

7
E2
TRUNG TÂM KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA
NATIONAL CENTRE FOR NATURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY OF VIETNAM

ISSN 0866-7160

tạp chí
SINH HỌC

Journal of Biology

TẬP 24 - SỐ 3

THÁNG 9-2002

HÀ NỘI

CV 27

TẠP CHÍ
SINH HỌC

Tổng biên tập : ĐẶNG NGỌC THANH
Phó tổng biên tập : NGUYỄN TIẾN BÂN
LÊ XUÂN TÚ

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

NGUYỄN TÁC AN, ĐÁI DUY BAN, LÝ KIM BẢNG,
NGUYỄN TIẾN BÂN, ĐOÀN CẢNH, PHẠM THỊ TRÂN
CHÂU, VŨ QUANG CÔN, NGUYỄN LÂN DŨNG, NÔNG
VĂN HẢI, TRƯỜNG NAM HẢI, ĐẶNG HUY HUỲNH,
NGUYỄN ĐĂNG KHÔI, NGUYỄN THỊ LÊ, PHAN KẾ LỘC,
NGUYỄN TÀI LƯƠNG, LÊ THỊ MUỘI, HOÀNG ĐỨC NHUẬN,
NGUYỄN HỮU PHỤNG, TRẦN DUY QUÝ, NGÔ KẾ SƯƠNG,
ĐẶNG NGỌC THANH, DƯƠNG ĐỨC TIẾN, LÊ XUÂN TÚ,
NGUYỄN VĂN UYÊN

Thư ký tòa soạn : **Trần Thanh Nga**

CÔN TRÙNG KÝ SINH VÀ CÔN TRÙNG ĂN THỊT TRÊN CÂY TRỒNG Ở MỘT SỐ TỈNH PHÍA NAM VIỆT NAM

LÊ XUÂN HUÊ, LÊ KHƯƠNG THÚY, ĐẶNG ĐỨC KHƯƠNG

Viên Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Từ sau năm 1975 đến nay, nhiều tác giả đã điều tra nghiên cứu côn trùng ở một số tỉnh phía Nam, nhưng chủ yếu là về côn trùng có hại [10, 11, 12, 13], còn về côn trùng ký sinh và côn trùng ăn thịt ít được chú ý. Chúng chỉ được đề cập trong một số tài liệu của Phạm Văn Lâm [14]. Côn trùng ký sinh và côn trùng ăn thịt có vai trò quan trọng trong việc điều hoà số lượng côn trùng hại cây trồng cũng như cây rừng. Ngày nay, chúng được sử dụng trong biện pháp phòng trừ tổng hợp chống côn trùng hại [15]. Để góp phần nghiên cứu và sử dụng chúng, chúng tôi đã tiến hành điều tra một số nhóm côn trùng ký sinh và côn trùng ăn thịt ở một số tỉnh phía Nam nước ta.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Việc điều tra thu mẫu côn trùng được thực hiện ngay ở thực địa; xử lý mẫu vật, phân loại và so mẫu ở phòng thí nghiệm.

Địa điểm: Long An (Đức Huệ, Tân Thạnh, Mộc Hoá, Vĩnh Hưng), Đồng Tháp (Cao Lãnh, Tam Nông), Tiền Giang (Cai Lậy, Cái Bè, Tân Phước), Kiên Giang (Vĩnh Thuận, U Minh Thượng).

Trên các loại cây trồng: lúa, nhãn, xoài, chanh, khóm và trà.

Thời gian tiến hành: tháng 6, 10, 11 năm 2000 và sử dụng số liệu điều tra ở Long An, 1981 [7].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thành phần loài

Côn trùng ký sinh và côn trùng ăn thịt thường gặp và đã xác định được ở các địa điểm nghiên cứu gồm 6 bộ, trong đó bộ Cánh cứng (Coleoptera) có 5 họ (29 loài); bộ Cánh nửa (Hemiptera) có 3 họ (15 loài); bộ Cánh gân (Neuroptera) có 1 họ (1 loài), đây cũng là họ mới và loài mới cho khu hệ côn trùng nước ta; bộ bộ ngựa (Mantodea) có 2 họ (7 loài); bộ Chuồn chuồn (Odonata) có 2 họ (5 loài); bộ Cánh màng (Hymenoptera) có 8 họ (23 loài), là bộ có số lượng họ và loài nhiều nhất, chiếm hơn 36% số loài đã xác định được. Có 45 loài côn trùng ký sinh và côn trùng ăn thịt bổ sung cho khu vực nghiên cứu.

2. Côn trùng ký sinh và côn trùng ăn thịt

Ở đây, chúng tôi chỉ điều tra trên một số cây trồng như lúa, lạc, cam, chanh, nhãn và trà (phần lớn là rừng trồng).

Côn trùng ký sinh gồm các họ thuộc bộ Cánh màng (Hymenoptera): *Braconidae* (mỗi suu tầm định loại được 2 loài), *Ichneumonidae* (8 loài), là những loài ký sinh sâu và nhộng côn trùng hại cây trồng, *Eulophidae* (1 loài), *Trichogrammatidae* (1 loài), *Scelionidae* (11 loài), là những loài ký sinh trong trứng các loài sâu hại như sâu đục thân lúa, các loài bọ xít, châu chấu v.v... Nhiều loài ký sinh trong trứng của các loài sâu hại quan trọng như *Tetrastichus schoenobii*, *Trichogramma japonicum*, *Telenomus rowani* ký sinh trong trứng của sâu đục thân lúa bướm 2 chấm (*Scirpophaga*

incertulas).

Côn trùng ăn thịt: các loài bộ rùa (*Coccinellidae*) thường ăn các loài rệp, rầy. Các loài khác thuộc họ Carabidae, Staphylinidae, Cicindelidae, Brachinidae (bộ Cánh cứng Coleoptera) ăn các loài rầy, sâu cuốn lá, sâu đo, các loại bướm nhỏ trong sinh cảnh cây trồng. Các loài côn trùng ăn thịt thuộc bộ Cánh màng (Hymenoptera) gồm các họ Vespidae (4 loài), Formicidae (5 loài), Sphecidae (1 loài). Các loài bộ xít thuộc họ Nabidae, Lygaeidae, Reduviidae, chuồn chuồn, bộ ngựa, cánh gân thường săn mồi và bắt các loài sâu, các loài bướm nhỏ, cào cào, dế... trên đồng ruộng.

Có thể do việc phun thuốc trừ sâu hoá học và thuốc diệt cỏ một cách không khoa học, nên nhiều loài côn trùng ký sinh và côn trùng ăn thịt đã bị tiêu diệt. Vào những năm 1980-1981,

chúng tôi tìm thấy các loài ong ký sinh *Telenomus rowani*, *Trichogramma japonicum*, *Tetrastichus scho-enobii* ký sinh trong trứng bướm hai chấm đục thân lúa và một số loài ong khác của họ *Scelionidae* ở Long An [7], nhưng vào đợt điều tra vừa qua chúng tôi không tìm thấy chúng. Các loài bộ rùa thuộc họ *Coccinellidae* cũng rất khó tìm như *Micraspis discolor* là loài thường có số lượng cá thể phong phú, nay cũng ít gặp trên đồng ruộng Long An và các nơi khác. Các loài *Ophionea indica*, *O. ishiii* (Carabidae) hầu như không gặp ở Long An, Đồng Tháp, Kiên Giang. Số lượng cá thể của các loài ong cự (*Ichneumonidae*), ong kén trắng (*Braconidae*) rất hiếm, thỉnh thoảng mới vọt được ong. Các loài bộ xít ăn thịt thuộc giống *Sycanus* (Reduviidae) trước kia thường thấy trên đồng ruộng thì nay rất ít gặp.

Bảng 1

Thành phần loài côn trùng ăn thịt

TT	Tên loài	Địa điểm				Con mồi
		KG	LA	ĐT	TG	
1	2	3	4	5	6	7
Bộ Cánh cứng Coleoptera						
Họ Brachidae						
1	<i>Pheropsophus catores</i> Schmidt*	+				Nhiều loài sâu hại
2	<i>Ph. cognatus</i> *	+				-
3	<i>Ph. javanus</i> Dejean*	+				-
4	<i>Ph. jessoensis</i> Morawitz*	+				-
Họ Carabidae						
5	<i>Chlaenius bioculatus</i> Motsch.*	+				Các loài rầy và sâu hại khác
6	<i>Ch. circumdatus</i> Brulle*	+				-
7	<i>Ch. praefectus</i> Bates*	+				-
8	<i>Ch. virgutifer</i> Chaudoir*	+				-
9	<i>Ch. xanthopleurus</i> Chaudoir				+	-
10	<i>Clivina lobata</i> Bonelli*	+				Rầy và rệp

1	2	3	4	5	6	7
11	<i>Drypta japonica</i> Bates	+				Các loài rầy
12	<i>Eucolliuris fuscipennis fuscipennis</i> (Chaudoir)				+	Các loài rầy và sâu cuốn lá nhỏ
13	<i>Galeritulla orientalis</i> Schmidt- Goebel*	+				Các loài rầy
14	<i>Ophionea indica</i> (Thunberg)		+		+	Các loài rầy và sâu cuốn lá nhỏ
15	<i>O. ishiii</i> Habu		+		+	-
16	<i>Pardileus sinicus</i> Hope	+				Nhiều loài sâu hại
17	<i>Stenolphus smaragdulus</i> Fabr.*	+	+	+	+	-
18	<i>S. quinquepustulatus</i> (Wiedemann)*	+				-
19	<i>Tachys fasciatus</i> Motsch.*	+				-
Họ Hổ trùng Cicindelidae						
20	<i>Collyuris bonelli</i> Guerin**		+			Rầy và côn trùng khác
Họ Bọ rùa Coccinellidae						
21	<i>Coccinella transversal</i> Fabr.	+		+		Rệp và rầy
22	<i>Lemnia biplagiata</i> (Swartz)**	+				Các loài rệp
23	<i>Menochilus sexmaculatus</i> (Fabr.)	+	+		+	Các loài rệp, rầy
24	<i>Harmonia octomaculata</i> (Fabr.)		+		+	Các loài rầy
25	<i>Micraspis discolor</i> (Fabr.)	+	+	+	+	Rệp và rầy-
26	<i>M. vineta</i> (Gorham)				+	Các loài rầy
27	<i>Rodolia concolor</i> (Lewis)**	+				Rầy, sâu non
Họ Staphylinidae						
28	<i>Paederus fuscipes</i> Curtis*	+				Rệp
29	<i>P. tamulus</i> Erichson*	+				-
Bộ Cánh nửa Hemiptera						
Họ Nabidae						
30	<i>Lorichius umbonatus</i> Dist.*	+				Rầy và rệp
Họ Lygaeidae						
31	<i>Geocoris tricolor</i> Fabr.				+	Rầy
Họ Reduviidae						
32	<i>Cydnocoris gilvus</i> Burm.*		+	+		Sâu non

1	2	3	4	5	6	7
33	<i>Etrychotes crudelis</i> Fabr.				+	Sâu non
34	<i>Endochus cingalensis</i> Stal*	+				Sâu non
35	<i>E. merula</i> Dist.*	+				Sâu non
36	<i>Mendis nigripennis</i> Fabr.*	+				Sâu non
37	<i>Opistoplatys majusschulas</i> Dist.	+				Sâu non
38	<i>O. perakensis</i> Miller	+				Sâu non
39	<i>Pasiropsis notata</i> Dist.*	+				Sâu non
40	<i>Pirates affinis</i> Serville	+				Sâu non
41	<i>Polididus armatissimus</i> Stal*	+				Sâu non
42	<i>Sastrapada</i> sp.*	+				Sâu non
43	<i>Sinthena flavipes</i> (Stal)*	+				Sâu non
44	<i>Sycanus versicolor</i> Dohrn.	+			+	Sâu non
Bộ Cánh gân Neuroptera						
Họ Mantispidae						
45	<i>Climaciella quadrituberculata</i> (Westwood)**	+	+	+		Rầy
Bộ Bộ ngựa Mantodea						
Họ Bộ ngựa to Mantidae						
46	<i>Hierodula patellifera</i> (Serville)**	+				Sâu non, bướm
47	<i>Mantis regiliosa</i> Linnae	+	+	+	+	Sâu non, bướm
48	<i>Statilia nemoralis</i> (Saussure)**	+				Sâu non, bướm
49	<i>Tenodera angustupennis</i> Saussure**	+				Sâu non, bướm
50	<i>T. aridifolia</i> Stoll.**	+				Sâu non và côn trùng khác
Họ Bộ ngựa nhỏ Acromantidae						
51	<i>Acromantis australis</i> **	+	+			Sâu non
52	<i>A. japonica</i> Westwodd**	+				Sâu non
Bộ Chuồn chuồn Odonata						
Họ Chuồn chuồn kim Coenagrionidae						
53	<i>Agriocnemis femina</i> (Brauer)**	+	+	+	+	Bướm nhỏ
54	<i>A. pymaca</i> (Rambur)**	+	+	+	+	Bướm nhỏ

1	2	3	4	5	6	7
55	<i>Ceriagrion melanurum</i> Selys**	+	+	+	+	Bướm nhỏ
Họ Chuồn chuồn ngô Libellulidae						
56	<i>Orthetrum sabinum</i> Drury*	+	+	+	+	Bướm nhỏ và côn trùng khác
57	<i>Pantala flavescens</i> Fabr.*	+	+	+	+	nt
Bộ Cánh màng Hymenoptera						
Họ Tò vò Sphecidae						
58	<i>Sphex subtruncatus</i> Dohlbom**	+				Sâu
Họ Ong vàng Vespidae						
59	<i>Pareumenes quadrispinosus</i> (Liu)**	+				Sâu non và côn trùng khác
60	<i>Polites hebraeus</i> Fabr.	+	+	+	+	nt
61	<i>Vespa affinis</i> Linnae	+	+	+	+	nt
62	<i>V. nigrithorax</i> Buyson	+				nt
Họ Kiến Formicidae						
63	<i>Campodotus</i> sp.	+				Sâu non và côn trùng khác
64	<i>Oecophylla smaradina</i> Fabr.	+	+	+	+	nt
65	<i>Polyrachis latona</i> Wheeler	+	+	+	+	nt
66	<i>P. moesta</i> Emery	+	+	+	+	nt
67	<i>Tetramorium guineense</i> Fabr.	+	+	+	+	nt

Ghi chú: KG: Kiên Giang; LA: Long An; ĐT: Đồng Tháp; TG: Tiền Giang;

*: các loài phát hiện mới cho khu vực nghiên cứu; **: mới cho khu hệ côn trùng của Việt Nam.

Bảng 2

Thành phần loài côn trùng ký sinh

TT	Tên loài	Địa điểm				Pha ký sinh
		KG	LA	ĐT	TG	
Bộ Cánh màng Hymenoptera						
Họ Braconidae						
1	<i>Cotesia ruficrus</i> Haliday*	+	+	+	+	Sâu non

TT	Tên loài	Địa điểm				Pha ký sinh
		KG	LA	ĐT	TG	
2	<i>Cardiochiles philippines</i> Ashmead*	+	+	+	+	Sâu non
Họ Eulophidae						
3	<i>Tetrastichus schoenobii</i> Ferriere	+	+	+	+	Trứng
Họ Ong cự Ichneumonidae						
4	<i>Charops brachypterum</i> G - M.*	+				Sâu non
5	<i>Temelucha biguttula</i> (Munakata)*	+	+			Sâu non
6	<i>T. philippinensis</i> Ashmead				+	Sâu non
7	<i>T. stangli</i> (Ashmead)					Sâu non
8	<i>Xanthopimpla enderkini</i> Krieger				+	Nhộng
9	<i>X. flavolineata</i> Cameron	+	+	+	+	Nhộng
10	<i>X. flavo-orbitalis</i> Cameron				+	Sâu non
11	<i>X. punctata</i> Fabr.	+			+	Nhộng
Họ Ong ký sinh trứng - Scelionidae						
12	<i>Anteromorpha ancilla</i> Kozlov et Lê	+				Trứng
13	<i>Gryon cromion</i> Kozlov et Lê	+	+			Trứng
14	<i>Idris khandalus</i> Mukerjee		+			Trứng
15	<i>Idris oobius</i> Kozlov et Lê		+			nt
16	<i>Macroteleia dones</i> Kozlov et Lê		+			nt
17	<i>Probaryconus varinus</i> Kozlov et Lê		+			nt
18	<i>Psilanteris silanis</i> Kozlov et Lê		+			nt
19	<i>Scelio homona</i> Kozlov et Lê	+	+			nt
20	<i>Telenomus dignus</i> (Gahan)		+		+	nt
21	<i>T. subitus</i> Lê		+			nt
22	<i>T. rowani</i> (Gahan)		+		+	nt
Họ Ong mắt đỏ Trichogrammatidae						
23	<i>Trichogramma japonicum</i> Ashmead					Trứng

Ghi chú: như bảng 1.

III. KẾT LUẬN

1. Các côn trùng ký sinh và côn trùng ăn thịt được chúng tôi thu thập và xác định ở Long An, Đồng Tháp, Tiền Giang, Kiên Giang gồm 90 loài. Chúng thuộc 6 bộ: Cánh cứng (Coleoptera); Cánh màng (Hymenoptera); Cánh nửa (Hemiptera); Bộ ngựa (Mantodea); Cánh gân (Neuroptera); Chuồn chuồn (Odonata). Trong đó, bộ Cánh màng có số lượng loài nhiều nhất, chiếm hơn 36% số loài đã định tên được.

2. Số loài côn trùng ký sinh và côn trùng ăn thịt bổ sung cho khu vực nghiên cứu là 45 loài, trong đó có họ mới (*Mantispidae*) thuộc bộ Cánh gân (Neuroptera); 15 loài mới cho khu hệ côn trùng của Việt Nam.

3. Nhiều loài côn trùng ký sinh và côn trùng ăn thịt phổ biến, có ý nghĩa quan trọng trên đồng ruộng như *Telenomus rowani*, *Tetrastichus schoenobii*, *Trichogramma japonicum* (Hymenoptera) (ký sinh trong trứng *Scirpophaga incertulas*), *Ophionea indica*, *O. ishii* (Carabidae) ăn các loài rầy, sâu cuốn lá nhỏ, sâu do... hầu như không tìm thấy trên ruộng lúa ở khu vực nghiên cứu trong thời gian các tháng 6-10, 11, 12 năm 2000. Loài bọ rùa đỏ *Micraspis discolor* tìm thấy trên đồng ruộng nhưng có số lượng cá thể rất ít.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Habu A., 1967: Carabidae truncatipennes group (Insect: Coleoptera). Biogeographical Society of Japan: 338.
2. Distant W. L., 1901: The fauna of British India. Rhynchota Vol. I (Heteroptera). Lond. 331-42.
3. Distant W. L., 1907: The fauna of British India. Rhynchota Vol. I (Homoptera-Heteroptera). Lond. 466-487.
4. Distant W. L., 1901: The fauna of British India - Rhynchota Homoptera: appendise, Heteroptera: addenda, Lond. 151-173.
5. Đặng Đức Khương, 1985: Tạp chí Sinh học, 7(4): 18-20.
6. Đặng Đức Khương, 1986: Tạp chí Sinh học, 8(3): 43-47.
7. Lê Xuân Huệ, 2000: Động vật chí Việt Nam. Ong ký sinh trứng họ Scelionidae. 3, NXB KH&KT. Hà Nội.
8. Lê Khương Thúy, 2000: Tạp chí Sinh học, 22(1): 56-60.
9. Lê Khương Thúy, 2000: Tạp chí Sinh học 22(2): 52-58.
10. Lưu Tham Mưu, 1995: Côn trùng hại cây trồng thường thấy ở các huyện miền núi tỉnh Bình Thuận. Báo cáo khoa học. Viện Sinh thái TNSV (Tài liệu đánh máy).
11. Nguyễn Quý Hùng, 1997: Báo cáo tổng kết đề tài KN- DL. 94-98-008 (Tài liệu đánh máy).
12. Nguyễn Văn Cẩm, 1983: Một số kết quả điều tra côn trùng hại cây trồng nông nghiệp ở miền Nam Việt Nam. Tóm tắt luận án PTS Nông nghiệp, Hà Nội.
13. Nguyễn Văn Cẩm, Hà Minh Trung, 1980: Kết quả nghiên cứu khoa học kỹ thuật (1969-1979). NXB Nông nghiệp Hà Nội: 34-52.
14. Phạm Văn Lâm, 1997: Danh lục các loài sâu hại lúa và thiên địch của chúng ở Việt Nam. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
15. Trần Ngọc Lân, 2000: Thành phần loài thiên địch và hướng lợi dụng chúng trong việc hạn chế mật độ quần thể một số loài sâu hại lúa ở vùng đồng bằng tỉnh Nghệ An. Tóm tắt luận án TS Sinh học Hà Nội.

PARASITE INSECTS AND PREDATOR INSECTS ON CULTIVATED PLANTS IN SOME PROVINCES OF SOUTH VIETNAM

LE XUAN HUE, LE KHUONG THUY, DANG DUC KHUONG

SUMMARY

This paper lists 90 species of parasite and predator insects collected and defined in Longan, Dongthap, Tiengiang, Kiengiang provinces. They belong to 6 orders, (*Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Hemiptera*, *Mantodea*, *Neuroptera*, *Odonata*), in which *Hymenoptera* has the biggest number of species, occupied 36% of the classified species.

There are 45 species of parasite and predator insects adding to the insect species composition in these researched areas, of which there are 15 species adding to the entomofauna of Vietnam.

Many popular and significant parasite and predator insects on the rice field such as *Telenomus rowani*, *Tetrastichus schoenobii*, *Trichogramma japonicum*, *Ophionea indica*, *O. ishii* and *Micraspis discolor*, seem to be hardly found in these areas during June, October, November & December of 2000.

Ngày nhận bài: 22-5-2001

ĐA DẠNG SINH HỌC CỦA QUẦN XÃ TUYẾN TRÙNG Ở VÙNG BIỂN VEN BỜ MIỀN TRUNG VIỆT NAM

NGUYỄN VŨ THANH, NGUYỄN ĐÌNH TÚ

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

NGUYỄN XUÂN DỤC

Viện Cơ học

Trong biển, tuyến trùng thuộc ngành động vật đáy không xương sống cỡ trung bình. Ước tính trong thế giới đa bào, chúng chiếm 4/5 số lượng cá thể; trên 1m² trầm tích đáy, có hàng trăm ngàn đến hàng triệu con tuyến trùng sinh sống; chúng có mặt ở khắp mọi nơi trong đáy của biển cả và đại dương. Đây là nhóm động vật không xương sống hiện đang được sử dụng như các sinh vật chỉ thị trong sinh quan trắc và đánh giá hiện trạng ô nhiễm môi trường biển và nước ngọt ở nhiều nước trên thế giới.

Ở nước ta, công tác điều tra cơ bản khu hệ động vật đáy không xương sống ở các vùng biển ven bờ đã được tiến hành trong vài chục năm trở lại đây. Một số công trình nghiên cứu về giun nhiều tơ, nhuyễn thể, ốc và nhóm hai mảnh vỏ đã được công bố (Đỗ Công Thung, Phạm Đình Trọng, 1998 và Nguyễn Xuân Dục, 1998). Các nghiên cứu về đa dạng sinh học tuyến trùng và sử dụng chúng trong quá trình đánh giá hiện trạng môi trường ở nước ta cũng chỉ mới bắt đầu (Nguyễn Vũ Thanh, Đoàn Cảnh, 2000).

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu về thành phần loài tuyến trùng và mức độ đa dạng của chúng tại các điểm thu mẫu thuộc vùng biển ven bờ miền Trung Việt Nam.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Phương pháp thu và xử lý mẫu

a) Tiến hành khảo sát và thu mẫu tại 6 điểm: Sa Huỳnh, Thuận An, Dung Quất, Đà Nẵng, Ròn và Quy Nhơn thuộc vùng biển ven bờ miền Trung Việt Nam theo phương pháp thu mẫu

chuẩn về động vật không xương sống đáy cỡ trung bình của Warwick và Somerfield, 1996

b) Thiết bị thu mẫu tại hiện trường: dùng gầu Petersen thu trầm tích đáy với diện tích ngoạm bùn 0,025 m². Tại mỗi điểm nghiên cứu, trầm tích được lấy từ 5 đến 7 gầu ở các vị trí khác nhau và được trộn đều để đảm bảo tính ngẫu nhiên. Sau đó, lấy 250 cm³ trầm tích cho vào hộp và cố định bằng formalin nóng 10%.

c) Phương pháp tách lọc mẫu theo Cobb, 1918

Mẫu cho nước đến đủ 1 lít nước khuấy đều, cho qua rây có lỗ 0,5 mm tách lọc bớt đá, đất sét; những gì không qua được rây và nằm trên rây được rửa sạch và bỏ. Những gì đã qua rây 0,5 mm chuyển tiếp qua rây lọc 63 μm, sau khi đã gạn lọc kỹ 5-6 lần, sau đó ly tâm với dung dịch đường bão hòa (d = 1,13-1,15) trên máy T23 với thời gian 15 phút, v = 3000 vòng/phút

d) Phương pháp xử lý mẫu và lên tiêu bản

Mẫu được bảo quản trong dung dịch TAF, xử lý làm trong và lên tiêu bản cố định theo phương pháp Seinhorst (1959).

Tiêu bản được bảo quản và lưu giữ tại bộ mẫu thuộc Phòng Tuyến trùng học, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật.

2. Phương pháp thống kê độ đa dạng (sử dụng phần mềm PRIMER-5)

Phương pháp tính chỉ số đa dạng sinh học

Chỉ số đa dạng Shannon-Weaver (H')

$$H' = - \sum_{i=1}^n \frac{n_i}{N} \log_2 \frac{n_i}{N}$$

Trong đó:

n_i = Tổng số lượng cá thể của loài thứ i

N = Tổng số lượng cá thể trong một mẫu nghiên cứu

Chỉ số đa dạng Margalef (D_v):

$$D_v = \frac{S-1}{\log N} \quad \text{hoặc} \quad d = \frac{S}{\sqrt{N}}$$

Trong đó:

S = Tổng số loài

N = Tổng số cá thể trong một mẫu nghiên cứu

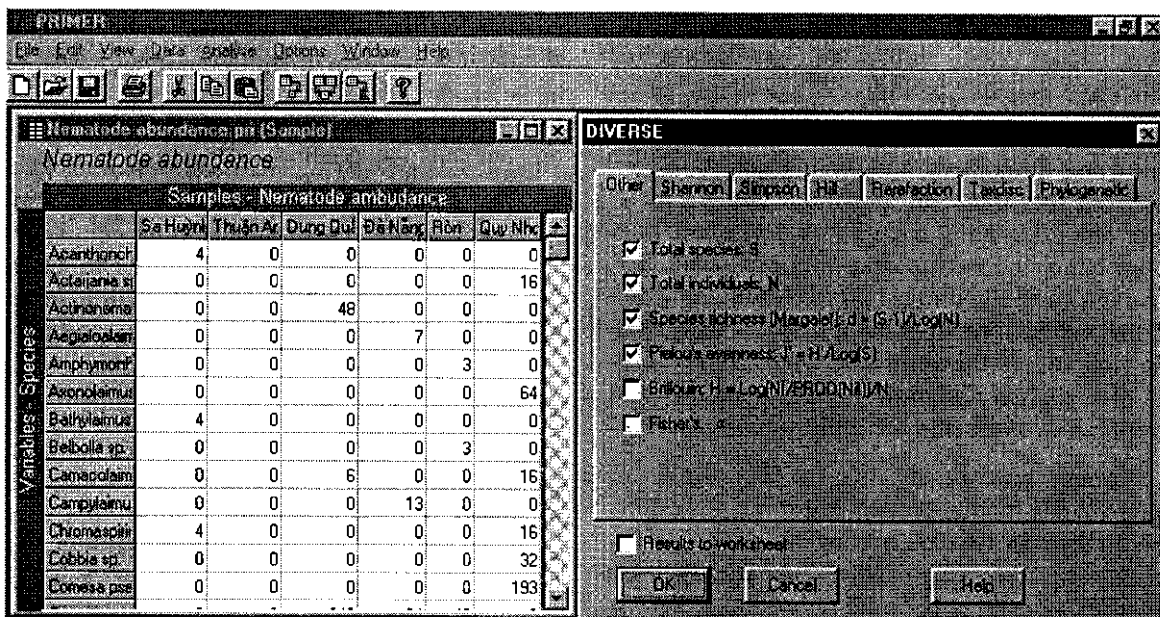
Chỉ số ưu thế Simpson, 1949:

$$C = \sum_{i=1}^n \left(\frac{n_i}{N} \right)^2$$

Trong đó:

n_i = Số lượng cá thể của loài thứ i

N = Tổng số lượng cá thể trong mẫu nghiên cứu



II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thành phần loài tuyến trùng ở vùng biển ven bờ miền Trung Việt Nam

a) Bộ ENOPLIDA Filipjev, 1929

Phân bộ Enoplina Chiwood & Chiwood 1937

Họ Thoracostomopsidae Filipjev, 1927

1. *Enoplolaimus* sp.

Họ Oxystominidae Chiwood, 1935 (Filipjev, 1918)

2. *Halalaimus* sp1.

3. *Halalaimus* sp2.

4. *Halalaimus* sp3.

5. *Litinium* sp.

6. *Oxystomina* sp.

7. *Thalassolaimus* sp.

Họ Oncholaimidae Filipjev, 1916

8. *Oncholaimellus* sp.

9. *Viscosia* sp.

Họ Enchelidiidae Filipjev, 1918

10. *Belbolla* sp.

11. *Polygastrophora* sp.

Phân bộ Tripyloidina de Coninck, 1965

Họ Tripyloididae Filipjev, 1918

12. *Bathylaimus* sp.

13. *Tripyloides* sp.

b) Bộ CHROMADORIDA Filipjev, 1929

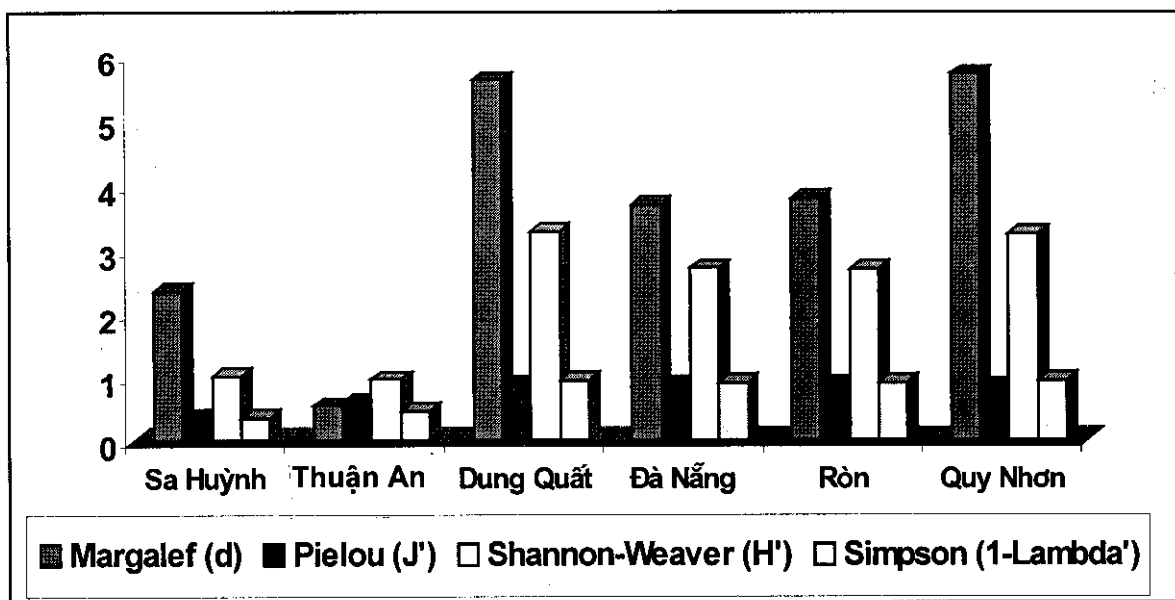
Phân bộ Chromadorina Filipjev, 1918

Họ Chromadoridae Filipjev, 1917

14. *Actinonema* sp.
 15. *Parapinnanema* sp.
 16. *Ptycholaimellus pandispiculatus* Hopper, 1961
 17. *Rhips* sp.
 18. *Spilophorella* sp.
 19. *Trochamus* sp.
- Họ Comesomatidae Filipjev, 1918
20. *Actarjania* sp.
 21. *Dorylaimopsis rabalaisi* Zhang, 1990
 22. *Dorylaimopsis turneri* Zhang, 1990
 23. *Dorylaimopsis* sp1.
 24. *Dorylaimopsis* sp2.
 25. *Dichromadora* sp.
 26. *Endeolophos* sp.
 27. *Hopperia* sp.
 28. *Paracomesoma siphon* Garlach, 1956
 29. *Paracomesoma* sp1.
 30. *Parachromadorita* sp.
 31. *Paramesonchium* sp.
 32. *Sabatieria* sp.
 33. *Setosabatieria* sp.
- Họ Ethmolaimidae Filipjev and Stekhoven, 1941
34. *Comesa pseudocoreandus* Vitiello, 1971
 35. *Comesa* sp.
 36. *Filitonchus* sp.
 37. *Gomphonchus* sp.
 38. *Neotonchus* sp1.
- Họ Cyatholaimidae Filipjev, 1918
39. *Acanthonchus* sp.
 40. *Pomponema* sp.
- Họ Selachinematidae Cobb, 1915
41. *Halichoanolaimus* sp1.
 42. *Halichoanolaimus* sp2.
 43. *Richtersia* sp.
- Họ Desmodoridae Filipjev, 1922
44. *Chromaspirina* sp.
 45. *Desmodora* sp1.
 46. *Desmodora* sp2.
 47. *Desmodorella* sp.
 48. *Metachromadora* sp.
 49. *Metachromadoroides* sp.
 50. *Molgolaimus* sp.
 51. *Neochromadora* sp.
 52. *Onyx dimorphus* Garlach, 1963
 53. *Onyx* sp1.
 54. *Pseudochromadora* sp.
- Họ Microlaimidae Micoletzky, 1922
55. *Microlaimus* sp.
- Phân bộ Leptolaimina Lorenzen, 1981
- Họ Leptolaimidae Örley, 1880
56. *Camacolaimus* sp.
 57. *Leptolaimus elegans* Stekhoven and De Conick, 1933
 58. *Leptolaimus* sp.
- Họ Aegialolaimidae Lorenzen, 1981
59. *Aegialolaimus* sp.
 60. *Southeria* sp.
- Họ Ceramonematidae Cobb, 1933
61. *Pterygonema ornatum* Timm, 1961
- Phân bộ Desmoscolecina Filipjev, 1934
- Họ Desmoscolecidae Shipley, 1896
62. *Desmocolex* sp.
 63. *Pareudesmocolex* sp.
 64. *Quadricoma* sp.
 65. *Tricoma* sp.
- c) Bộ MONHYSTERIDA Filipjev. 1929
- Họ Monhysteridae De Man, 1876
66. *Monhystera* sp.
 67. *Diplolaimella* sp.
- Họ Xyalidae Chitwood, 1951
68. *Amphymonhystera* sp.
 69. *Cobbia* sp.
 70. *Daptonema* sp1.
 71. *Daptonema* sp2.

72. *Elzalia* sp.
 73. *Linhystera* sp1.
 74. *Linhystera* sp2.
 75. *Paramonhystera* sp.
 76. *Promonhystera* sp.
 77. *Pseudosteineria* sp.
 78. *Retrotheristus* sp1.
 79. *Retrotheristus* sp2.
 80. *Rhynchonema wieseri* Hopper, 1961
 81. *Rhynchonema* sp1.
 82. *Theristus* sp1.
 83. *Theristus* sp2.
- Họ Sphaerolaimidae Filipjev, 1918
 84. *Sphaerolaimus* sp.
 85. *Metalinhomoeus* sp.
- Họ Siphonolaimidae Filipjev, 1918
 86. *Siphonolaimus* sp.
- Họ Linhomoeidae Filipjev, 1922
 87. *Eumorpholaimus* sp.
 88. *Paralinhomoeus* sp.
- Họ Axonolaimidae Filipjev, 1918
 89. *Axonolaimus* sp.
 90. *Odontophora* sp.
 91. *Parodontophora pacifica* Timm, 1963
 92. *Parodontophora paragranulifera* Timm, 1952
- Họ Diplopeltidae Filipjev, 1918
 93. *Campylaimus* sp.
 94. *Terschellingia longicaudata* De Man, 1907
 95. *Terschellingia* sp1.
 96. *Terschellingia* sp2.
- d) Các bộ khác
 Bộ Tyrenchida Thorne, 1949
 Họ Criconematidae Thorne, 1949
 97. *Discocriconemella limitanea* Luc, 1959
- Bộ Rhabditida Chitwood, 1933
 Họ Rhabditidae Örley, 1880
 98. *Rhabditis* sp.

2. Độ đa dạng của các quần xã tuyến trùng



Hình. Độ đa dạng của quần xã Tuyến trùng tại vùng biển ven bờ miền Trung Việt Nam

3. Nhận xét

Khu hệ tuyến trùng tại các điểm đã nghiên cứu ở vùng biển ven bờ miền Trung có thành phần loài tương đối phong phú, bao gồm 98 loài thuộc 79 giống, 25 họ của 5 bộ. Các bộ có số lượng loài tương đối lớn, với số lượng cá thể nhiều là bộ Chromadorida với 52 loài, chiếm 53,06% trong tổng số mẫu, bộ Monhysterida với 31 loài, chiếm 31,63% và Enoplida với 13 loài, chiếm 13,26%. Hai loài *Theristus* sp. và *Pseudochromadora* sp. có diện phân bố tương đối rộng, được phát hiện tại 5 trong 6 điểm đã thu mẫu: Thuận An, Dung Quất, Đà Nẵng, Ròn và Sa Huỳnh. Ba loài *Daptonema* sp., *Hopperia* sp. và *Oxystomina* sp. đã được phát hiện thấy tại 4 địa điểm: Đà Nẵng, Dung Quất, Quy Nhơn và Ròn. Đặc biệt, loài *Enoplolaimus* sp. có thể coi như là loài ưu thế tại điểm Thuận An vì chiếm tới 72,2 % tổng số lượng cá thể trong quần xã tuyến trùng. Loài *Discocriconemella limitanea* thuộc bộ Tylenchida được coi là loài vắng lai vì nó là tuyến trùng chuyên ký sinh trên rễ cây trồng, có cuộc sống chủ yếu ở trong rễ và phần đất quanh rễ cây trồng và cây rừng. Vì vậy, sự có mặt của nó trong nước biển là kết quả của quá trình rửa trôi theo nước mưa từ đất và trôi theo dòng sông ra biển ven bờ. Khu hệ tuyến trùng tại đây không những phong phú về thành phần loài mà còn có mật độ cá thể tương đối cao: trung bình trong 250 cm³ trầm tích đáy có 1114 cá thể, song số lượng cá thể từng loài riêng biệt không cao như ở một số loài: *Viscosia* sp., *Gomphionchus* sp., *Hopperia* sp., *Monhystera* sp., *Metalinhomoeus* sp., *Parodontophara paragranulifera*., *Monhystera* sp., *Microlaimus* sp., *Pterygonema ornatum*. và *Microlaimus* sp..

Trong tổng số 98 loài tuyến trùng được phát hiện, có 13 loài tuyến trùng ăn tạp, chiếm 13%, đây là những loài tuyến trùng chỉ thường hiện diện ở các vùng nước bắt đầu bị tác động; 84 loài không ăn tạp chiếm 84,69% tổng số quần xã, đây là những loài tuyến trùng thường bắt gặp trong các vùng nước ít bị tác động và còn tương đối sạch.

III. KẾT LUẬN

1. Qua các đợt nghiên cứu khảo sát tại 6

điểm ở vùng biển ven bờ thuộc miền Trung Việt Nam, đã phát hiện được 98 loài thuộc 79 giống, 25 họ của 5 bộ. Trong đó, có 3 bộ chính là: Enoplida; Monhysterida và Chromadorida. Các đại diện của Chromadorida bao gồm 52 loài, chiếm 53,06%; đại diện của Monhysterida bao gồm 31 loài, chiếm 31,63%; đại diện của Enoplida với 13 loài, chiếm 13,26%. Ngoài ra, còn bắt gặp 1 loài của bộ Tylenchida và 1 loài của bộ Rhabditida.

2. Tại bốn điểm là: Đà Nẵng, Ròn, Dung Quất và Quy Nhơn, chỉ số đa dạng (d) khá cao từ 3,79 (Ròn) đến 5,73 (Quy Nhơn). Ngược lại tại hai điểm Sa Huỳnh và Thuận An, nơi có đáy với trầm tích có thành phần cơ giới toàn cát thô, thì chỉ số đa dạng ở đây khá thấp d = 0.54 (Thuận An) và 2.34 (Sa Huỳnh)

3. Chỉ số ưu thế C thấp, từ 0,36 (Sa Huỳnh) đến 0,94 (Dung Quất), tại hầu hết các điểm nghiên cứu. Điều này chứng tỏ rằng sự phân bố quần xã Tuyến trùng tại khu hệ nghiên cứu là tương đối đồng đều.

4. Chỉ số Shannon-Weaver (H') tại các điểm nghiên cứu khá cao, đặc biệt là tại các điểm: Đà Nẵng, Ròn, Dung Quất và Quy Nhơn (H' = 2,7 đến 3,25).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Công Thung, 2000: Động vật đáy trong thềm cỏ biển từ Quảng Ninh đến Đà Nẵng. Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong sinh học, NXB ĐHQG, Hà Nội: 464-469.
2. Đoàn Cảnh, Nguyễn Vũ Thanh, 2000: Tạp chí Sinh học. 22(1): 6-9.
3. Gerlach S. A. and F. Riemann, 1973/1974: The Bremerhaven checklist of aquatic nematodes I & II.
4. Heip C., Herman R., M. Vincx, 1984: Rapp. P. Réun. Cons. perm. int. Explor. Mer.
5. Margalef D. R., 1958: General Systems, 3: 36-71.
6. Platt H. M. and R. M. Warwick, 1983: Free-living Marine Nematodes Part I.
7. Platt H. M. and R. M. Warwick, 1988: Free-living Marine Nematodes Part II.

8. Seinhorst J. W., 1959: Nematological. 1998: J. mar. Biol. Ass. UK., 78: 717-732.
9. Shannon C. J. and W. Weaver, 1949: The mathematical theory of communication. Urbana. Illinois University.
10. Simpson E. H., 1949: Nature, 163: 668.
11. Warwick R. M. and Somerfield P. J., 1996: The Meiobenthic method for assessment of marine water pollution. London, UK.
12. Somerfield P. J., Gee J. M., Aryuthaka C., 1998: J. mar. Biol. Ass. UK., 78: 717-732.
13. Vincx M., 1995: Ecology and population dynamics of free-living nematodes.
14. Warwick R. M., Platt H. M. and P. J. Somerfield, 1998: Free-living Marine Nematodes Part III.
15. Clarke K. R. and Warwick R. M., 1994: Change in marine communities. Plymouth Marine Laboratory, Natural Environmental Research Council, UK.

BIODIVERSITY OF THE MARINE NEMATODES IN THE COASTAL SEA AREA OF THE CENTRAL PART OF VIETNAM

NGUYEN VU THANH, NGUYEN DINH TU, NGUYEN XUAN DUC

SUMMARY

The free-living marine nematodes which live in the sediments of the 6 sites in the coastal sea areas of the Central part of Vietnam, are identified with 98 species of 79 genera, 25 families and 5 orders. Among them, 52 species belong to the order Chromadorida occupied 53.06%, 31 species to the order Monhysterida (31.63%) and 13 species to the order Enoplida (13.26%). There is only one species *Discocriconemella limitanea* of the order Tylenchida and one species *Rhabditis* sp. of the order Rhaditida. Two species: *Theristus* sp. and *Pseudochromadora* sp., are dominant in the Thuanan, Danang, Sahuynh, Dungquat and Ron sites.

The diversity index (Margleft index) of the meiofauna in the coastal sea areas of the Central part of Vietnam are estimated very high, they are from 3.79 (Ron station) to 5.73 (Quynhon station). They show that the environment in these areas are not disturbed yet.

Ngày nhận bài: 28-12-2000

MỘT SỐ CHI VÀ LOÀI RONG ĐỎ (RHODOPHYTA) MỚI CHO KHU HỆ RONG BIỂN VIỆT NAM PHÁT HIỆN ĐƯỢC TẠI QUẦN ĐẢO TRƯỜNG SA

ĐÀM ĐỨC TIẾN

Phân viện Hải dương học tại Hải Phòng

Vào các tháng 4, 5 của các năm 1994, 1995, 1996 và 1999, trong khuôn khổ của các đề tài: "Điều tra tổng hợp nguồn lợi sinh vật biển tại quần đảo Trường Sa" và "Điều tra thành phần loài rong biển làm thực phẩm cho bộ đội trên các đảo của quần đảo Trường Sa", trong dịp khảo sát tại các đảo Trường Sa Lớn, Nam Yết, Sơn Ca, Song Tử Tây, Thuyền Chài, Sinh Tồn, Phan Vinh và Tốc Tan (thuộc quần đảo Trường Sa), chúng tôi đã thu được một số mẫu rong biển, trong số đó có 3 chi và 3 loài là mới cho khu hệ rong biển Việt Nam. Trước đây, các chi và loài này đã được Đàm Đức Tiến, Nguyễn Văn Tiến và Phạm Hữu Trí thông báo nhưng không kèm theo mô tả [3, 4, 5, 6].

Tất cả mẫu của các chi này đều được thu tại vùng dưới triều với thiết bị lặn SCUBA. Hiện tại mẫu đang được lưu trữ tại Phòng Sinh thái và Tài nguyên sinh vật biển, Phân viện Hải dương học tại Hải Phòng.

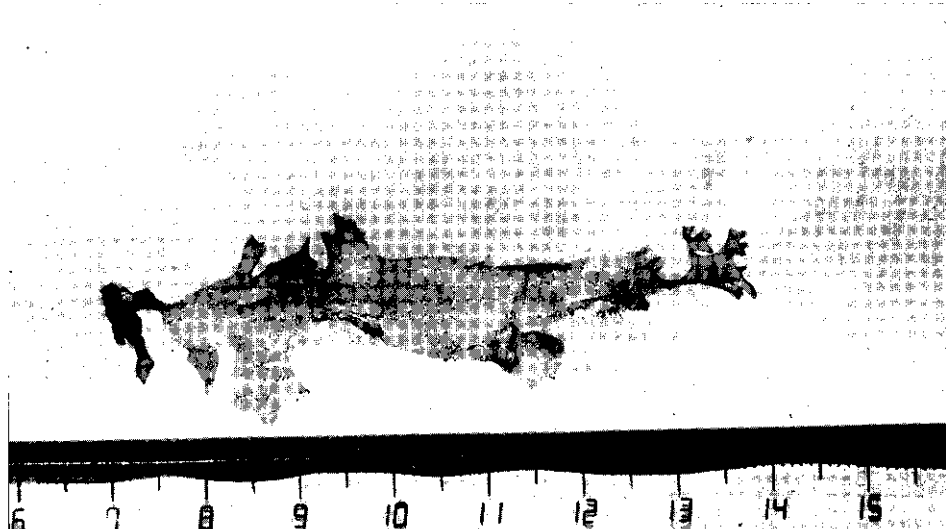
Sau đây là các chi và các loài rong biển mới cho khu hệ rong biển Việt Nam.

1. Chi *Meristotheca* J. Ag., Lunds Univ. Arsskr., Tom. 8, Lund, p. 36, 1872

Chi này nằm trong họ Solieriaceae J. Ag. 1876, bộ Gigartinales, lớp Florideophyceae. Được xếp gần chi *Kappaphycus* và *Eucheuma*.

Tàn dạng lá, xẻ thùy hay phân nhánh, có cấu tạo dạng mô xếp, vỏ mềm, phía trong là các tế bào rộng, phía ngoài là các tế bào nhỏ có mấu; túi bào tử với lớp mô mềm trung tâm bất thụ, được bao bọc bởi các chồi túi bào tử quả hoạt tính, hình thành nên các vòng xoắn và được chuyển hóa từ các bao sợi mô.

Loài *Meristotheca papulosa* (Montagne) J. Agardh, *Epicrasis* Sys. Floridearum, III, pl. 73, 1962. Xia, Xia and Zhang, in Tseng (ed.), *Comm. Sea. China*, p. 112, pl. 59, fig. 4, 1983; Kuang and Xia, *Studia Mar. Sin.* 1999 (ảnh 1).



Ảnh 1. Loài *Meristotheca papulosa* (Montagne) J. Agardh

Tên đồng nghĩa: *Callymenia papulosa* Montagne, in Ann. Sc. Nat. 3, Ser. 13, 246, 1849; *Euhymenia papulosa* Kuetz., Tab. Thyc., 17, Tab. 73, 1867; *Meritotheca japonica* (Mont.) Kylin, Lunds Univ. Arsskr, N. F. 2, 13d, 28, Nr8, p. 28, 1932. *Eucheuma tubulosa* Cotton et Yendo (Icon. V, p.123, 131, pl. 234, 235, figs 11-14).

Tân màu đỏ hay đỏ nhạt, dạng phiến, xẻ thùy hay phân nhánh, cao 20-30 cm. Rong bám vào vật bám bằng bàn bám dạng đĩa nhỏ. Phiến rộng đến 5cm, mép có các thùy nhỏ đầu tròn, bề mặt phẳng và nhẵn, đặc biệt tại các điểm có túi bào tử. Ở một vài chỗ, nơi hình thành các u lồi nhỏ, bề mặt thường sần xù. Tại nơi có túi bào tử bốn, bề mặt cũng thường sần xù hay có các gai nhỏ. Túi bào tử hình bán cầu, nhô cao lên khỏi hai mặt của phiến.

Tân lúc còn non thường mỏng, về sau thường dày lên. Rong dính chặt vào giấy lúc khô.

Mẫu vật số: 96145

Phân bố tại Việt Nam:

- Phân bố sâu: dưới triều.
- Chất đáy: phụ sinh trên các loài rong khác

hoặc trong các hốc san hô chết, nơi có cường độ ánh sáng thấp.

- Nơi tìm thấy: quần đảo Trường Sa.

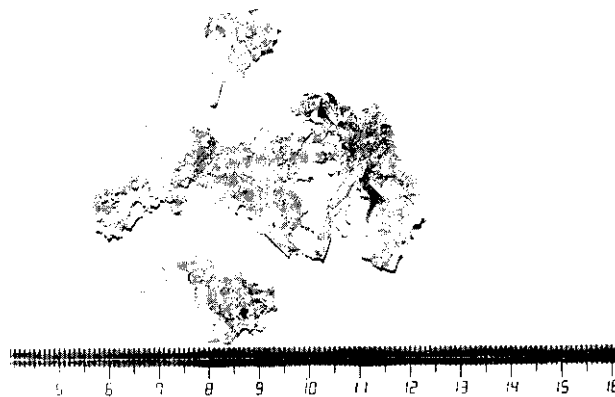
Phân bố trên thế giới: Ôxtrâyliá, Nhật Bản, Đài Loan, quần đảo Mã Lai, Polynésia, Biển Đỏ.

2. Chi *Haloplegma* Montagne, 1842: 258

Chi này nằm trong họ Ceramiaceae Dumort., bộ Rhodymeniales, lớp Florideophyceae. Được xếp gần chi *Spyridia*.

Tân cao 4-5 cm, màu đỏ vàng nhạt. Từ gốc phân chia thành các nhánh khác nhau với phiến, hình quạt, xẻ chạc hay xẻ thùy đều hoặc không. Bề mặt có cấu tạo dạng mạng lưới phức tạp gồm các lớp lưới, liên kết với nhau bằng các tế bào thuôn dài có mấu lồi. Phía ngoài, mỗi cạnh ô lưới có cấu tạo từ 1-4 tế bào hình vuông, chữ nhật, đôi khi tam giác hay đa giác. Tại các điểm tiếp giáp giữa các tế bào trên cạnh ô lưới, thường có một nhóm tế bào nhỏ. Bào tử bốn phân chia hình bốn mặt, hình thành đơn độc.

Loài *Haloplegma duperreyi* Montagne, 1842a: 258, pl. 7, f. 1. Mazé and Schramm 1870-77, Dickie 1874a; Piccone 1886; Murray 1889; Collins 1901; Vickies 1905; Howe 1915 (ảnh 2).



Ảnh 2. Loài *Haloplegma duperreyi* Montagne

Tên đồng nghĩa: *Haloplegma africanum* Kuetzing, 1862, p. 19, pl. 63, figs d-f; *Haloplegma preissii sensu* Weber-van Bosse, 1913, p. 136 (non soder)

Tân màu vàng nhạt đến vàng cam thẫm, cao

4-5 cm, bao gồm nhiều nhánh hình bản phát sinh tại các điểm có rễ giả, bản rộng 4-15 mm, hình quạt, xẻ chạc hay xẻ thùy, mép có răng cưa nhỏ. Mặt phiến cấu tạo bởi các sợi, hình thành nên dạng mạng lưới phức tạp gồm 5 lớp sợi liên

kết với nhau bằng các tế bào thuôn dài có mấu lồi. Các mắt lưới ở phía ngoài hình vuông hay gần vuông, đôi khi tam giác hay đa giác. Mỗi cạnh của ô lưới được cấu tạo bởi 1-4 tế bào, rộng 18-38 μ , dài 120 μ . Tại các chỗ tiếp giáp giữa hai tế bào, thường có một nhóm tế bào nhỏ dài 55 μ , rộng 7-15 μ , thường có chiều dài gần bằng chiều rộng, nằm ngay trên ô lưới hoặc nhô ra phía ngoài như các mấu nhỏ. Bào tử bốn phân chia thành hình bốn mặt, đường kính 48 μ .

Mẫu vật số 96166

Phân bố tại Việt Nam:

- Phân bố sâu: dưới triều
- Chất đáy: trên đá san hô hoặc san hô chết
- Nơi tìm thấy: cụm đảo Sinh Tồn

Phân bố trên thế giới: Nhật Bản, Đài Loan, Trung Quốc, Puerto Rico, Brazil, Jamaica,

Bahadot, Bahamasm.

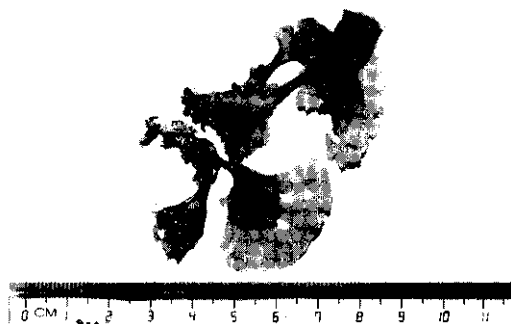
3. Chi *Martensia* Hering 1841

Chi này nằm trong họ Delesseriaceae Bory, bộ Rhodymeniales, lớp Florideophyceae.

Tân hình lá, xẻ thùy hay dạng đai, phân đốt nhiều, phân nhánh đều hoặc không, có cuống, bám vào vật bám bằng bàn bám dạng đĩa. Phần gốc có cuống, thường dày. Khi trưởng thành, phần mép ngoài có các tế bào với màng dày; bề mặt phiến thường có gân rõ rệt, đôi khi xen kẽ là các vùng có cấu tạo dạng rây. Trên mặt tán, thường có các vòng đồng tâm với màu sắc sặc sỡ.

Bào tử bốn hình thành trong ổ bào tử, túi bào tử thường nằm ngay trên mép của gân.

Loài *Martensia fragiliis* Harvey, 1854: 145. Yoshida & Mikami 1996a: 101. F. 1, 4-18 (ảnh 3).



Ảnh 3. Loài *Martensia fragiliis* Harvey

Tên đồng nghĩa: *Martensia denticulata* Harvey, 1854: 537; *Martensia elegans* sensu Okamura, 1909: 5. pl. 53, f. 1-9; 1916: 55; *Martensia australis* sensu Okamura, 1887: 99, pl. 12.

Tân dạng lá hình quạt, cao 4-5 cm, có một cuống ngắn 1 cm, bám vào vật bám bằng bàn bám dạng đĩa có xẻ thùy. Phần mép của mặt phiến được cấu tạo bởi nhiều hàng tế bào (10-15) có kích thước đều nhau, màng dày, hình vuông hoặc gần vuông, kích thước 50-100 μ ; phần trong là các tế bào sắp xếp theo hình ô lưới có kích thước và hình dạng không nhất định và các sợi gân chằng chịt. Trên phiến có một dãy tế

bào màu sắc sặc sỡ, xếp theo vòng đồng tâm. Bào tử bốn, phân cắt theo hình bốn mặt. Túi bào tử nằm ngay trên bề mặt của phiến, phần lớn ở vùng gần mép phiến.

Mẫu vật số 95139

Phân bố tại Việt Nam:

- Phân bố sâu: dưới triều
- Chất đáy: trên san hô chết hoặc đá san hô
- Nơi tìm thấy: các đảo Trường Sa Lớn, Nam Yết, Sơn Ca, Song Tử Tây và Thuyền Chài

Phân bố trên thế giới: Ôxtraylia, Indônêxia, Xri Lanca

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Hữu Dinh và cộng sự, 1993: Rong biển Việt Nam (phần phía Bắc), NXB KH&KT, Hà Nội, 364 tr.
2. Phạm Hoàng Hộ, 1969: Rong biển Việt Nam (phần phía Nam), Trung tâm học liệu Sài Gòn: 558 tr.
3. Đàm Đức Tiến, Nguyễn Văn Tiến, 1996: Thành phần loài và phân bố của rong biển đảo Trường Sa. Tài nguyên và Môi trường biển, III: 263-271, NXB KH&KT, Hà Nội.
4. Đàm Đức Tiến, 1999: Thành phần loài và phân bố của rong biển đảo Thuyền Chài. Hội nghị Khoa học công nghệ biển toàn quốc IV: 993-998, NXB KH&KT, Hà Nội.
5. Đàm Đức Tiến, 2000: Rong kinh tế quần đảo Trường Sa. Tài nguyên và Môi trường biển, VII: 235-247, NXB KH&KT, Hà Nội.
6. Phạm Hữu Trí, 1996: Góp phần nghiên cứu rong biển quần đảo Trường Sa (hai đảo Trường Sa Lớn và Nam Yết), "Tuyển tập nghiên cứu biển", tập VII: 147-162, NXB KH&KT, Hà Nội.
7. Okamura K. R., 1907-1942: Icones of Japanese Algae, V. 1-7, Tokyo, Japan: 258 p.
8. Tseng C. K., 1983: Common Seaweeds of China. Science press, Beijing, China: 316 p.
9. Xia Bangmei, Zhang Junfu, 1999: Flora Algarum Marinarum Sinicarum. Ahnfeltiales, Gigartinales, Rhodymeniales, II(V). 201p.
10. Yosshida T., 1998: Marine Algae of Japan, Tokyo, Japan. 1202 p.

SOME NEW RECORDS OF SEaweEDS (RHODOPHYTA) FOR THE MARINE ALGAL FLORA OF VIETNAM COLLECTED FROM THE TRUONGSA ARCHIPELAGO

DAM DUC TIEN

SUMMARY

The study of some species of seaweeds collected from the Truongsa archipelago, Vietnam (Big Truongsa, Namyet, Sonca, Songtutay, Thuyenchai, Sinh-ton, Phanvinh and Toctan islands) has recorded 3 new genera (*Meristotheca*, *Haloplegma*, *Martensia*) and 3 new species (*Meristotheca papulosa*, *Haloplegma duperreyi*, *Martensia fragiliis*) for the marine algal flora of Vietnam.

Ngày nhận bài: 20-5-2001

BỔ SUNG CHI *MERRILLANTHUS* CHUN & TSIANG (ASCLEPIADACEAE) CHO HỆ THỰC VẬT VIỆT NAM

TRẦN THẾ BÁCH

Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật

Trong các công trình nghiên cứu về họ Thiên lý ở Việt Nam [1, 3] và một số các tài liệu khác thì chi *Merrillanthus* Chun & Tsiang chưa được đề cập đến. Trong quá trình nghiên cứu mẫu của họ Thiên lý ở Phòng Tiêu bản thực vật thuộc Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật (HN), chúng tôi đã bổ sung 1 chi cho hệ thực vật Việt Nam là *Merrillanthus* Chun & Tsiang với loài *Merrillanthus hainanensis* Chun & Tsiang. Sau khi xây dựng khoá định loại các chi của họ Thiên lý có ở Việt Nam, chúng tôi thấy rất rõ chi *Merrillanthus* phân biệt với các chi khác của họ Thiên lý có ở Việt Nam bởi các đặc điểm như: dạng sống, cấu tạo của cơ quan truyền phấn, kích thước thủy tràng, trục cụm hoa, quả.

Sau đây là bản mô tả chi *Merrillanthus* và loài *Merrillanthus hainanensis* Chun & Tsiang.

***MERRILLANTHUS* Chun & Tsiang**

Chun & Tsiang, 1941. Sunyatsenia 6: 105; P. T. Li et al. 1995. Fl. China 16: 252; Endress et Bruyns, 2000. Bot. Rew. 66 (1): 50.

Cây leo. Lá mọc đối, cuống lá dài. Cụm hoa xim phân nhánh không đều, cuống cụm hoa dài, mập. Đài có 5 tuyến. Tràng hình cái bát nông, xẻ đến nửa tràng; thủy tràng phủ nhau phải, rộng 4 mm. Tràng phụ 5, dính trên cột nhị-nhụy, đứng, nạc, hình trứng, ngắn hơn bao phấn. Phấn phụ bao phấn mỏng, hình trứng, phủ lên đầu nhụy; hạt phấn tạo thành khối phấn và có sáp bao bên ngoài vách khối phấn, khối phấn không có mỏm ở đỉnh;

cơ quan truyền phấn có gót dính (retinaculum) và 2 chuỗi (caudicula); khối phấn 2 trong mỗi cơ quan truyền phấn, khối phấn hình thuôn, nằm ngang, chuỗi hướng xiên lên. Đỉnh bầu thót lại thành dạng vòi nhụy; đầu nhụy hình đĩa. Quả hình thoi, có vỏ dày. Hạt hình trứng.

Typus: Merrillanthus hainanensis Chun & Tsiang.

Theo Li P. T. et al. 1995, có 1 loài phân bố ở Campuchia, Trung Quốc và Việt Nam là *Merrillanthus hainanensis* Chun & Tsiang.

Merrillanthus hainanensis Chun & Tsiang, 1941. Sunyatsenia, 6: 105; P. T. Li et al. 1995. Fl. China, 16: 252.

Cây leo đến 3 m. Cuống lá 1,5-5 cm; phiến lá hình trứng 5-15 x 2-8 cm, gốc tròn hay hình tim, đỉnh nhọn; gân bên 6-7 cặp. Cụm hoa xim nhiều hoa; trục cụm hoa rất dày; cuống cụm hoa phân từ trục hoa dài 2-5 cm; cuống cụm hoa phân nhánh lần thứ 2 dài 3-10 cm. Cuống hoa 0,5-1,5 cm; đài hình trứng, 2 x 1,5 mm, có lông; tràng màu vàng, có sọc, ống tràng dài 3mm, thủy tràng hình trứng rộng, 4-5 x 3-4 mm. Quả dài 9-12 x 3,5-4 cm, có vỏ dày. Hạt hình trứng hay gần hình tròn, 1,3 x 1 cm, có mỏm dài 3,5 cm.

Sinh học và sinh thái: Trong rừng, ở độ cao trung bình.

Phân bố: Quảng Bình (Ba Rền). Còn có ở Campuchia và Trung Quốc.

Mẫu nghiên cứu: Quảng Bình (Ba Rền), VN 800 (HN).



Merrillanthus hainanensis Chun & Tsiang

1. Cành mang hoa; 2. Nụ hoa; 3. Hoa; 4. Đài với các tuyến; 5. Cột nhị-nhụy và tràng phụ;
6. Cơ quan truyền phấn; 7. Nhụy; 8. Quả; 9. Hạt (hình theo Tsiang et Li, 1977)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Costantin J., 1912: Asclépiadacées. In Lecomte, H: Fl. Gén. de l' Indo-Chine, 4(1): 1-154. Masson et Cie, Paris.
2. LI P. T. & Gilbert M. G. & Stevens W. D., 1995: Asclepiadaceae. In: Wu S. Y. et Raven P. H.: Fl. China, 16: 193-270. Science Press, Beijing, China et Missouri Botanical Garden, St. Louis, United States.
3. Phạm Hoàng Hộ, 2000: Cây cỏ Việt Nam. NXB Trẻ.
4. Tsiang et Li, 1977: Asclepiadaceae. In: Flora Reipublicae Popularis Sinicae, 63: 249-617. Pekin.

GENUS MERRILLANTHUS CHUN & TSIANG (ASCLEPIADACEAE) A NEW RECORD FOR THE FLORA OF VIETNAM

TRAN THE BACH

SUMMARY

Merrillanthus Chun & Tsiang is a new record for the Flora of Vietnam. *Merrillanthus* distinguishes with other genera in Asclepiadaceae by: habitus, structure of translator, size of corolla's lobe, axis of peduncle, fruit. *Merrillanthus* consists only one species *Merrillanthus hainanensis* Chun & Tsiang. In Vietnam, this species was found in Baren (Quangbinh province).

Ngày nhận bài: 26-2-2002

ÁP DỤNG HỆ THỐNG ĐIỂM BMWP ĐỂ ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG MÔI TRƯỜNG NƯỚC CỦA MỘT SỐ SÔNG SUỐI VÙNG HÀ NỘI, HÀ TÂY VÀ VĨNH PHÚC

LÊ THU HÀ, NGUYỄN XUÂN QUỲNH, MAI ĐÌNH YÊN

*Trường đại học Khoa học tự nhiên
Đại học Quốc gia Hà Nội*

Hiện nay, ở châu Âu, Bắc Mỹ, châu Úc và một số nước châu Á, người ta đã quan tâm đáng kể đến động vật không xương sống (ĐVKXS) cỡ lớn trong quá trình nghiên cứu diễn thế sinh thái của các thủy vực, sử dụng chúng như là sinh vật chỉ thị để đánh giá chất lượng nước, quản lý và bảo vệ môi trường (Mason, 1981; Metcalfe, 1989...).

Sử dụng động vật không xương sống (ĐVKXS) cỡ lớn để đánh giá chất lượng nước của các dòng chảy là một phương pháp quan trắc sinh học nhanh, có thể áp dụng trên một diện rộng với nhiều điểm quan trắc khác nhau (Mason, 1981; Croft, 1986; Fitter and Manuel, 1995 ...). Hệ thống điểm BMWP (Biological Monitoring Working Party) cho điểm các họ ĐVKXS cỡ lớn ở nước là phương pháp đã được sử dụng có hiệu quả trong các thủy vực ở các địa phương khác nhau và được xem như là một phương pháp chuẩn ở nhiều nước trên thế giới như Anh, Bỉ, Ấn Độ, Tại những nước này, sau một thời gian dài nghiên cứu, họ đã có danh sách thành phần các họ ĐVKXS cỡ lớn sử dụng làm sinh vật chỉ thị cho chất lượng môi trường nước. Hiện nay, ở Việt Nam đã có các nghiên cứu theo hướng này [5, 6, 10]. Đặc biệt, Nguyễn Xuân Quỳnh và cộng sự đã giới thiệu quy trình thu mẫu, phân tích mẫu và hệ thống điểm BMWP của Việt Nam. Tuy nhiên, số các nghiên cứu đó còn chưa nhiều. Nghiên cứu trong bài báo này nhằm mục đích:

Áp dụng phương pháp BMWP để đánh giá chất lượng nước của một số sông suối ở vùng Hà Nội, Hà Tây và Vĩnh Phúc.

Xác định thành phần các họ động vật có xương sống cỡ lớn của các điểm nghiên cứu.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Thời gian và địa điểm thu mẫu

Thu mẫu ĐVKXS được tiến hành trong 2 đợt, đợt 1 vào tháng 9 và đợt 2 vào tháng 12 năm 1999 tại 3 dòng chảy: suối Ao Vua (Ba Vì) mà nguồn gây ô nhiễm chính là các hoạt động du lịch; sông Cà Lồ, nguồn gây ô nhiễm chính là các hoạt động nông nghiệp ở hai bên bờ sông và nạn xói mòn; sông Nhuệ, nguồn gây ô nhiễm chính là nước thải sinh hoạt, nước thải công nghiệp, ... của Hà Nội và Hà Tây. Dọc theo mỗi dòng chảy, chọn 5 điểm thu mẫu.

2. Cách thu mẫu

Sử dụng vợt cào (lấy mẫu quét và đập nước) để lấy mẫu ở những điểm thu mẫu của dòng chảy nhỏ, nền suối, sông nông và ở nơi có thực vật thủy sinh. Thời gian thu mẫu tại mỗi điểm là 3 phút cộng với 1 phút tìm mẫu bằng tay. Mọi sinh cảnh ở điểm thu mẫu đều được lấy mẫu theo tỷ lệ phù hợp với diện tích của sinh cảnh đó.

Tại những điểm thu mẫu ở dòng chảy lớn hơn và sâu, có sự phối hợp sử dụng vợt cào thu mẫu ở vị trí gần bờ và lưới vét ở những chỗ nước sâu. Tại mỗi điểm thu mẫu, thực hiện 5 lần kéo lưới vét, trong đó 3 lần kéo lưới từ giữa dòng vào bờ và 2 lần kéo lưới song song với bờ.

Mẫu được cố định bằng cồn 95° ngay tại nơi thu mẫu, với lượng cồn cao gấp 2 lần mẫu.

3. Phân tích mẫu và số liệu

Định loại mẫu vật theo các tài liệu định loại đã được công bố trong nước và trên thế giới [2, 3, 8, 10, 11].

Sử dụng hệ thống điểm BMWP của Việt Nam cho điểm các họ chỉ thị ở từng điểm thu mẫu. Tổng số điểm thu được bằng cách cộng các điểm của từng họ có trong mẫu với nhau và tính điểm số trung bình trên taxon (ASPT - Average score per working party). Tính chỉ số ASPT như sau: $ASPT = \frac{\text{Tổng số điểm BMWP}}{\text{Tổng số họ tham gia tính điểm}}$.

Từ đó, đánh giá chất lượng môi trường nước. Mối liên quan giữa chỉ số ASPT với chất lượng môi trường nước được thể hiện ở bảng 1.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Thành phần các họ động vật không xương sống cỡ lớn

Kết quả khảo sát tại 3 dòng chảy: suối Ao Vua, sông Cà Lồ và sông Nhuệ, chúng tôi đã thu được đại diện của 57 họ thuộc 12 bộ của 2 ngành Chân khớp (Arthropoda) và ngành Thân mềm (Mollusca), 1 họ thuộc lớp Đỉa (Hirudinea) và một số đại diện của lớp Giun ít tơ (Oligochaeta) thuộc ngành Giun đốt (Annelida)

(bảng 2).

Bảng 1

Mối liên quan giữa chỉ số sinh học (ASPT) và chất lượng môi trường nước

Chỉ số sinh học (ASPT)	Chất lượng môi trường nước
Điểm 10-8	Nước rất sạch
Điểm 7,9-6	Nước khá sạch - nước sạch
Điểm 5,9-5	Nước bẩn ít - ô nhiễm nhẹ
Điểm 4,9-3	Nước bẩn vừa - ô nhiễm trung bình
Điểm 2,9 - 1	Nước rất bẩn - ô nhiễm nặng
Điểm 0	Nước cực kỳ bẩn - ô nhiễm rất nặng (không có sinh vật sinh sống)

Nguồn:

- Richard Orton, Anne Bebbington and John Bebbington, 1995
- Stephen Eric Mustow, 1997.

Bảng 2

Danh lục các họ ĐVKXS cỡ lớn có mặt tại các điểm nghiên cứu ở suối Ao Vua, sông Cà Lồ và sông Nhuệ

TT	Ngành, Lớp	Phân lớp, Bộ, Họ	Suối Ao Vua					Sông Cà Lô					Sông Nhuệ					V
			Đ1	Đ2	Đ3	Đ4	Đ5	Đ1	Đ2	Đ3	Đ4	Đ5	Đ1	Đ2	Đ3	Đ4	Đ5	
ARTHROPODA (Ngành Chân khớp)																		
Insecta (Lớp côn trùng)		Diptera (Bộ Hai cánh)																
1		Tipulidae				-	+	-			-			-				5
2		Chironomidae	+	-			+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
		Coleoptera (Bộ Cánh cứng)																
3		Psephenidae	-	-	+	-	+	-	+									5
4		Elminthidae		-		-	+											5
5		Hydrophilidae					+											5
6		Dytiscidae												-	-			5
7		Gyrinidae		+														5
8		Dryopidae					+											5

TT	Ngành, Lớp	Phân lớp, Bộ, Họ	Suối Ao Vua					Sông Cà Lồ					Sông Nhuệ					V
			Đ1	Đ2	Đ3	Đ4	Đ5	Đ1	Đ2	Đ3	Đ4	Đ5	Đ1	Đ2	Đ3	Đ4	Đ5	
9		Helodidae					-											5
		Ephemeroptera (Bộ Phù du)																
10		Heptagenidae	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -											10
11		Ephemeridae	+			+ -												10
12		Baetiidae	+ -		-	-	+ -						-		-			4
13		Leptophlebiidae	+ -		-	+ -	+ -											10
14		Ephemerellidae	-			+ -	-											10
15		Oligoneuriidae				-	-											10
16		Potamanthidae	-			-												10
17		Siphonuridae				-	+											4
18		Caenidae					-											7
		Hemiptera (Bộ Cánh nửa)																
19		Naucoridae				+											-	5
20		Belostomatidae															-	5
21		Pleidae	+ -	+ -	-	+ -	+											5
22		Corixidae						-	-	+ -			-		+ -	+ -	+ -	5
23		Mesoveliidae					+											5
24		Aphelocheiridae	-				-											10
25		Notonectidae	-								-		-	-		-		5
		Odonata (Bộ Chuồn chuồn)																
26		Gomphidae	-	-			-		+				+ -	+			+	6
27		Amphipterygidae	+				-											10
28		Cordulegastridae		+			-											6
29		Coenagrionidae			-		+		+				-	-	-			4
30		Aeshnidae		+			+ -											6
31		Libellulidae													+			4
32		Protoneuridae					+								-		-	3
33		Lestidae			+													6
		Plecoptera (Bộ Cánh úp)																
34		Perlidae	-				+											10

TT	Ngành, Lớp	Phân lớp, Bộ, Họ	Suối Ao Vua					Sông Cà Lồ					Sông Nhuệ					V
			Đ1	Đ2	Đ3	Đ4	Đ5	Đ1	Đ2	Đ3	Đ4	Đ5	Đ1	Đ2	Đ3	Đ4	Đ5	
		Trichoptera (Bộ Cánh lông)																
35		Hydropsychidae				+	+-											5
36		Philopotamidae					-											8
37		Leptoceridae		+	-		+-											10
38		Phryganeidae	+															10
39		Odontoceridae			-		+											10
40		Psychomyiidae					-											8
Crustacea (Lớp Giáp xác)		Deapoda (Bộ Mười chân)																
41		Atyiidae	+-	+-	+-	+-	-	+-	+	+		+						3
42		Palaemonidae	+-	+-				+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	3
43		Parathelphusidae								+	+				-	+	+-	3
44		Potamidae	+				+-											8
MOLLUSCA (Ngành Thân mềm)																		
Gastropoda (Lớp Chân bụng)		Pulmonata (Phân lớp Có phổi)																
45		Planorbidae			+-													3
		Prosobranchia (Phân lớp Mang trước)																
46		Thiaridae	+	+	+	+	-	+	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	+-	3
47		Viviparidae						+-	+-	+-	+-	-	+-	+-				4
48		Littorinidae						+-	+-	+	+-	+-	-		-	-	-	3
49		Bithyniidae											+	+	+	+	+	3
50		Pachychilidae									+	-						
51		Stenothyridae						+-	-	-	-	-						
Bivalvia (Lớp Hai mảnh vỏ)		Eulamellibranchia (Bộ Mang tấm)																
		Phân bộ Heterodonta																
52		Corbiculidae						+-	+-	+	+-	-				+-	+-	3
		Phân bộ Schizodonta																
53		Mytilidae									-							5

TT	Ngành, Lớp	Phân lớp, Bộ, Họ	Suối Ao Vua					Sông Cà Lồ					Sông Nhuệ					V
			Đ1	Đ2	Đ3	Đ4	Đ5	Đ1	Đ2	Đ3	Đ4	Đ5	Đ1	Đ2	Đ3	Đ4	Đ5	
54		Amblemidae									+	-						4
55		Unionidae						-	+	-	+	-	-			+	-	4
ANNELIDA (Ngành Giun đốt)																		
Hirudinea (Lớp Đũa)																		3
56		Hirudinidae				-										-		
Oligochaeta (Lớp Giun ít tơ)																		1
57								-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
		Tổng số họ	+	12	9	6	10	20	6	10	13	9	4	6	6	7	9	10
			-	15	7	8	16	21	9	10	8	9	9	13	8	11	10	11

Ghi chú:

(+) gặp vào tháng 9; (-) gặp vào tháng 12

(V) Hệ thống điểm BMWP của Việt Nam [10].

Kết quả ở bảng 2 cho thấy:

- Tại suối Ao Vua (Ba Vì), đã xác định được các đại diện của 42 họ ĐVKXS cỡ lớn bao gồm: 2 họ côn trùng Hai cánh (Diptera), 6 họ Cánh cứng (Coleoptera), 9 họ Phù du (Ephemeroptera), 5 họ Cánh nửa (Hemiptera), 7 họ Chuồn chuồn (Odonata), 1 họ Cánh úp (Plecoptera), 6 họ Cánh lông (Trichoptera), 3 họ Giáp xác mười chân (Decapoda), 2 họ Thân mềm chân bụng (Gastropoda) và 1 họ Đũa (Hirudinea). Trong số các họ kể trên thì các đại diện thuộc côn trùng và ấu trùng côn trùng ở nước chiếm đến 85% tổng số các họ gặp ở suối Ao Vua. Phần lớn các họ này là các họ ưa sạch, có điểm BMWP từ 8 đến 10 điểm.

- Trên sông Cà Lồ (Vĩnh Phúc), đã thu được 18 họ ĐVKXS cỡ lớn bao gồm: 2 họ côn trùng Hai cánh (Diptera), 2 họ Cánh nửa (Hemiptera), 2 họ Chuồn chuồn (Odonata), 3 họ Giáp xác mười chân (Decapoda), 5 họ Thân mềm chân bụng (Gastropoda), 4 họ Thân mềm hai mảnh vỏ (Bivalvia) và một số đại diện của Giun ít tơ (Oligochaeta). Như vậy, ở sông Cà Lồ thành phần ĐVKXS cỡ lớn chủ yếu là bọn Thân mềm (Mollusca), chiếm 50% tổng số họ đã gặp ở đây. Những họ này chủ yếu là các họ ưa sống trong điều kiện giàu chất hữu cơ như *Thiaridae*,

Chironomidae. Các họ này có số điểm BMWP từ 2 đến 4 điểm.

- Ở sông Nhuệ, đã gặp 22 họ ĐVKXS cỡ lớn bao gồm: 2 họ côn trùng Hai cánh (Diptera), 1 họ Cánh cứng (Coleoptera), 1 họ Phù du (Ephemeroptera), 4 họ Cánh nửa (Hemiptera), 4 họ Chuồn chuồn (Odonata), 3 họ Giáp xác mười chân (Decapoda), 4 họ Thân mềm Chân bụng (Gastropoda), 2 họ Thân mềm hai mảnh vỏ (Bivalvia), 1 họ Đũa (Hirudinea) và một số đại diện của Giun ít tơ (Oligochaeta) với số lượng cá thể khá lớn. Trong số đó thì các đại diện thuộc côn trùng và ấu trùng côn trùng ở nước chiếm 55% tổng số các họ, nhưng chỉ có họ *Chironomidae* có số lượng cá thể nhiều và hầu hết những họ này đều có khả năng chống chịu với sự ô nhiễm.

2. Chất lượng môi trường nước của các điểm nghiên cứu

Dựa vào các hệ thống điểm BMWP của Việt Nam cho điểm các họ chỉ thị ở từng điểm thu mẫu (bảng 2), chúng tôi đã tính toán chỉ số sinh học (ASPT). Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3 cho thấy bức tranh chung về mức độ ô nhiễm ở các dòng chảy nghiên cứu suối Ao Vua, sông Cà Lồ và sông Nhuệ.

Bảng 3

Chỉ số ASPT của các điểm nghiên cứu ở suối Ao Vua, sông Cà Lồ và sông Nhuệ

		Suối Ao Vua					Sông Cà Lồ					Sông Nhuệ				
		Đ1	Đ2	Đ3	Đ4	Đ5	Đ1	Đ2	Đ3	Đ4	Đ5	Đ1	Đ2	Đ3	Đ4	Đ5
BMWP tổng số	+	78	51	30	66	111	19	26	44	23	12	20	20	21	27	33
	-	93	37	64	91	141	28	28	22	27	29	49	27	36	32	38
Tổng số họ chỉ thị	+	12	9	6	10	18	6	9	13	7	4	6	6	7	9	10
	-	14	7	10	13	20	9	9	6	8	8	13	8	11	10	11
ASPT	+	6,3	5,7	5,0	6,6	6,2	3,2	3,0	3,4	3,3	3,0	3,3	3,3	3,0	3,0	3,3
	-	6,6	5,3	6,4	7,0	7,0	3,1	3,1	3,7	3,4	3,6	3,8	3,4	3,3	3,2	3,5

Ghi chú: (+) tháng 9; (-) tháng 12

Kết quả đánh giá mức độ ô nhiễm môi trường nước của các điểm nghiên cứu ở suối Ao Vua, sông Cà Lồ và sông Nhuệ dựa vào chỉ số ASPT, được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4

Chất lượng môi trường nước của các điểm nghiên cứu

Điểm nghiên cứu		Theo hệ thống BMWP của Việt Nam			
		Tháng 9/99		Tháng 12/99	
		ASPT	Chất lượng môi trường nước	ASPT	Chất lượng môi trường nước
Suối Ao Vua	Đ1	6,3	Nước sạch trung bình	6,6	Nước sạch trung bình
	Đ2	5,7	Ô nhiễm nhẹ	5,3	Ô nhiễm nhẹ
	Đ3	5,0	Ô nhiễm nhẹ	6,4	Nước sạch trung bình
	Đ4	6,6	Nước sạch trung bình	7,0	Nước sạch trung bình
	Đ5	6,2	Nước sạch trung bình	7,0	Nước sạch trung bình
Sông Cà Lồ	Đ1	3,2	Ô nhiễm trung bình	3,1	Ô nhiễm trung bình
	Đ2	3,0	Ô nhiễm trung bình	3,1	Ô nhiễm trung bình
	Đ3	3,4	Ô nhiễm trung bình	3,7	Ô nhiễm trung bình
	Đ4	3,3	Ô nhiễm trung bình	3,4	Ô nhiễm trung bình
	Đ5	3,0	Ô nhiễm trung bình	3,6	Ô nhiễm trung bình
Sông Nhuệ	Đ1	3,3	Ô nhiễm trung bình	3,8	Ô nhiễm trung bình
	Đ2	3,3	Ô nhiễm trung bình	3,4	Ô nhiễm trung bình
	Đ3	3,0	Ô nhiễm trung bình	3,3	Ô nhiễm trung bình
	Đ4	3,0	Ô nhiễm trung bình	3,2	Ô nhiễm trung bình
	Đ5	3,3	Ô nhiễm trung bình	3,5	Ô nhiễm trung bình

Kết quả ở bảng 4 cho thấy:

Chất lượng môi trường nước của suối Ao Vua tương đối sạch, mặc dù có một số điểm đã bắt đầu ô nhiễm nhưng còn ở mức độ nhẹ.

Sông Cà Lồ và sông Nhuệ có chất lượng môi trường nước ở mức ô nhiễm trung bình, đặc biệt một vài điểm nghiên cứu đã có mức ô nhiễm gần nặng.

III. KẾT LUẬN

Từ kết quả phân tích mẫu vật ĐVKXS cỡ lớn đã thu được ở các dòng chảy suối Ao Vua, sông Cà Lồ và sông Nhuệ trong tháng 9 và tháng 12 năm 1999, chúng tôi có một số kết luận sau đây:

1. Thành phần ĐVKXS cỡ lớn ở suối Ao Vua đã xác định được bao gồm 42 họ, trong đó các họ thuộc côn trùng và ấu trùng côn trùng ở nước chiếm đến 85%; phần lớn các họ này là các họ ưa sạch, có điểm BMWP từ 8 đến 10 điểm.

2. Trên sông Cà Lồ, đã thu được 18 họ ĐVKXS cỡ lớn và một số đại diện của Giun ít tơ (*Oligochaeta*), trong số đó chủ yếu là bọ Thân mềm (Mollusca) chiếm 50%.

3. Ở sông Nhuệ, đã gặp 22 họ ĐVKXS cỡ lớn và một số đại diện của Giun ít tơ (*Oligochaeta*) với số lượng cá thể khá lớn. Trong số đó thì các đại diện thuộc côn trùng và ấu trùng côn trùng ở nước chiếm 55% tổng số các họ, nhưng về số lượng cá thể thì chỉ có họ Chironomidae là chiếm đa số và hầu hết những họ này đều có khả năng chống chịu với sự ô nhiễm.

4. Kết quả tính chỉ số sinh học (ASPT) theo hệ thống BMWP cho thấy chất lượng môi trường nước của suối Ao Vua là tương đối sạch, mặc dù có một số điểm đã bắt đầu ô nhiễm nhưng còn ở mức độ nhẹ. Sông Cà Lồ và sông Nhuệ có mức ô nhiễm trung bình, đặc biệt một vài điểm nghiên cứu đã có mức ô nhiễm gần nặng.

5. Phương pháp sử dụng ĐVKXS làm sinh vật chỉ thị để đánh giá chất lượng nước là một phương pháp khả thi, mang lại kết quả tốt lại ít tốn kém.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Croft P. S., 1986: A key to the major group of British Freshwater Invertebrates, Field Studies Council AIDGAP Project, Printed in Great Britain.
2. Đặng Ngọc Thanh, 1980: Khu hệ động vật không xương sống nước ngọt Bắc Việt Nam. NXB KH&KT, Hà Nội.
3. Đặng Ngọc Thanh, Thái Trần Bái, Phạm Văn Miên, 1980: Định loại Động vật không xương sống nước ngọt Bắc Việt Nam, NXB KH&KT, Hà Nội.
4. Fitter R. and Manuel R., 1995: Lakes, rivers, streams and ponds of Britain and North-west Europe, Collin photo guide, Harper Collins Publishers.
5. Hoàng Thị Hòa, 2000: Nghiên cứu sử dụng động vật không xương sống cỡ lớn đánh giá chất lượng nước khu vực thành phố Đà Lạt, suối Đắc Ta Dun và sông Đa Nhim. Luận án thạc sĩ khoa học.
6. Lê Thu Hà, Nguyễn Xuân Quỳnh, 2001: Tạp chí Sinh học, 23(3A): 62-68.
7. Mason C. F., 1996: Biology of freshwater pollution. Produced by Longman Singapore Publishers Ltd. Third edition.
8. Merritt R. W. and Cummins K. W., 1996: An Introduction to the aquatic insects of North America, Kendall/Hunt Publishing Company.
9. National Water Council, 1981: River quality; the 1980 survey and future outlook. National Water Council. London.
10. Nguyen Xuan Quynh et al., 2000: Biological surveillance of freshwater, Using macroinvertebrate. A practical manual and identification key for use in Vietnam, Darwin Initiative, Field Studies Council, UK.
11. Patrick W. McCafferty, 1981: Aquatic entomology. Jones and Bartlett Publishers, Boston, London.
12. R. Orton, A. Bebbington and J. Bebbington, 1995: Freshwater invertebrates. Field Studies Council Published.

13. Stephen E. M., 1997: Quatic macroinvertebrates and environmental quality of rivers in Northern Thailand. PhD thesis.

APPLICATION OF THE BMWP SCORE SYSTEM TO ASSESS THE WATER QUALITY OF SOME STREAMS AND RIVERS IN THE HANOI, HATAY AND VINHPHUC AREAS

LE THU HA, NGUYEN XUAN QUYNH, MAI DINH YEN

SUMMARY

Using macroinvertebrates to assess the water quality is a rapid biological monitoring method. The Biological Monitoring Working Party (BMWP) has been applied successfully, with some adaptation to local conditions in some countries, in Europe, North America, Thailand and India for example. the BMWP score system for Vietnam is presented by Nguyen Xuan Quynh et al. (2000).

The present study had 2 primary objectives:

- To adapt the BMWP method to assess the water quality of some streams and rivers.
- Determination of the macroinvertebrate composition in the sampling sites.

This study was carried out on 3 running waters: Aovua stream, Calo river and Nhue river. Along each running water, 5 sites were taken sampling in September and December of 1999.

57 macroinvertebrate families were recorded in Aovua stream, Calo river and Nhue river. They belong to Arthropoda, Mollusca and Oligochaeta.

In the Aovua stream (Bavi), 42 families were recored and the aquatic insect families make up 85%. In Calo river, 18 families were recored; they belong to Diptera, Hemiptera, Odonata, Decapoda, Gastropoda, Bivalvia and some specimens of Oligochaeta; the number of mollusc families make up 50%; most of them like living in organic water as *Thiaridae*, *Chironomidae*. 22 families and some specimens of *Oligochaeta* have been found in the Nhue river, but only tubificid worms (*Oligochaeta*) and Chironomid larva (*Chironomidae*) occured with large numbers.

The water quality of the Aovua stream is rather clean. The water quality of the Calo and Nhue rivers is dirty.

Using macroinvertebrates as bioindex to assess the water quality is not expensive and is an useful method.

Ngày nhận bài: 27-11-2001

ĐỊNH LOẠI CÁC LOÀI THÚ HOANG ĐẠI THUỘC HỌ GẤU (URSIDAE) VÀ HỌ CHÓ (CANIDAE) Ở VIỆT NAM DỰA VÀO HÌNH THÁI VÀ CẤU TRÚC CỦA LÔNG

TRẦN HỒNG VIỆT

Trường đại học Sư phạm Hà Nội

PHẠM VĂN NHÃ

Đại học Tây Bắc

Hiện nay, các loài thú hoang đại thuộc họ Gấu (Ursidae) và họ Chó (Canidae) - bộ Ăn thịt (Carnivora) ở Việt Nam đã phát hiện được gần đầy đủ [1, 3, 4]. Trong đó, một số loài phân bố rộng rãi ở nhiều nơi như: Lửng chó (*Nyctereutes procyonoides*), Gấu ngựa (*Selenarctos thibetanus*), một số loài đã trở nên hiếm và rất hiếm như: Cáo (*Vulpes vulpes*), Sói xám (*Canis aureus*), Sói lửa (*Cuon alpinus*), Gấu chó (*Helarctos malayanus*). Trong phòng thí nghiệm, mẫu vật của các loài này cũng không nhiều. Do vậy, dùng lông của chúng để nghiên cứu, định loại cũng có khó khăn. Tuy vậy, dựa trên cơ sở các mẫu vật có sẵn ở Bảo tàng động vật - Trường đại học Sư phạm Hà Nội, Bảo tàng động vật - Trường đại học Khoa học tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội, chúng tôi đã dùng 320 chiếc lông, lấy từ 20 mẫu của 6 loài, thuộc 2 họ kể trên để xử lý phân tích và lập khóa định loại đến loài, góp phần vào việc phát triển, hoàn thiện dần bộ môn phân loại học ở Việt Nam.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chúng tôi sử dụng phương pháp nghiên cứu lông của các tác giả Faliu [2] và Trần Hồng Việt [5].

1. Lông nghiên cứu

Các kết quả nghiên cứu trước đã khẳng định lông của mẫu vật sống và mẫu vật chết không có sự sai khác, do vậy chúng tôi dùng lông của các mẫu vật chết để nghiên cứu định loại.

Lông được chọn phải là lông phủ trưởng thành của cá thể trưởng thành, nguyên vẹn các

phần và có cấu trúc đặc trưng.

2. Vị trí lấy lông

Lông được lấy ở điểm chính giữa chiều dài thân trên trục cột sống lưng của mẫu vật.

3. Chọn lông

Lông phủ của các loài thuộc họ Gấu và họ Chó có hai loại: lông trụ và lông phủ thường; lông nghiên cứu được dùng là lông phủ thường.

Cách phân biệt:

- Lông trụ: thường cứng, thẳng hoặc hơi cong, không có phần phình rõ ràng; lông thường tròn, ngọn dài, mọc vượt tầng lông trên lưng.

- Lông phủ thường: thường mềm, hơi cong, ngắn hơn lông trụ, có phần phình rõ rệt, phần gốc và trung gian 1 mảnh.

4. Chuẩn bị mẫu nghiên cứu

Làm sạch lông: rửa lông nhiều lần bằng nước nóng 70°C, hong khô trong bóng mát, tiếp đó rửa bằng ête rồi lại hong khô.

Lên tiêu bản lông: đặt lông nằm thẳng theo hướng lưng - bụng trên lam kính sạch, gắn tiêu bản bằng bôm canada.

Lên tiêu bản vẩy lông: quét vecni đánh móng tay (loại không pha nhũ) lên lam kính và in mặt lưng của lông.

Quan sát, đo tính, chụp ảnh trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 15×10, 15×40.

5. Thực hiện nghiên cứu

Mỗi loài đã dùng 2 - 5 cá thể (tùy số mẫu có ở bảo tàng), mỗi cá thể dùng 5 lông để phân tích, đo tính và 10 lông để quan sát bổ sung.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

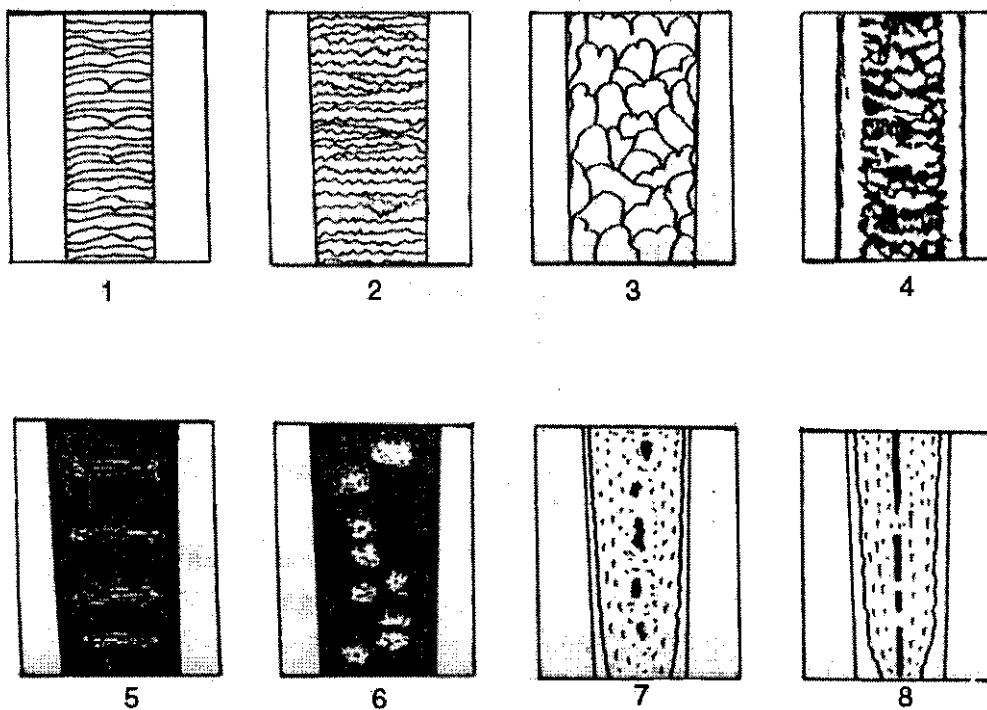
Qua quan sát, đo tính đã xác lập được các thông số nghiên cứu sau đây: Chiều dài lông

(L), độ mềm lông (M), chỉ số vò (Cv), chỉ số tùy (Ct) của các loài thuộc họ Gấu và họ Chó - bộ Ăn thịt ở Việt Nam.

Chỉ số lông của các loài thuộc họ Gấu và họ Chó ở Việt Nam

Tên loài	(L) mm	(M)	(Cv)	(Ct)
Cáo (<i>Vulpes Vulpes</i>)	33,5 - 42,0	0,00087 - 0,00125	0,01 - 0,86	0,55 - 1,00
Sói xám (<i>Canis aureus</i>)	57,0 - 73,5	0,00022 - 0,00099	0,04 - 0,80	0,41 - 0,98
Lửng chó (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)	36,5 - 58,0	0,00050 - 0,00109	0,04 - 0,83	0,41 - 1,00
Sói lửa (<i>Cuon alpinus</i>)	22,5 - 33,2	0,00157 - 0,00245	0,25 - 0,79	0,59 - 0,97
Gấu ngựa (<i>Selenarctos thibetanus</i>)	54,5 - 59,5	0,00010 - 0,00094	0,05 - 0,57	0,11 - 0,83
Gấu chó (<i>Helarctos malayanus</i>)	14,0 - 20,5	0,00175 - 0,00371	0,25 - 0,59	0,13 - 0,79

Hình thái vảy và hình thái tùy của các loài thú hoang đại thuộc họ Gấu và họ Chó ở Việt Nam có các dạng đặc trưng sau:



Ghi chú:

- 1: Vảy có dạng lát ngang.
- 2: Vảy có dạng lát răng.
- 3: Vảy có dạng cung, hình cung xen cung bổ khía.
- 4: Tùy có dạng vách kép, kiểu bó vảy cá.
- 5: Tùy có dạng vách kép hình bó, kiểu bó ken sít.
- 6: Tùy có dạng vách kép hình bó, kiểu bó có ô
- 7: Tùy có dạng mảnh vỡ, hình mảnh vỡ.
- 8: Tùy có dạng dải, hình dải

Dựa trên kết quả nghiên cứu, chúng tôi đã xây dựng được hai khóa định loại các loài thuộc họ Gấu và họ Chó như sau:

KHÓA ĐỊNH LOẠI CÁC LOÀI THUỘC HỌ GẤU VÀ HỌ CHÓ Ở VIỆT NAM

1. Dựa trên màu sắc, độ dài, hình dạng vảy, hình dạng tủy của lông

- 1(4) Lông có độ dài lớn hơn 50 mm.
- 2(3) Lông đen tuyền từ gốc đến ngọn
Selenarctos thibetanus
- 3(2) Trên lông chia làm 3 băng màu: Trắng - đen - trắng
Canis aureus.
- 4(1) Lông có độ dài nhỏ hơn 50 mm.
- 5(10) Vảy toàn bộ các phần dạng lát và lát răng.
- 6(7) Tủy toàn bộ các phần vách kép hình bó và bó có ô
Cuon alpinus.
- 7(6) Tủy các phần không có vách kép hình bó và bó có ô.
- 8(9) Tủy các phần có dạng vảy cá hoặc bó vảy cá
Ngctereutes procyonoides
- 9(8) Tủy các phần có sắc tố que, hạt giữa lông tập trung dày *Helarctos malayanus*.
- 10(5) Vảy có thêm dạng khác. Vảy trung gian I dạng cung xen cung bổ khía
Vulpes vulpes

2. Dựa vào hình thái, cấu trúc tủy của lông

- 1(8) Tủy có dạng vảy cá hoặc vách kép.
- 2(5) Tủy có dạng vảy cá hoặc bó vảy cá.
- 3(4) Tủy trung gian 2 bó vảy cá ken sít
Vulpes vulpes.
- 4(3) Tủy trung gian 2 bó vảy cá ken sít và băng đen
Nyctereutes procyonoides.

- 5(2) Tủy có dạng vách kép hình bó.
- 6(7) Tủy trung gian 2 vách kép bó điểm vách kép bó có ô
Cuon alpinus
- 7(6) Tủy trung gian 2 vách kép bó ken sít + bó có ô và băng đen.
- 8(1) Tủy có dạng mảnh vỡ hoặc dạng que dạng hạt
Canis aureus.
- 9(10) Tủy dạng que dạng hạt, giữa lông tập trung dày
Helarctos malayanus
- 10(9) Tủy có dạng mảnh vỡ và dải nhỏ
Selenarctos thibetanus

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ellerman J. R. and Morrison, Scott T. G. S, 1951: Checklist of Palearctic and Indian Mammals 1758 to 1946, British Museum (Nat. Hist) London: 200-315.
2. Fallu L. et al., 1979: Identifications des poils des mammifères Pyreneens, Ecole National Veterinaire de Toulouse: 1-51.
3. Đặng Huy Huỳnh, 1994: Danh lục các loài thú (Mammalia) Việt Nam. NXB KH&KT, Hà Nội.
4. Van Peenen P. F. D. and Col., 1969: Preliminary identification manual for mammals of south Việt Nam U. S. Nat. Mus. Smith. Inst. Washington: 218-237.
5. Trần Hồng Việt, 1985: Tạp chí Sinh học, 7(1): 39-42.
6. Trần Hồng Việt, 1990: Tạp chí khoa học, Đại học Tổng hợp Hà Nội, 4: 28-31,
7. Trần Hồng Việt, 1993: Tạp chí khoa học, Đại học Tổng hợp Hà Nội, 1: 30-33.

IDENTIFICATION OF BEARS (URSIDAE) AND WILD DOGS (CANIDAE) FREQUENTLY SEEN IN VIET NAM BASED ON THE STRUCTURE AND THE MORPHOLOGY OF THE HAIRS

TRAN HONG VIET, PHAM VAN NHA

SUMMARY

The article presents the result of the mammal identifying study by hairs.

After analyzing 320 hairs of 20 specimens of the families Ursidae and Canidae in Vietnam, the authors give the radical index of the morphology of the hairs such as: length(L), soft degree (M), cortex index(Cv), medulla index(Ct) of the hairs and determine the specific forms of the scales. The authors give two keys to identify the bears and the wild dogs in Vietnam, based on the structure and the morphology of these hairs.

Ngày nhận bài: 1-4-2002

**NGHIÊN CỨU SỰ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA CHO α -AMYLaza ỨA LẠNH
CỦA VI KHUẨN *PSEUDOALTEROMONAS HALOPLANCTIS* 505
TRONG NẤM MEN *PICCHIA PASTORIS* GS115**

**ĐỖ THỊ HUYỀN, LÊ VĂN TRƯỜNG, LÊ TRẦN BÌNH,
TRƯƠNG NAM HẢI**

Viện Công nghệ sinh học

THOMAS SCHWEDER

Trường đại học Greifswald, CHLB Đức

Trong những năm gần đây, việc nghiên cứu và sử dụng enzym có hoạt tính ở nhiệt độ thấp vào các ngành công nghiệp phát triển rất mạnh mẽ. Proteaza, lipaza, xenluloza, amylaza lạnh thường được bổ sung vào các chất tẩy rửa, bột giặt nhằm làm tăng hiệu quả tẩy rửa khi sử dụng trực tiếp nước máy. Trong công nghiệp thực phẩm, những enzym này còn được sử dụng chủ yếu để giữ cho hoa quả và thực phẩm tươi lâu và giữ mùi vị [1]. Ngoài ra, người ta còn dùng amylaza lạnh để đường hoá tinh bột ở nhiệt độ thấp với mục đích tạo ra các mono-, đisacarit có vị ngọt nhưng ít gây sâu răng và kích thích tiêu hóa [1]. Trong quá trình lên men bia, công đoạn làm chín bia diễn ra ở nhiệt độ thấp (8-12°C) để đảm bảo chất lượng bia về mùi và vị [1]. Trong dịch bia ở giai đoạn này, vẫn còn lẫn tinh bột chưa được thủy phân hoàn toàn. Như vậy, nếu có amylaza lạnh để bổ sung vào công đoạn này sẽ làm tăng chất lượng của bia.

Pseudoalteromonas haloplanctis 505 là chủng vi khuẩn được phân lập từ hệ vi khuẩn vùng Nam cực tại phòng thí nghiệm của Dr. Elisabeth Helmke, Trường đại học Greifswald-Cộng hòa Liên bang Đức. Chủng vi khuẩn này chỉ có thể sinh trưởng và phát triển ở khoảng nhiệt độ từ 0-25°C. α -amylaza của nó có rất nhiều điểm tương đồng với α -amylaza của chủng *Alteromonas haloplanctis* A23* [2]. Độ

tương đồng về trình tự của hai gen đạt 96% và vùng có trình tự khác nhau nhiều tập trung chủ yếu ở phần cuối của gen. Điều đáng quan tâm là enzym này có hoạt tính cao ở vùng nhiệt độ thấp (5-25°C). Chúng tôi đã tách dòng, đọc trình tự và biểu hiện thành công gen α -amylaza của chủng *P. haloplanctis* 505 trong *E. coli* và trong nấm men *S. cerevisiae*. Mặc dù vậy, enzym ngoại lai được tổng hợp với lượng rất thấp và hầu hết chúng bị giữ lại ở trong tế bào và màng tế bào [3]. Vì vậy, việc nuôi cấy để thu được lượng lớn enzym trong thể tái tổ hợp gặp nhiều khó khăn. Để khắc phục nhược điểm trên, chúng tôi đã biểu hiện gen α -amylaza của *P. haloplanctis* 505 trong chủng nấm men *Pichia pastoris* GS115 vì *P. pastoris* GS115 là chủng nấm men đã được nghiên cứu kỹ về mặt di truyền và được cải biến để tối ưu hóa việc biểu hiện các gen ngoại lai và tiết các sản phẩm của gen ngoại lai ra ngoài môi trường nuôi cấy [4, 5]. Trong công trình này, chúng tôi hướng tới việc tạo được chủng nấm men *P. pastoris* GS115 có khả năng tổng hợp và tiết hiệu quả α -amylaza lạnh của *P. haloplanctis* 505 ra ngoài môi trường nhằm sản xuất lượng lớn enzym để sử dụng vào mục đích trên.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Công trình được tài trợ về kinh phí của Trung tâm KHTN&CNQG theo đề tài “Hoàn thiện công nghệ sản xuất amylaza tái tổ hợp” và Dự án hợp tác Đức-Việt giữa Viện Công nghệ sinh học và Trường đại học Tổng hợp Greifswald, CHLB Đức do BMBF tài trợ.

a) *Chủng vi sinh vật*

Pseudoalteromonas haloplanctis 505 là chủng vi khuẩn mang gen α -amylaza do Dr. Elisabeth Helmke, Trường đại học Greifswald - Cộng hòa Liên bang Đức cung cấp.

E. coli DH5 α [end A1 rec A1 hsd R17 sup E44 gyp A96 thi-1 relA1 Δ lac U169 (ϕ 80 lacZM15)] được sử dụng làm thể nhận trong thí nghiệm biến nạp, nhân và chọn dòng các plasmit.

Pichia pastoris GS115 [his4] là chủng nấm men được sử dụng làm chủng nhận trong thí nghiệm biến nạp với vectơ biểu hiện mang gen α -amylaza [5].

b) *Plasmit*

Plasmit pPIC9 được sử dụng làm vectơ biểu hiện trong chủng nấm men *P. pastoris* GS 115 [5].

c) *Môi trường nuôi cấy*

Môi trường LB [6], môi trường MD, YPD [5], YP (1% Yeast Extract, 2% Bacto-pepton) được sử dụng để nuôi cấy và chọn lọc thể biến nạp. Môi trường Zobell (0,5% Pepton, 0,1% Yeast Extract và lượng nhỏ của muối NaCl, MgCl₂, MgSO₄, KCl₂, FeSO₄, CaCl₂) được sử dụng để nuôi cấy chủng *P. haloplanctis* 505.

2. Phương pháp

a) *Phương pháp biến nạp*

Tế bào *E. coli* được biến nạp theo phương pháp tạo tế bào khả biến bằng muối CaCl₂ của Sambrook và cs. [7].

Tế bào *P. pastoris* được biến nạp bằng phương pháp xung điện [8], thể biến nạp được chọn lọc trên môi trường MD.

b) *Các phương pháp liên quan đến tạo dòng phân tử ADN*

Các phản ứng cắt và nối các đoạn ADN, điện di trên gel agarosa được tiến hành theo các phương pháp của Sambrook và cs. [7].

c) *Chương trình PCR*

Phản ứng làm biến tính ADN khuôn diễn ra ở 94°C trong 4 phút, sau đó được tiếp theo với 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước. Bước 1: biến tính sợi ADN khuôn ở 94°C trong 1 phút. Bước 2: mỗi kết cặp bổ sung với đoạn gen tương đồng trong sợi khuôn ở 50°C trong 1 phút. Bước 3: tổng hợp, kéo dài chuỗi ở 72°C trong 2 phút 20 giây và cộng thêm 5 giây sau mỗi chu kỳ. Phản ứng kết thúc ở 72°C trong 5 phút và ủ mẫu ở 4°C.

Hai đoạn mỗi dùng để nhân gen do hãng Amersham Pharmacia Biotech tổng hợp có trình tự như sau:

PICAmy5': 5'AAGCTTTACGTAACGCC-CACCACATTTGTG3'

PICAmy3': 5'AATCCGAAATTCCTATG-GCGCTGAACTTGTATTAA3'

d) *Tách ADN hệ gen của P. haloplanctis*

Phương pháp này được mô tả như trong thông báo trước đây [3].

e) *Xác định hoạt tính thủy phân tinh bột của α -amylaza lạnh*

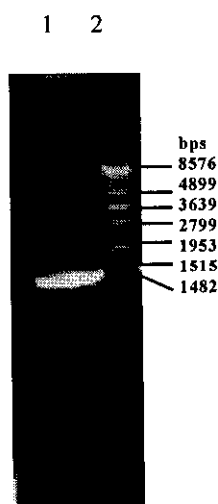
Tế bào *P. pastoris* mang gen *Amyl* được nuôi cấy qua đêm trong môi trường YPD, sau đó chuyển tế bào sang môi trường cảm ứng (YP + 1% metanol). Sau 2 ngày nuôi cấy cảm ứng, chúng tôi tiến hành ly tâm thu dịch môi trường để làm phản ứng. Lượng đầu khử được giải phóng ra từ tinh bột 1% trong đệm photphat (pH = 7,5) được xác định bằng phương pháp của Somogyi (1952) và so với đường chuẩn mantoza. Đơn vị hoạt độ được tính bằng số mol đầu khử được tạo ra u/l/h.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Nhân gen α -amylaza lạnh (*amyl*) bằng kỹ thuật PCR

Dựa trên trình tự gen α -amylaza của chủng *P. haloplanctis* 505, chúng tôi đã thiết kế những đoạn mỗi dùng cho PCR. Gen *Amyl* sẽ được đưa vào tại điểm cắt *EcoRI*, *SnaBI* trong vùng đa nối trên plasmit pPIC9 và sử dụng tín hiệu tiết α -MF đã được thiết kế sẵn trong plasmit nên đoạn mỗi tương ứng từ đầu 3' của gen có chứa

trình tự *EcoRI* nhân tạo, đoạn môi tương ứng từ đầu 5' của gen có chứa trình tự *SnaBI* nhân tạo và có trình tự bổ sung với đoạn gen mã hóa cho α -amylaza hoàn chỉnh. Phản ứng PCR được tiến hành như đã mô tả ở phần phương pháp. Đoạn khuôn sử dụng là ADN hệ gen của chủng *P. haloplanctis* 505. Sản phẩm của phản ứng được phát hiện bằng điện di trên gel agarosa 0,8%. Kích thước của sản phẩm theo tính toán dài khoảng 1428 bp (ảnh 1).



Ảnh 1: Nhân gen *amyl* bằng PCR
Đường chạy 1: Sản phẩm PCR
Đường chạy 2: Thang ADN chuẩn (ADN của SPP I cắt bằng *EcoRI*)

2. Thiết kế vector biểu hiện gen α -amylaza ưa lạnh trong chủng *P. pastoris* GS115

Để biểu hiện gen *Amyl* trong chủng *P. pastoris* GS115, chúng tôi đã chọn vector pPIC9 làm vector biểu hiện. Vector này không chỉ chứa những đoạn gen cần thiết để có thể biến nạp và chọn lọc trong tế bào *E. coli* mà chúng còn chứa gen quan trọng có nguồn gốc trực tiếp từ *P. pastoris* như gen *HIS4*, *AOXI_p*, *AOXI_t*, 3'*AOXI* đảm bảo cho pPIC9 có thể tích hợp vào nhiễm sắc thể của *P. pastoris* một cách dễ dàng. Gen *HIS4* trong pPIC9 tạo điều kiện thuận lợi cho việc chọn lọc các thể biến nạp trên môi trường tối thiểu khuyết histidin. Các đoạn *AOXI_p* và *AOXI_t* là vùng điều khiển mạnh trong tế bào nấm men. *AOXI* chỉ bắt đầu hoạt động phiên mã khi có metanol vì vậy chúng tạo điều kiện thuận

lợi cho việc điều khiển tổng hợp enzym ngoại lai từ thể biến nạp. Hơn nữa, pPIC9 còn chứa gen mã hóa cho tín hiệu tiết α -MF, có nguồn gốc từ *S. cerevisiae*. Nhờ tín hiệu tiết này mà protein ngoại lai được tiết ra môi trường nuôi cấy một cách dễ dàng.

Để đưa gen *Amyl* vào plasmid pPIC9, sản phẩm phản ứng PCR và plasmid pPIC9 phải được cắt triệt để bằng *SnaBI* và *EcoRI*. Đoạn gen *Amyl* và plasmid pPIC9 sau khi cắt được nối lại với nhau bằng ADN ligaza và biến nạp vào tế bào *E. coli*. Sau khi chọn lọc và kiểm tra các thể biến nạp nhận được, chúng tôi đã chọn được plasmid tái tổ hợp mang gen mã hoá α -amylaza và plasmid này được đặt tên là pPICAmyl. Sơ đồ thiết kế vector pPICAmyl để biểu hiện gen *Amyl* của chủng *P. haloplanctis* 505 trong chủng nấm men *P. pastoris* GS115 được trình bày trên hình 1.

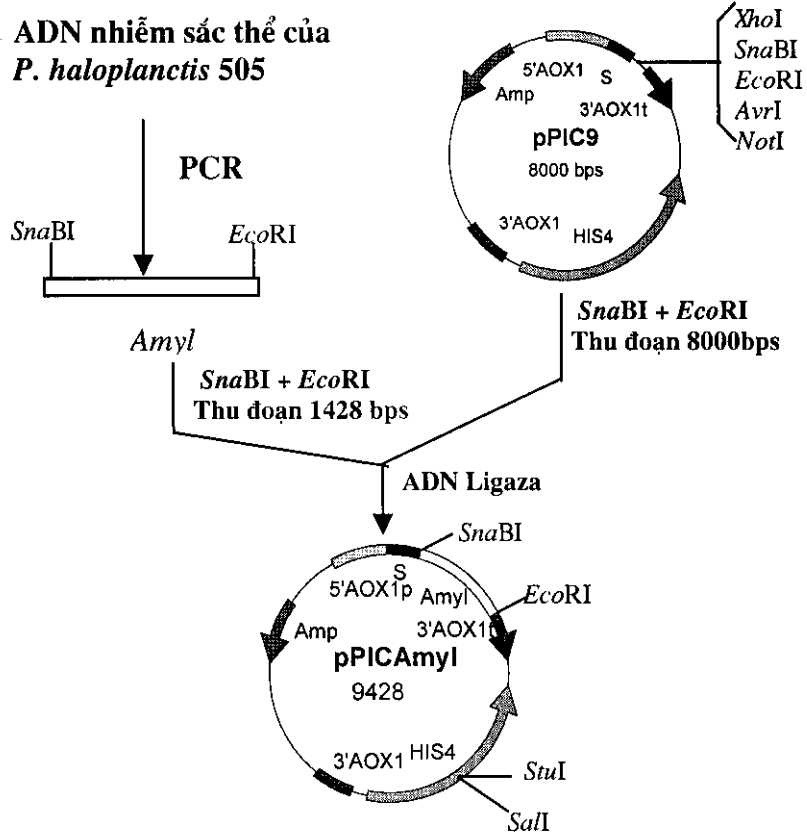
3. Tích hợp plasmid pPICAmyl vào hệ gen của chủng *P. pastoris* GS115

Để định hướng plasmid pPICAmyl tích hợp hiệu quả vào vùng *his4* trong hệ gen tế bào của chủng *P. pastoris* GS115, chúng tôi tiến hành cắt mở vòng plasmid pPICAmyl bằng *SalI* và biến nạp vào tế bào *P. pastoris* GS115 bằng phương pháp xung điện. Thể biến nạp được chọn lọc trên môi trường MD khuyết histidin và ủ ở 24°C trong 3 ngày.

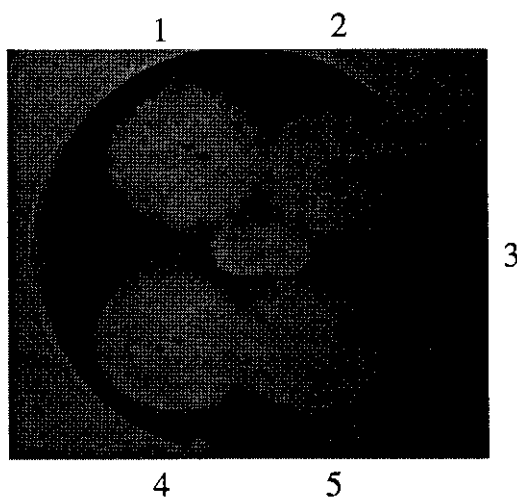
4. Nghiên cứu sự biểu hiện gen *amyl*

a) Định tính sự biểu hiện gen trong thể tái tổ hợp

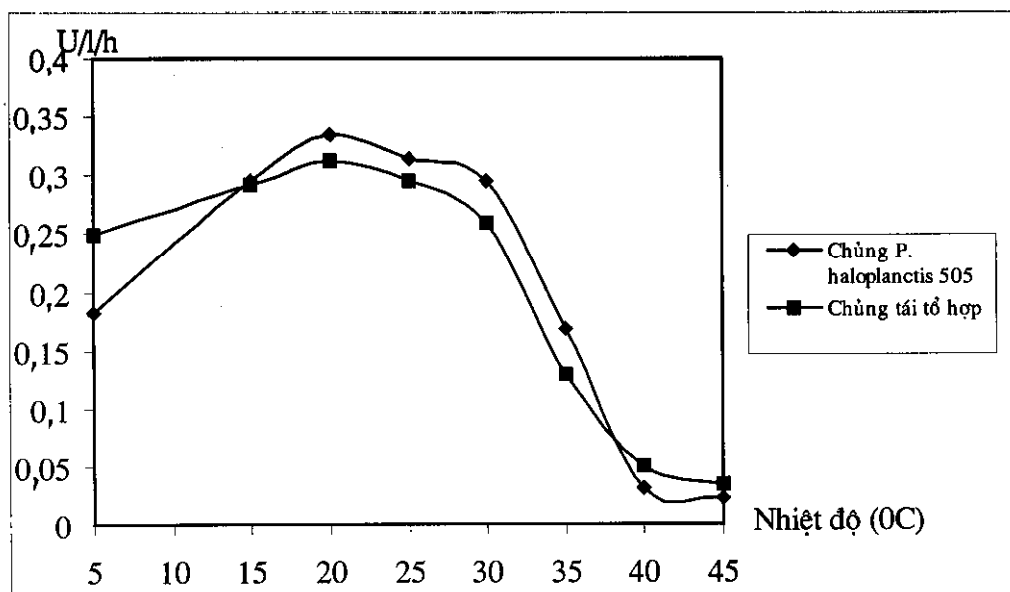
Các thể biến nạp từ đĩa môi trường MD được chuyển sang đĩa môi trường YP có chứa 0,1% tinh bột gạo và 1% metanol, ủ ở 24°C trong 5 ngày và bổ sung metanol mỗi ngày tới nồng độ cuối cùng là 1%. Sau đó, đĩa được nhuộm bằng dung dịch lugol (0,1% I_2 và 0,2% KI). Kết quả cho thấy hầu hết các thể biến nạp đều có vòng thủy phân tinh bột. Điều đó chứng tỏ gen mã hóa cho α -amylaza lạnh đã hoạt động tốt trong tế bào của *P. pastoris* dưới sự điều khiển của promoter *AOXI*. Kết quả được trình bày ở ảnh 2.



Hình 1. Sơ đồ thiết kế plasmit pPICAmyl



Ảnh 2. Vòng thủy phân tinh bột của các thể biến nạp *P. pastoris* GS115
1, 2, 4, 5: *P. pastoris* mang plasmit pPICAmyl; 3: *P. pastoris* mang plasmit pPIC9



Hình 2. So sánh nhiệt độ tối ưu cho hoạt tính amylaza từ thể biến nạp *P. pastoris* GS115 và chủng gốc *P. haloplanctis* 505

Bảng 1

Khả năng tiết α -amylaza lạnh của thể biến nạp *P. pastoris* GS115

	Enzym ngoại bào	Enzym màng tế bào	Enzym nội bào
Hoạt tính (U/l/h)	8,04	0,13	0
% enzym	98,4	1,6	0

b) Biểu hiện gen amyl trong dịch môi trường

Một khuẩn lạc của *P. pastoris* GS115 mang gen mã hoá cho α -amylaza lạnh được nuôi cấy lắc trong 20 ml môi trường YP ở nhiệt độ 25°C đến khi $OD_{600} \approx 1,5$ thì bổ sung metanol tới nồng độ cuối cùng là 1%. Duy trì môi trường cảm ứng bằng cách cứ sau 24 giờ lại bổ sung thêm metanol tới nồng độ cuối cùng là 1%. Sau mỗi lần cảm ứng, thu dịch nuôi cấy trong 5 giờ liên tiếp và xác định hoạt tính của enzym. Kết quả cho thấy, chỉ sau 4,5 giờ của lần cảm ứng thứ 2, hầu hết hoạt tính tổng số của enzym đã đạt mức tối đa. Chúng tôi chọn thời gian này để thu mẫu cho các nghiên cứu tiếp theo.

5. Xác định khả năng tiết α -amylaza của thể biến nạp *P. pastoris* GS115 ra ngoài môi trường nuôi cấy

Sau khi nuôi cấy cảm ứng trong 2 ngày, chúng tôi tiến hành ly tâm thu dịch nuôi cấy để kiểm tra hoạt tính enzym ngoại bào. Tủa tế bào được hòa vào đệm chứa 14mM β -mecaptoetanol, 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA pH 7,5 và 0,2 mg/ml liticaza, ủ ở 37°C trong 2 giờ. Ly tâm thu dịch nổi để kiểm tra hoạt tính amylaza lạnh ở màng tế bào. Sau đó, tủa tế bào được dịch hoá trong 2ml đệm photphat 0,1M pH 7,5 và được làm vỡ hoàn toàn bằng máy áp lực (French press machine) ở 9500Psi. Ly tâm thu dịch nổi để làm phản ứng kiểm tra amylaza bên trong tế bào. Kết quả thu được (bảng 1) cho thấy khả năng tiết amylaza tái tổ hợp của thể biến nạp *P. pastoris* GS115 là rất cao (khoảng 98,4% lượng enzym được tổng hợp).

6. So sánh nhiệt độ tối ưu của enzym tiết ra từ thể biến nạp và chủng gốc

Chủng *P. pastoris* GS115 tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường cảm ứng ở 25°C trong 2 ngày và chủng *P. haloplanctic* 505 được nuôi cấy trong môi trường Zobell có bổ sung 0,1% tinh bột gạo ở 4°C trong 5 ngày. Ly tâm, thu dịch nổi để kiểm tra hoạt tính của enzym ở các nhiệt độ khác nhau. Kết quả thu được (hình 4) cho thấy: amylaza được tiết ra từ thể biến nạp *P. pastoris* GS115 có hoạt tính mạnh nhất ở 20°C và có khả năng hoạt động ở nhiệt độ thấp tốt hơn chủng gốc. Ở 5°C, hoạt tính của enzym tiết ra từ thể biến nạp vẫn đạt được 79,4% so với hoạt độ tối ưu trong khi đó chủng gốc chỉ đạt 54,1%. Hơn nữa, khoảng nhiệt độ thích hợp của enzym tái tổ hợp rộng hơn so với chủng gốc, vì vậy rất dễ dàng cho việc sử dụng enzym.

III. THẢO LUẬN

Chúng tôi đã thiết kế được vector biểu hiện pPIC9 mang gen *amyl* và đã biểu hiện thành công trong chủng nấm men *P. pastoris* GS115. Kết quả định tính, định lượng và xác định khả năng tiết amylaza tái tổ hợp cho thấy gen *Amyl* đã hoạt động rất tốt dưới sự điều khiển của *AOX1p* và sản phẩm protein của nó được tiết hiệu quả bởi tín hiệu dẫn α -MF prepro. Hầu hết α -amylaza lạnh được tổng hợp trong *P. pastoris* GS115 và tiết ra môi trường nuôi cấy (98,4%) trong khi đó chỉ có khoảng 51% enzym được tiết ra ở *S. cerevisiae* tái tổ hợp [3]. Vì vậy, việc tổng hợp một lượng lớn protein tái tổ hợp từ *P. pastoris* GS115 tái tổ hợp sẽ không gây ảnh hưởng tới hoạt động trao đổi chất xảy ra ở trong tế bào và cũng không ảnh hưởng tới quá trình sinh trưởng của tế bào. Nhiều công trình nghiên cứu biểu hiện nhiều gen có nguồn gốc từ động vật, thực vật, nấm và vi khuẩn trong *P. pastoris* đều cho kết quả tương tự [4]. Điều đáng lưu ý ở đây là nhờ khả năng tiết rất tốt enzym ra môi trường mà việc nghiên cứu, tinh sạch enzym tái tổ hợp đơn giản hơn rất nhiều.

Điều rất lý thú ở công trình này là α -amylaza được tiết ra từ chủng *P. pastoris* GS115 có khoảng nhiệt độ thích hợp rộng hơn so với chủng gốc và hướng hẳn về nhiệt độ lạnh.

Enzym này có hoạt tính tối ưu ở 20°C và ở 5°C hoạt tính của enzym tiết ra từ thể biến nạp vẫn đạt được 79,4% so với hoạt độ tối ưu, trong khi đó chủng gốc chỉ đạt 54,1%. Kết quả nghiên cứu α -amylaza lạnh được tiết ra từ chủng *P. haloplanctic* 505 cho thấy: khi nuôi cấy chủng ở 16°C thì enzym có nhiệt độ tối ưu ở 30°C và khi nuôi cấy chủng ở 4°C thì enzym có nhiệt độ tối ưu ở 20°C. Sự khác biệt này có thể do enzym bị đứt gãy sau khi tổng hợp gây ra vì khi biểu hiện gen trong *E. coli* và điện di trên gel acrylamit có tinh bột, chúng tôi cũng nhận được 2 băng hoạt tính. Một băng có hoạt tính mạnh ở 20°C và một băng có hoạt tính mạnh ở 30°C (kết quả không trình bày ở đây).

Chúng tôi cũng đã tiến hành so sánh mức độ thủy phân của amylaza tái tổ hợp đối với các loại tinh bột khác nhau. Kết quả cho thấy enzym hoạt động tốt đối với nhiều loại tinh bột như tinh bột gạo tẻ, tinh bột gạo nếp, tinh bột sắn dây, tinh bột sắn ta, tinh bột khoai tây.

Qua những kết quả thu được ở trên, cho phép chúng tôi hy vọng có thể dùng chủng *P. pastoris* GS115 tái tổ hợp để nghiên cứu việc lên men sản xuất α -amylaza lạnh nhằm sử dụng vào các ngành công nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Margesin R., Schinner F., 1999: Biotechnological applications of cold-adapted organism, 15-115.
2. Feller G. et al., 1992: The Journal of Biological Chemistry, 8: 5217-5221.
3. Đỗ Thị Huyền và cộng sự, 2001: Di truyền học và Ứng dụng, 1: 25-30.
4. Fernander J. M., Hoeffler Z. P., 1999: Gene expression system, Academic Press: 159-191.
5. A manual of methods for expression of recombinant proteins in *P. pastoris*. Pichia Expression Kit. Catalog no. K: 171-01.
6. Trương Nam Hải, J. F. Pulitzer, 1996: Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 34(2): 1-5.
7. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 1989: Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor

- Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. engineering and Bioinformatics.
8. Nevoigt E., 1998: First German-Vietnamese Workshop on Genetic 9. Seidman C. E. et al., 1997: Current protocols in Molecular Biology, 1.8.1-1.8.10.

**EXPRESSION OF THE COLD-ADAPTED α -AMYLASE GENE
FROM THE BACTERIUM *PSEUDOALTEROMONAS HALOPLANTIS* STRAIN
505 INTO THE YEAST *PICHA PASTORIS* STRAIN GS115**

DO THI HUYEN et al.

SUMMARY

Cold-active amylase is used in many industries. In the detergent industry, it is added to the detergents to improve the cleaning quality when we use the cold tap water for washing. In the food industry, this enzyme is employed to produce the functional oligosaccharides as sweeteners reducing the tooth decay, to keep the freshness and the flavor of the fruit juice and to improve the quality of alcohol drinks etc., However, the utilization of cold-adapted microorganisms in biotechnology is still very limited. We were interested in the expression of the amylase gene from the bacterium *P. haloplanctis* strain 505 into the yeast *P. pastoris* strain GS115, to get a large amount of cold-adapted α -amylase. For this purpose, the α -amylase gene of *P. haloplanctis* 505 was amplified by PCR using forward and backward primers containing artificial *Sna*BI, *Eco*RI sites respectively. The PCR product was digested completely with *Sna*BI and *Eco*RI and then cloned into *Eco*RI-*Sna*BI sites of the pPIC9 expression vector. The obtained plasmid pPICAmyl was transferred into *P. pastoris* GS115 cells by electroporation. The α -amylase gene in pPICAmyl was under the regulation of the *AOX1* promoter, the *AOX1* terminator and the α -MF signal peptide. Expression results showed that the cold-adapted α -amylase gene in pPICAmyl plasmid functioned well in *P. pastoris* GS115 cells. The recombinant α -amylase was characterized by high amylolytic activities at low temperature range of 5-20°C, secreted effectively into the medium (about 98.4% of the total expressed amylase) and this enzyme hydrolyzed well the starches from different sources such as rice, potato, cassava.

Ngày nhận bài: 21-12-2000

THIẾT KẾ VECTO VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA PROTEIN ĐỘC TỔ *CRYIA(C)* CÓ NGUỒN GỐC TỪ VI KHUẨN *BACILLUS THURINGIENSIS* BẰNG VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI*

LÊ THỊ THU HIỀN, TRỊNH CÔNG SỰ,
TRẦN THỊ PHƯƠNG LIÊN, PHẠM BÍCH NGỌC,
ĐINH DUY KHÁNG, NÔNG VĂN HẢI, LÊ TRẦN BÌNH

Viện Công nghệ sinh học

Trong những năm gần đây, vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) đã được các nhà sinh học đặc biệt quan tâm nghiên cứu ở mức độ phân tử do protein tinh thể độc tố (Insecticidal Crystal Proteins-ICPs) của chúng không những có khả năng kháng côn trùng đặc hiệu với nồng độ độc tố rất thấp mà còn không gây ảnh hưởng đến môi trường sinh thái. Hơn 90 gen *cry* mã hóa cho ICPs đã được tách dòng và đọc trình tự [20]. Các gen này đã được chuyển thành công vào rất nhiều cây trồng tạo khả năng kháng côn trùng cho cây. Thử nghiệm đồng ruộng đầu tiên của cà chua chuyển gen *cry* đã được ba công ty: Monsanto, Sandoz và Agrogenetics tiến hành ở Mỹ vào năm 1988. Sau đó, Crop Genetics International, Agracetus, Calgen ... tiếp tục các thử nghiệm đồng ruộng trên ngô, thuốc lá, khoai tây. Nhờ khả năng kháng côn trùng đặc hiệu, từ năm 1996, cây bông chuyển gen *cryIA(c)* của *Bt* đã được đưa vào sản xuất đại trà [17].

Ở Việt Nam, các nghiên cứu chuyển gen thực vật, bao gồm gen *Bt* và một số gen khác mới được bắt đầu vài năm gần đây [8, 11, 12, 19]. Với mục đích tạo giống cây trồng có khả năng tự kháng sâu bệnh, giảm độ ô nhiễm môi trường do thuốc trừ sâu hóa học gây ra, gần đây tại Viện Công nghệ sinh học (VCNSH), chúng tôi đã thành công trong việc thiết kế một số vector có chứa các gen *cryIA(b)*, *cryIA(c)* tổng hợp hóa học và chuyển các vector này vào cây trồng. Những cây trồng đã chuyển gen *cry* được chúng tôi đánh giá sơ bộ bằng kỹ thuật PCR. Tuy nhiên, kết quả cuối cùng cần phải khẳng định là các cây được chuyển gen có khả năng biểu hiện gen chuyển thành sản phẩm protein

có tính kháng sâu nhờ kỹ thuật lai miễn dịch protein của cây chuyển gen và kháng thể đặc hiệu cho protein Cry của loại gen được chuyển vào cây. Vì vậy, chúng tôi thực hiện công trình thiết kế vector và biểu hiện gen *cryIA(c)* trong *Escherichia coli* (*E. coli*) với mục đích tạo và tinh chế protein CryIA(c) tái tổ hợp để sản xuất kháng thể kháng CryIA(c) nhằm sử dụng để kiểm tra sự có mặt của protein cryIA(c) ở các cây trồng được chuyển gen.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Vector pGEM-4Z mang gen *cryIA(c)* được tổng hợp hóa học và sửa đổi mã do Gs. I. Altosaar, Trường đại học Tổng hợp Ottawa, Canada gửi tặng.

Plasmid pET21d, chủng *E. coli* DH 5 α , BL 21(DE3) do Ts. C. Fukazawa, Viện Nghiên cứu Lương thực quốc gia Nhật Bản hỗ trợ.

Kháng thể kháng CryIA(c) do Gs. Supat Attathom, Trung tâm Kỹ thuật di truyền thực vật, Trường đại học Kasetsart, Thái Lan cung cấp.

Các loại hóa chất dùng trong điện di SDS-PAGE, lai miễn dịch (Western Blotting) được mua của hãng Bio-Rad.

2. Phương pháp

Tách chiết ADN plasmid và các kỹ thuật ADN tái tổ hợp được tiến hành theo Sambrook & cs [14].

Protein được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp của Hames [6].

Điện di protein trên gel polyacrylamit 12,5% (SDS-PAGE) được tiến hành theo phương pháp của Laemmli [9].

Kỹ thuật lai miễn dịch được tiến hành theo phương pháp của Daniel & cs [4].

Kỹ thuật gây miễn dịch sản xuất kháng thể được tiến hành theo Muramatsu & cs [10].

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

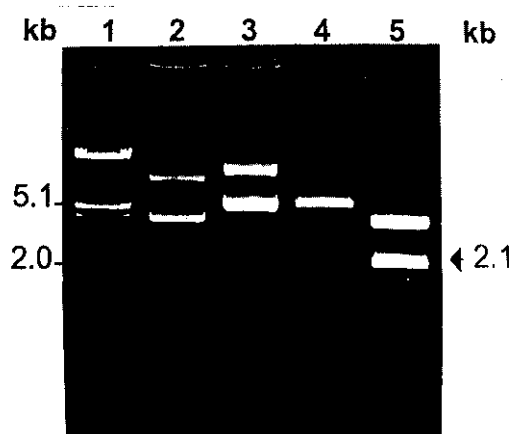
Theo Angenon & cs, các gen *cry* tự nhiên thường có hiệu quả biểu hiện trong thực vật không cao [1]. Vì vậy, rất nhiều nghiên cứu tập trung cải biến các gen *cry* tự nhiên nhằm tăng cường quá trình biểu hiện gen như: thay đổi các mã di truyền theo hướng tăng hàm lượng guanin/xytosin (G/C), cắt bớt gen, chỉ biểu hiện vùng gen *cry* liên quan đến tính độc của protein và sử dụng các promoter mạnh để điều khiển chúng.... Ngoài ra, bằng cách tổng hợp hóa học và thay đổi tối đa mã di truyền của các gen *cry* cũng làm tăng quá trình sinh tổng hợp ARN_m (mRNA) và protein [5, 8]. Theo hướng này, nhóm nghiên cứu của I. Altosaar tại Trường đại học Tổng hợp Ottawa, Canada đã cải biến và tổng hợp hóa học các đoạn gen *cryIA(b)* và *cryIA(c)* dài 1845 bp trên cơ sở các thông tin đã biết về gen *cry*. Các nghiên cứu chuyển gen thực vật sử dụng các gen *cry* tổng hợp hóa học

đã được tối ưu hóa về mã di truyền, đã làm tăng tính độc của ICPs lên nhiều lần [3, 13, 15]. Các gen *cry* này được chúng tôi sử dụng trong thiết kế vector để chuyển vào cây trồng.

1. Thiết kế vector biểu hiện gen *cryIA(c)*

Nhóm gen *cryI*, mã hóa cho các protein có tính độc đối với côn trùng bộ cánh vảy (*Lepidoptera*), có phân tử lượng từ 130 - 140 kDa và bao gồm 7 nhóm phụ ký hiệu từ *cryIA* đến *cryIF*. Trong đó *cryIA* được phân thành 3 nhóm nhỏ là *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIA(c)* [17]. Protein độc tố mã hóa bởi mỗi nhóm *cryI* đặc hiệu với những loài côn trùng thuộc bộ cánh vảy nhất định. Nhóm *CryIA* với cấu trúc tương đồng có phổ hoạt động trên các loài côn trùng khá giống nhau [7]. Các gen *cry* tự nhiên như: *cryIAa*, *cryIac*, *cryIab*, *cryIF* và *cryIIAa* đã được tách dòng và biểu hiện trong *E. coli*, sử dụng nhiều hệ vector biểu hiện khác nhau để nghiên cứu cấu trúc phân tử của gen *cry* và hoạt tính kháng côn trùng của độc tố protein [2, 16]. Trong khi đó, các gen *cry* được tổng hợp bằng con đường hóa học chưa được nghiên cứu biểu hiện trong tế bào *E. coli*.

Để có thể biểu hiện được gen *cryIA(c)* trong *E. coli*, trình tự nucleotit của gen trong quá trình thiết kế lắp ráp vào vector phải đảm bảo có mã khởi đầu (ATG) và mã kết thúc (UAA, UAG, UGA). Do đó, chúng tôi sử dụng 2 enzym hạn chế là *NcoI* và *BamHI* để tạo mã khởi đầu và mã kết thúc trong gen *cryIA(c)*.



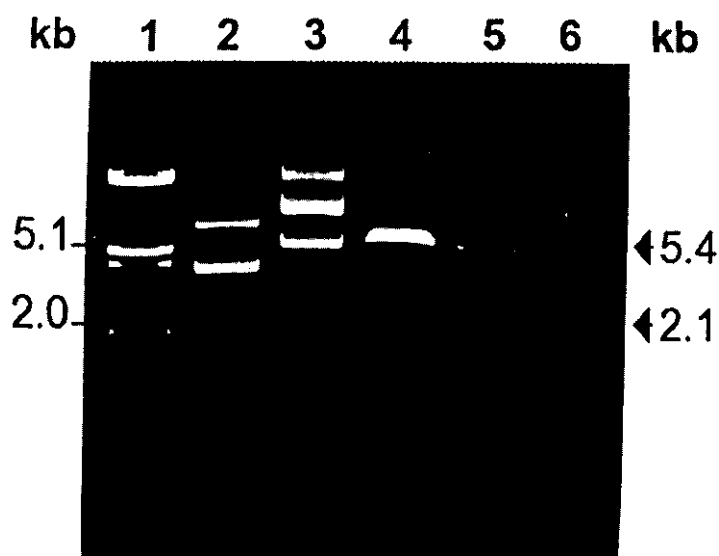
Ảnh 1. Xử lý vector pGEM-4Z-*cryIA(c)* và pET21d bằng enzym hạn chế

1. ADN λ /EcoRI+HindIII; 2. pET21d; 3. pGEM-4Z-*cryIA(c)*;
4. pET21d/ *NcoI*+*BamHI*; 5. pGEM-4Z- *cryIA(c)*/ *NcoI*+*BamHI*

Bước đầu tiên, chúng tôi tiến hành tách chiết đoạn gen *cryIA(c)* kích thước 2,1 kb từ vector pGEM-4Z bằng cách xử lý với hai enzym hạn chế *NcoI* và *BamHI*. Sau đó, tinh chế đoạn gen *cryIA(c)* sử dụng phương pháp chiết bằng điện di trong túi thẩm tích và gắn vào vector biểu hiện pET21d đã được mở vòng trước đó cũng bằng hai enzym này (hình 1). Tiếp theo, sản phẩm lai được biến nạp vào tế bào chủng *E. coli* DH5 α và được nuôi cấy trên môi trường chứa ampicilin (Amp). Tách chiết plasmid các khuẩn lạc sau biến nạp và kiểm tra sơ bộ bằng điện di trên gel agarosa 0,8%. Các plasmid có kích thước lớn hơn pET21d (mẫu đối chứng) được sử dụng để

cắt kiểm tra bằng *NcoI* và *BamHI*.

Sản phẩm theo tính toán lý thuyết của plasmid tái tổ hợp có mang gen *cryIA(c)* cắt bởi *NcoI* và *BamHI* là hai đoạn gen. Đoạn 1 có kích thước khoảng 5,4 kb (tương ứng với kích thước của vector pET21d) và đoạn 2 có kích thước ~2,1 kb (tương ứng với kích thước của gen *cryIA(c)*). Kết quả trên ảnh 2 cho thấy dòng plasmid chúng tôi dự đoán chứa gen *cryIA(c)*, sau khi cắt bằng *NcoI* và *BamHI*, đã tạo ra các đoạn có kích thước đúng theo tính toán lý thuyết: đoạn 1 dài khoảng 5,4 kb; đoạn 2 dài khoảng 2,1 kb. Chúng tôi ký hiệu vector tái tổ hợp là pET21d-*cryIA(c)*.



Ảnh 2. Kết quả cắt kiểm tra vector biểu hiện pET21d- *cryIA(c)* bằng enzym hạn chế

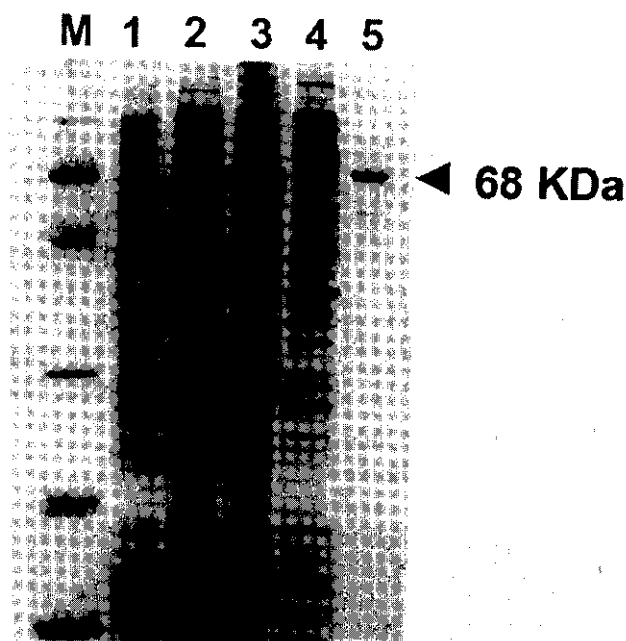
1. ADN λ /EcoRI+HindIII; 2. pET21d; 3. pET21d-*cryIA(c)*
4. pET21d-*cryIA(c)*/NcoI+ *BamHI*; 5. pET21d/NcoI+*BamHI*;
6. Đoạn gen *cryIA(c)* sau khi tinh chế

2. Biểu hiện gen *cryIA(c)* bằng vi khuẩn *E. coli*

Một số phương pháp truyền thống thường được sử dụng để nghiên cứu sự biểu hiện gen mã hóa protein tinh thể độc tố của *Bt* là phương pháp điện di trên gel polyacrylamit và phương pháp lai miễn dịch với kháng thể đa dòng kháng các loại protein tinh thể độc tố.

Theo những hướng nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành biến nạp vector pET21d-*cryIA(c)* vào tế bào chủng *E. coli* BL21(DE3) (chủng có

khả năng biểu hiện cao) và biểu hiện protein tái tổ hợp trong môi trường nuôi cấy có bổ sung chất cảm ứng 1mM IPTG (isopropyl β -D-thiogalatoxit). Sinh khối tế bào sau 3 giờ nuôi cấy được phá vỡ bằng siêu âm trong dung dịch lysozym có chứa 0,1 mM PMSF (phenyl metasulphonyl fluorit). Quá trình biểu hiện gen được xác định qua việc xuất hiện phân tử protein mới ở cận tế bào trên gel điện di SDS-PAGE. Protein CryIA(c) tái tổ hợp được tinh chế bằng phương pháp điện di trong túi thẩm tích.



Ảnh 3. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện gen *cryIA(c)* và tinh chế protein CryIA(c) tái tổ hợp

M: marker chuẩn

1. Protein tổng số của *E. coli* (đối chứng); 2. Protein tổng số chủng *E. coli* mang gen *cryIA(c)*
3. Cặn tế bào sau khi xử lý bằng lysozym; 4. Dịch nổi tế bào sau khi xử lý bằng lysozym;
5. Protein CryIA(c) tái tổ hợp được tinh chế bằng phương pháp thẩm tích

Các nghiên cứu cho thấy những phân tử protein độc tố do nhóm gen *cryIA* mã hóa thường tồn tại ở dạng tiền độc tố (protoxin) và chứa tới hơn 80% trình tự tương đồng. Tiền độc tố CryIA có phân tử lượng khoảng 130-140kDa và gồm hai phần: phần đầu N mang độc tính với kích thước khoảng 60-70 kDa và phần đầu C kích thước khoảng 60-70 kDa giàu xystein liên quan đến quá trình kết tinh [7, 20]. Gen *cryIA(c)* chúng tôi sử dụng đã được cắt bớt phần mã hóa cho đầu C, chỉ giữ lại phần mã hóa cho protein độc tố có kích thước theo tính toán lý thuyết là 68,635 kDa (không kể methionin thường bị loại bỏ sau dịch mã). Như vậy, băng protein mới xuất hiện đậm nét trên gel SDS-PAGE có kích thước khoảng 68 kDa, tương ứng với kích thước của đoạn mang tính độc.

Cũng cần nhấn mạnh thêm, gen *cryIA(c)* trên không chỉ được cắt bớt, mà còn được biến đổi nhiều như tăng trình tự G/C trong mã di

truyền để tăng cường sự biểu hiện gen ở thực vật. Do một số nghiên cứu cho thấy tỷ lệ khá cao của adenin/thymin (A/T) trong gen *cry* là nguyên nhân kìm hãm sự biểu hiện của chúng ở cây trồng. Mã giàu A/T như vậy rất hiếm gặp ở thực vật. Hiệu quả biểu hiện của gen *cry* tăng lên rất nhiều khi được thay đổi mã di truyền cho phù hợp mã thực vật và giữ nguyên trình tự axit amin [5, 8, 13, 15].

3. Lai miễn dịch

Rất nhiều chủng *Bt* tự nhiên đã được xác định chứa nhiều protein tinh thể độc tố nhờ phương pháp lai miễn dịch với kháng thể đa dòng. Để khẳng định chính xác bằng protein mới xuất hiện là CryIA(c), chúng tôi tiến hành phản ứng lai miễn dịch sử dụng kháng thể kháng CryIA(c).

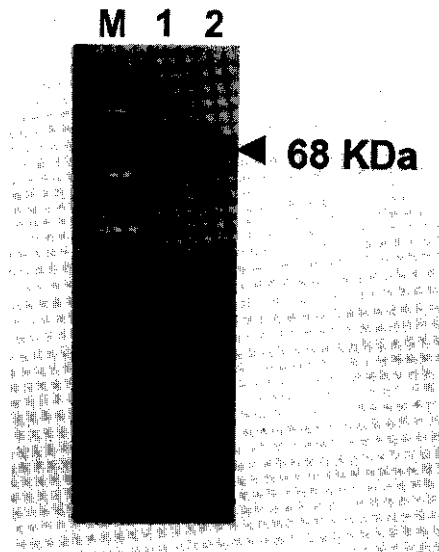
Kết quả lai dương tính trên ảnh 4 cho thấy gen cải biến *cryIA(c)* đã được biểu hiện mạnh ở

chúng *E. coli* BL21 (DE3) với hệ vectơ pET21d, protein tái tổ hợp khá ổn định và không bị phân hủy. Băng protein chính xuất hiện trên cột 2 có kích thước phân tử phù hợp với kích thước phân tử của CryIA(c) theo tính toán lý thuyết. Đặc biệt, CryIA(c) tái tổ hợp sau khi tinh chế, đã lai rất đặc hiệu với protein tái tổ hợp chúng tôi sử dụng để phát hiện CryIA(c). Sản phẩm lai chỉ xuất hiện một băng duy nhất (cột 1).

Việc biểu hiện thành công gen *cry* trong *E. coli* có một ý nghĩa vô cùng quan trọng. Đặc biệt, khi vectơ Ti-plasmit mang kết cấu gen ubiquitin-*cry*IA(c) do chúng tôi thiết kế, đã và đang được Phòng Công nghệ tế bào thực vật, VCNH chuyển vào lúa và các loại cây trồng khác. Ngoài ra, các nghiên cứu chuyển gen *cry*

trên đối tượng cây ngô cũng đang được triển khai trong chương trình hợp tác với Viện Nghiên cứu ngô thuộc Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Phương pháp phát hiện protein tinh thể độc tố trong các cây lúa, ngô... chuyển gen *cry* cần phải có kháng thể (sản xuất trên cơ sở Cry tái tổ hợp). Như vậy, Cry tái tổ hợp sẽ được sử dụng để kiểm tra các cây trồng chuyển gen này. Hơn nữa, Cry tái tổ hợp cũng có thể dùng trong mô hình thử nghiệm ở quy mô phòng thí nghiệm để nghiên cứu tác động của độc tố lên các loại côn trùng khác nhau.

Qua kết quả lai miễn dịch, có thể khẳng định chúng tôi đã thành công trong việc biểu hiện gen *cry*IA(c) ở vi khuẩn *E. coli*.



Ảnh 4. Lai miễn dịch protein CryIA(c) tái tổ hợp với kháng thể kháng CryIA(c)

M: Marker chuẩn,

1. Lai miễn dịch protein CryIA(c) tái tổ hợp sau khi tinh chế;

2. Lai miễn dịch protein tổng số của *E. coli* mang gen *cry*IA(c).

4. Sản xuất kháng thể

Sản phẩm protein CryIA(c), sau khi tinh chế và kiểm tra, đã được chúng tôi sử dụng để gây miễn dịch sản xuất kháng thể kháng CryIA(c) dùng trong kiểm tra các cây chuyển gen. Đầu tiên, protein Cry được trộn với tá chất Freund toàn phần với tỷ lệ 1 : 1 (1 ml dung dịch chứa khoảng 200 µg protein CryIA(c) tinh chế + 1ml

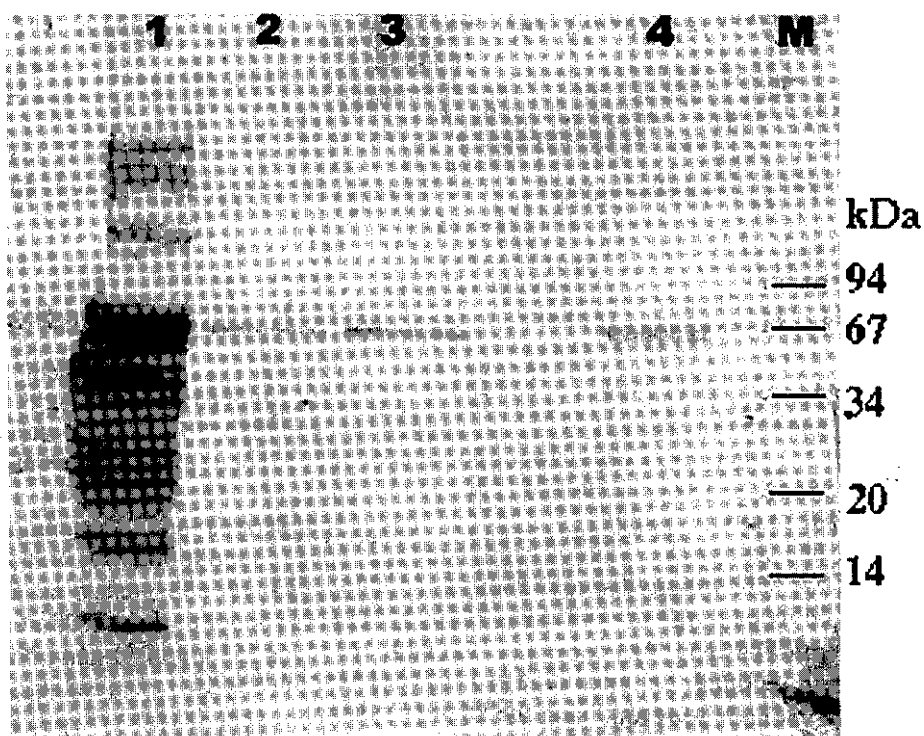
tá chất Freund toàn phần) và tiêm dưới da ở hai bên hông gần sống lưng thỏ. Sau đó, tiến hành tiêm nhắc lại vào các ngày thứ 5, 10 và 30. Đến ngày thứ 10 tính từ lần tiêm cuối cùng, chúng tôi tiến hành lấy máu thỏ và thu huyết thanh. Cần chú ý, khi thu huyết thanh ở thỏ, cần lấy máu ở động mạch, thao tác nhẹ nhàng tránh làm vỡ hồng cầu. Máu sau khi thu được ủ ở 37°C

trong 90 phút, giữ lạnh 90 phút ở 4°C và đem ly tâm với tốc độ 2000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng. Thu lấy dịch huyết thanh nổi và đem đông khô.

Để kiểm tra chất lượng kháng thể thu được, chúng tôi đã tiến hành lai miễn dịch với 3 loại kháng nguyên: i) Kháng nguyên tái tổ hợp CryIA(c) do chúng tôi tinh chế; ii) Kháng nguyên CryIA(b) (nhận được từ Ts. Nguyễn Thị Lộc, Bộ môn Sinh thái côn trùng và Phòng trừ sinh học, Viện Lúa đồng bằng sông Cửu Long); iii) Protein Cry tách chiết từ *Bt* chủng Hd1 (do Ts. Võ Thị Thứ cung cấp). Kết quả lai ở cả ba mẫu thí nghiệm trên (ảnh 5 - cột 1, 2, 3) đều

xuất hiện một vạch có kích thước khoảng 68 kDa.

Chúng tôi cũng đồng thời tiến hành thí nghiệm kiểm tra chất lượng kháng nguyên CryIA(c) chúng tôi tinh chế được, bằng cách lai miễn dịch với kháng thể chuẩn kháng CryIA(c) (do Ts. Nguyễn Thị Lộc cung cấp). Sản phẩm lai (ảnh 5, cột 4) xuất hiện một vạch có kích thước khoảng 68 kDa. Kết quả dương tính này một lần nữa khẳng định chúng tôi đã tinh chế được protein CryIA(c) tái tổ hợp. Những kết quả trên cho thấy kháng thể chúng tôi sản xuất được có chất lượng tốt và có thể sử dụng để phân tích các cây trồng được chuyển gen *cryIA(c)*.



Ảnh 5. Lai miễn dịch protein Cry tái tổ hợp với i) kháng thể kháng CryIA(c) sản xuất tại VCNSH (cột 1,2,3); ii) kháng thể chuẩn (cột 4)

1, 4. Protein CryIA(c) tái tổ hợp sản xuất tại VCNSH; 2. Protein CryIA(b) nhận được từ Ts. N.T.Lộc
3. Protein CryIA(c) tách chiết từ chủng Hd1; M. Marker chuẩn

III. KẾT LUẬN

Bằng kỹ thuật di truyền, chúng tôi đã:

1. Thiết kế được vector biểu hiện gen *cryIA(c)* mã hóa cho protein độc tố ở vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (*Bt*).

2. Biểu hiện được gen *cryIA(c)* mã hóa cho protein độc tố ở *Bt* trong *Escherichia coli*. Kết quả Western Blotting khẳng định các protein CryIA(c) tái tổ hợp có phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng CryIA(c).

3. Tinh chế được protein CryIA(c) tái tổ hợp

sử dụng trong việc sản xuất kháng thể kháng CryIA(c).

4. Sản xuất được một lượng lớn kháng thể kháng protein tái tổ hợp CryIA(c) để sử dụng trong các thí nghiệm phân tích cây trồng chuyển gen sau này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Angenon G., Van Montagu M., 1992: Biotechnology and crop improvement in Asia: 181-199.
2. Chakrabarti S. K. et al., 1998: Current Science, 75(7): 663-664.
3. Cheng X. et al., 1998: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 2767-2772.
4. Daniel M. B., Michael D. R., Edelstein S. J., 1996: Protein methods, 2d Ed Wiley-Liss, Inc.
5. Diehn S. H. et al., 1998: Plant Physiol., 117: 1433-1443.
6. Hames B. D., Rickwood D., 1989: Gel electrophoresis of protein: A practical approach, 2nd IRL, Press, Oxford.
7. Hofte H., Whiteley H. R., 1989: Microbiological reviews, 53(2): 242-255.
8. Lê Thị Thu Hiền & cs., 1998: Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học: 31-39.
9. Laemmli U. K., 1970: Nature, 227: 680-685.
10. Muramatsu M., Fukazawa C., 1993: Eur. J. Biochem, 215: 123-132.
11. Nguyễn Thị Thanh và cộng sự, 1998: Tóm tắt Báo cáo Hội nghị toàn quốc lần thứ nhất về Công nghệ sinh học cây lúa. Huế.
12. Phan Tố Phượng & cs., 1998: Tạp chí Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm, 2: 56-57.
13. Riazuddin S. et al., 1996: Rice Genetics, III: 730-734.
14. Sambrook J., Russell D. W., 1989: Molecular cloning I, III. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
15. Sardana R., Altosaar I., 1996: Rice Genetics, III: 723-729.
16. Sekar V. et al., 1987: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7036-7040.
17. Stewart S. D. et al., 2001: J. Econ. Entomol., 94(3): 752-760.
18. Tolin S., 1994: Pan European Conference on the potential long term ecological impact of GMOs: 57-58.
19. Trần Thị Phương Liên, Nông Văn Hải, 1997: Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 2: 23-27.
20. Udayasuriyan Y. et al., 1994: Biosci. Biotech. Biochem., 58(5): 830-835.

CONSTRUCTION AND EXPRESSION OF A GENE ENCODING AN INSECTICIDAL CRYSTAL PROTEIN CRYIA(C) IN *ESCHERICHIA COLI*

LE THI THU HIEN et al.

SUMMARY

An expression vector designated as pET21d-cryIA(c) for a synthetic insecticidal crystal gene *cryIA(c)* has been constructed by using a 2.1kb *NcoI/BamHI* fragment containing the entire coding region of *cryIA(c)*, originated from pGEM-4Z vector. This fragment was firstly inserted into the expression vector pET21d which had been cleaved with *NcoI/BamHI* and then expressed in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3).

When the total proteins were separated by SDS-PAGE, a major band was found in the cell extract of *E. coli* strain containing the expression vector. This recombinant protein has a molecular mass of 68 kDa as predicted.

The production of CryIA(c) protein in *E. coli* was examined immunologically using a specific antibody raised against CryIA(c), provided by the Center for Plant Genetic Engineering, Kasetsart University-Thailand.

Positive results from this Western blot analysis confirmed the inductive expression of the *cryIA(c)* gene in *E. coli*.

In addition, this recombinant protein was used as an antigen for immunizing the rabbit to produce the antibody against CryIA(c) that needs for analyzing the plant transformed with *cryIA(c)* gene.

Works on mobilizing this gene into plant binary vectors together with other insect resistance genes for expression in plants are in progress.

Ngày nhận bài: 29-11-2001

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG THỦY PHÂN TINH BỘT SẢN DẠNG HẠT CHƯA QUA HỒ HÓA CỦA AMYLaza BẰNG KÍNH HIỂN VI ĐIỆN TỬ

HOÀNG KIM ANH, NGÔ KẾ SƯƠNG

Viện Sinh học nhiệt đới

NGUYỄN XÍCH LIÊN

Trường đại học Bách khoa Tp. HCM

NGUYỄN KIM GIAO

Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

Tinh bột dạng hạt chưa hồ hóa thường rất bền với tác dụng của amylaza cũng như của các tác nhân hóa học khác. Quá trình hồ hóa tinh bột bằng nhiệt dẫn đến phá vỡ cấu trúc hạt, tạo điều kiện để enzym xâm nhập và thủy phân cơ chất. Đây cũng là giai đoạn bắt buộc trong sản xuất các sản phẩm tinh bột thủy phân trong công nghiệp. Tuy nhiên, chi phí cho hồ hóa tinh bột bằng nhiệt thường rất cao nên các nghiên cứu về thủy phân tinh bột chưa hồ hóa luôn là một vấn đề được quan tâm [3, 4]. Đã có một số nghiên cứu về các enzym thủy phân tinh bột chưa hồ hóa. Đa số khả năng này thuộc về glucoamylaza (GA) [6]. Một số tác giả cũng đề cập tới khả năng thủy phân hạt tinh bột bởi α -amylaza từ vi khuẩn *B.subtilis* [2] và *Lac. amylovorus* [7].

Trong nghiên cứu này, α -amylaza từ vi khuẩn *Bac. subtilis* (so sánh với Termamyl 120L), amylaza từ nấm mốc *Asp. oryzae* và *Asp. kawasaki* (so sánh với GA từ *Asp. niger* của hãng Novo) được sử dụng để thủy phân tinh bột sản chưa hồ hóa. Cấu trúc hạt tinh bột, khả năng hấp phụ của amylaza lên bề mặt của hạt gắn liền với khả năng thủy phân của enzym được nghiên cứu bằng kính hiển vi điện tử quét.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Tinh bột sản của hãng Vedan được sử dụng làm nguyên liệu thủy phân.

Nguồn enzym: α -amylaza từ *Bac.subtilis* của Viện Sinh học nhiệt đới (Viện SHND), tinh sạch từ enzym thô bằng cách rửa bằng polyetylglycol hoặc cồn ethylic ở nhiệt độ thấp; amylaza tinh sạch từ môi trường bề mặt gạo lức của nấm mốc *Asp. oryzae* (Viện SHND) và *Asp. kawasaki* (chủng thương mại của Nhật Bản); enzym đối chứng là Termamyl 120L và GA của hãng Novo.

2. Phương pháp

a) Thủy phân tinh bột sản dạng hạt chưa hồ hóa

Tinh bột sản dạng hạt nồng độ 1% không qua hồ hóa được thủy phân bằng các amylaza nấm mốc và vi khuẩn tại những điều kiện pH và nhiệt độ thích hợp. Sau mỗi 2 giờ, mẫu được ly tâm ở 12.000 g trong 10 phút. Lượng đường khử tạo ra trong phản ứng dịch bên trên được xác định theo phương pháp của Miller [8]. Phần tinh bột còn lại được rửa bằng cồn và nước cất, sau đó sấy đông khô hoặc sử dụng trực tiếp để kiểm tra các thay đổi về hình thái học của hạt tinh bột bằng kính hiển vi điện tử quét.

b) Hấp phụ amylaza lên hạt tinh bột sản chưa hồ hóa

Amylaza từ chủng *Aspergillus* sp. được cho vào dung dịch tinh bột sản 10 mg/ml trong dung dịch đệm axetat pH = 4,5 với lượng 5 μ g protein/1mg tinh bột. α -amylaza từ các chủng *B. subtilis*, *B. licheniformis* được cho vào dung dịch tinh bột sản 10 mg/ml trong dung dịch đệm

phốtphat pH = 5,7 với lượng 8-10 μg protein/1mg tinh bột. Hỗn hợp được lắc nhẹ ở 4°C trong 1 giờ, sau đó ly tâm 10 phút ở 12.000 g. Nồng độ protein còn lại trong phân dịch được xác định theo phương pháp Bradford và so sánh với nồng độ ban đầu để tính lượng protein hấp phụ lên tinh bột. Khả năng enzym hấp phụ lên bề mặt hạt tinh bột cũng được kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử quét và bằng cách xác định hoạt tính enzym trước và sau khi lắc với tinh bột sắn.

c) *Sử dụng kính hiển vi điện tử để nghiên cứu sự thay đổi hình thái của hạt tinh bột*

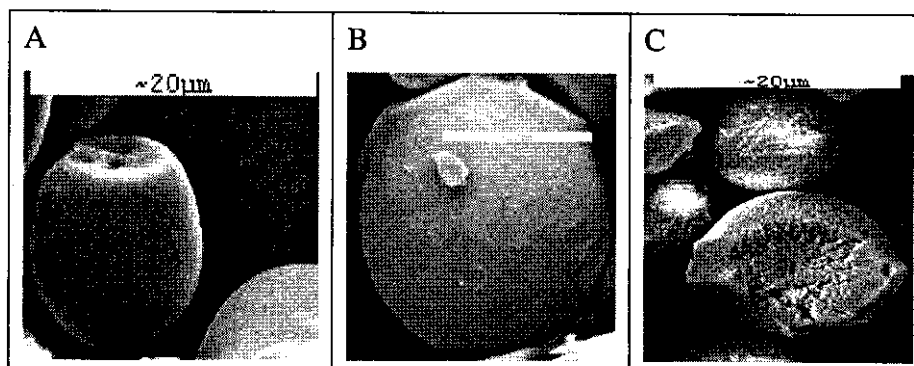
Cấu trúc của hạt tinh bột và các thay đổi hình thái học của hạt được phân tích trên kính hiển vi điện tử thuộc PTN SEM&EDS, Trung tâm Khoa học vật liệu, Khoa Vật lý, Trường đại học Khoa

học tự nhiên (ĐHQGHN). Các hạt tinh bột được gắn lên để mẫu bằng keo dán các bon có tính dẫn điện và tiếp đó phủ một lớp vàng với chiều dày 20 nm bằng thiết bị Sputter JFC-1600. Mẫu được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét JSM 5410 LV với điện áp 10-30 kV.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Cấu trúc của hạt tinh bột sắn

Thành phần và cấu trúc của tinh bột là những yếu tố rất quan trọng quyết định khả năng tinh bột bị phân hủy bởi enzym hay các tác nhân hoá, lý khác. Đã có nhiều nghiên cứu về cấu trúc tinh thể của tinh bột, chủ yếu là tinh bột bắp và khoai tây [5]. Các nghiên cứu về tinh bột sắn còn ít, đặc biệt ở Việt Nam chưa có một công bố nào liên quan đến đề tài này.



Ảnh 1. Đặc điểm hình thái học của hạt tinh bột sắn

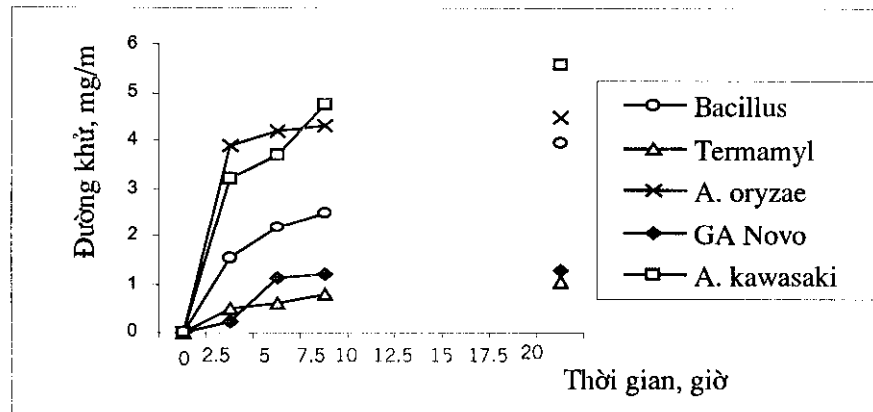
Ghi chú: A: Hình dạng đặc trưng của hạt tinh bột sắn, B: Bề mặt nhẵn của hạt tinh bột sắn, C: Cấu trúc xếp bên trong hạt tinh bột sắn khi enzym xâm nhập.

Tinh bột sắn có nhiều hình dạng, chủ yếu hình tròn hay hình trứng vát đầu, có một chỗ lõm và nูน ở giữa (ảnh 1A). So với nghiên cứu của nhóm tác giả Balagopalan [1] thì các kết quả thu được tương tự như các công bố đã biết về tinh bột sắn. Kích thước của hạt tinh bột nằm trong giới hạn từ 10-15 μm . Bề mặt hạt tinh bột nhẵn (ảnh 1B). Khi hạt tinh bột sắn bị vỡ, có thể thấy các rãnh tạo cấu trúc xếp của hạt (ảnh 1C). Các rãnh vô định hình kéo dài từ bề mặt tới tâm của hạt làm thành các lỗ xếp cũng được Kossman đề cập khá kỹ trong bài viết tổng quan

về tinh bột [5]. Tinh bột sắn có cấu trúc hạt tương đối xếp, liên kết giữa các phần tử trong cấu trúc tinh thể yếu, vì vậy nó dễ bị phân huỷ bởi các tác nhân như axit, enzym, hơn so với các loại hạt khác như bắp, gạo.

2. Khả năng thủy phân tinh bột sắn chưa hồ hóa của amylaza

Amylaza từ vi khuẩn và nấm mốc được sử dụng để thủy phân tinh bột sắn dạng hạt chưa hồ hóa. Kết quả thủy phân được xác định qua lượng đường khử tạo ra và bằng các quan sát trên kính hiển vi điện tử.

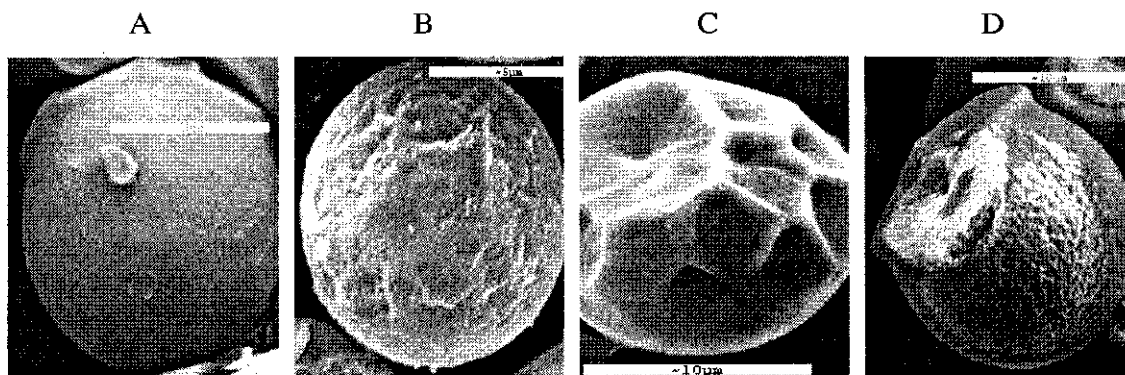


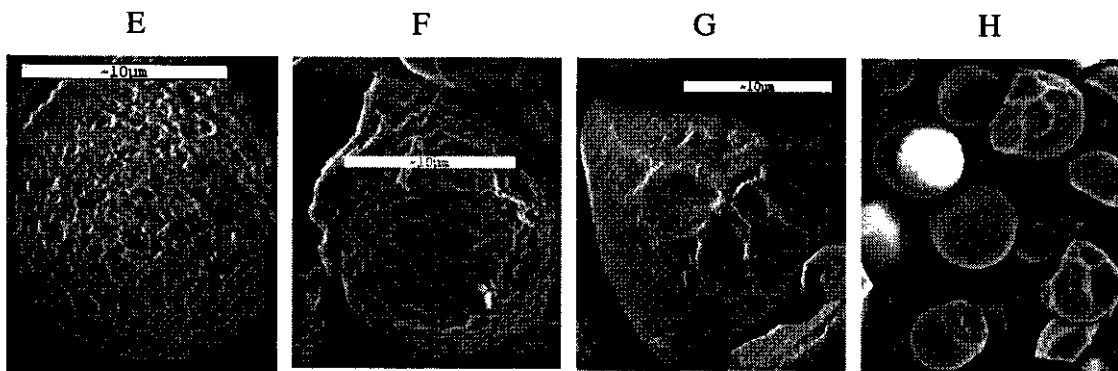
Hình 1. Lượng đường khử tạo ra khi thủy phân tinh bột sắn dạng hạt

Theo kết quả trên ảnh 2, cả 5 loại amylaza sử dụng ít hoặc nhiều đều có khả năng thủy phân hạt tinh bột sắn chưa hồ hoá. α -amylaza vi khuẩn tấn công hạt tinh bột sắn, tạo thành nhiều lỗ nhỏ trên bề mặt, sau 24 giờ thủy phân, bề mặt hạt bị rỗ như tổ ong (ảnh 2E, 2F). Lượng đường khử tạo ra trong phần dung dịch không nhiều (hình 1). Với α -amylaza từ nấm mốc *A. oryzae*, lượng đường khử tạo ra nhanh trong thời gian 3 giờ đầu nhưng sau đó, tác động thủy phân lên hạt tinh bột sắn tăng không đáng kể do α -amylaza nấm mốc chịu nhiệt kém hơn so với α -amylaza vi khuẩn. Trong ba loại α -amylaza đã sử dụng, enzym từ *B. subtilis* có tác dụng thủy phân hạt tinh bột sắn mạnh nhất. Khác với α -amylaza, GA nấm mốc có xu hướng tạo một vài lỗ lớn và sâu trên bề mặt hạt tinh bột (ảnh 2B, 2C). Có thể tác động thủy phân bắt đầu bằng việc hấp phụ lên bề mặt hạt, từ vị trí đó các gốc glucoza được tách dần khỏi mạch tinh bột nhờ tác động của enzym. Lượng đường khử tạo ra trong

dịch cao hơn so với trường hợp sử dụng α -amylaza vi khuẩn (hình 1), GA từ *A. kawasaki* có khả năng thủy phân hạt tinh bột sắn mạnh hơn hẳn so với GA của hãng Novo, Đan Mạch.

Khi sử dụng đồng thời 2 enzym, α -amylaza tác động làm lộ ra các đầu không khử tạo điều kiện cho sự xâm nhập của GA. GA thủy phân sâu vào bên trong giúp α -amylaza có thể tấn công vào những lớp cấu trúc tinh thể tiếp theo [4]. Khi thủy phân hạt tinh bột sắn bằng α -amylaza từ *B. subtilis* và GA từ *A. kawasaki*, sau 24 giờ, các hạt tinh bột bị thủy phân sâu sắc và bị cắt thành các mảnh nhỏ (ảnh 2G). Các quan sát trên kính hiển vi điện tử cũng cho thấy, dường như các amylaza không tấn công các hạt tinh bột đồng thời cùng một lúc. Có thể thấy nhiều hạt tinh bột với những dấu hiệu bị thủy phân rõ ràng bên cạnh những hạt tinh bột còn gần như nguyên vẹn (ảnh 2H). Colonna P. [2] cho rằng enzym tấn công tinh bột từng hạt một còn axit thì lại tấn công đồng thời tất cả các hạt.





Ảnh 2. Hạt tinh bột khi bị các amylaza tấn công

Ghi chú: A: Hạt tinh bột sắn khi chưa bị enzym tấn công. B, C: Hạt tinh bột sắn bị tấn công bởi GA của *A. niger* (enzym của hãng Novo) và GA của *A. kawasaki*. D, E, F: Hạt tinh bột sắn bị tấn công bởi α -amylaza của nấm mốc *A. oryzae*, vi khuẩn *B. licheniformis* (Termamyl 120 L) và *B. subtilis*. G, H: Hạt tinh bột sắn bị tấn công đồng thời bởi α -amylaza, GA và amylaza của nấm mốc *A. kawasaki*.

3. Khả năng hấp phụ của amylaza lên bề mặt hạt tinh bột sắn

Enzym từ *A. oryzae*, *A. kawasaki* và *B. subtilis* (dịch enzym sạch), Termamyl 120L và GA của hãng Novo được tiến hành hấp phụ lên bề mặt của hạt tinh bột.

Bảng

Kết quả hấp phụ enzym lên bề mặt của hạt tinh bột sau 30 phút

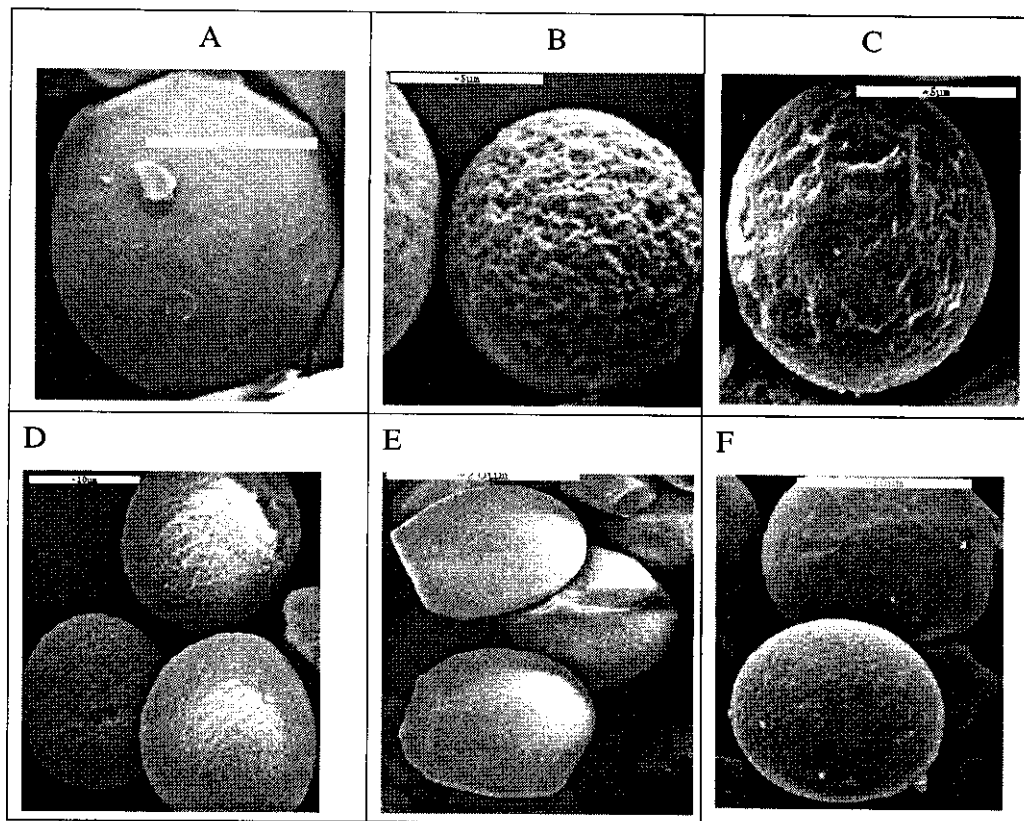
Nguồn enzym	Thí nghiệm 1			Thí nghiệm 2	
	Hoạt tính α -amylaza (đv/1 mgTB)	Hoạt tính GA (đv/1mg TB)	% protein hấp phụ lên tinh bột	Hàm lượng protein tan (mg/1mg TB)	% protein hấp phụ lên tinh bột
Termamyl 120L	8,0	1,25	Không có hiện tượng hấp phụ	50	Không có hiện tượng hấp phụ
<i>Bac. subtilis</i>	8,0	1,25	Không có hiện tượng hấp phụ	50	Không có hiện tượng hấp phụ
<i>Asp. oryzae</i>	1,4	2,0	Không có hiện tượng hấp phụ	50	Không có hiện tượng hấp phụ
<i>A. kawasaki</i>	0,6	2,0	8,69	50	5,13
GA Novo (<i>A. niger</i>)	0,13	2,0	7,67	50	3,1

Theo kết quả ở bảng trên, ta thấy: khi thủy phân hạt tinh bột sắn, khoảng 5-10% amylaza từ nấm mốc hấp phụ lên bề mặt hạt (ảnh 3C, 3F) trong khi amylaza vi khuẩn lại không có khả

năng này (ảnh 3B, 3E). Tuy nhiên, α -amylaza từ nấm mốc *A. oryzae* lại không hấp phụ lên bề mặt hạt khi thủy phân chúng (ảnh 3D). Điều đó cho thấy khả năng hấp phụ lên hạt tinh bột

ngoài phụ thuộc vào nguồn enzym là nấm mốc hay vi khuẩn, còn phụ thuộc vào đó là α -amylaza hay GA. Trong trường hợp thủy phân bằng GA từ *A. kawasaki* và *A. niger* (GA Novo), trên bề mặt

hạt tinh bột có những chấm trắng với kích thước khoảng 0,1 μm (ảnh 3C, 3F), tuy nhiên cần nghiên cứu sâu hơn để có thể khẳng định đó có phải là các phân tử enzym hay không.



Ảnh 3. Các quan sát trên kính hiển vi điện tử quét về hiện tượng hấp phụ enzym trên bề mặt hạt tinh bột

Ghi chú: A: tinh bột sắn. B, C: hạt tinh bột sắn xử lý với α -amylaza từ *Bac. subtilis* sau 6 giờ thủy phân và GA từ *A. niger* sau 24 giờ thủy phân (kích thước 5 μm). D: hạt tinh bột sắn xử lý với α -amylaza từ *A. oryzae*, *B. licheniformis* (Termamyl 120L) và GA từ *A. kawasaki* (kích thước 10 μm).

III. KẾT LUẬN

Hạt tinh bột sắn chủ yếu hình tròn hay hình trứng vát đầu, có một chỗ lõm và núm ở giữa, có cấu trúc hạt tương đối xốp, liên kết giữa các phân tử trong cấu trúc tinh thể yếu nên dễ bị phân hủy bởi các tác nhân như axit, enzym.

Cả 5 loại amylaza sử dụng ít hoặc nhiều đều có khả năng thủy phân hạt tinh bột sắn chưa hồ hóa. Trong ba loại α -amylaza đã sử dụng, enzym từ *Bac. subtilis* có tác dụng thủy phân loại cơ chất này mạnh nhất. Enzym từ *Asp.*

kawasaki có khả năng thủy phân hạt tinh bột sắn chưa hồ hóa mạnh hơn hẳn so với GA của hãng Novo. α -amylase vi khuẩn tấn công hạt tinh bột sắn, tạo thành nhiều lỗ nhỏ còn GA có xu hướng tạo những lỗ lớn và sâu trên bề mặt hạt tinh bột. Sử dụng đồng thời hai loại amylaza giúp tăng hiệu suất thủy phân. Hiện tượng hấp phụ trên bề mặt hạt tinh bột gắn liền với khả năng thủy phân của GA nấm mốc.

Khả năng thủy phân hạt tinh bột sắn sống so với tinh bột sắn đã hồ hóa của các amylaza còn thấp. Nâng cao hiệu suất thủy phân dạng cơ chất

này là một hướng nghiên cứu mới trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Balagopalan C., 1988: Cassava in Food, Feed and Industry, CRC Press Inc. Florida.
2. Colonna P. et al., 1988: Biotechnol. Bioeng., 31: 895-904.
3. Fogarty W. M., 1990: Recent advances in microbial amylases. Microbial enzymes and biotechnology 2nd edition, Elsevier science publisher LTD, London and New York.
4. Fujii M. et al., 1988: Biotechnology and Bioengineering, 32: 910-915.
5. Kossmann J. and Lloyd J., 2000: Critical reviews in Bio-chemistry and Molecular Biology, 35(3): 141-196.
6. Pandey A. et al., 2000: Biotechnol. Appl. Biochem., 31: 135-152.
7. Sanoja R. et al, 2000: Applied and Environmental Microbiology, 66(8): 3350-3356.
8. Miller G. L., 1959: Anal. Chem., 31: 426-429.

INVESTIGATION OF THE HYDROLYSIS ACTION ON THE NATIVE CASSAVA STARCH OF AMYLASES BY USING THE SCANNING ELECTRO-MICROSCOPY

HOANG KIM ANH et al.

SUMMARY

Native cassava starch granules have been subjected to enzymatic depolymerization with the amylases from *Bacillus* and *Aspergillus*. The structure of the starch granules, the adsorption of the amylases on raw starch, the type and extent of morphological changes undergone by the starch granules have been investigated by the scanning electron microscopy.

Ngày nhận bài: 5-9-2001

PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ ĐẦU 5' GIEN *cagA* CỦA BA ĐỒNG *HELICOBACTER PYLORI* CÓ NGUỒN GỐC TỪ MỘT BỆNH NHÂN VIỆT NAM

HOÀNG TUẤN ANH, NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH,
LÊ BẢNG SƠN, NGUYỄN THỊ THANH LỢI,
NGUYỄN THỊ NGUYỆT, TRẦN QUỲNH HOA

Viện Công nghệ sinh học

ĐẶNG ĐỨC TRẠCH

Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

Helicobacter pylori được coi là các vi khuẩn siêu đa dạng do quá trình đột biến và tái tổ hợp xảy ra trong hệ gen của chúng. Một quần thể vi khuẩn bao gồm các dòng có cùng nguồn gốc, cũng như virus HIV, không bao giờ thuần nhất vì mang các kiểu gen khác nhau [2].

Gen *cagA* của vi khuẩn *H. pylori* mã hóa cho một protein độc tính có khả năng điều khiển quá trình tổng hợp IL-8 của tế bào biểu mô dạ dày [2, 3, 4, 5]. Các nghiên cứu khuếch đại gen *cagA* từ ADN sinh thiết hoặc từ ADN của *H. pylori* phân lập từ người bệnh Việt Nam cho thấy, các quần thể vi khuẩn có thể mang các kiểu gen *cagA*⁺ hoặc *cagA*⁻ [1, 4, 5, 6, 7, 10]. Tuy nhiên, cấu trúc của các quần thể *H. pylori* có thể phức tạp hơn.

Trong công trình nghiên cứu này, chúng tôi thông báo kết quả phân tích trình tự đầu 5' gen *cagA* của ba dòng (quasi-species) *H. pylori* có cùng nguồn gốc từ một bệnh nhân Việt Nam bị loét dạ dày. Ở mức độ ADN, các ADN có độ tương đồng khoảng 95%.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu và chọn bệnh nhân

Các bệnh nhân đến khám tại bệnh viện Bưu Điện (Hà Nội), sau khi xác định sơ bộ có viêm dạ dày và chưa qua điều trị bằng kháng sinh được lấy sinh thiết bằng phương pháp nội soi. Sinh thiết được đưa vào dung dịch vận chuyển, [theo Seliger H. P. J]. Dung dịch A: NaCl 8,66 g, KH₂PO₄ 1,14 g, NaHPO₄.2H₂O 1,6 g, pha

trong nước cất, tới 1000 ml pH = 7,3; dung dịch B: glucoza 1,5%. Trộn 75 ml dung dịch A với 25 ml dung dịch B và bảo quản ở -80°C cho đến khi dùng.

2. Phương pháp

a) Tách ADN tổng số từ sinh thiết

Mảnh sinh thiết của bệnh nhân được nghiền tan hoàn toàn trong dung dịch lysis (10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 0,5% Tween 20) có bổ sung proteinaza K. ADN được làm sạch bằng phenol và rửa bằng cồn. Nồng độ và độ sạch của chế phẩm ADN được kiểm tra bằng máy quang phổ ở hai bước sóng 260 nm và 280 nm; ngoài ra chế phẩm ADN còn được kiểm tra điện di trên gel agarosa 0,8%. Chế phẩm ADN được dùng để nhân đoạn gen *cagA*.

b) Nhân đoạn gen *cagA* bằng kỹ thuật PCR

Cặp mồi đặc hiệu U₁, U₂ cho đoạn gen *cagA* được thiết kế dựa trên trình tự gen HPY269870 của vi khuẩn *H. pylori* (Thái Lan) đã được các tác giả công bố.

Chu trình nhiệt để tiến hành PCR gồm:

95°C - 5 phút	} 35 vòng
58°C - 2 phút	
72°C - 1 phút	
94°C - 1 phút	
58°C - 30 giây	
72°C - 1 phút	

Trình tự của các cặp mồi như sau:

U₁: 5'-ACCATTGATCAAACAACAACACC-3'
(từ 13-35)

U₂:5'-AGGGGGTTGTATGATATTTTCAT-3'
(từ 438-461)

c) Tạo dòng phân tử ADN

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarosa 2%. Băng ADN được cắt ra khỏi gel, làm sạch và gắn vào vector pUC 18 bởi T4 ligase. Vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E.coli* chủng DH5 α (ϕ 80dlacZ Δ M15, recA1, endoA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, deo R, Δ (lac ZYA-arg F) U19) bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C, 2 phút. Sau đó, các tế bào được nuôi cấy trên môi trường thạch LB chọn lọc có bổ sung ampicilin 100 μ g/ml, IPTG 0,1 mM, X-Gal 40 μ g/ml. Các khuẩn lạc *E. coli* mang plasmit tái tổ hợp có màu trắng được nuôi riêng rẽ trong môi trường LB có ampicilin 100 μ g/ml. Các plasmit được tách chiết theo phương pháp đã được miêu tả [8]. Sự có mặt của đoạn gen *cagA* được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR theo như đã miêu tả ở trên.

d) Giải trình tự của đoạn gen *cagA*

Trình tự của đoạn gen *cagA* được xác định bằng phương pháp của Sanger [9] có sử dụng đoạn mồi gắn huỳnh quang và phân tích trên máy xác định trình tự tự động MegaBACE 1000. Các chương trình P/C GENE và Blast được sử dụng để phân tích kết quả.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

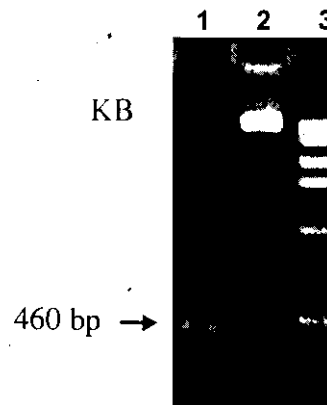
1. Khuếch đại gen *cagA* từ ADN sinh thiết của một bệnh nhân Việt Nam bị loét dạ dày

Bằng cấp mồi thiết kế dựa trên trình tự của gen *cagA*, chủng *H. pylori* của Thái Lan, chúng tôi đã khuếch đại đoạn gen *cagA* từ ADN sinh thiết của một bệnh nhân Việt Nam bị loét dạ dày. Trên điện di đồ (xem ảnh), chỉ có một băng ADN với kích thước khoảng 0,46 kb là được thấy, chứng tỏ đoạn gen *cagA* đã được khuếch đại một cách đặc hiệu bằng kỹ thuật PCR.

2. Giải trình tự của gen *cagA*

Đoạn gen *cagA*, sau khi được khuếch đại từ ADN sinh thiết, được gắn vào vector pUC18. Có vài chục khuẩn lạc dương tính màu trắng đã được chọn lọc từ các *E.coli*. Trình tự ADN của ba đoạn ADN tạo dòng đã được giải mã và để

trình trong databank (hình 1) với mã số là: HPY 313505(333bp), HPY 313504(403bp) và HPY 313505(401bp).



Ảnh. Điện di đồ sản phẩm PCR của gen *cagA*

- 1: Sản phẩm PCR từ ADN sinh thiết bệnh
- 2: Chế phẩm ADN tách từ bệnh nhân bị viêm dạ dày
- 3: 1 KB ADN chuẩn.

Như đã thấy, ba đoạn ADN có độ tương đồng khoảng 95%, có một vài khác biệt do đột biến từ G-A (hoặc A-G), A-T (hoặc T-A) ở một vài vị trí. Sự đứt đoạn của một hoặc hai gốc kiểm khối gen cũng được quan sát thấy ở dòng A với mã số HPY 313504(403bp).

Các thay đổi nucleotit đã không làm xuất hiện các stop codon trên các đoạn gen nghiên cứu. Một khung dịch mã chạy từ đầu đến cuối đoạn gen *cagA* được tìm thấy trong cả ba trường hợp nghiên cứu. Như đã trình bày ở [10], sự đứt đoạn của hai nucleotit CG đã làm thay đổi khung dịch mã protein của gen *cagA* ở dòng A dẫn đến sự xuất hiện của một protein có thành phần khác hẳn với các protein CagA đã biết (hình 1).

Từ kết quả thu được, chúng tôi tiến hành phân tích và so sánh trình tự đầu 5' gen *cagA* của các dòng *H. pylori* mang nguồn gốc địa lý và dân tộc khác nhau thì nhận thấy rằng (hình 2).

a) Ở mức độ ADN

- Các ADN dường như khác nhau nhiều ở vùng 5'.
- Các ADN chia sẻ sự tương đồng từ nucleotit số 70.

Trình tự ADN của ba đoạn cagA

```

seq62_submit_      -AGGGGGTTGTATGATATTTTCCATAAAATTC--GATTGTGGGT 43
seq54_submit_      -----GGGGTTGTATGATATTTTCCATAAAATTCGGATTGTGGGT 43
seqth_submit_      -----
                      *****
seq62_submit_      GTTGATTTTAGACGGATCTTTTGAAGAGACCCCAACTCGTAAAGATTGGTAACGCT 102
seq54_submit_      GTTGATTTTAGACGGATCTTTTGAAGAGACCCCAACTCGTAAAGATTGGTAACGCT 102
seqth_submit_      -----GAGACCCCAACTCGTAAAGATTGGTAACGCT 33
                      *****
seq62_submit_      GATCCCCAAATTTCTTAAAGCTATCTATGGAAGAATCTACAGCAATGAGATT 154
seq54_submit_      GATCCCCAAATTTCTTAAAGCTATCTATGGAAGAATCTACAGCAATGAGATT 154
seqth_submit_      GATCCCCAAATTTCTTAAAGCTATCTATGGAAGAATCTACAGCAATGAGATT 85
                      *****
seq62_submit_      GTCCTTTGTTGATCAAATCATTGCTCTTATTGATAAAGTCTGAAAAATACTGATTCT 210
seq54_submit_      GTCCTTTGTTGATCAAATCATTGCTCTTATTGATAAAGTCTGAAAAATACTGATTCT 210
seqth_submit_      GTCCTTTGTTGATCAAATCAT-GCTCTTATTGATAAAGTCTGAAAAATACTGATTCT 140
                      *****
seq62_submit_      TTTTGGCAGGATTTTGTATCGCTTTATTGGCGTATTCTTCCCTTAATTGCGAGATTTTCT 270
seq54_submit_      TTTTGGCAGGATTTTGTATCGCTTTATTGGCGTATTCTTCCCTTAATTGCGAGATTTTCT 270
seqth_submit_      TTTTGGCAGGATTTTGTATCGCTTTATTGGCGTATTCTTCCCTTAATTGCGAGATTTTCT 200
                      *****
seq62_submit_      CAAAAGCTTGCCTGTTATCCTTATCATTCTTATCAACGATTGGTTTTTGATCAGGATCAA 330
seq54_submit_      CAAAAGCTTGCCTGTTATCCTTATCATTCTTATCAACGATTGGTTTTTGATCAGGATCAA 330
seqth_submit_      CAAAAGCTTGCCTGTTATCCTTATCATTCTTATCAACGATTGGTTTTTGATCAGGATCAA 260
                      *****
seq62_submit_      ATGAAGCGACAGCGTTATCAACTTTAATAAAAGCTACTTGAAGATTATTG-ATAAATCGT 389
seq54_submit_      ATGAAGCGACAGCGTTATCAACTTTAATAAAAGCTACTNGAAAATNTTGGATAATTTCGT 390
seqth_submit_      ATGAAGCGACAGCGTTATCAACTTTAATAAAAGCTACTTGAAGATTATTG-ATAAATCGT
                      *****
seq62_submit_      TGC GGAACAAAATC----- 403
seq54_submit_      NGCGGANCAAA----- 401
seqth_submit_      TGC GGAACAAAATC----- 333
                      *****

```

Protein dịch mã từ ba đoạn ADN

```

seq54protein      -----LXRKELSNFXVAFIKVDNAVASFDPDQKPIVDKNDKDNR 40
seq62protein      -----DFVPQRFINNQLQVAFIKVDNAVASFDPDQKPIVDKNDKDNR 41
seqthprotein      -----DFVPQRFINNQLQVAFIKVDNAVASFDPDQKPIVDKNDKDNR 41
                      *-----*****
seq54protein      QAFEKISQLREEYANKAIKNPAKKNQYFSDFINKSNDLINKDNLIADVSSIDSFKKFGDQ 100
seq62protein      QAFEKISQLREEYANKAIKNPAKKNQYFSDFINKSNDLINKDNLIADVSSIDSFKKFGDQ 101
seqthprotein      QAFEKISQLREEYANKAIKNPAKKNQYFSDFINKS--MI----- 7
                      *****
seq54protein      RYQIFTSWVSLQKDPSKINTQQIRNFMENIIQPX----- 134
seq62protein      RYQIFTSWVSLQKDPSKINTQQIEFYGYHTTPX----- 135
seqthprotein      -----
                      *****

```

Hình 1. Trình tự ADN và protein CagA của ba dòng *H. pylori* của cùng một bệnh nhân Việt Nam

- Sự khác biệt giữa các ADN chủ yếu do đột biến, đứt đoạn (hoặc chèn thêm của một vài gốc kiễm).


```

seqHK          TCCGCTCTAAAAATCAACACCCCAACAAATCCGAAATTTTATGGAAAATATCATACAACCCCC 461
seqJapan       TCCGCTCTAAAAATCAACACCCCAACAAATCCGAAATTTTATGGAAAATGTCTATAAACCCCC 449
seqAustria     TCCGCTCTAAAAATCAACACCCGATCGATCCGAAATTTTATGGAAAATATCATACAACCCCC 446
seqUSA         TCCGCTCTAAAAATCAACACCCCAAAAAATCCGAGGTTTATGGAAAATATCATACAACCCCC 452
-----*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*
seq62_submit_  TGCGGAACAAAATC----- 403
seq54_submit_  NGCGGANCAAA----- 401
seqth_submit_  TGCGGAACAAAATC----- 333
seqHK          TAT----- 464
seqJapan       TATCTCTGATGATAAAGAAAAAGCGGAGTTTTTGAGGTCTGCCAAACAATCTTTTGCAGG 509
seqAustria     TATCCCTGATGATAAAGAAAAAGCGGAGTTTTTGAAATCTGCCAAACAATCTTTTGCAGG 506
seqUSA         TATCTCTGATGATAAAGAGAAAGCGGAGTTTTTGAGGTCTGCCAAACAAGCTTTTGCAGG 512
-----*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

```

b) Ở mức độ protein

- Các protein mang tính bảo thủ hơn ở vùng C'.
- Vùng N' của protein CagA mang signaling signal rất khác biệt trong từng dòng.

```

seq54protein   -----LXRXLSSXNFXVAFIKVDNAVASFDPDQKPIVDKNDKDN 40
seq62protein   -----DFVPQRFINNLLQVAFIKVDNAVASFDPDQKPIVDKNDKDN 41
seqthprotein   -----DFVPQRFINNLLQVAFIKVDNAVASFDPDQKPIVDKNDKDN 41
seqHKprotein   MTNETIDQTTTPDQTPNQTFDFVPQRFINNLLQVAFIKVDNAVASFDPDQKPIVDKNDKDN 60
seqJapan       MTNETIDQTTTPDQTFDFVPQRFINNLLQVAFIKVDNAVASFDPDQKPIVDKNDKDN 56
seqAustria     MANETINQ-----QPQTGAAFNPQQFINNLLQVAFIKVDNAVASYDPDQKPIVDKNDKDN 55
seqUSA         MTNEAINQ-----QPQTEAAFNPPQFINNLLQVAFIKVDN.VASFDPNQKPIVDKNDKDN 55
-----*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*
seq54protein   QAFEKISQLREEYANKAIKNPAKKNQYFSDFINKSNDLINKDNLIADVSSIDSFKKFGDQ 100
seq62protein   QAFEKISQLREEYANKAIKNPAKKNQYFSDFINKSNDLINKDNLIADVSSIDSFKKFGDQ 101
seqthprotein   QAFEKISQLREEYANKAIKNPAKKNQYFSDFINKSNDLINKDNLIADVSSIDSFKKFGDQ 78
seqHKprotein   QAFEKISQLREEYANKAIKNPAKKNQYFSDFINKSNDLINKDNLIADVSSIDSFKKFGDQ 120
seqJapan       QAYEKISQLREEYANKAIKNPAKKNQYFSDFINKSNDLINKDNLIADVSSVESFRKFGDQ 116
seqAustria     QAFDGISQLREEYSNKAIKNPTKKNQYFLDFINKSNDLINKDALIDVESSTKSFKKFGDQ 115
seqUSA         QAFEKISQLREEFANKAIKNPTKKNQYFSSFISKSNDLINKDNLIADVSSIDSFKKFGDQ 115
-----*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*
seq54protein   RYQIFTSWVSLQKDPKSKINTQQIRNFMENIIQPP----- 134
seq62protein   RYQIFTSWVSLQKDPKSKINTQQIEFYGYHTTPX----- 135
seqthprotein   ----- 135
seqHKprotein   RYQIFTSWVSLQKDPKSKINTQQIQNFMENIIQPP----- 154
seqJapan       RYQIFTSWVSLQKDPKSKINTQQIRNFMENIVIKPPISDDKEAEFLRSKQSFAGIIGNQ 176
seqAustria     RYRIFTSWVSHQNDPSKINTSRIRNFMENIIQPPIPDDKEAEFLRSKQSFAGIIGNQ 175
seqUSA         RYQIFMNVVSHQNDPSKINTQKIRGFMENIIQPPISDDKEAEFLRSKQSFAGIIGNQ 175
-----*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*
seq54protein   RYQIFTSWVSLQKDPKSKINTQQIRNFMENIIQPP----- 134
seq62protein   RYQIFTSWVSLQKDPKSKINTQQIEFYGYHTTPX----- 135
seqthprotein   ----- 135
seqHKprotein   RYQIFTSWVSLQKDPKSKINTQQIQNFMENIIQPP----- 154
seqJapan       RYQIFTSWVSLQKDPKSKINTQQIRNFMENIVIKPPISDDKEAEFLRSKQSFAGIIGNQ 176
seqAustria     RYRIFTSWVSHQNDPSKINTSRIRNFMENIIQPPIPDDKEAEFLRSKQSFAGIIGNQ 175
seqUSA         RYQIFMNVVSHQNDPSKINTQKIRGFMENIIQPPISDDKEAEFLRSKQSFAGIIGNQ 175
-----*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

```

Hình 2: Sánh trình tự đầu 5' gen *cagA* của các dòng *H. pylori* mang nguồn gốc địa lý và dân tộc khác nhau

Hiện tượng các dòng của *H. pylori* trong cùng một quần thể mang các kiểu gen *cagA* khác nhau đặt ra vô số các vấn đề cần được quan tâm trong nhiều năm về sau. Những trả lời về tần số của các kiểu gen cũng như những nghiên cứu về phân bố của chúng trong cộng đồng người Việt Nam là những đòi hỏi cần thiết

III. KẾT LUẬN

Đầu 5' gen *cagA* của vi khuẩn *Helicobacter pylori* từ một bệnh nhân Việt nam đã được tạo dòng và giải trình tự. Phân tích cho thấy, ADN của ba dòng (quasi species) *H. pylori* không giống nhau do một vài đột biến và sự đứt đoạn của các đôi kiểm. Sự đa dạng của gen *cagA* ở mức độ ADN và protein được phát hiện. Đặc biệt, *cagA* của dòng A, do mất hai gốc kiểm nên có khung dịch mã thay đổi, dẫn đến sự xuất hiện của một epitop mới bao gồm 6 axit amin khác hẳn với protein CagA của hai dòng B và C.

Từ kết quả, chúng tôi so sánh với trình tự đầu 5' gen *cagA* của các dòng *H. pylori* mang nguồn gốc địa lý và dân tộc khác nhau thì nhận thấy rằng:

- Ở mức độ ADN: ADN khác nhau nhiều ở vùng 5' và có sự tương đồng từ nucleotit số 70. Sự khác biệt giữa các ADN chủ yếu do đột biến, đứt đoạn (hoặc chèn thêm của một vài gốc kiểm).

- Ở mức độ protein: Protein mang tính bảo thủ hơn ở vùng C'. Vùng N' của protein CagA mang signaling signal rất khác biệt trong từng dòng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Asahi M. et al., 2000: J. Exp. Med., 191: 593-602.
2. Covacci A. and Rapuoli R., 1998: Curr. Opin. Microbiol., 1: 96-102.
3. Tran Quynh Hoa et al., 2001: The deletion of two nucleotides from the 5' end of the *cagA* gene in the genome of *Helicobacter pylori* (vietnamese strain). International workshop on Biology. Hanoi-Vietnam: 198-205.
4. Nguyen Thi Thanh Loi, Le Duc Dao, Nguyen Thi Hong Hanh, 2001: Application of a PCR method for amplifying the *cagA* gene to diagnose *Helicobacter pylori* bacterium in patient's biopsies. Annual scientific conference of Vietnamese association of medicine and pharmacy.
5. Odenbeit S. et al., 2000: Science, 287: 1497-1500.
6. Odenbreit S. et al., 2001: Cellular Microbiol., 3: 21-31.
7. Perez-Perez G. I. et al., 1999: J. Physiol Pharmacol., 50: 833- 847.
8. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 1989: Molecular cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
9. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., 1977: Proc. Nat. Aca. USA, 74: 5463-5467.
10. Stein M., Rappuoli R., Covacci A., 2000: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 97: 1263-1268.

ANALYSING THE 5' END OF THE CAGA GENE OF THREE *HELICOBACTER PYLORI* BACTERIUM QUASI-SPECIES ISOLATED FROM BIOPSIES OF ONE VIETNAMESE PATIENT

HOANG TUAN ANH et al.

SUMMARY

The 5' end of the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* bacterium isolated from biopsies of one vietnamese patient was cloned and sequenced. The results showed that the nucleotide sequence of three quasi-species *H. pylori* was different because of few mutation points and the interruption of base pairs. The multiformity of the *cagA* gene on DNA and protein level was discovered. Specially, in the quasi-species A, because of the lost of two bps, the reading frame of the CagA gene was changed so appeared a new epitope included six amino acids which were completely different from the CagA protein of two quasi-species B and C.

Ngày nhận bài: 18-10-2001

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ TÍNH CHẤT CỦA RIBONUCLEAZA TỪ TUYẾN TUY CỦA LỢN

NGUYỄN VĂN THIẾT

Viện Công nghệ sinh học

Các enzym thuộc nhóm ribonucleaza (ARNaza) là những enzym xúc tác phản ứng phân huỷ liên kết photphodiester trong phân tử axit ribonucleic (ARN). Các enzym này phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên. TUYẾN TUY trong cơ thể động vật là cơ quan giàu ARNaza nhất và đại diện điển hình của nhóm enzym này là ribonucleaza từ tuyến bò (ARNaza A) - một trong những enzym được nghiên cứu nhiều nhất trong enzym học. Ngoài ra, trong các mô và cơ quan khác nhau của động vật, trong đó có cả người, còn tìm thấy nhiều loại ARNaza có các tính chất hóa-lý và tính chất xúc tác giống như ARNaza A. Các enzym này tạo thành một họ enzym lớn rất gần gũi nhau về cấu trúc và chức năng, được gọi là siêu họ ARNaza A. Tuy là các enzym được nghiên cứu rất nhiều nhưng ngày nay các enzym nhóm ARNaza vẫn được các nhà nghiên cứu đặc biệt quan tâm bởi vì, ngoài chức năng tiêu hóa (của nucleaza từ tuyến tụy) và các chức năng sinh học khác đã được biết đến như tham gia vào các quá trình sao chép hay nhân đôi (sinh sản) và phục hồi cấu trúc của ADN, sao mã (tổng hợp ARN) và chịu trách nhiệm về những biến đổi sau sao mã của ARN (quá trình chế biến hay processing ARN), các enzym này còn có những chức năng (hoạt tính) sinh học mới quan trọng như: 1. Hoạt tính chống virus [2, 10, 15]; 2. Hoạt tính xytotoxin và chống ung thư [4, 6, 9]; 3. Hoạt tính norotoxin; 4. Hoạt tính helminthotoxin (kháng giun); 5. Kích thích quá trình sinh mao mạch [15]; 6. Tác động lên hệ miễn dịch của cơ thể [4, 11, 15] và tham gia vào quá trình sinh sản ở cả động vật (chống sinh tinh trùng [2, 4]) và thực vật (xác định tính tự khắc hay tự không tương hợp, tức khả năng nhận biết

và loại bỏ phần mình trong quá trình thụ phấn ở các loài cây thụ phấn chéo [8]) v.v...

Trong số các hoạt tính mới của ARNaza được nêu trên, đáng quan tâm nhất là khả năng chống virus và hoạt tính xytotoxin (chống ung thư) và chúng cũng là động lực cho các nghiên cứu cơ bản định hướng ứng dụng nhằm tạo ra các chế phẩm thuốc chữa các bệnh do virus [3] và ung thư [1, 5, 7]. Không phải ngẫu nhiên mà, ngoài các enzym nhóm ARNaza ra, còn tồn tại một phổ rộng các protein khác cũng có hoạt tính ribonucleolytic (thủy phân ARN), như một số dạng của lactoferrin (trong sữa) và các ABzym (kháng thể enzym) trong máu của các bệnh nhân bị mắc chứng lao ban đỏ và một số bệnh tự miễn dịch [15]. Hơn nữa, đối với một số nucleaza, hoạt tính nucleolytic cũng không phải là duy nhất.

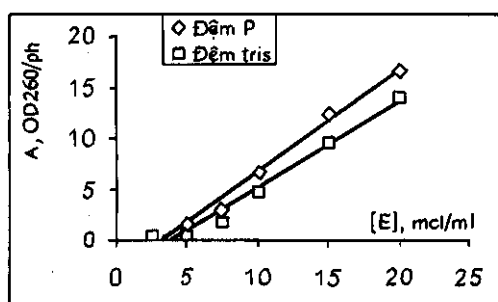
Mục đích công trình này của chúng tôi là nghiên cứu một số tính chất hóa-lý, tính chất xúc tác và tính chất sinh học mới của ARNaza từ tuyến tụy của lợn, nhằm góp phần tạo cơ sở khoa học cho việc sản xuất và ứng dụng các chế phẩm thuốc trên cơ sở ARNaza.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Chế phẩm ARNaza được tách chiết và tinh chế từ tuyến tụy của lợn theo quy trình mà chúng tôi đã công bố trước đây, với một số biến đổi nhỏ [12]. Chế phẩm ARNaza nhận được có độ bền nhiệt cao và duy trì được hoạt tính tương đối ổn định trong một thời gian dài (gần 2 năm) ở nhiệt độ 4°C, cả trong trạng thái dung dịch và trạng thái bột khô sau khi bay hết hơi nước ở nhiệt độ thấp (xem dưới đây).

2. Chế phẩm ARN dùng làm cơ chất cho ARNaza được tách chiết và tinh chế từ lá non (là chồi) của một số loại cây (nhãn, vải, hoa lan...) theo quy trình tách chiết và tinh chế ADN mà chúng tôi đã công bố trước đây [14], với một số biến đổi nhằm nâng cao hàm lượng ARN trong chế phẩm axit nucleic tổng số, cho phép nhận các chế phẩm axit nucleic tổng số có độ tinh sạch cao, chứa tới 95% ARN và thích hợp làm cơ chất cho ARNaza. Hàm lượng ARN trong các chế phẩm axit nucleic tổng số được xác định theo tăng OD, sau khi thủy phân hoàn toàn ARN trong chế phẩm bằng ARNaza đã được đun sôi 10 phút (để loại bỏ hoạt tính ADNaza). Sau khi thủy phân xong, OD₂₆₀ của dịch thủy phân tăng tới 38-40% so với giá trị OD₂₆₀ trước lúc thủy phân. Các kết quả này cho thấy hàm lượng ARN trong chế phẩm rất cao, chiếm tới 90 - 95%, trong một vài trường hợp thậm chí còn cao hơn 95%. Trong trường hợp các chế phẩm axit nucleic tổng số chứa một lượng đáng kể (nhiều) ADN so với ARN thì tăng OD₂₆₀ sau khi thủy phân bằng ARNaza chỉ đạt không quá 30% so với ban đầu.

3. Phương pháp xác định hoạt tính ARNaza cũng giống như phương pháp xác định hoạt tính của deoxyribonucleaza (ADNaza) mà chúng tôi đã sử dụng trước đây [13], dựa trên nguyên lý của hiệu ứng hyperchrom, tức tăng hấp thụ ở vùng cực tím (260 nm) khi axit nucleic bị thủy phân.



Hình 1. Sự phụ thuộc A-[E]

Các kết quả nghiên cứu động học của phản ứng do ARNaza từ tụy lợn xúc tác được dẫn ở các hình trên đây cho thấy hoạt tính của enzyme tỷ lệ tuyến tính với nồng độ của nó trong môi trường phản ứng, trong khoảng khảo sát là từ 2,5

1 đơn vị (đv) ARNaza là lượng enzyme xúc tác phản ứng thủy phân ARN tổng số trong những điều kiện tiêu chuẩn xác định và làm tăng mật độ quang học của dịch phản ứng (OD₂₆₀) lên 1 đv OD sau thời gian phản ứng là 1 giờ. Hoạt tính ARNaza được đo trực tiếp trên máy quang phổ Diode Array SP 8452 A Hewlett Packard theo tăng OD₂₆₀ sau 1 phút (ph) kể từ khi bắt đầu phản ứng.

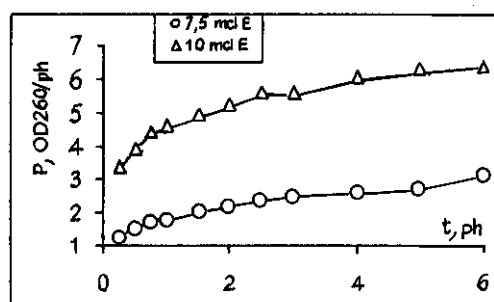
4. Protein được xác định theo phương pháp Lowry hoặc phương pháp quang phổ ở 280 nm.

5. Hóa chất các loại cần thiết cho thí nghiệm đều có độ sạch phân tích cao.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Một số tính chất động học của ARNaza từ tụy lợn

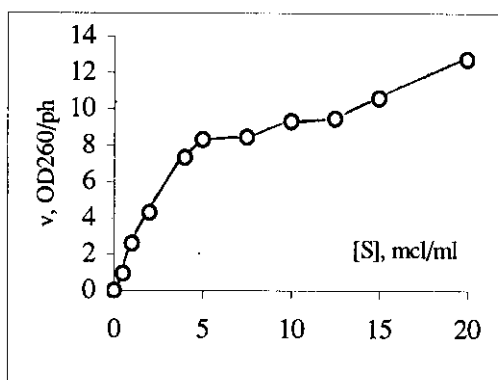
Để nghiên cứu một số tính chất hoá-lý và xúc tác của ARNaza từ tụy lợn, trước tiên chúng tôi tiến hành một số nghiên cứu cơ bản về động học nhằm tìm điều kiện tối ưu để xác định hoạt tính enzyme như tốc độ ban đầu của phản ứng, mối phụ thuộc của hoạt tính (A) hay tốc độ (v) của phản ứng vào nồng độ của enzyme ([E]) và nồng độ cơ chất ([S]). Kết quả các nghiên cứu này được trình bày trên các hình 1, 2 và 3. Hoạt tính enzyme hoặc tốc độ phản ứng trong các hình này và trong tất cả các hình khác được biểu diễn bằng đv (OD₂₆₀/ph) × 10⁻².



Hình 2. Sự phụ thuộc P-t

đến 20 μl dịch enzyme/1 ml dung dịch phản ứng, tức là từ 0,1 đến 1 đv enzyme/ml. Trong các nghiên cứu tiếp theo, lượng enzyme được sử dụng là 0,5 đv/ml; điều kiện phản ứng (đkpr): 8 μg ARN, 20 mM đệm pH = 7,2 (hình 1). Mặt khác,

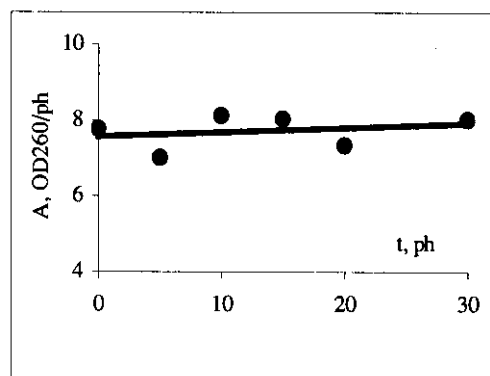
đồ thị tích lũy sản phẩm theo thời gian (hình 2) cho thấy tới trên 70% lượng sản phẩm tạo thành trong phút đầu tiên của phản ứng, sau đó tốc độ phản ứng giảm mạnh; đkpư: 8 μ g ARN, 20 mM đệm tris-HCl pH = 7,2. Do về mặt kỹ thuật, không thể đo được tốc độ ban đầu của phản ứng (trong những giây đầu), cho nên, để cho tiện lợi, hoạt tính của ARNaza trong tất cả các thí nghiệm được đo sau 1 phút, kể từ khi cho enzyme vào để bắt đầu phản ứng. Cuối cùng, đường cong bão hòa ARNaza bởi ARN (hình 3) cho thấy động học của phản ứng do ARNaza từ tụy lợn xúc tác tuân thủ động học thông thường Michaelis-Menten và, trong các điều kiện thí nghiệm nêu trên, lượng ARN 4-8 μ g/ml là đủ để bão hòa enzyme. Trong tất cả các thí nghiệm tiếp theo, lượng ARN được sử dụng là 8 μ g/ml hỗn hợp phản ứng.



Hình 3. Sự phụ thuộc v-[S]

2. Độ bền nhiệt của ARNaza từ tụy lợn

Để xác định độ bền nhiệt của ARNaza từ tụy lợn, dung dịch enzyme được đun sôi cách thủy trong các khoảng thời gian khác nhau: 0, 5, 10, 15, 20 và 30 phút, sau đó ly tâm 10 phút ở tốc độ 10000 vòng/phút để loại protein bị thoái hóa và dịch trong được sử dụng để xác định hoạt tính ARNaza theo các điều kiện tối ưu đã tìm được ở trên (phản ứng tiến hành trong 20 mM đệm tris-HCl pH = 7,2). Kết quả thí nghiệm này (được trình bày trên hình 4) cho thấy ARNaza từ tụy lợn rất bền với nhiệt: đun sôi cách thủy dịch enzyme từ 5 đến 30 phút, hầu như không làm thay đổi hoạt tính của enzyme, chứng tỏ ARNaza từ tụy lợn có độ bền cấu hình rất cao. Đây cũng là một trong các tính chất chung của các enzyme họ ARNaza A.



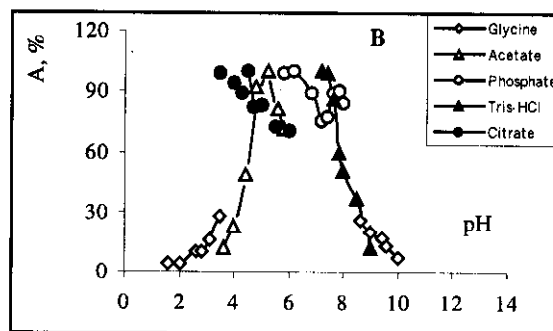
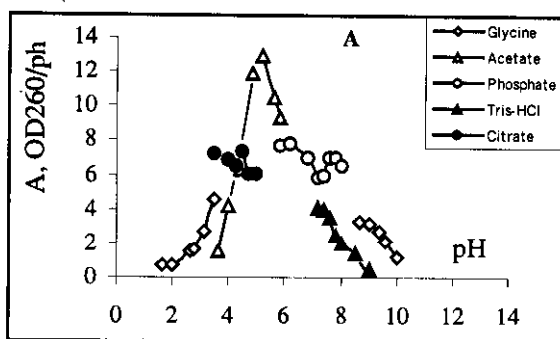
Hình 4. Sự phụ thuộc của A vào thời gian đun sôi cách thủy

3. Sự phụ thuộc của hoạt tính enzyme vào pH

Phản ứng môi trường là một trong các thông số quan trọng trong xúc tác enzyme. Trong các thí nghiệm nghiên cứu nhằm tìm giá trị pH tối ưu của ARNaza từ tụy lợn, chúng tôi đã sử dụng các loại đệm khác nhau trong vùng pH từ 2 đến 10. Kết quả xác định hoạt tính enzyme trong các đệm này được trình bày trên hình 5.

Tuy mỗi đệm chỉ bao gồm một vùng trong thang pH, như đệm glyxin (pH 2,6-3,5 và 8,65-10,0, ngoài ra còn 2 giá trị của dung dịch glyxin cùng nồng độ với giá trị pH ngoài vùng của đệm

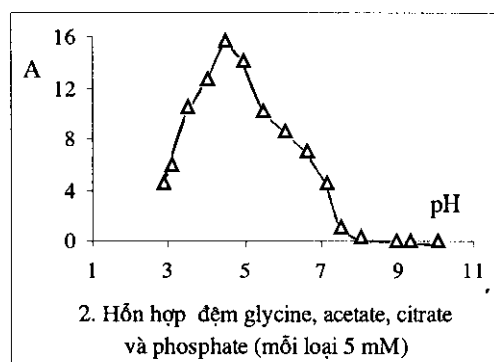
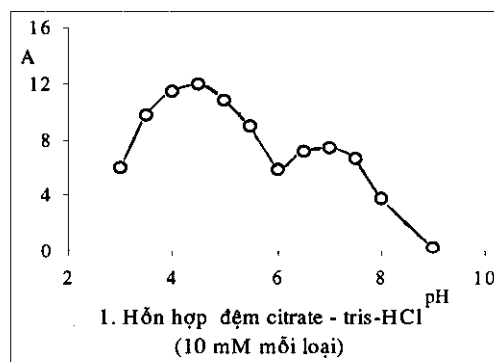
này là 1,6 và 2,0), đệm photphat (pH 5,8 - 8,0), đệm tris-HCl (pH = 7,2-9,0), đệm xitrat (pH = 3,5-6,0) và đệm axetat (pH 3,6 - 5,8), nhưng tất cả các đệm này gộp lại sẽ cho một bức tranh tổng thể về mối phụ thuộc hoạt tính của ARNaza vào pH. Các kết quả trên hình 5 cho thấy: trong vùng axit của đệm glyxin, A tăng khi pH tăng và giảm khi tăng tiếp pH trong vùng kiềm; trong các đệm tris-HCl, xitrat và photphat, A lại giảm khi tăng pH, còn trong đệm axetat, đồ thị A-pH dường như có đỉnh hoạt tính tại pH = 5. Các kết quả với từng đệm riêng biệt này không cho phép xác định giá



Hình 5. Sự phụ thuộc hoạt tính của ARNaza từ tụy lợn vào pH trong các đệm khác nhau

trị pH tối ưu của ARNaza từ tụy lợn, nhưng gộp chung lại thì thấy giá trị pH tối ưu của phản ứng enzym dường như là trong vùng axit (tại pH ~ 5, hình 5A). Tuy nhiên, mỗi phụ thuộc của hoạt tính tương đối (A,%) vào pH trong các đệm khác nhau lại chỉ cho thấy dường như giá trị pH tối ưu của enzym này lại nằm trong khoảng pH = 6-7 và đồ thị A-pH có dạng hình chuông thông thường như nhiều enzym khác (hình 5B).

Để loại trừ ảnh hưởng của bản chất đệm lên hoạt tính enzym, chúng tôi sử dụng các hỗn hợp đệm 20 mM: 1) xitrat-tris-HCl (mỗi đệm 10 mM) và 2) glyxin-axetat-xitrat-phốtphat (mỗi đệm 5 mM) để nghiên cứu mối phụ thuộc vào pH trong khoảng pH = 3-9. Kết quả nghiên cứu sự phụ thuộc A-pH trong các hỗn hợp đệm này được trình bày trên hình 6.



Hình 6. Sự phụ thuộc hoạt tính của ARNaza tụy lợn vào pH trong các hỗn hợp đệm khác nhau

Các kết quả nhận được cho thấy sự phụ thuộc A-pH trong hỗn hợp đệm xitrat-tris-HCl rất phức tạp: có 2 đỉnh hoạt tính tại các giá trị pH là 4,5 và 7; còn trong hỗn hợp đệm glyxin-axetat-xitrat-phốtphat chỉ có một đỉnh hoạt tính (nhọn) tại pH = 4,5 và một vai thấp ở vùng pH lớn hơn (từ 6 đến 7) trên đồ thị A - pH. Các kết quả này cho phép kết luận rằng pH tối ưu của ARNaza từ tụy lợn là 4,5. Kết quả này là một bất ngờ, vì pH tối ưu của các enzym thuộc siêu họ ARNaza A nằm ở vùng trung tính (~ 7,0).

4. Sự phụ thuộc của hoạt tính ARNaza từ tụy lợn vào lực ion

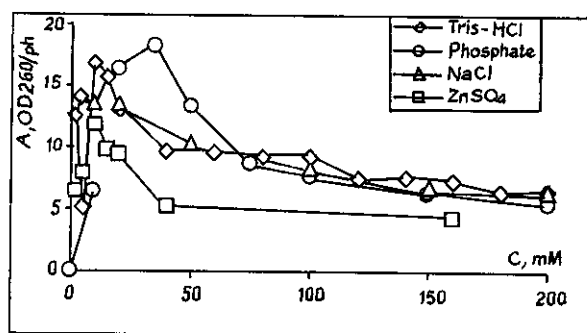
Đã tiến hành nghiên cứu mối phụ thuộc của hoạt tính của ARNaza vào lực ion của các đệm phốtphat và tris-HCl, và vào nồng độ của NaCl và ZnSO_4 (trong 20 mM đệm tris-HCl, pH = 7,2).

Kết quả các thí nghiệm này được trình bày trên hình 7. Các kết quả này cho thấy khi lực ion tăng thì hoạt tính của ARNaza cũng tăng, sau đó giảm. Trong cả 4 trường hợp, hoạt tính của

enzym cực đại ở lực ion thấp và đồ thị có dạng tương tự nhau.

Những kết quả trình bày trên đây cho thấy ARNaza từ tụy lợn có nhiều nét tương đồng với ARNaza A, đặc biệt là theo tính bền nhiệt và sự thể hiện hoạt tính cực đại ở lực ion thấp. Ngoài độ bền nhiệt cao ra, enzym từ tụy lợn còn có độ bền rất cao khi bảo quản một thời gian dài ở

4°C; enzym này bền cả ở trạng thái hòa tan trong dung dịch và ở trạng thái bột khô (nhận được sau khi cho bay hết hơi nước ở 4°C). Chế phẩm enzym được bảo quản từ tháng 4/2000 cho đến cuối tháng 10/2001 vẫn giữ được hoạt tính enzym cao. Đa số các kết quả trong công trình này đều nhận được trong các thí nghiệm với chế phẩm ARNaza được bảo quản 12-18 tháng ở 4°C.



Hình 7. Sự phụ thuộc hoạt tính của ARNaza từ tụy lợn vào lực ion
Nồng độ của $ZnSO_4$ dao động từ 0 đến 8 mM, của các chất khác - đến 200 mM.
Giá trị $[ZnSO_4]$ trên trục hoành được tăng lên 20 lần

Tuy giống ARNaza A về nhiều tính chất, nhưng ARNaza từ tụy lợn lại khác các thành viên trong họ ARNaza A về mối phụ thuộc của hoạt tính enzym vào pH: ARNaza A có pH tối ưu là 7,0, trong khi đó pH tối ưu của ARNaza từ tụy lợn lại nằm trong vùng axit (khoảng 4,5). Đây là nét khác biệt nổi bật nhất của ARNaza từ tụy lợn với các enzym trong họ ARNaza A. Sự khác biệt này dẫn chúng tôi đi đến giả định rằng ARNaza từ tuyến tụy sẽ có những tính chất sinh học khác với ARNaza A, cụ thể là có hoạt tính xytotoxin. Điều suy đoán này là có cơ sở vì dung dịch enzym được bảo quản tới 18 tháng mà vẫn còn hoạt tính cao và đặc biệt không bị mốc và thối (dung dịch protein bình thường để vài tuần là bị thối); điều này phần nào chứng minh cho hoạt tính kháng khuẩn (xytotoxin) của ARNaza từ tụy lợn. Tính chất sinh học này là vấn đề sẽ được chúng tôi nghiên cứu trong thời gian tới.

III. KẾT LUẬN

ARNaza từ tụy lợn giống với các enzym thuộc họ ARNaza A về nhiều tính chất, đặc biệt là enzym này rất bền với nhiệt: đun sôi cách thủy 30 phút không làm thay đổi hoạt tính của

enzym. Enzym thể hiện hoạt tính cao nhất trong vùng lực ion thấp. Ngoài ra, ARNaza từ tụy lợn còn rất bền khi bảo quản lâu dài ở 4°C. Mặt khác, ARNaza từ tụy lợn lại phân biệt với tất cả các thành viên khác của siêu họ ARNaza A về pH tối ưu: các ARNaza từ tuyến tụy thường có pH tối ưu là 7,0, trong khi đó pH tối ưu của ARNaza từ tụy lợn là 4,5.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bretscher L. E., Abel R. L., Raines R. T., 2000: J. Biol. Chem., 275(14): 9893-9896.
2. Dostals J. et al., 1993: J. Reprod. Fertil., 33: 263-274.
3. Kilani A. F. et al., 2000: J. Biol. Chem., 275(14): 10611-10622.
4. Kim J. S., Raines R. T., 1994: Eur. J. Biochem., 224: 109-114.
5. Klink T. A., Raines R. T., 2000: J. Biol. Chem., 275(23): 17463-17467.
6. Laccetti A. et al., 1992: Cancer Res., 52: 4582-4586.
7. Leland P. A. et al., 2001: J. Biol. Chem., 276(36): 20564-20567.

8. McCubbin A. G., Kao T., 2000: Annu. Rev. Dev. Biol., 16: 333-364.
9. Piccoli R. et al., 1993: Relationship between the 2-mode quaternary structure of bovine seminal ribonuclease and its allosteric and antitumor actions. In Abstr. 3rd Int. Meet. Ribonucleases: Chem. Biol. Biotechnol.. GP srl Pubbliche Relazioni, Napels, Italy: 11.
10. Salganik R. I., 1985: Science in USSR, 4: 98-103. (t. Nga).
11. Tamburrini M. et al., 1990: Eur. J. Biochem., 190: 145-148.
12. Nguyen Van Thiet, Tran Thi Thom, Tran Dinh Toai, 1993: Purification of bovine and pig pancreatic ribonuclease (RNase). Proceedings of 2nd Vietnam National Congress on Chemistry "Chemistry for development", Hanoi 7-9 December: 167.
13. Nguyễn Văn Thiết, Trần Thị Thom, Trần Đình Toại, 1995: Tạp chí Sinh học, 17(3): 59-42.
14. Nguyễn Văn Thiết, Lê Thị Lan Oanh, 1998: Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học-Annual Report 1997. NXB KH&KT, Hà Nội: 259-266.
15. Vlassov A. V., 1998: Biokhimiya, 63(12): 1587-1599. (t. Nga).

STUDIES ON SOME PROPERTIES OF THE PIG PANCREATIC RIBONUCLEASE

NGUYEN VAN THIET

SUMMARY

In this paper, some of the main kinetic and catalytic properties of RNase from the pig pancreas are studied. It shows that the pig pancreatic RNase is a high thermostable enzyme: boiling the enzyme up to 30 min does have no effect on its activity. Moreover, this enzyme is very stable at 4°C for a long time (18 months). The most important obtained result is that the pig pancreatic RNase possesses optimal pH at 4.5. This is the main difference of the pig pancreatic RNase from the other enzymes of the RNase A superfamily.

Ngày nhận bài: 16-11-2001

NATIONAL CENTRE FOR NATURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY OF VIETNAM
JOURNAL OF BIOLOGY
VOLUME 24 - NUMBER 3
9 - 2002

CONTENTS

	<i>Pages</i>
1. LE XUAN HUE, LE KHUONG THUY, DANG DUC KHUONG	1-8
2. NGUYEN VU THANH, NGUYEN DINH TU NGUYEN XUAN DUC	9-14
3. DAM DUC TIEN	15-18
4. TRAN THE BACH	19-20
5. LE THU HA, NGUYEN XUAN QUYNH, MAI DINH YEN	21-28
6. TRAN HONG VIET, PHAM VAN NHA	29-31
7. DO THI HUYEN et al.	32-38
8. LE THI THU HIEN et al.	39-46
9. HOANG KIM ANH et al.	47-52
10. HOANG TUAN ANH et al.	53-58
11. NGUYEN VAN THIET	59-64

TRUNG TÂM KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA
TẠP CHÍ SINH HỌC
TẬP 24 - SỐ 3
9 - 2002

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
1. LÊ XUÂN HUỆ, LÊ KHƯƠNG THÚY, ĐẶNG ĐỨC KHƯƠNG : Côn trùng ký sinh và côn trùng ăn thịt trên cây trồng ở một số tỉnh phía Nam Việt Nam.	1-8
2. NGUYỄN VŨ THANH, NGUYỄN ĐÌNH TỬ, NGUYỄN XUÂN DỤC : Đa dạng sinh học của quần xã tuyến trùng ở vùng biển ven bờ miền Trung Việt Nam.	9-14
3. ĐÀM ĐỨC TIẾN : Một số chi và loài rong đỏ (Rhodophyta) mới cho khu hệ rong biển Việt Nam phát hiện được tại quần đảo Trường Sa.	15-18
4. TRẦN THẾ BÁCH : Bổ sung chi <i>Merrillanthus</i> Chun & Tsiang (Asclepiadaceae) cho hệ thực vật Việt Nam.	19-20
5. LÊ THU HÀ, NGUYỄN XUÂN QUỲNH, MAI ĐÌNH YÊN : Áp dụng hệ thống điểm BMWP để đánh giá chất lượng môi trường nước của một số sông, suối vùng Hà Nội, Hà Tây và Vĩnh Phúc.	21-28
6. TRẦN HỒNG VIỆT, PHẠM VĂN NHẢ : Định loại các loài thú hoang dại thuộc họ Gấu (Ursidae) và họ Chó (Canidae) ở Việt Nam dựa vào hình thái và cấu trúc của lông.	29-31
7. ĐỖ THỊ HUYỀN, LÊ VĂN TRƯỜNG, LÊ TRẦN BÌNH, TRƯƠNG NAM HẢI, THOMAS SCHWEDER : Nghiên cứu sự biểu hiện gen mã hóa cho α -amylaza ưa lạnh của vi khuẩn <i>Pseudoalteromonas haloplanctis</i> 505 trong nấm men <i>Pichia pastoris</i> GS115.	32-38
8. LÊ THỊ THU HIỀN, TRỊNH CÔNG SỰ, TRẦN THỊ PHƯƠNG LIÊN, PHẠM BÍCH NGỌC, ĐÌNH DUY KHÁNG, NGÔNG VĂN HẢI, LÊ TRẦN BÌNH : Thiết kế vectơ và biểu hiện gen mã hóa protein độc tố CryIA (c) có nguồn gốc từ vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i> bằng vi khuẩn <i>Escherichia coli</i> .	39-46
9. HOÀNG KIM ANH, NGÔ KẾ SƯƠNG, NGUYỄN XÍCH LIÊN, NGUYỄN KIM GIAO : Nghiên cứu khả năng thủy phân tinh bột sản dạng hạt chưa qua hồ hóa của amylaza bằng kính hiển vi điện tử.	47-52
10. HOÀNG TUẤN ANH, NGUYỄN THỊ HỒNG HẠNH, LÊ BĂNG SƠN, NGUYỄN THỊ THANH LỢI, NGUYỄN THỊ NGUYỆT, TRẦN QUỲNH HOA, ĐẶNG ĐỨC TRẠCH : Phân tích trình tự đầu 5' gen <i>cagA</i> của ba dòng <i>Helicobacter pylori</i> có nguồn gốc từ một bệnh nhân Việt Nam.	53-58
11. NGUYỄN VĂN THIẾT : Nghiên cứu một số tính chất của ribonucleaza từ tuyến tụy của lợn.	59-64