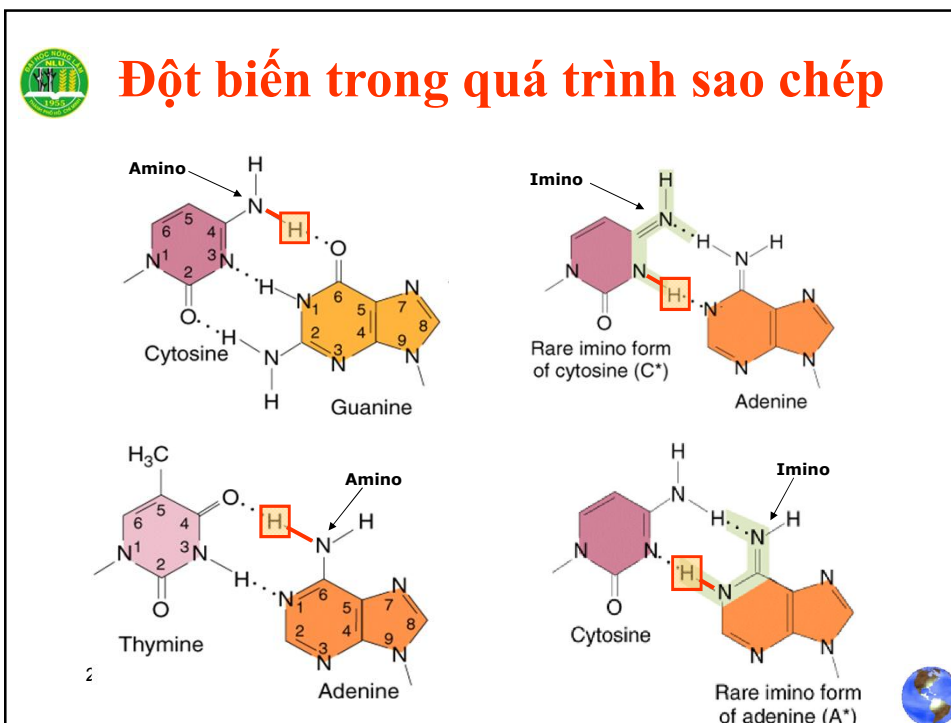
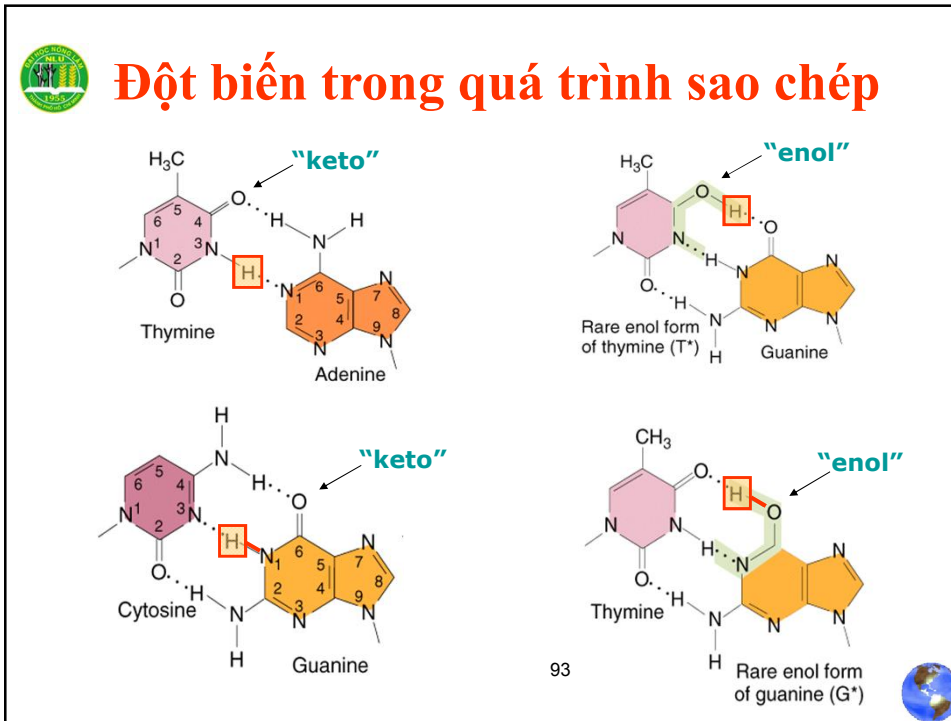
- Kích thích bằng phóng xạ
- Kích thích bằng hóa chất

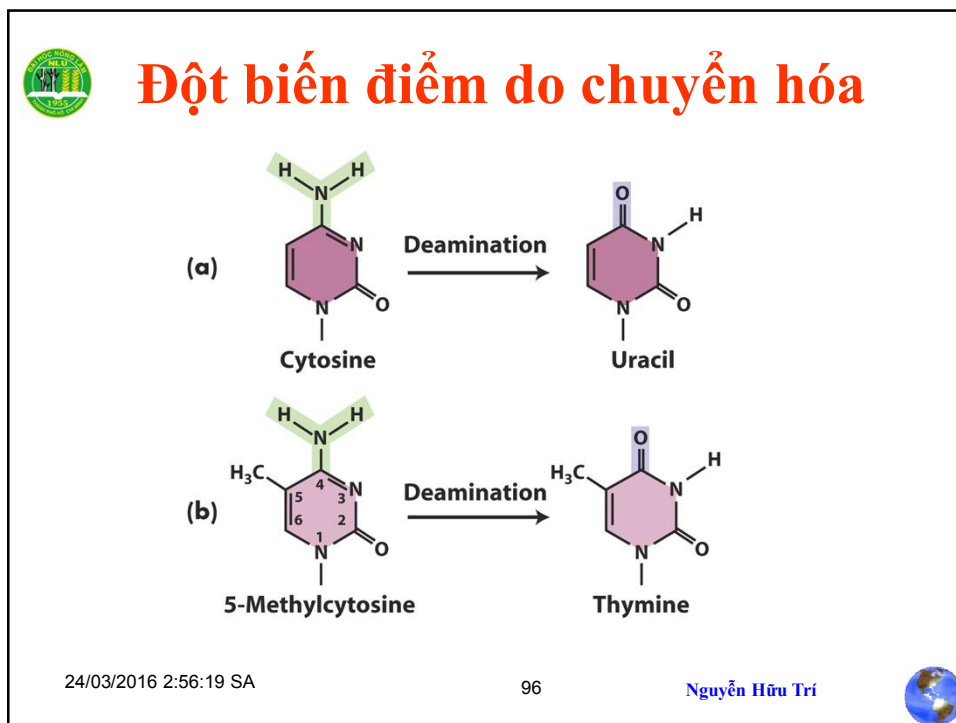
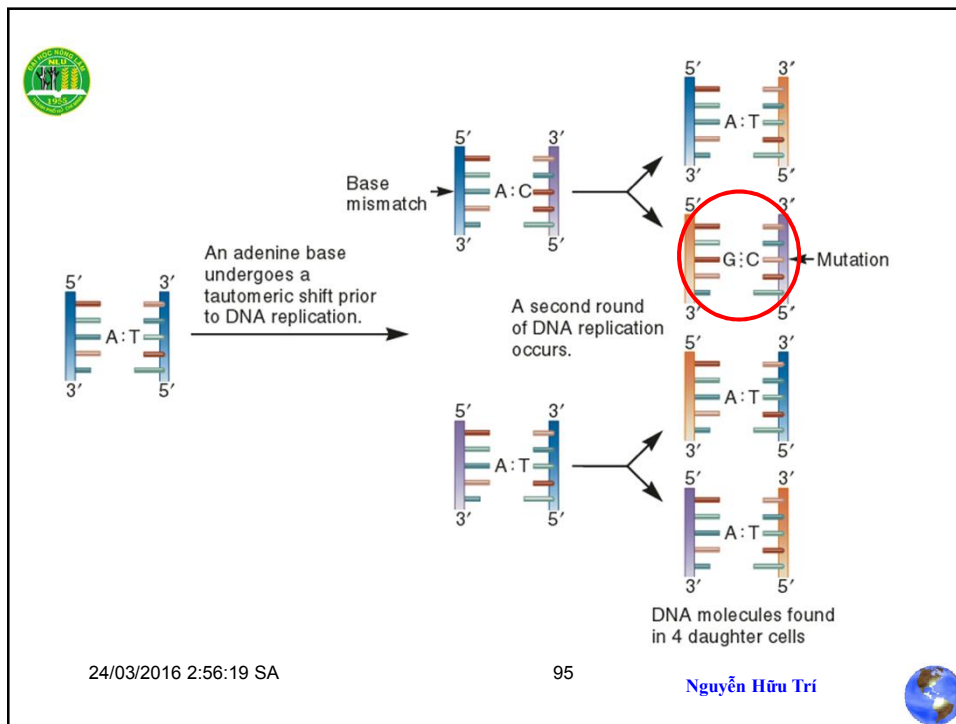
24/03/2016 2:56:19 SA

92


Nguyễn Hữu Trí



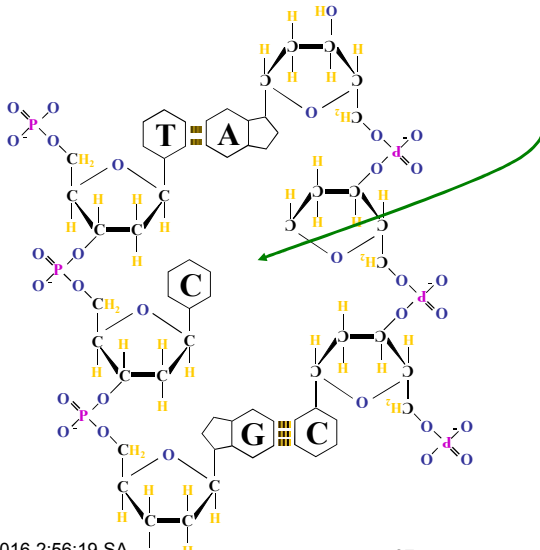






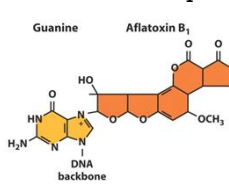


# Đột biến điểm do chuyển hóa



Sự phản purin hóa  
(depurination)

Aflatoxin B<sub>1</sub>





Guanine Aflatoxin B<sub>1</sub>  
DNA backbone

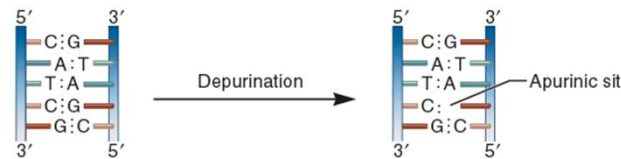
24/03/2016 2:56:19 SA

97

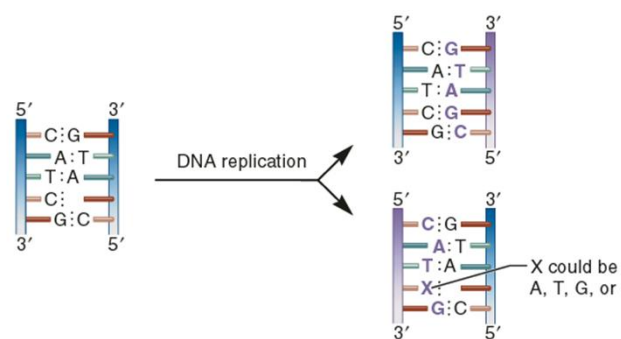
Nguyễn Hữu Trí







(a) Depurination




(b) Replication over an apurinic site

24/03/2016 2:56:19 SA

98

Nguyễn Hữu Trí





# Đột biến điểm do hóa chất

## 5-bromouracil:

- Trong trạng thái bình thường rất giống T, sẽ bắt cặp với A.
- Trong trạng thái hiếm, bắt cặp với G
- Gây ra đột biến AT thành GC

## 2-aminopurine:

- Có thể bắt cặp với C
- Gây ra đột biến AT thành GC

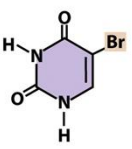
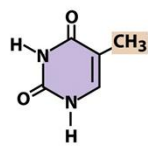
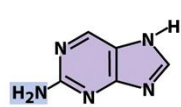
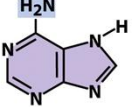
Analog	Substitutes for
 (a) 5-Bromouracil	 Thymine
 (b) 2-Aminopurine	 Adenine

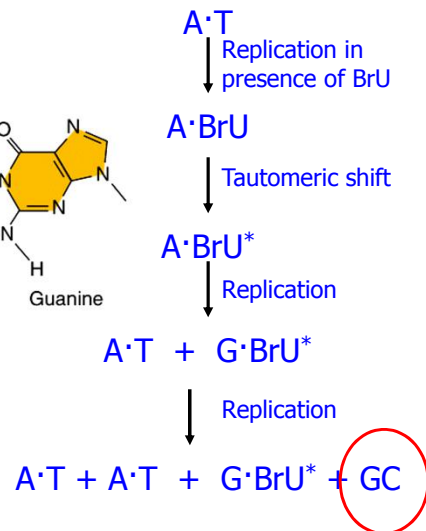
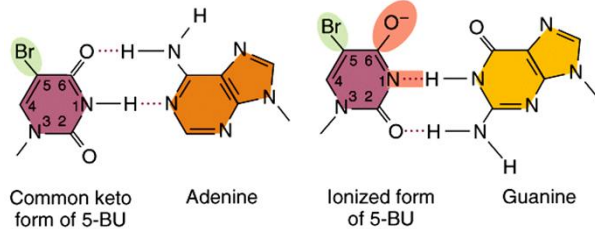
Figure 10-5 Brock Biology of Microorganisms 11/e © 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

## Những chất đồng phân gốc base (base analogs)

24/03/2016 2:56:19 SA

99

Nguyễn Hữu Trí



24/03/2016 2:56:19 SA

100

Nguyễn Hữu Trí



**Đột biến điểm do tia UV**

(a)

(b)

Tia UV cung cấp năng lượng hình thành 2 liên kết cộng hóa trị mới giữa 2 T kế cận, gây ra sự dimer hóa các thymine.

24/03/2016 2:56:19 SA 101 Nguyễn Hữu Trí

**CÁC CƠ CHẾ SỬA SAI**

1. CƠ CHẾ SỬA SAI TRONG QUÁ TRÌNH SAO CHÉP
2. CƠ CHẾ SỬA SAI NGOÀI QUÁ TRÌNH SAO CHÉP

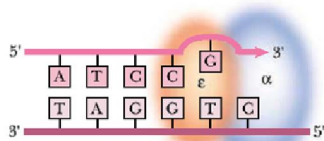
24/03/2016 2:56:19 SA 102 Nguyễn Hữu Trí



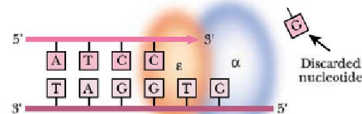
## Sửa sai nhờ DNA polymerase III (proofreading)

DNA polymerase sử dụng hoạt tính 3'-5' exonuclease để cắt các nucleotide tổng hợp sai trong quá trình sao chép.

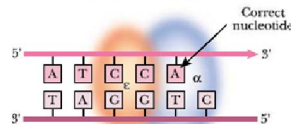
A)  $\epsilon$  SUBUNIT DETECTS MISMATCH DUE TO BULGE



B)  $\epsilon$  SUBUNIT CUTS OUT MISMATCHED BASE (G)



C) POLYMERASE GOES BACK,  $\alpha$  SUBUNIT REPAIRS MISMATCH



24/03/2016 2:56:19 SA

Nguyễn Hữu Trí



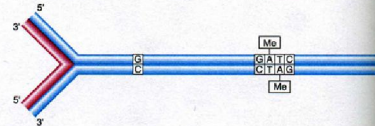
## CƠ CHẾ SỬA SAI NGAY SAU KHI SAO CHÉP

Mạch bố mẹ được methyl hóa. Một thời gian ngắn sau khi sao chép mạch con mới được methyl hóa. Do đó ngay sau khi sao chép mạch con không được methyl hóa.

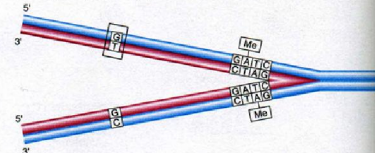
Đặc điểm này, khi hệ thống sửa sai của tế bào nhận biết được mạch nào sai và sửa sai mạch đó.

24/03/2016 2:56:19 SA

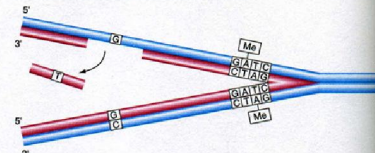
(a) Parental strands are marked with methyl groups.



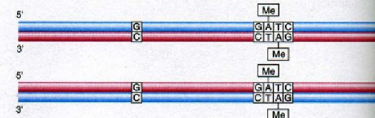
(b) Enzyme system recognizes mismatch in replicated DNA.



(c) DNA on unmarked new strand is excised.



(d) Repair and methylation of newly synthesized DNA strand.





## CƠ CHẾ SỬA SAI NGOÀI QUÁ TRÌNH SAO CHÉP

### ĐẢO NGƯỢC SAI HỒNG (DAMAGE REVERSAL) CẮT BỎ SAI HỒNG (BER,NER)

24/03/2016 2:56:19 SA

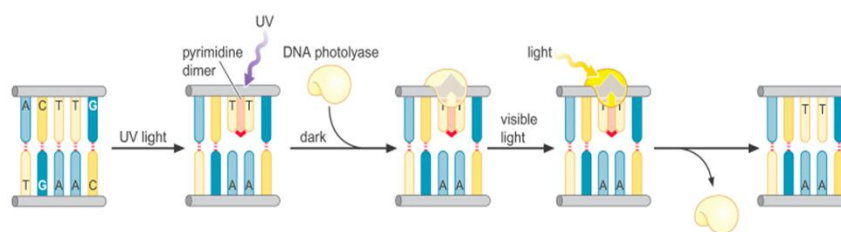
105

Nguyễn Hữu Trí



## CƠ CHẾ SỬA SAI NGOÀI QUÁ TRÌNH SAO CHÉP

### ĐẢO NGƯỢC SAI HỒNG



### Hiện tượng quang hoạt hóa

24/03/2016 2:56:19 SA

106

Nguyễn Hữu Trí



**CƠ CHẾ SỬA SAI NGOÀI QUÁ TRÌNH SAO CHÉP**

**ĐẢO NGƯỢC SAI HỒNG**

**Loại bỏ nhóm methyl**

24/03/2016 2:56:19 SA 107 Nguyễn Hữu Trí

**CƠ CHẾ SỬA SAI NGOÀI QUÁ TRÌNH SAO CHÉP**

**BER (BASE EXCISION REPAIR)**

- Glycosylase: nhận biết và cắt base sai hỏng
- AP endonuclease, exonuclease: Cắt phân tử đường của base sai hỏng

24/03/2016 2:56:19 SA

THE CELL, Fourth Edition, Figure 6.21 © 2004 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.



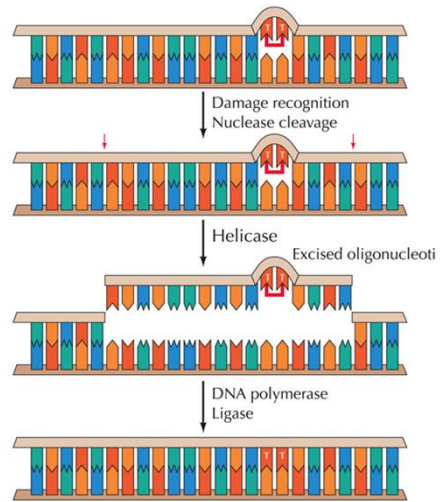
## CƠ CHẾ SỬA SAI NGOÀI QUÁ TRÌNH SAO CHÉP

### NER (NUCLEOTID EXCISION REPAIR)

**Nuclease: nhận biết và cắt ở 2 vị trí chuyên biệt:**

-Nu thứ 7 kể từ vị trí sai hỏng theo hướng 5'

-Nu thứ 4 kể từ vị trí sai hỏng theo hướng 3'



24/03/2016 2:56:19 SA

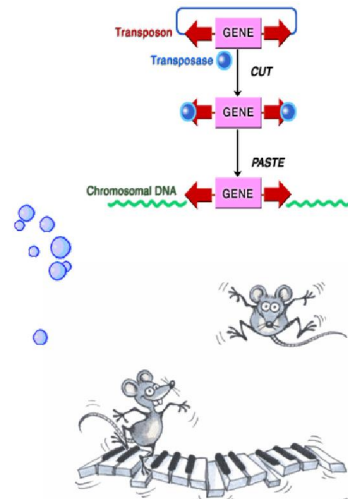
109

Nguyễn Hữu Trí

THE CELL, Fourth Edition, Figure 6.22



## Gene nhảy (Tranposon)



24/03/2016 2:56:19 SA

110

www.HelloCrazy.com

Nguyễn Hữu Trí





## Gene nhảy (Tranposon)

- Các gen nhảy là các trình tự DNA có khả năng gắn xen vào một vị trí mới trên bộ gen hay rời bỏ vị trí đó, làm biến đổi các hoạt động di truyền. Các gen nhảy còn được gọi là nhân tố chuyển vị (transposon).
- Các nhân tố chuyển vị được tìm thấy ở prokaryote và eukaryote.
- Ví dụ về gen nhảy ở bắp



24/03/2016 2:56:19 SA

111

Nguyễn Hữu Trí



## Các trình tự IS

- Các trình tự gắn xen IS (Insertion Sequence) được tìm thấy đầu tiên ở E. coli do tác động ức chế của chúng trong cơ chế kiểm soát sự biến dưỡng đường galactose.
- Khi nhân tố IS2 xen vào bên trong gen tương ứng, vi khuẩn mất khả năng lên men galactose. Khi nhân tố này rời khỏi gen, khả năng lên men galactose được tái lập.

24/03/2016 2:56:19 SA

112

Nguyễn Hữu Trí



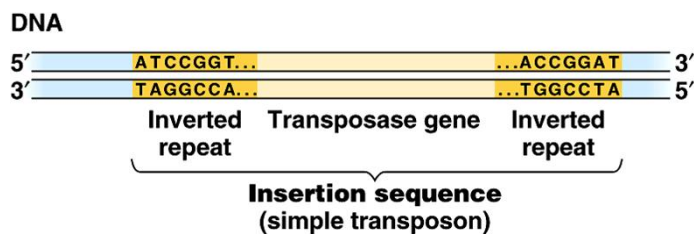




## Cấu trúc và cơ chế chuyển vị của IS

Các trình tự IS có kích thước nhỏ (khoảng 1kb), cấu trúc bao gồm:

- > Một trình tự trung tâm đặc trưng cho từng loại IS. Vùng này mã hóa cho transposase và một vài gen khác.
- > Ở hai đầu hai trình tự lặp đảo IR (Inverted repeat) là hai trình tự ngắn giống nhau nhưng có chiều ngược nhau.



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

24/03/2016 2:56:19 SA

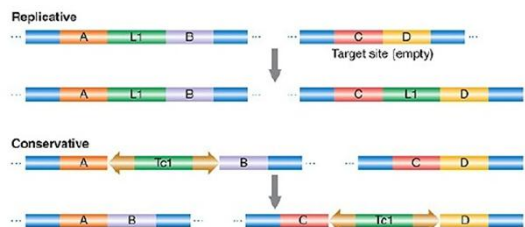
113

Nguyễn Hữu Trí



## Cơ chế chuyển vị của IS

- Dưới tác động của transposase, đoạn DNA nơi sẽ nhận đoạn gắn xen bị cắt đứt, hình thành nên các đầu so le, hay đầu dính (cohesive end).
- Sự chuyển vị gen có thể xảy ra theo hai khả năng:
  - > Transposon được nhân lên, bản cũ ở lại vị trí ban đầu, bản sao kia chuyển đến vị trí mới.
  - > Transposon được chuyển ngay đến vị trí nhận, vị trí cũ mất transposon.
- Ở hai đầu của nhân tố IS vẫn còn hồ, DNA polymerase và ligase sẽ làm nhiệm vụ lấp đầy chỗ trống.
- Sau khi gắn chèn, nhân tố IS hoàn toàn được dung hợp vào genome.



24/03/2016 2:56:19 SA

114

Nguyễn Hữu Trí





## Hai kiểu chuyển vị

- > **Chuyển vị nhân bản:** Transposon được nhân lên, bản cũ ở lại vị trí ban đầu, bản sao kia chuyển đến vị trí mới.
- > **Chuyển vị bảo tồn:** Transposon được chuyển ngay đến vị trí nhận, vị trí cũ mất transposon.

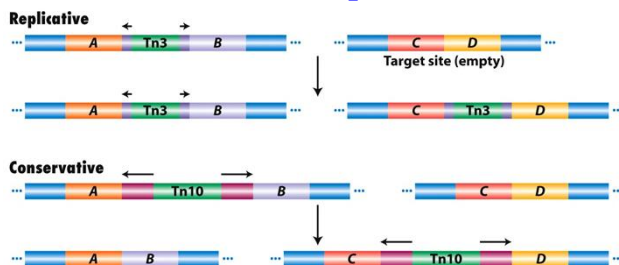


Figure 14-9  
Introduction to Genetic Analysis, Ninth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

24/03/2016 2:56:19 SA

115

Nguyễn Hữu Trí



## Transposon

- Các transposon (Tn) là các trình tự gen nhảy có kích thước lớn hơn các trình tự IS. Giống như nhân tố IS, transposon có chứa những gen chèn vào đoạn DNA trên nhiễm sắc thể.
- Transposon tương đối phức tạp hơn nhân tố IS, nó còn có những gen bổ sung.
- Có hai dạng transposon trong prokaryote: composite Tn và noncomposite Tn (transposon phức hợp và transposon đơn).

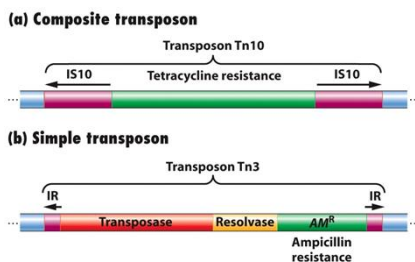


Figure 14-4  
Introduction to Genetic Analysis, Ninth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company


24/03/2016 2:56:19 SA

116

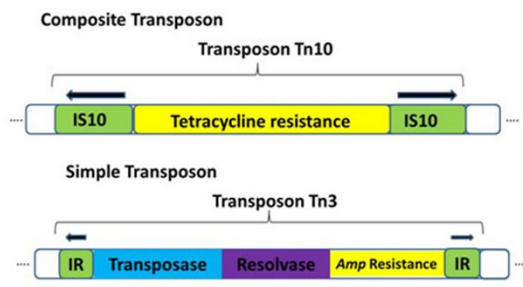
Nguyễn Hữu Trí



## Transposon phức hợp



 Là một phức hợp với vùng trung tâm có chứa những gen kháng thuốc kháng sinh, nằm kề bên với các nhân tố IS.

- Có độ dài vài ngàn bp.
- Nhân tố IS nằm bên trái được gọi là IS-L, và nhân tố IS nằm bên phải là IS-R. Tùy theo loại transposon mà IS-L và IS-R có thể cùng hướng, hoặc ngược hướng đối xứng nhau.
- Vì bản thân IS có IR (Inverted repeat), nên transposon cũng có IR ở hai đầu cần thiết cho sự chuyển vị.
- Tn 10 là một ví dụ về transposon phức hợp. Tn 10 có độ lớn phân tử 9.300bp, vùng trung tâm chiếm 6.500bp, chứa gen kháng tetracycline nằm giữa IS10L và IS10R. Mỗi nhân tố IS dài khoảng 1.400bp.




Composite Transposon  
Transposon Tn10

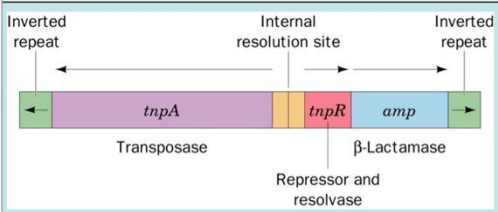
Simple Transposon  
Transposon Tn3

24/03/2016 2:56:19 SA 117 Nguyễn Hữu Trí 

## Transposon đơn




- Transposon đơn có chứa gen kháng kháng sinh, nhưng nó không kết thúc ở hai đầu với nhân tố IS, nhưng có những chuỗi trình tự lặp đảo IR cần thiết cho sự chuyển vị.
- Enzyme đóng vai trò quan trọng trong chuyển vị được mã hóa bởi các gen định vị trong vùng trung tâm của transposon.
- Tn3 là một ví dụ về transposon đơn.

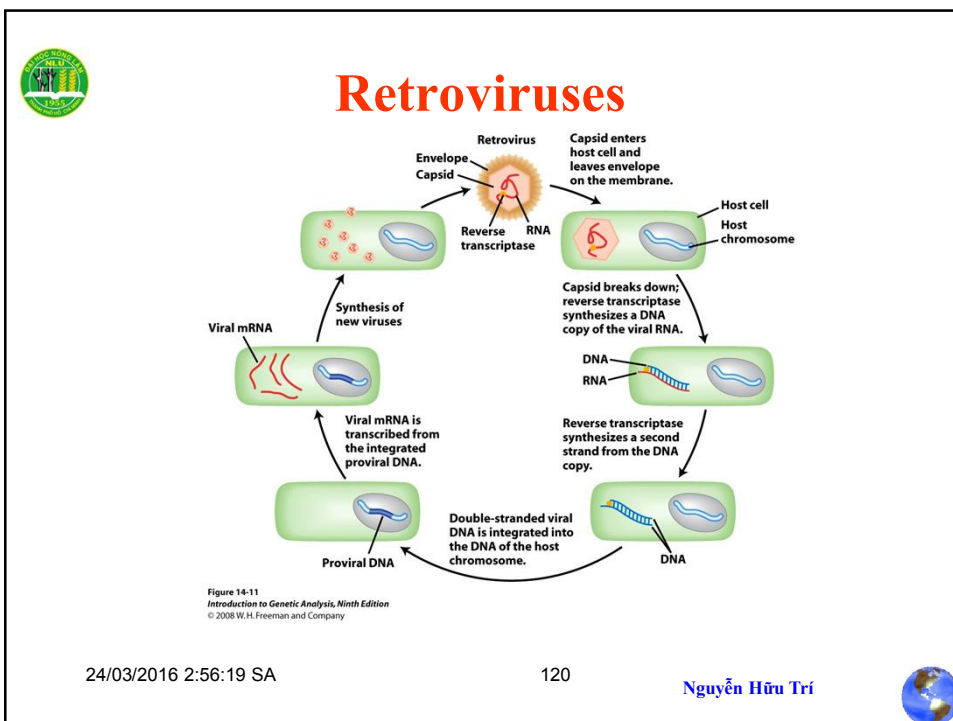
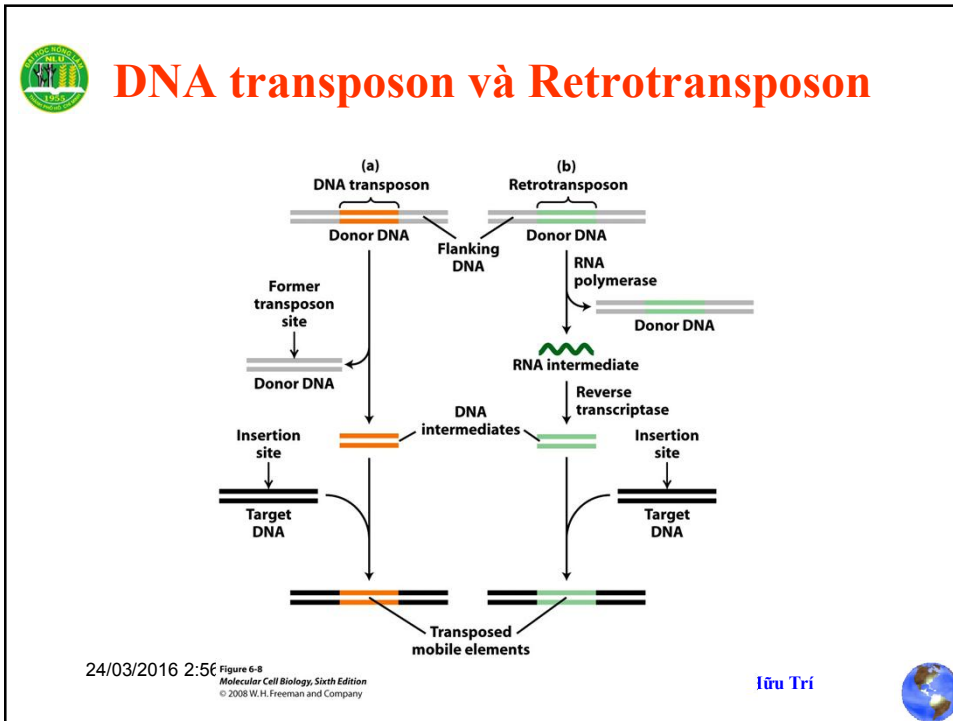



Inverted repeat      Internal resolution site      Inverted repeat

← tnpA →      tnpR      amp →

Transposase      Repressor and resolvase      β-Lactamase

24/03/2016 2:56:19 SA 118 Nguyễn Hữu Trí 





## Retrotransposon

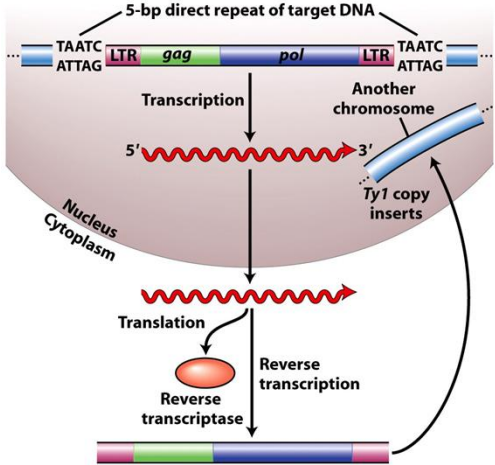





Figure 14-13  
Introduction to Genetic Analysis, Ninth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

24/03/2016 2:56:19 SA
121
Nguyễn Hữu Trí 



## TÁI TỔ HỢP TƯƠNG ĐỒNG (HOMOLOGOUS RECOMBINATION)

- Tái tổ hợp (recombination): là quá trình trong đó nhiễm sắc thể hay phân tử DNA đứt rã rồi các phân đứt được nối lại theo một tổ hợp mới. Quá trình này có thể xảy ra trong tế bào sống (ví dụ như qua sự trao đổi chéo trong phân bào giảm nhiễm) hay trong ống nghiệm nhờ các enzyme cắt và nối.
- Mô hình tái tổ hợp đơn giản và cổ điển nhất là mô hình Holiday. Mặc dù có những thiếu sót cần thêm thắt, sửa đổi, nhưng mô hình này đã minh họa tương đối rõ tiến trình tái tổ hợp. Về cơ bản được mô tả như sau :
  - Điều kiện xảy ra tái tổ hợp tương đồng: hai vùng DNA tái tổ hợp phải có trình tự tương đồng và một trong hai trình tự đó phải có điểm đứt (nick) trên một mạch.
  - Các protein RecB và RecC làm tháo xoắn và cắt đứt một trong hai mạch DNA. Phức hợp RecBC nhận biết một trình tự chi ( $\chi$ ) và cắt cách đó vài base.
  - Protein RecA gắn lên mạch DNA đứt tạo thuận lợi cho việc nhận biết trình tự tương đồng ở mạch kia và hình thành nên phân tử lai.

24/03/2016 2:56:19 SA
122
Nguyễn Hữu Trí 

### Mô hình Holiday

(d) A B 1 2 3 4 a b

Vertical cut (along line V) and reseat

Horizontal cut (along line H) and reseat

(f) 5' D E f 3' 3' D' e' f' 5' 3' d' e' F' 5' 5' d e F 3' Heteroduplexes and recombinants 123

(g) 5' D E F 3' 3' D' e' F' 5' 3' d' e' f' 5' 5' d e f 3' Heteroduplexes; No recombinants

24/03/2016 2:56:19 SA Nguyễn Hữu Trí

### Mô hình DSB (Double strand Break)

DSB

5' to 3' Resection

Strand Invasion

New DNA Synthesis

Strand Annealing

Products

No Crossing-Over Crossing-Over

- Điều kiện xảy ra tái tổ hợp tương đồng: hai vùng DNA tái tổ hợp phải có trình tự tương đồng và một trong hai phân tử DNA có điểm đứt (nick) trên hai mạch.
- Mô hình này phổ biến hơn mô hình Holiday và có vai trò quan trọng trong việc sửa chữa các đột biến đứt gãy mạch đôi.

24/03/2016 2:56:19 SA 124 Nguyễn Hữu Trí

## VAI TRÒ CỦA REC A TRONG TÁI TỔ HỢP TƯƠNG ĐỒNG

primary binding site

RecA filament

secondary binding site

cross-section of single DNA strand bound to RecA protein

DNA in secondary site is tested for complementarity

base-pairing between strands is switched

- Vị trí gắn sơ cấp: gắn với DNA mạch đơn
- Vị trí gắn thứ cấp: gắn với DNA mạch đôi.
- Để rà tìm vùng tương đồng trên mạch đôi, Rec A giữ mạch đơn ở vị trí sơ cấp, trượt đi, đến khi xuất hiện vùng tương đồng thì dừng lại, cắt liên kết H giữa hai mạch đôi; nối và hình thành liên kết H mới.

ATP

RecA protein

INPUT DNAs

OUTPUT DNAs

three-stranded structure

3' 5'

## Tái tổ hợp tương đồng trong giảm phân

diploid cell with one pair of homologous chromosomes shown

MEIOSIS

meiosis without gene conversion

region of gene conversion

meiosis with gene conversion

Fig 5-65, Molecular Biology of the Cell, 4<sup>th</sup> Ed. Alberts, B. et al.

24/03/2016 2:56:19 SA

126

Nguyễn Hữu Trí

