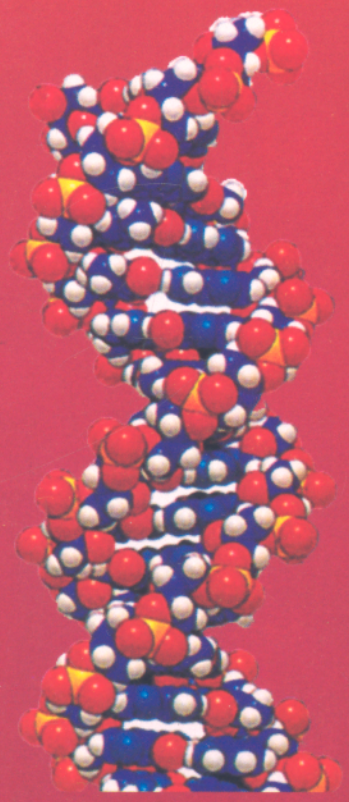
TS. TRỊNH ĐÌNH ĐẠT

Công nghệ SINH HỌC

TẬP BỐN

CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN



NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

TS. TRỊNH ĐÌNH ĐẠT

CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TẬP BỐN

CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN

(Sách dùng cho sinh viên đại học, cao đẳng thuộc các ngành
Sư phạm, Nông nghiệp, Lâm nghiệp, Thủy sản, Công nghệ sinh học, Giáo viên Sinh học THPT)

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

LỜI NÓI ĐẦU

Trong những năm gần đây, Công nghệ sinh học phát triển mạnh mẽ với nhiều thành tựu rực rỡ, xứng đáng với thế kỷ mới – Thế kỷ của Sinh học. Nhiều công nghệ mới ra đời như Công nghệ tế bào, Công nghệ protein – enzym, Công nghệ vi sinh, Genomics, Proteomic, Công nghệ di truyền v.v... Nhiều kỹ thuật, công nghệ đã và đang được áp dụng rộng rãi vào các lĩnh vực đời sống khác nhau của con người. Công nghệ gen, công nghệ di truyền (Genetic technology) liên quan đến các kỹ thuật hiện đại nhất, cao cấp nhất, ngày càng có nhiều ứng dụng trong nông nghiệp, y học và bảo vệ sức khoẻ cộng đồng.

Để phục vụ nhu cầu học tập, giảng dạy và tham khảo ở các bậc đào tạo của các ngành Công nghệ sinh học, Công nghệ thực phẩm, Sinh học v.v... và các bạn đọc quan tâm đến khoa học sự sống, chúng tôi biên soạn cuốn "Công nghệ di truyền" nhằm cung cấp những kiến thức cơ bản về lĩnh vực công nghệ di truyền áp dụng trong khoa học và thực tiễn. Sách đề cập đến các kỹ thuật, phương pháp phân tích axit nucleic về công nghệ di truyền trong nông nghiệp và những ứng dụng của công nghệ gen trong chữa bệnh bằng gen là hướng mới của sinh – y học hiện đại.

Mặc dầu đã cố gắng tham khảo, cập nhật những thành tựu mới, nhưng với kiến thức còn hạn hẹp nên trong quá trình biên soạn chắc chắn không tránh khỏi những sai sót. Tác giả xin chân thành cảm ơn và sẵn sàng tiếp thu những góp ý của đồng nghiệp, của bạn đọc gần xa để những lần xuất bản sau, cuốn sách được hoàn chỉnh hơn.

TÁC GIẢ

MỤC LỤC

Chương 1

MỞ ĐẦU

1.1. KHÁI NIỆM VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN

1.1.1. Khái niệm về Công nghệ sinh học

Thuật ngữ Công nghệ sinh học (Biotechnology) được hiểu theo nhiều định nghĩa, khái niệm khác nhau và sự hiểu nó cũng chưa được thống nhất. Khái niệm này được hiểu tùy theo giai đoạn phát triển lịch sử của nó.

Công nghệ sinh học có thể hiểu theo hai nghĩa rộng và hẹp.

– Hiểu theo nghĩa rộng thì Công nghệ sinh học bao gồm cả những thành tựu, những ứng dụng sinh học trong thực tiễn đời sống con người xuất hiện từ hàng trăm thế kỷ nay như việc lên men rượu, bia, làm bánh mì, chế nước ngọt... cùng với các kỹ thuật cao cấp, hiện đại ngày nay. Nhiều nhà khoa học tách các ứng dụng lâu đời mang tính chất cổ truyền ra thành lĩnh vực ứng dụng sinh học.

– Công nghệ sinh học hiểu theo nghĩa hẹp liên quan đến các kỹ thuật hiện đại mang tính công nghệ như Công nghệ di truyền và các kỹ thuật hiện đại, cao cấp khác như tổng hợp các enzym, tổng hợp các peptid, tạo các dòng vi khuẩn tổng hợp protein của người có hoạt tính sinh học cần thiết, tạo các kháng thể, tạo các vacxin v.v... Theo nghĩa hẹp thì Công nghệ sinh học, bắt đầu từ năm 1970 khi kỹ thuật di truyền ra đời, trong đó nền tảng là công nghệ ADN tái tổ hợp. Thuật ngữ Công nghệ sinh học do kỹ sư người Hungari (Karl Ereky) nêu ra vào năm 1917 để mô tả quá trình chế biến củ cải bằng phương pháp lên men làm nguồn thức ăn nuôi lợn với quy mô lớn. Theo Karl Ereky, "Công nghệ sinh học là từ dùng để chỉ tất cả những việc, trong đó các sản phẩm được sản xuất từ các nguyên liệu thô với sự giúp đỡ của các vật chất sống". Từ năm 1961 trở đi, Công nghệ sinh học luôn gắn liền với những nghiên cứu về việc sản xuất công nghiệp các hàng hóa với dịch vụ thông qua các quá trình có sử dụng các cơ thể, hệ thống sinh học và chế biến.

Vào những năm 1960-1970, Công nghệ sinh học cũng được hiểu là công nghệ lên men (Industrial fermentation) vi sinh vật để tạo ra sản phẩm lên men mang tính chất sản xuất công nghiệp. Đầu những năm 1970, Công nghệ sinh học đã chuyển sang giai đoạn mới cao hơn hẳn nhờ kỹ thuật di truyền ra đời. Các kỹ thuật mới cho phép tạo giống mới trực tiếp nhanh hơn, tận dụng được nguồn gen của nhiều sinh vật khác nhau để tạo ra những chủng, những giống vi sinh vật, vật nuôi, cây trồng có sản lượng cao nhưng ít tốn công sức để gây đột biến, phân lập, chọn lọc như giai đoạn trước đây. Nhờ có các kỹ thuật mới mà các tế bào vi sinh vật, các tế bào động vật và cả tế bào thực vật được sử dụng như một "nhà máy sinh học" để sản xuất hàng loạt sản phẩm như các

protein có hoạt tính sinh học, các enzym và các sản phẩm khác. Các cơ thể động vật, thực vật có thể mang gen mới tạo ra các sản phẩm mới từ gen lạ đưa vào cơ thể mà không cần phải tiến hành lai tạo, chọn lọc các biến dị bằng các phương pháp lai hữu tính thông thường.

Năm 1987, theo W.H. Stone "Công nghệ sinh học là những công nghệ sử dụng các cơ thể sống, hoặc các phần của cơ thể như tế bào để tạo ra, hoặc thay đổi các sản phẩm nhằm cải tiến các cây trồng, vật nuôi, hoặc phát triển các vi sinh vật vào các ứng dụng đặc hiệu".

Theo khái niệm của Liên đoàn Công nghệ sinh học Châu Âu (EFB) thì "Công nghệ sinh học là ứng dụng tổng hợp của sinh hóa học, vi sinh vật và các khoa học về công nghệ để đạt sự ứng dụng công nghệ các năng lực của vi sinh vật, của các tế bào, các tổ chức nuôi cấy và các thành phần của chúng".

Theo Nghị quyết 18/CP của Chính phủ nước Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam ngày 11/3/1994 về phát triển Công nghệ sinh học ở Việt Nam đến năm 2010 thì "Công nghệ sinh học là một tập hợp các ngành khoa học (sinh học phân tử, di truyền học, vi sinh vật học, hóa sinh học và công nghệ học) nhằm tạo ra các công nghệ khai thác ở quy mô công nghiệp các hoạt động sống của vi sinh vật, tế bào thực vật và động vật".

Như vậy có thể tổng quát chung khái niệm về Công nghệ sinh học như sau: *"Công nghệ sinh học là các quá trình sản xuất ở quy mô công nghiệp có sự tham gia của các tác nhân sinh học (ở mức độ cơ thể, tế bào, hoặc thành phần dưới tế bào) dựa trên các thành tựu tổng hợp của nhiều ngành, nhiều bộ môn khoa học, nhằm phục vụ cho việc tăng sản phẩm vật chất cho xã hội và bảo vệ lợi ích của con người".*

Cũng có thể hiểu đơn giản *"Công nghệ sinh học là công nghệ sử dụng các quá trình sinh học của các tế bào vi sinh vật, động vật, thực vật tạo ra thương phẩm phục vụ lợi ích con người".*

1.1.2. Khái niệm về Công nghệ di truyền

Theo quan điểm Công nghệ sinh học hiện đại, các tác nhân sinh học tham gia vào các quá trình sản xuất ra các sản phẩm vật chất (thương phẩm) là những giống sinh vật mới, hoặc các sản phẩm của chúng được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền hiện đại (hay còn được gọi là Công nghệ di truyền).

Công nghệ di truyền (genetic technology) còn có thể hiểu là kỹ thuật di truyền (genetic engineering), công nghệ gen (gene technology), hoặc thao tác gen (gene manipulation) đang là công nghệ cốt lõi của Công nghệ sinh học hiện đại.

Ta có thể nêu khái niệm về Công nghệ di truyền là *"Công nghệ di truyền (công nghệ gene - gene technology) bao gồm các kỹ thuật hiện đại được thực hiện trên axit nucleic (ADN và ARN) nhằm nghiên cứu cấu trúc của gen, điều chỉnh và biến đổi gen, nhằm tách, tổng hợp và chuyển các gen mong muốn vào các tế bào vật chủ mới để tạo ra cơ thể sinh vật mới mang những đặc tính mới, cũng như tạo ra sản phẩm mới".*

Cũng có thể hiểu đơn giản *"Công nghệ di truyền là một khoa học về thao tác gen (gene manipulation) để chủ động tạo ra một thực thể sinh học mới".*

Các kỹ thuật chủ yếu của Công nghệ di truyền là: tách chiết gen, nhân dòng gen,

xác định trình tự gen, thiết kế các vector chuyển gen, biến nạp gen, biểu hiện gen lạ ở cơ thể, hoặc tế bào chủ nhận. Để thực hiện được Công nghệ di truyền, các thực nghiệm đều cần phải sử dụng ADN tái tổ hợp. Do đó, công nghệ ADN tái tổ hợp là công nghệ nền tảng, cơ bản nhất của Công nghệ di truyền.

1.2. LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN

1.2.1. Lịch sử phát triển của Công nghệ sinh học

Công nghệ sinh học mà thực chất là Công nghệ sinh học truyền thống có lịch sử hình thành lâu đời, từ lúc con người chưa hiểu biết về các vi sinh vật nhưng đã được ứng dụng nhiều trong thực tiễn sản xuất bia, rượu, giấm ăn. Ngày nay với những thành tựu, những kỹ thuật sinh học hiện đại thì Công nghệ sinh học chuyển sang giai đoạn mới thay đổi về chất. Với kỹ thuật sinh học hiện đại, con người có thể chủ động tạo ra những sinh vật có đặc tính mới và tạo ra sản phẩm mới mà trước kia loài sinh vật đó không có được.

Sự phát triển của Công nghệ sinh học có thể chia làm 3 giai đoạn:

a) Giai đoạn trước năm 1900

Từ xa xưa trong quá trình phát triển lịch sử, loài người đã biết sử dụng các loài vi sinh vật để chế biến và bảo quản thực phẩm. Người ta đã sử dụng các vi sinh vật lên men để tạo ra rượu bia, đồ uống lên men, sản xuất giấm ăn... Nhiều di tích khảo cổ ở các vùng Trung Đông, Ai Cập cho thấy, con người đã biết sản xuất rượu bia từ nhiều năm trước Công nguyên. Cùng thời gian này, loài người còn biết sử dụng các vi sinh vật để sản xuất phomat, làm sữa chua, chế biến đậu phụ, chao, làm giấm ăn... thực chất quá trình chế biến đồ uống, hoặc sản phẩm lên men cũng là các quá trình của Công nghệ sinh học ở mức thô sơ mang tính chất kinh nghiệm, sản xuất với trình độ thủ công và với quy mô sản xuất nhỏ.

b) Giai đoạn từ 1900 đến 1970

Trong giai đoạn này, con người đã hiểu biết về các quá trình sinh lý, sinh hóa, di truyền của sinh vật, đặc biệt là của các vi sinh vật và áp dụng vào sản xuất. Người ta đã sử dụng nhiều loài sinh vật để sản xuất sinh khối và sản phẩm của chúng.

Vào đầu những năm 1900, công nghệ lên men (industrial fermentation) phát triển. Quy trình lên men đã trở thành công nghệ hóa học sản xuất cồn ethanol, axeton, butanol... ở quy mô lớn.

Vào những năm 1940 đến 1960, với sự phát triển của công nghệ ứng dụng vi sinh, người ta đã sản xuất nhiều loại kháng sinh như penicillin, streptomycin và các kháng sinh khác.

Những năm về sau, với sự phát triển mạnh mẽ của công nghệ vi sinh vật đã sản xuất các sản phẩm mới như chuyển hóa các steroid, sản xuất các vitamin, các enzym... Hai giai đoạn trên đây có thể xếp vào Công nghệ sinh học truyền thống và phương pháp kỹ thuật sản xuất là phương pháp kinh điển.

c) Giai đoạn từ 1970 trở lại đây

Từ năm 1970 đến nay là giai đoạn Công nghệ sinh học hiện đại gắn liền với các kỹ

thuật và khoa học tiên tiến hiện đại về sinh vật như sinh học phân tử, kỹ thuật gen, công nghệ mô tế bào, công nghệ protein-enzym, công nghệ lên men, công nghệ chuyển gen, công nghệ sản xuất vacxin v.v... Giai đoạn này được coi là giai đoạn phát triển của Công nghệ di truyền.

1.2.2. Lịch sử phát triển của Công nghệ di truyền

Công nghệ di truyền (công nghệ gen) là Công nghệ sinh học hiện đại. Công nghệ sinh học hiện đại được ra đời từ những nghiên cứu vào những năm đầu của thập kỷ 70 thế kỷ XX của nhà khoa học Paul Berg ở trường Đại học Tổng hợp Stanford (Mỹ). Paul Berg đã phát triển kỹ thuật ADN tái tổ hợp (Recombination DNA) bằng cách sử dụng đặc tính cắt của enzym giới hạn (restriction enzyme) và khả năng nối các mạch ADN với nhau của enzym nối ligase. Nhờ kỹ thuật này, các vật chất di truyền thường là một hay vài gen có thể lắp ghép vào phân tử ADN có nguồn gốc khác (ví dụ lắp ghép gen của động vật, thực vật vào plasmid của vi khuẩn, hoặc vào phagơ λ) để hình thành ADN tái tổ hợp. Khi các ADN tái tổ hợp được tạo thành có thể được chuyển từ cơ thể này (cơ thể cho) sang cơ thể, hoặc tế bào khác (cơ thể nhận, tế bào nhận). Điều cơ bản và quan trọng là các gen tái tổ hợp này vẫn duy trì chức năng cũ của nó trong cơ thể, hoặc tế bào nhận. ADN tái tổ hợp là kỹ thuật đầu tiên của hàng loạt kỹ thuật Công nghệ sinh học hiện đại khác, tập hợp lại gọi là Công nghệ di truyền (Genetic technology). Vì vậy Công nghệ di truyền có thể định nghĩa là một khoa học thao tác gen (gene manipulation) để chủ động tạo nên một thực thể sinh học mới như phần khái niệm đã nêu ở trên.

Thành tựu đầu tiên của kỹ thuật ADN tái tổ hợp là việc sản xuất ra hoocmon sinh trưởng người (hGH-human growth hoocmon) nhờ vi sinh vật nhận là *Escherichia coli* (*E.coli*). Các nhà khoa học đã đưa được gen mã hóa hGH vào *E.coli*. *E.coli* có ADN tái tổ hợp đã sản sinh ra một lượng rất lớn hoocmon sinh trưởng người và được sử dụng vào thực tiễn y học.

Vào những năm đầu của thập kỷ 80 thế kỷ XX, nhờ kỹ thuật ADN tái tổ hợp, người ta đã sản xuất interferol, sản xuất các protein chống đông máu v.v... Khác với Công nghệ sinh học kinh điển, Công nghệ di truyền tiến hành nhờ các kỹ thuật hiện đại của nhiều lĩnh vực khoa học như hóa sinh, di truyền phân tử, vi sinh học phân tử và các kỹ thuật, thiết bị hiện đại, tiên tiến, chính xác khác.

1.3. CÁC LĨNH VỰC CHỦ YẾU CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN

Các lĩnh vực chủ yếu của Công nghệ di truyền nói riêng và Công nghệ sinh học nói chung thường được xem xét, phân loại trên cơ sở những thành tựu ứng dụng từ những năm 1970 trở lại đây. Tùy theo cách nhìn khác nhau mà Công nghệ sinh học và Công nghệ di truyền được phân loại theo các kiểu khác nhau. Tuy nhiên có thể chia làm 2 loại theo đối tượng, hoặc theo ngành ứng dụng phục vụ.

1.3.1. Công nghệ sinh học, Công nghệ di truyền phân loại theo đối tượng

a) Công nghệ sinh học phân tử (Molecular Biotechnology) gồm có công nghệ gen và

các ứng dụng của kỹ thuật di truyền. Sản phẩm của Công nghệ sinh học phân tử là các protein tái tổ hợp, vacxin tái tổ hợp, các vi sinh vật chuyển gen, các động, thực vật chuyển gen.

b) Công nghệ sinh học protein và enzym (Biotechnology of protein and enzymes): Sản phẩm của công nghệ này là các thành phần của máu (máu nhân tạo), các protein kháng thể, các hoocmon và các chất kích thích tăng trưởng, interleukin, các loại enzym (protease, amylase, pectinase...).

c) Công nghệ sinh học vi sinh vật (Microbial Biotechnology): Sản phẩm của Công nghệ sinh học vi sinh vật bao gồm từ các sản phẩm Công nghệ sinh học cổ truyền như rượu bia, phomat, tương, giấm... cho đến sản phẩm của Công nghệ di truyền như các enzym, các axit amin, các chất kháng sinh, các polyme hữu cơ và các hợp chất có hoạt tính sinh học khác.

d) Công nghệ sinh học động vật (Animal Biotechnology): Sản phẩm của Công nghệ sinh học động vật là các interferon, các hoocmon từ tế bào động vật đã được nuôi cấy, các vacxin tái tổ hợp, các kháng thể đơn dòng, các tế bào gốc, các động vật chuyển gen sinh học.

e) Công nghệ sinh học thực vật (Plant Biotechnology), sản phẩm của Công nghệ sinh học thực vật là các cây trồng được tạo từ mô của cây, các cây trồng chuyển gen có nhiều tính trạng mới như kháng sâu, kháng nấm, chịu hạn, hoặc các cây có khả năng sản xuất vacxin...

1.3.2. Công nghệ sinh học và Công nghệ di truyền phân loại theo ngành ứng dụng, hoặc lĩnh vực kinh tế xã hội

a) Theo ngành sản xuất ứng dụng, hoặc lĩnh vực kinh tế xã hội, Công nghệ sinh học và Công nghệ di truyền bao gồm:

– Công nghệ sinh học y học (Medical Biotechnology).

– Công nghệ sinh học nông nghiệp (Agricultural Biotechnology).

– Công nghệ sinh học thực phẩm (Food Biotechnology).

– Công nghệ học sinh học trong hóa học và vật liệu (Biotechnology in Chemistry and Meterials).

– Công nghệ sinh học năng lượng (Energetic Biotechnology).

– Công nghệ sinh học môi trường (Evironmental Biotechnology).

b) Ngoài sự phân loại trên, các nhà khoa học còn phân loại Công nghệ di truyền thành một số lĩnh vực sau:

– Khoa học về hệ gen (Genomics): Khoa học xác định trình tự các nucleotit của hệ gen và chức năng của chúng ở các loài sinh vật.

– Tin sinh học (Bioinformatics): Tập hợp các dẫn liệu về phân tích hệ gen.

– Biến nạp (Transformation): Chuyển gen mới (lạ) vào vi sinh vật, vật nuôi, cây trồng.

– Chọn giống phân tử (Molecular Breeding): Xác định, đánh giá các tính trạng mong muốn trong chọn tạo giống nhờ phân tích các chỉ thị di truyền phân tử (molecular genetics markers).

– Chẩn đoán học (Diagnostics): Xác định nhanh chóng, chính xác các bệnh di truyền và các tác nhân gây bệnh nhờ các kỹ thuật phân tử.

– Công nghệ sản xuất vacxin (Vacxine Technology): Tạo các vacxin tái tổ hợp để phòng và chống bệnh

Có thể nói rằng, việc phân loại những lĩnh vực của Công nghệ sinh học và Công nghệ di truyền là rất đa dạng, phong phú và ngày càng đi sâu vào những lĩnh vực cụ thể có liên quan đến đời sống của con người.

1.4. CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN TRÊN THẾ GIỚI

Như phần lược sử của Công nghệ sinh học và Công nghệ di truyền đã nêu, Công nghệ sinh học hiện đại trên thế giới được bắt đầu từ những năm 1960 trở lại đây với những mốc quan trọng trong lịch sử phát triển như:

Năm 1953 với sự phát minh ra cấu trúc của phân tử ADN của James Watson và Francis Crick đã thúc đẩy nhanh chóng sự phát triển của di truyền học ở mức độ phân tử. Công trình khoa học này đã đặt nền móng cho sinh học phân tử và Công nghệ sinh học hiện đại ngày nay.

Vào thập kỷ 60 thế kỷ XX, những phát minh quan trọng ra đời trong đó đã tìm ra bảng mã di truyền với 64 codon mã di truyền (1966).

Năm 1967, enzym nối ligase đã được chiết xuất, enzym này có thể nối các đoạn mạch đơn ADN với nhau, làm tiền đồ cho việc tạo ra các ADN tái tổ hợp về sau.

Năm 1970, người ta phát hiện và chiết xuất được enzym giới hạn (Restriction enzyms = RE) lần đầu tiên. Đây là mốc lịch sử hết sức quan trọng trong kỹ thuật di truyền. Enzym giới hạn được sử dụng để cắt các phân tử ADN tại những điểm đặc hiệu chính xác, tạo ra các đoạn ADN mong muốn, từ đó nối những đoạn ADN có nguồn gốc khác nhau để tạo ra các ADN tái tổ hợp.

Năm 1972, các phân tử ADN tái tổ hợp đầu tiên được tạo ra tại trường Đại học Stanford (Mỹ) do nhà khoa học Paul Berg và các cộng sự thực hiện. Các tác giả đã sử dụng các enzym giới hạn để cắt các phân tử ADN có nguồn gốc khác nhau rồi nối chúng lại với nhau bằng việc sử dụng enzym nối ligase. Kết quả là tạo ra ADN tái tổ hợp có nguồn gốc khác nhau. Năm 1973, các nhà khoa học đã nối nhiều đoạn ADN vào plasmid được tách ra từ vi khuẩn *E.coli*. Plasmid tái tổ hợp này có thể hoạt động, tự sao chép khi đưa vào tế bào vi khuẩn *E.coli* khác, từ đó tạo ra công nghệ quan trọng trong Công nghệ di truyền là việc tách dòng gen.

Năm 1976, xác định được gen ung thư đầu tiên.

Năm 1977, K.Itakara và Boyer tổng hợp nhân tạo gen mã hóa hoocmon somatostatin đưa vào *E.coli*. Các nòi *E.coli* này đã sản sinh hoocmon sinh trưởng người là somatotropin.

Năm 1978, lần đầu tiên insulin người được tổng hợp nhờ vi khuẩn *E.coli* bằng kỹ thuật di truyền. Insulin này có thể chữa bệnh tiểu đường cho người. Đầu tiên, người ta tiến hành tổng hợp 2 đoạn gen mã hóa cho 2 chuỗi polypeptit và gắn vào plasmid tạo ra 2 loại plasmid tái tổ hợp. Đưa 2 loại plasmid tái tổ hợp này vào các dòng vi khuẩn. Một dòng vi khuẩn tạo chuỗi polypeptit A và một dòng vi khuẩn tạo chuỗi polypeptit B.

Kết hợp 2 chuỗi polypeptit này trong điều kiện thích hợp sẽ tạo ra phân tử insulin có hoạt tính dùng để chữa bệnh tiểu đường.

Năm 1984, kỹ thuật chuỗi trùng hợp PCR được Kary Mullis đề xuất. Đây là kỹ thuật nền tảng cho Công nghệ di truyền.

Năm 1990, dự án hệ gen người với mục tiêu giải trình tự hơn 3 tỷ cặp bazơ (bp) của ADN người và lưu giữ thông tin trong cơ sở dữ liệu (database).

Năm 1997, Jan Wilmut và cộng sự công bố nhân bản vô tính từ nhân tế bào soma đưa vào tế bào trứng đã mất nhân, sau đó đưa trứng này vào tử cung của cừu cái khác. Từ đó đã sinh ra cừu Dolly.

Năm 2000, giải mã hệ gen thực vật đầu tiên loài *Arabidopsis thaliana*.

Năm 2003, công bố toàn bộ trình tự hệ gen người (30.000-35.000 gen). Xác định trình tự nucleotit của 3,3 tỷ cặp bazơ tạo nên ADN của người. Có 99,9% trình tự giống nhau ở tất cả mọi người, trong đó có khoảng 50% các gen chưa biết chức năng.

Năm 2003, công bố hệ gen của lúa, cụ thể như loại lúa *Oryza sativa*, loài phụ Indica có 45.000-56.000 gen, còn loài phụ Japonica có 32.000-50.000 gen.

Năm 2003, tổng diện tích cây trồng chuyển gen trên toàn cầu khoảng 67,7 triệu ha. Trong đó 5 quốc gia chính chiếm tới 99% gồm có Mỹ (63%), Argentina (21%), Canada (6,5%), Braxin (4,4%) và Trung Quốc (4,1%).

1.5. CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN Ở VIỆT NAM

Những thành tựu liên quan đến Công nghệ sinh học ở Việt Nam có thể nói là được bắt đầu từ cuối thế kỷ XIX.

Viện Pasteur Sài Gòn là cái nôi của Công nghệ sinh học Việt Nam, được thành lập năm 1891 do bác sĩ Albert Calmette làm giám đốc đầu tiên và sau đó là bác sĩ Alecxandre Yersin. Trong thời gian này, các nhà khoa học của Viện Pasteur Sài Gòn đã sản xuất được vacxin đậu mùa, vacxin phòng dại.

Năm 1925, Viện Pasteur Hà Nội được thành lập.

Năm 1936, các Viện Pasteur ở toàn Đông dương đặt dưới sự chỉ đạo của Paris để bảo đảm uy tín và chất lượng của các công trình khoa học.

Giai đoạn 1945-1954, dù trong chiến tranh có muôn vàn khó khăn, các nhà khoa học Việt Nam đã sản xuất hàng triệu liều vacxin phòng bệnh, chữa bệnh.

Năm 1949, bác sĩ Nguyễn Văn Hưởng cùng đồng nghiệp đã sản xuất vacxin chống đậu mùa, thương hàn, dịch tả.

Năm 1980, GS. Bác sĩ Phạm Ngọc Thạch và GS. Bác sĩ Đặng Văn Ngữ đã nuôi cấy nấm *Penicillium* để sản xuất dịch thô penicillin. Đặc biệt, GS. Bác sĩ Đặng Văn Ngữ đã xây dựng Viện Sốt rét Ký sinh trùng và Côn trùng để chỉ đạo công tác phòng chống dịch sốt rét trên toàn miền Bắc.

Giai đoạn từ 1955 đến nay: Sau ngày giải phóng và thống nhất đất nước, Công nghệ sinh học Việt Nam phát triển mạnh cả về lực lượng, về các lĩnh vực nghiên cứu và đào tạo. Công nghệ sản xuất vacxin do các công ty và các Viện vacxin đã sản xuất đủ

các loại vacxin viêm gan B, vacxin viêm não Nhật Bản, vacxin tả uống, vacxin phòng dại và nhiều loại vacxin khác như thương hàn, ho gà, uốn ván v.v...

Công nghệ rượu bia từ thời Pháp cho đến ngày nay được liên tục phát triển. Nhiều nhà máy sản xuất bột ngọt đã được xây dựng.

Từ năm 1995, các kỹ thuật sinh học hiện đại như nghiên cứu lập bản đồ gen, chẩn đoán phân tử, tạo vi sinh vật tái tổ hợp, chuyển gen ở động, thực vật, tạo vacxin tái tổ hợp... được triển khai nghiên cứu ở các Viện nghiên cứu và các Trường đại học trên khắp đất nước.

Năm 1997, các nhà khoa học đã hoàn thiện quy trình công nghệ chuyển gen hoocmon sinh trưởng người vào cá vàng (*Carassius auratus*).

Năm 2001, các nhà khoa học đã thành công việc chuyển gen hoocmon sinh trưởng người vào cá Chạch (*Misgurnus anguillicaudatus*) bằng vi tiêm.

Năm 2003, Viện Sinh học Nhiệt đới đã chuyển gen Bt kháng sâu vào cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) và cây ngô (*Zea mays*).

Năm 2005, Viện Công nghệ sinh học đã chuyển gen hoocmon sinh trưởng người vào cá chép (*Cyprinus carpio*), để cá có tốc độ lớn nhanh, hiệu suất sử dụng thức ăn cao.

Công nghệ sinh học là lĩnh vực công nghệ cao được Đảng và Nhà nước ta ưu tiên phát triển. Nghị quyết 18/CP của Thủ tướng Chính phủ khẳng định: "Cùng với các ngành công nghệ mũi nhọn khác (công nghệ thông tin, công nghệ tự động hóa và công nghệ vật liệu mới), Công nghệ sinh học sẽ góp phần khai thác tối ưu các nguồn nhân lực của đất nước phục vụ cho phát triển sản xuất, nâng cao chất lượng cuộc sống của nhân dân và chuẩn bị những tiền đề cần thiết về mặt công nghệ cho đất nước tiến vào thế kỷ XXI".

Chương 2

CÁC KỸ THUẬT CHỦ YẾU TRONG CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN

Vào năm 1972, các nhà khoa học tại trường Đại học Tổng hợp Stanford đã tạo ra các phân tử ADN tái tổ hợp đầu tiên bằng cách sử dụng enzym giới hạn cắt các phân tử ADN có nguồn gốc khác nhau và nối các đoạn ADN đó bằng enzym nối ligase. Phương pháp này ngày càng được mở rộng, đến năm 1973-1974, nhóm nhà khoa học Cohen, Helinski, Boyer đã tạo ra ADN tái tổ hợp có hoạt tính sinh học. Kỹ thuật mới này được thực hiện trong điều kiện thí nghiệm invitro (trong ống nghiệm) để tạo thành (ghép nối) các ADN có hoạt tính, sau đó đưa và gắn vào phân tử ADN khác trong tế bào sống.

Kỹ thuật gen được bắt đầu từ năm 1977, bao gồm các kỹ thuật thao tác trên gen nhằm điều chỉnh và biến đổi gen, hoặc tạo ra gen mới, từ đó tạo ra sản phẩm mới, hoặc các cơ thể mới. Kỹ thuật gen bao gồm một số kỹ thuật cơ bản, đó là: kỹ thuật ADN tái tổ hợp (recombination of gene), chuyển ghép gen (transfer of gene), dung hợp gen (gene fusion) và vi thao tác gen (gene micromanipulation).

2.1. KHÁI NIỆM VỀ ADN TÁI TỔ HỢP

ADN tái tổ hợp (recombinant DNA) là ADN được tạo ra từ hai hay nhiều nguồn vật liệu di truyền khác nhau. Phân tử ADN tái tổ hợp được tạo ra nhờ kỹ thuật ghép nối các đoạn ADN của các cá thể khác nhau trong cùng một loài, hoặc của các loài khác nhau.

Kỹ thuật tái tổ hợp ADN được thực hiện qua nhiều công đoạn phức tạp, tinh vi, thực chất là một công nghệ gồm các bước chủ yếu sau:

Bước 1: Nuôi tế bào cho plasmid để tạo vector chuyển gen và nuôi tế bào cho (ví dụ tế bào của người) để cung cấp ADN.

Bước 2: Tách chiết ADN plasmid và ADN tế bào cho. Bước này còn được gọi là phân lập gen.

Bước 3: Cắt cả hai loại ADN (ADN plasmid và ADN tế bào cho) bằng cùng một loại enzym giới hạn (restriction enzym - RE). Ví dụ, sử dụng enzym giới hạn endonuclease *Eco*RI tạo ra các đầu so le.

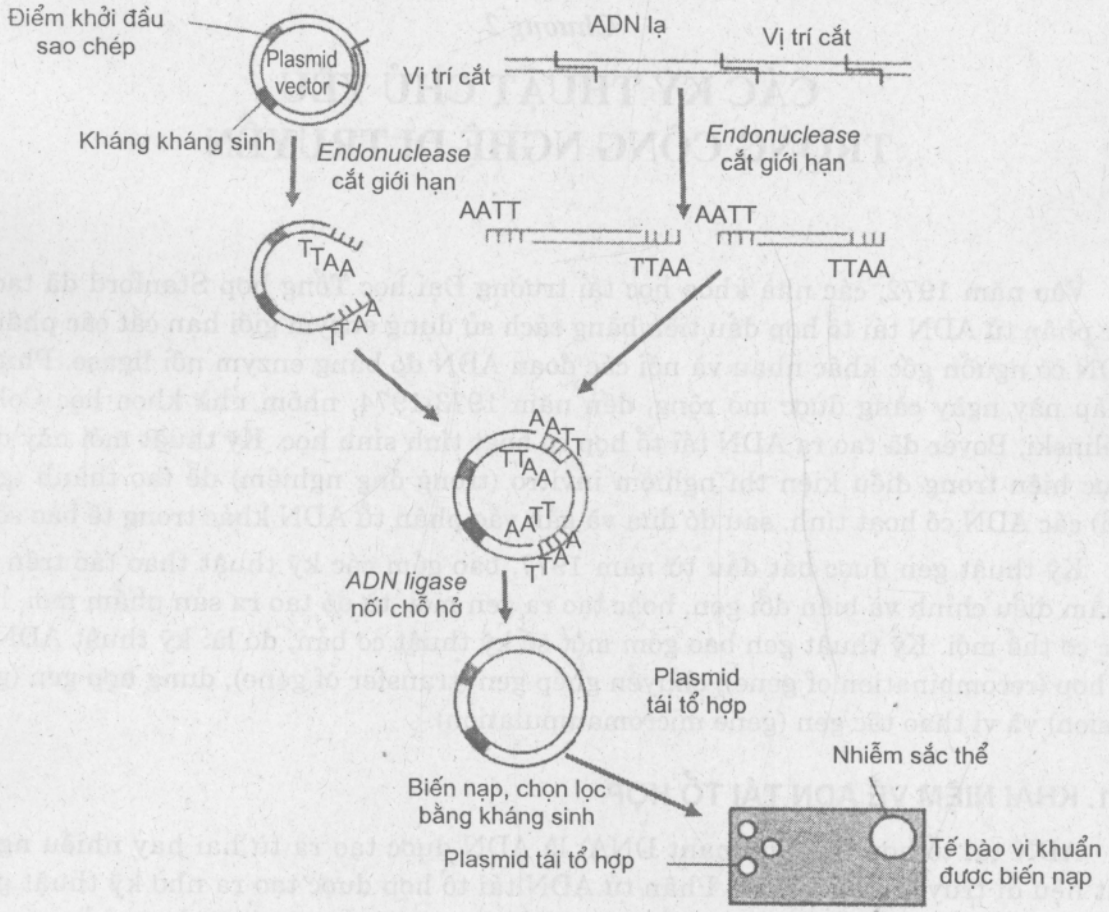
Bước 4: Trộn chung ADN plasmid đã bị cắt với ADN tế bào cho cũng đã bị cắt bởi một loại enzym giới hạn như đã nêu trên.

Bước 5: Bổ sung enzym nối ligase để tạo ra ADN tái tổ hợp hoàn chỉnh.

Bước 6: Biến nạp ADN tái tổ hợp vào tế bào chủ (ví dụ vi khuẩn *E.coli*) và nhân dòng.

Bước 7: Chọn lọc và tạo dòng tế bào chủ (vi khuẩn) mang ADN tái tổ hợp và theo dõi hoạt động, biểu hiện của gen thông qua sản phẩm của gen lấy từ tế bào cho.

Sơ đồ khái quát của quá trình tạo dòng ADN tái tổ hợp được nêu ở Hình 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ quá trình tạo dòng ADN tái tổ hợp

(Nguồn: Phạm Thành Hổ, 2005)

2.2. CÁC ENZYM CHỦ YẾU DÙNG TRONG KỸ THUẬT ADN TÁI TỔ HỢP

2.2.1. Các enzym giới hạn

Trong Công nghệ di truyền, muốn tạo ra ADN tái tổ hợp để đưa vào tế bào chủ cần phải có công cụ cắt plasmid hình vòng và đoạn ADN của tế bào rồi cho chúng nối lại với nhau. Công cụ cắt ADN là các enzym giới hạn.

a) Khái niệm về enzym giới hạn

Thông thường tế bào vi khuẩn bị nhiễm phagơ (thể thực khuẩn) thì vi khuẩn đó bị phagơ phá huỷ. Một số chủng vi khuẩn sau khi nhiễm phagơ lại không bị phá huỷ, do trong tế bào vi khuẩn này có loại enzym có khả năng cắt ADN phagơ thành những đoạn nhỏ. Năm 1970, Hamilton Smith là người đầu tiên tách được loại enzym này từ vi khuẩn *Haemophilus influenzae* được gọi tên là *Hin*II. Ngay sau đó, các nhà khoa học

đã nhận thấy rằng, phần lớn các loài vi khuẩn mang loại enzym có chức năng cắt ADN lạ xâm nhập để bảo vệ tế bào khỏi bị xâm nhập của các ADN lạ. Những enzym đó được gọi là enzym giới hạn.

Enzym giới hạn là enzym có khả năng nhận biết những đoạn trình tự ADN nhất định và cắt ADN ở ngay điểm này hay ở điểm kế cận. Tuỳ theo phương thức cắt và nguồn gốc của enzym giới hạn mà người ta phân loại và đặt tên cho các enzym giới hạn đó.

b) Phân loại enzym giới hạn

Các enzym giới hạn được phân thành 3 kiểu I, II và III. Các enzym giới hạn thường dùng phổ biến trong công nghệ ADN tái tổ hợp, Công nghệ di truyền thuộc kiểu II. Các enzym này cắt bên trong mạch ADN (không phân huỷ từ 2 đầu của ADN) nên còn được gọi là các enzym endonuclease. Enzym giới hạn kiểu II thực chất là endonuclease giới hạn kiểu II.

– Các endonuclease giới hạn kiểu II:

Cách gọi tên các enzym giới hạn kiểu II cũng như các enzym giới hạn khác dựa trên quy ước chung. Tên enzym giới hạn được ghép bởi chữ cái đầu tiên là tên chi và hai chữ tiếp theo là hai chữ cái tên loài của vi sinh vật mà enzym được tách chiết. Những chữ và số La mã tiếp theo là tên của chủng và dòng của loài sinh vật cụ thể đã tách chiết enzym.

Ví dụ:

Tên enzym	Chi	Loài	Chủng	Thứ tự dòng
	Escherichia	*coli*	Ry13	
*E.co*RI	*E.*	*co*	R	I
*E.co*RV	*E.*	*co*	R	V
	Bacillus	*amyloliquefaciens*	H	
*Bam*HI	*B*	*am*	H	I
	Haemophilus	*aegyptius*		
*Hae*III	*H*	*ae*		III
	Serratia	*martesens*		
*Sma*I	*S*	*ma*		I

Giá trị của enzym giới hạn là ở tính chất cắt đặc hiệu của chúng. Mỗi enzym cụ thể có thể nhận biết một đoạn trình tự đặc thù các cặp bazơ trên ADN. Đoạn nhận biết phổ biến nhất có chiều dài 4, 5, hoặc 6 nucleotit tương ứng với khoảng $4^4 = 256$ cặp bazơ, $4^5 = 1024$ cặp bazơ, hoặc $4^6 = 4096$ cặp bazơ có khả năng lặp lại một lần trong cấu trúc chung của ADN. Như vậy enzym giới hạn nhận biết đoạn trình tự 4 nucleotit sẽ cắt phân tử ADN ngắn hơn các enzym giới hạn nhận biết đoạn trình tự 5, hoặc 6 nucleotit. Có hai kiểu cắt của enzym giới hạn là kiểu cắt tạo đầu bằng (blunt ends) và đầu sole (đầu dính – cohesive ends). Enzym giới hạn cắt đầu bằng không tự nối các đoạn ADN lại với nhau. Để nối các đoạn ADN sau khi cắt, cần sử dụng enzym nối ligase và các

adaptor chuyên dụng cho mỗi loại enzym. Enzym giới hạn cắt đầu sole tạo đầu dính. Sau khi cắt chúng có thể tự nối lại với nhau theo nguyên tắc bổ sung. Chính vì vậy trong công nghệ ADN tái tổ hợp người ta thường dùng các enzym giới hạn cắt đầu sole.

Một số loại enzym giới hạn thường được sử dụng cùng với đoạn trình tự nhận biết và vị trí cắt của chúng được nêu ở Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Một số enzym giới hạn thường dùng

Enzym	Vi khuẩn có enzym	Đoạn nhận biết và cắt trên ADN
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens*	GGATCC CCTAG G
*Eco*RI	*E.coli RY13*	GAATTC CTTAA G
*Hha*I	*Haemophilus haemolyticus*	G CGC C GCG
*Hind*III	*Haemophilus influenzae*	AAGCTT TTCGAA
*Pst*I	*Providencia stuartii*	CT GCAG GACGTC
*Hae*III	*Haemophilus aegyptipus*	GG CC CC GG
*Sma*I	*Serratia martesens*	CCC GGG GGG CCC

Các enzym giới hạn cắt đầu sole cắt theo hai kiểu hình dạng. Các đoạn có thể sinh ra đó là các đoạn có đầu 3' nhô ra và các đoạn có đầu 5' nhô ra (H. 2.2).

*Hae*III	*Pst*I	*Eco*RI
5' – GG | CC – 3' CC GG	5' – C TGCA | G – 3' G ACGT C	5' – G | AATT C – 3' C T TAA G
Đầu bằng	Đầu sole 3'	Đầu sole 5'

Hình 2.2. Các dạng đầu mút tạo ra bởi các loại enzym giới hạn

Hai loại enzym tạo đầu sole 3' và đầu sole 5' thường được dùng trong Công nghệ di truyền do khả năng tự nối lại với nhau, hoặc với các đoạn ADN khác có đầu tương tự. Khi sử dụng từng loại enzym giới hạn cần có các điều kiện nhiệt độ, độ pH, dung môi thích hợp. Ví dụ, khi sử dụng enzym *Eco*RI để cắt ADN của tế bào động vật, cần sử dụng dung dịch đệm gồm 100mM Triston-HCl có pH = 7,5; 5mM $MgCl_2$; 100mg BSA/ml; 0,15% TristonX-100. Nguyên tắc chung cắt ADN bằng một enzym giới hạn

nào đó là ủ ADN sợi kép với một lượng enzym giới hạn thích hợp trong một chế độ dung dịch đệm theo hướng dẫn của nhà sản xuất và ở một nhiệt độ tối ưu cho chính loại enzym này. Trong điều kiện thích hợp, phản ứng cắt hoàn toàn một microgam ADN sợi kép kéo dài 1-3 giờ và thường ở 37°C. Một số loại enzym giới hạn có hoạt tính yếu, do vậy khi cắt có thể kéo dài thêm thời gian, hoặc bổ sung thêm enzym giới hạn sau 1-2 giờ rồi lại ủ tiếp.

2.2.2. Các enzym polymerase

Các enzym polymerase xúc tác cho quá trình sao chép các axit nucleic (ADN, hoặc ARN) được sử dụng nhiều trong Công nghệ di truyền. Khi nói về một enzym polymerase nào đó, người ta thường dùng thuật ngữ "phụ thuộc ADN", hoặc "phụ thuộc ARN" để chỉ axit nucleic mà enzym này xúc tác cho việc sao chép. ADN polymerase phụ thuộc ADN thì sao chép ADN sang ADN; ADN polymerase phụ thuộc ARN thì sao chép ARN sang ADN, còn enzym ARN polymerase phụ thuộc ADN thì phiên mã ADN sang ARN. Các enzym này tổng hợp axit nucleic bằng cách nối các nucleotit với nhau theo nguyên tắc bổ sung dựa theo mạch khuôn. Quá trình tổng hợp mạch mới bổ sung diễn ra theo chiều từ 5'-3' và sự khởi đầu cần có đầu 3'-OH tự do.

a) Các ADN polymerase

– Enzym ADN polymerase I (pol I) là enzym ADN polymerase I xúc tác cho việc lấp đầy chỗ trống trên phân tử ADN, hoặc mạch đơn của ADN ngắn. Enzym ADN polymerase I xúc tác tổng hợp mạch đơn mới đồng thời có vai trò trong việc sửa chữa các sai sót trong quá trình sao chép ADN. Ngoài chức năng tổng hợp, enzym ADN polymerase I còn có hoạt tính exonuclease, có nghĩa là nó có khả năng thuỷ phân liên kết giữa các nucleotit từ hai đầu của phân tử ADN, cắt rời từng nucleotit theo cả 2 chiều 5'-3' và 3'-5'. Trong nhiều trường hợp, enzym ADN polymerase I được sử dụng trong kỹ thuật xác định trình tự ADN bằng phương pháp dideoxy, tổng hợp mẫu dò có đánh dấu phóng xạ, hoặc thiết kế các vector mạch đơn.

Trong thực tế enzym ADN polymerase I ít được sử dụng mà người ta thường sử dụng một sản phẩm thuỷ phân của nó được gọi là đoạn Klenow (Klenow fragment). Đoạn này vẫn giữ được hoạt tính của polymerase và exonuclease 5'-3'. Đoạn Klenow được sử dụng khi cần sao chép một phân tử ADN mạch đơn vì chức năng exonuclease bị thiếu khả năng cắt đầu 3' - 5' nên enzym này không thể thuỷ phân mạch đơn làm khuôn trong quá trình tổng hợp ADN mới.

– Enzym T_4 ADN polymerase có nguồn gốc từ thể thực khuẩn T_4 (phage T_4) xâm nhiễm vi khuẩn *E.coli*. Hoạt tính của enzym T_4 ADN polymerase tương tự đoạn Klenow. Do nó có hoạt tính exonuclease 3'-5' mạnh nên thường được sử dụng để tổng hợp mẫu dò có độ phóng xạ cao.

– Enzym *Taq* polymerase được chiết xuất từ vi khuẩn chịu nhiệt *Thermophilus aquaticus*. Enzym *Taq* polymerase thường sử dụng trong việc nhân gen trong kỹ thuật chuỗi trùng hợp (kỹ thuật PCR). Enzym *Taq* có khả năng tăng cường sự bắt cặp tạo ADN bổ trợ (cADN-complementary ADN) nhưng không hoạt động trên các phân tử ARN.

Hiện nay còn có nhiều loại ADN polymerase khác lưu hành trên thị trường như T_7 ADN polymerase, *Vent* ADN polymerase...

b) Các enzym ARN polymerase

Có ba loại enzym ARN polymerase thường được dùng trong thực tế, đó là SP_6 ARN polymerase, T_3 ARN polymerase và T_7 ARN polymerase. Enzym SP_6 ARN polymerase được tách chiết từ phage xâm nhiễm vi khuẩn *Samonella typhimurium*. Enzym T_3 ARN polymerase và T_7 ARN polymerase được tách chiết từ phage xâm nhiễm *E.coli*. Các enzym này xúc tác quá trình phiên mã tổng hợp ARN từ mạch khuôn của phân tử ADN theo chiều từ 5'-3' (mạch khuôn có chiều 3'-5'). Trên thực tế ARN polymerase được ứng dụng trong tổng hợp mẫu dò ARN và trong việc nghiên cứu quá trình phiên mã tổng hợp mARN.

c) Enzym phiên mã ngược (Reverse transcriptase)

Enzym phiên mã ngược có khả năng tổng hợp ADN một mạch gọi là ADN bổ trợ (cADN) từ khuôn mARN, hoặc từ một đoạn polynucleotit được tổng hợp bằng con đường hoá học. Nhờ có enzym phiên mã ngược này mà có thể tổng hợp được hầu hết các gen riêng biệt nào đó nếu như có mặt mARN của gen đó. Các cADN mạch đơn có thể biến thành mạch kép nhờ ADN polymerase và được gọi là cADN mạch kép (c-DNA duplex). Đoạn cADN mạch kép có thể gắn vào plasmid rồi biến nạp vào vi khuẩn, từ đó tạo dòng c-ADN. Nếu cADN có nguồn gốc từ 1 gen thì ta tạo được dòng gen. Trong trường hợp mARN trưởng thành khi đã ở ngoài nhân thì ta sẽ thu được dòng gen chỉ chứa những đoạn mã hoá (exon). Không có đoạn không mã hóa (intron).

2.2.3. Các enzym nối (Ligase)

Enzym ligase là enzym nối quan trọng trong tế bào. Các enzym này xúc tác hình thành các liên kết phosphodiester để nối các đoạn axit nucleic với nhau. ADN ligase xúc tác nối hai đoạn ADN với nhau, ARN ligase xúc tác nối các đoạn ARN với nhau. Trong công nghệ ADN tái tổ hợp, ADN ligase là enzym chủ yếu được sử dụng rộng rãi. Có một số loại enzym nối khác nhau, nhưng enzym T_4 ADN ligase kết hợp với hai loại enzym T_4 polynucleotit kinase và alkaline phosphatase được sử dụng rộng rãi nhất trong các thí nghiệm về Công nghệ di truyền.

Có 3 loại enzym nối thường dùng trong Công nghệ di truyền. Enzym *E.coli* ADN ligase được tách chiết từ vi khuẩn *E.coli*, xúc tác phản ứng nối hai đoạn trình tự ADN có đầu sole. Enzym T_4 ADN ligase được tách chiết từ phage T_4 xâm nhiễm vào *E.coli* có chức năng giống như *E.coli* ADN ligase nhưng lại có khả năng nối hai đoạn trình tự ADN có đầu bằng và là enzym nối được ưa chuộng nhất hiện nay. Enzym T_4 ARN ligase tách chiết từ phage T_4 xâm nhiễm *E.coli*, có khả năng nối hai trình tự ARN bằng các liên kết phosphodiester.

Ngoài các loại enzym nối kể trên, hiện nay người ta còn sử dụng các đoạn nối (đầu dính-adaptor) cho các enzym cắt đầu bằng. Adaptor xúc tác nối các đoạn ADN do các enzym giới hạn cắt đầu bằng từ đó tạo nên đầu sole. Mỗi loại enzym cắt đầu bằng đều có các loại adaptor đặc trưng riêng.

2.2.4. Các enzym nuclease

Các enzym nuclease phân huỷ các axit nucleic bằng cách làm đứt các liên kết phosphodiester là liên kết nối các nucleotit cùng một mạch với nhau. Ngoài các enzym giới hạn đã nêu ở trên còn có các loại nuclease chủ yếu sau:

– Enzym ADNase I (endonuclease) tách chiết từ tụy của bò, xúc tác phản ứng thuỷ phân các liên kết ngay sau một bazơ nitơ ở cả mạch đơn và mạch kép hoàn toàn ngẫu nhiên.

– Enzym S1 nuclease (endonuclease) là enzym tách chiết từ nấm mốc *Aspegillus oryzae*. S1 nuclease phân cắt các ADN mạch đơn và cả ARN.

– Enzym nuclease BAL 3 (endonuclease) phân cắt cả 2 đầu 5' và 3' của ADN và không có khả năng cắt nội liên kết.

– Enzym exonuclease III là một 3' exonuclease cắt đầu 3' của mạch đơn và tạo thành các đoạn ADN có đầu 5' nhô ra.

– Enzym ARNase A tách chiết từ tuy bò. Enzym này thường được sử dụng để loại bỏ ARN trong hỗn hợp ADN và ARN.

– Enzym ARNase H dùng để loại bỏ ARN trong các phân tử lai ADN-ARN, nhất là sau phản ứng phiên mã ngược để hình thành mạch thứ hai của cADN, từ đó tạo nên phân tử cADN kép.

2.3. CÁC VECTOR SỬ DỤNG TRONG CÔNG NGHỆ ADN TÁI TỔ HỢP

Muốn chuyển được gen mong muốn từ thể cho sang vật chủ nhận (thể nhận), hoặc tách dòng gen, điều cơ bản là cần phải có vật chuyển gen (vector chuyển gen). Vector chuyển gen là phân tử ADN nhỏ có khả năng mang được gen cần thiết. Vector chuyển gen phải các đặc điểm quan trọng, cần thiết sau:

- Có điểm khởi đầu sao chép (origin of replication - ori) để tự sao chép mà tồn tại độc lập trong tế bào.

– Có các đoạn trình tự nhận biết cho enzym giới hạn cắt rồi để hở tạo nơi lắp ráp các đoạn gen lạ.

– Có đoạn trình tự khởi điểm (promoter).

– Có dấu chuẩn chọn lọc cho phép dễ dàng phát hiện nhận biết chúng trong tế bào chủ nhận. Thông thường dấu chuẩn chọn lọc là các gen kháng chất kháng sinh, hoặc gen tổng hợp chất màu.

Để bảo đảm được tính bền vững của ADN tái tổ hợp, ngoài các đặc điểm trên vector chuyển gen cũng cần những đặc tính khác để cho việc tạo, tách dòng dễ thực hiện như:

– Chứa các gen vô hiệu hoá các đoạn ADN không mong muốn bị gắn nhầm vào.

– Có khả năng tạo nhiều bản sao để khi tách khỏi tế bào được số lượng lớn, đảm bảo sự khuếch đại của gen lạ mong muốn được gắn vào.

Giá trị của các vector chuyển gen ở chỗ nó được cấu tạo thuận tiện cho mục đích sử dụng. Hiện tại chưa có loại vector chuyển gen toàn năng, mà cần phải lựa chọn vector chuyển gen cho từng đối tượng và tuỳ thuộc vào kích thước của đoạn gen cần được chuyển.

– Các vector chuyển gen có các ứng dụng quan trọng chủ yếu:

– Tạo dòng, nhân dòng các đoạn trình tự, hoặc gen để tạo nhiều bản sao giống nhau.

– Nghiên cứu sự biểu hiện của một đoạn trình tự ADN, hoặc một gen.

– Chuyển gen vào tế bào của sinh vật khác (vật chủ nhận).

– Sản xuất các ARN.

– Sản xuất protein được tổng hợp từ gen đã được tạo dòng. Do tính chất quan trọng và nhiều ứng dụng nên các vector chuyển gen ngày càng được khám phá, hoàn thiện không ngừng. Từ những vector chuyển gen sẵn có trong tự nhiên như plasmid ở vi khuẩn, ngày nay người ta đã tạo ra nhiều loại vector phức tạp ứng dụng vào nhiều mục đích khác nhau, thậm chí tạo ra cả nhiễm sắc thể nhân tạo.

2.3.1. Các vector plasmid

Nhiều loại plasmid được tìm thấy ở các vi khuẩn nhân sơ, hoặc ở một số nấm men. Plasmid là những phân tử ADN có kích thước nhỏ (2-5kb), dạng vòng, nằm độc lập trong tế bào chất. Plasmid có khả năng sao chép độc lập, không phụ thuộc vào sự sao chép ADN nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Mỗi tế bào vi khuẩn có trung bình khoảng 20 plasmid.

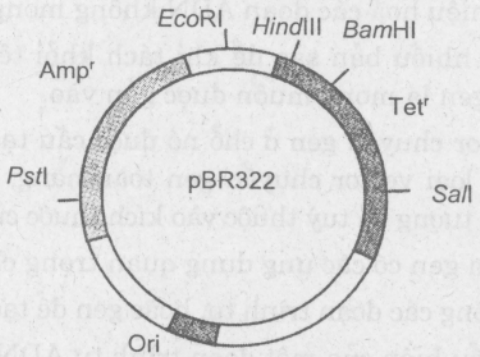
Có nhiều loại plasmid khác nhau. Tuỳ theo chức năng và các gen có trên đó, người ta chia nhiều loại khác nhau như plasmid giới tính (F), plasmid kháng chất kháng sinh (R), plasmid có gen mã hoá chất colicin giết các vi khuẩn (col)... Một cách phân loại khác dựa theo phương thức truyền sang vật nhận, được chia thành hai nhóm, tiếp hợp và không tiếp hợp.

Các plasmid tiếp hợp có thể tự truyền từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác thông qua quá trình tiếp hợp. Quá trình này đòi hỏi plasmid chứa đoạn đặc thù *tra* (transfer) và đoạn *mob* (mobilising). Plasmid tiếp hợp thường lớn, có cơ chế kiểm soát chặt chẽ việc sao chép ADN và tồn tại trong tế bào với số lượng bản sao thấp.

Các plasmid không tiếp hợp thì không tự truyền đi được để vào vật nhận. Plasmid không tiếp hợp thường nhỏ, sao chép một cách thoải mái và tồn tại trong tế bào với số bản sao lớn hơn so với plasmid tiếp hợp. Các plasmid luôn được cải biến để ngày càng thuận tiện hơn qua nhiều thế hệ, thuận tiện cho công nghệ ADN tái tổ hợp.

Plasmid thế hệ thứ nhất là những plasmid đầu tiên được sử dụng để tách dòng như pSC1001, ColE1...

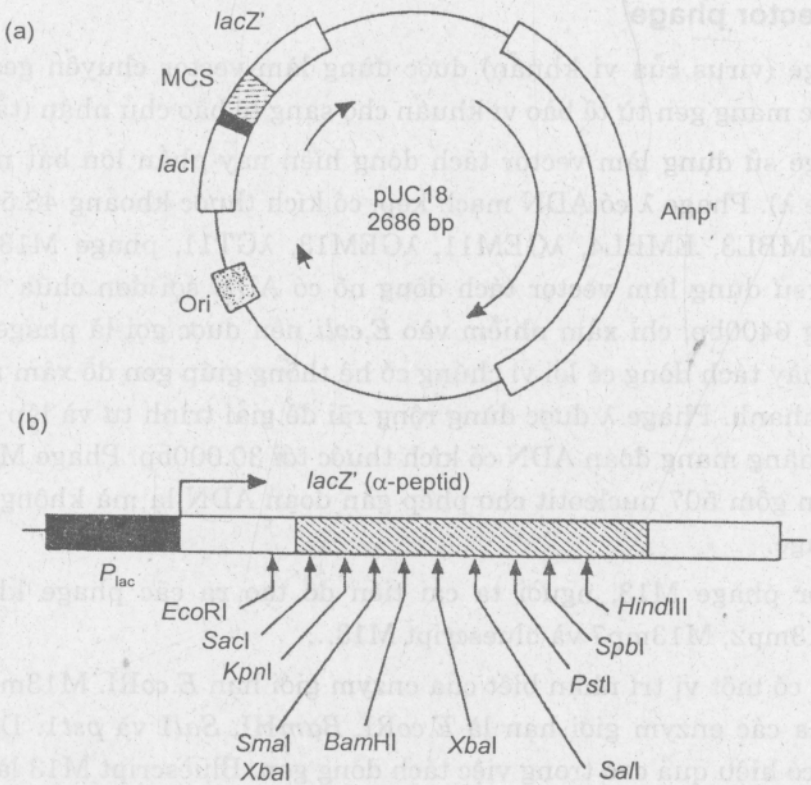
Plasmid thế hệ thứ hai được tạo ra bằng cách kết hợp các đặc tính quý của nhiều plasmid tự nhiên, gắn thêm gen chỉ thị để tạo nên một plasmid mới. Điển hình cho plasmid thế hệ thứ hai và cũng là một trong những plasmid được sử dụng rộng rãi nhất trong Công nghệ di truyền, đó là plasmid pBR322 (H.2.3).



Hình 2.3. Plasmid pBR322

Ký hiệu một plasmid bao gồm chữ đầu p (viết tắt của plasmid), chữ thứ 2, 3 là BR (chữ đầu tiên của các tác giả, hoặc tên loài vi khuẩn phát hiện ra plasmid đó), còn các chữ số sau cùng (chỉ thứ tự chủng vi khuẩn). Ví dụ, pBR32 thì B (Bolivon) và R(Rodriquez) là hai tác giả tạo nên, còn 322 là thứ tự chủng vi khuẩn tách chiết plasmid.

Plasmid pBR322 có kích thước 4,36kb mang 2 gen kháng chất kháng sinh ampicilline (Amp^r) và kháng chất kháng sinh tetracycline (Tet^r), một trình tự khởi đầu sao chép (ori) và nhiều trình tự nhận biết của các enzym giới hạn (*E.co*RI, *Hind*III, *Bam*HI, *Sal*I, *Pst*I...). Plasmid pBR322 có khả năng sao chép độc lập với nhiễm sắc thể của *E.coli*. Mỗi tế bào *E.coli* chứa khoảng 20-30 bản sao. Trong những điều kiện nuôi cấy thuận lợi, tế bào *E.coli* có thể chứa tới 1.000 bản sao. Plasmid pBR322 cho phép gắn đoạn ADN lạ có kích thước tới 6kb nó vẫn hoạt động bình thường. Từ plasmid pBR322 có thể cải tiến tạo ra một số loại plasmid khác để hình thành nhóm pBR. Một trong những dẫn xuất thuộc nhóm pBR là pAT153. Plasmid này được tạo ra bằng cách loại bỏ 2 đoạn ADN của pBR322 sau khi xử lý pBR322 bằng enzym giới hạn *Hae*II. Lượng ADN bị loại bỏ rất nhỏ (705bp) nhưng hiệu quả làm tăng số bản sao lên 3 lần so với pBR322 ban đầu và có mức bền vững sinh học cao hơn so với pBR322.



Hình 2.4. Cấu tạo của pUC18

a) Bản đồ cấu tạo chung

b) Đoạn đa liên kết MCS nằm ngay sau khởi điểm lac (P_{lac})

(Nguồn: Lê Đình Lương, Quyền Đình Thi, 2003)

Mặc dầu vector plasmid pBR322 và pAT153 được sử dụng rộng rãi trong việc tách dòng gen, nhưng người ta vẫn cố gắng tạo ra những plasmid mạnh hơn. Plasmid nhân tạo thế hệ thứ 3 rất mạnh, có kích thước nhỏ và có một đoạn đa liên kết (polylinker), hoặc điểm đa tách dòng (multiple cloning site). Đoạn đa liên kết là đoạn polynucleotit tổng hợp, mang một chuỗi các vị trí nhận biết của nhiều loại enzym giới hạn. Nhóm plasmid này là các plasmid pUC và điển hình là pUC18. Plasmid pUC18 được cải tiến từ pBR322 có kích thước là 2686bp. Plasmid pUC18 có điểm khởi đầu sao chép (ori), mang gen kháng kháng sinh ampicilline (Amp^r). Ngoài ra nó còn có gen ức chế gen lac (lac I), đoạn đa liên kết (MCS) và gen lacZ'. Đoạn đa liên kết gồm nhiều vị trí nhận biết của các enzym giới hạn (H.2.4).

Gen lacZ' giúp dễ dàng phát hiện vector tái tổ hợp nhờ quan sát màu sắc khuẩn lạc trên môi trường thạch. Bình thường khuẩn lạc có màu xanh do enzym β-galactosidase được tổng hợp. Khi gen cần chuyển đã gắn vào vector ở vị trí gần gen lacZ' thì khuẩn lạc sẽ có màu trắng do enzym β-galactosodase không được tổng hợp là vì vector đã có gen ức chế lacI.

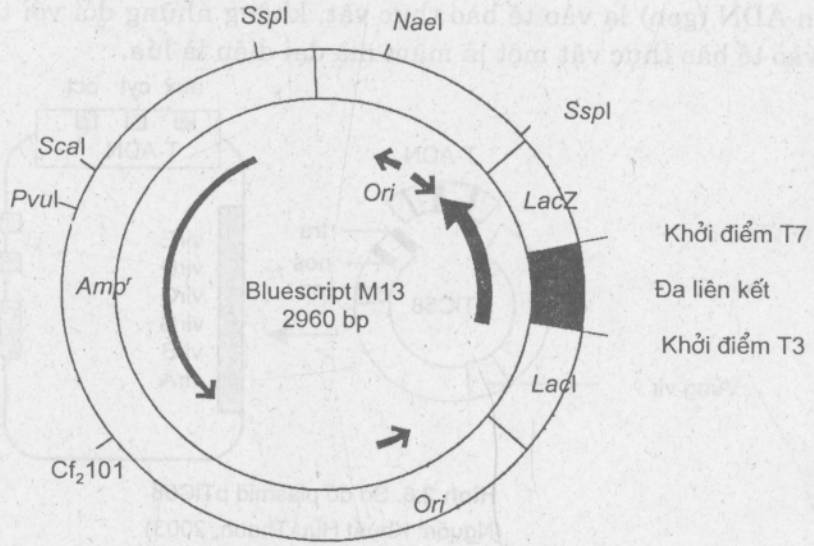
2.3.2. Các vector phage

Các phage (virus của vi khuẩn) được dùng làm vector chuyển gen do khả năng thực hiện việc mang gen từ tế bào vi khuẩn cho sang tế bào chủ nhận (tải nạp).

Các phage sử dụng làm vector tách dòng hiện nay phần lớn bắt nguồn từ phage lamda (phage λ). Phage λ có ADN mạch kép, có kích thước khoảng 48.500bp. Có nhiều loại phage EMBL3, EMBL4, λGEM11, λGEM13, λGT11, phage M13... Phage M13 thường được sử dụng làm vector tách dòng nó có ADN sợi đơn chứa 10 gen, có kích thước khoảng 6400bp, chỉ xâm nhiễm vào *E.coli* nên được gọi là phage cho *E.coli*. Sử dụng vector này tách dòng có lợi vì chúng có hệ thống giúp gen dễ xâm nhập vào *E.coli* và sao chép nhanh. Phage λ được dùng rộng rãi để giải trình tự và lập ngân hàng gen vì nó có khả năng mang đoạn ADN có kích thước tới 30.000bp. Phage M13 có một đoạn ở giữa sợi đơn gồm 507 nucleotit cho phép gắn đoạn ADN lạ mà không gây hỏng chức năng của phage.

Từ vector phage M13, người ta cải tiến để tạo ra các phage khác như vector M13mp1, M13mp2, M13mp7 và bluescript M13...

M13mp2 có một vị trí nhận biết của enzym giới hạn *E.co*RI. M13mp7 có bốn vị trí nhận biết của các enzym giới hạn là *E.co*RI, *Bam*HI, *Sal*I và *pst*1. Do vậy M13mp7 thuận lợi và có hiệu quả cao trong việc tách dòng gen. Bluescript M13 là vector được sử dụng rất rộng rãi trong Công nghệ di truyền có kích thước khoảng 2,96kb. Vector bluescript M13 mang gen kháng với kháng sinh ampicillin, gen lacI, gen lacZ. Xen giữa gen lacI và lacZ là đoạn đa liên kết (polylinker) có hai khởi điểm T3 và T7. Vector này chứa nhiều vị trí nhận biết của các enzym giới hạn như SspI, NaeI, ScaI, PvuI, $Cf_2$101... (Hình 2.5).



Hình 2.5. Vector bluescript M13

2.3.3. Cosmid vector

Cosmid vector được thiết kế để nhân dòng những đoạn ADN lớn (khoảng 40-45kb). Đây là loại vector nhân tạo kết hợp các thuộc tính của plasmid với phage. Cosmid vector có chứa đầu cos (đầu dính) của phage giúp ADN của phage từ dạng thẳng nối lại thành vòng tròn nên có thể gói bọc dễ dàng trong phần đầu của phage. Mặt khác cosmid vector lại có phần gốc plasmid, do vậy chúng có khả năng tự nhân đôi như những plasmid của vi khuẩn. Do hầu như toàn bộ phần ADN của phage đã được cắt bỏ, nên chúng có khả năng mang đoạn ADN ngoại lai có kích thước lớn. Khi đoạn ADN ngoại lai được ghép nối, các cosmid tái tổ hợp sẽ được gói bọc trong phage. Phage mang ADN tái tổ hợp không tự nhân lên được vì phần ADN phage đã bị loại bỏ nhưng chúng vẫn có khả năng lây nhiễm vào vi khuẩn. Tuy nhiên sau khi vào vi khuẩn, chúng lại có khả năng tự nhân lên do bản thân trong vi khuẩn đã có plasmid bình thường. Cosmid mang đoạn gen lạ có thể dài đến 45kb dùng để lập thư viện gen ở ruồi giấm, chuột, thậm chí cả ở người.

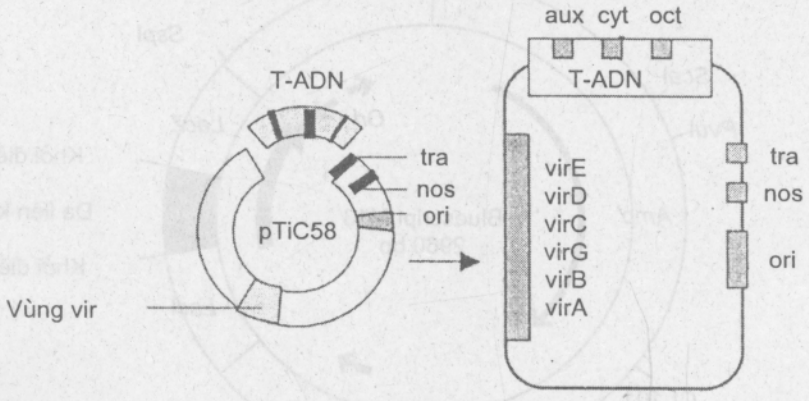
2.3.4. Các vector khác

a) Plasmid Ti

Plasmid Ti được sử dụng rộng rãi trong việc chuyển gen ở thực vật. Plasmid Ti bắt nguồn từ vi khuẩn trong đất, loài *Agrobacterium tumifaciens* gây bệnh tạo khối u (tumor) ở thực vật. Nhân tố gây khối u này là plasmid Ti (Tumor inducing) có ADN vòng tròn có kích thước khoảng 200kb. Plasmid Ti chứa đoạn T-ADN cho phép xâm nhập vào hệ gen (genome) của tế bào chủ. Enzym chịu trách nhiệm chuyển đoạn T-ADN từ plasmid vào genome tế bào chủ được mã hoá bởi vùng vir. Vùng vir gồm có 6 gen (virA, virB, virC, virD, virE và virG). Đoạn T-ADN mang gen mã hoá tổng hợp auxin, cytocin và oncogen làm cho các tế bào phân chia không kiểm soát, do vậy tạo nên các khối u (Hình 2.6).

Hiện nay, người ta đã thành công trong việc cải biến plasmid Ti bằng cách cắt bỏ hầu hết các đoạn gen gây phát triển khối u, chỉ để lại vùng vir và phần T-ADN tối thiểu mang các điểm ghép gen. Loại vector mới này sử dụng rất hiệu quả trong việc

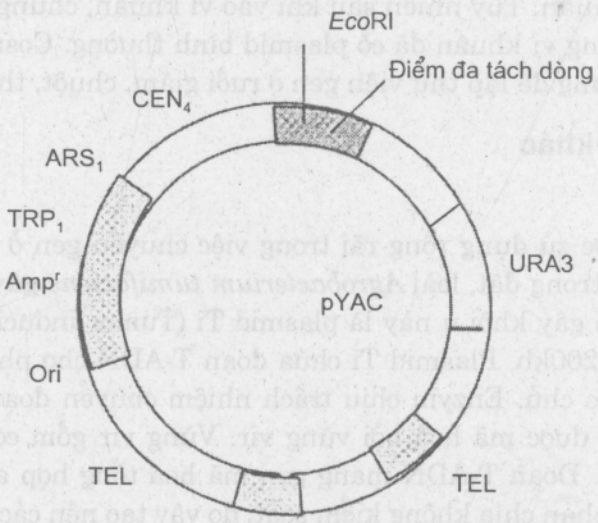
đưa đoạn ADN (gen) lạ vào tế bào thực vật, không những đối với thực vật hai lá mầm mà còn vào tế bào thực vật một lá mầm mà đại diện là lúa.



Hình 2.6. Sơ đồ plasmid pTiC58
(Nguồn: Khuất Hữu Thanh, 2003)

b) Vector nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men YAC

Nấm men là đối tượng quan trọng trong Công nghệ di truyền. Các plasmid có nguồn gốc từ vi khuẩn đưa vào nấm men hoạt động thường không hiệu quả. Ngược lại plasmid có nguồn gốc nấm men đưa vào tế bào vi khuẩn lại không hoạt động. Cho tới nay ở vi sinh vật nhân chuẩn (eukaryota) mới chỉ tìm được một loại plasmid duy nhất, đó là plasmid hình vòng, có kích thước khoảng 2 micromet, có nhiều trong tế bào nấm men *Sacchromyces cerevisiae*. Người ta cải biến plasmid này qua nhiều bước tạo thành nhiễm sắc thể (NST) nhân tạo nấm men, gọi là pYAC (yeast artificial chromosome) (Hình 2.7). pYAC có khả năng mang đoạn ADN lạ dài đến 2000kb. Sự cải biến có thể tạo ra các plasmid nhân tạo của NST nấm men được ứng dụng trong việc tách dòng gen, lập ngân hàng genome và dùng trong chuyển gen ở tế bào động vật, thực vật.



Hình 2.7. Sơ đồ vector pYAC

Ghi chú: Điểm khởi đầu sao chép (ori); gen kháng sinh ampicillin (Amp^r); đoạn trình tự sao chép của nấm men (ARS_1) tâm động NST (CEN_4); điểm mút (TEL); các gen làm dấu chuẩn chọn lọc TRP_1 và URA3, điểm cắt của enzym giới hạn (*E.coRI*).

c) Vector là virus của tế bào eukaryote

Các vector virus thường được sử dụng là các loại virus SV40 (Simian virus) adenovirus, retrovirus, baculovirus và virus herpes... Các vector nhóm này được sử dụng trong tách dòng gen và chuyển gen ở tế bào động vật, thực vật bậc cao.

Nhìn chung có nhiều loại vector khác nhau được dùng trong Công nghệ di truyền. Mỗi loại vector có tế bào chủ đặc trưng và khả năng xen đoạn ADN có kích thước khác nhau (xem bảng 2.2).

Bảng 2.2. Khả năng mang đoạn xen ADN của một số vector

Hệ thống vector	Tế bào chủ	Độ dài đoạn xen (kb)
Plasmid	*E.coli*	0,1-10
Phage λ	*E.coli*	10-20
Cosmid	*E.coli*	35-45
BAC (NST nhân tạo vi khuẩn)	*E.coli*	50-300
YAC (NST nhân tạo nấm men)	*S.cerevisiae*	100-2000
MAC (NST nhân tạo động vật có vú)	Tế bào động vật	>2000

2.4. CÁC LOẠI TẾ BÀO CHỦ

Nhiều loại tế bào chủ khác nhau được sử dụng phụ thuộc vào mục đích sử dụng như:

– Nuôi số lượng lớn để tách plasmid cho thí nghiệm tạo dòng. Hệ thống tế bào chủ này cần đơn giản, dễ sử dụng.

– Dùng để biểu hiện gen, đặc biệt ở sinh vật nhân chuẩn bậc cao như động vật, thực vật. Hệ thống tế bào chủ này cần mang tính đặc thù.

– Dùng để sản xuất protein tái tổ hợp.

Tuỳ theo mục đích sử dụng mà chọn một loại tế bào chủ thích hợp. Các tế bào chủ có thể chia làm hai hệ thống chính, đó là các tế bào chủ nhân sơ và tế bào chủ nhân chuẩn.

2.4.1. Tế bào chủ nhân sơ

Một loại tế bào chủ lý tưởng là tế bào cần phải dễ nuôi cấy, dễ giữ và nhân giống, lại chấp nhận được nhiều loại vector. Vi khuẩn *E.coli* đáp ứng các yêu cầu của tế bào chủ lý tưởng và được sử dụng nhiều trong kỹ thuật tạo và tách dòng gen. Do tính chất đặc biệt của tế bào chủ lý tưởng nên *E.coli* được nghiên cứu tỷ mỷ về cơ chế di truyền, phân lập và tạo nên nhiều chủng khác nhau. Các nghiên cứu đó làm cơ sở cho kỹ thuật ADN tái tổ hợp và Công nghệ di truyền.

E.coli là vi khuẩn gram âm, có hình que (dài khoảng 1 micromet), không gây bệnh, thường gặp trong ruột người. *E.coli* có 1 nhiễm sắc thể (phân tử ADN) dạng vòng nằm trong vùng nhân. Kích thước của các phân tử ADN này khoảng $4x10^6$ cặp bazơ. Các quá trình biểu hiện của gen như phiên mã, dịch mã được xảy ra đồng thời. Sau khi

mARN được tổng hợp sẽ được sử dụng ngay để dịch mã mà không qua các bước sửa đổi sau phiên mã vì gen của chúng không có các intron (đoạn không mã hoá). Do vậy, *E.coli* được coi là tế bào chủ đơn giản nhất. Rất nhiều thí nghiệm tách dòng gen ở các phòng thí nghiệm đang sử dụng *E.coli* làm tế bào chủ.

Ngoài *E.coli*, một số vi khuẩn khác cũng được dùng làm tế bào chủ cho các thí nghiệm tách dòng gen như: *Bacillus, Pseudomonas* và *Streptomyces*... tuy nhiên những tế bào chủ này có những hạn chế nhất định. Những tế bào chủ này cần đòi hỏi những vector thích hợp, nên việc đưa các ADN tái tổ hợp vào chúng gặp nhiều khó khăn.

2.4.2. Tế bào chủ nhân chuẩn

Một trong những nhược điểm cơ bản khi sử dụng *E.coli* làm tế bào chủ để tách dòng gen vì nó là sinh vật nhân sơ không có màng nhân bao bọc NST. Do vậy các gen ở sinh vật nhân chuẩn không thể biểu hiện được trong *E.coli* vì môi trường khác với môi trường bình thường của gen sinh vật nhân chuẩn. Như vậy, nếu chúng ta muốn sản xuất một loại protein nhân chuẩn trong một thí nghiệm tách dòng thì khó có thể tin rằng *E.coli* mang ADN tái tổ hợp có thể sản sinh ra protein có chức năng đầy đủ như protein nhân chuẩn mong muốn.

Các tế bào chủ nhân chuẩn có phổ tồn tại rất rộng từ các vi sinh vật nhân chuẩn bậc thấp như nấm men, nấm mốc, tảo cho đến các tế bào sinh vật đa bào phức tạp như động vật, thực vật.

a) Tế bào nấm men (Saccharomyces cerevisiae)

Nấm men *S. cereviseae* được sử dụng làm tế bào chủ một cách rộng rãi trong Công nghệ di truyền vì nhiều lý do:

– *S. cereviseae* là vi sinh vật nhân chuẩn đơn bào (kích thước khoảng 5 micromet) đã được nghiên cứu tỷ mỷ về đặc điểm di truyền, sinh lý. Nấm men *S. cereviseae* dễ nuôi cấy với quy mô lớn để thu sinh khối tế bào.

– Một số *S. cereviseae* có khởi điểm (promotor) mạnh và có plasmid dùng làm vector YAC biểu hiện gen.

– *S. cereviseae* có khả năng thực hiện các biến đổi sau dịch mã như đường hoá, phosphoril hoá... để protein có đầy đủ các hoạt tính sinh học.

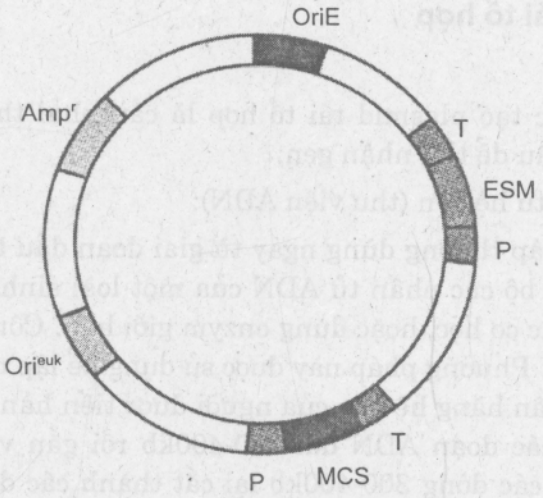
– *S. cereviseae* bình thường tổng hợp ít loại protein của bản thân nó, nếu đưa gen lạ tổng hợp protein mới thì sản phẩm dễ làm tinh sạch.

– *S. cereviseae* là loài nấm men được sử dụng rộng rãi trong lên men bánh mì, lên men rượu, bia. Do đó nó được công nhận là vi sinh vật an toàn, hầu như không tạo ra độc tố.

– Hệ gen (genome) của *S. cereviseae* có khoảng $1,35 \times 10^7$ cặp bazơ đã được giải trình tự vào năm 1996 và có kích thước nhiều hơn *E.coli* khoảng 3,5 lần.

Các vi nấm khác cũng được sử dụng làm tế bào chủ trong các thí nghiệm tạo dòng gen như nấm mốc *Aspergillus nidulans, Neurospora crassa, hoặc Pechia pastoris*. Vector biểu hiện gen ở tế bào *E. cerevisease* cũng như ở sinh vật nhân chuẩn khác chúng bao gồm khởi điểm (P- promoter), điểm kết thúc (T- terminator), khởi đầu sao

chép của *E.coli* (ori E); khởi đầu sao chép ở tế bào Eukaryota (ori^{euk}); các gen đánh dấu chọn lọc (ESM); các vị trí nhận biết của enzym giới hạn (MCS- multicloning site: điểm đa tách dòng) (Hình 2.8).



Hình 2.8. Sơ đồ vector biểu hiện ở tế bào Eukaryota

b) Các tế bào chủ thực vật

Một số loại tế bào thực vật được sử dụng làm tế bào chủ thực vật trong các thí nghiệm thao tác gen. Tảo đơn bào, ví dụ như loài *Chramydomonas rainhardii* có tất cả những đặc tính ưu việt của vi sinh vật cộng với cấu trúc và chức năng của tế bào thực vật. Do vậy tảo đơn bào được sử dụng ngày càng nhiều trong các thí nghiệm thao tác di truyền, trong Công nghệ di truyền. Tuy nhiên, người ta cũng còn dùng các tế bào thực vật nuôi cấy trong những môi trường thích hợp có thể dùng làm tế bào chủ.

c) Các tế bào chủ động vật

Các tế bào động vật nuôi rất phức tạp, nhưng trong những điều kiện cần thiết cho sự biểu hiện ra các protein có hoạt tính sinh học, người ta vẫn sử dụng tế bào chủ động vật. Các loại tế bào chủ động vật bao gồm:

– Tế bào thận của khỉ xanh Châu Phi (African green monkey kidney).

– Tế bào thận chuột đồng nhỏ (Baby hamster kidney).

– Tế bào thận phôi người (Human embryonic kidney).

– Tế bào tử cung chuột bạch (Chinese hamster ovary).

– Tế bào côn trùng để nuôi *Baculovirus* biểu hiện protein người.

– Tế bào tuyến trùng *Caenorhabditis elegans*.

2.5. TẠO, TÁCH VÀ CHỌN LỌC DÒNG ADN TÁI TỔ HỢP

Trong phần trước chúng ta đã biết có 2 yếu tố quan trọng trong công nghệ ADN tái tổ hợp là: khả năng sử dụng các enzym để cắt nối các phân tử ADN invitro và hệ thống các tế bào vật chủ để đưa ADN tái tổ hợp vào tế bào chủ nhằm nhân lên với một số lượng lớn bản sao trong tế bào chủ. Mỗi tế bào chủ khi phân bào tạo nên một dòng tế

bào chứa bản sao của một gen cần thiết, đó là tách dòng gen (gene cloning). Một thí nghiệm tách dòng phụ thuộc vào mục tiêu chủ đạo của thí nghiệm và nguồn nguyên liệu dùng để tách chiết axit nucleic cho việc tách dòng.

2.5.1. Tạo plasmid tái tổ hợp

a) Tạo nguồn gen

Bước đầu của việc tạo plasmid tái tổ hợp là cần phải thu được nguồn gen. Có 3 phương pháp khác nhau để thu nhận gen:

– Thu nhận ADN từ hệ gen (thư viện ADN):

Đây là phương pháp thường dùng ngay từ giai đoạn đầu tiên phát triển công nghệ ADN tái tổ hợp. Toàn bộ các phân tử ADN của một loài sinh vật được tách thành các đoạn nhỏ bằng cách lắc cơ học, hoặc dùng enzym giới hạn. Công đoạn sau đó là gắn các đoạn này vào plasmid. Phương pháp này được sử dụng để lập ngân hàng ADN của cả hệ gen. Ví dụ, việc lập ngân hàng hệ gen của người được tiến hành như sau: Đầu tiên tách hệ gen người thành các đoạn ADN dài 300-400kb rồi gắn vào các vector YAC, hoặc BAC để tạo dòng. Từ các dòng 300-400kb lại cắt thành các đoạn ADN dài từ 30-40kb rồi gắn vào các cosmid. Từ đoạn 30-40kb lại được cắt thành các đoạn ADN dài trung bình khoảng 4kb, sau đó gắn vào các plasmid.

– Tổng hợp gen bằng phương pháp hoá học:

Muốn tổng hợp hoá học đoạn ADN hay một gen cần phải biết trình tự các đoạn ADN hay gen đó. Sử dụng các máy tổng hợp ADN tự động (DNA synthesizer). Phương pháp tổng hợp gen bằng con đường hoá học, ví dụ đầu tiên là tổng hợp gen mã hoá cho hoocmon somatostatin có 14 axit amin được biểu hiện trong vi khuẩn *E.coli*. Các nòi *E.coli* mang gen này có thể sản sinh ra insulin, hoocmon tăng trưởng người (hGH). Một tế bào *E.coli* có thể sản sinh ra khoảng 3 triệu phân tử hoocmon sinh trưởng người có hoạt tính tương tự như hoocmon sinh trưởng tự nhiên.

– Lập ngân hàng ADN bổ trợ (cADN):

Đây là phương pháp tạo gen từ mARN (ARN thông tin) nhờ enzym phiên mã ngược (reverse transcriptase). Đầu tiên, từ mARN tổng hợp được cADN mạch đơn. Nhờ enzym phiên mã ngược nên bất cứ gen nào có mARN, hoặc một đoạn polyribonucleotit tổng hợp bằng con đường hoá học đều có thể tổng hợp được cADN. Từ các cADN mạch đơn có thể tạo thành cADN mạch kép nhờ có enzym ADN polymerase. Các cADN mạch kép được gắn vào plasmid để tạo ra plasmid tái tổ hợp.

Ngân hàng ADN bổ trợ có nhiều ưu thế vì các dòng cADN chứa đoạn trình tự nucleotit chỉ gồm các đoạn mã hoá của một gen. Mặt khác, có thể tạo ra những tế bào vi khuẩn chuyên hoá chỉ tạo ra một loại protein tương ứng với một mARN cụ thể, từ đó sản phẩm tạo ra dễ được tinh sạch và được sản phẩm như mong muốn.

b) Tạo plasmid tái tổ hợp

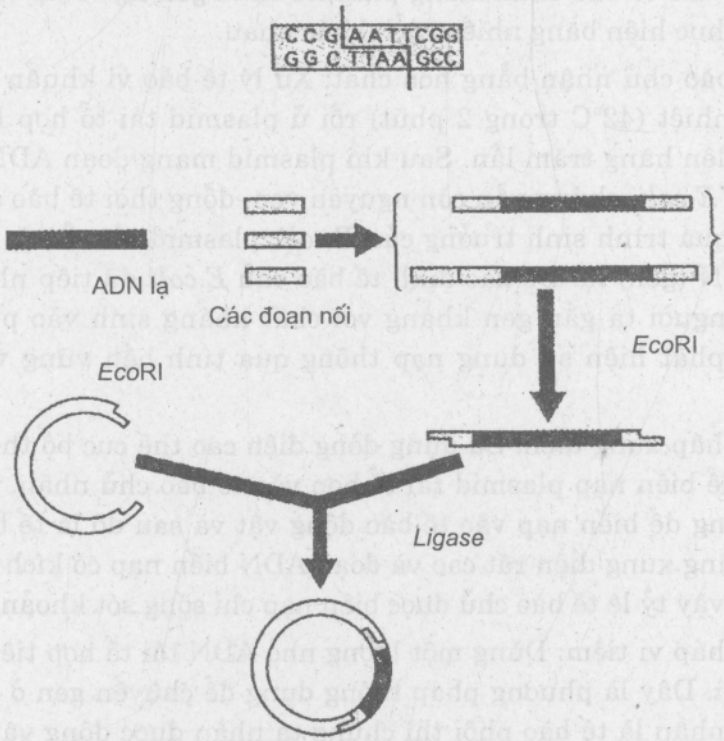
Khi có các đoạn ADN hay cADN mong muốn. Bước tiếp theo là gắn chúng vào vector chuyển gen để tạo ra plasmid tái tổ hợp. Có nhiều phương pháp gắn các đoạn ADN, hoặc cADN vào plasmid, hoặc các vector chuyển gen khác.

– Phương pháp dùng đầu dính:

Theo phương pháp này, đầu tiên cần xử lý ADN chứa đoạn gen mong muốn và vector chuyển gen (như plasmid) bằng các loại enzym giới hạn cắt tạo đầu dính (ví dụ, *E.co*RI). Trộn lẫn ADN và vector chuyển gen đã bị cắt bằng cùng một loại enzym giới hạn như đã nêu trên. Bước tiếp theo là dùng enzym nối ligase để gắn các đoạn cần nối với nhau. Phương pháp này được ứng dụng rộng rãi trong việc tạo plasmid tái tổ hợp.

– Phương pháp dùng đoạn nối (linkers):

Các đoạn ADN hay ARN ngắn khoảng 10-20 nucleotit được tổng hợp bằng con đường hoá học, gọi là đoạn oligonucleotit. Đoạn oligonucleotit tổng hợp này cần có đoạn trình tự nhận biết tương ứng với một loại enzym giới hạn (ví dụ *E.co*RI) dùng làm đoạn nối (linker). Các đoạn nối được gắn vào 2 đầu của đoạn ADN (gen) lạ tạo thành đoạn ADN có 2 đoạn trình tự tương ứng với điểm cắt của enzym giới hạn. Bước tiếp theo là xử lý các đoạn ADN lạ có gắn đoạn nối và xử lý vector chuyển gen bằng cùng một loại enzym giới hạn (*E.co*RI). Trộn chung vector và ADN đã xử lý bằng enzym giới hạn (*E.co*RI) và gắn chúng với nhau nhờ enzym nối ligase (H.2.9.)



Hình 2.9. Sơ đồ dùng đoạn nối tạo ADN tái tổ hợp

– Phương pháp dùng enzym terminal transferase:

Đây là phương pháp gắn đuôi oligo, một loại nucleotit, ví dụ CCCCC (đuôi dC) vào đầu 3'-OH của một mạch ADN (đuôi homopolymer), do đó tạo ra được mạch đơn thứ 2 của cADN có đuôi bổ sung là GGGGG. Khả năng tạo đuôi homopolymer là do enzym terminal transferase xúc tác. Ta có thể hình dung phương pháp này như sau:

– Từ một phân tử mARN tạo ra mạch cADN mạch đơn rồi tạo ra cADN mạch kép nhờ enzym phiên mã ngược và ADN polymerase.

+ Xử lý cADN mạch kép để tạo dòng cADN đầu bằng nhờ việc sử dụng enzym S1 nuclease.

+ Xử lý các dòng cADN đầu bằng, bằng enzym terminal transferase cùng với oligo (dC) để tạo đầu mút 3'CCCCC.

+ Xử lý plasmid có đoạn trình tự nhận biết của enzym giới hạn *REPst*I bằng enzym giới hạn *Pst*I, sau đó ủ với enzym terminal transferase cùng với oligo (dG) để tạo đuôi 3'GGGGG.

+ Trộn lẫn các dòng cADN và plasmid sau khi xử lý với nhau. Các đầu mút của hai loại đuôi bổ trợ sẽ bắt cặp bổ sung với nhau. Do vậy, đoạn ADN lạ (từ cADN) bắt cặp với plasmid. Nhờ có enzym ADN polymerase I và ligase chúng sẽ nối với nhau tạo ra plasmid tái tổ hợp.

2.5.2. Tách dòng ADN tái tổ hợp

Sau khi plasmid tái tổ hợp, hoặc vector tái tổ hợp được tạo thành, bước tiếp theo là biến nạp chúng vào tế bào chưa mang plasmid chứa gen lạ, ví dụ biến nạp vào *E.coli*. Biến nạp được thực hiện bằng nhiều cách khác nhau.

– Xử lý tế bào chủ nhận bằng hoá chất: Xử lý tế bào vi khuẩn *E.coli* bằng $CaCl_2$ lạnh, kèm sốc nhiệt (42°C trong 2 phút) rồi ủ plasmid tái tổ hợp làm cho khả năng dung nạp tăng lên hàng trăm lần. Sau khi plasmid mang đoạn ADN lạ biến nạp chui được vào tế bào *E.coli*, chúng vẫn còn nguyên vẹn, đồng thời tế bào chủ vẫn sống bình thường. Trong quá trình sinh trưởng của *E.coli*, plasmid tái tổ hợp được sao chép tạo thành dòng ADN (gen) lạ. Để xác định tế bào chủ *E.coli* đã tiếp nhận plasmid tái tổ hợp hay chưa, người ta gắn gen kháng với chất kháng sinh vào plasmid tái tổ hợp. Nhờ đó có thể phát hiện sự dung nạp thông qua tính bền vững với kháng sinh đã được đánh dấu.

– Phương pháp xung điện: Sử dụng dòng điện cao thế cục bộ theo xung bằng máy điện biến nạp để biến nạp plasmid tái tổ hợp vào tế bào chủ nhận. Lúc đầu máy biến nạp được sử dụng để biến nạp vào tế bào động vật và sau đó là tế bào thực vật. Hiệu quả biến nạp bằng xung điện rất cao và đoạn ADN biến nạp có kích thước lớn (khoảng 25-135kb). Tuy vậy tỷ lệ tế bào chủ được biến nạp chỉ sống sót khoảng 50-70%.

– Phương pháp vi tiêm: Dùng một lượng nhỏ ADN tái tổ hợp tiêm thẳng vào nhân tế bào chủ nhận. Đây là phương pháp thông dụng để chuyển gen ở tế bào động vật có vú. Nếu tế bào nhận là tế bào phôi thì chúng ta nhận được động vật chuyển gen. Vấn đề này sẽ nêu ở chương sau.

– Phương pháp dùng súng bắn ADN: Các hạt kim loại tungsten, hoặc vàng cực nhỏ (đường kính khoảng 4 micromet) mang đoạn ADN, hoặc ARN, được bắn nhanh với tốc độ cao, xuyên qua màng tế bào để đưa ADN, hoặc ARN vào nhân tế bào nhận. Thực hiện thao tác này bằng súng bắn ADN (còn gọi là súng bắn gen – gene gun). Phương pháp biến nạp bằng súng bắn ADN được dùng nhiều khi chuyển gen ở thực vật.

Ngoài ra còn một số phương pháp khác đưa ADN vào tế bào chủ sẽ được nêu cụ thể ở các chương sau.

2.5.3. Chọn lọc dòng ADN đặc hiệu và biểu hiện gen

Sau khi biến nạp ADN (gen) vào tế bào chủ nhận thì ở trong tế bào nhận, ADN biến nạp được nhân bản, từ đó chúng tạo ra được dòng ADN (gen). Bước tiếp theo chúng ta cần kiểm tra, chọn lọc đúng dòng gen mong muốn và sau đó tạo điều kiện cho gen biểu hiện.

a) Chọn lọc dòng ADN tái tổ hợp đặc hiệu

Trong nhiều trường hợp, do sử dụng các loại enzym giới hạn khác nhau nên tạo ra số lượng dòng ADN rất lớn, hoặc một loại enzym giới hạn có thể cắt ra những đoạn gen không mong muốn. Trong khi đó nhà nghiên cứu lại chỉ muốn tách một dòng ADN cụ thể đặc hiệu. Có 3 hướng chính để chọn lọc dòng ADN là lai axit nucleic dùng mẫu ARN dò đặc hiệu, phát hiện bằng kiểu hình, hoặc phát hiện bằng phản ứng miễn nhiễm tuỳ theo tính chất của dòng gen.

Ví dụ, chọn lọc dòng mang đoạn ADN của ADN ribosome bằng phương pháp lai axit nucleic được tiến hành như sau:

– Các dòng ADN tái tổ hợp được phân bố đều trên mặt thạch của đĩa petri chứa môi trường nuôi cấy.

– Đóng dấu các dòng này lên màng lọc nitro-cellulose, hoặc màng nilon filter. Các tế bào sẽ vỡ ra và ADN thoát ra ngoài.

– Biến tính các dòng ADN bằng nhiệt độ cao.

– Nhúng màng lọc vào mẫu dò ARN đã đánh dấu phóng xạ.

– Các dòng chứa rADN tương ứng với mẫu dò ARN sẽ lai với nhau và tạo thành đoạn mạch kép.

– Loại bỏ các phần không lai.

– Đặt miếng phim phát quang phóng xạ lên màng lai. Những phần xuất hiện trên ảnh phóng xạ tự ghi biểu hiện tương ứng với các ADN bổ trợ với mẫu dò ARN. Từ đó tách được dòng ADN mong muốn.

b) Biểu hiện của gen mong muốn

Muốn gen đã tạo dòng biểu hiện ra các protein cần phải có vector biểu hiện mang đầy đủ yếu tố phiên mã và dịch mã. Đối với các dòng gen ở động vật có vú tạo ra sản phẩm là các protein có hoạt tính sinh học, chúng ta cần với số lượng lớn và có giá trị thương mại. Sự biểu hiện của các gen này trong tế bào *E.coli* cần lưu ý một số nhân tố sau:

– Số lượng bản sao của plasmid tái tổ hợp trong tế bào *E.coli* cần hợp lý.

– Phải có khởi điểm (promotor) phiên mã mạnh.

– Có trình tự thuận lợi cho ribosome bám khi khởi đầu dịch mã.

– ADN tái tổ hợp có sự ổn định lâu dài trong *E.coli*.

– Không có sự phân giải protein của các enzym trong tế bào chủ.

Chương 3

CÁC KỸ THUẬT CHỦ YẾU TRONG PHÂN TÍCH AXIT NUCLEIC

Trong Công nghệ di truyền cần phải phân tích axit nucleic, cụ thể là các đoạn ADN, gen và ARN. Người ta sử dụng các phương pháp, kỹ thuật khác nhau để phân tích axit nucleic gồm các phương pháp tách chiết ADN, ARN, các phương pháp phân tích tính đa hình di truyền của axit nucleic. Sau đây là một số kỹ thuật, phương pháp chủ yếu để phân tích các axit nucleic.

3.1. CÁC PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT ADN VÀ ARN

3.1.1. Phương pháp tách chiết ADN ở thực vật

3.1.1.1. Nguyên tắc

Tế bào thực vật ngoài màng tế bào còn có lớp thành cellulose vững chắc ở bên ngoài. Do đó việc tách chiết ADN từ tế bào thực vật gặp phải những khó khăn, phức tạp nhất định. Cho đến nay, có nhiều phương pháp tách chiết, tinh sạch ADN khác nhau từ nhiều đối tượng thực vật. Tuy nhiên, việc tách chiết ADN thực vật có nguyên tắc chung đó là:

– Nghiền các mô, tế bào bằng biện pháp cơ học: Nghiền mô trong đá khô, nitơ lỏng bằng cối, chày sứ để phá vỡ thành cellulose, giải phóng các thành phần bên trong tế bào.

– Sử dụng đệm có chất tẩy (CTAB) để phá vỡ màng bào, giải phóng ADN.

– Sử dụng các hoá chất (phổ biến là EDTA) để bảo vệ ADN khỏi sự phân huỷ bởi các enzym nuclease nội bào.

– Sử dụng các hoá chất như chloroform, isoamyl alcohol, phenol... để loại protein và các tạp chất ra khỏi ADN.

– Thu hồi ADN bằng cách kết tủa ADN trong cồn, hoặc isopropanol, sau đó ly tâm thu lấy kết tủa ADN.

– Hoà tan ADN bằng nước cất, hoặc dung dịch đệm.

3.1.1.2. Các bước tiến hành

Tuỳ theo đối tượng và mục đích khác nhau khi tách ADN có thể tiến hành các bước khác nhau. Sau đây là một số bước tiến hành tách chiết ADN tổng số từ lá và tách chiết ADN từ hạt.

a) Tách chiết ADN từ lá theo phương pháp CTAB

– Thành phần đệm chiết:

CTAB 2% (W/V).

Mercaptoethanol 0,2% (V/V).

EDTA 0,5M, pH=8.

TrisHCl 1M, pH=7,5.

NaCl 5M.

– Các bước tiến hành:

Bước 1: Ủ sẵn 5ml đệm chiết ở 60°C trong bình ổn nhiệt (30 phút).

Bước 2: Nghiền 0,7-1g mô lá thực vật trong nitơ lỏng bằng cối chày sứ cho đến khi thành bột mịn.

Bước 3: Hoà tan mẫu đang nghiền trong đệm chiết, tiếp tục nghiền thêm một chút để mẫu nghiền tạo thành dạng đồng nhất.

Bước 4: Ủ mẫu ở 65°C trong 30 phút, lắc đều 3-5 lần trong quá trình ủ.

Bước 5: Thêm một thể tích dung dịch bao gồm chloroform và isoamyl alcohol có tỷ lệ 24:1. Lắc đều.

Bước 6: Ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút.

Bước 7: Chuyển phần dịch phía trên sang ống sạch, sau đó cho thêm thể tích dung dịch chloroform: isoamyl alcohol 24:1. Lắc đều.

Bước 8: Ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút.

Bước 9: Chuyển phần dịch phía trên sang ống sạch. Thêm vào đó 1 thể tích cồn tuyệt đối (EtOH 100%) có bổ sung thể tích CH_3COONa (NaOAc) 3M (pH=5,2), hoặc bằng isopropanol tương ứng với 2/3 thể tích mẫu. Để mẫu ở -20°C trong 20 phút.

Bước 10: Ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Thu kết tủa.

Bước 11: Rửa kết tủa bằng EtOH 80%. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C.

Bước 12: Để kết tủa khô trong điều kiện nhiệt độ phòng. Hoà tan kết tủa trong dung dịch 200µl nước, hoặc dung dịch TE 0,1X (dung dịch Tris-HCl: EDTA= 10:1). Giữ ở nhiệt độ -20°C để dùng dần.

– Có thể dùng các enzym ARNase để loại bỏ các ARN, sẽ được ADN tinh khiết.

b) Tách chiết ADN từ hạt

– Thành phần đệm chiết:

NaCl 350mM.

Tris 500mM, pH=7,5.

SDS 0,5%.

Dung dịch Kalium acetate (KOAc).

– Các bước tiến hành:

Bước 1: Nghiền hạt cho mịn, cho vào ống ly tâm 1,5ml.

Bước 2: Thêm 250µl đệm chiết. Lắc đều bằng vortex. Để yên 15 phút ở nhiệt độ phòng.

Bước 3: Ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút. Hút chuyển dịch nổi ở pha trên sang ống mới.

Bước 4: Bổ sung 10X thể tích Kalium acetate. Ủ trong đá lạnh 20 phút.

Bước 5: Ly tâm 9000 vòng/phút trong 10 phút. Hút chuyển dịch nổi ở phía trên sang ống mới.

Bước 6: Kết tủa ADN bằng isopropanol với thể tích 1:1. Để yên trong đá lạnh 2 phút.

Bước 7: Ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút. Hút bỏ dịch nổi phía trên rồi làm khô kết tủa.

Bước 8: Hoà tan kết tủa bằng 75µl trong đệm TE (Tris-HCl: EDTA= 10:1). Bảo quản ở 4°C để dùng dần.

- Có thể dùng các enzym ARNase loại bỏ các ARN để được ADN tinh khiết.

3.1.2. Tách chiết ADN ở động vật

3.1.2.1. Nguyên tắc

Có thể tách chiết ADN từ các nguyên liệu khác nhau như máu, nước bọt, mô cơ, lông, tóc (còn nguyên chân tóc, chân lông) và các loại mô khác. Có nhiều phương pháp tách chiết khác nhau. Tuy vậy tách chiết ADN có chung một nguyên tắc đó là:

– Tách tế bào có nhân ra khỏi vật mang.

– Phá vỡ tế bào, màng và phân huỷ protein để giải phóng ADN.

– Xử lý bằng nhiệt để phá huỷ hoàn toàn protein, giải phóng ADN ra khỏi nhân.

– Tách ADN ra khỏi đệm tách và bảo quản ADN ở 4-20°C.

3.1.2.2. Các bước tiến hành

Tuỳ theo các nguyên liệu khác nhau mà có thể áp dụng một số bước tiến hành khác nhau.

a) Tách chiết ADN từ mô động vật

Bước 1: Cắt mô thành từng miếng nhỏ. Nghiền mô trong nitơ lỏng để thành bột mịn. Cho mẫu vào ống nghiệm chờ nitơ bay hết.

Bước 2: Cho khoảng 100mg mẫu vào trong ống eppendorf loại 1,5ml.

Bước 3: Thêm 500µl đệm STE (0,1M Sodium chlorid; 0,05M Tris-HCl; pH 7,5; 0,001M EDTA). Hoà trộn nhẹ nhàng. Bổ sung 12µl protease K (nồng độ 10mg/ml) và 37µl SDS 10%.

Bước 4: Trộn đều hỗn hợp, ủ ở 55°C trong 2 giờ, thỉnh thoảng lắc nhẹ.

Bước 5: Thêm một lượng dung dịch PCI (phenol:chloroform:isoamyl alcohol có tỷ lệ 25:24:1) bằng thể tích mẫu, trộn nhẹ, để ở nhiệt độ phòng 5 phút.

Bước 6: Ly tâm 9000 vòng/phút trong 5 phút.

Bước 7: Chuyển phần dịch nổi phía trên sang ống eppendorf sạch. Lặp lại các bước 5-7 một lần nữa.

Bước 8: Thêm một lượng dung dịch CI (chloroform:isoamyl alcohol=24:1) bằng thể tích mẫu, trộn nhẹ, để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.

Bước 9: Ly tâm 9000 vòng/ phút trong 5 phút.

Bước 10: Chuyển phần dịch nổi phía trên sang ống eppendorf sạch.

Bước 11: Thêm một lượng Sodium acetate 3M (NaOAc) bằng 1/10 lượng mẫu và một lượng cồn ethylic (EtOH) 95% bằng 2,5 lần lượng mẫu.

Bước 12: Để kết tủa ADN ở -20°C ít nhất trong 2 giờ, hoặc qua đêm.

Bước 13: Ly tâm 9000 vòng/phút trong 10 phút. Rửa sạch tủa bằng cồn EtOH 70%. Hút sạch EtOH.

Bước 14: Hoà tan kết tủa ADN bằng 500µl dung dịch TE 1X (dung dịch TE 1X gồm có: 0,01M Tris-HCl; 0,01M EDTA, pH=7,5) để bảo quản ở 4°C.

– Có thể sử dụng enzym ARNase để loại bỏ ARN trước khi bỏ proteinase K.

b) Tách chiết ADN từ máu bằng chelex

Bước 1: Lấy 100µl máu tươi, hoặc một miếng giấy thấm, hoặc vải đã thấm máu, kích thước 0,5 x 0,5cm cho vào ống eppendorf.

Bước 2: Thêm 1ml đệm chiết PBS (137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na_2HPO_4; 2mM KH_2PO_4), lắc đều, sau đó để yên ở nhiệt độ phòng 30 phút.

Bước 3: Ly tâm 14.000 vòng/phút trong 5 phút. Thu kết tủa. (Lặp lại bước 2-3 khoảng 3 lần).

Bước 4: Thêm 150µl Chelex 10%. Lắc đều bằng vortex.

Bước 5: Đun sôi ở 100°C trong 10 phút. Ly tâm 10.000 vòng/phút. Thu phần ADN hòa tan ở dịch phía trên. Loại bỏ kết tủa.

Bước 6: Tách ADN khỏi Chelex, bảo quản ở nhiệt độ 4°C đến -20°C.

c) Tách chiết ADN từ máu bằng muối

Bước 1: Lấy khoảng 0,1ml máu tĩnh mạch cho vào ống eppendorf có chứa 25µl EDTA 0,4M; lắc đều.

Bước 2: Thêm vào eppendorf 1,2ml đệm phá hồng cầu (1mM NH_4HCO_3, 115mM NH_4Cl).

Bước 3: Ly tâm 500 vòng/phút. Thu kết tủa, loại bỏ phần dịch nổi phía trên.

Bước 4: Thêm vào ống 200µl đệm phá bạch cầu (100mM Tris-HCl pH 7,6; 40mM EDTA; 50mM NaCl; 0,2% SDS; 0,05% Sodium azide). Lắc đều.

Bước 5: Thêm 20µl protein K (10mg/ml). Ủ ở 50°C trong 2 giờ.

Bước 6: Thêm 80µl NaCl bão hoà 6M. Lắc mạnh bằng vortex.

Bước 7: Ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút, thu phần dịch nổi phía trên cho vào ống eppendorf.

Bước 8: Kết tủa ADN bằng cồn EtOH tuyệt đối.

Bước 9: Hoà tan kết tủa bằng dung dịch TE 1X. Bảo quản ở nhiệt độ 4°C đến -20°C.

d) Tách chiết ADN từ máu bằng phenol/chloroform

Bước 1: Bổ sung 50µl Saponin 10% vào 1ml máu để phá hồng cầu. Để yên ở nhiệt độ 37°C trong 4 giờ.

Bước 2: Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Loại bỏ phần dịch phía trên, thu lấy kết tủa.

Bước 3: Hoà tan kết tủa bằng 1ml nước khử ion. Lắc mạnh bằng vortex. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Thu lấy kết tủa.

Bước 4: Hoà tan kết tủa trở lại bằng 1ml nước và SDS (Sodium dodecyl sulphate) 10% tới khi nồng độ SDS trong hỗn hợp đạt 50µl/ml.

Bước 5: Ủ hỗn hợp trên ở 37°C trong 1 giờ.

Bước 6: Thêm lượng dung dịch PCI (phenol: chloroform: isoamyl alcohol= 25:24:1). Lắc mạnh bằng vortex. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút. Thu dịch phía trên. Loại bỏ kết tủa. Có thể lặp lại bước 6 từ 2 đến 3 lần.

Bước 7: Thêm vào một lượng dung dịch CI (chloroform : isoamyl alcohol=24:1) bằng thể tích ban đầu. Lắc mạnh bằng vortex.

Bước 8: Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Thu phần dịch nổi phía trên, loại bỏ kết tủa.

Bước 9: Thêm hỗn hợp Sodium acetate 3M với cồn EtOH 99% (tỷ lệ 1:1) theo tỷ lệ 10 hỗn hợp : 3 dịch mẫu. Để yên ở 20°C trong 4 giờ, hoặc qua đêm.

Bước 10: Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 20 phút. Thu lấy kết tủa, loại bỏ phần dịch nổi phía trên.

Bước 11: Thêm 200µl EtOH 70% lạnh để rửa kết tủa.

Bước 12: Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 30 phút. Thu kết tủa, loại bỏ EtOH phía trên.

Bước 13: Hoà tan kết tủa trong nước khử ion, hoặc dung dịch TE với nồng độ 50ng/µl. Bảo quản mẫu ADN ở 4°C đến -20°C.

3.1.3. Tách chiết ADN từ các vi khuẩn

Về nguyên tắc chung, việc tách chiết ADN từ các mẫu vi khuẩn cũng tương tự như tách chiết ADN từ thực vật và động vật. Điều khác cơ bản là phải tiến hành nuôi vi khuẩn để thu sinh khối tế bào. Thông thường trong 1 lít dịch nuôi cấy ta thu được khoảng 100ml kết tủa tế bào vi khuẩn. Sử dụng các chất, hoặc phương pháp phá màng tế bào, ví dụ như nghiền kết tủa vi khuẩn với SDS, hoặc với EDTA. Cũng có thể ủ kết tủa vi khuẩn với enzym lizozym ở nhiệt độ thích hợp.

Sau khi phá vỡ màng tế bào thì tiến hành loại bỏ protein bằng chloroform, isoamyl alcohol, phenol. Tiếp theo, kết tủa ADN bằng EtOH, hoặc isopropanol như các phương pháp tách chiết ADN ở động vật, thực vật đã được nêu ở trên.

3.1.4. Tách chiết ARN

Tách chiết ARN tổng số từ động vật, thực vật và vi khuẩn cũng theo các bước thực hiện cơ bản như tách chiết ADN. Tuy nhiên cũng cần có một số bước khác như phân huỷ ADN, kết tủa ARN và loại bỏ enzym ARNase, tuỳ theo đặc điểm cấu tạo khác nhau của mẫu vật.

Dịch chiết sau khi làm sạch protein (bằng phenol, chloroform, isoamyl alcohol) được ủ với enzym ADNase để phân huỷ ADN. Bước tiếp theo là gây kết tủa ARN bằng cồn ethylic, hoặc isopropanol để tách ARN tổng số. Trường hợp muốn tách riêng mARN

cần sử dụng sắc ký ái lực trên cột oligo T-cellulose. Dựa vào cấu trúc phân tử của mARN có đuôi poly A, người ta đã tạo ra bộ KIT (bộ mẫu thử) chuyên dụng bao gồm phần chứa các viên bi nhiễm từ có mang oligo T trên bề mặt bi. Sau khi tách chiết các loại ARN (rARN, tARN, mARN) cho hỗn hợp ARN này chảy qua phễu có chứa oligo T-cellulose, các mARN được giữ lại còn các loại ARN khác sẽ ra khỏi phễu. Bước tiếp theo là dùng đệm Tris-EDTA cho chảy qua phễu. Các mARN được giải phóng nhờ liên kết A-T bị phá huỷ.

3.1.5. Định lượng và xác định độ tinh sạch của axit nucleic

Để xác định mức độ tinh sạch và hàm lượng hỗn hợp ADN, ARN thu được sau khi tách chiết, người ta dùng phương pháp đo quang phổ và phương pháp điện di.

3.1.5.1. Phương pháp đo quang phổ

Phương pháp đo quang phổ dựa trên khả năng hấp thụ ánh sáng khác nhau của các bazơ nitơ của phân tử ADN mạch kép và mạch đơn. Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260nm (Optical Density – OD_{260nm}) cho phép xác định nồng độ ADN trong dung dịch. Một đơn vị OD ở bước sóng 260nm ký hiệu là A_{260nm}.

$A_{260nm} = 1 = 50\mu g/ml$ ADN mạch kép.

$A_{260nm} = 1 = 33\mu g/ml$ ADN mạch đơn.

$A_{260nm} = 1 = 40\mu g/ml$ ARN.

Khi tính nồng độ ADN, cần lưu ý đến hệ số pha loãng của dịch chiết. Công thức tính chung nồng độ ADN là:

$C_{ADN} = A_{260nm} \times 50 \times$ độ pha loãng

Ví dụ, dịch chiết ADN mạch kép khi pha loãng gấp 2 có giá trị $A_{260nm} = 0,6$ thì dung dịch có nồng độ là:

$C_{ADN} = 0,6 \times 50 \times 2 = 60\mu g/ml$

Khi tách chiết ADN có thể còn lẫn tạp với protein. Để đánh giá độ tinh sạch của dung dịch ADN người ta còn đo dung dịch ở bước sóng 280nm là phổ hấp thụ cực đại của protein.

Nếu tỷ lệ $A_{260nm}/A_{280nm} = 1,8 – 2$ thì có thể xem dịch chiết ADN đã là tinh sạch.

Nếu tỷ lệ $A_{260nm}/A_{280nm} \geq 2$ thì dung dịch chiết ARN được coi là tinh sạch.

3.1.5.2. Phương pháp điện di

Để đánh giá mức độ tinh sạch, nguyên vẹn của phân tử ADN sau khi tách chiết, người ta còn dùng phương pháp điện di ADN. ADN là đại phân tử mang điện tích âm nên trong điện trường chúng sẽ chạy về cực dương. Nếu phổ điện di của dung dịch ADN đã tách chiết sau khi hiện hình cho một dải băng rộng, hoặc cho nhiều vạch thì chứng tỏ ADN đã bị gãy đoạn nhiều, hoặc lẫn ADN với ARN. Phổ điện di là băng gọn, rõ, chứng tỏ ADN không bị đứt gãy và không lẫn tạp.

Để điện di, người ta dùng gel agarose, hoặc gel polyacrylamid. Để hiện hình các băng ADN trên bản gel điện di có thể dùng Ethidium bromid. Thuốc thử này tạo liên

kết nhuộm với các bazơ nitơ. Khi chiếu tia tử ngoại (tia UV) vào bản gel liên kết nhuộm sẽ phát quang màu da cam ở bước sóng ≈ 300nm. Cũng có thể nhận biết băng điện di bằng phương pháp nhuộm bạc. Bản gel sau khi điện di được cố định bằng axit acetic 10%, sau đó rửa sạch axit acetic. Bước tiếp theo là nhuộm bằng dung dịch $AgNO_3$ và hiện hình các băng ADN bằng formaldehyt ở pH kiềm, hoặc bằng dung dịch Na_2CO_3.

3.2. MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH ADN

ADN của sinh vật mang tính đa hình. Đa hình ADN là sự sai khác trong genome của các cá thể cùng một loài, giữa các loài khác nhau, hoặc xem xét ở cấp độ trên loài. Có nhiều phương pháp khác nhau để phân tích sự đa hình của ADN như: RAPD-PCR, AFLP, RFLP, SSR, STS lai axit nucleic, giải trình tự ADN...

– Có thể phân biệt sự đa hình thành hai loại chính là:

Loại 1: Là sự khác nhau về số lượng, trình tự sắp xếp của các nucleotit trong phân tử ADN ở các cá thể.

Loại 2: Là sự khác biệt về số lượng các vệ tinh (microsatellite)- đó là các đoạn 2-5 nucleotit được lặp lại khác nhau ở từng cá thể, từng giống vật nuôi, cây trồng...

Chính sự đa hình của ADN giúp chúng ta thu được các đoạn ADN có độ dài khác nhau khi tiến hành nhân bản đoạn ADN bằng kỹ thuật chuỗi trùng hợp (PCR), hoặc dùng các enzym giới hạn cắt phân tử ADN thành nhiều đoạn rồi đem nhân bản bằng kỹ thuật PCR. Các băng ADN khác nhau có thể quan sát bằng mắt sau khi nhuộm, hoặc dùng để phân tích trình tự các nucleotit. Các phần mềm toán học giúp chúng ta xử lý và đánh giá đúng đắn sự khác nhau của các sinh vật.

– Các phương pháp phân tích ADN có thể chia thành các nhóm khác nhau như:

+ Kỹ thuật PCR và nhóm phương pháp phụ thuộc PCR.

+ Lai phân tử (lai axit nucleic).

+ Giải trình tự ADN.

Dưới đây là một số phương pháp phân tích ADN thường dùng.

3.2.1. Kỹ thuật PCR - nền tảng của phân tích đa hình ADN

3.2.1.1. Khái niệm chung

Kỹ thuật PCR (phản ứng chuỗi trùng hợp – Polymerase Chain Reaction) là kỹ thuật tổng hợp nhân tạo các đoạn ADN với tốc độ nhanh, chính xác cao được thực hiện trong máy chu trình nhiệt (máy PCR).

Kỹ thuật PCR được Karry Mullis phát minh năm 1985 và được tiếp thu hoàn thiện thông qua việc phát hiện và sản xuất được enzym ADN polymerase chịu nhiệt từ vi khuẩn *Thermophilus aquaticus* và một số vi khuẩn khác. Máy PCR ngày càng hoàn thiện cho phép thay đổi nhanh chóng, chính xác nhiệt độ cho từng giai đoạn phản ứng nhân bản ADN. Cho đến nay, kỹ thuật PCR được coi là phương pháp nền quan trọng của Công nghệ di truyền.

3.2.1.2. Nguyên lý

Kỹ thuật tổng hợp ADN ngoài cơ thể cũng tuân thủ những nguyên tắc cơ bản của sao chép ADN trong cơ thể như: Đoạn ADN cần nhân mở xoắn thành 2 mạch đơn, cần có các cặp mồi (mồi xuôi, mồi ngược), cần nguyên liệu và điều kiện môi trường thích hợp và enzym ADN polymerase. Tuy nhiên kỹ thuật PCR có khác là dùng nhiệt độ cao (94°C) tháo xoắn thay cho helicase kết hợp với enzym ADN polymerase chịu nhiệt và hệ thống điều nhiệt thích hợp cho từng giai đoạn phản ứng tổng hợp cùng với các đoạn mồi được thiết kế chủ động. Nhờ kỹ thuật PCR mà với một lượng nhỏ ADN ban đầu chúng ta có thể thu được đủ lượng ADN cần thiết để tiến hành các thí nghiệm về ADN.

3.2.1.3. Các thành phần tham gia phản ứng

Muốn tiến hành phản ứng PCR, cần có các thành phần sau:

– ADN khuôn (DNA template): Có thể là ADN kép, đơn, hoặc ARN được tách chiết từ các đối tượng nghiên cứu. ADN khuôn phải có độ nguyên vẹn cao tránh lẫn tạp (hệ số A_{260nm}/A_{280nm} = 1,8 - 2) và có lượng ban đầu từ 1 đến hàng chục ng.

– Mồi (primer): Lựa chọn cặp mồi rất quan trọng cho một phản ứng PCR. Đoạn mồi là các oligonucleotit có độ dài 6-30 nucleotit, có trình tự bắt cặp bổ sung với trình tự 2 đầu mạch khuôn. Trình tự mồi xuôi và mồi ngược bảo đảm không tự bổ sung cho nhau, không có cấu trúc kẹp tóc, giàu G và C (chiếm trên 60%). Mồi phải bảo đảm đủ dài để bắt cặp chính xác. Nhiệt độ gắn mồi (T_m) không khác nhau quá lớn. Nhiệt độ gắn mồi được tính theo công thức:

+ Đối với mồi ≤ 20 nucleotit thì nhiệt độ gắn mồi tính như sau:

$T_m = [2(A + T) + 4(G + C)]°C$

Ví dụ, đoạn mồi CAGCAAATATCTGTCCTTAC thì nhiệt độ gắn mồi

$T_m = [2(A + T) + 4(G+C)]°C = [2 \times 12 + 4 \times 8] = 56°C$.

+ Đối với mồi > 20 nucleotit thì nhiệt độ gắn mồi được tính theo công thức:

$T_m = 22 + 1,46[2(G + C) + (A + T)]°C$.

Nồng độ mồi thường khoảng 100-500nM.

Thời gian gắn mồi khoảng 30-60 giây.

– ADN polymerase: Là enzym xúc tác cho quá trình lắp ráp các nucleotit A, T, G, C vào mạch ADN mới đang tổng hợp. Ngày nay người ta dùng nhiều loại ADN polymerase: *Taq* ADN polymerase, P_{fu} ADN polymerase, T_4 ADN polymerase, T_{th} ADN polymerase... nhưng phổ biến là *Taq* ADN polymerase. *Taq* ADN polymerase được tách chiết từ chủng vi khuẩn suối nước nóng *Thermophilus aquaticus*, không bị mất hoạt tính ở nhiệt độ biến tính ADN (92° - 94°C). *Taq* ADN polymerase có hoạt tính ở dải nhiệt độ cao, làm cho phản ứng PCR xảy ra nhanh, chính xác và đặc hiệu.

– Các deoxyribonucleotit triphosphat (dNTP) gồm 4 loại dATP, dTTP, dGTP, dCTP là nguyên liệu tham gia tạo nên mạch ADN mới. Nồng độ tối ưu của dNTP thường dùng là 100-200μM. Tuy nhiên, ở nồng độ dNTP thấp (10-100μM) thì *Taq* ADN polymerase hoạt động chính xác hơn.

– Dung dịch đệm (buffer): Thành phần dung dịch đệm của phản ứng PCR thường

phụ thuộc vào loại enzym ADN polymerase sử dụng trong PCR. Ví dụ, thành phần dung dịch đệm 10X cho phản ứng PCR khi sử dụng *Taq* ADN polymerase bao gồm:

Tris-HCl 100 μM với pH = 8 ở 25°C.

KCl 500μM.

Gelatin 0,01%.

$MgCl_2$ 2mM.

Nồng độ $MgCl_2$ có thể giao động từ 0,5 đến 5mM. Chính ion Mg^{2+} có tác dụng gắn liên kết dNTP với ADN polymerase tăng khả năng bám nối của mồi.

3.2.1.4. Các chu kỳ của phản ứng PCR

a) Phản ứng PCR gồm nhiều chu kỳ lặp lại, mỗi chu kỳ gồm 3 bước chính:

Bước 1: Biến tính (denaturing)

Xử lý nhiệt độ để tách ADN mạch kép thành mạch đơn dùng làm khuôn để tổng hợp mạch mới. Nhiệt độ thường là 94-95°C, trong thời gian 2-5 phút.

Bước 2: Gắn mồi (Annealing)

Hạ nhiệt độ xuống 30-65°C trong khoảng 20 giây đến 2 phút. Các đoạn mồi sẽ bắt cặp với mạch khuôn theo nguyên tắc bổ sung. Đây là giai đoạn quan trọng. Nhiệt độ gắn mồi phải bảo đảm đúng để khả năng gắn tốt nhất, tránh hiện tượng gắn không đặc hiệu.

Bước 3: Kéo dài (tổng hợp - extending)

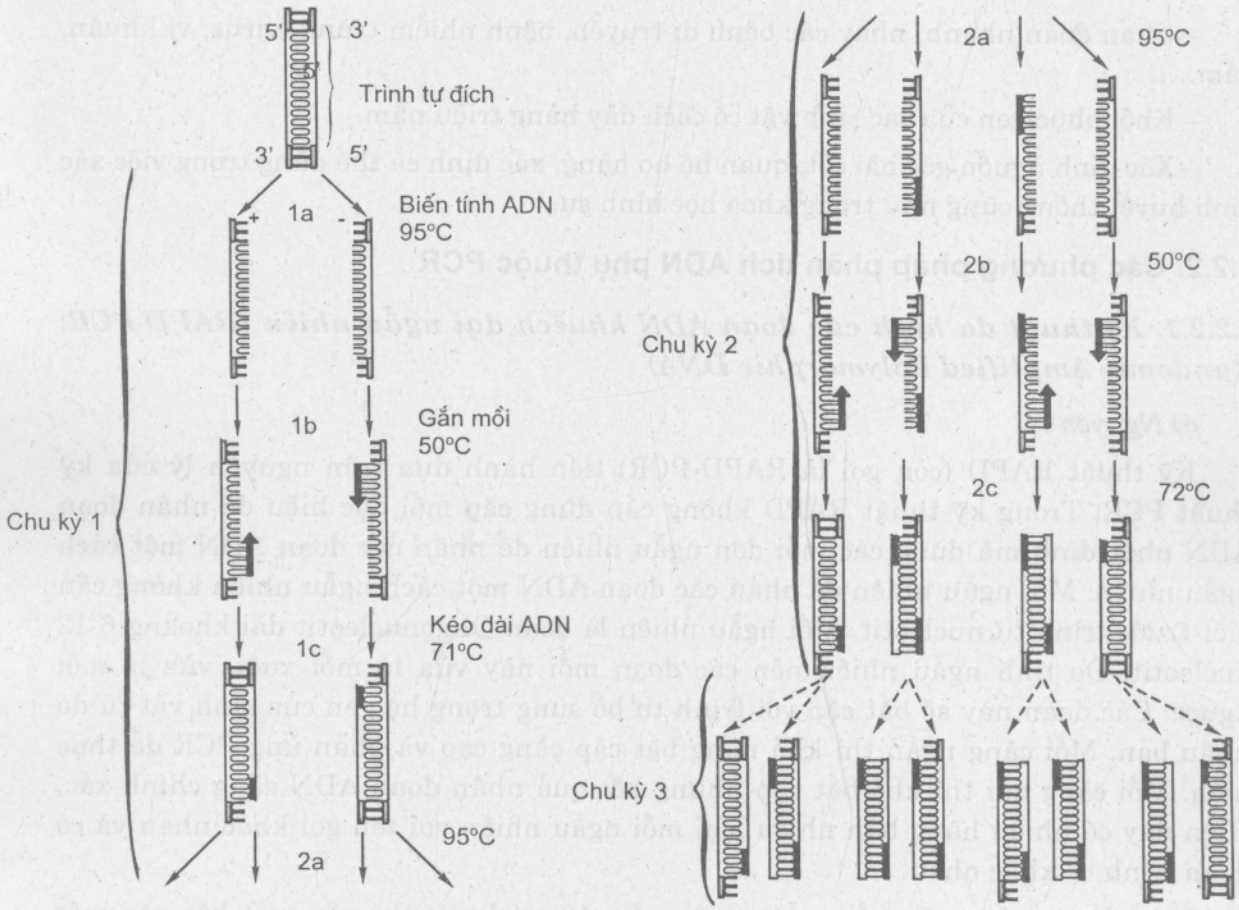
Các dNTP được lắp ráp để tạo thành mạch đơn ADN mới bổ sung với mạch ADN khuôn bắt đầu từ mồi. Nhiệt độ bước này là 68-72°C. Thời gian kéo dài tuỳ thuộc vào chiều dài của đoạn cần nhân lên, thời gian khoảng 20 giây đối với đoạn ADN khuôn nhỏ hơn 500 nucleotit, 40 giây đối với đoạn ADN khuôn nhỏ hơn 1200 nucleotit. Thường thì thời gian kéo dài 2-5 phút.

Mỗi chu kỳ gồm 3 bước như trên, lặp lại từ 25 lần đến 50 lần.tuỳ thuộc mục đích yêu cầu nghiên cứu. Tuy nhiên cần lưu ý rằng, nếu kéo dài thời gian quá 30 chu kỳ thì khả năng sai sót sẽ tăng theo. Số lượng bản sao sau n chu kỳ sẽ là $a \times 2^n$ (trong đó a là số đoạn khuôn). Cũng cần lưu ý rằng, sau chu kỳ thứ nhất, nhiệt độ tăng lên 94-95°C thì ở chu kỳ thứ hai chỉ cần 20 giây thay vì 2-5 phút như trong chu kỳ thứ nhất (H.3.1).

Gần đây người ta đã cải tiến kỹ thuật PCR thành PCR định lượng (Realtime PCR, RT-PCR) cho phép hiển thị và theo dõi trực tiếp quá trình nhân bản ADN diễn ra theo từng chu kỳ nhiệt bằng việc sử dụng kỹ thuật phát huỳnh quang. Dựa vào cường độ phát huỳnh quang mà có thể định lượng các đoạn ADN hình thành.

b) Thông thường sau khi thực hiện phản ứng PCR, cần tiến hành điện di trên gel agarose để xác định chất lượng của ADN. Các bước tiến hành như sau:

– Chuẩn bị gel để điện di: Lấy 0,8 gam bột agarose hoà tan trong 100ml đệm TAE 1 lần (Tris-Bazơ 48,8g/l; axit acetic 10,2ml/l; EDTA 0,5M 20ml/l có pH= 8,0). Đun sôi đến 50°C thì đổ dung dịch vào khuôn gel đã cài răng lược để tạo thành giếng nhỏ. Độ dày của bản gel tuỳ thuộc vào mục đích sử dụng. Để gel đông và ổn định trong 30-40 phút ở nhiệt độ phòng. Rút lược ra khỏi khuôn. Đặt khay gel vào bể điện di sau đó đổ TAE 1 lần tới khi ngập mặt gel khoảng 2mm.



Hình 3.1. Sơ đồ quá trình nhân bản đoạn ADN bằng PCR

– Tra mẫu: Mẫu được trộn theo tỷ lệ 2µl ADN + 1µl đệm tra mẫu 10X + 7µl nước cất để được tổng thể tích 10µl. Thêm vài giọt Bromophenol Blue làm chỉ thị màu để quan sát sự chuyển động của mẫu trong quá trình chạy điện di.

– Chạy điện di: Đặt khay gel vào máy điện di. Chạy điện di với điện thế 60-80V (10V/cm). Quan sát khi vạch màu đến cuối bản gel thì dừng lại.

– Nhuộm gel: Gel sau khi chạy điện di được nhuộm bằng Ethidium Bromid (5µg/ml) trong 15 phút. Lắc nhẹ. Rửa gel bằng nước cất, sau đó soi gel để xem băng ADN dưới ánh sáng đèn tử ngoại. Nếu băng gọn rõ thì sản phẩm PCR tốt.

3.2.1.5. Ứng dụng của kỹ thuật PCR

Kỹ thuật PCR được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau, từ nghiên cứu khoa học đến sản xuất và đời sống xã hội. Những ứng dụng chính của kỹ thuật PCR là:

– Tách nhanh chóng, chính xác từng gen, hoặc từng đoạn ADN riêng biệt.

– Là kỹ thuật nền cho các nghiên cứu di truyền phân tử như xác định trình tự gen, đa hình ADN, xác định marker phân tử cho chọn giống, phát hiện đột biến gen...

– Xác định giới tính động vật ở giai đoạn phôi, thai.

– Chẩn đoán nhanh, nhạy các bệnh di truyền, bệnh nhiễm trùng (virus, vi khuẩn, nấm...).

– Khôi phục gen của các sinh vật cổ cách đây hàng triệu năm.

– Xác định nguồn gốc hài cốt, quan hệ họ hàng, xác định cá thể dùng trong việc xác định huyết thống cũng như trong khoa học hình sự.

3.2.2. Các phương pháp phân tích ADN phụ thuộc PCR

3.2.2.1. Kỹ thuật đa hình các đoạn ADN khuếch đại ngẫu nhiên (RAPD-PCR: Randomly Amplified Polymorphic DNA)

a) Nguyên lý

Kỹ thuật RAPD (còn gọi là RAPD-PCR) tiến hành dựa trên nguyên lý của kỹ thuật PCR. Trong kỹ thuật RAPD không cần dùng cặp mồi đặc hiệu để nhân đoạn ADN nhất định mà dùng các mồi đơn ngẫu nhiên để nhân các đoạn ADN một cách ngẫu nhiên. Mồi ngẫu nhiên để nhân các đoạn ADN một cách ngẫu nhiên không cần biết trước trình tự nucleotit. Mồi ngẫu nhiên là đoạn Oligonucleotit dài khoảng 6-12 nucleotit. Do tính ngẫu nhiên nên các đoạn mồi này vừa là mồi xuôi, vừa là mồi ngược. Các đoạn này sẽ bắt cặp với trình tự bổ sung trong hệ gen của sinh vật từ đó nhân bản. Mồi càng ngắn thì khả năng bắt cặp càng cao và phản ứng PCR dễ thực hiện. Mồi càng dài thì khó bắt cặp nhưng kết quả nhân đoạn ADN càng chính xác. Hiện nay có nhiều hãng bán nhiều loại mồi ngẫu nhiên với tên gọi khác nhau và có đoạn trình tự khác nhau.

Theo lý thuyết, một mồi ngẫu nhiên gồm 10 nucleotit thì xác suất bắt gặp một trình tự bổ sung với nó trong mạch ADN (được cấu tạo bởi 4 loại nucleotit A, T, G, C) sẽ là $1/4^{10}$ = 1/1.048.576. Một hệ genome đơn bội của lúa có kích thước khoảng 550.000.000bp, vậy khả năng bắt cặp mồi ngẫu nhiên (10 nucleotit) có thể là 550.000.000/1.048.576 = 524 vị trí. Vì mồi có thể gắn với ADN genome ở 2 vị trí khác nhau cả ở trên các sợi đối diện của ADN khuôn, do vậy sẽ chỉ có 262 đoạn ADN khác nhau được nhân lên. Khi phân tích phổ băng RAPD, nếu 2 mẫu có phổ băng giống nhau nhiều thì chúng có quan hệ di truyền gần gũi và ngược lại.

b) Các bước tiến hành kỹ thuật RAPD-PCR

Các bước tiến hành kỹ thuật RAPD-PCR gồm các bước cơ bản như phản ứng PCR bao gồm các bước chính sau:

– Tách chiết, tinh sạch, đánh giá độ tinh sạch ADN hệ gen. Tuỳ theo đối tượng nghiên cứu mà có các công đoạn tách chiết khác nhau như đã trình bày ở phần các phương pháp tách chiết ADN đã nêu trên. Trước hết phải nghiền, phá mẫu. Dùng đệm tách làm cho ADN giải phóng ra ngoài. Loại bỏ protein bằng hỗn hợp phenol : chloroform : isoamyl alcohol (tỷ lệ 25:24:1). Ly tâm thu dịch nổi. Kết tủa ADN bằng isopropanol, hoặc ethanol 100°. Rửa sạch kết tủa và hoà tan ADN bằng đệm, hoặc nước cất. Kiểm tra độ tinh sạch bằng điện di, hoặc bằng đo quang phổ tia tử ngoại.

– Thực hiện phản ứng PCR với mồi ngẫu nhiên. Có thể sử dụng các loại mồi ngẫu

nhiên khác nhau để nghiên cứu một loại mẫu, hoặc dùng 1 loại mồi nhưng với các loại mẫu khác nhau để so sánh.

– Điện di sản phẩm PCR:

Sản phẩm PCR được tiến hành điện di trên gel agarose, hoặc gel polyacrylamid, sau đó được nhuộm bằng ethidium bromid. Soi gel dưới ánh sáng tử ngoại, phát hiện băng ADN. Chụp ảnh băng ADN.

– Phân tích và đánh giá kết quả:

Dựa vào kết quả băng ADN trên gel để xác định tính đa dạng di truyền bằng các phần mềm thông dụng (như NTSYS-PC, UPGMA Cluster, Gelcompar...) để lập sơ đồ hình cây biểu hiện mối quan hệ tương đồng di truyền giữa các mẫu nghiên cứu.

Hệ số tương đồng di truyền được tính theo công thức của Nei M. và Li.W.H. (1979).

Theo Nei M và Li.W.H. (hệ số Nei)

$$S = \frac{2N_{AB}}{N_A + N_B}$$

Trong đó: S là hệ số tương đồng di truyền.

N_{AB} là số băng ADN có cả ở mẫu A và B.

N_A là số băng ADN có ở mẫu A.

N_B là số băng ADN có ở mẫu B.

c) Ứng dụng kỹ thuật RAPD-PCR

Kỹ thuật RAPD-PCR có những ưu điểm như thực hiện nhanh, dễ làm, ít tốn kém nên được ứng dụng rộng rãi trong việc phát hiện tính đa dạng của sinh vật. Những thay đổi trong gen, đột biến nhiễm sắc thể... đều làm thay đổi kích thước của đoạn nhân bản. Kỹ thuật này phù hợp với phân tích đa dạng di truyền, lập bản đồ gen.

Một trong những ứng dụng quan trọng nhất của kỹ thuật RAPD-PCR là xác định nguồn gốc di truyền, mối quan hệ họ hàng của động vật, thực vật và vi sinh vật nên kỹ thuật RAPD-PCR còn được gọi là phương pháp phân loại học phân tử. Tuy nhiên, kỹ thuật này còn có một số hạn chế như: số băng thu được khi sử dụng các mồi ngẫu nhiên còn rất lớn và không chắc chắn khi có băng ADN giống nhau thể hiện cùng kích thước trên bản gel có thực sự là ở cùng một vị trí trên hệ genom hay không.

3.2.2.2. Kỹ thuật đa hình chiều dài các đoạn ADN nhân bản chọn lọc (AFLP-Amplified Fragment Length Polymorphism)

a) Nguyên lý

Kỹ thuật AFLP dựa trên nguyên tắc là sử dụng kỹ thuật PCR để nhân bản các đoạn ADN đã bị cắt bởi enzym giới hạn. Khâu then chốt của kỹ thuật này là việc thiết kế các mồi đặc trưng. Để thiết kế được các mồi đặc trưng, trước hết cắt các mẫu ADN cần nghiên cứu bằng các enzym giới hạn. Người ta thường dùng đồng thời 2 enzym giới hạn để cắt ADN. Ví dụ, người ta dùng đồng thời enzym giới hạn *E.co*RI có trình tự nhận biết để cắt là 6 nucleotit (-GAATTC-/-CTTAAG-) và enzym *Mse*I có

trình tự nhận biết để cắt là 4 nucleotit (-AATT-/-TTAA-). Sau khi xử lý với các enzym giới hạn, ADN bị cắt thành nhiều đoạn có kích thước khác nhau nhưng trình tự các nucleotit ở hai đầu đoạn cắt giống nhau và đã được xác định. Dựa vào trình tự đã biết ở 2 đầu cắt, có thể thiết kế các đoạn oligonucleotit ngắn (gọi là adaptor) và gắn chúng vào hai đầu cắt. Dựa vào trình tự adaptor có thể thiết kế mồi PCR gồm 2 phần: phần có trình tự bổ sung với adaptor và phần có 1 đến 3 nucleotit tuỳ ý. Với mồi thiết kế như vậy chỉ có các đoạn ADN có trình tự 2 đầu bắt cặp bổ sung với trình tự mồi mới được nhân bản.

b) Các bước tiến hành kỹ thuật AFLP

Bước 1: Tách chiết, tinh sạch ADN

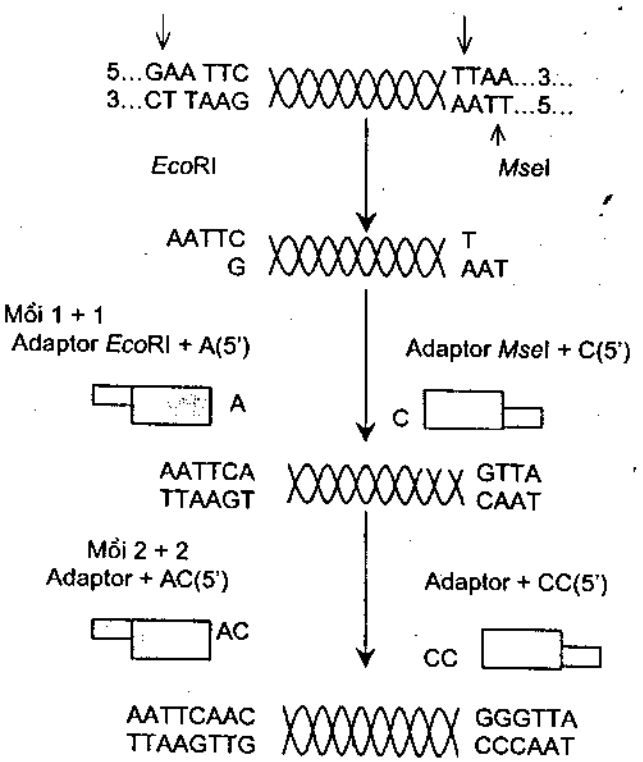
Phương pháp tách chiết và tinh sạch ADN tuỳ theo mẫu như đã nêu ở phần tách chiết ADN.

Bước 2: Cắt các phân tử ADN bằng các enzym giới hạn. Có thể dùng hai enzym giới hạn để xử lý. Ví dụ, dùng *Eco*RI và *Mse*I để cắt ADN thành các đầu dính.

Bước 3: Nối các đoạn ADN đã cắt với các adaptor.

Bước 4: Nhân bản có chọn lọc các đoạn được nối ở trên bằng kỹ thuật PCR.

Bước 5: Phân tích kết quả sản phẩm PCR bằng điện di và xử lý kết quả bằng các phần mềm thông dụng để đánh giá sự khác biệt di truyền và đa dạng sinh học của các mẫu nghiên cứu. Sơ đồ kỹ thuật AFLP được mô tả ở Hình 3.2.



Hình 3.2. Sơ đồ kỹ thuật AFLP
(Nguồn: Khuất Hữu Thanh, 2003)

c) Những ưu, nhược điểm của kỹ thuật AFLP

– Ưu điểm: Kỹ thuật AFLP có tiềm năng to lớn trong kỹ thuật phân tích đa dạng di truyền. Kỹ thuật AFLP có những ưu điểm:

+ Kỹ thuật AFLP có thể phân tích với bất kỳ hệ gen nào từ đơn giản đến phức tạp.

+ Phân tích sự đa dạng di truyền, đánh dấu các gen và ứng dụng để lập bản đồ gen.

+ Có thể nhân chọn lọc nhiều đoạn giới hạn trong một phản ứng AFLP. Thông thường ta có thể thu được 50-100 băng ADN (đoạn ADN) cho mỗi mẫu nghiên cứu.

– Nhược điểm: Tuy có những ưu điểm cơ bản nhưng kỹ thuật AFLP còn có những nhược điểm là:

+ Đối với các hệ genome lớn, phức tạp thì số phân đoạn ADN là quá lớn, khó phân tích, do vậy cần tìm biện pháp hạn chế số phân đoạn chỉ đủ để phân tích.

+ Kỹ thuật tiến hành qua nhiều bước, phức tạp.

3.2.2.3. Kỹ thuật phân tích các trình tự lặp lại đơn giản (SSR: Simple Sequence Repeats)

a) Nguyên lý

Kỹ thuật SSR là kỹ thuật khuếch đại các đoạn lặp lại đơn giản, còn được gọi là phương pháp vi vệ tinh (microsattellite). Các đoạn lặp lại gồm 2 đến 6 cặp nucleotit được lặp đi lặp lại nhiều lần trong hệ gen. Đoạn SSR điển hình là đoạn trình tự gồm 2-3 cặp nucleotit, lặp lại từ 9 đến 30 lần. Các đoạn trình tự bảo thủ thường dùng trong kỹ thuật SSR là ATT, AT, CTT, CT v.v... Các đoạn lặp lại có kích thước dài ngắn khác nhau tuỳ theo từng loài, từng giống vật nuôi, cây trồng.

Ví dụ, ở lúa có khoảng 1000 lần lặp lại trật tự AC/TG, khoảng 300 lần lặp lại trật tự GAAT/CTTA.

Ngay trong một genome cũng có mức độ lặp lại ở các nhiễm sắc thể khác nhau. Ở động vật có vú, một đoạn trình tự lặp lại một vài lần chiếm >50%, còn đoạn trình tự lặp lại tới hàng trăm nghìn lần chỉ chiếm khoảng 20-25%. Các đoạn SSR thường ở vùng gần tâm động, hoặc đầu mút của NST và có vai trò điều hoà hoạt động của gen.

b) Các bước tiến hành kỹ thuật SSR

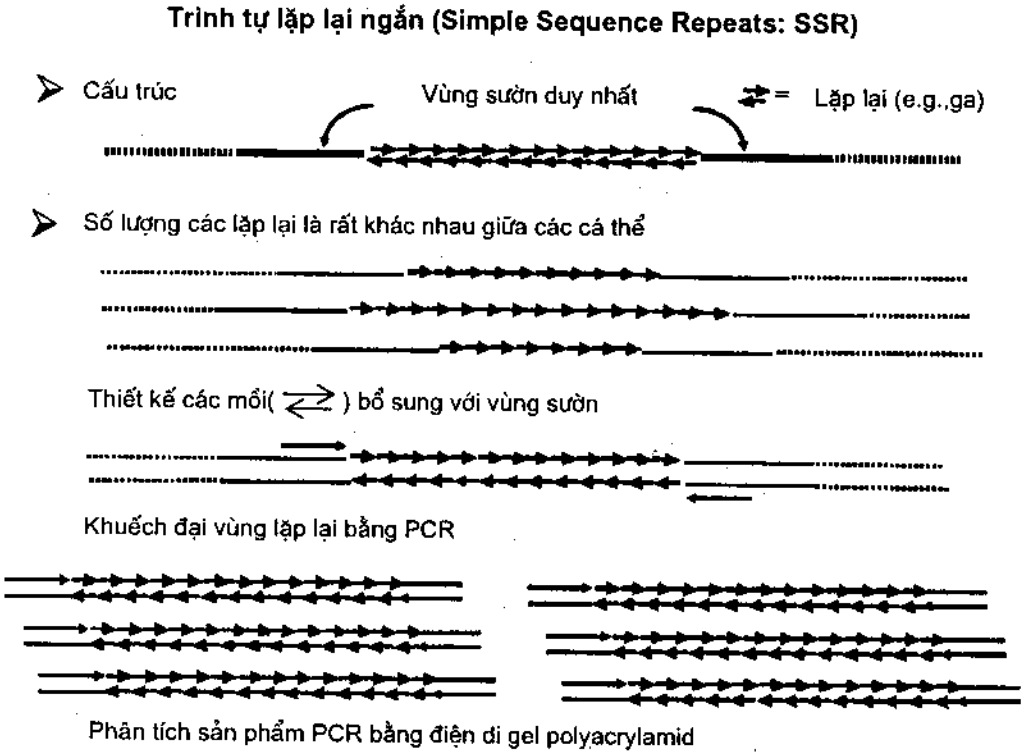
– Tách chiết và tinh sạch ADN như đã nêu ở phần trên.

– Tiến hành phản ứng PCR:

Tiến hành phản ứng PCR với các đoạn có trình tự bổ sung với các trình tự ở hai đầu của vùng chứa SSR (vùng sườn). Do các vùng sườn ở 2 đầu SSR khá bảo thủ nên kỹ thuật SSR có tính ứng dụng cao đối với các loài, các giống khác nhau.

– Điện di sản phẩm PCR trên gel polyacrylamide, sau đó nhuộm gel theo phương pháp nhuộm bạc.

– Chụp ảnh phổ điện di và phân tích số liệu. Sơ đồ tóm tắt các bước tiến hành kỹ thuật SSR được mô tả ở Hình 3.3.



Hình 3.3. Sơ đồ kỹ thuật SSR

c) Những ưu, nhược điểm của kỹ thuật SSR

– Ưu điểm:

+ Kỹ thuật SSR là loại marker chính xác và hữu hiệu trong nghiên cứu đa dạng di truyền, phân loại các giống vật nuôi, cây trồng khác nhau trong cùng một loài động vật hay thực vật.

+ Sử dụng kỹ thuật SSR để xây dựng bản đồ liên kết, phân lập (gen), xác định quan hệ di truyền giữa các giống, dòng vật nuôi, cây trồng và chẩn đoán cặp lai cho ưu thế lai.

+ Kỹ thuật SSR tương đối đơn giản, không tốn kém, dễ thực hiện.

– Nhược điểm:

+ Kỹ thuật SSR cần nhiều bước tiến hành, cần thiết kế các cặp mồi chính xác tương ứng với các vùng sườn để nhân các SSR rải rác trong genome.

3.2.2.4. Kỹ thuật xác định vị trí trình tự đã được đánh dấu (STS: Sequence Tagged Site)

Kỹ thuật STS do Olson và cộng sự đề xuất năm 1989. STS là một đoạn ADN ngắn gồm khoảng 60-1000bp có thể phát hiện được bằng kỹ thuật PCR. Kỹ thuật STS cho phép xác định những vị trí cần biết bằng các trình tự ADN biết trước của ADN trong genome.

a) Nguyên lý

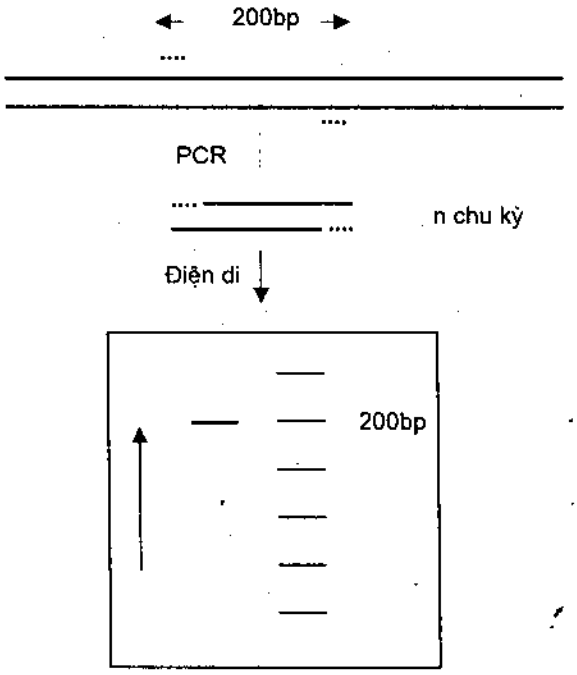
Kỹ thuật STS là kỹ thuật nhân trực tiếp những locus (gen) đã biết (gen, cADN...) bằng việc sử dụng cặp mồi PCR được thiết kế theo trình tự đoạn đầu và cuối của những locus đặc trưng này.

b) Các bước tiến hành

– Xác định trình tự các nucleotit ở 2 đầu của đoạn sử dụng làm mẫu dò trong sản phẩm RAPD.

– Dựa vào trình tự đã xác định, thiết kế các mồi STS có chiều dài 18-20 nucleotit. Các đoạn mồi này dài hơn các mồi của RAPD nên có tính đặc hiệu cao hơn khi tiến hành kỹ thuật PCR.

– Tiến hành PCR. Nếu qua kỹ thuật PCR xuất hiện nhiều đoạn mới được tổng hợp, điều đó chứng tỏ ADN chưa biết được đánh dấu STS mà ta cần tìm. Qua n chu kỳ chúng ta sẽ được nhiều đoạn ADN mới và xác định kích thước của đoạn này nhờ điện di sản phẩm PCR. Sơ đồ Hình 3.4 minh hoạ việc sử dụng PCR để phát hiện STS.



Hình 3.4. Sơ đồ sử dụng PCR để phát hiện STS
(Sử dụng cặp mồi 2 đầu cách nhau 200bp. PCR tạo ra nhiều đoạn 200bp)

c) Ưu, nhược điểm của kỹ thuật STS

Kỹ thuật STS sử dụng để xây dựng bản đồ di truyền liên kết. Ví dụ, người ta xác định được STS liên kết với một số gen kháng stress, chịu lạnh ở lúa. Tuy nhiên, kỹ thuật STS còn có hạn chế, đó là: cần kết hợp phương pháp xác định trình tự đoạn ADN thiết kế mẫu dò, thiết kế mồi và nhiều bước phân tích phức tạp.

3.2.2.5. Kỹ thuật phân tích Taq-Man

a) Nguyên lý

Phân tích Taq-Man là phương pháp sử dụng mẫu dò để khảo sát các trình tự đặc biệt trong các sản phẩm PCR bằng cách lợi dụng hoạt tính 5' exonuclease của enzym *Taq* ADN polymerase. Mẫu dò Taq-Man (20-30bp) có chiều dài lớn hơn đoạn mồi PCR, chúng không có khả năng kéo dài ở đầu 3'. Mẫu dò này được đánh dấu bằng yếu tố chỉ

thị huỳnh quang (fluorescent receptor: R) ở đoạn trình tự phía đầu và một yếu tố ức chế (fluorescent quencher: Q) ở đầu kia.

Trong khi tiến hành phản ứng PCR, mẫu dò Taq-Man sẽ bám vào đoạn trình tự bổ sung với nó trên sợi đơn ADN trong đoạn cần nhân bản. Khi nhân bản (sao chép), do hoạt tính 5'-3' exonuclease của *Taq* ADN polymerase mà enzym này kéo dài đoạn mồi trong PCR. Do vậy, yếu tố ức chế Q bị tách ra khỏi yếu tố chỉ thị huỳnh quang R và yếu tố R sẽ phát quang. Do sự tách yếu tố ức chế, chỉ thị huỳnh quang tăng lên cùng với quá trình sao chép nên cường độ phát huỳnh quang sẽ tăng dần lên. Trong quá trình sao chép, nhân bản, tuỳ theo số chu kỳ tăng lên dần thì sự phát sáng huỳnh quang sẽ tăng theo hàm luỹ thừa và mức độ cuối cùng sẽ được đo bằng máy đo quang phổ khi kết thúc quá trình PCR. Bởi vì sự tăng cường độ huỳnh quang chỉ xảy ra khi các mẫu dò Taq-Man bám bổ sung đúng vào phần bên trong của đoạn trình tự được nhân bản (giữa 2 mồi xuôi và mồi ngược của PCR), do đó phân tích Taq-Man là phương pháp rất nhạy để xác định sự có mặt nhiều hay ít các đoạn trình tự đặc biệt cần xác định. Phân tích Taq-Man cho hiệu quả chính xác cao.

b) Các bước tiến hành

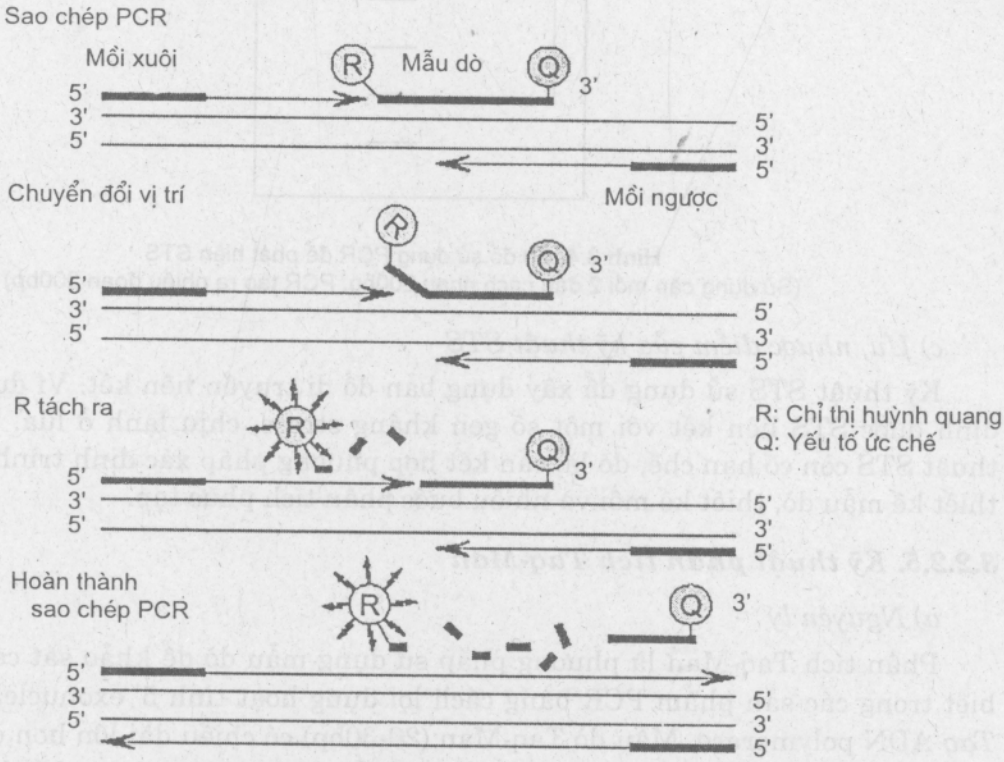
– Thiết kế mẫu dò Taq-Man có gắn chỉ thị huỳnh quang (R) vào đầu 5' và yếu tố ức chế (Q) ở đầu 3' của mẫu dò.

– Nhân bản đoạn trình tự cần khuếch đại bằng PCR.

– Đo huỳnh quang bằng máy đo quang phổ.

– Xác định hàm lượng đoạn ADN thông qua cường độ huỳnh quang.

Sơ đồ mô tả các bước phân tích Taq-Man ở Hình 3.5.



Hình 3.5. Sơ đồ phân tích Taq-Man

c) Ưu, nhược điểm của kỹ thuật Taq-Man

Phân tích Taq-Man cho hiệu quả cao vì chỉ cần sử dụng phương pháp đo quang phổ huỳnh quang, không cần điện di. Phân tích Taq-Man là phương pháp nhạy để xác định sự có mặt của đoạn trình tự đặc biệt. Kỹ thuật này dễ thực hiện và nhanh chóng. Tuy nhiên kỹ thuật bị hạn chế bởi việc thiết kế mẫu dò và cần nhiều thiết bị chính xác.

3.2.3. Kỹ thuật tạo ADN bổ sung (cADN)- Ngân hàng gen

3.2.3.1. Khái niệm về cADN

Hệ gen của sinh vật nhân chuẩn có kích thước rất lớn gồm nhiều gen. Các gen có cấu trúc phức tạp. Quá trình tạo dòng gen (cloning gene) thực chất là tạo một phần hết sức nhỏ bé trong tổng số ADN của tế bào. Khi tạo dòng gen, không phải tất cả các đoạn của gen cần tạo dòng gen mà chỉ cần các đoạn mã hoá của một gen. Chúng ta biết rằng, gen của sinh vật nhân chuẩn bậc cao chứa những đoạn mã hoá (exon) xen kẽ với các đoạn không mã hoá (intron). Do vậy chúng ta cần bản sao của gen chỉ chứa phần mã hoá cho protein. Bản sao này bắt nguồn từ phân tử mARN trưởng thành sau khi đã cắt bỏ các đoạn tương ứng với các intron. Nhờ enzym sao mã ngược (Reverse transcriptase) mà từ mARN trưởng thành này sẽ tổng hợp nên ADN. Các ADN tạo nên bằng cách này được gọi là ADN bổ sung (cADN: complementary DNA). Như vậy cADN là các phân tử ADN được tổng hợp từ khuôn mARN nhờ quá trình phiên mã ngược. cADN thu được từ 1 tế bào, ở các giai đoạn khác nhau lưu giữ tạo thành ngân hàng cADN.

3.2.3.2. Kỹ thuật tạo cADN và ngân hàng cADN

Muốn tạo ra cADN và tập hợp thành ngân hàng cADN cần có các bước sau:

– Tách các mARN ra khỏi các ARN khác. Quá trình này được thực hiện ở các giai đoạn phát triển khác nhau của loài.

Muốn tách chiết mARN ra khỏi các loại ARN khác (rARN, tARN) cần cho hỗn hợp ARN chảy qua phễu có gắn cellulose-oligoT. mARN được gắn lại trong phễu. Công đoạn tiếp theo là giải phóng mARN ra khỏi phễu nhờ đệm Tris-EDTA.

– Sử dụng mARN làm khuôn cùng với enzym sao mã ngược và các nguyên liệu dNTP để tạo cADN.

– Tạo dòng cADN, thu thập các dòng cADN ở các giai đoạn phát triển khác nhau của tế bào, lưu giữ để lập ngân hàng cADN.

– Tìm các cADN cần thiết bằng lai ADN, hoặc nhờ các phản ứng miễn dịch.

3.2.3.3. Ưu, nhược điểm của kỹ thuật tạo cADN

Kỹ thuật tạo cADN để tạo dòng gen không chứa phần intron, từ đó có thể xác định trình tự của các nucleotit của gen, trên cơ sở đó chủ động tạo ra sản phẩm protein đặc hiệu cần thiết. Khi tạo ra được các dòng cADN, có thể dễ dàng biến nạp vào các vật chủ là vi khuẩn. Trong tế bào vi khuẩn, gen được nhân bản và được biểu hiện. Biến nạp cADN khắc phục được hiện tượng tế bào vi khuẩn không dung nạp gen có cấu trúc mang phần không mã hóa (intron). Tuy nhiên, kỹ thuật tạo cADN cho ta nhiều gen khác nhau. Mặt khác mỗi giai đoạn phát triển khác nhau của cơ thể thì sự phiên mã

của hệ gen là khác nhau, vì vậy việc thiết lập ngân hàng cADN và chọn lọc gen mong muốn đòi hỏi công phu, tỷ mỷ và tốn nhiều thời gian.

3.2.4. Một số phương pháp lai axit nucleic

Lai axit nucleic dựa vào nguyên tắc bổ sung giữa các bazơ nitơ A-T và G-C. Các đoạn polynucleotit đơn có nguồn gốc khác nhau nhưng có cấu trúc bổ sung với nhau thì chúng có thể bắt cặp với nhau tạo ra phân tử lai.

Tiến hành phản ứng lai ADN cần sử dụng nhiệt độ cao, hoặc dùng hóa chất gây biến tính (NaOH, formaldehyt) để ADN kép tách thành hai mạch đơn và tạo điều kiện thích hợp cho các mạch đơn có nguồn gốc khác nhau (mẫu dò và ADN kép) có thể dễ dàng bắt cặp với nhau theo nguyên tắc bổ sung. Để phát hiện các vị trí của phản ứng lai thì mẫu dò dùng đem lai thường được đánh dấu phóng xạ bằng P^{32}.

Hiện nay có một số phương pháp lai axit nucleic như: lai Southern Blot, lai Northern Blot, lai Western Blot, dot (điểm) blot và slot (khe) blot v.v...

3.2.4.1. Phương pháp Southern Blot

a) Nguyên lý

Phương pháp lai Southern Blot (thấm Southern) được Edward Southern đề xuất năm 1975 và sau đó được tiếp tục hoàn thiện. Phương pháp này cho phép xác định được sự có mặt của các đoạn trình tự nucleotit trên một đoạn ADN nào đó trong hỗn hợp có nhiều đoạn ADN khác nhau, dựa trên sự bắt cặp bổ sung của mẫu dò (DNA probe) đã được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ (P^{32}) với đoạn ADN có chứa trình tự bổ sung với mẫu dò đó.

b) Các bước tiến hành

– Tách chiết ADN nghiên cứu ra khỏi mô, tế bào. Sử dụng các enzym giới hạn cắt ADN để tạo ra hỗn hợp các đoạn ADN có kích thước khác nhau.

– Tiến hành điện di hỗn hợp sản phẩm đã bị xử lý bởi enzym giới hạn trên gel agarose (nồng độ agarose 0,8%; đệm TBE (Tris-Borat-EDTA), hiệu điện thế 1,5V/cm chiều dài bản gel).

– Biến tính các băng ADN kép trên gel điện di bằng cách xử lý gel đã chạy điện di với khoảng thời gian 20 phút trong dung dịch NaOH 0,4M để tạo thành các ADN mạch đơn.

– Chuyển các đoạn ADN mạch đơn từ gel sang màng lai (màng nitrocellulo, hoặc nilon filter) bằng hệ thống tạo mao dẫn (máy Bloting). Dung dịch dẫn truyền là NaOH 0,4M. Vị trí của các đoạn ADN đơn được giữ chặt trên màng lai.

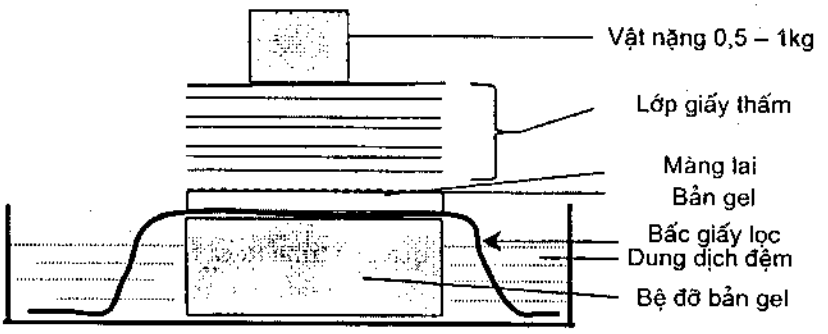
– Các đoạn ADN cố định trên màng lai được đem lai với dung dịch mẫu dò (DNA probe) đã được đánh dấu bằng P^{32}, hoặc phản ứng tạo màu. Quá trình này được thực hiện ở buồng lai có nhiệt độ 65-68°C, trong thời gian từ 6 đến 12 giờ.

– Rửa màng lai bằng hỗn hợp NaCl, natri citrat và nước cất ở nhiệt độ 65°C, từ hai đến ba lần. Thấm khô bằng giấy thấm, hoặc sấy khô ở nhiệt độ 65°C.

– Xác định vị trí lai nhờ kỹ thuật phóng xạ tự ghi. Nơi xảy ra phản ứng lai sẽ phát

quang và chụp được nhờ phim X quang. Nơi phát quang sẽ thể hiện là vệt đen sau khi rửa phim X quang, và đó là vị trí lai ADN.

Kỹ thuật Southern Blot là phương pháp chuẩn để áp dụng thành công trong nghiên cứu sự đa hình của ADN và đánh giá sự đa hình của các đoạn giới hạn được gọi là kỹ thuật RFLP. Sơ đồ phương pháp lai Southern Blot được thể hiện ở Hình 3.6.



Hình 3.6. Sơ đồ kỹ thuật Southern Blot

3.2.4.2. Kỹ thuật đa hình chiều dài các đoạn cắt giới hạn (RFLP: Rectriction fragment Length Polymorphism)

a) Nguyên lý

Kỹ thuật RFLP dựa trên sự sai khác của phổ băng điện di và độ dài của các phân đoạn bị cắt bởi enzym giới hạn. Số lượng đoạn cắt khác nhau được phân biệt bằng điện di đồ nên còn được gọi là dấu vân tay (finger printing) đặc trưng cho từng phân tử ADN. Khi xử lý các mẫu ADN bằng cùng một cặp enzym giới hạn thì các hệ genome có cấu trúc khác nhau sẽ tạo nên các đoạn cắt có chiều dài khác nhau. Ngược lại, nếu các hệ genome có cấu trúc giống nhau sẽ tạo nên các đoạn cắt giống nhau thể hiện giống nhau trên điện di đồ (H.3.7).

b) Các bước tiến hành

– Tách chiết và tinh sạch ADN.

– Cắt các mẫu ADN cần phân tích bằng một cặp enzym giới hạn.

– Điện di sản phẩm ADN sau khi đã xử lý bằng enzym giới hạn.

– Làm biến tính ADN bằng sử dụng nhiệt độ cao.

– Chuyển ADN đã biến tính lên màng lai nitrocellulo, hoặc nilon filter.

– Ủ màng lai với mẫu dò đã được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ P^{32}. Mẫu dò là các đoạn ADN sợi đơn được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ P^{32}. Mẫu dò sẽ liên kết bổ sung với các đoạn ADN đơn tương ứng.

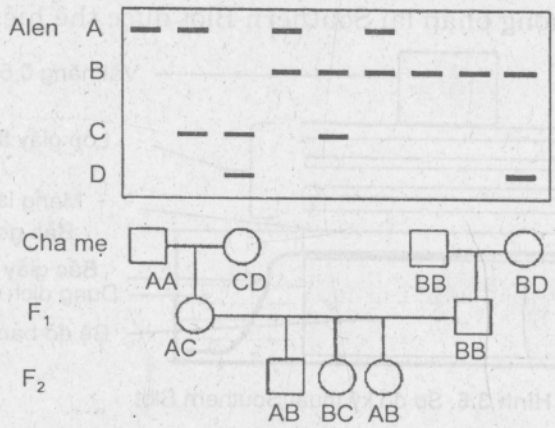
– Rửa màng lai để loại bỏ phần mẫu dò không bắt cặp bổ sung, hoặc liên kết không đặc hiệu.

– Hiển thị bằng phim phóng xạ tự ghi.

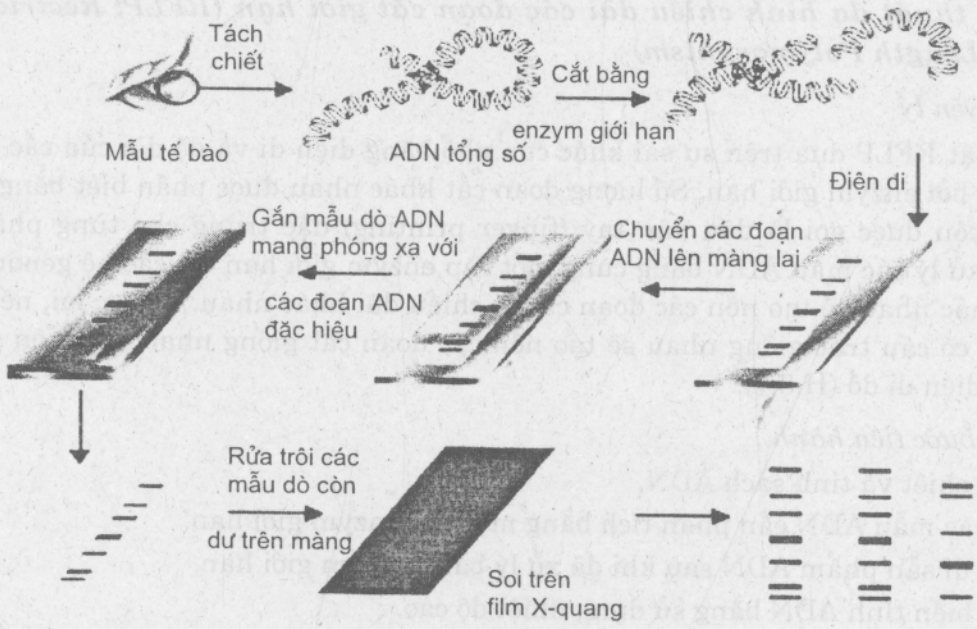
c) Ứng dụng của kỹ thuật RFLP

Kỹ thuật RFLP mở ra hướng mới cho nhiều lĩnh vực của di truyền và chọn tạo giống. Sử dụng kỹ thuật RFLP nghiên cứu mối quan hệ họ hàng của nhiều nhóm loài

thực vật, động vật. Kỹ thuật này cho phép phát hiện sự có mặt của gen cần tìm trong hệ genome sinh vật nghiên cứu; phát hiện sự đa dạng ADN qua các cá thể khác nhau của một loài; phát hiện các thể đột biến gen. Kỹ thuật RFLP cũng phát hiện được các thể lai soma, lập bản đồ giới hạn của một gen. Sơ đồ kỹ thuật RFLP được mô tả ở Hình 3.8.



Hình 3.7. Sự khác nhau về vị trí cắt ở các cá thể



Hình 3.8. Sơ đồ kỹ thuật RFLP

3.2.4.3. Phương pháp lai Northern Blot

a) Nguyên lý

Phương pháp lai Northern Blot về cơ bản tương tự như phương pháp lai Southern Blot. Sai khác cơ bản của phương pháp này là lai ARN (mARN) với mẫu dò ADN.

b) Các bước tiến hành

Về cơ bản, các bước tiến hành của phương pháp lai Northern Blot bao gồm các bước sau:

– Tách chiết mARN ra khỏi tế bào.

– Chuyển mARN lên màng lai nitrocellulo, hoặc nilon filter.

– Ủ màng lai với mẫu dò ADN đặc hiệu có gắn đồng vị phóng xạ, hoặc chất phát huỳnh quang.

– Phát hiện số lượng và vị trí lai nhờ phim phóng xạ tự ghi, hoặc hiển thị huỳnh quang.

c) Ứng dụng của phương pháp lai Northern Blot

– Có thể nghiên cứu mARN của từng gen cụ thể trong các đoạn ADN tách dòng.

– So sánh sự khác nhau giữa các gen của tế bào đột biến và tế bào bình thường.

3.2.5. Các phương pháp giải trình tự ADN và ARN

3.2.5.1. Các phương pháp giải trình tự ADN

Muốn nghiên cứu trình tự các nucleotit của một gen, một đoạn ADN, hoặc cả phân tử ADN cần tiến hành giải trình tự ADN. Hiện nay có một số phương pháp giải trình tự ADN khác nhau. Sau đây là một số phương pháp giải trình tự ADN chủ yếu thường dùng.

a) Phương pháp hoá học (Phương pháp Maxam và Gilbert)

Phương pháp giải trình tự các nucleotit (Sequencing) của A. Maxam và W. Gilbert (1977) còn được gọi là phương pháp hoá học.

– Nguyên lý:

Các đoạn ADN (hoặc gen) có số lượng trình tự nucleotit giống nhau (ví dụ dài 12 nucleotit) được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ P^{32} ở đầu 5'. Các đoạn ADN đã mang dấu phóng xạ được chia làm 4 nhóm. Mỗi nhóm được xử lý bằng các chất hoá học, hoặc hỗn hợp hoá học khác nhau nhằm bẻ gãy các đoạn ADN ở các vị trí khác nhau ở một hay hai loại bazơ nitơ khác nhau. Sau đây là ví dụ về tác dụng của các hoá chất và vị trí bazơ nitơ bị bẻ gãy khi xử lý.

Loại bazơ nitơ bị đứt gãy	Hoá chất tác dụng
G	Dimethyl sulphat
G và A	Axit mạnh (pH=2)
T và C	Hydrazine
C	Hydrazine + HCl

Kết quả sau khi xử lý tạo thành các đoạn ADN bị cắt ngẫu nhiên có kích thước khác nhau. Bốn nhóm sau khi cắt được đem điện di trên gel polyacrylamid và thu được các băng ADN khác nhau theo thứ tự. Tuỳ theo đoạn nucleotit dài, ngắn khác nhau sẽ thu được trật tự băng khác nhau. Các đoạn nucleotit ngắn chạy nhanh, ở xa điểm xuất phát; các đoạn nucleotit dài chạy chậm, ở gần điểm xuất phát. Nhờ phương pháp phóng xạ tự ghi, chúng ta thu được các băng khác nhau trên bản gel sau điện di.

– Các bước giải trình tự theo phương pháp Maxam-Gilbert:

+ Tách chiết ADN từ các mẫu nghiên cứu.

+ Cắt ADN từ các mẫu và tạo các đoạn ADN giống nhau bằng kỹ thuật tạo dòng ADN.

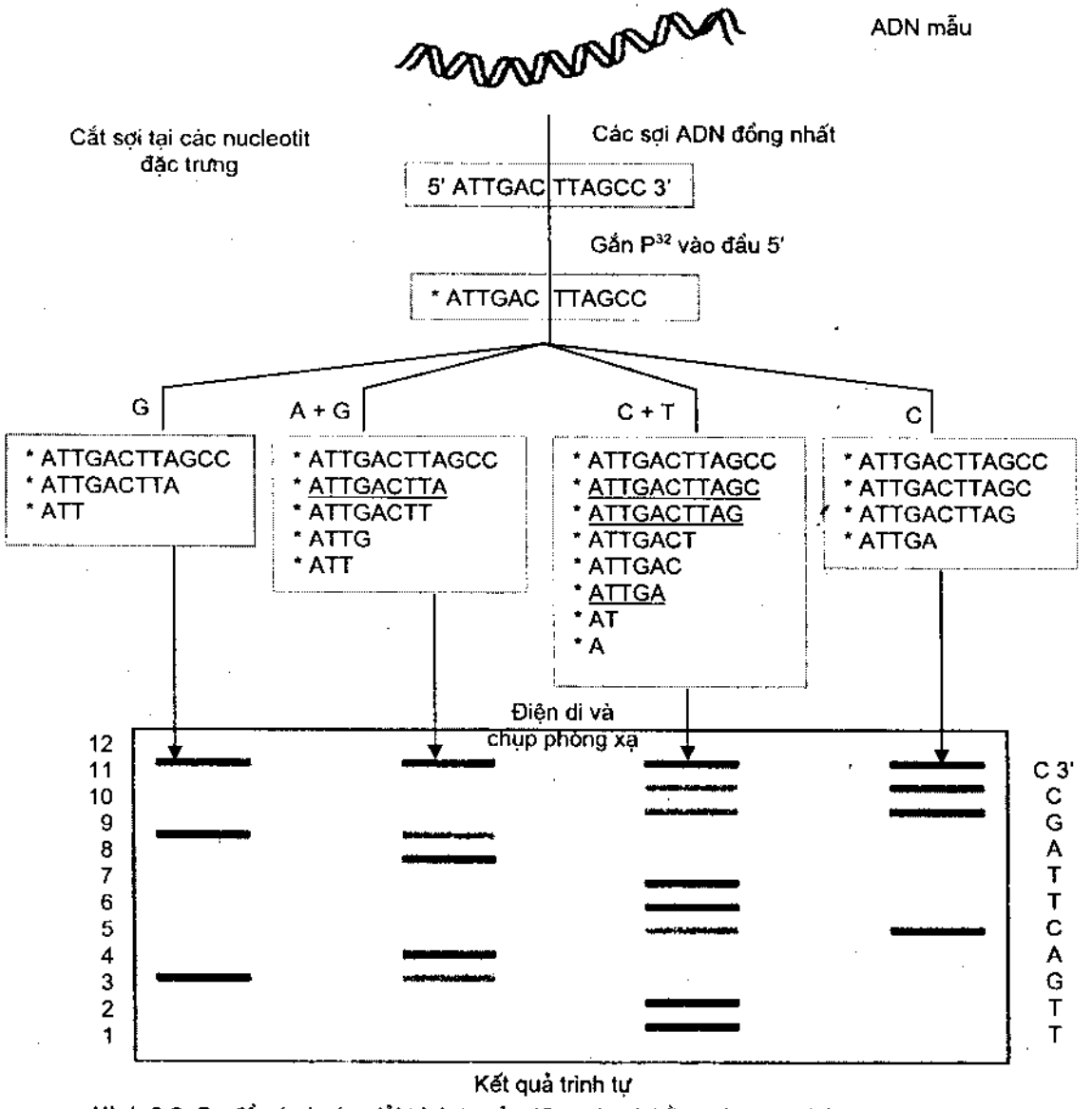
+ Gắn đồng vị phóng xạ P^{32} vào đầu 5' của các đoạn ADN.

+ Xử lý hoá chất thành 4 nhóm riêng biệt sao cho mỗi đoạn nucleotit chỉ bị hỏng ở một bazơ nitơ. Kết quả sau khi xử lý, mỗi nhóm chứa một số đoạn nucleotit có chiều dài khác nhau.

+ Điện di sản phẩm của 4 nhóm trên gel polyacrylamid. Đoạn nucleotit ngắn sẽ chuyển động xa hơn và ngược lại đoạn nucleotit dài sẽ chuyển động chậm và ở gần điểm xuất phát.

+ Chụp ảnh kết quả điện di bằng phương pháp phóng xạ tự ghi. So sánh kết quả thu được ở các mẫu khác nhau theo 4 nhóm.

Sơ đồ các bước giải trình tự theo phương pháp Maxam Gilbert được trình bày ở Hình 3.9.



Hình 3.9. Sơ đồ các bước giải trình tự của 12 nucleotit bằng phương pháp Maxam Gilbert

b) Phương pháp dideoxy

– Nguyên lý:

Phương pháp xác định trình tự ADN dideoxy của F. Sanger (1977) là phương pháp sử dụng enzym ADN polymerase và các dideoxy. Dideoxy là các nucleotit mất cả hai nhóm OH ở vị trí cacbon số 2 và 3 trên phân tử đường pentose.

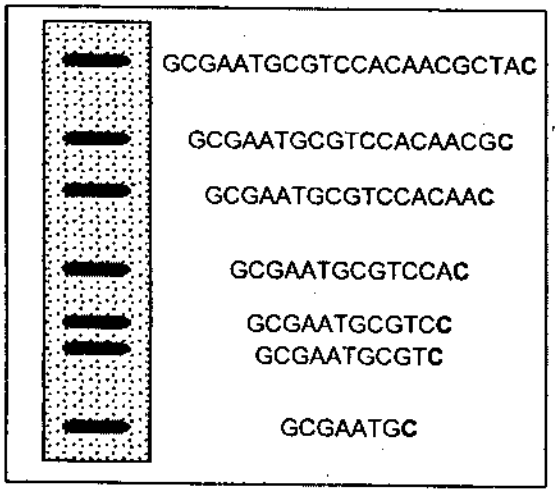
Phương pháp này dựa trên nguyên tắc là ADN polymerase xúc tác cho việc kéo dài chuỗi polynucleotit khi gặp các dideoxynucleotit (ddNTP) thì dừng lại. Do vậy các đoạn polynucleotit sẽ có chiều dài khác nhau.

Nguyên nhân của hiện tượng này là đầu 3'OH cần cho việc hình thành liên kết phosphodiester ở chuỗi polynucleotit đang hình thành với các nucleotit kế tiếp. Việc thiếu nhóm 3'OH ở dideoxynucleotit dẫn đến chuỗi polynucleotit dừng lại. Ví dụ, nếu như ta thêm ddCTP vào hỗn hợp phản ứng đang tổng hợp ADN thì quá trình kéo dài chuỗi polynucleotit đến khi gặp ddCTP sẽ dừng lại ở vị trí C. Nếu thêm ddGTP vào hỗn hợp thì khi gặp ddGTP chuỗi polynucleotit sẽ dừng lại ở vị trí G. Người ta chỉ bổ sung các ddNTP với nồng độ khoảng 1% so với các dNTP. Do vậy khả năng gắn liên kết với các dNTP nhiều hơn so với khả năng gắn với ddNTP. Từ đó sẽ cho các đoạn polynucleotit dài, ngắn khác nhau. Nếu chia làm 4 nhóm với việc bổ sung 1% các loại ddNTP riêng biệt (ddATP, ddCTP, ddGTP và ddTTP) khi chạy điện di sẽ được 4 bản điện di khác nhau. Các băng ADN xác định được nhờ việc gắn đồng vị phóng xạ vào mồi, hoặc vào các dideoxy.

– Các bước tiến hành phương pháp dideoxy:

+ Biến tính ADN, bổ sung mồi có đánh dấu phóng xạ P^{32} Taq ADN polymerase, bổ sung đủ các loại dNTP cho vào dung dịch đệm thích hợp để thực hiện phản ứng tổng hợp ADN, sau đó chia làm 4 lô (4 ống eppendorf).

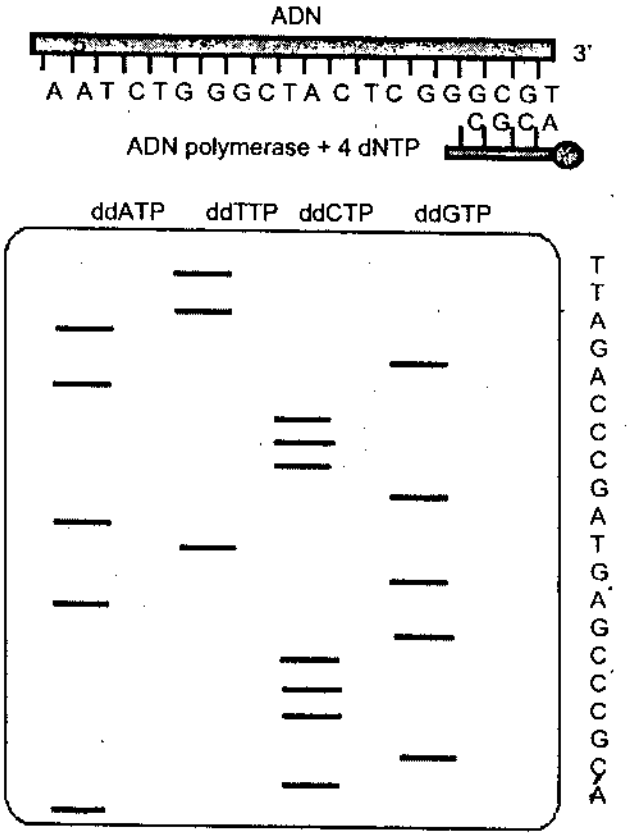
+ Bổ sung vào mỗi lô một loại ddNTP với tỷ lệ 1% (ống A thêm 1% ddATP, ống T thêm 1% ddTTP, ống C thêm 1% ddCTP và ống G thêm 1% ddGTP). Với tỷ lệ này thỉnh thoảng mới có một ddNTP được gắn ngẫu nhiên. Trường hợp không đánh dấu bằng P^{32} ở mồi thì có thể đánh dấu P^{32} ở ddNTP.



Hình 3.10. Kết quả điện di phản ứng dideoxy với ddCTP

+ Điện di các nhóm phản ứng bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamid ở điều kiện biến tính để được các băng của các đoạn oligonucleotit có kích thước khác nhau.

+ Thu kết quả các băng bằng phương pháp phóng xạ tự ghi. Chụp ảnh và phân tích kết quả. Có thể tiến hành giải trình tự cả 2 mạch của ADN khuôn để tránh sai sót. Một trong những kết quả điện di phương pháp giải trình tự thể hiện ở Hình 3.10 và kết quả điện di của hỗn hợp 4 dideoxy ở Hình 3.11.



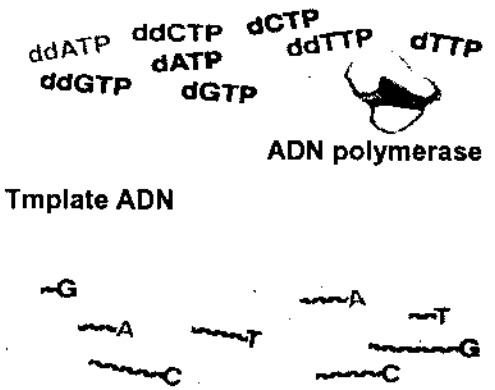
Hình 3.11. Kết quả điện di phản ứng dideoxy với ddNTP

c) Giải trình tự ADN tự động

– Nguyên lý:

Giải trình tự ADN tự động dựa theo nguyên lý của phương pháp dideoxy được cải tiến dựa vào các thiết bị tự động hoá nhanh và chính xác hơn. Sự tự động hoá đã cải tiến tốc độ giải trình tự của mẫu, đặc biệt có ý nghĩa cho việc giải trình tự các nguồn mẫu lớn. Trong kỹ thuật này người ta không đánh dấu bằng chất đồng vị phóng xạ mà đánh dấu bằng chất huỳnh quang (fluochrome). Mỗi loại dideoxy nucleotit được đánh dấu bằng một fluochrome có màu khác nhau (ví dụ như xanh da trời, da cam, xanh lục và đen...) như ở Hình 3.12. Như vậy các phân đoạn ADN được đánh dấu phân biệt bởi các màu khác nhau. Khi sử dụng 4 loại dideoxy nucleotit (ddATP, ddTTP, ddCTP và ddGTP) có 4 màu khác nhau thì có thể giải trình tự mẫu nghiên cứu trong 1 phản ứng (1 giếng điện di) thay vì cho 4 phản ứng trong (4 giếng) riêng biệt như phương pháp

dideoxy đã trình bày ở trên. Phần mềm máy tính sẽ tự động giải trình tự dữ liệu từ gel điện di và cho hình ảnh kết quả giải trình tự ADN.



Hình 3.12. Các ddNTP được gắn các fluochrome khác nhau

– Các bước tiến hành:

+ Giải trình tự ADN tự động bao gồm các thành phần chủ yếu sau:

* ADN mẫu chứa khoảng 10^{10} phân tử, hoặc 10^{10} đoạn ADN dài khoảng 10^3-10^4bp.

* Các deoxynucleotit (dNTP).

* Bốn loại dideoxynucleotit (ddNTP) có gắn màu huỳnh quang khác nhau, mỗi loại gắn một màu riêng biệt.

* Các enzym cần thiết.

Có thể dùng bộ hoá chất sinh chuẩn BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing của hãng Applied Biosystems bao gồm các dNTP, ddNTP, các enzym cần thiết cho phản ứng.

* Dung dịch đệm.

* Mồi xuôi và mồi ngược đặc hiệu cho đoạn cần nhân bản. Thể tích chung cho mỗi phản ứng là 20µl.

+ Tiến hành chạy PCR theo 3 bước chính:

* Biến tính ADN ở 96°C làm cho ADN kép thành mạch đơn.

* Gắn mồi ở 50°C. Có thể dùng riêng, hoặc dùng chung cả mồi xuôi và mồi ngược.

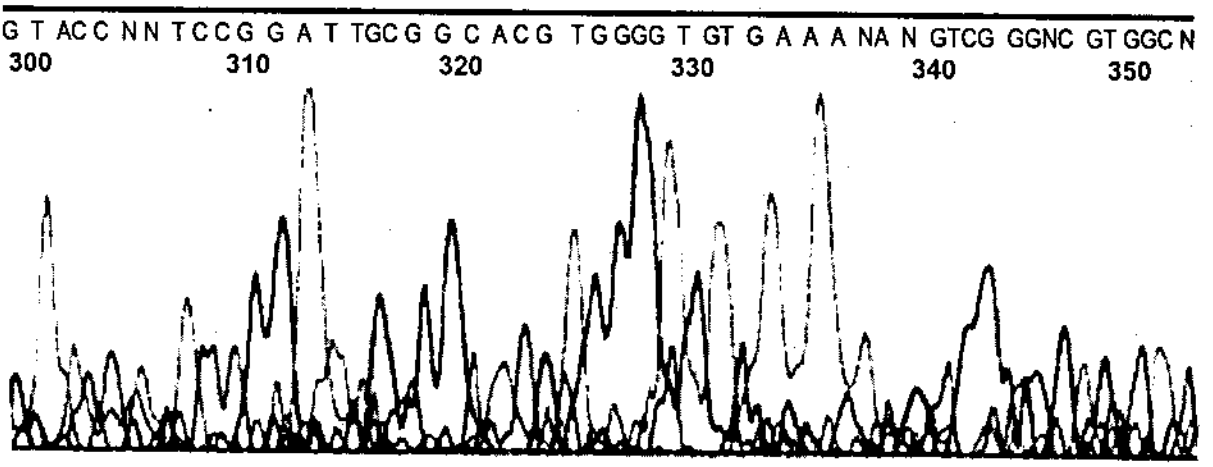
* Kéo dài chuỗi polynucleotit ở 60°C.

Thực hiện 3 bước trên khoảng 25 chu kỳ. Giữ phản ứng PCR ở 40°C trong 10 phút, hoặc để qua đêm.

* Sản phẩm PCR được loại bỏ chất thừa. Kết tủa ADN bằng Ethanol/EDTA.

* Hoà tan kết tủa sạch bằng 15µl HiDiFormamide do các hãng sản xuất cung cấp.

* Sau khi hoà tan kết tủa thì tiến hành điện di trên gel polyacrylamid. Kết quả thu được nhờ máy đọc trình tự và được xử lý bằng các phần mềm chuyên dụng. Những phần mềm sẽ cung cấp dữ liệu in ra từ máy tính. Kết quả giải trình tự một đoạn ADN được minh hoạ ở Hình 3.13.



Hình 3.13. Một kết quả giải trình tự ADN tự động

3.2.5.2. Giải trình tự ARN

Giải trình tự ARN gồm 2 phương pháp chủ yếu sau:

a) Phương pháp giải trình tự ARN trực tiếp

Đây là phương pháp hoá học giải trình tự ARN trực tiếp, tương tự như phương pháp giải trình tự ADN. Các ARN được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ P^{32} ở đầu 5' và được chia làm 4 nhóm. Mỗi nhóm được xử lý bằng các chất, hoặc hợp chất hoá học khác nhau để bẻ gãy ARN ở các vị trí khác nhau của các bazơ nitơ. Ví dụ:

Loại bazơ nitơ	Hoá chất tác dụng
G	Dimethylsulphate
A	Dimethylpyrocarbonate
U và C	Hydrazine
C	Hydrazine + HCl

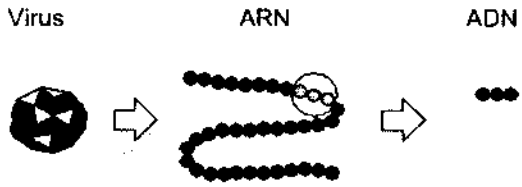
Các phân tử ARN cùng nguồn gốc sẽ được xử lý bằng 4 nhóm hoá chất trên, sau đó tiến hành điện di trên gel polyacrylamid, thu được phổ băng khác nhau. Tiếp theo là việc phát hiện phổ băng ARN nhờ phương pháp phóng xạ tự ghi tương tự như phương pháp hoá học giải trình tự ADN.

b) Phương pháp giải trình tự ARN gián tiếp

Phương pháp giải trình tự ARN gián tiếp thông qua phương pháp giải trình tự ADN. Dựa trên cơ sở của hiện tượng phiên mã ngược từ ARN thành ADN nhờ enzym phiên mã ngược (transcriptase).

Giải trình tự ARN gián tiếp có thể thực hiện từ các phân tử mARN, hoặc từ ARN của virus.

Các bước chính của phương pháp giải trình tự ARN virus được mô tả ở Hình 3.14.



AGGCTCGATCGAATGTCAAFGAGCCTAAGCTACTAGCA

Hình 3.14. Các bước chính giải trình tự ARN gián tiếp

3.2.5.3. Kỹ thuật Microarray (Microscopy arrays)

Microarray là kỹ thuật mới, hiện đại, cho phép cũng một lúc xác định được sự có mặt và biểu hiện của các gen ở những mô, tế bào đặc trưng.

a) Nguyên lý

Gen được gắn vào lam kính hiển vi (đĩa microarray) cho biến tính để được ADN ở dạng mạch đơn. Mỗi đĩa microarray được gắn từ hàng ngàn đến chục ngàn gen. Tách các mARN ở các mô, tế bào đặc thù và được đánh dấu bằng các chất có khả năng phát huỳnh quang. Tiến hành lai giữa hỗn hợp mARN trên với các gen trên đĩa microarray.

Sau phản ứng lai, tiến hành rửa sạch các mARN không lai, quan sát vị trí lai nhờ phát hiện sự phát quang dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Dựa vào kết quả lai sẽ phát hiện được mARN của gen đang hoạt động và những gen ở trạng thái không hoạt động.

b) Các bước tiến hành

– Gắn các gen lên đĩa microarray có phủ lớp polylisine để gắn chặt gen. Cho ADN biến tính đã tách ADN thành mạch đơn.

– Tách mARN (ARN thông tin) ở các mẫu nghiên cứu khác nhau. Đánh dấu màu phát quang cho các mARN. Có thể mỗi loại mARN đánh dấu một màu riêng biệt, hoặc cùng loại mẫu tuỳ theo mục đích nghiên cứu.

– Trộn chung các mARN của các loại mẫu và cho tiến hành lai axit nucleic trên đĩa microarray.

– Phát hiện phản ứng lai nhờ phản ứng phát huỳnh quang và ghi lại trên phim ảnh.

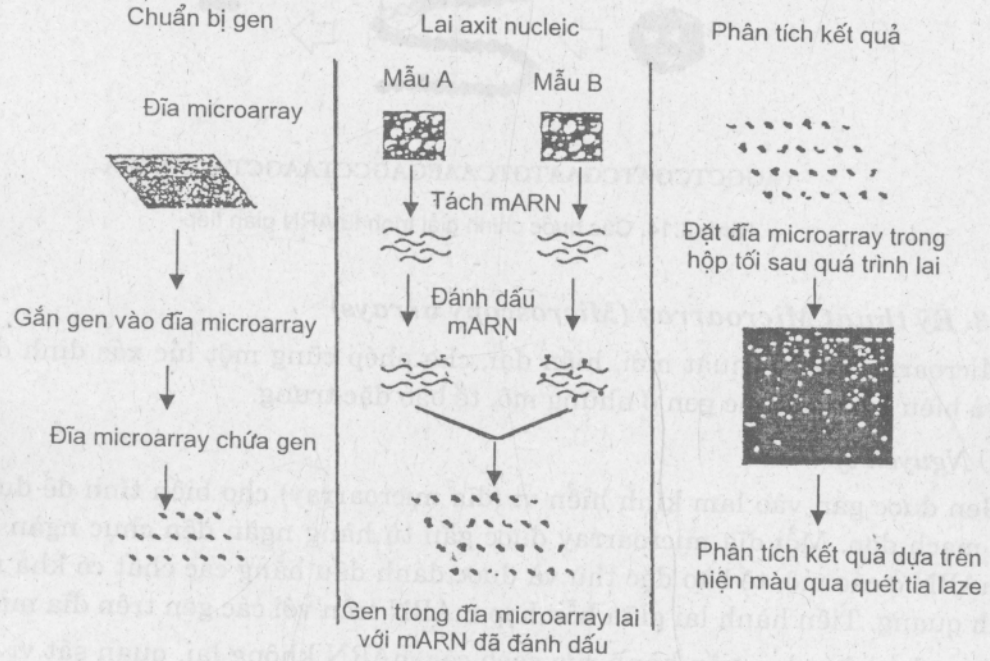
– Sử dụng các chương trình phần mềm chuyên dụng để xác định sự biểu hiện của gen ở các mẫu phân tích.

c) Ứng dụng của kỹ thuật microarray

Kỹ thuật microarray là kỹ thuật hữu hiệu cho việc nghiên cứu genome và xác định chức năng của các gen, những tính trạng và gen tương ứng quy định...

Ví dụ: Để xác định những gen kiểm soát tính chống chịu (chịu hạn, chịu rét, chịu mặn, kháng bệnh...), người ta thiết lập thư viện cADN của đối tượng nghiên cứu ở điều kiện bình thường và điều kiện stress, hoặc bị nhiễm bệnh. Tiến hành microarray rồi so

sánh, đối chiếu kết quả ở các điều kiện khác nhau để tìm sự khác biệt. Kỹ thuật này cùng một lúc có thể phát hiện số lượng lớn sự khác biệt. Sơ đồ quy trình kỹ thuật microarray được thể hiện ở Hình 3.15.



Hình 3.15. Sơ đồ quy trình kỹ thuật microarray

Chương 4

CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN ĐỘNG VẬT

4.1. KHÁI NIỆM VỀ CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN ĐỘNG VẬT

Công nghệ di truyền động vật bao gồm các lĩnh vực chủ yếu như nuôi cấy tế bào động vật, sản xuất các chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh, nâng cao sức sản xuất, cấy chuyển phôi, chuyển gen vào động vật và đặc biệt gần đây là việc nhân bản dòng vô tính động vật (Animal cloning) và công nghệ tế bào gốc (Stem cell).

Công nghệ di truyền động vật có nhiều ứng dụng liên quan trực tiếp đến con người và được phát triển khá mạnh mẽ. Tuy nhiên, so với sự phát triển của Công nghệ sinh học khác, Công nghệ di truyền động vật có những đặc điểm đặc thù như:

– Kỹ thuật thực hiện phức tạp và khó thực hiện.

– Nhiều những phát minh, thành tựu về Công nghệ di truyền ở động vật có thể áp dụng cho con người nên đụng chạm đến vấn đề đạo đức xã hội.

– Có nhiều thành tựu đáp ứng nhu cầu phòng và chữa trị bệnh cho người.

– Nhiều ứng dụng trong chăn nuôi, tạo giống vật nuôi.

4.2. CÁC LĨNH VỰC VÀ KỸ THUẬT CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN ĐỘNG VẬT

4.2.1. Nuôi cấy tế bào động vật

Vấn đề nuôi cấy tế bào động vật invitro lần đầu tiên được triển khai vào năm 1907. Tuy nhiên phải hơn 40 năm sau mới thực sự được triển khai một cách có quy mô. Vào những năm đầu thập kỷ 50 thế kỷ XX, tế bào động vật có vú được nuôi với số lượng lớn để nuôi các chủng của virus gây bệnh bại liệt (Poliomyelite virus) dùng để chế vacxin phòng chống bại liệt. Tiếp theo đó là việc triển khai nuôi cấy tế bào người để nhân nuôi nhiều chủng virus khác nhằm sản xuất các kháng thể đặc hiệu và interferon. Sự phát triển của các phương pháp nuôi cấy tế bào động vật và người đã dẫn đến sự phát triển công nghệ vacxin và các chế phẩm miễn dịch.

Nhìn chung nuôi cấy tế bào động vật là lĩnh vực quan trọng có xu hướng phát triển mạnh của Công nghệ di truyền và được ứng dụng vào nhiều lĩnh vực như sản xuất vacxin virus, sản xuất các peptit, protein, hoocmon trị liệu, sản xuất kháng thể đơn dòng v.v...

4.2.1.1. Những khó khăn trong việc nuôi cấy tế bào động vật có vú

– Nuôi cấy tế bào động vật có vú và người gặp khó khăn hơn nuôi cấy tế bào vi sinh vật hoặc tế bào thực vật. Phần lớn các tế bào động vật đã được chuyên hóa cao. Do vậy, khi tách các tế bào chuyên hóa này nuôi cấy trong môi trường nhân tạo thì tế bào tăng lên về số lượng và khối lượng tế bào nhưng khó phát triển được thành một cơ thể

trưởng thành. Trong quá trình nuôi tế bào có thể tạo ra các mức bội thể khác nhau và tế bào không thể nuôi kéo dài mãi mà chúng bị chết theo chương trình đã được lập sẵn. Mật độ tế bào nuôi thường rất thấp (1 triệu tế bào/ml dung dịch sau nuôi cấy).

– Khó khăn thứ hai là tế bào động vật có vú có thời gian để tăng gấp đôi về số lượng rất dài (15-40 giờ) trong khi đó khả năng tăng gấp đôi của vi khuẩn chỉ là 1-2 giờ, thậm chí có loài vi khuẩn chỉ cần vài chục phút.

– Khó khăn thứ ba là tế bào động vật có vú thường rất nhạy cảm với môi trường nuôi cấy như nhiệt độ trong giới hạn hẹp (35-38°C), cần nhiều oxy và môi trường dinh dưỡng cũng như pH phải thích hợp.

Bên cạnh đó việc nuôi cấy tế bào động vật còn đòi hỏi kỹ thuật cao, điều kiện môi trường rất nghiêm ngặt, do vậy cần có kinh phí cao và kỹ thuật, thiết bị chính xác, đắt tiền.

4.2.1.2. Chuẩn bị tế bào để nuôi cấy

Nuôi cấy tế bào động vật có vú có nhiều công đoạn khác nhau. Công đoạn đầu tiên là chuẩn bị tế bào để đưa vào nuôi cấy.

Trước hết, các mảnh mô được tách ra khỏi cơ thể động vật trong điều kiện vô trùng. Tiếp theo, các mảnh mô này được xử lý với các enzym protease, thường dùng enzym tripsin để thu huyền phù tế bào. Sau khi loại bỏ tripsin, dịch huyền phù được chuyển vào loại bình nuôi cấy chuyên dụng bằng nhựa plastic hoặc thủy tinh. Bình nuôi có đáy phẳng, rộng, có chứa môi trường nuôi cấy dạng lỏng thích hợp cho từng loại mô. Tế bào phải trải qua pha log (từ thời điểm bắt đầu đến lúc có dấu hiệu phân chia tế bào đầu tiên), các tế bào sẽ tự gắn vào đáy bình nuôi và bắt đầu phân chia nguyên phân. Kiểu nuôi trực tiếp tế bào có nguồn gốc từ các mô đã phân hóa gọi là nuôi cấy sơ cấp. Việc nuôi cấy sơ cấp các tế bào bình thường chỉ tạo một lớp đơn do hiện tượng kìm hãm tiếp xúc kiểm soát quá trình phân bào của chúng. Nếu ta lấy một phần của lớp tế bào để tạo ra khoảng trống thì tế bào tiếp tục phân chia tới khi khoảng trống được lấp kín thì dừng lại. Nuôi các mô cơ, da, thận, phổi... của phôi sẽ thuận lợi hơn nuôi các tế bào của các mô của cơ thể trưởng thành. Các tế bào của quá trình nuôi sơ cấp sẽ được tách khỏi bình nuôi bằng cách xử lý với tripsin hoặc EDTA. Các tế bào này dùng làm nguyên liệu khởi đầu cho việc tạo ra dòng nuôi thứ cấp (secondary cultures). Chúng được "gieo" vào môi trường dinh dưỡng với mật độ cao. Các tế bào này được nhân lên với tốc độ ổn định qua nhiều lần cấy chuyển liên tiếp nhau. Kết quả thu được từng nhóm tế bào, được gọi là một chủng tế bào (cell strain). Các tế bào không tăng lên vô hạn mà chúng chỉ có khả năng phân chia một số lần nhất định cho đến khi khả năng phân chia giảm sút và cuối cùng bị chết. Ví dụ, các chủng tế bào người thường chỉ phân chia tối đa là 100 lần trước khi chết.

4.2.1.3. Các dòng tế bào liên tục (Continuous cell lines)

Không phải tất cả các dòng tế bào nuôi sơ cấp và tạo ra các dòng tế bào đều bị chết sau một số lần phân chia mà có một số tế bào biến đổi và chúng có thể tồn tại lâu dài. Ví dụ, khi nuôi tế bào chuột thì có phần lớn các tế bào bị chết sau khi phân chia 30-50 lần. Một số ít tế bào bị biến đổi và chúng có hình thái khác, tăng trưởng nhanh hơn và có khả năng tạo dòng tế bào riêng. Những tế bào ngoại lệ này có thể tồn tại lâu dài khác với các chủng tế bào khởi đầu của chúng và được gọi là các dòng tế bào (cell lines).

Trong quá trình cấy chuyển liên tục, các dòng tế bào chịu sự biến đổi sâu sắc. Sự thay đổi này dẫn đến hình thành các cụm tế bào thay cho lớp đơn và sự sắp xếp các cụm tế bào này không đều. Các dòng tế bào bị biến đổi này được gọi chung là mô ung thư và chúng có khả năng gây ung thư khi đem các tế bào này cấy vào các cơ thể động vật tương ứng ban đầu của chúng. Các tế bào ung thư này thường ở dạng lệch bội giống như trường hợp cơ thể bị nhiễm virus ung thư. Để giải quyết vấn đề này, chúng ta cần phải giữ tế bào nuôi cấy ở điều kiện đông lạnh trong nhiều năm, chỉ khi chúng ta cần thì sẽ nuôi cấy tế bào này sau khi đã thực hiện giải đông. Thực tế người ta tiến hành trộn các chất phụ gia (glyxerin, dimethylsulphoxit) để ngăn cản sự tác hại của các tinh thể băng khi đưa vào đông lạnh.

4.2.1.4. Các môi trường nuôi cấy tế bào

Tế bào động vật có vú đòi hỏi điều kiện môi trường nuôi cấy phức tạp, đủ các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự tăng trưởng, phân chia của tế bào khi chúng đã bị tách ra khỏi cơ thể của chúng.

– Môi trường nuôi cấy phải cần đạt những tiêu chuẩn sau:

+ Môi trường phải chứa đầy đủ các chất dinh dưỡng cho sự tồn tại và sinh sản của tế bào.

+ Phải duy trì pH môi trường (pH = 7,0 – 7,3) bằng các hệ đệm thích hợp cho từng loại mô của loài nghiên cứu.

+ Môi trường phải có các ion cần thiết và đảm bảo áp suất thẩm thấu chuẩn xác.

+ Môi trường phải có hợp chất cung cấp năng lượng như glucose.

+ Có chứa phenol red để chỉ thị pH.

– Có 2 loại môi trường là môi trường tự nhiên và môi trường tổng hợp:

+ Môi trường tự nhiên: Môi trường tự nhiên là các dung dịch chiết từ cơ thể động vật như: dịch huyết tương, dịch nước ối bào thai, dịch chiết phôi...

+ Môi trường tổng hợp: Môi trường nuôi cấy tế bào được tổng hợp từ các chất vô cơ và hữu cơ đơn giản. Có một số môi trường nuôi cấy tế bào thường dùng như sau:

Thành phần muối	Hàm lượng muối (mg/l)	
	Môi trường Hanks	Môi trường Earle
NaCl	8000	6800
KCl	400	400
$CaCl_2.2H_2O$	185	264
$MgSO_4.7H_2O$	200	200
$NaH_2PO_4.H_2O$	-	140
Na_2HPO_4	47.5	-
KH_2PO_4	60	-
$NaHCO_3$	350	1680
Glucose	1000	1000
Phenol red	17	17

Với môi trường muối cân bằng như trên, tế bào có thể tồn tại một số giờ nhưng chúng không phân chia. Muốn cho tế bào phân chia cần bổ sung vào môi trường các amino axit (Arginin, Cystein, Glutamin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenyl alanin, Treonin, Triptophan, Tyrosin, Valin). Bổ sung các vitamin cần thiết (Cholin chlorit, axit floric, inositol, nicotinic axit, pyridoxin, riboflavin, thiamin) và chất đệm như bicarbonat natri.

Ngoài ra để chống hiện tượng nhiễm khuẩn, nhiễm nấm, người ta bổ sung kháng sinh như penicilline để kháng khuẩn và nystatine để kháng nấm, và một số loại kháng sinh khác như tetracyciline, kanamycine, gentamycine... để kháng các loại khuẩn mycoplasma. Cần bổ sung thêm 5-10% huyết thanh vì trong huyết thanh còn chứa những thành phần như globulin miễn dịch, hoocmon sinh trưởng..., đó là các chất rất cần thiết cho sự phân chia tế bào.

Tất cả các dụng cụ nuôi phải sạch khuẩn, có tính trung tính. Nước cất sử dụng để pha chế phải tinh khiết, không có các ion lạ.

4.2.1.5. Các cách nuôi cấy

a) Nuôi cấy quy mô nhỏ

Nuôi cấy với quy mô nhỏ là hình thức nuôi cấy các tế bào khởi nguyên cũng như các chủng tế bào trong các đĩa petri, hoặc bình Roux có đáy rộng và bằng phẳng. Có thể dùng các loại bình chuyên dụng khác như bình chữ T, bình hình trụ có diện tích đáy từ 25 đến 175cm^2. Bình thường dùng là bình chữ T 75cm^2 chứa 15-20ml môi trường và gieo được 10^6 tế bào khởi nguyên và đưa vào tủ ấm 37°C. Sau 2-3 ngày ta được một lớp tế bào đơn. Từ lớp tế bào đơn, tiếp tục cấy chuyển để thành các chủng tế bào.

b) Nuôi cấy tế bào quy mô lớn

Nuôi cấy tế bào ở quy mô công nghiệp thường dùng thiết bị bioreactor cho hiệu quả cao. Tuy nhiên khi nuôi cấy quy mô lớn, chúng ta cần chú ý một số vấn đề như:

– Khả năng cung cấp huyết thanh (huyết thanh bò) với giá thành cao và rất dễ nhiễm virus.

– Trong quá trình nuôi dễ bị nhiễm khuẩn từ dụng cụ, từ không khí và từ các chất để pha môi trường.

Nuôi cấy tế bào động vật có nhiều ứng dụng trong thực tiễn như sản xuất vacxin, các hoocmon, các kháng thể đơn dòng, sản xuất protein tái tổ hợp, sản xuất virus diệt côn trùng thông qua tế bào nuôi cấy.

4.2.2. Tổng hợp peptit - hoocmon có bản chất peptit và ứng dụng

4.2.2.1. Đại cương về peptit

Peptit là các phân tử sinh học được cấu trúc từ một vài cho đến hàng chục amino axit. Tuy nhiên, người ta vẫn gọi những phân tử sinh học chứa một lượng không lớn các amino axit vẫn là peptit. Peptit được tạo thành do các amino axit liên kết với nhau bằng liên kết peptit. Liên kết peptit là liên kết giữa đầu –COOH của amino axit này với đầu $-NH_2$ của amino axit kế tiếp bằng việc loại đi một phân tử nước để tạo thành liên kết: – CO – NH –

Khi một số amino axit liên kết với nhau thông qua liên kết peptit thì tạo ra oligopeptit. Khi có nhiều amino axit nối với nhau thì tạo ra chuỗi polypeptit. Một phân tử protein có thể có một, hai hay nhiều chuỗi polypeptit. Trong phân tử protein ngoài liên kết peptit như đã nêu trên, các amino axit còn liên kết với nhau bằng liên kết disulfid. Liên kết disulfid có vai trò quan trọng trong việc tạo cấu hình không gian cho một số loại protein, đặc biệt là các protein có những chức năng sinh học quan trọng như các hoocmon, các kháng thể và một số protein khác.

Peptit có tính chất lý hóa không khác nhiều so với amino axit vì đều chứa nhóm $-NH_2$ và nhóm –COOH tự do. Sự sai khác chủ yếu là do mạch bên R của gốc amino axit tham gia trong chuỗi peptit. Chính sự khác nhau giữa các mạch bên R, khác về số lượng và loại amino axit trong peptit làm cho điểm đẳng điện, khối lượng khác nhau. Về mặt hóa học, peptit tham gia các phản ứng đặc trưng cho 2 nhóm $-NH_2$ và –COOH. Liên kết peptit có thể bị bẻ gãy hoàn toàn trong môi trường HCl 6N, ở nhiệt độ 110°C, trong 24 giờ hoặc ở trong dung dịch kiềm. Trong điều kiện này, các amino axit được tách ra ở dạng tự do. Đây là công đoạn không thể thiếu được trong phương pháp phân tích định lượng amino axit. Để xác định trình tự các amino axit, người ta cần gắn hóa chất đánh dấu vào các đầu N và C của amino axit. Thông thường, người ta gắn chất dabsylchlorid vào đầu N của peptit. Sau đó tiến hành thủy phân bằng HCl 6N ở 110°C trong 24 giờ và tiến hành tách được riêng từng loại amino axit lần lượt theo thứ tự. Kết quả thu được amino axit tự do tách ra và có chứa chất đánh dấu đã được gắn vào đầu N của nó (Hình 4.1).

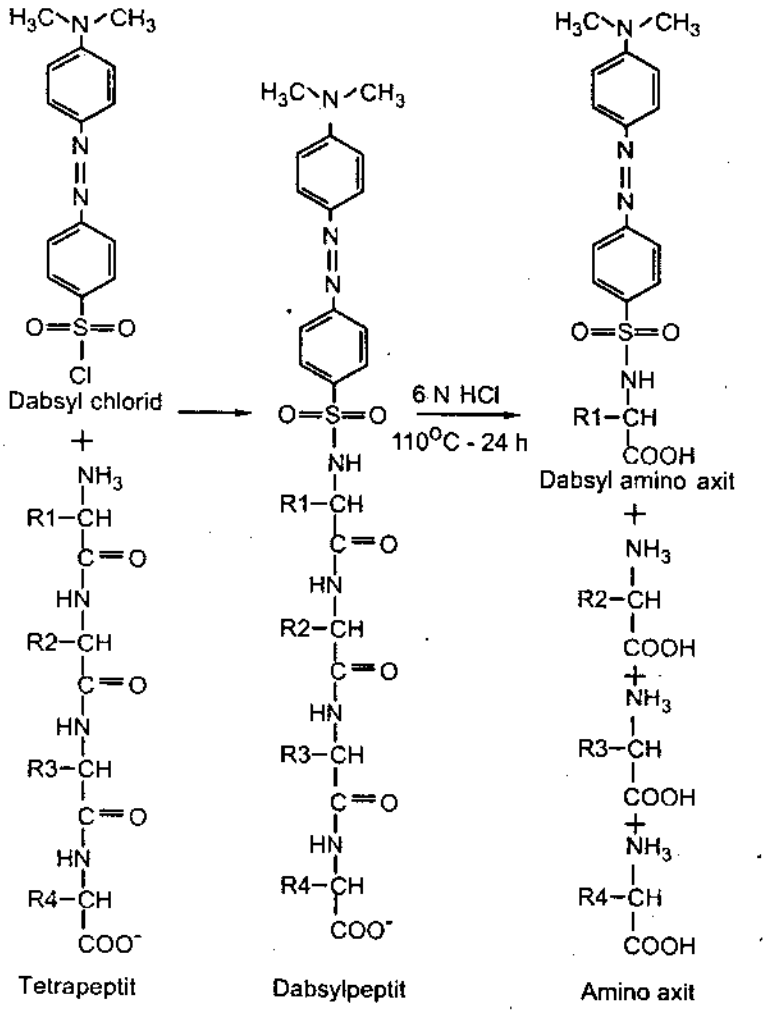
Các liên kết peptit còn bị cắt bởi các enzym protease. Enzym protease có mặt ở các tế bào và mô làm nhiệm vụ phân giải các phân tử protein.

Nhiều peptit có hoạt tính sinh học đặc biệt đang được sử dụng rộng rãi trong thực tiễn y học. Có nhiều loại peptit có hoạt tính sinh học. Peptit - hoocmon tham gia vào quá trình trao đổi chất, vận chuyển thông tin hóa học giữa các tế bào mô và các cơ quan.

Insulin là peptit-hoocmon điển hình, là phân tử khá lớn, có 51 amino axit tạo thành 2 chuỗi polypeptit và 2 chuỗi polypeptit nối với nhau bằng cầu disulfid (-S-S-). Glucagon là một peptit-hoocmon bao gồm 29 amino axit được tổng hợp từ tuyến tụy, có tác động ngược với insulin.

Corticotropin là peptit-hoocmon bao gồm 39 amino axit, được tạo ra từ phần trước của tuyến yên, có vai trò kích thích hoạt động của vỏ tuyến thượng thận.

Ngoài ra, còn có nhiều loại peptit mạch ngắn, có phổ hoạt động rộng. Ví dụ, loại peptit tổng hợp hóa học L. Aspatyl phenylalanin methylester là chất ngọt hơn đường tới hàng trăm lần hiện đang được dùng rộng rãi trong công nghiệp và chế biến thực phẩm để thay thế đường. Peptit mạch ngắn tự nhiên bao gồm 9 amino axit do vùng não dưới đồi tiết ra và dự trữ ở thùy sau tuyến yên, có khả năng kích thích dạ con co bóp, hoặc peptit ngắn bradykinin gồm 9 amino axit có tác dụng ức chế hiện tượng sưng tấy các mô. Một peptit mạch ngắn khác là enkephalin được tạo ra ở não bộ lại là chất có tác dụng giảm đau. Bên cạnh đó còn nhiều loại peptit-hoocmon khác có những tác dụng khác nhau đối với hoạt động sống của cơ thể.



Hình 4.1. Xác định amino axit bằng cách gắn hóa chất đánh dấu vào đầu N

4.2.2.2. Tổng hợp peptit

Trong thực tiễn hiện nay, nhu cầu đòi hỏi với số lượng lớn các loại peptit, nhất là các peptit mạch ngắn, nhỏ nhưng lại có hoạt tính sinh học. Tuy nhiên trong tự nhiên những loại peptit này tồn tại với lượng rất nhỏ. Do vậy, công nghệ tổng hợp peptit-hoocmon trở thành công nghệ phát triển mạnh, đặc biệt là công nghệ di truyền tổng hợp peptit. Trong thực tế có 3 phương pháp tạo peptit:

a) Tách chiết và tinh sạch các peptit tự nhiên từ các mô, tế bào

Phương pháp này khó thực hiện vì lượng peptit có trong mô, tế bào rất nhỏ, đồng thời rất khó tách chiết và tinh sạch.

b) Tổng hợp peptit bằng phương pháp hóa học

Tổng hợp peptit bằng con đường hóa học là phổ biến hơn cả. Phương pháp này đòi hỏi peptit tổng hợp được phải có hoạt tính sinh học. Do vậy phải tạo ra peptit có trình tự các amino axit đặc thù riêng đối với từng loại peptit. Đây là phương pháp khá phức tạp, có nhiều công đoạn khác nhau. Thông thường trước khi ghép nối tạo ra liên kết

của 2 amino axit, ta phải khóa được đầu $-NH_2$ của amino axit thứ nhất và khóa đuôi –COOH của amino axit thứ hai, thực hiện liên kết peptit giữa 2 đầu còn lại của 2 amino axit. Tiếp tục tiến hành với các thao tác tương tự đối với đoạn có 2 amino axit vừa được tạo thành với amino axit thứ ba v.v... Do sự phức tạp như vậy nên hiệu suất tổng hợp mạch peptit rất thấp, tốn rất nhiều thời gian.

Vào năm 1960, các nhà sinh hóa học Mỹ đã đề ra phương pháp tổng hợp peptit trên pha rắn. Người ta sử dụng hạt nhựa serin làm chỗ bám của một đầu mạch peptit còn đầu kia để tự do hoạt động. Mỗi một cột chứa nhựa serin thực hiện việc ghép nối lần lượt các amino axit theo thứ tự cần thiết. Phương pháp tổng hợp peptit trên pha rắn đã nâng cao hiệu suất tổng hợp lên nhiều lần.

c) Tổng hợp peptit bằng công nghệ di truyền

Tổng hợp peptit bằng công nghệ di truyền trên cơ sở sử dụng các đoạn oligo nucleotit mã hóa cho các peptit được thiết kế theo một trình tự nhất định, rồi gắn vào vector chuyển gen để tạo ADN tái tổ hợp. Bước tiếp theo là biến nạp ADN tái tổ hợp vào tế bào chủ nhận và cho gen biểu hiện để tạo ra sản phẩm.

Ở Việt Nam đã có những công trình nghiên cứu về việc tạo ra peptit có hoạt tính sinh học. Năm 2000, các nhà khoa học Viện Công nghệ sinh học thuộc Trung tâm Công nghệ Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia đã thiết kế 2 đoạn oligonucleotit gồm 52 nucleotit dựa theo trình tự peptit kháng khuẩn đã được tổng hợp bằng phương pháp hóa học và 1 loại peptit tachypleusin trong máu sam biển. Sử dụng 2 enzym giới hạn *E.co*RI và *Hin*III xử lý vector chuyển gen $pMALC_2$ và hai đoạn oligonucleotit đã thiết kế để tạo đầu dính. Sau khi vector $pMALC_2$ đã gắn đoạn oligonucleotit đã được biến nạp vào vi khuẩn *E.coli* BL21. Tế bào vi khuẩn đã biến nạp được nuôi cấy trên môi trường LB chứa kháng sinh ampicilline, sau đó thu nhận tế bào và tách chiết, tinh sạch protein vi khuẩn. Kết quả cho thấy phân đoạn thứ 4 của peptit có khả năng ức chế phát triển của vi khuẩn là rất rõ.

Công nghệ di truyền chủ yếu áp dụng cho việc tạo ra các peptit-hoocmon và các hoocmon ứng dụng vào thực tiễn y học.

4.2.2.3. Các peptit-hoocmon

a) Khái niệm chung về hoocmon

Hoocmon là các chất được tổng hợp với liều lượng rất nhỏ nhưng có hoạt tính sinh học cao và mang tính đặc hiệu. Trong cơ thể, các hoocmon được tổng hợp và đổ trực tiếp vào máu, nhưng mỗi loại hoocmon chỉ có tác dụng đặc hiệu với một cơ quan, một chức năng hay một quá trình sinh học nhất định của cơ thể. Ví dụ, hoocmon kích thích noãn hoàng có tác dụng kích thích quá trình phát triển và chín noãn bào; Hoocmon LH kích thích rụng trứng; Hoocmon parahoocmon của tuyến cận giáp tác dụng lên quá trình trao đổi phospho và canxi; Hoocmon hGH có tác dụng điều hòa quá trình sinh trưởng.

Trong cơ thể, một số hoocmon được tạo ra ở dạng đã hoàn chỉnh. Tuy nhiên, một số hoocmon lại được hình thành qua nhiều giai đoạn. Ví dụ preproinsulin → proinsulin → insulin.

Các hoocmon có tính chất đa dạng về cấu trúc hóa học, nơi phát sinh và bản chất. Dựa vào bản chất của hoocmon, người ta chia hoocmon ra làm hai nhóm:

– Các hoocmon có bản chất là lipit còn được gọi là các steroid như cortison được tiết từ tuyến trên thận, testosteron được tiết ra từ tinh hoàn và oestrogen được tiết từ buồng trứng.

– Các hoocmon có bản chất là protein. Trong nhóm này đa dạng về cấu trúc và nơi phát sinh như:

+ Các hoocmon là các chuỗi peptit ngắn như oxytocin được tiết ra từ tế bào thần kinh của tuyến hypothalamus, sau đó được tích tụ ở thùy sau tuyến yên, hoocmon này chỉ là những peptit ngắn khoảng 9 amino axit.

+ Các hoocmon có cấu trúc gồm nhiều chuỗi polypeptit dài như insulin tiết ra từ tuyến tụy gồm 2 loại chuỗi: 1 chuỗi có 21 amino axit và 1 chuỗi gồm 30 amino axit.

+ Hoocmon sinh trưởng có khối lượng phân tử lớn và thay đổi tùy loài động vật.

Hầu hết các hoocmon không mang tính đặc trưng cho loài, có nghĩa là hoocmon của loài động vật này cũng có thể gây tác dụng với loài động vật khác, kể cả đối với người. Ví dụ, hoocmon insulin tiết ra từ tuyến tụy có thể dùng chung cho một số loài động vật.

b) Cơ chế tác động của hoocmon

Về cơ chế tác động của hoocmon đối với các quá trình sinh học trong cơ thể động vật còn tiếp tục được nghiên cứu. Nhìn chung các hoocmon được tiết ra từ các tuyến nội tiết theo máu và tác dụng lên các tế bào đích. Ở tế bào đích xảy ra 3 giai đoạn kế tiếp nhau:

– Hoocmon được nhận biết bởi một thụ thể (receptor) đặc hiệu trên màng tế bào đích.

– Phức hợp hoocmon – thụ thể hình thành tín hiệu.

– Tín hiệu (chất truyền tín hiệu thứ 2) tác động làm biến đổi nội bào như thay đổi nồng độ các enzym, thay đổi tính thấm của màng để tăng cường hấp thụ hay đào thải các chất, gây tiết các hoocmon ở các tuyến đích, gây hiện tượng co hoặc giãn cơ cũng như tăng cường tổng hợp protein.

Hiện nay có 2 mô hình về cơ chế tác động của hoocmon được nhiều người thừa nhận là:

1) Các hoocmon tác động thông qua chất truyền tín hiệu thứ hai

Những hoocmon tác động theo cơ chế này là các hoocmon có bản chất protein, peptit hay là nhóm amino axit. Theo cơ chế này, hoocmon khi được tiết ra có vai trò như chất truyền tín hiệu thứ nhất theo máu mang thông tin đến tế bào. Khi tiếp xúc với màng tế bào, hoocmon được gắn với thụ thể đặc hiệu trên màng. Phức hợp hoocmon-thụ thể vừa mới hình thành kết hợp với phân tử G-protein trên màng tế bào sẽ phản ứng với 3 hệ thống đáp ứng khác nhau của màng là:

* Hệ thống adenylcylase - AMP vòng (AMPv): G-protein là chất trung gian và được gọi là G-protein vì nó có khả năng kết hợp với guanyl nucleotit ở dạng GDP hay GTP. Chỉ có phức hợp G-protein-GTP mới có tác dụng hoạt hóa enzym adenylcylase có ở trên

màng sinh chất. Enzym adenylcylase sau khi được hoạt hóa sẽ xúc tác cho quá trình biến đổi từ ATP thành AMPv với sự tham gia của ionMg^{2+}. AMPv là chất truyền tín hiệu thứ hai, nó kích thích enzym protein kinase từ trạng thái không hoạt động thành dạng hoạt động. Enzym protein kinase dạng hoạt động sẽ hoạt hóa một loạt enzym trong các con đường chuyển hóa nội bào. Kết quả sẽ làm biến đổi sự chuyển hóa vật chất, tăng cường hoạt động trong tế bào.

* Hệ thống calcium-calmodulin: Khi hoocmon kết hợp với thụ thể trên màng thông qua G-protein đặc hiệu làm hoạt hóa kênh ion Ca^{2+} làm cho Ca^{2+} từ ngoại bào chuyển vào nội bào. Trong nội bào, Ca^{2+} kết hợp với calmodulin. Phức hợp Ca-calmodulin sẽ làm thay đổi khả năng hoạt động các enzym.

* Hệ thống phospholipase-phospholipit: Phức hợp hoocmon-thụ thể mới hình thành thông qua G-protein đặc hiệu hoạt hóa enzym phospholipase có trên màng tế bào. Enzym này sẽ phân giải một dạng phospholipit là phosphatidylinositol tạo thành diacylglycerol và inositoltriphosphat.

• Diacylglycerol là chất hoạt hóa protein kinase C. Protein kinase C đã được hoạt hóa đến lượt mình lại hoạt hóa hoặc ức chế các enzym khác trong hệ thống enzym nội bào.

• Inositoltriphosphate có tác dụng huy động ion Ca^{2+} trong mạng lưới nội chất.

Tất cả các quá trình trên làm thay đổi quá trình chuyển hóa các chất trong tế bào.

Hiện nay, người ta phát hiện được trên 10 hoocmon tác động theo cơ chế thông qua G- protein trên màng theo 3 hệ thống đáp ứng của màng.

2) Các hoocmon tác động thông qua sự hoạt hóa các gen

Ngược lại với cơ chế tác động của các hoocmon nói trên, các hoocmon cơ bản, như là steroid, thyroid, vitamin D... sau khi đi qua màng tế bào vào trong nội bào, rồi vào trong nhân, các hoocmon này sẽ tác động lên vùng nhận biết (thụ thể). Phức hợp hoocmon – thụ thể tương tác với gen đích, thúc đẩy hoặc kìm hãm quá trình phiên mã, dịch mã để tổng hợp protein tương ứng.

c) Tổng hợp peptit-hoocmon bằng công nghệ di truyền

Các peptit-hoocmon được tổng hợp trong cơ thể động vật. Với sự phát triển của công nghệ gen, người ta có thể tự tổng hợp được nhiều loại hoocmon có hoạt tính sinh học tương tự hoocmon tự nhiên.

– Sản xuất insulin:

+ Insulin là hoocmon điều chỉnh quá trình đồng hóa đường trong cơ thể người. Sự thiếu hụt hoocmon này sẽ phát sinh bệnh tiểu đường. Insulin dùng để chữa bệnh cho người mắc bệnh tiểu đường.

Năm 1955, người ta đã xác định được trình tự các amino axit của insulin. Phân tử insulin gồm 2 chuỗi polypeptit: Chuỗi A gồm 21 amino axit và chuỗi B gồm 30 amino axit.

Phân tử pre-proinsulin gồm hai chuỗi polypeptit nối với nhau bằng 3 cầu liên kết disulfid. Sau khi cắt bỏ đoạn peptit tín hiệu gồm 24 amino axit của phân tử preproinsulin sẽ tạo thành phân tử proinsulin. Phân tử proinsulin lại cắt bỏ 35 amino axit ở đoạn giữa (đoạn C) và hình thành liên kết disulfur giữa 2 chuỗi A và B để tạo thành phân tử insulin hoàn chỉnh.

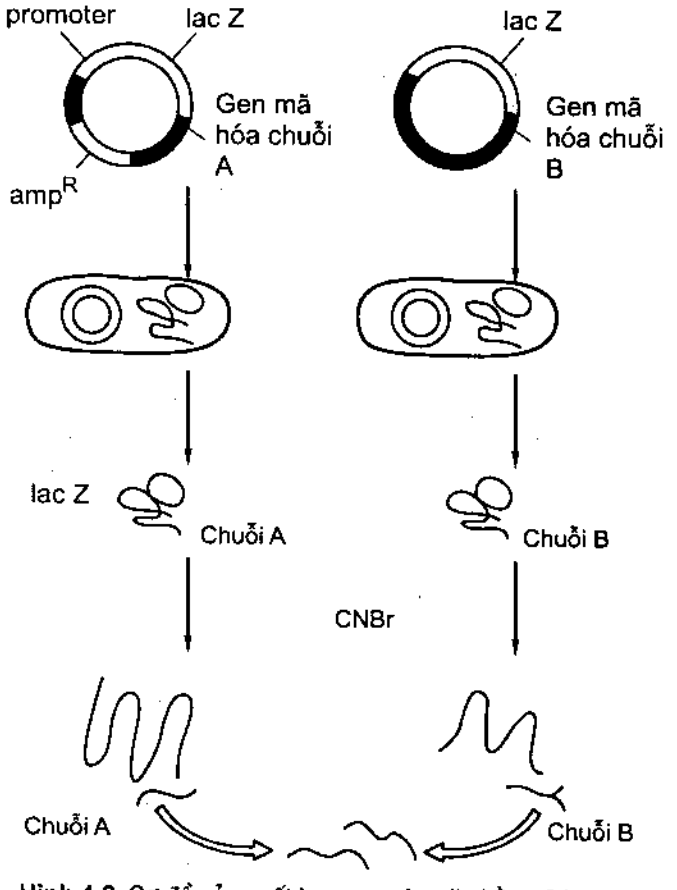
+ Năm 1978, lần đầu tiên insulin được tổng hợp bằng công nghệ di truyền nhờ vi khuẩn *E.coli*. Sản phẩm insulin sản xuất bằng công nghệ di truyền có giá trị trong việc chữa bệnh tiểu đường cho người và được bán trên thị trường.

Quá trình sản xuất insulin nhân tạo có thể tóm tắt như sau:

* Đầu tiên người ta tổng hợp nhân tạo 2 đoạn ADN mã hóa cho 2 chuỗi polypeptit A và chuỗi polypeptit B.

* Gắn mỗi đoạn ADN trên vào plasmid pBR322 ở đoạn cuối của gen lacZ.

* Mỗi vector tái tổ hợp được biến nạp vào một dòng vi khuẩn *E.coli*. Trong một dòng vi khuẩn *E.coli* tổng hợp nên chuỗi polypeptit β-gal – chuỗi A, một dòng *E.coli* khác tổng hợp chuỗi polypeptit β-gal – chuỗi B. Tách riêng 2 chuỗi polypeptit A và chuỗi polypeptit B bằng kỹ thuật đặc trưng. Kết hợp hai chuỗi polypeptit A và B trong phản ứng thích hợp để tạo các liên kết disulfur, tạo nên phân tử insulin có khả năng chữa bệnh tiểu đường. (Hình 4.2.).



Hình 4.2. Sơ đồ sản xuất hoocmon insulin bằng Công nghệ di truyền

Sản xuất hoocmon sinh trưởng người:

Hoocmon sinh trưởng người (hGH) trong cơ thể được tổng hợp ở tuyến yên. Hoocmon sinh trưởng người gồm có 191 amino axit có tác dụng làm cho trẻ em phát triển bình thường. Sự thiếu hụt hoocmon này làm trẻ em phát triển còi cọc, nếu điều trị bằng insulin chiết từ não người chết thì rất tốn kém và dễ bị lây nhiễm bệnh.

+ Quá trình sản xuất hoocmon sinh trưởng người bằng công nghệ di truyền có thể tóm tắt như sau:

* Tách chiết mARN của gen hGH từ các tế bào tuyến yên đang hoạt động.

* Tổng hợp phân tử ADN bổ sung (cADN) nhờ có enzym phiên mã ngược và các enzym ADN-polymerase.

* Sử dụng hai loại enzym giới hạn *E.co*RI và *Hin*III cắt cADN và loại bỏ đoạn ADN điều khiển peptit tín hiệu.

* Tạo đoạn ADN mới mã hóa 24 amino axit và gắn đoạn ADN này vào cADN để tạo ra gen mã hóa hGH.

* Tạo ra plasmid tái tổ hợp bằng cách gắn gen mã hóa hGH với plasmid pBR322.

* Biến nạp plasmid tái tổ hợp trên vào vi khuẩn *E.coli*. Nuôi cấy *E.coli* sau khi được biến nạp để tạo thành sinh khối rồi tách chiết, tinh sạch hGH để tạo sản phẩm hoocmon sinh trưởng người.

– Sản xuất hoocmon somatostatin bằng công nghệ di truyền:

Somatostatin là peptit-hoocmon ngắn gồm có 14 amino axit, được tổng hợp từ vùng dưới đồi của não, có tác dụng ức chế sự giải phóng hGH, ức chế tổng hợp insulin, ức chế tiết axit ở dạ dày, có tác dụng hạ thân nhiệt... Có thể sản xuất somatostatin bằng công nghệ di truyền theo các bước chủ yếu sau:

+ Tổng hợp hóa học đoạn mạch đơn ADN gồm có 51 nucleotit có trình tự là TAC – 42 nucleotit (mã hóa somatostatin) – ACTATC.

+ Phiên mã để tạo mARN tương ứng có trình tự bổ sung tương ứng là: AUG – 42 ribonucleotit – UGAUAG.

+ Tổng hợp ADN bổ sung (cADN) tương ứng bằng phản ứng phiên mã-ngược nhờ enzym phiên mã ngược và ADN polymerase.

+ Biến đổi plasmid pBR322 để có promotor Lac và một phần của gen *lacZ*. Trong đó gen *lacZ* có phần mã hóa enzym β-galactosidase.

+ Gắn kết cADN với vector plasmid pBR322 đã bị biến đổi để tạo vector tái tổ hợp.

+ Biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào chủ *E.coli*.

+ Gen tổng hợp somatostatin được biểu hiện trong sinh khối tế bào chủ.

+ Tách chiết, tinh chế và xử lý để thu somatostatin. Somatostatin ngoài tác dụng như trên, nó còn có tác dụng đến hoạt động của hệ thần kinh, gây vô cảm. Nếu với số lượng lớn quá mức cần thiết, somatostatin còn gây động kinh, chậm lớn. Do vậy, người ta đã cố gắng gây miễn dịch chống lại somatostatin nhằm làm tăng mức độ sinh trưởng của vật nuôi và ngay cả ở con người.

4.2.3. Công nghệ sản xuất kháng thể đơn dòng và ứng dụng

4.2.3.1. Đại cương về kháng thể và kháng thể đơn dòng

– Kháng thể là các protein được tổng hợp trong cơ thể người và động vật có xương sống, có khả năng tạo ra phức hệ đặc hiệu với các kháng nguyên đã kích thích sinh

ra nó. Kháng thể theo khái niệm trên đây được gọi là kháng thể miễn dịch (immunoglobulin - Ig). Ngoài kháng thể miễn dịch, trong cơ thể còn có sẵn kháng thể tự nhiên không qua con đường miễn dịch. Về cơ bản, kháng thể miễn dịch là phân tử protein có cấu trúc gồm 2 chuỗi polypeptit nặng (H) và 2 chuỗi polypeptit nhẹ (L) gắn với nhau bằng các cấu trúc disulfur có dạng hình chữ Y.

– Khi phân tử kháng nguyên lạ đưa vào cơ thể, sẽ kích thích tế bào sản xuất ra nhiều phân tử kháng thể khác nhau, nên kháng thể tạo ra là kháng thể đa dòng. Chính vì tính đặc hiệu của kháng thể không cao và hiệu quả sử dụng những kháng thể này trong chẩn đoán, điều trị bệnh sẽ thấp. Công nghệ tạo kháng thể đơn dòng đặc hiệu được G. Milstein và C. Koehler nghiên cứu sản xuất kháng thể đơn dòng vào năm 1975.

Kháng thể đơn dòng là kháng thể được sản xuất bởi một dòng tế bào lympho B. Kháng thể đơn dòng mang tính đặc hiệu và có tính chất đồng nhất về cấu trúc và tính chất. Trong công nghệ sản xuất, kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi các dòng tế bào lai giữa tế bào ung thư myolema với tế bào lympho của hệ miễn dịch ở người hoặc động vật.

4.2.3.2. Sản xuất kháng thể đơn dòng

G. Milstein và C. Koehler đã sử dụng thể lai giữa một dòng tế bào lympho B của động vật mang gen kháng thể đặc hiệu chống lại kháng nguyên lai với tế bào dòng mylolema (tế bào bạch cầu ung thư) có khả năng sinh sản vô hạn.

Kỹ thuật lai (dung hợp) giữa tế bào lympho B từ tuyến tụy của chuột và tế bào dòng myolema được tiến hành nhờ tác dụng của chất polyethylene glycol (PEG). Sử dụng môi trường chọn lọc hypoxanthine-aminopterin-thymine (HAT) để chọn lọc tế bào lai. Những tế bào không lai không có khả năng sinh trưởng trong môi trường HAT vì chúng không có khả năng tổng hợp enzym chuyên hóa nucleic axit HPRTase.

Sản xuất kháng thể đơn dòng gồm 2 công đoạn chính:

a) Gây miễn dịch

Hiệu quả sản xuất kháng thể đơn dòng phụ thuộc rất nhiều vào bước chuẩn bị kháng nguyên, tạo kháng nguyên, chọn động vật để gây miễn dịch và quá trình tạo kháng thể. Quá trình tạo kháng thể của tế bào lympho B còn phụ thuộc vào hoạt động kích thích của tế bào lympho T.

Những phân tử kháng nguyên có khối lượng phân tử nhỏ hơn 1000 thì không đủ kích thích tế bào lympho B và lympho T hoạt động. Đối với các kháng thể có phân tử nhỏ, người ta phải ghép chúng vào các phân tử lớn như albumin huyết thanh bò (bovin serum albumin - BSA) làm tăng khả năng nhận biết của tế bào lympho B.

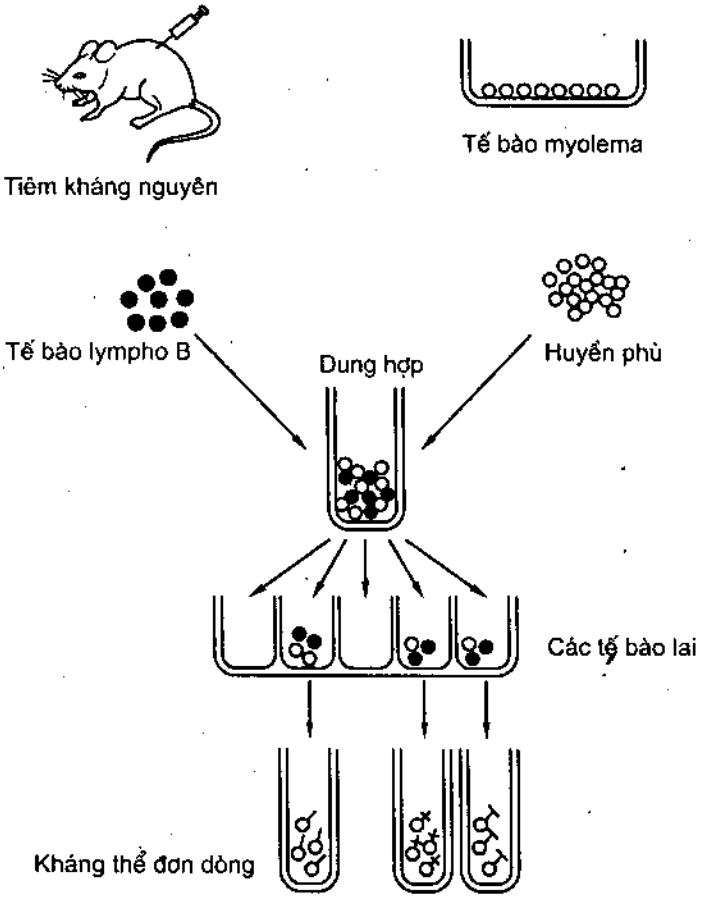
Khả năng đáp ứng miễn dịch tốt khi kháng nguyên có nguồn gốc khác loài với động vật chủ gây miễn dịch. Sự khác biệt di truyền giữa hai loài càng lớn thì khả năng đáp ứng miễn dịch càng cao. Ví dụ, nếu sử dụng kháng nguyên từ người thì động vật gây miễn dịch thường dùng là chuột nhắt hoặc chuột cống. Tuy nhiên, khả năng đáp ứng miễn dịch nhiều khi không đồng nhất. Chẳng hạn, kháng nguyên từ chuột cống gây miễn dịch thành công ở chuột nhắt trắng, nhưng ngược lại, kháng nguyên từ chuột nhắt trắng lại không tạo được sự đáp ứng miễn dịch tốt ở chuột cống.

Phương thức gây miễn dịch phụ thuộc vào bản chất của kháng nguyên. Đa số kháng nguyên được tiêm vào phúc mạc, tiêm bắp, hoặc tiêm dưới da cho động vật nhận.

b) Dung hợp tế bào

Máu của động vật sau khi đã được gây miễn dịch cần tiến hành ly tâm để thu các phân đoạn khác nhau. Trong đó có phân đoạn có nồng độ tế bào lympho B cao. Các tế bào myolema cũng cần duy trì ở giai đoạn sinh trưởng mạnh (logarit).

Có nhiều phương pháp dung hợp tế bào khác nhau, tuy nhiên người ta thường dùng polyethylene glycol (PEG). Hỗn hợp tế bào lympho B được tách từ tuyến tụy của động vật đã được gây miễn dịch trộn với tế bào myolema có nồng độ cao được nuôi trong môi trường nuôi có nồng độ PEG thích hợp. Quy trình sản xuất kháng thể đơn dòng được trình bày ở sơ đồ Hình 4.3 gồm các bước sau:



Hình 4.3. Sơ đồ quy trình sản xuất kháng thể đơn dòng

– Tạo tế bào sinh kháng thể lympho B:

Tiêm kháng nguyên vào chuột để gây phản ứng miễn dịch. Tụy của chuột đã gây miễn dịch được cắt nhỏ rồi nghiền thành dịch. Ly tâm loại bỏ huyết thanh, dịch mô, thu phân đoạn có nồng độ tế bào lympho cao, có khả năng kháng HAT.

Tế bào myolema tủy xương tách từ bình nuôi cấy lớp đơn bằng tripsin. Rửa, ly tâm hai lần, giữ trong môi trường nuôi, kiểm tra mức sống của tế bào phải đạt hiệu quả sống sót trên 95%.

– Trộn tế bào lympho B tuyến tụy với tế bào myolema với tỷ lệ 5:1 hoặc 10:1. Bổ sung PEG vào dịch huyền phù chứa hỗn hợp hai loại tế bào trên để dung hợp tế bào.

– Nuôi cấy và chọn lọc các tế bào lai:

Nuôi cấy hỗn hợp tế bào trong môi trường chứa HAT. Tế bào tụy chuột bình thường không phải tế bào lai sẽ bị chết trong môi trường chứa HAT sau 1-2 tuần. Các tế bào lai phát triển bình thường mang cả 2 đặc tính: có khả năng phân chia vô hạn và kháng được HAT.

– Tách các dòng tế bào lai:

Nuôi cấy riêng rẽ từng tế bào lai, chọn lọc tế bào có khả năng sinh kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên đưa vào chuột ban đầu. Nhân dòng tế bào để sản xuất kháng thể đơn dòng. Có thể giữ dòng tế bào này lâu dài bằng cách thêm DMSO 10% (dimethylsulfooxide) rồi giữ trong nitơ lỏng, khi cần thiết sẽ giải đông và nuôi để tạo kháng thể đơn dòng.

c) Kiểm tra khả năng tạo kháng thể của tế bào lai

Không phải tất cả các tế bào lai đều cho hiệu quả sản xuất kháng thể cao. Mặt khác kháng thể đơn dòng sản xuất ra phải mang tính đặc hiệu cao. Tính đặc hiệu của kháng thể thể hiện ở khả năng phản ứng gắn kết đặc hiệu với một loại kháng nguyên cụ thể.

Hiện nay, người ta thường dùng phương pháp kiểm tra, đánh giá kháng thể dựa vào một số kỹ thuật chính như kỹ thuật RIA, RIMA, ELISA...

– Kỹ thuật miễn dịch phóng xạ (Radio immuno assay - RIA) dựa trên sự cạnh tranh giữa kháng nguyên được đánh dấu đồng vị phóng xạ (I^{125}) với kháng nguyên không đánh dấu phóng xạ cùng gắn vào một loại kháng thể đặc hiệu. Ta có thể hình dung kỹ thuật này như sau:

+ Lô A (đối chứng): Lấy một lượng nhất định kháng nguyên tinh khiết đã được đánh dấu phóng xạ. Kháng nguyên này phải cùng loại với kháng nguyên trong mẫu thử nghiệm ban đầu. Trộn chung kháng nguyên đánh dấu ở trên với một lượng kháng thể đặc hiệu rồi ủ để gây phản ứng gắn kết. Rửa bỏ kháng nguyên đánh dấu tự do không gắn với kháng thể. Đo độ phóng xạ của phức hệ kháng nguyên – kháng thể (độ phóng xạ A).

+ Lô B (kiểm nghiệm): Ngoài lượng kháng nguyên đánh dấu và kháng thể như lô A còn trộn thêm loại kháng nguyên cần thử không được đánh dấu phóng xạ để kháng nguyên này cùng gắn vào kháng thể. Đo độ phóng xạ của phức hệ kháng nguyên – kháng thể (độ phóng xạ B).

+ Dựa vào tỷ lệ đo độ phóng xạ của 2 lô A/B để xác định nồng độ kháng nguyên trong mẫu thử so với đường cong chuẩn.

– Kỹ thuật miễn dịch phóng xạ định lượng (Radio immunometric assay - RIMA):

Kỹ thuật RIMA sử dụng khả năng tạo ra hiện tượng các kháng thể đơn dòng gắn được với các vị trí độc lập trên một phân tử kháng nguyên lớn. Để thực hiện kỹ thuật RIMA cần phải chọn 2 loại kháng thể đơn dòng có khả năng gắn vào 2 vị trí gắn kết (2 điểm thụ cảm) trên cùng một kháng nguyên lớn. Như vậy có thể thử trên một ống nghiệm (giếng) để kiểm tra được cả 2 kháng thể đơn dòng. Khi sử dụng 2 loại kháng thể khác nhau cho thí nghiệm RIMA sẽ xảy ra hiện tượng cạnh tranh giữa 2 loại kháng thể. Từ đó xác định được khả năng miễn dịch của kháng thể tạo ra.

– Kỹ thuật miễn dịch hấp thụ liên kết enzym (Enzyme linked immunosorbent assay - ELISA):

Kỹ thuật ELISA (kỹ thuật Sandwich - bánh kẹp) là kỹ thuật gián tiếp xác định khả năng gắn kết của kháng nguyên, kháng thể thông qua 2 bước gắn kháng thể đặc hiệu - kháng nguyên - kháng thể đặc hiệu đã gắn enzym. Các enzym thường dùng là phosphotase kiềm, peroxydase hoặc β-glactosidase.

– Kỹ thuật ELISA gồm có các bước sau:

+ Nhỏ huyết thanh có chứa kháng thể đặc hiệu vào các giếng của tấm nhựa microtitor có 96 giếng. Để cho kháng thể gắn vào thành giếng.

+ Nhỏ tiếp kháng nguyên cần xét nghiệm vào các giếng. Nếu là kháng nguyên đặc hiệu thì phản ứng gắn kết kháng nguyên - kháng thể sẽ xảy ra.

+ Thêm kháng thể đã liên kết với các enzym vào các giếng để loại kháng thể mới này gắn vào kháng nguyên đã bị gắn kháng thể đầu tiên. Kết quả tạo nên dạng "bánh kẹp" kháng thể - kháng nguyên - kháng thể gắn enzym.

+ Bổ sung cơ chất của enzym tương ứng. Enzym sẽ thủy phân cơ chất làm thay đổi màu dung dịch. Tốc độ thủy phân của enzym tỷ lệ thuận với lượng kháng thể đã gắn enzym tương ứng, tỷ lệ thuận với lượng kháng nguyên kiểm tra xét nghiệm. Sự thay đổi màu sắc dung dịch có thể nhận xét bằng mắt thường được đo bằng quang phổ kế.

d) Sản xuất kháng thể đơn dòng với quy mô lớn

Sau khi tách dòng thành công. Sau đó xác định được các dòng tế bào có khả năng sản xuất tốt kháng thể đơn dòng và bảo quản các dòng tế bào này để sản xuất kháng thể đơn dòng với quy mô lớn theo 2 phương pháp: sản xuất trên môi trường nuôi nhân tạo (invitro), hoặc thực hiện trong cơ thể động vật (invivo).

– Sản xuất kháng thể đơn dòng bằng phương pháp invitro:

Nếu là dòng tế bào lấy từ kho bảo quản thì cần phải đánh giá lại trước khi đưa vào sản xuất. Tế bào được tách ra và được nhân nuôi một cách thích hợp. Nuôi cấy quá thưa, hoặc quá dày đều không cho kết quả tốt. Kháng thể đơn dòng được tiết ra môi trường nuôi cấy. Nồng độ kháng thể ở trong môi trường nuôi dao động từ 10-100μg/ml. Do vậy cần phải theo dõi, khống chế để thu hoạch kháng thể vào thời điểm có hiệu quả cao nhất. Thông thường người ta thường thu hoạch kháng thể khi tế bào ở pha sinh trưởng (pha logarit) để tránh sự thoái hóa dòng. Nếu chỉ thu hoạch kháng thể mà không cần giữ dòng tế bào thì nên thu hoạch vào cuối pha logarit.

– Sản xuất kháng thể đơn dòng bằng phương pháp invivo:

Sự phát triển của các tế bào đã được tách dòng trong cơ thể động vật thí nghiệm (thường là chuột) cho phép tạo được lượng kháng thể lớn mà không gặp những khó khăn như trong phương pháp nuôi cấy invitro.

Tế bào sau khi dung hợp (tế bào lai) được kiểm tra khả năng sản xuất kháng thể sẽ được tiêm vào phúc mạc của động vật để tạo thành khối u. Liều tiêm thích hợp khoảng 10^5-10^6 tế bào đối với 1 chuột thí nghiệm. Khối u sẽ phát triển sau 2-4 tuần và tạo ra dịch nuôi ở khối u. Dịch nuôi khối u có thể đạt tới 10ml/chuột. Khối u sau giai đoạn phát

triển được tách ra và trích lấy dịch nuôi khối u, từ đó tinh sạch kháng thể. Kháng thể đơn dòng được tách ra nhờ màng cellulo DEAE, cột Sephadex hoặc dùng sắc ký.

e) Ứng dụng của kháng thể đơn dòng

Kháng thể đơn dòng có nhiều ưu điểm và được ứng dụng vào nhiều mục đích khác nhau.

– Ứng dụng trong chẩn đoán bệnh:

Kháng thể sử dụng trong chẩn đoán cần phải có tính đặc hiệu cao, ít xảy ra phản ứng chéo. Vì vậy kháng thể đơn dòng đáp ứng tốt nhất cho công việc này.

Kháng thể đơn dòng đã được sử dụng để chẩn đoán các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn và virus; chẩn đoán nhiễm ký sinh trùng, hoặc chẩn đoán sự xâm nhập của kháng nguyên lạ vào cơ thể.

+ Sử dụng kháng thể đơn dòng chẩn đoán bệnh do nhiễm virus:

Sử dụng kháng thể đơn dòng để chẩn đoán được nhiều bệnh do virus như virus cúm (Gerhard và cộng sự, 1981), bệnh do virus viêm gan (Shih và cộng sự, 1980; Wands và cộng sự, 1981), bệnh do virus bại liệt (Ferguson và cộng sự, 1981), bệnh ung thư vòm mũi họng do virus Epstein Barr (Hoffman và cộng sự, 1980), virus bệnh dại (Wiktor và cộng sự, 1978)... Moving và cộng sự (Thụy Điển), 1998, đã công bố kết quả sử dụng kháng thể đơn dòng để chẩn đoán bệnh viêm phế quản ở gia cầm.

Cũng vào năm 1998, Chenard G. và cộng sự công bố sử dụng kỹ thuật ELISA với kháng thể đơn dòng để chẩn đoán bệnh lở mồm ở lợn.

+ Ứng dụng trong chẩn đoán bệnh do nhiễm vi khuẩn:

Kháng thể đơn dòng có vai trò lớn trong chẩn đoán bệnh nhiễm khuẩn. Nhờ có tính đặc hiệu cao nên chúng được sử dụng để xác định cả ở dạng mầm bệnh và bệnh đã biểu hiện. Nhiều bệnh do nhiễm vi khuẩn như bệnh bạch hầu, ho gà, uốn ván... được chẩn đoán bằng cách sử dụng các kháng thể đơn dòng và được dùng rộng rãi trong y học.

+ Ứng dụng trong chẩn đoán bệnh do nhiễm ký sinh trùng:

Kháng thể đơn dòng được sử dụng nhiều trong chẩn đoán bệnh nhiễm ký sinh trùng. Năm 1980, Yoshida và cộng sự cũng như Rener và cộng sự đã thành công trong việc sản xuất kháng thể đơn dòng để chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét. Năm 1982, Smith và cộng sự, Taylor và Butterwort đã dùng kháng thể đơn dòng chẩn đoán bệnh sán máng (*Schistosoma mansoni*). Năm 1981, Mc Mahon-Pratt và David đã thành công trong chẩn đoán bệnh nhiễm trùng do các loài ký sinh trùng *Leishmania*. Bên cạnh đó, kháng thể đơn dòng còn dùng để chẩn đoán nhiều loài ký sinh trùng khác như bệnh giun chỉ, bệnh ngủ v.v...

+ Ứng dụng trong chẩn đoán khối u:

Việc sử dụng kháng thể đơn dòng để chẩn đoán khối u đã được Mc Gee và cộng sự (1982), Ashall và cộng sự (1987) tiến hành. Kháng thể đơn dòng sử dụng trong các chẩn đoán này là loại kháng thể có phản ứng với kháng nguyên liên kết khối u. Các kháng thể đơn dòng đặc hiệu với các kháng nguyên đặc hiệu ở các mô hay tế bào có thể sử dụng để phát hiện khối u đã di căn. Một số loại kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao còn được sử dụng để phát hiện các khối u sản sinh ra các chất chuyển hóa riêng

của chúng, khi được chuyển vào huyết thanh máu của người mắc bệnh. Trên cơ sở phối hợp với các kỹ thuật miễn dịch phóng xạ. Kỹ thuật hóa miễn dịch, miễn dịch tế bào... có thể phát hiện khối u nguyên phát ở giai đoạn sớm cũng như giám sát sự tiến triển của bệnh nhân trong quá trình điều trị ung thư.

+ Ứng dụng trong chẩn đoán các bệnh lý khác:

Ngoài việc ứng dụng để phát hiện các khối u nguyên phát, thứ phát, kháng thể đơn dòng còn được sử dụng chẩn đoán các bệnh khác như bệnh về tim (Haber và cộng sự, 1982), bệnh tự miễn dịch (Schoenfeld và cộng sự, 1982, 1983) v.v...

– Ứng dụng trong điều trị một số bệnh:

Kháng thể đơn dòng không những dùng để chẩn đoán các dạng bệnh mà còn được sử dụng để điều trị một số bệnh. Kháng thể đơn dòng dùng để điều trị ung thư đã được tiến hành. Clark và cộng sự (1983) dùng kháng thể đơn dòng của chuột nhắt để điều trị ung thư bằng cách kích thích vật chủ bị bệnh đáp ứng với kháng nguyên lạ, tiêu diệt các tế bào ung thư. Mloney D.G. (1998) đã sử dụng kháng thể đơn dòng để điều trị bệnh ung thư máu. Kháng thể đơn dòng còn được sử dụng trong việc chống thải mảnh ghép (Trường hợp ghép tim, thận kháng thể đơn dòng có thể dùng với mục đích ngăn cản phản ứng miễn dịch của cơ thể người nhận đối với các mảnh ghép từ cơ thể lạ).

4.3. SẢN XUẤT VACXIN BẰNG KỸ THUẬT ADN TÁI TỔ HỢP

4.3.1. Khái niệm

Hệ thống miễn dịch của cơ thể đóng một vai trò đặc biệt quan trọng trong việc bảo vệ cơ thể chống lại các tác nhân gây bệnh thông qua các cơ chế miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào. Từ trước đến nay, để phòng chống bệnh cho gia cầm, gia súc và con người, người ta thường sử dụng các vacxin sống nhược độc (attenuated vaccine), hoặc vacxin bất hoạt (inactivated vaccine). Vacxin sống nhược độc là loại vacxin chứa các tác nhân gây bệnh còn sống, nhưng đã làm giảm độc tố và được tạo ra bằng cách nuôi cấy, chọn lọc nhân tạo liên tục qua nhiều thế hệ. Loại vacxin này thường kích thích cho sự miễn dịch lâu dài. Tuy nhiên, cũng có khả năng các tác nhân nhược độc chuyển thành trạng thái gây độc trở lại. Vacxin bất hoạt còn gọi là vacxin chết, là loại vacxin sử dụng chính các tác nhân gây bệnh đã bị giết chết bằng các phương pháp lý, hóa học. Loại vacxin này có khả năng kích thích miễn dịch nhưng không hoàn toàn, không được lâu bền và có tính chất hạn chế, chỉ phòng chống được với một số tác nhân gây bệnh nhất định. Những tiến bộ khoa học về miễn dịch học, vi sinh vật học, sinh học phân tử và hóa sinh học, công nghệ gen... cho phép sản xuất vacxin thuộc thế hệ mới bao gồm:

– Vacxin dưới nhóm (subunit vaccines).

– Vacxin tái tổ hợp vector (recombinant vectoral vaccines).

– Vacxin axit nucleic (DNA and RNA vaccines).

Những loại vacxin này an toàn, rẻ tiền, có hiệu quả cao và có khả năng sản xuất với số lượng lớn.

Sau đây chúng ta tiếp cận với những vấn đề liên quan đến các loại vacxin thế hệ mới này.

4.3.2. Lựa chọn các kháng nguyên đích cho sản xuất vacxin

Nhìn chung, các yếu tố quyết định của kháng nguyên bề mặt (thường là protein) chịu trách nhiệm cảm ứng với các kháng thể trung hòa. Ví dụ, protein bề mặt của virus có thể chứa một vài vùng quyết định kháng nguyên (epitop) và cảm ứng với các kháng thể tương ứng trong quá trình đáp ứng miễn dịch. Chính vì thế mà các vacxin dưới nhóm phải gồm tất cả các quyết định kháng nguyên. Do vậy, cần phải xác định rõ các kháng nguyên sẽ gây đáp ứng miễn dịch là việc cần thiết cho việc sản xuất vacxin.

4.3.2.1. Protein cấu trúc gây đáp ứng tạo kháng thể trung hòa để tạo vacxin

Quá trình trung hòa các virus được thực hiện bởi sự liên kết của kháng thể với một hay nhiều phần khác nhau của protein bề mặt của virus gây bệnh. Nghiên cứu protein cấu trúc là đích hướng tới cho việc sản xuất vacxin.

Những nghiên cứu về protein bề mặt và cơ chế trung hòa virus bại liệt cho ta chiến lược mới để chế tạo vacxin bại liệt. Kết quả nghiên cứu cho thấy quyết định kháng nguyên trung hòa có mặt ở vỏ capsid của virus. Đó là protein vỏ VP1 ở virus bại liệt loại 1. VP1 này liên kết với mảnh gắn kháng nguyên F_{ab} (Fragment of antigen binding) của hai kháng thể đơn dòng trung hòa. Protein VP1 là protein vỏ capsid lớn nhất (34kDa) ở trên bề mặt vỏ virus, chứa yếu tố quyết định trung hòa. Như vậy vacxin thuộc nhóm chống lại virus bại liệt phải chứa protein VP1.

Những nghiên cứu tiếp theo của Emini (1984) cho thấy có 5 quyết định kháng nguyên bề mặt của virus bại liệt liên quan đến sự trung hòa. Ba vị trí liên kết với VP1, một vị trí liên kết với VP2 và một vị trí liên kết với VP3. Như vậy, để chống lại virus bại liệt có hiệu quả thì kháng thể phải chống lại cả 3 loại protein VP1, VP2 và VP3 của vỏ capsid virus bại liệt.

Khi nghiên cứu virus gây bệnh chân, miệng (food and mouth disease virus - FMDV) cho thấy sự đáp ứng miễn dịch trung hòa cũng trực tiếp chống lại VP1. Hơn nữa người ta còn tìm ra các gốc amino axit 141-160 và 200-213 trong chuỗi polypeptit của VP1 liên quan đến sự trung hòa virus FMDV. Như vậy, protein về mặt VP1 của FMDV là kháng nguyên lý tưởng cho việc sản xuất vacxin chống lại bệnh chân, miệng do virus FMDV gây ra.

Ở virus cúm, người ta thấy có 4 vị trí liên kết với kháng thể trên phân tử protein HA. Đồng thời phân tử glycoprotein NA tuy không tham gia trực tiếp vào sự trung hòa virus nhưng lại kích thích hiệu quả miễn dịch. Do vậy, cả 2 loại protein HA và NA đều cần thiết phải có trong kháng nguyên để tạo ra vacxin chống virus cúm có hiệu quả.

Ở virus bệnh sởi có các vị trí liên kết kháng thể trên 2 loại protein HA và protein F. Do vậy, kháng nguyên đích cho việc tạo ra vacxin sởi cần có cả 2 loại protein HA và F.

4.3.2.2. Protein cấu trúc gây đáp ứng tạo kháng thể không trung hòa để tạo vacxin

Trong cơ thể, nếu chỉ riêng loại kháng thể trung hòa bảo vệ cơ thể thì không có hiệu quả cao. Ví dụ, tính mẫn cảm với sự lây nhiễm virus bệnh sởi không được bảo vệ bởi loại kháng thể sinh ra chỉ chống lại mỗi một loại protein HA (Norby, 1975). Do vậy, những kháng nguyên bên trong (interal antigen) có lẽ đóng vai trò quan trọng trong

việc chống lây nhiễm. Như đã đề cập ở trên, những kháng nguyên cảm ứng tạo kháng thể trung hòa có vai trò quan trọng trong việc đáp ứng miễn dịch của cơ thể khi nhiễm bệnh. Bên cạnh đó có những kháng nguyên tuy không cảm ứng để tạo ra kháng thể trung hòa nhưng lại có vai trò tạo kháng thể bảo vệ chống lại sự lây nhiễm bệnh.

Khi nghiên cứu đáp ứng miễn dịch chống lại sự lây nhiễm virus viêm gan B (HBV), người ta thấy kháng thể trung hòa được tạo ra trước tiên để chống lại kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B, gọi là kháng nguyên HBsAg (Peterson, 1977). Tuy nhiên, việc đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên lõi bên trong của virus này (Hepatitis B virus core antigen = HBcAg) mới có tác dụng ngăn chặn sự gây nhiễm và phát triển của virus viêm gan B. Như vậy, kháng nguyên lõi, cũng như các kháng nguyên gây đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể không trung hòa góp phần tạo khả năng miễn dịch tốt hơn, lâu dài hơn.

Như vậy, mặc dầu về cơ chế chưa được hiểu thấu đáo, nhưng các kháng nguyên cảm ứng gây ra kháng thể không trung hòa (non- neutralizing antibody) cần được xem như một hướng cần thiết cho sự chế tạo vacxin.

4.3.2.3. Protein không cấu trúc gây đáp ứng tạo kháng thể để tạo vacxin

Một loại kháng nguyên có tiềm năng gây đáp ứng miễn dịch khác là các sản phẩm protein của gen điều hòa trong tế bào. Sự sao chép, nhân đôi của virus cần đòi hỏi sản phẩm điều hòa của gen điều hòa. Do vậy những kháng thể ngăn cản, chống lại các sản phẩm điều hòa này có thể ngăn cản sự nhân đôi của virus. Người ta cho rằng, những kháng thể làm mất chức năng sản phẩm gen điều hòa gọi là tatIII. TatIII có thể là dừng sự sao chép, nhân đôi của virus, ví dụ như virus HIV (theo Steven Josephs). Điều này mở ra một cách tiếp cận mới cho việc tạo vacxin chống lại virus có hiệu quả hơn.

Tóm lại, để sản xuất vacxin có hiệu quả cao, chúng ta cần phải tìm hiểu sâu sắc hơn, hệ thống hơn về hệ thống đáp ứng miễn dịch chống virus; về đặc điểm, thành phần cấu tạo của các virus và cả về kháng nguyên đích gây nên việc tạo kháng thể trung hòa cũng như các thành phần protein khác mà chúng có khả năng gây đáp ứng miễn dịch.

4.3.3. Xác định và tạo dòng gen cho việc tạo kháng thể đích

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp cho phép tách chiết, tạo dòng gen và biểu hiện gen. Người ta nhận thấy có một số gen cần thiết cho việc sản xuất vacxin để tạo ra các vacxin dưới nhóm. Các gen mã hóa cho các kháng nguyên đích đã được xác định vị trí, cấu trúc của gen dựa vào các kỹ thuật sinh học phân tử. Kích thước của protein kháng nguyên có thể tương ứng, hoặc không tương ứng với mARN của các gen mã hóa. Nếu như kháng nguyên đích là sản phẩm của một phần do protein ban đầu cắt ra thì mARN tương ứng dài hơn. Ngược lại nếu như kháng nguyên đích đã bị phosphoril hóa thì mARN lại có kích thước ngắn hơn.

Tổng số các mARN của virus có thể được tách chiết sau khi gây nhiễm, sau đó được tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột oligo T-cellulose và được đưa vào hệ thống dịch mã. Sản phẩm dịch mã được phát hiện nhờ các phản ứng miễn dịch đặc hiệu khi sử dụng các kháng thể đặc hiệu chống kháng nguyên. Những gen của virus mã hóa cho các mARN đặc hiệu tổng hợp kháng nguyên đặc hiệu cũng có thể được phát hiện nhờ

phương pháp lai axit nucleic, hoặc giải trình tự gen. Khi tiến hành tạo dòng gen và biểu hiện gen của virus, cần phải chú ý các điểm sau đây:

– Tạo dòng gen ADN bổ sung (cADN) từ mARN có lợi hơn so với tạo dòng ADN của cả hệ gen virus.

– Gen tạo dòng phải được gắn cùng chiều với các promotor thích hợp để điều khiển quá trình phiên mã của virus.

– Gen tạo dòng phải đưa vào đúng điểm Ori (điểm khởi đầu sao chép) theo đúng khung đọc của promotor đó.

– Luôn sẵn sàng cho gen biểu hiện.

4.3.3.1. Tạo dòng gen để tạo kháng nguyên đích bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp

Ta có thể hình dung việc tạo dòng gen nhằm tạo kháng nguyên đích đối với dòng 3 gen của virus gây bệnh cúm (parainfluenza virus) ở người như sau:

– Tách chiết mARN tổng số, trong đó có mARN của 3 dòng gen nghiên cứu.

– Thiết lập ba thư viện khác nhau của 3 gen parainfluenza virus gây bệnh cúm ở người (human parainfluenza virus 3 – HPIV3).

– Tạo ngân hàng dòng gen bằng sử dụng mARN tách chiết từ tế bào bị nhiễm virus cúm. Tạo cADN mạch đơn nhờ gắn đuôi polyA vào mARN và dùng cột oligo T-cellulose để tách riêng từng mARN. Tổng hợp cADN kép.

– Đoạn cADN kép có chiều dài 1,2-1,3kb được chọn lọc bằng sắc ký Sephadex CL4.

– Gắn cADN vào plasmid pBR322 nhờ xử lý bằng enzym giới hạn Bam HI.

– Biến nạp plasmid tái tổ hợp vào *E.coli*.

– Thu nhận các khuẩn lạc *E.coli* chứa cADN nhờ chọn lọc bằng chất kháng sinh.

– Xác định các dòng HPIV3 nhờ lai axit nucleic với việc sử dụng mẫu dò đánh dấu phóng xạ.

– Tách các dòng gen HPIV3 và cho gen biểu hiện.

4.3.3.2. Biểu hiện của kháng nguyên đích trong tế bào chủ

a) Biểu hiện kháng nguyên đích trong tế bào chủ sinh vật nhân sơ (prokaryot)

Các tế bào sinh vật nhân sơ thích hợp cho việc biểu hiện gen lạ khi các gen này không có quá trình biến đổi sau dịch mã.

Escherichia coli (E.coli) là một trong những vật chủ thường dùng để biểu hiện các gen của sinh vật nhân chuẩn. Các promotor được sử dụng để biểu hiện gồm có: trp, lac, UVS... và để biểu hiện các sản phẩm như insulin, interferon, hoocmon sinh trưởng người. Có một thực tế là, sản phẩm của gen sau khi tạo ra nhiều khi không đáp ứng hoạt tính mong muốn. Tuy nhiên, sự biểu hiện của gen virus để tạo ra kháng nguyên đích trong *E.coli* lại ít thuận lợi. Ví dụ, gen VP1 của virus bại liệt được biểu hiện trong vi khuẩn *E.coli* là một phân tử protein có khối lượng 73kDa do promotor trp của plasmid pLOP6 điều khiển. Có lẽ là, trong vi khuẩn *E.coli*, môi trường dường như không thích hợp cho việc biểu hiện và biến đổi của một số kháng nguyên virus cúm, virus viêm gan B cũng như virus sởi, do vậy các kháng nguyên trên ít được tạo ra từ vi khuẩn *E.coli*.

Người ta cố gắng tìm một số vi sinh vật nhân sơ khác để biểu hiện các gen của virus do sự tiết các protein ngoại lai ra ngoài tế bào vi sinh vật. Điều đó thuận lợi cho việc thu sản phẩm. Các vi khuẩn Gram dương là mục tiêu nghiên cứu cho các biểu hiện của gen virus không chỉ thuận lợi cho việc thu sản phẩm mà sản phẩm cũng không bị biến đổi.

b) Biểu hiện kháng nguyên đích trong tế bào chủ sinh vật nhân chuẩn (eukaryot)

Tế bào sinh vật nhân sơ (prokaryot) không có cơ chế cho sự biến đổi protein ở sinh vật nhân chuẩn. Do vậy, để nhận các sản phẩm protein hoàn chỉnh cần phải nghiên cứu, phát hiện các hệ biểu hiện là của tế bào sinh vật nhân chuẩn. Đã có một số thành công trong việc biểu hiện protein virus gây đáp ứng miễn dịch trong ống nghiệm bằng cách sử dụng tế bào sinh vật nhân chuẩn như tế bào nấm men, tế bào nuôi của động vật có vú và tế bào côn trùng. Động lực tìm kiếm hệ biểu hiện này là việc tăng chất lượng, hạ giá thành sản phẩm vacxin và để tạo ra các loại protein có hoạt tính sinh học đầy đủ.

– Nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*) là hệ biểu hiện có nhiều ưu điểm. Nó cung cấp môi trường thích hợp để tạo ra protein có cấu trúc hoàn chỉnh. Kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg) được tổng hợp nhờ nấm men *S.cerevisiae* bằng cách sử dụng vector có chứa vùng 5' của enzym alcohol dehydrogenase I (ADHI) làm promotor cho quá trình tổng hợp kháng nguyên này. Protein kháng nguyên sau khi tổng hợp được tích tụ lại thành hạt có kích thước khoảng 22nm giống như protein tiết ra ở tế bào của người. Miyanohara (1986) cũng đã biểu hiện gen kháng nguyên lõi của virus viêm gan B (HBcAg) trong nấm men dưới sự điều khiển của promotor của enzym axit phosphatase. Chuỗi polypeptit này chính là kháng nguyên có tiềm năng tạo ra kháng thể lâu dài chống lại virus viêm gan B.

– Tế bào nuôi của động vật có vú cũng được sử dụng làm hệ biểu hiện của gen virus. Gen ngoại lai được biểu hiện trong tế bào động vật có vú nhờ sử dụng promotor SV40, promotor retrovirus, promotor virus papilloma bò...

Ưu điểm của hệ biểu hiện tế bào động vật có vú là protein kháng nguyên được biểu hiện là protein có cấu trúc và có chức năng hoàn chỉnh. Kháng nguyên HBsAg được biểu hiện thành công khi sử dụng hệ biểu hiện là tế bào động vật có vú. Kháng nguyên này sau khi tổng hợp được tích lũy ở dạng hạt có kích thước khoảng 22nm. Các hạt này được tiết ra ngoài tế bào.

Để biểu hiện gen HBsAg cần tạo ra vector SV40 có gắn gen ngoại lai HBsAg. Vector tái tổ hợp này được nhiễm vào tế bào thận của khỉ châu Phi (COS) và kháng nguyên T được biểu hiện từ đó tạo ra protein HBsAg. HbsAg tìm thấy ở môi trường nuôi cấy ngoài tế bào ở dạng hạt 22nm. Các hạt này có đặc điểm sinh lý, sinh hóa và tính kháng nguyên thích hợp và có khả năng gây miễn dịch có hiệu quả. Chúng là vacxin được sử dụng cho việc chống bệnh viêm gan B.

Tế bào côn trùng cũng là hệ biểu hiện của các gen tổng hợp kháng nguyên. Một số lượng lớn protein nhân chuẩn được tạo ra nhờ tế bào vật chủ là tế bào côn trùng như: β-interferon người, interleukin 2, α-interferon, kháng nguyên T virus polyoma.... β-interferon người có hoạt tính sinh học cao được tạo ra trong tế bào côn trùng loài

Spodoptera frugiperda. Có tới 95% β-interferon được tiết ra ngoài các tế bào côn trùng bị gây nhiễm bởi virus baculovirus tái tổ hợp mang gen β-interferon người.

Năm 1985, Maeda và cộng sự đã tạo vector baculovirus có gắn gen mã hóa α-interferon biến nạp vào tế bào tằm dâu *Bombyx mori* và tổng hợp được α-interferon.

Ngoài tế bào động vật có vú, tế bào côn trùng cũng như các sinh vật nhân chuẩn khác như tảo *Chlamydomonas reinhardii*, hoặc một số nấm sợi *Achyla* cũng được sử dụng làm hệ biểu hiện cho các protein kháng nguyên vacxin.

4.3.4. Miễn dịch dự phòng bằng virus tái tổ hợp nhược độc

Áp dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp để sản xuất vacxin là các protein kháng nguyên dưới nhóm theo như đã mô tả ở trên. Có một phương thức khác là dùng kỹ thuật di truyền tạo ra virus nhược độc mang gen kháng nguyên lạ gây nhiễm để tạo kháng thể.

4.3.4.1. Miễn dịch dự phòng bằng virus đậu mùa nhược độc

Virus đậu mùa nhược độc có phân tử ADN kép được sử dụng tiêm chủng để phòng và chống bệnh đậu mùa. Nhờ kỹ thuật ADN tái tổ hợp, người ta tạo ra virus đậu mùa tái tổ hợp có khả năng gây đáp ứng miễn dịch cho cơ thể người chống lại bệnh đậu mùa. Người ta đã gắn gen mã hóa cho protein kháng nguyên của virus đậu chủng độc gây bệnh vào virus đậu nhược độc để tạo ra virus đậu tái tổ hợp, như là một vacxin đậu tái tổ hợp.

Cũng có thể tạo ra vacxin tái tổ hợp mang các gen lạ khác như virus viêm gan B là gen HBsAg, hoặc gen haemagglutinin (HA) của virus cúm. Động vật được tiêm chủng virus đậu tái tổ hợp còn sống chứa gen HBsAg, hoặc gen HA sẽ tạo ra lượng kháng thể lớn chống lại HBsAg hoặc HA, có nghĩa là chống được bệnh viêm gan B hoặc bệnh cúm.

4.3.4.2. Miễn dịch dự phòng bằng adenovirus nhược độc

Adenovirus nhược độc lý tưởng là virus không gây bệnh nhưng hệ gen của nó cho phép gắn được các gen lạ và biểu hiện sản phẩm của gen lạ nhờ sự điều khiển của các promotor thích hợp ở trong các tế bào chủ bị lây nhiễm. Người ta đã tạo ra adenovirus nhược độc ở người không gây bệnh ung thư mà lại có khả năng nhận đoạn ADN ngoại lai dài tới 7kb. Adenovirus này dùng làm vacxin chống lại các bệnh. Ví dụ, người ta dùng adenovirus người loại 5 của chủng hoang dại (Ad5) để tạo adenovirus tái tổ hợp. Bằng cách loại bỏ vùng E3 (early region 3) và vùng E1 (early region 1) để tạo ra loại adenovirus mới có tên là dIE 1,3, có phân tử ADN ngắn và có khả năng gắn thêm đoạn ADN dài tới 7,5kb. Người ta gắn gen pre-S2 dưới sự điều khiển của promotor E1 của adenovirus ban đầu đã tạo ra adenovirus tái tổ hợp. Thỏ được tiêm chủng adenovirus tái tổ hợp này có thể tạo kháng thể chống virus viêm gan B.

4.3.5. Những ứng dụng và triển vọng của vacxin tái tổ hợp

Vacxin tái tổ hợp được sử dụng rộng rãi trong việc chống lại nhiều bệnh cho gia cầm, gia súc và con người. Nhiều loại vacxin tái tổ hợp để chống lại nhiều loại bệnh như bệnh lở mồm long móng, bệnh chân, miệng do virus FMDV, bệnh viêm gan B, bệnh do virus cúm, bệnh sởi... Nhiều loại vacxin tái tổ hợp chống các bệnh phổ biến ở gia cầm như bệnh Marek, bệnh Gumboro, bệnh Neucatstle... hoặc các bệnh bạch cầu ở bò, bệnh lở chân ở cừu...

Hiện tại, người ta cố gắng nghiên cứu tạo ra vacxin tái tổ hợp chống lại bệnh cúm gà bằng cách gắn gen haemagglutinin của virus influenza vào virus pox để tạo ra vacxin kháng bệnh cúm gà đang là vấn đề thời sự trên thế giới. Hệ gen của virus HIV gây suy giảm hệ thống miễn dịch (bệnh AIDS) ở người cũng đã được xác định. Gen tạo protein vỏ của HIV đã được xác định và gắn vào vector virus đậu tạo ra vector tái tổ hợp. Khi biến nạp vào tế bào vi khuẩn và cho gen protein vỏ của HIV biểu hiện thu được sản phẩm, sau đó tiến hành gây miễn dịch cho những người tình nguyện. Kết quả cho thấy có khả năng tạo ra phản ứng miễn dịch đầu tiên chống lại HIV.

4.4. CÔNG NGHỆ TẠO ĐỘNG VẬT CHUYỂN GEN

4.4.1. Khái niệm

Nhằm nâng cao năng suất của gia súc, gia cầm và vật nuôi nói chung, người ta thường tiến hành chọn lọc và lai tạo giống. Khi tiến hành giao phối giữa các dòng, các giống động vật khác nhau về các tính trạng như: khả năng tăng trọng, năng suất sữa, sản lượng trứng, khả năng chống chịu bệnh... có thể tạo ra giống mới có các tính trạng như nêu trên vượt trội hơn cả các dòng, các giống cha mẹ. Sự kết hợp giữa giao phối và chọn lọc là có hiệu quả mặc dầu tốn nhiều thời gian, công sức và kinh phí. Có thể nói cho tới nay, hầu hết các giống vật nuôi có năng suất, chất lượng tốt hiện nay đang được chăn nuôi là do quá trình giao phối và chọn lọc.

Thời gian gần đây, cùng với sự phát triển của khoa học về sinh học phân tử, các nhà khoa học đã tiến hành cải biến hệ gen bằng cách thêm vật liệu di truyền từ hệ gen khác vào cơ thể sinh vật bằng cách chuyển gen.

Những động vật mà có hệ gen bị biến đổi bằng cách đưa thêm ADN ngoại lai gắn vào hệ gen của nó gọi là động vật chuyển gen (transgenic animal). ADN ngoại lai dùng để đưa vào cơ thể khác gọi là gen chuyển. Toàn bộ quá trình thao tác để tạo sinh vật chuyển gen gọi là công nghệ chuyển gen. Sản phẩm sinh vật chuyển gen nói chung, cả thực vật, động vật và vi sinh vật, còn gọi là GMO (Genetic Modified Organism) đã bắt đầu xuất hiện ở nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới.

Việc chuyển gen vào tế bào động vật nuôi cấy hay vào cơ thể động vật có thể sử dụng với nhiều mục đích khác nhau, bao gồm cả việc nghiên cứu cơ bản và nghiên cứu ứng dụng. Nhìn chung, mục đích biến đổi hệ gen động vật giống như mục đích cải tạo giống bằng phương pháp lai tạo và chọn lọc giống truyền thống. Chuyển gen ở vật nuôi là nhằm tạo ra các dòng vật nuôi mới có những đặc tính quý mong muốn một cách nhanh chóng, khắc phục được những trở ngại trong lai tạo tự nhiên như việc lai xa giữa 2 loài khác nhau. Động vật chuyển gen có thể có những đặc tính mới, vượt qua cả giới hạn phạm vi loài, khi mà bằng phương pháp lai tạo thông thường không thể thực hiện được.

4.4.2. Các gen dùng để chuyển vào động vật

Tùy theo đối tượng động vật khác nhau, với mục đích khác nhau mà người ta chọn các gen khác nhau để chuyển vào động vật. Gen chuyển vào động vật phải là các gen mang những tính trạng mới có ích cho con người, phải được cơ thể vật nhận dung hợp và biểu hiện để tạo ra được tính trạng mới cần thiết.

4.4.2.1. Các gen dùng để chuyển vào cá

– Những gen lạ được chuyển vào cá nhằm tăng năng suất sản lượng cá cũng như tạo ra những sản phẩm, tính trạng mới ở cá. Những gen ngoại lai dùng để chuyển vào cá là các gen hoocmon sinh trưởng người (hGH), hoocmon sinh trưởng bò (bGH), hoocmon sinh trưởng loài cá này sang loài cá khác (fGH), gen δ-crystallin gà, gen β-glactosidase vi khuẩn, gen kháng hygromycin, gen mã hóa cho protein chống lạnh ở cá (AFP), gen α-globin, gen neomycin phosphotransferase, gen luciferase v.v...

Promotor được sử dụng cũng rất đa dạng. Phổ biến nhất là promotor metallothionein chuột (mMT – mouse metallothionein) dùng để gắn các gen hoocmon sinh trưởng GH như các promotor của virus (RVS - Rous sarcoma virus, CMV-Cytomegalovirus), promotor của gen chống lạnh ở cá (op-AFP - ocean pout antifreeze protein), promotor thymidine kinase virus (vTK), promotor cholecytokinine chuột (rCCK), promotor β- acting (cBA). Những promotor trên là các promotor mạnh, đặc biệt là promotor β-actin biểu hiện mạnh ở giai đoạn phát triển phôi ở cá.

Người ta có thể chuyển toàn bộ plasmid tái tổ hợp mang gen cấu trúc gắn với promotor, nhân tố tăng cường có thể ở cả dạng mạch vòng, mạch thẳng vào trứng của cá. Cũng có thể chuyển gen cấu trúc đã tinh sạch vào cá thì cũng có khả năng tạo ra cá chuyển gen. Khi gen được chuyển vào trứng cá đã thụ tinh, có thể xảy ra các khả năng khác nhau như:

+ Đoạn ADN ngoại lai có thể bị thoái hoá trước khi được hội nhập vào hệ gen của vật chủ do trong tế bào trứng có sẵn những exonuclease, hoặc endonuclease.

+ Một vài đoạn ADN ngoại lai có thể tồn tại và được nhân bản sau một vài lần phân bào của tế bào trứng nhưng vẫn không được hội nhập vào hệ gen của vật chủ.

+ Gen ngoại lai có thể được hội nhập vào hệ gen vật chủ, sau đó bị thoái hoá do tác động của hệ gen tế bào vật chủ. Kết quả gen ngoại lai không được biểu hiện là do tế bào vật chủ chỉ mang đoạn ADN không hoàn chỉnh của đoạn ngoại lai.

+ Gen ngoại lai có thể được hội nhập muộn vào một số tế bào vật chủ sau một vài chu kỳ phân bào của trứng, kết quả có thể tạo ra động vật chuyển gen ở thể khảm.

+ Gen ngoại lai có thể được hội nhập nhưng không được biểu hiện do ADN bị methyl hoá, hoặc thiếu hụt promotor thích hợp, hoặc được chèn vào vị trí không thích hợp trên NST của tế bào vật chủ.

+ Trường hợp may mắn là gen ngoại lai được hội nhập đúng vị trí, tồn tại một cách bền vững trong hệ gen của vật chủ, được di truyền cho thế hệ sau.

– Nghiên cứu tạo cá chuyển gen chủ yếu tập trung vào mục đích, đó là:

+ Tạo cá chuyển gen có tốc độ sinh trưởng nhanh:

Tốc độ lớn của cá được tăng cường nhờ chuyển gen hoocmon sinh trưởng của người, hoặc động vật có vú vào các loài cá nuôi. Ở Trung Quốc, khi chuyển gen hoocmon sinh trưởng người vào cá chép làm cho tốc độ lớn nhanh, hiệu suất sử dụng thức ăn cao. Cá chuyển gen có kích thước lớn hơn 22% so với đối chứng. Cá rô phi chuyển gen hoocmon sinh trưởng người có hiệu suất sử dụng thức ăn tới 200% so với cá đối chứng.

+ Tạo cá chuyển gen có khả năng chịu lạnh:

Khả năng chịu lạnh ở các loài cá sinh trưởng ở vùng ôn đới, hàn đới là rất cao. Khả năng chịu lạnh này nhờ có một loại protein chống lạnh AFPs (antifreeze proteins). Các protein AFPs tìm thấy ở nhiều loài cá sống ở vùng có khí hậu lạnh. Wang và cộng sự (1995) đã chuyển thành công gen AFPs lấy từ loài cá chạch lớn ở vùng lạnh (*Macrozoarces americanus*) vào trứng của loài cá vàng (*Carassius auratus*) và đã phát hiện được sự biểu hiện của gen AFPs ở cá vàng. Cá vàng chuyển gen có khả năng chịu lạnh tốt hơn cá đối chứng khi nuôi chúng ở nhiệt độ thấp.

+ Tạo cá chuyển gen có khả năng kháng bệnh:

Nuôi cá công nghiệp với mật độ cao, khả năng lây nhiễm bệnh là rất lớn, gây hiện tượng cá chết hàng loạt và gây thiệt hại lớn đối với các nhà nuôi cá. Do vậy, việc tạo cá kháng bệnh cao là nhu cầu cấp bách của ngành nuôi trồng thuỷ sản. Chuyển gen chống chịu bệnh vào cá nuôi là hướng nghiên cứu cho nhiều triển vọng. Áp dụng công nghệ chuyển gen để vô hiệu hoá virus gây bệnh như virus IHNV (infectious heamatopoetic necrosis virus) làm cá chết hàng loạt đã làm cho khả năng chống các virus này của cá chuyển gen được tăng lên.

+ Các hướng tạo cá chuyển gen khác:

Ngoài việc tạo cá chuyển gen làm tăng tốc độ sinh trưởng, tạo cá chống lạnh, kháng bệnh, người ta còn chuyển gen với mục đích khác: Chuyển gen mã hoá prolactin làm tăng khả năng chịu mặn của cá. Trong nghề nuôi cá cảnh, người ta đã tiến hành chuyển gen tạo màu sắc để tạo cá có màu sắc mới, phong phú. Một số gen mã hoá cho protein có khả năng phát huỳnh quang màu xanh (Green Fluorescent Protein - GFP), màu đỏ (Red Fluorescent Protein - RFP), hoặc màu vàng (Yellow Fluorescent Protein - YFP) được chuyển vào cá mú vằn (*Danio rerio*) tạo ra cá medaka (*Oryzias latipes*) ở Nhật Bản. Cá chuyển gen có màu sắc sặc sỡ thể hiện dưới ánh sáng ban ngày, hoặc dưới ánh sáng đèn tử ngoại vào ban đêm.

4.4.2.2. Các gen dùng để chuyển vào chuột

Loài chuột *Mus musculus* được chọn làm động vật thí nghiệm trong mô hình chuyển gen ngoại lai vào động vật. Từ đầu những năm 1980, hàng trăm các gen khác nhau đã được đưa vào trong các dòng chuột khác nhau. Các nghiên cứu trên chuột đã góp phần cho việc hiểu biết sự điều chỉnh gen, sự phát triển của khối u, các đặc tính miễn dịch và cơ sở phân tử của các quá trình cơ bản trong cơ thể động vật.

Lần đầu tiên người ta chuyển gen hoocmon sinh trưởng người (hGH), hoặc của chuột cống (rGH) vào chuột nhắt. Dưới sự điều khiển của promotor metallothionin (MT) đã tạo ra dòng chuột lớn gấp hai lần so với đối chứng. Khi chuyển gen hGH vào chuột thành công, người ta đã nghĩ ngay đến việc chuyển gen vào các vật nuôi khác như thỏ, gà, lợn, trâu, bò... Ví dụ, chuyển gen mã hoá luciferase là enzym mã hoá luciferyl adenylate thành oxyluciferin và phát huỳnh quang sinh học (bioluminscense). Gen mã hoá luciferase có nguồn gốc từ sứa ở biển được chuyển vào chuột, từ đó tạo ra chuột phát huỳnh quang được tiến hành thành công tại Đại học Osaka, Nhật Bản. Chuyển các đột biến của gen APP (Gen protein beta amyloid tiền thân) đã cho thấy được cơ chế của bệnh Alzheimer.

4.4.2.3. Các gen dùng để chuyển vào lợn

Người ta đã chuyển vào lợn rất nhiều gen lạ khác nhau dưới sự điều khiển của nhiều loại promotor mạnh khác nhau như: mMT-hGH, mMT-bGH, PRL-bGH, mMT-hGRF, Alb-hGRF, mMT-hiGF$_1$ và mMT-pGH (trong đó mMT: mouse methallotionin – promotor methallotionin chuột, hGH: human growth hoocmon – hoocmon sinh trưởng người, bGH: bovin growth hoocmon – hoocmon sinh trưởng bò, pGH: porcin growth hoocmon – hoocmon sinh trưởng heo, hGRF: human growth releasing factor – nhân tố kích thích tiết hoocmon sinh trưởng người, hiGF$_1$: human insulin like growth factor 1, PR: prolactin, Alb: albumin). Để giải quyết hiện tượng nguồn cung cấp máu người không đáp ứng đủ cho việc truyền máu cho bệnh nhân, người ta thiết kế vùng điều chỉnh từ gen β-globin người kết hợp với 2 gen α_1-globin và một gen β^A-globin người rồi chuyển vào lợn. Hemoglobin người được sản sinh trong cơ thể lợn, về cấu tạo không khác gì hemoglobin tự nhiên của người và có thể tách dễ dàng khỏi hemoglobin lợn bằng phương pháp sắc ký. Tuy nhiên, việc sử dụng hemoglobin chuyển gen này còn đạt hiệu quả thấp và còn gây một số hiện tượng bất thường cho những bệnh nhân được điều trị.

4.4.2.4. Các gen dùng để chuyển vào bò

Các gen được chuyển vào bò chủ yếu là các gen tổng hợp các protein làm tăng chất lượng sữa như tăng hàm lượng cazein, tăng hàm lượng canxi, tăng hàm lượng axit béo no, tăng hàm lượng lactose sữa cũng như làm tăng khả năng tăng trọng nhờ chuyển gen hoocmon sinh trưởng người. Một hướng cơ bản khác là tạo bò chuyển gen sản xuất ra sữa chứa các sản phẩm chữa bệnh cho người như albumin. Albumin này dùng để chữa cho người bị bệnh suy gan, bị suy dinh dưỡng. Khi bò sản xuất sữa chứa albumin người thì việc chữa trị bằng cách cho bệnh nhân uống sữa có chứa dược tố albumin để chữa bệnh. Ngoài albumin, người ta còn nghĩ tới việc tạo ra bò chuyển gen sản xuất sữa có các dược tố chữa bệnh đau tim, viêm mật...

Bò chuyển gen sản xuất ra sữa chua (yoghourt) là một ví dụ hấp dẫn và lý thú trong công nghệ thực phẩm trong tương lai.

4.4.2.5. Các gen dùng để chuyển vào cừu

Các gen dùng để chuyển vào cừu cũng tương tự gen chuyển vào lợn. Việc chuyển gen vào cừu sử dụng các promotor mạnh kết hợp với các gen hoocmon sinh trưởng đã được tiến hành đối với các tổ hợp như: mMT-hGH, mMT-hGRF, PRL-bGH, sMT-sGH$_5$ hay sMT-sGH$_9$ (trong đó sMT: sheep metallothionin, sGH$_5$: sheep growth hoocmon 5, sGH$_9$: sheep growth hoocmon 9 – hoocmon sinh trưởng cừu 5 và 9). Việc chuyển các gen trên nhằm cho cừu lớn nhanh, nhiều thịt nạc, ít mỡ. Ngoài các gen hoocmon sinh trưởng, người ta cũng chuyển một số gen ngoại lai khác vào cừu như chuyển gen của 2 enzym vi khuẩn cải biến serin thành sistein nhằm tăng sức sản xuất len của cừu, gen interferon và gen chống influenza của chuột vào cừu làm tăng cường sức chống bệnh cho cừu.

Clark và cộng sự ở Viện Sinh lý động vật Edinburg đã đưa gen mã hoá yếu tố IX (yếu tố đông máu quan trọng), hoặc đưa gen α_1- antitripsin (gen AAT: chất ức chế protein kinase inhibitor α_1 là chất cần thiết điều trị bệnh viêm phổi) vào cừu đã tạo ra cừu sản xuất sữa có các chất trên để điều trị bệnh. Hãng Genpharm ở California

cũng đã tạo cừu chuyển gen tiết sữa chứa lactoferrin, một hợp chất chống các vi trùng gây bệnh.

4.4.2.6. Các gen dùng để chuyển cho gia cầm

Gà trở thành đối tượng quan trọng trong công nghệ chuyển gen, nhằm tăng khả năng chống bệnh, tăng sản lượng thịt, trứng... Gen beta - glactosidase của vi khuẩn được chuyển vào gà thông qua retroviral vector đã được tiến hành. Angen, một hãng tư nhân đã tạo ra 3 loại gà chuyển gen, đó là: gà kháng bệnh do virus, gà có tốc độ tăng trọng nhanh mang gen hoocmon sinh trưởng của động vật có vú và gà sản xuất một số chất biệt dược chứa trong trứng để chữa bệnh v.v...

4.4.3. Các phương pháp chủ yếu trong chuyển gen ở động vật

Chuyển gen ở động vật có thể bằng nhiều phương pháp khác nhau như chuyển gen bằng vi tiêm, chuyển gen nhờ liposome, chuyển gen nhờ virus và retrovirus, chuyển gen bằng biến nạp, hoặc dùng súng bắn gen. Sau đây chúng ta xem xét một số phương pháp chuyển gen chủ yếu để chuyển gen vào động vật.

4.4.3.1. Chuyển gen nhờ vi tiêm

a) Khái niệm

Chuyển gen thông qua vi tiêm vào phôi non của động vật là sử dụng thiết bị vi thao tác có gắn kim thuỷ tinh cực nhỏ để tiêm đoạn ADN ngoại lai vào tế bào phôi ở giai đoạn 2 đến 4 tế bào. Dịch tiêm là một lượng nhỏ từ 1 đến 2 nanolit (nl). ADN có nồng độ khoảng 30μg/ml, chứa khoảng 10^3 bản sao gen chuyển, được tiêm trực tiếp vào tế bào phôi trần.

b) Quy trình vi tiêm

Quy trình vi tiêm ở động vật khác nhau có những thao tác khác nhau. Tuy nhiên, quy trình chung có những điểm cơ bản giống nhau. Sau đây chúng ta đề cập đến quy trình tạo cá chuyển gen bằng vi tiêm, gồm các bước chính sau (Hình 4.4).

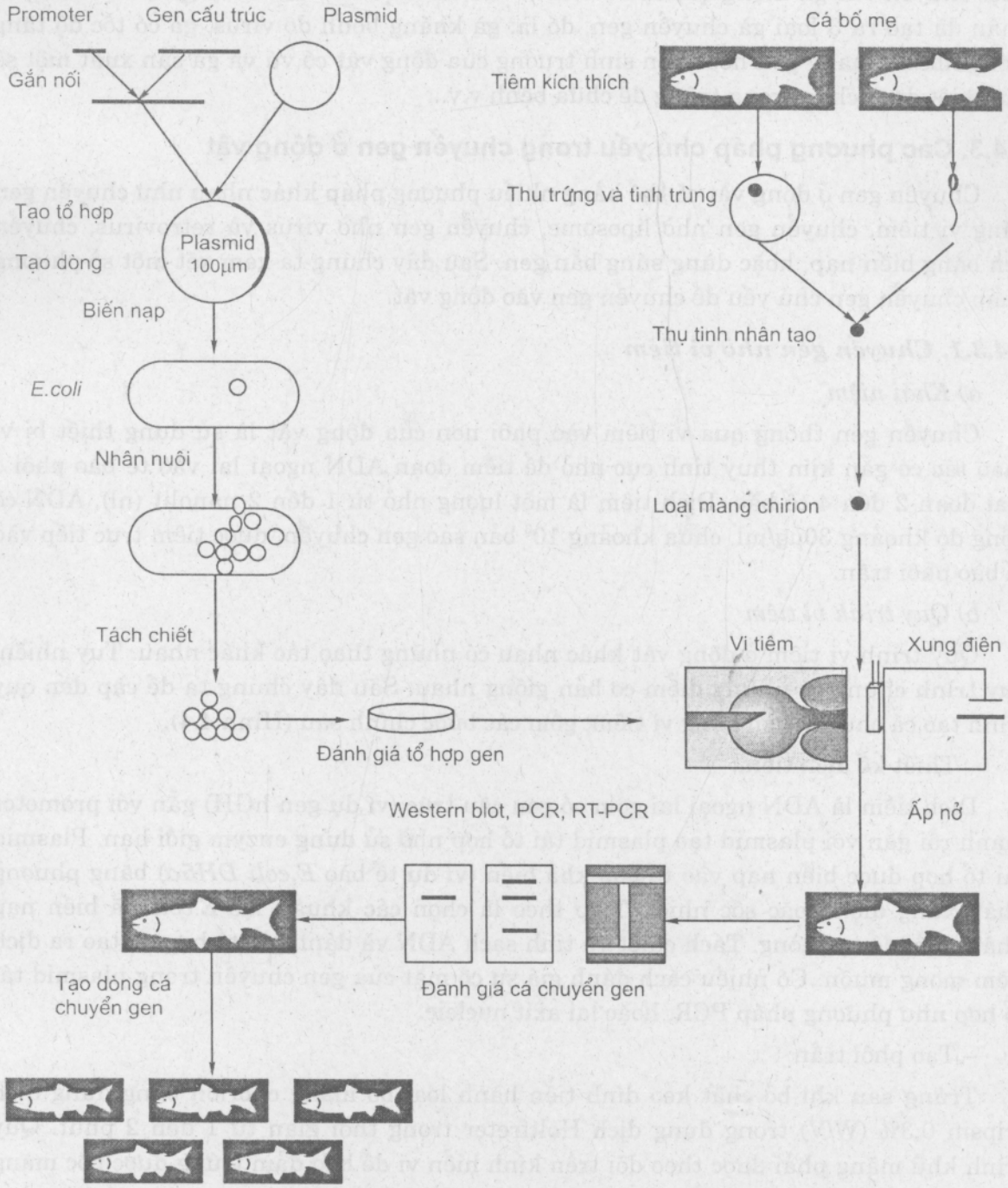
– Thiết kế dịch tiêm:

Dịch tiêm là ADN ngoại lai gồm có gen cấu trúc (ví dụ gen hGH) gắn với promotor mạnh rồi gắn với plasmid tạo plasmid tái tổ hợp nhờ sử dụng enzym giới hạn. Plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào khả biến (ví dụ tế bào *E.coli DH5α*) bằng phương pháp xung điện hoặc sốc nhiệt. Tiếp theo là chọn các khuẩn lạc *E.coli* đã biến nạp nhân nuôi để tạo dòng. Tách chiết và tinh sạch ADN và đánh giá tổ hợp để tạo ra dịch tiêm mong muốn. Có nhiều cách đánh giá sự có mặt của gen chuyển trong plasmid tái tổ hợp như phương pháp PCR, hoặc lai axit nucleic.

– Tạo phôi trần:

Trứng sau khi bỏ chất keo dính tiến hành loại bỏ màng chorion bằng dung dịch tripsin 0,3% (W/V) trong dung dịch Holtfreter trong thời gian từ 1 đến 2 phút. Quy trình khử mặng phải được theo dõi trên kính hiển vi để bảo đảm trứng được bóc màng hoàn toàn mà không làm tổn thương đến trứng. Khi thấy hiện tượng màng chorion bắt đầu bị phân huỷ thì ngừng việc xử lý bằng tripsin và rửa trứng nhiều lần bằng dung

dịch Holtferter (dung dịch muối đẳng trương). Có thể tiến hành bóc màng chorion bằng tay sau khi đã xử lý sơ bộ bằng dung dịch tripsin 0,25% trong khoảng 30 giây. Trứng cá sau khi thụ tinh và xử lý được đưa vào đĩa petri có phủ lớp agar mỏng và đưa lên kính lúp có độ phóng đại 10 lần. Kẹp nhẹ trứng bằng panh kẹp, sau đó xé màng bằng kẹp kim nhỏ. Cần thận trọng, tránh làm vỡ trứng và cần phải thao tác nhanh để khỏi ảnh hưởng đến quá trình vi tiêm.



Hình 4.4. Sơ đồ tạo cá chuyển gen bằng vi tiêm

– Phương pháp vi tiêm:

Để biến nạp gen vào phôi bằng vi tiêm cần phải tạo kim vi tiêm, kim nạp và kim giữ. Đường kính bên trong mũi kim vi tiêm khoảng 0,2μm. Kim giữ được chế tạo bằng ống capillar có đầu nhẵn, đường kính bên trong khoảng 1mm. Sau khi đốt nóng ống capillar, dùng máy kéo kim tự động tạo đầu kim giữ có đường kính bên trong khoảng 80-100μm. Kim nạp cũng được chế tạo bằng ống capillar có đường kính bên trong khoảng 1mm. Hơ ống capillar trên ngọn lửa đèn cồn cho mềm rồi kéo nhanh tạo ống có đầu với kích thước khoảng 0,2μm, chiều dài 10-15cm. Kim nạp này được nối với một bơm tiêm (Syringe) bằng nhựa mềm, hút từ dịch tiêm ADN vào đầy kim nạp rồi đưa đầu kim nạp vào tận đầu mút kim vi tiêm và bơm dung dịch ADN vào trứng.

Bộ vi tiêm thao tác cho phép điều chỉnh các kim theo không gian 3 chiều. Đưa một lượng dịch tiêm khoảng 1-2nl vào mỗi tế bào phôi ở giai đoạn 1 đến 4 tế bào. Sau khi vi tiêm, trứng được ấp trong dung dịch Holtfreter và đảm bảo cung cấp oxy thường xuyên cho trứng. Ở nhiệt độ 28°C, trứng đã vi tiêm sẽ nở sau 48 đến 50 giờ.

– Đánh giá sự hội nhập của gen ngoại lai vào trong hệ gen của cá vi tiêm:

Sau khi vi tiêm cho cá nở, bước tiếp theo là đánh giá sự hội nhập của gen ngoại lai (hGH) vào trong hệ gen của cá bằng phương pháp PCR, gồm các công đoạn:

+ Tách chiết ADN hệ gen cá. Sau khi tách chiết ADN, kiểm tra độ tinh sạch bằng đo tỷ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} phải đạt từ 1,6 đến 2,0.

+ Tiến hành PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen ngoại lai (ví dụ gen hGH). Sau đó kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di. Nếu bản điện di có băng tương ứng với gen ngoại lai là vi tiêm thành công. Trường hợp vi tiêm hGH thì xuất hiện ở bản điện di băng 479bp thì vi tiêm gen hGH đã thành công.

– Đánh giá sự biểu hiện gen ngoại lai vào cá vi tiêm:

Gen ngoại lai (hGH) sau khi hội nhập vào hệ gen của cá có thể biểu hiện hoặc không biểu hiện. Sự biểu hiện của gen hội nhập thể hiện ở mức độ phiên mã và dịch mã. Đánh giá mức độ phiên mã bằng cách tách chiết ARN tổng số, sau đó sử dụng phương pháp RT-PCR (Revert Transcription PCR: Phản ứng PCR phiên mã ngược) để xác định sự biểu hiện của gen ngoại lai ở mức độ phiên mã tạo mARN. Sản phẩm RT-PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Nếu xuất hiện băng 479bp là gen được biểu hiện.

Cũng có thể kiểm tra sự biểu hiện của gen ngoại lai (hGH) bằng việc xem xét mức độ tăng trọng và hiệu suất sử dụng thức ăn. Nếu chuyển gen hGH thành công thì cá vi tiêm tăng trọng nhanh và có hiệu suất sử dụng thức ăn cao hơn hẳn so với cá đối chứng.

4.4.3.2. Chuyển gen bằng sử dụng liposom để xử lý tinh trùng

a) Khái niệm

Chuyển gen bằng sử dụng liposom là kỹ thuật ủ tinh trùng với liposom chứa plasmid tái tổ hợp mang gen ngoại lai, sau đó dùng tinh trùng này cho thụ tinh nhân tạo. Từ đó sẽ tạo ra phôi mang gen ngoại lai. Bình thường tinh trùng không dung hợp các đoạn ADN trần, nhưng khi sử dụng liposom là các màng lipit gói bọc ADN ngoại lai

thì có thể đưa chúng vào bên trong tinh trùng. Tinh trùng mang gen ngoại lai được thụ tinh với trứng cho hợp tử chuyển gen.

b) Các bước tiến hành

– Phương pháp:

Plasmid tái tổ hợp mang gen ngoại lai được đóng gói trong liposom rồi được phủ một lớp mỏng tinh trùng, với khoảng 10^7 tinh trùng, ở 37°C trong thời gian 30 phút. Sau đó lấy tinh trùng đã xử lý này cho thụ tinh nhân tạo. Thế hệ con F_1 được kiểm tra gen chuyển và sự biểu hiện của gen chuyển. Kiểm tra gen chuyển được dung hợp hay không ở thế hệ con bằng phương pháp PCR, hoặc bằng phương pháp lai Southern blot. Sự biểu hiện của gen chuyển còn được xác định bằng phương pháp điện di máu trên gel polyacrylamid. Nếu chuyển gen thành công thì băng điện di protein sẽ xuất hiện băng protein tương ứng với gen chuyển mã hóa.

– Ưu điểm:

Phương pháp chuyển gen bằng thụ tinh nhân tạo dễ thực hiện. Việc xử lý tinh trùng với liposom chứa ADN ngoại lai và sự hoà nhập của chúng vào tinh trùng không ảnh hưởng đến khả năng sinh sản cũng như sức sống của thế hệ con. Phương pháp này phù hợp với việc tạo ra một số lượng lớn con cháu chuyển gen.

4.4.3.3. Chuyển gen nhờ virus và retrovirus

a) Khái niệm

Chuyển gen nhờ virus là phương pháp đưa gen ngoại lai chèn vào hệ gen virus, sau đó cho virus nhiễm vào tế bào chủ để chuyển gen vào tế bào chủ.

Chuyển gen nhờ retrovirus mang gen ngoại lai: Sau khi xâm nhiễm vào tế bào chủ, retrovirus sẽ tổng hợp ra cADN nhờ enzym phiên mã ngược. cADN mạch kép của gen ngoại lai sẽ được chèn vào hệ gen của tế bào chủ. Có nhiều loại virus, retrovirus có thể được sử dụng để chuyển gen. Sau đây chúng ta xét một trường hợp chuyển gen nhờ retrovirus.

b) Các bước tiến hành

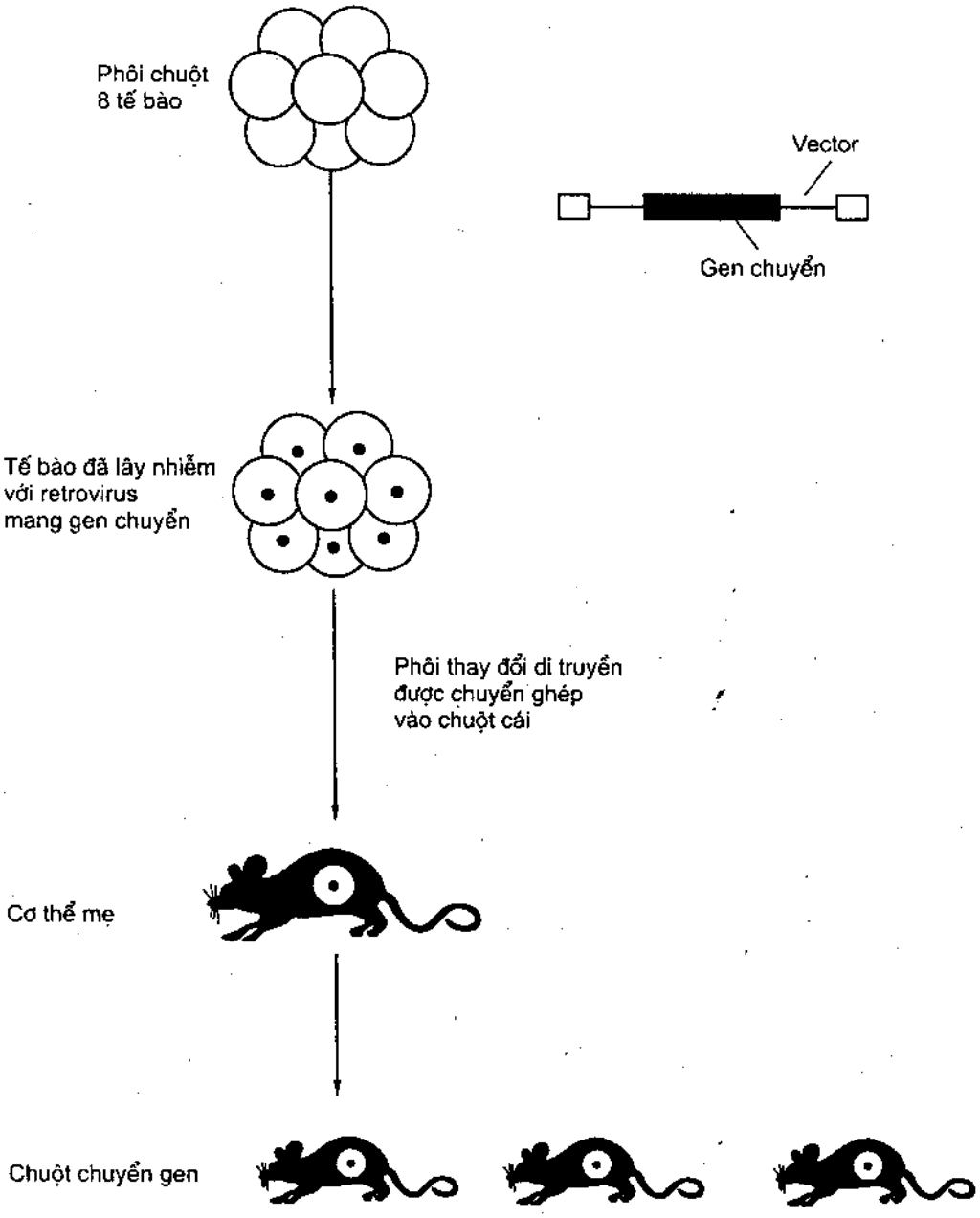
Retrovirus có hệ gen là ARN có thể chuyển thành mạch ADN mạch kép bằng enzym phiên mã ngược của retrovirus. Khi xâm nhiễm vào tế bào vật chủ thì ARN chứa gen ngoại lai của retrovirus hình thành ADN kép và ADN mạch kép này gắn với hệ gen của tế bào chủ. ADN của retrovirus sau khi gắn vào tế bào chủ có thể truyền lại cho tế bào vật chủ, gen ngoại lai đã được retrovirus chuyển vào và được truyền lại cho thế hệ sau.

Cách chuyển gen thường là sử dụng tế bào mầm được nuôi cấy và cho lây nhiễm với retrovirus mang gen ngoại lai trước khi tế bào mầm biệt hoá thành tinh trùng là có hiệu quả. Tinh trùng sau khi mang gen ngoại lai từ retrovirus sẽ cho thụ tinh nhân tạo. Cũng có thể chuyển gen vào tế bào phôi rồi đưa vào cơ thể mẹ. Vì thế muốn sử dụng retrovirus làm vector chuyển gen trước hết phải loại bỏ gen gây ung thư của nó, đồng thời phải loại bỏ một phần hệ gen của retrovirus để tạo ra một khoảng trống làm nơi gắn gen ngoại lai.

c) Ứng dụng

Chuyển gen nhờ retrovirus đã được sử dụng để chuyển gen cho cá mú vằn (*Danio*

rerio), hoặc cá medaka (*Oryzias latipes*) vào chuột (*Mus musculen*). Tỷ lệ cá mang gen ngoại lai là 5,6%. Chuyển gen nhờ retrovirus cũng có thể ứng dụng để chữa trị một số khuyết tật di truyền, ví dụ, để phục hồi việc sản xuất insulin ở những người đái tháo đường. Tuy nhiên, cần hết sức thận trọng khi sử dụng các virus và retrovirus để chuyển gen. Các virus và retrovirus phải đảm bảo an toàn và phải biết tường tận về chúng trước khi sử dụng chúng làm vector chuyển gen. Sơ đồ chuyển gen nhờ retrovirus vào tế bào chuột được thể hiện ở Hình 4.5.



Hình 4.5. Sơ đồ chuyển gen nhờ retrovirus
(Nguồn: Winter P.C. và cộng sự, 1998)

4.4.3.4. Chuyển gen nhờ gen nhảy

a) Khái niệm

Ở một số loại sinh vật nhân chuẩn như ngô, ruồi giấm... trong hệ gen của chúng có các đoạn ADN tồn tại ở dạng nhiều bản sao và có khả năng vận động sang các vị trí mới trong hệ gen. Các đoạn ADN đó được gọi là các yếu tố di truyền vận động (Transposable genetic element - TGE). Yếu tố di truyền vận động đầu tiên được phát hiện là một đoạn xen (insertion sequence - IS). Đó là đoạn ADN nhỏ không mang gen nào. Những yếu tố khác có mang gen được gọi là gen nhảy (transposon). Các gen nhảy thường chứa khoảng vài ngàn cặp nucleotit và được ký hiệu là T_n kèm theo chữ số, ví dụ, T_{n3}. Nếu gen nhảy có mang gen nào đó thì người ta ký hiệu gen vào trong ngoặc. Ví dụ T_{n3} (amp-r) là gen nhảy T_{n3} mang gen kháng ampiciline. Gen này là gen đánh dấu để phát hiện sự di chuyển, vận động của gen nhảy.

b) Cơ chế hoạt động của gen nhảy

Cơ chế xen của gen nhảy vào nhiễm sắc thể có thể hình dung như sau:

Tại điểm đích, nơi mà gen nhảy xen vào trên nhiễm sắc thể (điểm đích) xảy ra một vết cắt hình chữ chi. Gen nhảy sẽ xen vào giữa sau đó vết cắt được hàn lại theo nguyên tắc bổ sung. Kết quả nhiễm sắc thể sẽ mang gen mới do gen nhảy đem đến.

c) Ứng dụng

Gen nhảy được dùng làm vector chuyển gen ở nhiều loài động vật, đặc biệt là các loài côn trùng như ruồi giấm *Drosophila* hay ở muỗi sốt rét *Anopheles*.

Các yếu tố đáp ứng đầy đủ các yêu cầu chuyển gen ngoại lai vào các loài côn trùng khác nhau như: *Minos, Hermes, Marier, Piggy* tách ra từ *Drosophila, Musca domestica* và từ *Trichoplusia*. Các gen đánh dấu cho chuyển gen nhờ gen nhảy là các gen quy định tính trạng về hình thái, gen protein phát màu huỳnh quang GFP, RFP hay YFP.

4.4.4. Các hướng mới và thành tựu ứng dụng động vật chuyển gen

Động vật chuyển gen được ứng dụng nhiều trong các lĩnh vực khác nhau như nghiên cứu khoa học cơ bản, ứng dụng trong chăn nuôi, tạo giống và ứng dụng trong y học. Những thành tựu chủ yếu trong việc tạo động vật chuyển gen là làm tăng khả năng sinh trưởng của các vật nuôi nhờ chuyển gen hoocmon sinh trưởng, hoặc chuyển gen làm tăng sức sản xuất trứng, len và những đặc tính mới khác. Tuy nhiên hiện nay, người ta quan tâm nhiều đến việc chuyển gen ở động vật để tạo sản phẩm nuôi như các chất dược liệu, hoặc để tạo ra các nội tạng thay thế cho người.

4.4.4.1. Chuyển gen vào động vật để sản xuất protein trị liệu

Từ 1986, người ta đã đề xuất việc sản xuất các protein làm dược liệu. Bằng cách chuyển gen vào động vật lấy sữa đã thu được sữa có chứa các protein kháng khuẩn, chống viêm. Việc chuyển gen mã hoá cho protein trị liệu như yếu tố đông máu Factor IX, hoặc protein ức chế enzym protease α1 (α1- antitrypsin) đã cho hàm lượng các chất này trong sữa rất cao, cho phép điều trị bệnh bằng cách uống sữa.

Ở Mỹ, chuyển gen cho dê *Alpine* đã sản xuất sữa chứa protein điều trị ung thư có tên là BR96. Người ta cũng chuyển gen vào cừu, hoặc bò để sản xuất albumin bổ sung

cho những người bị bệnh suy dinh dưỡng, suy gan. Uống sữa cừu, sữa bò chuyển gen sản xuất albumin là phương pháp rẻ tiền nhất điều trị bệnh suy dinh dưỡng cho người.

4.4.4.2. Chuyển gen vào động vật nhằm tạo ra nội tạng thay thế

Vấn đề cung cấp nội tạng thay thế cho người là vấn đề hết sức khó khăn nếu chỉ dựa vào nguồn cung cấp từ chính con người. Hướng sử dụng nội tạng động vật chủ yếu là của lợn là hướng có nhiều triển vọng. Trường Đại học Cambrige đã tạo ra lợn chuyển gen có tim mang protein người dùng để ghép cho người mà không gây hiện tượng thải ghép. Ca ghép tim lợn chuyển gen cho người đầu tiên cho thấy sau một năm, quả tim lợn vẫn hoạt động bình thường trong cơ thể người. Hiện tại, các nhà khoa học đã tạo ra hàng trăm con lợn có thể cung cấp các nội tạng như tim, thận, gan... nhằm để ghép cho người.

Chương 5

CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN THỰC VẬT

5.1. KHÁI NIỆM CHUNG VỀ CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN THỰC VẬT

Ngay từ giai đoạn đầu khi con người biết trồng trọt, người ta đã có ý thức chọn lọc các cây trồng theo những đặc tính có lợi cho con người.

Từ lúc bắt đầu trồng trọt đến cuối thế kỷ XIX, tất cả những giống cây trồng được cải tạo thường do người nông dân thực hiện dựa vào kinh nghiệm của họ. Quá trình chọn lọc tốn thời gian hàng chục, thậm chí hàng trăm năm nhưng hiệu quả lại không cao.

Vào nửa đầu thế kỷ XX, thành tựu về cải tiến giống cây trồng diễn ra mạnh mẽ nhờ có những thành tựu nghiên cứu về sinh học như việc khám phá ra định luật di truyền Mendel, khám phá ra hiện tượng di truyền liên kết của Morgan và những kết quả nghiên cứu khác, từ đó tạo ra cây trồng mang biến dị tổ hợp của nhiều gen có lợi. Cùng với sự ra đời của các kỹ thuật gây đột biến bằng các tác nhân vật lý như tia X, tia gama, tia nơtron và các hóa chất, người ta sử dụng kỹ thuật đột biến trong cải tạo hệ gen của cây trồng nên đã tạo ra nhiều giống mới có nhiều đặc tính quý. Trồng trọt gồm có 3 ngành chính: Giống cây trồng, Bảo vệ Thực vật và Kỹ thuật canh tác. Theo G. Wenzel, năm 1998, thì công nghệ sinh học đều ứng dụng vào cả 3 ngành chính của trồng trọt.

Công nghệ sinh học thực vật từ khi ra đời được phát triển theo 3 giai đoạn chính:

– Giai đoạn từ 1937 đến 1957: Nuôi thành cônddowif*f*, tế bào như tế bào cà rốt, phát hiện vai trò của các vitamin và của các chất điều hòa sinh trưởng như auxin và cytokinin.

– Giai đoạn từ 1958 đến 1992: Tách và nuôi tế bào đơn, tạo tế bào trần (protoblast) và tái sinh cây, tạo cây đơn bội bằng nuôi cấy bao phấn. Đặc biệt từ năm 1980, phát triển công nghệ di truyền (công nghệ gen) thực vật.

– Giai đoạn từ 1992 đến 2005: Ứng dụng các thành tựu công nghệ di truyền vào sản xuất với quy mô lớn và trên diện rộng.

Như vậy công nghệ di truyền thực vật có thể hiểu là công nghệ sử dụng các kỹ thuật hiện đại được thực hiện trên tế bào và axit nucleic (ADN và ARN) để nghiên cứu cấu trúc và điều chỉnh về biến đổi gen, chuyển gen mong muốn vào tế bào nhằm tạo ra cơ thể thực vật mang những đặc tính mới cũng như sản phẩm mới.

Sản phẩm của công nghệ di truyền thực vật là các cây trồng được tạo ra từ mô, hoặc tế bào của cây, các cây trồng chuyển gen có những tính trạng mới phù hợp với lợi ích của con người. Công nghệ di truyền thực vật gồm có 2 lĩnh vực chính là công nghệ nuôi cấy mô, tế bào thực vật và kỹ thuật chuyển gen vào thực vật.

5.2. CÔNG NGHỆ NUÔI CẤY MÔ VÀ TẾ BÀO THỰC VẬT

5.2.1. Cơ sở nuôi cấy mô và tế bào thực vật

5.2.1.1. Khái niệm

Nuôi cấy mô, tế bào thực vật là phạm trù khái niệm chung cho tất cả các loại nuôi cấy các nguyên liệu (tế bào, mô, phôi...) thực vật hoàn toàn sạch các vi sinh vật, trên môi trường dinh dưỡng nhân tạo trong điều kiện vô trùng.

Nuôi cấy mô, tế bào bao gồm nuôi cây non, cây trưởng thành, nuôi cấy các bộ phận cơ quan như rễ, thân, lá, hoa, bao phấn, noãn chưa thụ tinh, ... nuôi cấy phôi, nuôi cấy mô sẹo, nuôi cấy các tế bào đơn và nuôi cấy tế bào trần (protoblast). Nuôi cấy tế bào thực vật thực hiện trong ống nghiệm (invitro) khác với quá trình nuôi trồng cây ngoài điều kiện tự nhiên.

Nuôi cấy mô, tế bào thực vật thường sử dụng các bộ phận nuôi cấy khác nhau với mục đích khác nhau:

– Nuôi cấy các đỉnh sinh trưởng, chóp rễ nhằm nhân nhanh dòng cây đồng nhất về di truyền và làm sạch bệnh do virus, vi khuẩn.

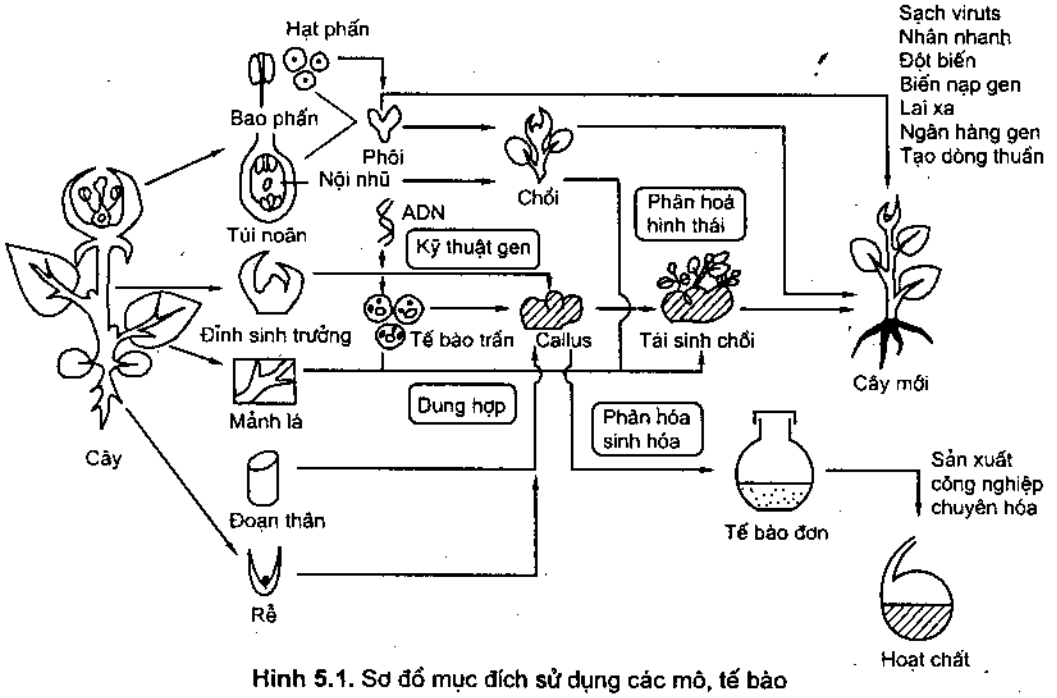
– Nuôi cấy bầu, noãn chưa thụ tinh, hoặc bao phấn nhằm tạo cây đơn bội, tạo dòng đồng hợp tử.

– Nuôi cấy phôi nhằm mục đích cứu phôi khi lai xa, từ đó nhân dòng cây lai xa và phá hiện tượng ngủ nghỉ của hạt.

– Nuôi cấy mô sẹo (callus) nhằm mục đích tạo dòng vô tính, tạo dòng tế bào đơn và tạo cây có biến dị soma.

– Nuôi cấy tế bào để tạo dòng tế bào đơn, từ đó tạo ra tế bào trần để lai vô tính, hoặc để biến nạp gen, chuyển gen.

Sơ đồ sử dụng các mô, tế bào vào các mục đích khác nhau thể hiện ở Hình 5.1.



Hình 5.1. Sơ đồ mục đích sử dụng các mô, tế bào

5.2.1.2. Cơ sở kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật

a) Cơ sở khoa học của kỹ thuật nuôi cấy mô, tế bào

– Tính toàn năng của tế bào:

Về tính toàn năng của tế bào đầu tiên được Haberlandt (1902) đề cập. Ông cho rằng, mỗi tế bào bất kỳ của cơ thể đa bào đều tiềm tàng khả năng phát triển thành một cá thể hoàn chỉnh. Theo quan điểm của sinh học hiện đại thì mỗi tế bào riêng rẽ đã phân hóa đều mang toàn bộ thông tin di truyền của toàn bộ cơ thể. Trong điều kiện thích hợp, mỗi một tế bào đều có thể phát triển thành một cơ thể hoàn chỉnh. Đó là tính toàn năng của tế bào. Tính toàn năng của tế bào là cơ sở khoa học của phương pháp nuôi cấy mô, tế bào thực vật. Hiện nay, người ta đã thực hiện được khả năng tạo ra một cơ thể thực vật hoàn chỉnh từ một tế bào riêng rẽ.

– Sự phân hóa và phản phân hóa của tế bào:

Cơ thể thực vật trưởng thành là một tổng thể thống nhất bao gồm nhiều cơ quan khác nhau, có chức năng khác nhau và được hình thành từ nhiều loại tế bào khác nhau. Tuy nhiên, tất cả các loại tế bào đều bắt nguồn từ một tế bào hợp tử ban đầu. Tế bào hợp tử đầu tiên lúc đầu phân chia thành khối tế bào chưa chuyên hóa. Các tế bào chưa chuyên hóa này tiếp tục phân chia và biến đổi thành các tế bào chuyên hóa đặc trưng cho các mô, cơ quan có chức năng khác nhau. Đó là hiện tượng phân hóa tế bào. Tuy nhiên, các tế bào chuyên hóa thành các tế bào chuyên biệt lại không mất hoàn toàn sự biến đổi của mình. Trong những điều kiện thích hợp nhất định chúng có thể trở thành dạng tế bào như tế bào ban đầu, nghĩa là ở dạng tế bào chưa chuyên hóa. Hiện tượng này gọi là hiện tượng phản phân hóa tế bào.

Sự phân hóa và phản phân hóa tế bào là một quá trình hoạt hóa, ức chế hoạt động của các gen. Trong một giai đoạn phát triển nhất định của cây, một số gen nào đó đang ở trạng thái ức chế không hoạt động được hoạt hóa để cho ra một tính trạng biểu hiện mới. Ngược lại một số gen lại bị ức chế đình chỉ hoạt động. Quá trình hoạt hóa, ức chế diễn ra theo một chương trình đã được lập sẵn trong cấu trúc hệ gen của tế bào, giúp cho sự sinh trưởng, phát triển của cơ thể thực vật được hài hòa. Sự hoạt động hài hòa của các tế bào và mô cơ quan còn phụ thuộc vào tế bào nằm trong khối mô, cơ quan của cơ thể. Khi tách riêng từng tế bào, hoặc làm giảm kích thước khối mô sẽ tạo điều kiện cho việc hoạt hóa các gen của tế bào.

Kỹ thuật nuôi cấy mô, tế bào thực chất là kỹ thuật điều khiển phát triển sự phát sinh hình thái của tế bào thực vật một cách có định hướng dựa vào sự phân hóa và phản phân hóa của tế bào thực vật. Để điều khiển sự phát sinh hình thái của tế bào, người ta bổ sung vào môi trường nuôi cấy hai nhóm chất điều hòa sinh trưởng thực vật là auxin và cytokinin. Tỷ lệ hàm lượng của 2 nhóm chất điều hòa sinh trưởng này trong môi trường nuôi cấy khác nhau sẽ định hướng cho sự phát sinh hình thái (phát sinh chồi, rễ, hoặc mô sẹo) của mô nuôi cấy khác nhau. Trong môi trường nuôi cấy, tỷ lệ nồng độ auxin/cytokinin (đại diện là IAA/kinetin) là thấp thì mô nuôi cấy phát sinh theo hướng tạo chồi, tỷ lệ này cao thì mô nuôi cấy sẽ tạo ra mô sẹo.

b) Yêu cầu kỹ thuật của nuôi cấy mô, tế bào thực vật

– Các thiết bị hóa chất bao gồm:

+ Cân phân tích, cân kỹ thuật, tủ đựng hóa chất, tủ lạnh, máy đo pH, nồi khử trùng v.v...

+ Buồng cấy, hoặc tủ cấy vô trùng: Buồng cấy với điều kiện phải kín, dễ diệt trùng, bảo đảm khi nuôi cấy không bị nhiễm khuẩn.

+ Buồng nuôi cấy. Buồng nuôi cấy bảo đảm ổn định nhiệt độ (25°C), đảm bảo điều chỉnh đủ ánh sáng, chu kỳ chiếu sáng (hoặc bóng tối) thích hợp với từng yêu cầu nuôi cấy các loại mô. Các giá để nuôi cấy có thể bằng gỗ, bằng sắt hoặc thép không gỉ. Kích thước phải phù hợp với từng loại cây và quy mô thí nghiệm.

– Môi trường nuôi cấy mô, tế bào thực vật

Có nhiều loại môi trường khác nhau, có thành phần và tỷ lệ thành phần khác nhau. Tuy nhiên, có một số thành phần cơ bản đó là:

+ Các thành phần môi trường bao gồm: các loại muối, nguồn cacbon, vitamin, các chất điều hòa sinh trưởng, các nhóm chất bổ sung và các chất độn. Các loại muối khoáng dùng trong môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật gồm các nguyên tố đa lượng (NO_3^-, NH_4^+, SO_4^{2-}, HPO_4^{2-}, $H_2PO_4^-$...) và các nguyên tố vi lượng (Fe, B, Mn, Mo, Cu, Zn...).

+ Nguồn cacbon chủ yếu là các loại đường sucrose, dextrine, glycerin, rượu và cũng có thể là axit hữu cơ.

Vitamin cần bổ sung vào môi trường nuôi cấy bao gồm các loại như vitamin B_1, vitamin B_2, vitamin B_6, Biotin...

Các nhóm chất bổ sung bao gồm nước dừa, dịch chiết mầm lúa mì, dịch chiết nấm men, dịch thủy phân cazein v.v...

Các chất điều hòa sinh trưởng bao gồm có auxin và cytokinin. Auxin là hoocmon sinh trưởng kích thích sự sinh trưởng của tế bào gồm có 4 loại indolylacetic axit (IAA), naphthylacetic axit (NAA); 2,4D và Indolylbutyric axit (IBA). Cytokinin là hoocmon phân bào gồm có 3 loại là kinetin: một dẫn xuất của bazơ hữu cơ adenin; zeatin cũng là một dẫn xuất của adenin và một loại cytokinin nữa rẻ tiền hơn là 6-Benzylaminopurin (BAP). Bên cạnh đó còn có một số chất điều hòa sinh trưởng khác như Gibberellic axit (GA3); abscisic axit (ABA) cũng được sử dụng trong nuôi cấy mô để phát triển hoa, tăng chiều cao và tăng sức chống chịu của cây.

c) Một số môi trường cơ bản dùng để nuôi cấy mô tế bào

Thành phần của các môi trường nuôi cấy cũng như tỷ lệ của các thành phần có thể khác nhau tùy thuộc vào nguồn gốc mô, tế bào và yêu cầu của việc nuôi cấy. Có nhiều loại môi trường nuôi cấy khác nhau. Sau đây là một số môi trường phù hợp với các đối tượng khác nhau:

– Môi trường Murashige-Skoog (MS) là môi trường được sử dụng rộng rãi nhất trong việc nuôi cấy mô tế bào thực vật. Môi trường MS thích hợp cho việc nuôi cấy

thực vật một lá mầm và hai lá mầm. Ngày nay trên cơ sở môi trường MS, người ta cải tiến thành nhiều môi trường khác nhau, quan trọng nhất là bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng.

– Môi trường Anderson là môi trường chuyên dùng cho việc nhân giống vô tính các cây thuộc họ Đỗ quyên (Rhododendron). Nồng độ các loại muối khoáng của môi trường Anderson chỉ bằng một nửa so với môi trường MS. Tuy nhiên, môi trường này có thể bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BAP và 6-Dimethylamylaminopurin. Môi trường này cũng phù hợp cho việc nuôi cấy các cây thân gỗ nhỏ.

– Môi trường Gamborg: Bao gồm các loại muối khoáng như amonium nitrat, cancium chlorid, sulphat đồng, sulphat magie, sulphat mangan, muối kali, các chất hữu cơ, một số chất điều hòa sinh trưởng. Đây là môi trường thử nghiệm đầu tiên để nuôi cấy đậu tương, sau đó áp dụng dùng để nhân giống vô tính, nuôi cấy tế bào trần.

– Môi trường nuôi cấy hoa phong lan: Trên cơ sở thành phần môi trường khác nhau, hãng Sigma đã đưa ra một số môi trường nuôi cấy phong lan. Trong những môi trường này bao gồm các loại muối khoáng amonium sulphat, cancium chlorid, sulphat magie, sulphat đồng, sulphat mangan, myoindositol, nicotilic axit, pepton, hoặc sucrose.

5.2.2. Nhân giống cây trồng bằng nuôi cấy mô, tế bào

5.2.2.1. Khái niệm và mục đích chung

Trong ngành trồng trọt, nhiều trường hợp đòi hỏi phải nhân nhanh một kiểu gen ưu tú bằng cách sử dụng mô tế bào sinh dưỡng để tạo thành các dòng, giống cây mới có cùng một kiểu gen. Nói chung, gần như tất cả các phần, thậm chí các tế bào của cây tươi có thể dùng làm mẫu để nuôi cấy mô như rễ, lá, thân, phấn hoa, noãn, thịt của lá v.v... Nguyên tắc cơ bản là mẫu phải chứa tế bào sống lấy từ các mô non trong đó có nhiều tế bào đang phân chia. Cây được chọn để lấy mô tế bào phải có phẩm chất tốt, năng suất cao, không bị bệnh và không ở trạng thái ngủ, nghỉ.

– Kỹ thuật nhân nhanh các giống cây trồng invitro có những ưu việt hơn các phương pháp nhân giống khác đó là:

+ Có thể nhân giống cây trồng ở quy mô công nghiệp.

+ Có hệ số nhân rất cao và cho các cá thể hoàn toàn đồng nhất về mặt di truyền.

+ Sạch bệnh, cho sản phẩm đồng loạt, thuận tiện cho thu hoạch lớn.

– Kỹ thuật nhân nhanh giống cây trồng được ứng dụng vào các mục đích sau:

+ Giữ gìn và nhân nhanh các kiểu gen quý làm vật liệu cho công tác giống.

+ Nhân nhanh các loài, giống hoa quý, các giống cây cảnh khó trồng bằng hạt.

+ Nhân nhanh kết hợp với việc làm sạch virus, sạch bệnh.

+ Bảo quản vốn gen, tập đoàn gen.

Bằng phương pháp nhân nhanh giống cây trồng trên cơ sở nuôi cấy mô, tế bào người ta đã nhân nhiều giống hoa (hoa lan, cẩm chướng, hoa đồng tiền, hoa lily, hoa cúc...), các cây lương thực, thực phẩm (khoai tây, mía, cà phê, măng tây, củ cải, cà

chua...), các cây ăn quả (chuối, dứa, cam, chanh...), các cây lâm nghiệp (bạch đàn, keo tai tượng, keo lá chàm, thông, tùng...), các loại cây cảnh (si, sung, đa, lộc vừng...).

5.2.2.2. Quy trình nhân giống vô tính invitro

Cho tới nay, có gần 400 loài cây đã được nhân giống theo con đường vô tính invitro. Theo Murashige (1974) và Georger (1993), quy trình nhân giống vô tính gồm các bước sau:

Bước 1: Chọn lọc và chuẩn bị cây mẹ

Trước khi tiến hành nhân giống invitro cần chọn lọc cần chọn lọc cẩn thận các cây mẹ (cây lấy mẫu, mô, tế bào để nuôi cấy). Các cây mẹ phải là cây sạch bệnh, sạch nấm, sâu, đặc biệt là sạch virus. Cây lấy mẫu nuôi cấy mô phải là cây ở giai đoạn sinh trưởng mạnh. Các cây này phải được trồng trong điều kiện thích hợp, có chế độ chăm sóc tốt và phòng trừ sâu bệnh tốt trước khi lấy mẫu mô, tế bào. Có như vậy thì mới làm giảm mẫu nhiễm bệnh và tăng khả năng sống và sinh trưởng của mẫu nuôi cấy invitro.

Bước 2: Nuôi cấy khởi động

Đây là giai đoạn lấy mẫu, khử trùng và đưa vào nuôi cấy invitro. Giai đoạn nuôi cấy khởi động phải bảo đảm tỷ lệ nhiễm virus, nhiễm bệnh rất thấp, tỷ lệ sống cao, các mô phải tồn tại và sinh trưởng tốt. Khi lấy mẫu phải chọn đúng loại mô, đúng giai đoạn phát triển cần thiết. Thông thường người ta lấy mô ở đỉnh chồi ngọn, đỉnh chồi nách rồi đến đỉnh chồi hoa và có thể là đoạn thân non, hoặc mảnh lá non. Đỉnh chồi ngọn, đỉnh chồi nách dùng để nhân nhanh nhiều loài cây trồng như: dứa, khoai tây, thuốc lá, cà chua, hoa cúc, hoa hồng... Đỉnh chồi hoa để nhân nhanh súp lơ. Mảnh lá mầm để nhân nhanh họ bầu bí v.v... Sử dụng chồi non của hạt nảy mầm cũng dễ dàng nhân nhanh nhiều loại cây trồng.

Bước 3: Nhân nhanh

Đây là giai đoạn kích thích mô nuôi cấy phát sinh hình thái và tăng nhanh số lượng cây thông qua con đường tạo chồi và tạo phôi vô tính. Tùy theo môi trường và điều kiện ngoại cảnh thích hợp mà việc nhân nhanh có hiệu quả cao. Nếu môi trường có hàm lượng cytokinin cao sẽ kích thích tạo chồi ở giai đoạn đầu. Điều kiện nuôi cấy thích hợp để nhân nhanh là ở nhiệt độ 25°C-27°C, thời gian chiếu sáng là 16h/ ngày đêm và cường độ chiếu sáng khoảng 2000-4000lux. Tuy nhiên, tùy theo từng loài mà có chế độ môi trường cũng như điều kiện khác nhau. Ví dụ, nhân nhanh các loài hoa thập tự (súp lơ, su hào...) chỉ cần thời gian chiếu sáng 9-10h/ngày đêm; còn nhân các loài hoa phong lan thì giai đoạn đầu lại để trong tối.

Bước 4: Tạo cây invitro hoàn chỉnh

Muốn tạo cây hoàn chỉnh thì khi có chồi phải tạo rễ cho chồi. Muốn tạo rễ cho chồi cần chuyển chồi sang môi trường tạo rễ. Môi trường tạo rễ có tỷ lệ auxin/cytokinin cao. Do vậy cần bổ sung vào môi trường tạo rễ một lượng nhỏ auxin. Khi ở môi trường tạo rễ thích hợp, chồi sẽ tạo rễ ngay sau khi được chuyển sang môi trường mới.

Bước 5: Chuyển cây invitro ra vườn ươm

Để chuyển cây invitro ra vườn ươm ngoài tự nhiên có tỷ lệ sống cao, sinh trưởng tốt, cần bảo đảm một số yêu cầu sau:

– Cây invitro phải đạt tiêu chuẩn về hình thái nhất định, có một số lá nhất định, có bộ rễ và chiều cao cây thích hợp.

– Giá thể trồng cây invitro phải bảo đảm sạch, tơi xốp, thoát nước và có đủ điều kiện dinh dưỡng phù hợp.

– Vườn ươm phải chủ động điều chỉnh được nhiệt độ, độ ẩm, chế độ chiếu sáng cũng như chế độ dinh dưỡng phù hợp.

5.2.2.3. Các phương thức nhân nhanh giống vô tính cây invitro

Nhân giống vô tính invitro đã bổ sung cho các kỹ thuật nhân giống vô tính cổ điển như giâm cành, giâm chồi, chiết, ghép và có ưu thế chủ yếu, đó là:

– Tính khả thi rộng: Với kỹ thuật giâm cành, chiết cành... chỉ có thể thực hiện ở một số loài cây trồng nhất định như các cây ăn quả (cam, quýt, táo...) và một số cây trồng khác. Khi nuôi cấy mô có thể sử dụng để nhân với nhiều loài cây ăn quả, cây lâm nghiệp và hiệu quả tác động cao hơn.

– Tốc độ nhân giống cao: Hệ số nhân giống invitro rất cao, có thể đạt tới hệ số từ 3^5 đến 10^{10}, tùy loài cây trồng.

– Có khả năng công nghiệp hóa cao: Nuôi cấy mô ở trong điều kiện môi trường dinh dưỡng ổn định, điều kiện chiếu sáng, độ ẩm... có thể chủ động, không phụ thuộc vào mùa vụ. Do vậy hoàn toàn có thể sản xuất giống cây theo quy mô công nghiệp.

Có nhiều phương thức nhân nhanh giống vô tính. Sau đây là một số phương thức nhân nhanh giống vô tính invitro:

a) Hoạt hóa chồi nách

Sự phát triển của chồi được kích thích bằng cách loại bỏ chồi ngọn khi nuôi cấy đỉnh chồi, hoặc đoạn thân mang mắt ngủ. Theo phương thức này, để hoạt hóa chồi nách cần tiến hành theo hai cách tùy thuộc vào loài cây trồng:

– Tạo ra cây trực tiếp từ chồi nách. Cách này thường áp dụng khi nuôi cấy các loài cây hai lá mầm như thuốc lá, khoai tây, hoa cúc...

– Tạo ra cụm chồi từ chồi nách. Trường hợp này áp dụng với các cây một lá mầm như mía, lúa...

b) Tạo chồi bất định

Ngoài phương pháp sử dụng nách, hoặc chồi đỉnh có thể sử dụng các bộ phận khác như mẩu thân cây, mảnh lá, cuống hoa, dẻ hành... vào việc nhân giống vô tính. Trường hợp này phải thực hiện quá trình phản phân hóa và tái phân hóa để bắt các tế bào soma hình thành chồi trực tiếp, hoặc tạo chồi gián tiếp qua mô sẹo (callus).

Nếu tái sinh cây hoàn chỉnh trực tiếp không qua mô sẹo thì thu được cây nhanh chóng và đồng nhất về di truyền. Phát triển cây từ chồi trực tiếp, thường áp dụng trên đối tượng hai lá mầm như khoai tây, thuốc lá.

Ở nhiều loài cây như hoa lan, dứa, chuối, hoa loa kèn... thường gặp sự phát triển cây qua giai đoạn *dẻ hành* (protocorm). Đây là hiện tượng cùng một lúc mẫu nuôi cấy có thể tạo ra hàng loạt *dẻ hành*. Các *dẻ hành* này tiếp tục sản sinh ra các *dẻ hành* mới khác, hoặc phát triển thành cây. Phương pháp này cho hệ số nhân giống rất cao. Từ một mẫu nuôi cấy có thể tạo ra hàng triệu cá thể sau một thời gian rất ngắn. Nhờ phương pháp này mà một số loài lan vốn rất đắt trở thành có giá phải chăng. Hiện nay phương pháp sử dụng *dẻ hành* trở thành nền tảng cho công nghệ sản xuất lan, chuối, dứa.

c) Tạo phôi vô tính (Somatic embryos)

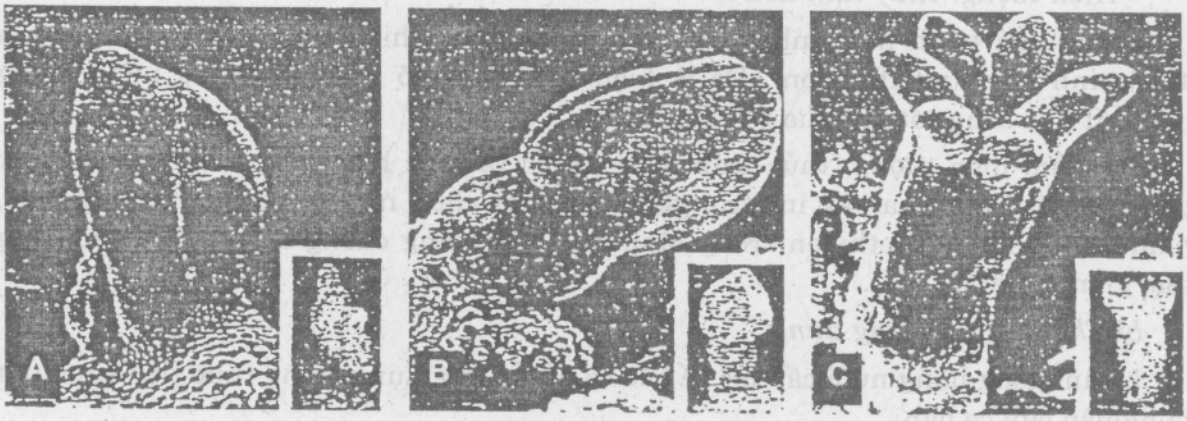
Ở thực vật sinh sản hữu tính, phôi là sản phẩm đầu tiên của quá trình thụ tinh. Từ phôi hữu tính này hình thành ra cây trưởng thành. Tuy nhiên, trong quá trình nuôi cấy invitro, phôi có thể được hình thành từ các tế bào soma, gọi là phôi vô tính (Somatic embryos). Các phôi vô tính này có thể tái sinh hình thành cây hoàn chỉnh. Kỹ thuật tạo phôi vô tính trở thành kỹ thuật tiên tiến trong nhân giống vô tính cây trồng, đặc biệt là các cây thân gỗ ăn quả, hoặc cây lâm nghiệp.

Sự hình thành phôi vô tính có 2 bước:

Bước 1: Sự phân hóa các tế bào để phát sinh phôi vô tính. Các tế bào có khả năng phát sinh phôi là các tế bào có kích thước nhỏ nhưng nhân lớn, có nhiều hạch nhân (nhân con), không có không bào, tế bào chất đậm đặc. Cần đưa các tế bào này vào môi trường giàu auxin.

Bước 2: Tạo điều kiện cho tế bào phôi mới hình thành phát triển bằng cách giảm bớt auxin trong môi trường và tạo môi trường thích hợp cho việc phân hóa và phát triển tiếp theo của các phôi đã hình thành.

Nhìn chung kỹ thuật nuôi cấy phôi gồm các bước như: tạo phôi, nhân phôi, phát triển phôi và phôi nảy mầm để tạo cây. Trên thực tế nhiều phôi vô tính của các cây được hình thành từ các callus (Hình 5.2).



Hình 5.2. Các phôi vô tính phát sinh từ callus.
A: Cây cỏ vườn quả; B: Cây nho; C: Cây thông
Nguồn: Fowke L.C.S. et al, 1994 (Plant cell rep)

5.2.2.4. Những hạn chế và những thành tựu của nhân giống cây bằng nuôi cấy mô, tế bào

a) Những hạn chế

Nhân giống cây trồng bằng nuôi cấy mô, tế bào có những hạn chế đó là:

– Tính không ổn định di truyền (genetic instability):

Mục đích nhân giống invitro là tạo ra quần thể cây đồng nhất với số lượng lớn. Tuy nhiên, ở một số trường hợp, tính không đồng nhất xảy ra do những biến dị soma. Biến dị soma có thể xảy ra khác nhau tùy theo phương thức nuôi cấy vô tính. Nuôi cấy tế bào mô sẹo dễ phát sinh biến dị hơn so với nuôi cấy chồi đỉnh. Mặt khác, nếu cấy chuyển quá nhiều lần thì xuất hiện nhiều biến dị. Ví dụ, khi nhân giống dứa bằng nuôi cấy invitro ở Việt Nam, nếu cấy chuyển quá 5 lần sẽ xuất hiện biến dị soma. Tỷ lệ biến dị tăng lên dần sau khi cấy chuyển 5 lần trở lên và có thể đạt tới 5%. Các dạng biến dị chủ yếu ở dứa là bạch tạng, lá sọc, sinh trưởng kém và chậm ra quả...

– Sự nhiễm bệnh do vi khuẩn:

Khi nuôi cấy, đại đa số vi khuẩn, nấm đều bị loại trừ. Tuy nhiên, một số loại vi khuẩn như *Agrobacterium, Bacillus, Pseudomonas*... có thể xâm nhiễm vào mô, tồn tại trong mô và gây tác hại khi tế bào bắt đầu phân chia. Có thể sử dụng một số kháng sinh để tiêu diệt các vi khuẩn này nhưng phải thận trọng vì kháng sinh làm hủy hoại ty thể, lạp thể và ức chế quá trình sinh trưởng.

– Tạo ra các độc tố:

Khi nuôi cấy mô thường xuất hiện hiện tượng mô hóa màu nâu, hóa đen và các màu này phát tán vào môi trường nuôi và ảnh hưởng đến phát triển bình thường của các mô khác. Hiện tượng hóa nâu, hóa đen này là do mô già có chứa nhiều chất tanin, hoặc hydroxyphenol. Muốn loại trừ hiện tượng hóa nâu, hóa đen, người ta dùng than hoạt tính, bổ sung polyvinyl pyrolidon (PVP), ngâm mô trước khi nuôi cấy vào trong axit ascorbic, axit citric v.v...

– Hiện tượng "thủy tinh hóa":

Trong quá trình nhân nhanh invitro thường xuất hiện hiện tượng cây bị bệnh "thủy tinh hóa" (vitrification). Đó là hiện tượng cây có thân, lá mọng nước, trong suốt, rất khó sống sót khi đưa ra vườn ươm.

Để giảm hiện tượng "thủy tinh hóa", người ta thực hiện một số giải pháp như: giảm sự hút nước của cây invitro, giảm các chất chứa nitơ trong môi trường nuôi, giảm sự hình thành ethylen trong bình nuôi cấy, tăng cường cường độ chiếu sáng kèm giảm nhiệt độ v.v...

b) Thành tựu và ứng dụng

Nhân giống bằng nuôi cấy mô tế bào có nhiều ứng dụng trong thực tiễn sản xuất và nghiên cứu cơ bản.

Ứng dụng chủ yếu của nhân giống bằng nuôi cấy mô tế bào là nhân nhanh giống cây trồng quý, hữu ích nhưng vẫn giữ được các đặc điểm di truyền mong muốn. Bên cạnh đó, việc nhân giống cây trồng còn tạo ra giống cây sạch bệnh, phục tráng giống,

chọn lọc các đột biến, gìn giữ ngân hàng gen, sử dụng vào công nghệ chuyển gen và tạo ra các sản phẩm công nghiệp chuyên hóa. Những thành tựu và ứng dụng sẽ được đề cập ở các phần sau của chương này.

5.2.3. Tạo cây sạch bệnh và phục tráng giống

5.2.3.1. Tạo cây sạch bệnh virus qua nuôi cấy mô phân sinh đỉnh (meristem)

a) Cơ sở khoa học

Trong sản xuất nông nghiệp, thiệt hại do bệnh nhiễm khuẩn nói chung (nấm, vi khuẩn...) và virus nói riêng là rất lớn. Virus có thể lây truyền qua các thế hệ cây. Theo thống kê sơ bộ có khoảng 600 loại virus ở thực vật trong đó ít nhất có 80 loại có thể truyền qua hạt giống.

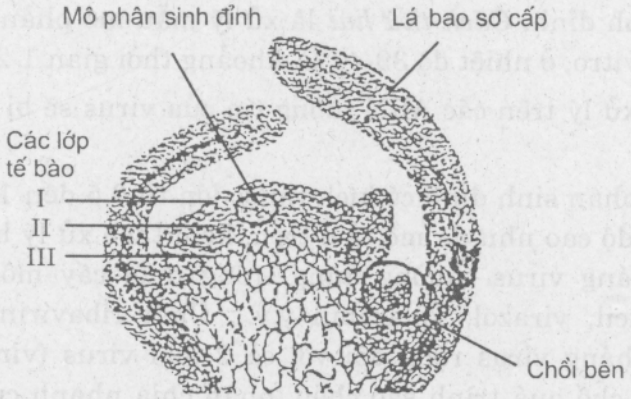
Khi nuôi cấy mô, tế bào để tạo giống vô tính bằng cách khử trùng có thể loại vi khuẩn, nấm. Tuy nhiên, virus vẫn có thể tồn tại trong tế bào sống. Do vậy nhiều loài cây trồng như khoai tây, khoai lang, các loài hoa... có thể bị thoái hóa giống do nhiễm virus. Để bảo đảm chất lượng cây trồng, nhất là cây nhân vô tính, cần phải làm sạch virus nhờ các kỹ thuật khác nhau.

b) Kỹ thuật làm sạch virus qua nuôi cấy mô phân sinh đỉnh

– Nguyên lý làm sạch virus

+ Limasset và Cornnel (1949) chứng minh rằng, nồng độ virus trong thực vật giảm dần ở gần đỉnh sinh trưởng, riêng đỉnh sinh trưởng thì hoàn toàn sạch virus. Monel và Martin (1952) thấy rằng, ở mô phân sinh đỉnh (đỉnh sinh trưởng - meristem) và lá bao thứ nhất không có virus, sau đó nồng độ virus tăng dần ở các lá xa với mô phân sinh đỉnh ở phía dưới.

Từ kết quả trên, các tác giả đã đưa ra kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh để tạo ra cây sạch virus. Kết quả nghiên cứu của Meyer (1987) cho thấy, phương pháp nuôi cấy mô phân sinh đỉnh để loại virus là hoàn toàn phù hợp. Việc loại bỏ virus phụ thuộc nhiều yếu tố như loài cây, sự có mặt của một hay nhiều loại virus xâm nhiễm, kích thước của mô phân sinh đỉnh. Thông thường người ta sử dụng mô phân sinh đỉnh có kích thước 1-2mm để loại virus (Hình 5.3).



Hình 5.3. Cấu tạo của mô phân sinh đỉnh (meristem) trong phần đỉnh chồi ở thực vật.

Có thể sử dụng mô phân sinh đỉnh có kích thước 1-2mm để loại trừ các loại virus hại các loại cây ví dụ như khoai tây và một số cây trồng khác. Tuy nhiên, cần phải phân lập mô phân sinh đỉnh có kích thước nhỏ hơn 0,2mm thì mới bảo đảm sạch virus. Việc phân lập mô phân sinh đỉnh có kích thước 0,01-0,1mm rất khó khăn, phức tạp, tỷ lệ tái sinh cây thấp.

+ Theo các tác giả như Mathews (1970), Wang và Hu (1980) thì mô phân sinh đỉnh (meristem) không có virus vì các lý do sau:

* Virus xâm nhập, vận chuyển trong cây nhờ hệ mô dẫn. Hệ thống mô dẫn không có ở mô phân sinh đỉnh, do vậy virus không xâm nhập vào được.

* Trong quá trình phân bào, mô phân sinh đỉnh không cho phép sao chép các thông tin di truyền của virus.

* Hệ thống kìm hãm, vô hiệu hóa ở vùng mô phân sinh đỉnh hoạt động mạnh hơn các vùng khác của cây.

* Vùng mô phân sinh đỉnh có nồng độ auxin cao, do vậy cũng có thể ngăn cản quá trình sao chép của virus.

– Các kỹ thuật làm sạch virus invitro:

Để tạo cây trồng sạch bệnh bằng phương pháp nuôi mô phân sinh đỉnh không nhất thiết phải hoàn toàn sạch virus, mà có thể bị nhiễm virus với nồng độ nhỏ và sẽ được làm sạch trong quá trình nuôi mô phân sinh đỉnh. Các kỹ thuật làm sạch virus invitro bao gồm:

Nuôi cấy mô phân sinh đỉnh có kích thước < 0,3mm. Sử dụng các môi trường dinh dưỡng thích hợp để tái sinh cây (tạo chồi, tạo rễ...) để được cây nguyên vẹn. Công đoạn sau khi được cây nguyên vẹn thì kiểm tra độ sạch virus bằng các phương pháp khác nhau.

+ Nuôi cấy mô phân sinh đỉnh có kích thước lớn hơn 0,3mm kết hợp với xử lý nhiệt độ cao khoảng 36-37^{0}C. Ở nhiệt độ 36-37^{0}C, một số loài virus không có khả năng sao chép, nhân lên. Hình thức làm sạch virus bằng xử lý nhiệt độ có thể thực hiện theo hai cách: *Cách thứ nhất* là xử lý cây mẹ ở nhiệt độ 36-37^{0}C, thời gian dài từ một đến hai tháng và có loài có thể kéo dài đến khoảng 6 tháng và tiến hành trước khi lấy mô phân sinh đỉnh. *Cách thứ hai* là xử lý mẫu mô phân sinh đỉnh trước khi đưa vào nuôi cấy invitro, ở nhiệt độ 39-40^{0}C, khoảng thời gian 1-2 tuần.

Ở các nhiệt độ xử lý trên các ARN thông tin của virus sẽ bị phân giải, từ đó tạo cây sạch virus.

+ Nuôi cấy mô phân sinh đỉnh có kích thước lớn từ 0,5 đến 1,0mm bằng cách kết hợp với xử lý nhiệt độ cao như đã mô tả ở trên, kèm theo xử lý bằng hóa chất kháng virus. Các chất kháng virus thường dùng trong nuôi cấy mô phân sinh đỉnh là ribavirin, 2-thiouracil, virazol, vidarabin v.v... Chất ribavirin là đồng phân của guanosin, có phổ kháng virus rộng đối với cả 2 loại virus (virus chứa ADN, hoặc ARN). Chất này ức chế quá trình sao chép, phân chia nhanh của tất cả virus chứa trong cây.

+ Ghép mô là kỹ thuật ghép mô phân sinh đỉnh vào các cây gốc đã sạch bệnh và các cây gốc này đã được xử lý kháng virus. Kỹ thuật ghép mô này thường áp dụng với các loài cây thân gỗ ăn quả như cam, chanh, quýt v.v...

c) Nhân nhanh và duy trì tình trạng sạch bệnh

Không phải tất cả các cây sau quá trình xử lý nhiệt, hoặc phối hợp xử lý nhiệt với hóa chất và nuôi cấy mô phân sinh đỉnh đều sạch virus. Do vậy, việc kiểm tra mức độ sạch bệnh, duy trì tình trạng sạch bệnh của giống cây có ý nghĩa quan trọng và quyết định. Thông thường, để duy trì các giống cây được tạo ra từ nuôi cấy mô phải được nuôi trồng trong điều kiện hoàn toàn cách ly với nguồn bệnh và các vector truyền bệnh. Các cây này phải được trồng trong nhà màn, nhà lưới, hoặc nhà kính để cách ly với các vector truyền bệnh như rệp, bướm, nhện, ong... Sau khi trồng trong nhà màn, nhà lưới cách ly vector truyền bệnh có thể đưa ra nhân nhanh ở các vùng vườn, hoặc đồng ruộng cách ly không có các cây cùng loài đã bị nhiễm bệnh, không có các cây cùng họ, cùng chi mang các bệnh tương tự và cách xa vùng sản xuất trồng trọt thông thường. Mặt khác vùng cách ly phải là vùng có mật độ côn trùng rất thấp, có tốc độ gió vừa phải để không đưa côn trùng, mầm bệnh đến khu vực cách ly đang nhân nhanh giống cây sạch bệnh.

Muốn tạo khu vực, vùng cách ly để nhân nhanh giống cây sạch bệnh, trước hết phải làm vệ sinh đồng ruộng, khu vực chuẩn bị nhân giống. Trước hết phải nhổ bỏ các cây bị tái nhiễm, các cây hoang dại, làm sạch, tơi xốp đất trồng. Việc chẩn đoán các bệnh virus giúp phát hiện được cây bệnh trong giai đoạn nhân giống được coi là vấn đề quan trọng nhất. Người ta sử dụng nhiều phương pháp chẩn đoán bệnh do virus hại thực vật như:

– Phương pháp chẩn đoán bằng dấu hiệu bệnh lý của cây:

Nhận biết các biểu hiện bệnh virus bằng các triệu chứng thể hiện ở cây mà ta có thể nhận thấy bằng mắt là phương pháp đơn giản nhất. Chẩn đoán bằng mắt (có thể sử dụng một số công cụ hỗ trợ cầm tay như kính lúp nhỏ) đòi hỏi phải có kinh nghiệm quan sát, so sánh vì rất dễ nhầm lẫn giữa cây bị bệnh do virus với những cây bị các bệnh khác như các bệnh do tuyến trùng, bệnh do nấm, hoặc một số bệnh do sinh lý. Việc đánh giá cây bệnh dựa vào sự quan sát triệu chứng của bệnh gặp khó khăn và thiếu chính xác khi mà cây bị nhiều loại virus cùng xâm nhập cũng như bị bệnh phối hợp giữa virus và các nguyên nhân khác. Mặt khác thời điểm quan sát cây bệnh ở các giai đoạn phát triển khác nhau, tuổi khác nhau của cây, hoặc đặc điểm của giống cây cũng là những yếu tố quan trọng trong việc chẩn đoán sự nhiễm virus.

– Phương pháp chẩn đoán bằng cây chỉ thị:

+ Phương pháp chẩn đoán bệnh bằng cây chỉ thị nhiễm bệnh là cách dùng dịch ép của cây đã bị bệnh nhiễm virus đem xét nghiệm virus, kết hợp với những dấu hiệu đặc trưng về bệnh lý của cây bị nhiễm virus. Đây là phương pháp nhanh, khá chính xác cho phép chứng minh sự có mặt của virus. Theo phương pháp này nồng độ virus thấp vẫn có thể phát hiện được. Phương pháp phát hiện bằng cây chỉ thị chủ yếu ở

các họ như họ Cà (Solanaceae), họ rau Dền (Amaranthaceae), họ Đậu (Fabaceae) và họ Cúc (Asteraceae) trong đó họ Cà là chiếm ưu thế về số lượng.

+ Phương pháp chẩn đoán bằng cây chỉ thị có những hạn chế như:

* Phương pháp lây nhiễm tạo cây chỉ thị phức tạp, cách truyền virus vào cây cũng khác nhau. Có loại virus phải truyền qua côn trùng truyền bệnh, có loại virus truyền qua đường dẫn truyền phức tạp.

* Thời gian chẩn đoán thường bị kéo dài do phải trải qua quá trình ủ bệnh, sau đó cây mới xuất hiện các triệu chứng ra ngoài.

* Việc xuất hiện các triệu chứng bệnh đặc trưng còn phụ thuộc vào các điều kiện môi trường thí nghiệm như độ ẩm, nhiệt độ, ánh sáng...

* Tốn nhiều công sức để trồng trọt, chăm bón cây chỉ thị, nuôi dưỡng vector (côn trùng) truyền bệnh...

* Một số loại bệnh virus như bệnh xoăn lá, cuốn lá khó tiến hành chẩn đoán bằng cây chỉ thị.

– Phương pháp chẩn đoán bằng phép thử huyết thanh:

Phương pháp chẩn đoán bằng phép thử huyết thanh là cách người ta trộn huyết thanh đặc hiệu cho mỗi loại virus với dịch chiết cây cần chẩn đoán bệnh. Nếu đúng là cây bị bệnh thì kết quả thu được là có sự kết tủa dạng huyền phù hay mây mờ, do phản ứng ngưng kết kháng nguyên – kháng thể. Kháng thể được tạo ra trong cơ thể động vật như thỏ, chuột được gây phản ứng miễn dịch bằng tiêm các kháng nguyên virus. Chính những kháng thể này được dùng để chẩn đoán bệnh virus tương ứng trong phép thử huyết thanh.

Ưu điểm của phương pháp này là nhanh chóng, có tính đặc hiệu cao. Kết quả thu được chậm nhất là sau 48 giờ. Chi phí cho xét nghiệm tương đối thấp, không cần khu nhà cách ly để trồng cây chỉ thị.

Đã có nhiều cải tiến để tạo ra kháng thể đặc hiệu, chất lượng cao. Trước hết là phải làm sạch protein virus trước khi tiêm cho thỏ, chuột để tránh hiện tượng phản ứng với các protein lạ không đặc hiệu. Việc sản xuất ra kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao đã làm tăng chất lượng của phương pháp chẩn đoán virus bằng phép thử huyết thanh.

– Phương pháp chẩn đoán bằng kỹ thuật miễn dịch hấp phụ liên kết enzym (test ELISA):

Test ELISA là kỹ thuật mới ứng dụng để chẩn đoán virus hại cây trồng. Phương pháp này được dựa vào độ nhạy cảm của phản ứng miễn dịch để xác định nồng độ có mặt của virus tăng lên theo sự liên kết của phức kháng nguyên – kháng thể, nhưng kháng thể này được liên kết với một enzym. ELISA được sử dụng như một test có độ nhạy cao để chẩn đoán virus thực vật (Clark, Adams và Barbara, 1976).

Test ELISA có khả năng phát hiện nhạy với mọi loại virus, nhất là đối với virus gây bệnh cuốn lá khoai tây và là một loại bệnh virus khó phát hiện bằng các phương pháp khác như bằng cây chỉ thị, hoặc bằng phép thử huyết thanh. Nhiều nhà nghiên

cứu công nhận test ELISA là phương pháp tốt nhất và dễ sử dụng nhất để chẩn đoán virus hại thực vật (Casper, 1977). Ngày nay, nhiều trung tâm nghiên cứu nông nghiệp Quốc tế đã sản xuất ra các chế phẩm ELISA thành bộ xét nghiệm (bộ KIT) virus để nhận biết các loại virus như virus X, Y, M... gây bệnh ở khoai tây, virus da cóc sần ở cây sắn, hoặc phát hiện virus chùm ngọn ở cây chuối v.v... Thực chất phương pháp chẩn đoán bằng kỹ thuật miễn dịch hấp thụ liên kết enzym (test ELISA) là dựa vào một phản ứng màu do có mặt của enzym trong phức liên kết enzym – kháng thể – kháng nguyên, xúc tác phân giải cơ chất đặc hiệu. Ví dụ khi gắn enzym phosphatase với kháng thể rồi thử phản ứng với cơ chất α-nitrophenolphosphat thì phản ứng có màu vàng, vì dưới tác dụng của phosphatase, nhóm phosphat sẽ được tách ra, còn lại α-nitrophenol sẽ có màu vàng.

– Phương pháp chẩn đoán bằng kính hiển vi điện tử:

Kính hiển vi điện tử có độ phóng đại từ hàng vạn đến chục vạn lần và có thể quan sát nhận dạng các virus có dạng hình đũa, hình sợi. Ví dụ gây bệnh ở cây phong lan, hoa huệ có hình đũa và hình sợi (Corbert, 1974; Asges và cộng tác viên, 1974). Tuy nhiên, chẩn đoán virus bằng kính hiển vi điện tử khó phát hiện những virus dạng hình cầu vì dễ lẫn với các bào quan ở thực vật. Tuy nhiên, người ta vẫn sử dụng phương pháp này vì nhiều trường hợp cho kết quả tin cậy với số lượng lớn.

– Phương pháp lai phân tử:

Lai axit nucleic là một trong những phương pháp phát hiện vật liệu di truyền của virus. Đây là phương pháp chẩn đoán virus có độ nhạy rất cao, có tính đặc trưng cao để nhận biết ADN, hoặc ARN của virus (Abu, Samh và Raudles, 1983).

Phương pháp này bao gồm các bước tiến hành như sau:

+ Tổng hợp mẫu dò (ADN probe) dựa trên trình tự đã biết của ADN (hoặc ARN) của virus. Mẫu dò này được gắn bằng đồng vị phóng xạ H^3, hoặc P^{32}.

+ Tách ADN từ dịch chiết của cây bị nhiễm bệnh virus, trong đó có ADN (hoặc ARN) của virus.

+ Chuyển ADN (hoặc ARN) của virus lên màng lai nitrocellulo, hoặc màng lai nilon, kết hợp gây biến tính ADN thành mạch đơn.

+ Nhúng màng lai vào mẫu dò đã được tách thành dạng mạch đơn. Hiện tượng bắt cặp bổ sung giữa mẫu dò với đoạn nucleotit tương ứng của virus sẽ xảy ra.

+ Phát hiện được những vị trí lai tương ứng dựa vào phóng xạ tự chụp.

– Phương pháp chẩn đoán bằng phản ứng PCR:

Ngày nay nhờ những tiến bộ về phương pháp phân tích ADN, người ta áp dụng vào chẩn đoán virus dựa vào các phương pháp phân tích ADN. Những phương pháp (kỹ thuật) này cho phép chẩn đoán nhanh, chính xác, thường dùng để chẩn đoán axit nucleic, trong phần lõi của virus. Trình tự các nucleic trong phân tử axit nucleic của các loại virus là khác nhau. Có thể sử dụng phản ứng PCR để nhận biết các axit nucleic đặc trưng của virus. Người ta thiết kế các cặp mồi (primer) là các đoạn nucleotit dài từ 10 đến 30 nucleotit có trình tự bổ sung ở 2 đầu (phía 3') của các đoạn

ADN của virus cần nhân lên. Sau quá trình nhân bản thực hiện khoảng 30 đến 35 chu kỳ, thì chỉ những ADN virus tương ứng mới được nhân lên. Từ đó, xác định được các mẫu cây bị bệnh virus.

Trường hợp phần lõi của virus là ARN thì cần phải chuyển ARN sang dạng ADN bổ sung (cADN), sau đó phát hiện cADN bằng phản ứng PCR như đã trình bày ở trên.

Phương pháp chẩn đoán virus gây bệnh bằng phản ứng PCR có độ nhạy, độ chính xác cao gấp nhiều lần so với các phương pháp khác như ELISA, hoặc phép thử huyết thanh.

Ở Việt Nam, các Viện nghiên cứu, các Trung tâm giống cây trồng đã sử dụng các phương pháp chẩn đoán virus để tạo giống cây sạch bệnh đối với khoai tây, cà chua, cam, quýt, mía và một số giống cây trồng khác.

5.2.3.2. Phục tráng giống và những thành tựu phục tráng giống

a) Quy trình phục tráng giống và tạo cây sạch bệnh

Nhiều giống cây trồng có giá trị kinh tế cao rất cần thiết cho đời sống con người. Trải qua quá trình luân canh, trồng trọt nhiều năm làm cho nhiều giống cây trồng nhiễm bệnh và thoái hóa dẫn đến năng suất, chất lượng ngày càng giảm đi. Tạo cây sạch bệnh và phục tráng giống là điều hết sức cần thiết để nâng cao năng suất và chất lượng của các giống cây trồng, đặc biệt là các cây lương thực, cây thực phẩm, cây ăn quả và các giống hoa quý.

Phục tráng giống và tạo cây sạch bệnh bao gồm nhiều công đoạn, kết hợp nhiều công nghệ khác nhau. Muốn đưa một giống cây sạch bệnh ra trồng đại trà cần phải qua nhiều công đoạn phục tráng giống và phải được thực hiện nghiêm ngặt. Có thể tóm tắt các công đoạn sản xuất cây sạch bệnh và phục tráng giống như sau:

– Chọn cây mẹ có giá trị kinh tế cao, cần thiết phải phục tráng giống nhưng đang ở tình trạng nhiễm virus, nhiễm bệnh. Tiến hành xác định loại virus gây bệnh cho cây rồi tiến hành xử lý ở nhiệt độ cao (36-37^{0}C) trong thời gian dài.

– Nuôi cấy mô phân sinh đỉnh (meristem): Chọn môi trường nuôi cấy mô phân sinh đỉnh thích hợp với từng giống cây. Tiến hành xử lý nhiệt độ các mẫu mô nuôi cấy ở nhiệt độ cao (khoảng 39-40^{0}C) trong thời gian 1 đến 2 tuần tùy theo giống cây. Có thể kết hợp với xử lý hóa chất cùng với việc lựa chọn điều kiện nuôi cấy như nhiệt độ, cường độ chiếu sáng, thời gian chiếu sáng (hoặc bóng tối) thích hợp từng giống cây.

– Tái sinh cây: Sử dụng các môi trường thích hợp cho việc tạo chồi, tạo rễ thích hợp để tạo cây con trước khi đưa ra vườn ươm.

– Trồng cây con trên vườn ươm: Cần phải chuẩn bị vườn ươm có giá thể tơi xốp, thoát nước, đủ chất dinh dưỡng cần thiết, cần che mưa nắng, cách ly với các vector truyền bệnh, tiến hành chăm sóc tốt. Cần xét nghiệm virus bằng các phương pháp chẩn đoán khác nhau (xem xét bằng mắt về các dấu hiệu bệnh lý, thử huyết thanh, chẩn đoán bằng kỹ thuật ELISA, phân tích ADN...).

Sau khi chọn được cây sạch bệnh cần phải duy trì các cây sạch bệnh, thường

xuyên giám sát cách ly nguồn bệnh. Tiến hành nhân nhanh cây sạch bệnh có giá trị tốt bằng nhiều phương pháp khác nhau.

– Chuyển giống cây sạch bệnh, có giá trị kinh tế cao, đưa ra sản xuất đại trà.

b) Những thành tựu phục tráng giống, tạo cây sạch bệnh

Nhiều giống cây lương thực, thực phẩm, cây ăn quả đã được phục tráng giống cho hiệu quả kinh tế cao, ví dụ như:

– Khoai tây:

Khoai tây là cây lương thực có nguồn gốc ở Châu Âu và ngày nay được trồng rộng rãi ở nhiều nước Châu Âu, Châu Á v.v... Khoai tây được nhân giống vô tính và cũng là cây bị virus phá hoại nhiều nhất. Tuy vậy, việc làm sạch virus và phục tráng giống khoai tây còn tiến hành chậm chạp. Việc tạo giống khoai tây sạch virus bằng việc sử dụng các phương pháp chẩn đoán virus và trồng ở các khu vực cách ly, tránh tái nhiễm virus do vector chủ yếu là các loại rệp lá và rệp củ khoai tây. Khu vực cách ly, cần phải diệt hết cỏ dó là nơi lưu giữ virus từ đó có thể truyền vào củ khoai tây. Muốn tạo khoai tây sạch bệnh và phục tráng để nâng cao năng suất khoai tây, cần kết hợp xử lý nhiệt độ và nuôi cấy mô phân sinh đỉnh (meristem) của khoai tây: Quá trình xử lý nhiệt ở nhiệt độ 35-38^{0}C từ 5 đến 7 tuần và sau đó nuôi cấy đỉnh sinh trưởng thì có thể loại bỏ được các virus A, X, Y, virus xoăn lá và các loại virus M và S cũng bị giảm đi một cách đáng kể (Kassanis và Varna, 1967; Mc Donal, 1973; Per, 1974; Huang, 1975...). Ở các giống khoai tây bình thường, khi quan sát mô phân sinh đỉnh có độ lớn 80-100mm vẫn quan sát thấy hàng chục thể virus (Krylova và cộng tác viên 1973) nhưng khi làm sạch virus và nuôi cấy mô phân sinh đỉnh thì có thể loại được hoàn toàn virus.

– Các loại rau:

Hầu hết các loại rau được trồng bằng hạt. Truyền bệnh virus qua hạt gây ra nhiều bệnh cho nhiều loại rau, đậu quả... Vì vậy cần phải chọn lọc những cây làm giống sạch bệnh thông qua tạo cây sạch bệnh, trồng cách ly để tạo hạt rau, đậu sạch virus. Các vector truyền bệnh virus cho rau, đậu quả thường là rệp lá, hoặc một số loài sâu, bệnh khác. Vì vậy, vấn đề vệ sinh đồng ruộng phòng trừ vector truyền virus là vấn đề rất cần thiết và luôn luôn phải quan tâm. Một số loại rau có thể nhân giống vô tính qua nhiều năm như rau ngót, hoa lơ... người ta cần phải có vật liệu sạch ban đầu. Thông qua phương pháp nuôi cấy mô tạo được hàng trăm cây và kết hợp với phương pháp chẩn đoán virus, người ta tạo hàng ngàn cây sạch bệnh.

Đối với nấm ăn, muốn tạo nấm sạch virus, cần sử dụng phương pháp nuôi cấy mô phân sinh đỉnh kết hợp với xử lý nhiệt để loại trừ virus (Walkey, 1968; Mori, 1971), hoặc bằng phương pháp thử huyết thanh (Smith, 1976).

– Cây ăn quả:

Các loài cây ăn quả thường bị virus phá hoại mạnh mẽ nhất. Virus hại cây ăn quả có thể truyền khi nhân giống vô tính và cả khi trồng bằng hạt. Mặt khác nhiều

cây ăn quả là cây lâu năm, luôn luôn chịu tác động của các vector truyền bệnh là virus. Việc xác định cây ăn quả có bị nhiễm virus gây bệnh cây là việc khó khăn, vì thời gian ủ bệnh thường kéo dài, khả năng chống chịu virus của cây cao, cây thường biểu hiện trạng thái bệnh khi đã bị nhiễm nặng kéo dài. Do vậy việc phòng chống virus cho cây ăn quả phải được tiến hành thường xuyên liên tục.

Để làm sạch bệnh virus của cây ăn quả thân gỗ thường phải xử lý nhiệt các cành có các mắt của chúng được sử dụng để ghép về sau. Theo các nhà chọn tạo giống cây ăn quả thì xử lý nhiệt ở cây ăn quả thân gỗ có thể loại trừ được 1 loại virus ở cây mận, 7 loại virus ở cây táo, 6 loại virus ở cây đào, 4 loại virus ở cây anh đào, 2 loại virus ở nho tây v.v... Xử lý nhiệt ở cây ăn quả không bao giờ đạt độ tinh sạch 100%, thậm chí một số loài cây còn lại tới 4 loại virus không bị mất hoạt tính.

Nuôi cấy mô phân sinh đỉnh các cây ăn quả thân gỗ để tạo cây sạch bệnh gặp nhiều khó khăn hơn so với các giống cây khác. Cho tới ngày nay, người ta mới thành công trong việc nuôi cấy mô phân sinh đỉnh để tạo cây ăn quả sạch virus ở một số cây như dâu chua có quả đỏ, hoặc đen, cây táo (Walkey, 1972) và một số cây ăn quả khác.

– Các giống hoa:

Nhiều giống hoa được nhân giống vô tính (giâm cành, thân, trồng bằng củ...) nên thường bị bệnh virus. Ban đầu người ta thường chỉ tập trung làm sạch virus ở một số giống hoa có giá trị kinh tế cao như hoa cúc, hoa thủy tiên... Hiện nay người ta bắt đầu nuôi cấy mô và làm sạch một số giống hoa có giá trị khác như hoa lan hài, hoa huệ, hoa lay ơn... Việc làm sạch virus đối với các loài hoa này bằng cách xử lý nhiệt kết hợp với nuôi cấy mô phân sinh đỉnh. Đã có một số xí nghiệp, công ty hoa trên thế giới tiến hành tạo giống hoa sạch virus để đưa ra trồng đại trà và xuất khẩu đến nhiều nước khác. Các nước có nhiều thành công trong lĩnh vực này là Hà Lan, Đức, Anh v.v... đã tạo ra nhiều giống hoa đặc trưng cho từng quốc gia, từng vùng miền.

5.2.4. Chọn tạo giống bằng nuôi cấy mô, tế bào

Công nghệ nuôi cấy mô tế bào có nhiều ứng dụng trong việc chọn tạo giống cây trồng có giá trị kinh tế cao. Nhờ công nghệ nuôi cấy mô invitro, người ta đã tạo ra các cây đơn bội, tạo dòng thuần chủng, lai tế bào soma và chọn lọc các biến dị soma để cải tiến giống cây trồng.

5.2.4.1. Nuôi cấy bao phấn, noãn chưa thụ tinh và tạo cây đơn bội

a) Hiện tượng đơn bội ở thực vật

Hầu hết các loài cây trồng có mức bội thể khác nhau phổ biến là các cây lưỡng bội (2n) và có một số cây là tứ bội (4n) v.v... Như vậy, mỗi một tính trạng của cây do 2 hay nhiều gen chi phối. Trường hợp cây 2n dị hợp tử thì tính trạng sẽ biểu hiện tùy thuộc vào alen lặn hay alen trội quyết định. Cây 2n thì tính trạng trội được biểu hiện khi cây là đồng hợp trội, hoặc cây là dị hợp tử. Đối với gen lặn thì tính trạng chỉ biểu hiện khi cây là đồng hợp lặn. Thể đơn bội (happloid) của cây phản ánh đầy đủ các gen của cây, vì vậy nó là nguyên liệu lý tưởng cho công tác chọn tạo giống cây trồng. Từ

các thể đơn bội, các nhà chọn giống đã tạo ra cây đồng hợp tử tuyệt đối nhờ sự lưỡng bội hóa của thể đơn bội. Cây đồng hợp tử tuyệt đối này là nguyên liệu quý cho công tác chọn tạo giống vì tất cả gen lặn trong đó có gen lặn quy định tính trạng quý cũng được biểu hiện ra kiểu hình.

Ở thực vật bậc cao chỉ có thể giao tử (hạt phấn, noãn) là những tế bào đơn bội. Nếu như nuôi cấy hạt phấn, tế bào noãn để chúng phát triển thành cây thì ta nhận được cây đơn bội (1n). Năm 1964, hai nhà khoa học Ấn Độ là Guka và Maheshwari, lần đầu tiên đã nuôi cấy bao phấn cây Cà độc dược (*Datura innoxia*) và tạo ra cây đơn bội. Nhờ những đóng góp đáng kể của các nhà khoa học khác như Nitsch (1973-1976), Noicel (1973)... phương pháp nuôi cấy bao phấn tạo cây đơn bội đã đạt được nhiều kết quả. Hiện nay có tới hơn 200 loại cây được tạo ra từ con đường đơn bội và là nguyên liệu lý tưởng để nghiên cứu các gen quy định tính trạng của cây và cũng là nguyên liệu quý để chọn tạo giống cây trồng. Cây đơn bội có thể sử dụng vào các mục đích khác nhau như:

– Nghiên cứu sự di truyền của các gen, cả gen trội và gen lặn, cũng như nghiên cứu sự tương tác của các gen.

– Tạo đột biến ở mức đơn bội.

– Tạo cây đồng hợp tử tuyệt đối phục vụ công tác giống cây trồng.

Nhờ kỹ thuật đơn bội để tạo giống mới mà người ta đã giảm bớt thời gian chọn tạo giống. Theo E.Teroule và Y. Demarly (người Pháp), 1988, thì tạo giống mới bằng kỹ thuật đơn bội đã giảm thời gian trung bình là 5 năm so với các kỹ thuật chọn tạo giống lưỡng bội bình thường.

Ngày nay kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào đã phát triển nhanh, với phương tiện, thiết bị ngày càng hiện đại, mở ra tiềm năng to lớn trong việc nuôi cấy hạt phấn, tế bào noãn để tạo thành cây đơn bội, từ đó tạo ra dòng thuần tuyệt đối. Đáng chú ý là ở các đối tượng có tầm quan trọng lớn như lúa gạo, lúa mì, lúa mạch đen, đại mạch và các cây trồng như cà chua, thuốc lá, khoai tây v.v...

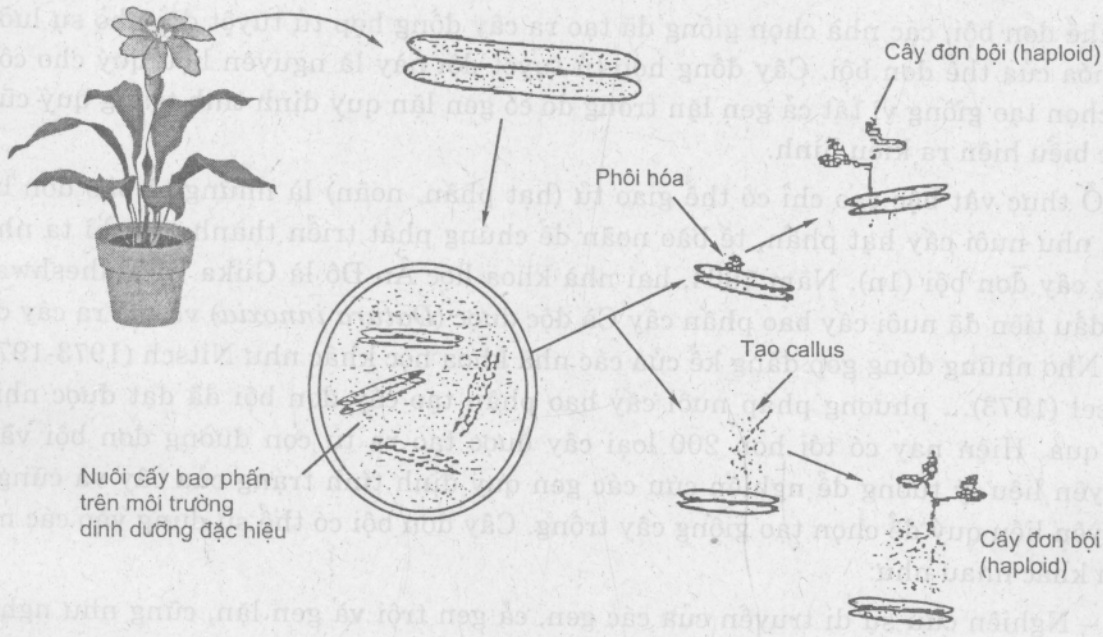
Điều cần chú ý là hiện tại, người ta mới nuôi cấy hạt phấn trưởng thành để tạo cây đơn bội thành công thông qua con đường phôi hóa, hoặc tạo thành mô sẹo, từ đó tạo cây đơn bội.

Nuôi cấy bao phấn non chưa đạt nhiều kết quả. Hiện tại chỉ có một số kết quả về nuôi cấy bao phấn non thành công như nuôi cấy bao phấn non của cây *Trillium electum* (Saparow và cs, 1955), cây hành *Allium cepa* (Vasil, 1959), hoặc ở cây *Atropa belladonna* (Bajaj, 1974)...

b) Phương pháp tạo cây đơn bội bằng nuôi cấy bao phấn, hạt phấn

– Nguyên lý:

Nuôi cấy hạt phấn đơn bội (tiểu bào tử) tách rời, hoặc bao phấn có chứa các hạt phấn đơn bội trên môi trường dinh dưỡng nhân tạo thích hợp để kích thích hạt phấn phát triển thành cây đơn bội (Hình 5.4.).



Hình 5.4. Sơ đồ tạo cây đơn bội bằng nuôi cấy bao phấn

– Có 2 phương pháp cơ bản được sử dụng để nuôi cấy bao phấn, hạt phấn:

+ Các bao phấn được nuôi trong môi trường agar đặc, hoặc môi trường lỏng. Sự phát sinh phôi xảy ra trong bao phấn, từ đó hình thành cây đơn bội.

+ Hạt phấn được tách rời khỏi bao phấn bằng phương pháp cơ học, hoặc do sự tách rời tự nhiên từ bao phấn, được nuôi trong môi trường lỏng, từ đó tạo ra cây đơn bội.

Sự phát sinh cây đơn bội từ hạt phấn được gọi là sinh sản đơn tính đực (androgenesis). Người ta phân biệt 3 phương thức sinh sản đơn tính đực:

– Sinh sản đơn tính trực tiếp từ tiểu bào tử:

Tiểu bào tử trong bao phấn, hoặc đã được tách rời tạo thành phôi (1n) và từ phôi thành cây đơn bội (1n).

Ví dụ, phương thức sinh sản này đã thực hiện ở cây Cà độc dược (*Datura innoxia*), hoặc từ cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*).

+ Sinh sản đơn tính đực gián tiếp qua mô sẹo:

Tiểu bào tử trong bao phấn, hoặc đã được tách rời tạo thành mô sẹo. Mô sẹo phát triển thành chồi và từ chồi hình thành cây đơn bội (1n). Mô sẹo thường phát triển ra ngoài bao phấn. Ví dụ phương thức hình thành cây đơn bội như ở cây lúa nước (*Oryza sativa*), cây cải dầu (*Brassica napus*), cây hoa huệ (*Lolium multiflorum*), cây lúa mạch (*Hordeum valgare*).

+ Sinh sản đơn tính đực hỗn hợp:

Phương thức sinh sản này diễn ra tương tự như sinh sản đơn tính đực gián tiếp. Tuy nhiên, giai đoạn phát triển mô sẹo rất ngắn, khó nhận biết.

Ví dụ phương thức sinh sản đơn tính đực ở cây cà độc dược (*Datura innoxia*), cây cà chua (*Lycopersicon esculentum*)...

– Kỹ thuật nuôi cấy bao phấn:

Kỹ thuật nuôi cấy bao phấn tạo cây con đơn bội là kỹ thuật khá phức tạp, phụ thuộc vào yếu tố như tuổi hạt phấn, trạng thái sinh lý của cây cho bao phấn, hạt phấn, kiểu gen của cây và môi trường nuôi cấy bao phấn v.v... Tuy nhiên, nuôi cấy bao phấn có một số bước cơ bản như sau:

+ Chọn bao phấn:

Giai đoạn phát triển của hạt phấn có vai trò quyết định trong việc tạo cây đơn bội, thích hợp nhất là bao phấn chứa hạt phấn bắt đầu từ thể 4 nhân đến ngay sau nguyên phân lần thứ nhất. Bao phấn của những hoa đầu tiên cho kết quả tốt hơn bao phấn của các hoa muộn.

+ Xử lý nụ hoa:

Cần xử lý ở nhiệt độ thích hợp các nụ hoa sau khi cắt khỏi cây và trước khi tách bao phấn để nuôi cấy nhằm kích thích sự phân chia của tiểu bào tử và từ đó tạo thành cây đơn bội. Chế độ xử lý nhiệt phụ thuộc vào loài cây.

Hạt phấn của cây chè (*Camellia sinensis*) thì xử lý ở nhiệt độ 30-35^{0}C trong khoảng thời gian từ 2 đến 5 giờ trước khi nuôi cấy ở nhiệt độ 25^{0}C sẽ cho tỷ lệ hình thành mô sẹo và cho các thể phân sinh cao (Saher và Bhattacharya, 1988).

Nhiều tác giả khác cho rằng, xử lý ở nhiệt độ thấp (1-10^{0}C) trong thời gian từ 14 đến 72 giờ, hoặc lâu hơn sẽ làm tăng tỷ lệ tạo mô sẹo khi nuôi cấy bao phấn của cây cà độc dược (*Datura innoxia*), cây cải dầu (*Brassica napus*)... (theo Tyagi và cộng sự, 1979; Gupta và Babbar, 1980; Sundeland và Wildon, 1979; Dunnell và cộng sự, 1985...).

Một số tác giả khác lại cho rằng, xử lý nụ hoa lúa nước (*Oryza sativa*), loài phụ Japonica ở nhiệt độ 10^{0}C trong 2-3 tuần, còn loài phụ Indica thì ở nhiệt độ 7^{0}C trong 1 tuần; xử lý nụ hoa thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) ở 2-5^{0}C trong khoảng thời gian 2-3 ngày sẽ thuận lợi cho việc nuôi cấy bao phấn để tạo cây đơn bội.

– Chọn môi trường tái sinh thích hợp:

Tùy theo đối tượng nuôi cấy bao phấn, hạt phấn mà chúng ta lựa chọn môi trường thích hợp tương ứng. Tuy nhiên, cũng có một số quy tắc chung, đó là:

+ Các cây thuộc họ Hòa Thảo cần hàm lượng auxin cao, đặc biệt là chất 2,4D để kích thích cho sự phân bào (ví dụ: đối với lúa mì cần nồng độ 10^{-5} mol 2,4D).

+ Các cây thuộc họ Cà thì cần lượng auxin ít hơn. Ví dụ đối với cây cà (*Solanum tuberosum*) chỉ cần nồng độ 10^{-6} mol.

+ Hàm lượng đường trong môi trường cao: Tùy theo đối tượng nuôi cấy mà môi trường có hàm lượng đường khác nhau. Đối với cây ngô (*Zea mays*) cần 60-120g sucrose/l, cây lúa nước (*Oryza sativa*) cần 50-60g sucrose/l còn đối với cây cà (*Solanum tuberosum*) lại cần 20-40g sucrose/l...

+ Các nguồn chất hữu cơ bổ sung và các phụ gia:

Các nguồn chất hữu cơ bổ sung không xác định được như dịch chiết khoai tây, nước dừa, dịch chiết nấm men... có tác dụng tốt đối với việc nuôi cấy bao phấn của nhiều loài thực vật. Môi trường nuôi cấy cho thêm 100g dịch chiết khoai tây cho kết quả khá tốt khi nuôi cấy bao phấn các cây thuốc lá, lúa nước và lúa mì (Anonymous, 1966, 1967).

Than hoạt tính có tác dụng kích thích phát sinh phôi khi nuôi cấy bao phấn đơn bội. Ví dụ, than hoạt tính có hiệu quả tích cực khi nuôi cấy bao phấn cây thuốc lá (theo Anagnostakis, 1974; Bajaj và Heberle, 1977); nuôi cấy bao phấn lúa mạch đen (theo Wenzel, Hoffmann và Thomas, 1977); nuôi cấy bao phấn khoai tây (theo Sopory, Jacobsen và Wenzel, 1978)...

Các nguyên tố vi lượng ít ảnh hưởng trong việc nuôi cấy bao phấn.

– Chọn lọc cây đơn bội:

Không phải tất cả các cây được hình thành từ việc nuôi cấy bao phấn là cây đơn bội. Do vậy vẫn phải xác định chính xác cây đơn bội. Có nhiều cách khác nhau để xác định cây đơn bội như làm tiêu bản để đếm số lượng nhiễm sắc thể, đo hàm lượng ADN trong tế bào, so sánh cây tái sinh từ bao phấn với cây mẹ về khả năng sinh trưởng, hình thái, kích thước v.v...

c) Phương pháp tạo cây đơn bội bằng nuôi cấy noãn chưa thụ tinh

– Nguyên lý:

Sự hình thành cây đơn bội từ noãn chưa thụ tinh được gọi là sinh sản đơn tính cái, hay còn gọi là trinh nữ sinh (gynogenesis). Nghiên cứu tạo cây đơn bội bằng nuôi cấy noãn chưa thụ tinh được White (1932) và Maheshwari (1958) tiến hành trên cây *Antirhinum* và cây *Cooperia pedunculata* nhưng vẫn chưa có kết quả rõ rệt. Thành công đầu tiên trong việc nuôi cấy noãn chưa thụ tinh là việc thu nhận được mô sẹo đơn bội từ việc nuôi cấy noãn cây *Ginkgo biola* (Tulecke, 1964). Do hiện tượng một số loài cây như hành, tỏi, củ cải đường, hoa hướng dương v.v... việc tạo ra cây đơn bội bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn và hạt phấn hầu như không đạt kết quả. Một số trường hợp nuôi cấy bao phấn, hạt phấn cho cây đơn bội nhưng cây lại bị bạch tạng. Chính vì lẽ đó trong những năm 70 của thế kỷ XX, người ta tập trung giải quyết vấn đề khó khăn trong nuôi cấy noãn chưa thụ tinh để tạo cây đơn bội, nhất là đối với các đối tượng như hành, tỏi, củ cải đường... như đã nêu ở trên. Đã có nhiều thành tựu trong lĩnh vực này.

– Kỹ thuật nuôi cấy noãn chưa thụ tinh: Kỹ thuật nuôi cấy noãn chưa thụ tinh tạo cây đơn bội về cơ bản cũng giống như nuôi cấy bao phấn, hạt phấn. Kết quả nuôi cấy tế bào noãn phụ thuộc vào các yếu tố như kiểu gen của cây mẹ và biến động tùy thuộc và loài cây. Những loài cây như hành, tỏi, củ cải đường tỷ lệ nuôi cấy noãn thành công khoảng từ 10% đến 20%, ở lúa nước là 5% đến 12% còn ở dâu tằm là từ 3% đến 6% v.v... Nuôi cấy noãn chưa thụ tinh gặp nhiều khó khăn, phức tạp, chủ yếu là do việc tách tế bào noãn rất khó khăn và khi tách dễ gây tổn thương cho mô. Để

tăng hiệu quả của nuôi cấy tế bào noãn chưa thụ tinh tạo cây đơn bội, người ta kết hợp nghiên cứu các yếu tố như kiểu gen cây mẹ, giai đoạn phát triển của túi phôi, chế độ xử lý nhiệt, chọn lọc các môi trường nuôi cấy v.v...

– Hiện tại nuôi cấy noãn chưa thụ tinh ở các cây ngũ cốc như lúa, ngô dễ thành công hơn cả. Người ta đã nuôi cấy được nhiều noãn từ một bắp ngô non chưa thụ phấn và tạo được hạt ngô đơn bội invitro đạt tỷ lệ 4-5%.

5.2.4.2. Nuôi cấy tế bào trần và ứng dụng trong tạo giống cây trồng

a) Vấn đề chung

Trên cơ sở những thành công trong việc dung hợp tế bào soma ở động vật và người, các nhà sinh lý học thực vật đặt vấn đề thử nghiệm dung hợp tế bào thực vật.

Như đã trình bày ở trên, các tế bào ở các mô của các loài cây có tính toàn năng, Trong những điều kiện nhất định có thể nuôi cấy, điều khiển sự phát sinh của tế bào để tạo ra cây hoàn chỉnh. Ở thực vật, tế bào có vách cellulose do vậy không thể ghép, dung hợp các tế bào với nhau được. Các nhà thực nghiệm phải mất nhiều năm mới phá bỏ được vách cellulose của tế bào thực vật, tạo ra dạng tế bào thực vật chỉ chứa màng tế bào, khối chất nguyên sinh và nhân tế bào. Từ đây mới đưa đến khái niệm nuôi cấy tế bào trần thực vật hay còn gọi là protoblast. Có hai biện pháp chính để phá vách cellulose là biện pháp cơ học và biện pháp sử dụng enzym. Việc nuôi cấy tế bào trần thành công mở ra khả năng biến nạp gen vào tế bào thực vật thuận lợi mà trước kia thường bị vách cellulose ngăn cản, đồng thời cũng mở ra khả năng dung hợp tế bào trần. Điều đó có nghĩa là gắn kết hai tế bào thành một tế bào chứa hai bộ nhiễm sắc thể khác nhau và tạo ra thể lai vô tính. Con người đã biết đến protoblast từ lâu khi phát hiện ra hiện tượng co nguyên sinh và có ý đồ tách bỏ vách cellulose để tiến hành các thí nghiệm khác nhau trên cơ sở sử dụng tế bào trần (Kuster, 1910). Tuy nhiên, cho đến năm 1960, Cocking mới tìm ra phương pháp tạo protoblast bằng các enzym phân giải vách cellulose. Kỹ thuật dùng enzym tạo protoblast do Cocking khởi xướng, sau đó đã được cải tiến và sử dụng thành công trên nhiều loài cây khác. Thực chất kỹ thuật protoblast chỉ phát triển mạnh từ sau công trình của Takebe (1971) tái sinh cây hoàn chỉnh từ protoblast tách ra từ cây thuốc lá.

Cho đến nay đã thực sự hoàn chỉnh các phương pháp nuôi cấy protoblast từ khâu phân giải vách cellulose, nuôi tế bào protoblast, tái sinh cây hoàn chỉnh thành công trên nhiều giống cây trồng quan trọng như cà chua (Zapata, 1977), cải dầu (Kartha, 1974), khoai tây (Shepanrd và Tohen, 1977), lúa nước (Fujimuna, 1985), lúa mì (Lorz, 1990) v.v... Đây là những nền tảng quan trọng cho việc thực hiện lai tế bào soma ở thực vật và chuyển gen ở thực vật nhằm tạo ra các giống cây trồng mới mang nhiều tính trạng mới.

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào trần là quy trình phức tạp, sử dụng nhiều kỹ thuật, phương tiện hiện đại của công nghệ nuôi cấy tế bào thực vật. Tuy nhiên, chúng ta có thể hình dung các bước chính của phương pháp nuôi cấy tế bào trần như sau:

b) Phương pháp tách và nuôi cấy tế bào trần

Mặc dầu theo tư liệu khoa học cho thấy, có 2 phương pháp tách protoblast, đó là

biện pháp cơ học và biện pháp sử dụng enzym. Tuy nhiên, biện pháp sử dụng enzym có hiệu quả hơn rất nhiều so với biện pháp cơ học. Nhiều loại enzym như cellulase, pectinase, hemicellulase... tách chiết từ các sinh vật khác nhau như nấm, ốc, mối v.v... có thể phá vách cellulose nhưng lại không gây độc cho tế bào. Vách cellulose gồm các thành phần chính là cellulose, pectin và hemicellulose, do vậy cần phải sử dụng phối hợp cả 3 loại enzym: petinase phá hủy pectin, cellulase phá hủy cellulose, hemicellulase phá hủy hemicellulose. Đối với tế bào thực vật, sức trương của tế bào sống luôn cân bằng với áp lực tác động lên thành tế bào. Khi tách bỏ vách cellulose, tế bào có thể bị vỡ khi không còn bị nén bởi vách cứng cellulose. Để khắc phục tình trạng này, người ta phải sử dụng hỗn hợp dung dịch làm tăng áp suất thẩm thấu gây hiện tượng co nguyên sinh vào dung dịch enzym. Thành phần dung dịch hỗn hợp bao gồm: các enzym pectinase, cellulase, hemicellulase, các chất như sorbitol, manitol, $CaCl_2.2H_2O$, $CaH_4(PO_4)_2.H_2O$... Tùy theo từng đối tượng thực vật khác nhau và từng loại mô mà thay đổi nồng độ các enzym và các chất cho thích hợp. Nồng độ các chất sorbitol, manitol thường dùng trong khoảng 0,3 đến 0,7M pH của hỗn hợp khoảng pH = 5,5 đến 5,8 và ủ trong khoảng từ 3 đến 8 giờ.

Thông thường để tạo protoblast người ta tách từ lá.

– Quy trình tách protoblast từ lá có thể tóm tắt như sau:

+ Lá non được cắt nhỏ, đưa vào dung dịch co nguyên sinh rồi ủ trong hỗn hợp enzym trong khoảng 5 đến 8 giờ.

+ Tách protoblast bằng phễu lọc lỗ có $\phi < 50\mu m$, có thể thu được hàng triệu protoblast.

+ Rửa sạch enzym bằng các dung dịch khác nhau. Các dung dịch này không chứa enzym.

+ Chuyển protoblast sang dung dịch manitol.

+ Tạo nhũ protoblast với mật độ khoảng 10^4-10^7/ml dung dịch và đem nuôi cấy protoblast trên đĩa môi trường mềm, hoặc môi trường lỏng.

– Tái sinh cây từ protoblast:

Sau thời gian nuôi cấy khoảng 1-2 tuần, các protoblast sẽ tự tái tạo vách cellulose và bắt đầu phân chia tạo ra các microcallus. Chuyển các microcallus nuôi trên môi trường đặc, chúng sẽ tạo ra các macrocallus (mô sẹo). Khi mô sẹo hình thành thì chuyển sang nuôi ở môi trường tái sinh chồi, tái sinh rễ và tạo cây hoàn chỉnh tương tự như quy trình tái sinh cây từ mô sẹo đã nêu ở phần trên.

– Các yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của tế bào trần:

Nuôi cấy tế bào trần protoblast về cơ bản cũng giống như nuôi cấy tế bào bình thường. Tuy nhiên, cũng cần có một số thay đổi do bản chất riêng của protoblast. Các thay đổi thường liên quan đến việc điều chỉnh nồng độ các muối vô cơ ($CaCl_2$, $CaH_4(PO_4)_2$, $NaNO_3$...), các hợp chất hữu cơ, vitamin, các loại đường v.v... để đảm bảo áp suất thẩm thấu đủ để tế bào không bị vỡ. Mặt khác cũng cần đảm bảo nồng độ các auxin thích hợp cho từng giai đoạn hình thành chồi, rễ và phát triển bình thường của cây tái sinh.

c) Ứng dụng công nghệ tế bào trần trong chọn tạo giống

– Nuôi cấy protoblast có thể ứng dụng vào các lĩnh vực chủ yếu sau:

+ Dung hợp tế bào protoblast để tạo tế bào lai soma.

+ Chọn tạo dòng tế bào.

+ Biến nạp di truyền tạo cây chuyển gen.

– Dung hợp tế bào protoblast (lai soma, lai vô tính tế bào thực vật):

+ Protoblast là các tế bào trần, không có vách cứng. Do vậy chúng có thể dung hợp (hòa lẫn) vào nhau để tạo tế bào lai vô tính mà vật chất di truyền gồm cả 2 hệ gen của hai tế bào khác nhau. Từ tế bào lai soma có thể hình thành cây lai. Việc dung hợp được protoblast là một trong những thành tựu to lớn của công nghệ nuôi cấy mô, tế bào. Bằng phương pháp dung hợp protoblast có thể tạo ra con lai xa giữa hai loài khác nhau - điều mà không thể thực hiện được bằng con đường lai hữu tính thông thường.

+ Thành tựu đầu tiên lai xa bằng dung hợp protoblast là của Callson (1972) đã dung hợp tế bào protoblast của 2 loài thuốc lá *Nicotiana glauca* và *Nicotiana langsdoffii*. Đặc biệt là Melcher (1977) dung hợp protoblast của cây cà chua (*Lycopersicon esculentum*) với khoai tây (*Solanum tuberosum*), đánh dấu một mốc quan trọng trong việc sử dụng phương pháp dung hợp protoblast để lai xa. Hai dạng cây lai đã được phát hiện. Dạng thứ nhất cây lai có hệ gen lục lạp của khoai tây (gọi là potatoes) và dạng thứ hai có hệ gen lục lạp của cây cà chua (gọi là topatoes). Hai dạng cây này đã hình thành bộ phận giống như củ nhưng hoa lại bất thụ. Nhiều nhà khoa học cũng tiến hành dung hợp protoblast của nhiều loài khác nhau như dung hợp protoblast của đỗ tương với lúa nước, hoặc thuốc lá với đỗ tương đã thu được cây lai chỉ sống được một thời gian ngắn. Hy vọng sẽ có sản phẩm cây rau có quả cà chua, cà chua lại có củ khoai tây...

+ Biện pháp dung hợp các tế bào có thể thực hiện theo hai cách: Dung hợp bằng hóa chất và dung hợp bằng điện trường.

* Dung hợp bằng hóa chất thường dùng là polyethylen glycol (PEG) 5-20%, là chất có tác dụng gắn kết các protoblast, tạo điều kiện cho chúng dễ dung hợp với nhau. Môi trường để các tế bào dung hợp thuận lợi nếu có độ pH từ 8 đến 10 và bổ sung thêm 200-250mm $CaCl_2$.

* Dung hợp bằng điện trường: Đưa hỗn hợp protoblast vào điện trường dòng điện một chiều. Các protoblast sẽ sắp xếp thành chuỗi giữa 2 điện cực của điện trường, sau đó tạo xung điện có thế hiệu cao (750-1000V) trong thời gian rất ngắn khoảng 1/100 đến 1/1000 giây. Trong điều kiện này, vùng tiếp xúc giữa 2 protoblast màng tế bào bị phá vỡ và có khả năng hai tế bào trần hòa nhập với nhau. Quá trình dung hợp sẽ xảy ra.

Bước tiếp theo là chọn lọc các thể lai soma. Vì quá trình dung hợp xảy ra ngẫu nhiên giữa các protoblast, nên trong một hỗn hợp 2 loại protoblast, ví dụ protoblast A và B có thể xảy ra 3 trường hợp: A dung hợp với A, B dung hợp với B được thể dung

hợp là AA, BB có hệ gen giống nhau, gọi là dung hợp đồng nhân; thể dung hợp AB gọi là thể dung hợp dị nhân. Việc tách thể dung hợp chứa hai hệ gen ra khỏi các thể dung hợp đồng nhân là vấn đề quan trọng. Người ta có thể dùng các phương pháp sàng lọc khác nhau như phân tích phổ izozym. Nếu là thể dị nhân sẽ gồm cả các băng của hệ gen "bố" và của hệ gen "mẹ". Trường hợp phân tích các hệ izozym không thành công thì phải sử dụng các kỹ thuật phân tích ADN để đánh giá.

Thành tựu và ứng dụng của phương pháp nuôi cấy và dung hợp protoblast là rất lớn. Sử dụng các phương pháp này các nhà chọn giống đã tạo ra nhiều giống mới như khoai tây, cà chua chống virus, chống rệp, hoặc cây cải dầu, thuốc lá chống nấm, chống virus.

– Chọn dòng tế bào:

Thực vật bậc cao có vách cellulose thường có kích thước lớn. Do vậy việc xử lý, chọn lọc dòng tế bào với số lượng lớn là khó thực hiện hơn nhiều so với chọn lọc các vi sinh vật có kích thước tế bào nhỏ hơn.

Khi loại bỏ vách cellulose để tạo thành tế bào trần (protoblast) thì các tế bào riêng rẽ này có kích thước nhỏ tương đương với tế bào vi sinh vật. Do vậy có thể sử dụng phương pháp chọn dòng tế bào như phương pháp sử dụng đối với vi sinh vật.

Một đĩa petri có đường kính khoảng 5-7cm cho phép nuôi 5.10^6 protoblast (ví dụ protoblast cây thuốc lá). Muốn nuôi hết 5.10^6 cây thuốc lá trên để kiểm tra cần khoảng 100ha đất canh tác. Do vậy cần phải tìm biện pháp chọn lọc bằng xử lý đột biến, ví dụ như các đột biến kháng với các chất kháng sinh rồi nuôi trong môi trường chứa kháng sinh thì có thể chọn lọc dòng tế bào mong muốn. Nhìn chung các biện pháp chọn lọc dòng có thể phân biệt bằng hình thái cây lai, sử dụng gen đánh dấu, hoặc sử dụng môi trường chọn lọc thích hợp để chọn lọc dòng.

– Biến nạp di truyền và tạo cây chuyển gen:

Tế bào trần không có vách cellulose thuận lợi cho dùng phương pháp biến nạp gen, từ đó tạo ra cây trồng chuyển gen. Người ta đã chuyển nhiều gen quan trọng như gen chống sâu, chịu thuốc diệt cỏ, gen kháng nấm, gen chịu hạn v.v... vào tế bào trần của lúa, ngô, khoai tây v.v... để tạo ra cây trồng mới có các đặc tính mong muốn. Về kỹ thuật chuyển gen tạo thực vật chuyển gen sẽ đề cập ở phần sau trong chương này.

5.2.4.3. Biến dị dòng soma và chọn lọc biến dị soma

a) Khái niệm

Biến dị dòng soma (soma clone variation) là những biến dị thể hiện ở các tế bào, các mô và các cây có nguồn gốc từ việc nuôi cấy mô, tế bào. Biến dị dòng soma còn được gọi là biến dị dòng vô tính.

Trong nhân giống vô tính invitro, không phải tất cả các cây phát sinh từ một mô của cây đều có tính đồng đều về mặt di truyền. Một số cây phát sinh từ nuôi cấy mô không ổn định về mặt di truyền. Đây cũng là hạn chế khi chúng ta nhân giống vô tính invitro nhằm tạo giống đồng nhất. Tuy nhiên, những biến dị dòng vô tính này lại cho chúng ta tiềm năng rất lớn để nghiên cứu và chọn tạo giống mới.

Tỷ lệ các biến dị phát sinh trong quá trình nhân giống vô tính invitro là khá lớn, do vậy cần phải xác định nguyên nhân, cơ chế các biến dị, từ đó chúng ta điều khiển định hướng có lợi cho chọn tạo giống.

b) Phân loại các biến dị dòng soma

Trên cơ sở xem xét sự biểu hiện các biến dị dòng soma, có thể chia làm 2 loại biến dị chính là biến dị kiểu gen và biến dị kiểu hình.

– Biến dị kiểu gen (Genetic variation):

Biến dị kiểu gen là các biến dị có liên quan đến vật chất di truyền của cây, có khả năng di truyền, xảy ra với tần số thấp. Bản chất của các biến dị này còn chưa được sáng tỏ nhưng có thể chia ra ba kiểu chính sau (Larkin et. al., 1985).

+ Đột biến số lượng nhiễm sắc thể: Đây là kiểu biến dị phổ biến, thể hiện sự sai lệch về số lượng nhiễm sắc thể như tạo ra thể đa bội, dị bội hay thể khảm. Thông thường, tỷ lệ hình thành các biến dị số lượng nhiễm sắc thể ở các loài có bộ NST 2n chứa nhiều nhiễm sắc thể là cao hơn so với các loài có số lượng nhiễm sắc thể ít (Creissen and Karp, 1985).

+ Đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể là các biến đổi về cấu trúc của nhiễm sắc thể. Các biến đổi này gồm: mất đoạn, đảo đoạn, chuyển đoạn hay lặp đoạn của nhiễm sắc thể.

+ Đột biến gen là các biến đổi trong cấu trúc của gen như: mất, thêm hay lặp các nucleotit, tăng số lượng của đoạn trình tự đặc thù, hoặc hiện tượng nhảy của gen.

– Biến dị kiểu hình (Phenotype variation):

Biến dị kiểu hình liên quan đến sự thể hiện của một kiểu gen nhất định. Hiện tượng thường thấy là hiện tượng methyl hóa của gen làm xuất hiện kiểu hình mới của cây sau khi tái sinh cây và như là kết quả của các phản hồi về sinh lý. Những biến dị kiểu hình này là tạm thời, không di truyền được cho thế hệ sau. Ví dụ điển hình của biến dị kiểu hình như hiện tượng tăng mạnh khả năng sinh trưởng của cây tái sinh khi đưa ra trồng trên đất. Biểu hiện này có liên quan đến quá trình trẻ hóa, hoặc quá trình loại bỏ virus của mô nuôi cấy ban đầu (Swartz et. al., 1983; Skirvin et. al., 1994). Một ví dụ khác của biến dị kiểu hình thường thấy là hiện tượng ra hoa sớm, cây bị bạch tạng, cây có thay đổi về màu sắc hoa, hình dạng của hoa, của lá và chiều cao của cây.

Nguyên nhân của các biến dị kiểu hình không di truyền này còn chưa được sáng tỏ nhưng chắc chắn có liên quan đến quá trình biểu hiện của gen (Skirvin et. al., 1994).

c) Các nguyên nhân chính gây ra biến dị dòng soma

Nhiều thực nghiệm nhằm xác định nguyên nhân tạo ra các biến dị dòng soma trong nuôi cấy mô. Mọi yếu tố trong quá trình nuôi cấy dẫn đến những biến dị di truyền đều xem như là nguyên nhân của biến dị di truyền các dòng soma. Có thể chia các nhóm yếu tố làm 3 nhóm nguyên nhân, đó là: sinh lý, di truyền và hóa sinh, mà thực chất là nguồn gốc cây ban đầu và các yếu tố trong quá trình nuôi cấy mô.

– Nguồn gốc các mẫu nuôi cấy mô:

Các mẫu nuôi cấy từ một kiểu gen cho nên về mặt di truyền được xem như là đồng nhất. Tuy nhiên, trên thực tế, các mẫu nuôi cấy lại lấy từ các mô đã phân hóa khác nhau như xylem, phloem, mô bì, nhu mô v.v... Tế bào các mô này có thể ở các mức bội thể khác nhau. Sự đa dạng này gọi là đa bội vô tính (polysomatic). Nhiều loài cây đều có hiện tượng đa bội vô tính như lúa mì, thuốc lá, khoai tây, cà chua...

Hiện tượng khảm ở cây phát sinh từ nuôi cấy mô do ở các cây có các lớp tế bào, hoặc mô có cấu trúc di truyền khác nhau là do hiện tượng đột biến soma phát sinh trong quá trình phân bào nguyên phân.

– Các yếu tố trong quá trình nuôi cấy:

Các yếu tố chủ yếu trong quá trình nuôi cấy mô dẫn đến các biến dị dòng soma bao gồm:

+ Phương thức nhân giống invitro: Phương thức nhân giống khác nhau cho tỷ lệ xuất hiện các biến dị dòng soma khác nhau. Nhìn chung, chồi bất định được tái sinh từ một số tế bào thì cho tỷ lệ biến dị soma cao hơn nhiều so với chồi tái sinh từ một nhóm tế bào hay một mô. Nuôi cấy callus, protoblast thường cho nhiều biến dị soma.

+ Loại mẫu cấy: Các loại mẫu cấy khác nhau cũng cho tỷ lệ biến dị dòng soma khác nhau. Nếu mẫu cấy lấy từ chồi đỉnh, chồi nách hay mô phân sinh đỉnh (meristem) thường cho tỷ lệ biến dị dòng soma thấp hơn so với mẫu lấy từ lá, rễ, thân. Bên cạnh đó tuổi của cây mẹ, kiểu gen của cây mẹ, dòng tế bào non hay già v.v... cũng ảnh hưởng đến tỷ lệ biến dị dòng soma.

+ Các chất điều hòa sinh trưởng: Nếu nuôi cấy mô trong môi trường chứa auxin mạnh như 2,4D, hoặc 2,4,5,T thường gây nhiều loại biến dị ở cây tái sinh từ mô nuôi cấy này. Ví dụ ở cây nho, nếu nuôi cấy mô kéo dài vài năm trong điều kiện môi trường có auxin mạnh, sẽ mất dần khả năng phân hóa và tái sinh cây.

+ Thời gian nuôi cấy và số lần cấy chuyển: Nếu nuôi cấy mô dài ngày cũng như tăng số lần cấy chuyển sẽ làm tăng tỷ lệ xuất hiện các biến dị soma. Nguyên nhân là do việc kéo dài nuôi cấy mô tế bào trong điều kiện invitro dẫn đến thay đổi kiểu methyl hóa các nucleotit trong genom.

Quá trình methyl hóa ADN là hiện tượng một nhóm methyl (CH_3) gắn với adenin hay cytosin xảy ra trong đoạn ADN mã hóa cho một gen, làm cho gen này bị bất hoạt như ở ngô, khoai tây, nho v.v... Biến dị trong quá trình nuôi cấy mô còn dẫn đến những biến đổi hóa sinh xảy ra ở nhiều loài cây trồng khi nuôi cấy mô. Ví dụ như hiện tượng thay đổi trong đồng hóa cacbon dẫn đến mất khả năng quang hợp, khả năng tổng hợp tinh bột, caroten... Biến đổi số lượng nhiễm sắc thể của tế bào, mô nuôi cấy invitro có thể còn do trong quá trình phân bào xảy ra hiện tượng phân chia không đồng đều của nhiễm sắc thể. Biến dị đột biến gen, hoặc đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể có thể do nhiều nguyên nhân khác nhau. Có ý kiến cho rằng, do sự sao chép muộn của vùng dị nhiễm sắc (heterochromatin) là nguyên nhân chính dẫn đến biến dị dòng vô tính ở ngô (*Zea mays L.*), hoặc ở đậu tằm ngựa (*Vivia faba L.*). Các yếu tố chuyển vị Ac- Dc cũng được thể hiện sau quá trình nuôi cấy mô invitro.

d) Những ứng dụng của chọn lọc biến dị dòng soma

Muốn chọn tạo giống theo một tính trạng cụ thể nào đó thì các nhà chọn tạo giống phải nuôi trồng thí nghiệm ở các điều kiện khác nhau. Ví dụ, muốn chọn lọc giống cây chống chịu mặn thì nhà chọn giống phải trồng cây với một số lượng lớn, bố trí trồng ở các điều kiện đất có nồng độ muối khác nhau và phải tiến hành qua nhiều thế hệ. Do vậy tốn kém về chi phí và thời gian.

Phương pháp nuôi cấy mô invitro kết hợp với chọn lọc giúp các nhà chọn giống chọn lọc với số lượng tế bào đơn rất lớn và từ đó tạo ra cây hoàn chỉnh. Với phương pháp này, các nhà chọn giống có thể chọn lọc từ một vài đĩa petri, hay một vài bình nuôi cấy có thể thu được một giống cây mong muốn trong một thời gian ngắn. Chọn lọc biến dị dòng soma được ứng dụng trên nhiều loài cây trồng và đặc biệt có ý nghĩa đối với việc cải tiến các cây trồng đã được nhân giống vô tính qua hàng ngàn năm và có nền di truyền rất hẹp, ít đa dạng như các giống chuối (*Musa spp*). Chuối rất ít khi sản sinh ra hạt có khả năng sinh sản. Việc chọn giống chuối chủ yếu bằng con đường vô tính. Do vậy nuôi cấy mô, tế bào kết hợp với tác động của các điều kiện chọn lọc là phương thức tốt nhất để chọn tạo giống chuối.

– Chọn lọc biến dị soma:

Người ta tập trung chọn lọc các biến dị soma theo một số tính trạng như kháng bệnh (nấm, khuẩn, virus) và các tính trạng chống chịu điều kiện bất lợi (hạn, lạnh, mặn, chịu phèn...).

+ Chọn lọc các cây kháng bệnh: Sử dụng các yếu tố chọn lọc như phytotoxin để chọn lọc khả năng kháng với các nấm, vi khuẩn, hoặc virus đã được thử nghiệm. Tuy nhiên, chọn lọc cây có nguồn gốc từ mô nuôi cấy invitro làm tăng cường khả năng kháng bệnh lại kéo theo những đặc tính không mong muốn khác. Ví dụ, chọn lọc liên tiếp với một phytotoxin làm cho khoai tây kháng bệnh, nhưng củ khoai lại nhỏ đi và chất lượng dinh dưỡng của củ lại kém đi. Thông thường người ta sử dụng trực tiếp nấm, vi khuẩn làm yếu tố chọn lọc đã phát hiện dòng tế bào soma kháng bệnh. Từ các dòng tế bào này tạo ra cây kháng bệnh tương ứng.

+ Chọn lọc cây chống chịu với điều kiện môi trường không thuận lợi:

Nhiều vùng đất trồng có độ muối, độ phèn hay kim loại nặng khá cao. Muốn chọn các cây trồng thích nghi với các điều kiện môi trường bất lợi này cần chọn lọc dòng tế bào soma có khả năng thích ứng, từ đó cho cây có khả năng chống chịu. Chọn lọc dòng tế bào soma chống chịu với muối NaCl đã cho các cây trồng như lúa nước, khoai tây, cà chua, mía... chống chịu muối tốt. Tuy nhiên, các dòng cây này thường có năng suất thấp hơn, hoặc sinh sản kém hơn. Việc nghiên cứu khắc phục các tính trạng không mong muốn kèm theo khi chọn lọc các cây chống chịu với điều kiện không thuận lợi đang được các nhà chọn giống cây trồng quan tâm nghiên cứu.

– Phát hiện các biến dị soma trong nuôi cấy mô: Việc phát hiện sớm các biến dị mong muốn khi nuôi cấy mô là vấn đề quan trọng. Phát hiện biến dị sớm trước khi thể hiện ở kiểu hình của cây đã làm giảm bớt nhiều thời gian chọn lọc. Người ta thường dùng các biện pháp kiểm tra sinh học trực tiếp trong quá trình nuôi cấy đã

thu được nhiều kết quả khả quan. Chọn lọc tính kháng bệnh bằng cách nuôi cấy mô tế bào cùng với nguồn bệnh sẽ chọn lọc dòng tế bào có tính kháng bệnh, từ đó cho cây trồng kháng bệnh. Biện pháp chọn lọc này đã hết sức thành công khi chọn lọc các cây ăn quả như cam, quýt, xoài và nho kháng bệnh do nấm gây nên.

Khi kỹ thuật phân tử phát triển, người ta dùng các chỉ thị phân tử như RAPD, AFLP, RFLP... kết hợp với các cặp mồi đặc hiệu để phát hiện các gen kháng bệnh, tính chống chịu đặc trưng nhằm chọn lọc các dòng tế bào mong muốn.

– Triển vọng của nghiên cứu biến dị dòng soma:

Như đã nêu trong một số ví dụ ở trên, nghiên cứu chọn lọc các biến dị dòng soma cho nhiều kết quả và tạo ra nhiều giống cây trồng mới có các đặc tính mong muốn. Tuy nhiên, về tiềm năng trong lĩnh vực này còn rất lớn. Những biến dị do nuôi cấy mô vẫn còn là con đường rất tốt để cải tạo các cây trồng, nhất là các cây trồng lâu năm. Những biến dị dòng soma vẫn được xã hội chấp nhận và chưa có cản trở về mặt xã hội như vấn đề tạo giống cây bằng kỹ thuật chuyển gen. Mặt khác nghiên cứu các hiện tượng chống chịu, kháng bệnh một cách thuận lợi.

5.2.5. Thụ phấn và nuôi cấy phôi invitro

5.2.5.1. Hiện tượng bất thụ trong lai xa

Khi lai xa giữa 2 loài cây khác nhau thường xảy ra hiện tượng bất hợp của giao tử thể hiện ở 2 khâu: Bất hợp của giao tử trước khi thụ tinh và bất hợp của giao tử sau khi thụ tinh.

a) Bất hợp của giao tử trước khi thụ tinh

Trong tự nhiên, quá trình thụ phấn của thực vật thường xảy ra theo trình tự sau:

Hạt phấn chín rơi lên núm nhụy sẽ xảy ra nảy mầm, tạo ra ống phấn. Ống phấn mọc dài xuyên dọc theo nhụy và tiếp cận túi phôi. Tiếp theo là 2 nhân tinh tử của hạt phấn thâm nhập vào túi phôi và thực hiện quá trình thụ tinh kép. Một tinh tử kết hợp với tế bào noãn đơn bội tạo thành hợp tử lưỡng bội, sau đó phát triển thành phôi. Một tinh tử thứ hai kết hợp với tế bào nội nhũ nhị bội để tạo thành hợp bào nội nhũ tam bội.

Nếu một hạt phấn lạ rơi vào núm nhụy, lập tức nhụy sẽ tiết ra chất ức chế ngăn cản sự phát triển của ống phấn, hoặc làm biến dạng ống phấn để ngăn cản sự thụ tinh. Đó là hiện tượng bất hợp giao tử trước thụ tinh.

b) Bất hợp của giao tử sau thụ tinh

Trong một số trường hợp, hạt phấn lạ rơi vào núm nhụy, thụ phấn vẫn xảy ra nhưng hạt của cây lai lại không phát triển. Nguyên nhân của hiện tượng này là giữa nội nhũ và phôi đã hình thành cơ chế ức chế sự phát triển của phôi. Hiện tượng bất hợp của giao tử sau khi thụ tinh thường gặp khi tiến hành lai xa khác loài hay khác chi.

5.2.5.2. Thụ phấn invitro

Để khắc phục hiện tượng bất hợp giao tử khi lai xa, người ta áp dụng kỹ thuật thụ

phấn trong ống nghiệm (invitro). Quá trình thụ phấn invitro bao gồm tách bầu quả chứa noãn và nuôi cấy trong điều kiện vô trùng. Hạt phấn được đặt cẩn thận vào đầu nhụy. Khi thụ phấn thành công thì phôi sẽ phát triển trong môi trường nuôi cấy. Biện pháp này đặc biệt có ý nghĩa đối với trường hợp phôi phát triển không bình thường, hoặc cây cho ít hạt phấn, ống phấn phát triển chậm, tỷ lệ hạt phấn nảy mầm thấp...

Điều kiện cơ bản để thực hiện thành công khi thụ phấn invitro là phải nuôi cấy được bầu quả hay noãn đã phân lập được và phải chủ động điều khiển quá trình nảy mầm của hạt phấn trong môi trường nuôi cấy vô trùng. Như vậy, sau khi thụ phấn thành công, phôi sẽ được nuôi ngay trên môi trường nuôi cấy vô trùng.

Trên cơ sở thí nghiệm thụ tinh trong ống nghiệm đối với các loài như cà chua, dưa chuột (Nitsch, 1951), ở rau cải (Inomata, 1975), ở cam, quýt (Beasley, 1974) v.v... người ta đã tổng kết quy trình thụ phấn invitro gồm các bước sau:

– Kích thích hạt phấn nảy mầm.

– Kích thích sinh trưởng của ống phấn.

– Nuôi noãn và cho thụ tinh noãn.

– Nuôi hợp tử thành phôi và hạt.

Trên cơ sở quy trình này, người ta đã thành công trong việc thụ phấn invitro đối với một số loài thuộc họ Paparaceae, họ Cryophyllaceae, họ Solanaceae, vì các họ này bầu quả chứa nhiều noãn. Thời gian gần đây, người ta đã thành công trong việc thụ phấn invitro và tạo phôi đối với một số loài, chi trong họ Hòa Thảo (Graminaceae) như việc lai noãn của đại mạch (Hordeum) với hạt phấn của lúa mạch đen (Secale) cũng như với hạt phấn của lúa mì (Triticum).

5.2.5.3. Nuôi cấy phôi invitro (cứu phôi)

Trong quá trình lai xa, bằng phương pháp thụ phấn invitro, kết quả thụ tinh có thể hình thành hợp tử nhưng phôi không phát triển được. Nguyên nhân chủ yếu của hiện tượng này là nội nhũ không phát triển bình thường và không cung cấp đủ dinh dưỡng cho phôi phát triển. Để khắc phục hiện tượng trên phải tiến hành nuôi cấy invitro nhằm cứu phôi. Phôi non được tạo thành sau khi thụ tinh phải được tách rời và nuôi cấy trong môi trường thích hợp để phôi phát triển bình thường. Đã có nhiều thành công trong việc nuôi cấy phôi invitro nhằm cứu phôi khi lai khác loài như lai lúa mì với đại mạch, hoặc lai đại mạch với lúa mạch đen và tạo ra lúa lai xa hữu thụ nổi tiếng với tên gọi là giống lúa Hordescale.

5.2.5.4. Những thành tựu và khó khăn trong việc thụ phấn và nuôi cấy phôi invitro

a) Những khó khăn

– Môi trường dinh dưỡng: Các môi trường dinh dưỡng thông thường để nuôi cấy mô, tế bào thường không đáp ứng trong việc nuôi cấy phôi invitro. Mỗi một loại phôi invitro cần phải có môi trường thích hợp riêng. Cần điều chỉnh các nồng độ muối, thành phần của loại muối cho thích hợp. Nồng độ muối kalium trong môi trường nuôi

cấy thích hợp sẽ kích thích phôi phát triển. Các nguồn nitơ thường dùng là các muối amonium malat, amonium citrat, hoặc amonium glutamat.

– Sự phát triển mô sẹo:

Khi nuôi cấy phôi invitro, trong một số trường hợp phôi phát triển thành khối mô sẹo. Có thể giải thích hiện tượng phôi phát triển thành mô sẹo là do môi trường dinh dưỡng không bình thường nên đã xảy ra hiện tượng tương tự như sự không phù hợp giữa phôi và nội nhũ. Mặc dù cũng có thể tái sinh cây từ khối mô sẹo này, nhưng mô sẹo này thường kèm theo hiện tượng không ổn định về vật chất di truyền.

b) Những thành tựu

Từ những thành tựu nuôi cấy phôi invitro ban đầu của cây củ cải Raphanus (Hanning, 1904), về sau này là những thí nghiệm nuôi cấy phôi invitro ở các cây lai khác loài giữa *Linum perenne* với *Linum austriacum* (Laibach, 1929). Hiện tại có nhiều thành tựu trong việc cứu phôi như nuôi cấy phôi non của tổ hợp lai khác loài *Hordedum Vulgare* với *Secale cereale* (Clauss và Kunert, 1977), hoặc đối với con lai khác loài giữa *Argemone mexicana* lai với *Argemone ochroneuca* (Kanta và cộng sự, 1963), hoặc con lai giữa hai loài bất tương hợp về sinh sản hữu tính như *Brassica campestris* với loài *Brassica oleracea* (Inomata, 1977-1979)... Các thành tựu khác như nuôi cấy phôi của sắn (*Manihot esculentum)* (Stamp và Henshaw, 1982), của đu đủ (*Carica papaya)* (Litz và Conover, 1982), của mía (*Saccharum officinarum)* (Jane Ho và Vasil, 1983) và gần đây là cây lạc (*Arachis hypogaea)* (Hazel Y, Wetzstein và Charleen Baker, 2000) v.v...

5.2.6. Công nghệ tế bào trong bảo quản nguồn gen thực vật

5.2.6.1. Khái niệm chung về bảo quản nguồn gen thực vật

Mục đích cơ bản của việc bảo quản nguồn tài nguyên gen thực vật là duy trì sự phong phú, đa dạng di truyền trong loài, giữa các loài và cả hệ sinh thái nói chung. Trên cơ sở đó làm cơ sở cho việc khai thác, sử dụng chúng có hiệu quả nhất cả trong thời gian hiện tại và trong tương lai (Khanna và cs, 1991). Công việc bảo quản nguồn gen thực vật là một công việc không thể thiếu trong công tác giống cây trồng.

a) Phương thức bảo quản nguồn gen phụ thuộc vào loại cây trồng khác nhau, chủ yếu phụ thuộc vào bản năng sinh tồn nòi giống của từng loài. Dựa vào đặc tính sinh sản, các loài cây trồng nói riêng và các loài thực vật nói chung được chia ra làm 3 nhóm chính sau:

– Cây sinh sản hữu tính, hạt của chúng có thể chịu đựng được điều kiện bảo quản ở nhiệt độ thấp, độ ẩm thấp. Các loài cây trồng này gồm có: hạt lúa nước, ngô, đậu, lúa mì, đại mạch, ổi, các hạt rau v.v...

– Cây sinh sản hữu tính, hạt của chúng không chịu được điều kiện bảo quản ở nhiệt độ và độ ẩm thấp. Khi bảo quản trong điều kiện nhiệt độ và ẩm độ thấp, hạt dễ bị hỏng, mất khả năng nảy mầm. Các loài cây trồng này gồm có cao su, dừa, xoài, mít, lê, măng cụt, sầu riêng, chôm chôm v.v...

– Những cây trồng được nhân giống vô tính lâu dài, chúng mất khả năng sinh sản hữu tính. Các loài này gồm có: Khoai sọ, dứa, dong riềng v.v... là loài mất hoàn toàn khả năng sinh sản hữu tính. Một số loài nhân vô tính nhưng vẫn còn một phần khả năng sinh sản hữu tính như: Khoai lang, sắn, mía, chuối, hành, tỏi v.v...

b) Tùy theo đặc tính sinh học của loài, tùy theo mức độ tồn tại mà có các phương thức bảo quản nguồn gen khác nhau. Tuy nhiên, có thể chia làm hai phương thức bảo quản chính như sau:

– Bảo quản tại chỗ – Bảo quản In-situ là hình thức bảo quản nguồn gen tại chỗ, tại vùng chúng thường được trồng, được tồn tại trong điều kiện sinh thái tự nhiên của chúng. Phương thức bảo quản này thực hiện đối với cây sinh sản vô tính, cây hoang dại, một số loài cây có múi đặc sản như cam, quýt v.v...

– Bảo quản Ex-situ là hình thức bảo quản mẫu trong điều kiện nhân tạo tối ưu. Nói cách khác đây là hình thức thu gom các loài cây trồng từ nơi xuất xứ được bảo quản cất giữ, hoặc trồng tại các vườn mẫu. Bảo quản Ex-situ có các hình thức như:

+ Bảo quản tại vườn ươm (field genebank).

+ Bảo quản hạt trong kho lạnh (seed genebank).

+ Bảo quản invitro (invitro genebank).

+ Bảo quản ADN.

Việc lựa chọn hình thức bảo quản đối với cây trồng là phụ thuộc vào bản chất, phụ thuộc vào điều kiện kinh tế, sự phát triển khoa học và công nghệ của từng Quốc gia. Nhiều nước sử dụng cả 4 hình thức bảo quản nói trên để duy trì, bảo quản vốn gen của cây trồng. Tuy nhiên, tùy từng loài mà tỷ lệ phần trăm hình thức bảo quản khác nhau.

Ví dụ đối với lúa, bảo quản hạt chiếm 80%, bảo quản in-situ chiếm 10%, bảo quản invitro là 7%, còn bảo quản hạt phấn 3%.

Bảo quản khoai lang: bảo quản trên đồng ruộng là 50%, bảo quản hạt là 10%, bảo quản in-situ là 8%, bảo quản invitro là 25% và bảo quản hạt phấn là 7%.

Trên thế giới hiện nay có những kho bảo quản hạt giống rất lớn, gồm hầu hết các hạt giống cơ bản trên thế giới. Nhìn chung phương thức bảo quản invitro có vai trò rất lớn vì chủ yếu cần một khoảng không gian nhỏ hẹp, có thể lưu giữ một số lượng lớn cá thể để chủ động trong công tác trồng trọt.

5.2.6.2. Bảo quản nguồn gen invitro

Bảo quản nguồn gen invitro sử dụng hai phương pháp chính là bảo quản sinh trưởng tối thiểu và phương pháp bảo quản ngừng sinh trưởng tạm thời.

a) Phương pháp bảo quản sinh trưởng tối thiểu

Phương pháp này áp dụng cho việc bảo quản ngắn hạn các cây nhân giống vô tính invitro (chuối, dứa, khoai tây, khoai lang...). Đặc điểm cơ bản của phương pháp này là kéo dài thời gian giữa 2 lần cấy chuyển nhờ ức chế sự sinh trưởng của mẫu nuôi cấy nhằm giữ mức tối thiểu chi phí trong quá trình bảo quản.

Mẫu đưa vào bảo quản thường là dạng phôi, chồi, mầm, hoặc cây con sạch bệnh. Mẫu cần được đặt trong điều kiện nhiệt độ, ánh sáng và chế độ dinh dưỡng nhất định để tốc độ sinh trưởng của chúng giảm đi 15-20 lần so với tốc độ sinh trưởng trong điều kiện bình thường.

Các nhân tố thường dùng để ức chế sinh trưởng thường là:

– Nhiệt độ phòng nuôi thấp: Đây là nhân tố phổ biến để ức chế sinh trưởng. Tùy từng loài khác nhau mà chúng ta hạ nhiệt độ cho thích hợp.

Đối với các loài chịu lạnh, nhiệt độ bảo quản từ 0°C đến 5°C. Ví dụ, giữ chồi cây táo, cây thông ở nhiệt độ 2°C trong 52 tuần, khoai tây giữ ở nhiệt độ 6-12°C thời gian 25-52 tuần... Những cây nhiệt đới cần bảo quản ở nhiệt độ cao hơn, ví dụ như cây chuối giữ ở nhiệt độ 15°C, trong thời gian 18 tháng, khoai lang giữ ở 18°C, thời gian 12 đến 18 tháng...

– Bổ sung vào môi trường nuôi các chất ức chế sinh trưởng như axit abcisic, clo, cholin clorit, làm tăng áp suất thẩm thấu bằng cách bổ sung vào môi trường các chất như sucrose, manitol v.v... làm giảm việc cung cấp oxy cho mẫu nuôi cấy bằng dùng dầu phủ và có thể làm nghèo môi trường dinh dưỡng đến mức tối thiểu. Tất cả các biện pháp này làm giảm đáng kể khả năng sinh trưởng của mẫu nuôi cấy bảo quản. Ví dụ, khi nuôi cấy sắn ở nhiệt độ 20°C có bổ sung vào môi trường 4% sucrose, có thể kéo dài thời gian nuôi cấy tới 15 tháng.

b) Phương pháp bảo quản ngừng sinh trưởng tạm thời

Đây là phương pháp bảo quản mẫu giống trong nitơ lỏng, thường được áp dụng cho nhiều loài cây. Trong thời gian bảo quản tế bào, mô hoàn toàn ngừng sinh trưởng. Mẫu bảo quản gồm phôi, mô sẹo và tế bào. Thời gian bảo quản có thể kéo dài 20 -30 năm, hoặc lâu hơn. Trước khi đưa vào bảo quản, mẫu phải được xử lý tránh hình thành các tinh thể nước trong tế bào làm chết mẫu. Quy trình bảo quản gồm các bước chính sau:

– Tách mẫu nuôi cấy invitro đang ở pha sinh trưởng mạnh để đưa vào bảo quản.

– Xử lý chống đông bằng dung dịch DMSO, nồng độ 1M; kết hợp với glycerol, nồng độ 1M và đường sucrose, nồng độ 2M.

– Hạ nhiệt độ xuống -30°C đến -40°C để giữ ổn định các chất trong tế bào.

– Bảo quản ở nhiệt độ -196°C trong thời gian dài, có thể tới 30 năm. Khi hết thời gian bảo quản, hoặc khi cần đưa mẫu ra thì phải phá băng và phục hồi sinh trưởng theo thứ tự:

+ Phá băng ở nhiệt độ 37°C đến 40°C.

+ Phục hồi sinh trưởng và nuôi cấy tạo ra cây hoàn chỉnh.

5.2.6.3. Những kết quả và khó khăn còn tồn tại

a) Những kết quả

Hàng chục năm qua, nguồn tài nguyên cây trồng trên thế giới được quan tâm gìn

giữ và bảo quản. Nhiều loài cây trồng đã được đưa vào bảo quản invitro như: Cây dứa, cây cà phê, cây cao su, khoai lang, khoai tây, sắn, cây chuối, đu đủ, cây dừa, cây nho, các cây có múi (cam, chanh...) các cây họ gừng riềng (gừng, nghệ, riềng...), mía, mít và một số loài cây trồng khác.

b) Những khó khăn còn tồn tại

Việc bảo quản nguồn gen thực vật được nhiều nước quan tâm. Đã có nhiều trong tâm chuyên bảo quản nguồn gen như Trung tâm nghiên cứu khoai tây (CIP) ở Peru; Trung tâm bảo quản sắn, củ mài (IITA) ở Nigeria; Trung tâm nghiên cứu nhiệt đới (CIAT), ở Columbia; Mạng lưới cải tạo giống chuối Thế giới (1NIBAP) ở Bỉ; Phòng bảo quản các giống khoai lang ở Việt Nam v.v... Tuy nhiên, việc bảo quản còn gặp những hạn chế, khó khăn như:

– Chưa có những nghiên cứu đánh giá đầy đủ mối tương quan giữa các yếu tố môi trường (môi trường dinh dưỡng, chất ức chế dinh dưỡng, nhiệt độ, ánh sáng...) trong quá trình bảo quản.

– Chưa có điều kiện thử nghiệm thời gian bảo quản an toàn đối với từng loại cây trồng; khả năng kiểm tra sự ổn định về phẩm chất của giống và về tính di truyền trong quá trình bảo quản còn hạn chế.

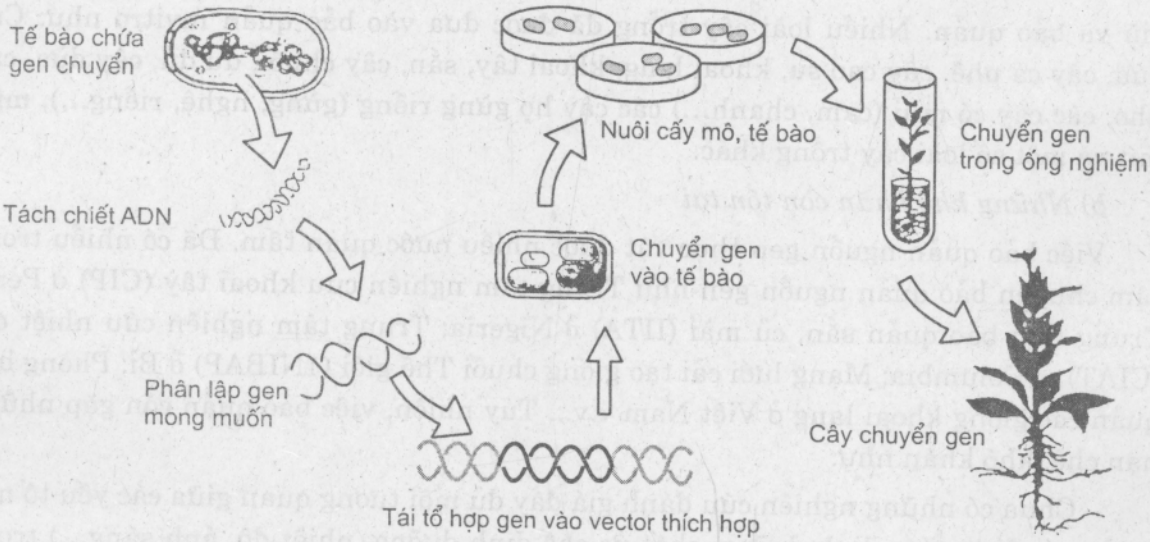
– Điều kiện xây dựng các trung tâm, kho bảo quản cần nhiều kinh phí nên khó thực hiện, đặc biệt ở những nước có nguồn tài nguyên phong phú nhưng kinh tế chậm phát triển.

5.3. KỸ THUẬT CHUYỂN GEN Ở THỰC VẬT

5.3.1. Vấn đề chung về kỹ thuật chuyển gen ở thực vật

Kỹ thuật chuyển gen ở thực vật là kỹ thuật đưa một hay nhiều gen lạ đã được thiết kế dạng plasmid tái tổ hợp, hoặc được gắn vào hệ gen của tế bào chủ. Trong tế bào chủ, gen lạ hoạt động tổng hợp nên các protein đặc trưng, từ đó xuất hiện đặc tính mới của cơ thể đã mang gen chuyển. Muốn chuyển gen lạ vào tế bào thực vật chủ, phải gắn gen mong muốn chuyển vào vector. Các vector chuyển gen càng nhỏ càng tốt vì chúng dễ xâm nhập vào tế bào. Vector phải có khả năng tự sao chép, nhờ đó gen lạ cũng được sao chép cùng với ADN vector. Đồng thời vector phải được gắn gen chỉ thị chọn lọc, ví dụ, gen kháng với kháng sinh, hoặc gen chỉ thị màu. Vector phải có một hay một vài đoạn trình tự nhận biết và cắt của enzym giới hạn để khi xử lý bằng enzym giới hạn tạo vị trí ghép nối với ADN để tạo ADN tái tổ hợp.

Vector thường dùng để chuyển gen ở thực vật gồm có các plasmid của vi khuẩn, hoặc một số loại virus thực vật. Các bước chính để tạo một thực vật chuyển gen gồm có: Chọn lọc và phân lập gen; chuyển gen vào tế bào thực vật; nuôi tế bào thực vật mang gen lạ để tạo cây hoàn chỉnh. Sơ đồ tổng quát tạo thực vật chuyển gen thể hiện ở Hình 5.5.



Hình 5.5. Sơ đồ tổng quát tạo thực vật chuyển gen

a) Chọn lọc gen

Về nguyên tắc, gen của tất cả các loài sinh vật, bao gồm động vật, thực vật, vi sinh vật, thậm chí cả gen nhân tạo đều có thể được chọn lọc và chuyển vào thực vật. Tuy nhiên, thông thường người ta chỉ chọn lọc một số gen quy định một số tính trạng mong muốn để chuyển vào cây trồng như gen kháng sâu, gen kháng virus, kháng nấm, gen kháng thuốc diệt cỏ, hoặc các gen sản xuất vacxin cho người và động vật v.v... Các gen kháng sâu chủ yếu thường dùng như gen kháng sâu BtCryI chuyển vào ngô và một số cây lương thực khác.

b) Chuyển gen vào tế bào thực vật

Sau khi chọn lọc, phân lập gen quy định các tính trạng mong muốn, cần tạo ADN tái tổ hợp rồi chuyển vào tế bào thực vật. Thực hiện chuyển gen bằng 2 nhóm phương pháp chính: Chuyển gen gián tiếp nhờ sinh vật trung gian và chuyển gen trực tiếp bằng các phương tiện, thiết bị khác nhau.

c) Nuôi tế bào thực vật thành cây hoàn chỉnh

Sau khi gen ngoại lai được chuyển vào tế bào thực vật, các tế bào này cần được nuôi trong điều kiện dinh dưỡng và các chất điều hòa sinh trưởng thích hợp để tạo cây hoàn chỉnh. Cây non được ươm trong vườn ươm, chọn lọc rồi đưa ra đồng ruộng.

5.3.2. Các phương pháp chuyển gen ở thực vật

Có nhiều phương pháp khác nhau sử dụng để chuyển gen vào thực vật. Tuy nhiên, có thể phân thành 2 nhóm phương pháp chính: Nhóm phương pháp thứ nhất là các phương pháp chuyển gen gián tiếp nhờ vi sinh vật trung gian thường là vi khuẩn, virus. Nhóm phương pháp thứ hai là chuyển gen trực tiếp bằng các thiết bị, hoặc các biện pháp thao tác nhất định mà không cần sinh vật trung gian.

5.3.2.1. Các phương pháp chuyển gen gián tiếp

a) Chuyển gen gián tiếp nhờ vi sinh vật đất Agrobacterium

– Nguyên lí chung:

Sử dụng vi sinh vật đất Agrobacterium để chuyển gen ở thực vật là phương pháp hiệu quả và phổ biến nhất hiện nay nhờ vào khả năng gắn gen ngoại lai vào hệ gen thực vật một cách chính xác và ổn định.

Agrobacterium là nhóm vi sinh vật đất Gram âm, gây ra các triệu chứng bệnh ở cây khi xâm nhiễm qua vết thương.

Chi Agrobacterium gồm một số loài chính sau:

A. tumefaciens gây bệnh u thân cây.

A. shizogenes gây bệnh tóc rễ cây.

A. rubi gây bệnh u cho các cây dâu đất, mâm xôi...

Trong các loài trên người ta thường sử dụng *A. tumefaciens* để chuyển gen.

Từ lâu người ta phát hiện sự hình thành khối u ở thân cây và thường gặp ở chỗ tiếp giáp giữa rễ và thân khi cây bị nhiễm vi sinh vật đất loài *A. tumefaciens* qua vết thương. Phân tích các khối u ở cây cho thấy có sự hình thành một số chất mới như nopalin và octopin được gọi chung là opin. Các chất opin này không tồn tại ở các cây bình thường. Điều đặc biệt là khối u không ngừng tăng trưởng kể cả khi diệt hết các vi khuẩn trong cây đã bị nhiễm.

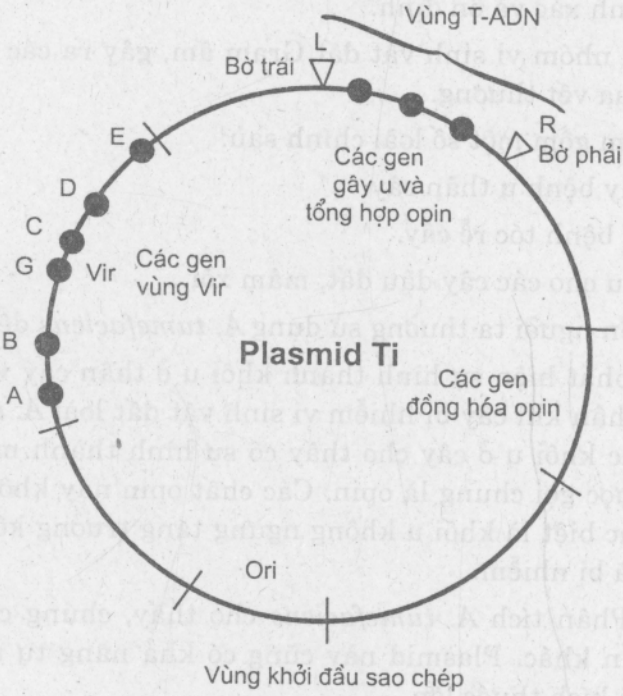
A. tumefaciens. Phân tích *A. tumefaciens* cho thấy, chúng có chứa các plasmid như các loại vi khuẩn khác. Plasmid này cũng có khả năng tự sao chép độc lập và plasmid của chúng có kích thước lớn.

Những vi khuẩn đất không mang plasmid thì không có khả năng gây khối u cho cây. Như vậy, chính plasmid đã mang gen gây khối u cho cây. Người ta gọi plasmid này là plasmid Ti (Tumo inducing plasmid). plasmid Ti là plasmid lớn, có kích thước khoảng 200kb đã được xác định trình tự. Khi lây nhiễm vào tế bào thực vật, một phần nhỏ của plasmid Ti khoảng 25kb được gọi là T-ADN được chuyển và gắn vào hệ gen của thực vật. Nhờ vậy đoạn T-ADN tồn tại trong hệ gen của tế bào thực vật mà nó chuyển vào. Trong plasmid Ti, đoạn T-ADN được giới hạn bằng bờ phải (R) và bờ trái (L) có các đoạn nucleotit tương tự nhau. Đoạn T-ADN chứa các gen tổng hợp auxin, tổng hợp cytokinin, đó là các gen gây khối u và chứa các gen tổng hợp ra opin.

Ngoài đoạn T-ADN , trên plasmid Ti còn có vùng vir chứa các gen E, D, C, G, B, A tạo ra các enzym tương ứng. Các enzym này có chức năng cắt đứt bờ phải và bờ trái để giải phóng T-ADN có chịu trách nhiệm lây nhiễm như có chức năng bọc T-ADN, vận chuyển và gắn T-ADN vào tế bào chủ thực vật. Plasmid Ti còn có điểm khởi đầu sao chép ori và các gen đồng hóa opin (Hình 5.6). Opin là "chất dinh dưỡng" của vi khuẩn.

Plasmid Ti là plasmid có kích thước lớn mang gen gây khối u cho thực vật do chúng chuyển được đoạn T-ADN vào hệ gen của thực vật. Dựa vào hiện tượng này các nhà khoa học tạo ra vector liên hợp và vector nhị thể để chuyển gen cần thiết vào cây trồng. Vector liên hợp là kết quả của sự liên hợp của 2 loại plasmid: Plasmid Ti đã cắt bỏ gen gây khối u, các gen tổng hợp opin nhưng vẫn giữ vùng vir, bờ phải và bờ trái. Thay vào những phần gen bị cắt bỏ là đoạn tương đồng của plasmid trung gian thứ hai có chứa vùng gắn gen cần chuyển theo ý muốn của con người. Khi cho 2 loại plasmid này tiếp xúc với nhau chúng sẽ trao đổi chéo giữa 2 đoạn tương đồng với

nhau. Kết quả là tạo ra vector mới nằm trong vi khuẩn *A. tumefaciens*, có thể chuyển gen cần thiết vào cây theo cơ chế thông thường.



Hình 5.6. Cấu trúc của plasmid Ti

Vector nhị thể khác với vector liên hợp là chúng có cả hai loại vector (plasmid) cùng tồn tại và hoạt động trong vi khuẩn *A. tumefaciens*. Loại vector thứ nhất tách dòng từ *E. coli* trong đó có thiết kế vùng bờ phải, bờ trái và ở giữa hai bờ này là các gen chỉ thị và các gen cần chuyển vào cây. Vector (plasmid) thứ hai chính là plasmid Ti đã bị cắt bỏ T-ADN, bờ phải, bờ trái và chỉ giữ lại vùng vir. Nhờ hệ thống vector nhị thể này có thể chuyển gen một cách hữu hiệu.

– Phương pháp chuyển gen nhờ Agrobacterium:

Sử dụng Agrobacterium để chuyển gen đã thu được nhiều kết quả, đặc biệt là chuyển gen vào lúa và các cây lương thực quan trọng. Nhiều giống lúa chuyển gen có giá trị đặc biệt như giống lúa Golden rice có chứa hàm lượng vitamin A cao gấp nhiều lần so với lúa thông thường. Nhờ giống lúa này đã giải quyết được vấn đề hết sức khó khăn về sự thiếu vitamin ở các nước đang phát triển, đặc biệt là ở Châu Phi. Quá trình chuyển gen vào lúa qua nhiều công đoạn khác nhau, có thể hình dung các công đoạn ở một số ví dụ sau:

1) Quy trình chuyển gen vào lúa mì nhờ Agrobacterium

Năm 1997, lần đầu tiên lúa mì được tiến hành chuyển gen nhờ Agrobacterium nhưng chưa được hoàn thiện, cho đến nay qua hàng loạt nghiên cứu, quy trình chuyển gen vào lúa mì đã khá hoàn thiện, bao gồm các bước sau:

– Chuẩn bị phôi từ hạt lúa mì:

+ Gieo 4-5 hạt lúa mì vào mỗi khay có đường kính 20cm.

+ Đưa các khay vào nhà kính, hoặc tủ nuôi có nhiệt độ khoảng 18-20°C vào ban ngày và 14-15°C vào ban đêm, với độ ẩm không khí khoảng 50-70°C. Chế độ chiếu sáng 16 giờ/ ngày.

+ Sau khi lúa trổ bông được 12-16 ngày, hái các bông lúa về, bóc một số hạt để xác định kích cỡ và cấu trúc phôi. Nếu phôi có chiều dài từ 0,8 đến 1,5mm, có màu trắng đục là được.

+ Các bông lúa còn lại đem khử trùng trong ethanol 70% (V/V) trong 1 phút, sau đó đem ngâm vào dung dịch thuốc tẩy trắng (Domestos bleach) 10% (V/V), lắc nhẹ trong 15 phút. Tráng sạch thuốc tẩy bằng nước cất ít nhất 3 lần.

+ Dùng dao mổ vô trùng, tách phôi ra khỏi hạt (thao tác dưới kính hiển vi, kính lúp).

+ Loại bỏ trục của phôi và chỉ giữ lại phôi, sau đó đưa phôi vào các đĩa petri có chứa môi trường bán lỏng. Mỗi đĩa petri đường kính 55mm cho vào 50 phôi.

– Chuẩn bị Agrobacterium:

Agrobacterium có mang Plasmid Ti và vector nhị thể đã mang gen cần chuyển được chuẩn bị sẵn sàng.

+ Nuôi Agrobacterium trong 10ml môi trường lỏng có cho thêm glycerol 2% và kháng sinh tương ứng. Ủ ở tủ ấm 27-29°C có lắc nhẹ 250 lần/ phút, trong thời gian 12 đến 24 giờ. Đo độ đục cho đến khi được $OD_{600\ nm} > 1$ là kết thúc nuôi.

+ Ly tâm thu Agrobacterium với tốc độ 4500v/ph trong 10 phút. Thu cặn Agrobacterium rồi hòa cặn trong 4ml môi trường nuôi cấy có chứa acetosyringone 250mM/l.

+ Chuyển lại hỗn hợp này lên ủ ấm, có lắc cho đến khi sử dụng (không để quá 3 giờ).

– Nuôi cấy phôi với Agrobacterium:

+ Lấy 4ml môi trường có nuôi Agrobacterium ở trên, bổ sung thêm Silwet để đạt nồng độ cuối cùng là 0,015%. Sau đó đổ chỗ môi trường này vào 1 đĩa petri có 50 phôi đã chuẩn bị ở trên.

– Ủ đĩa phôi ở nhiệt độ phòng, khoảng 1-3 giờ.

– Chuyển các phôi sang đĩa môi trường mới rồi đưa vào bóng tối, ở nhiệt độ 22-23°C, trong khoảng 2-3 ngày.

– Sau đó phôi chuyển sang môi trường tạo mô sẹo rồi để vào tối ở nhiệt độ 24-25°C, trong 18 ngày.

– Sau 18 ngày, mô sẹo được chuyển sang môi trường thích hợp (môi trường RDZ), ủ ở nhiệt độ 24-25°C, dưới ánh sáng khoảng 3 tuần.

– Chuyển mô sẹo sang môi trường chọn lọc để tạo chồi (môi trường chọn lọc RPPT). Trong môi trường này chồi sẽ hình thành và tạo cây non.

– Cứ sau 3 tuần lại chuyển cây non sang môi trường RPPT mới, cho đến khi cây non chống chịu với PPT thì chuyển cây ra trồng ở môi trường ngoài vườn ươm, hoặc đất trồng.

2) Chuyển gen vào cây lúa nước nhờ Agrobacterium

Chuyển gen vào lúa nước cũng tương tự như chuyển gen vào lúa mì. Tuy nhiên, có một số công đoạn thay đổi. Cụ thể các bước tiến hành là:

– Thân non, hoặc lá non của lúa được khử trùng bề mặt bằng dung dịch chlor, trong 20 phút.

– Rửa bằng nước cất vô trùng 5 lần.

– Agrobacterium đã mang vector nhị thể và plasmid Ti được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng, ở nhiệt độ 25°C, có bổ sung các chất kháng sinh thích hợp.

– Đo độ đục của dung dịch nuôi tới khi đạt $OD_{600\ nm}$ = 0,4 thì tiến hành ly tâm tốc độ 2600 vòng/phút, trong 30 phút để thu cặn Agrobacterium. Hòa cặn Agrobacterium vào 4ml môi trường tạo mô sẹo IM rồi ủ ở nhiệt độ phòng, có lắc nhẹ 50-100 lần/phút, trong khoảng 1 giờ.

– Chuyển mô của thân non, lá non đã chuẩn bị ở trên vào 4ml dung dịch có chứa Agrobacterium đã được chuẩn bị. Sau đó để trên máy lắc 1-2 giờ.

– Chuyển mô vào môi trường tạo mô sẹo CIM rồi để vào bóng tối, ở nhiệt độ 19-25°C trong thời gian 2-3 ngày.

– Rửa mô bằng nước cất vô trùng 4-5 lần, sau đó rửa bằng dung dịch rửa.

– Chuyển mô vào môi trường tạo mô sẹo có bổ sung các chất chọn lọc như kháng sinh Kanamycin 50mg/l, cefotaxin 50mg/l, sau đó để trong tối 20-30 ngày.

– Chuyển mô sẹo sang môi trường tạo chồi SIM có bổ sung 100mg/l Kanamycin và nuôi trong 3-4 tuần.

– Chuyển chồi sang môi trường tạo rễ với việc bổ sung 0,5μM IBA cùng với 25mg/l Kanamycin. Thời gian tạo rễ kéo dài vài tháng thì tạo cây con.

b) Chuyển gen gián tiếp nhờ virus

Ngoài việc sử dụng vi khuẩn, người ta còn dùng virus làm vector chuyển gen vào cây trồng. Chuyển gen nhờ virus có thể thuận lợi do virus dễ xâm nhập và lây lan trong cơ thể thực vật và đồng thời virus có thể mang đoạn ADN lớn hơn so với khả năng của plasmid. Tuy nhiên, virus làm vector chuyển gen cần phải có các tiêu chuẩn sau:

– Hệ gen của virus phải là ADN.

– Virus có khả năng di chuyển từ tế bào này sang tế bào khác qua các lỗ ở vách tế bào.

– Có khả năng mang được đoạn ADN (gen) mới, sau đó chuyển gen này vào tế bào thực vật.

– Có phổ ký chủ rộng (trên nhiều loài cây).

– Không gây tác hại đáng kể cho thực vật.

Đối chiếu các tiêu chuẩn trên, hiện nay có hai loại virus được sử dụng làm vector chuyển gen là caulimovirus và geminivirus. Tuy nhiên, việc sử dụng virus để chuyển gen ở thực vật còn ít được sử dụng vì ADN virus khó ghép nối với hệ gen của thực vật.

5.3.2.2. Các phương pháp chuyển gen trực tiếp

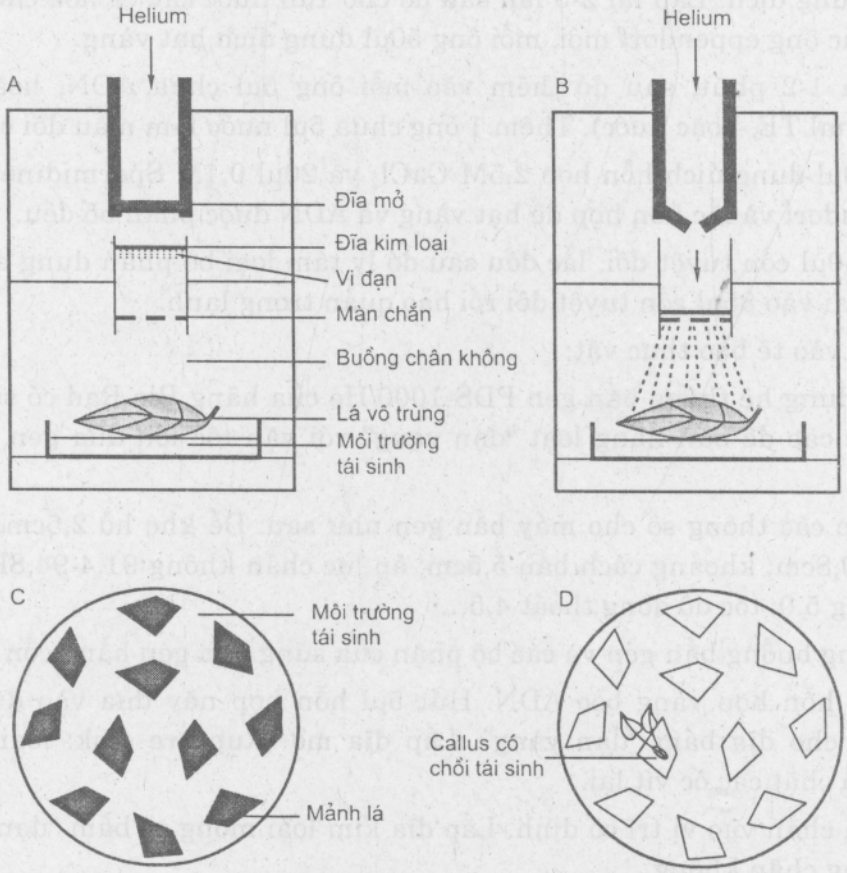
Khoảng chục năm trước đây, việc chuyển gen nhờ Agrobacterium vào cây một lá mầm không thực hiện được. Điều này dẫn đến việc phát triển phương pháp mới như súng bắn gen (Klein và cs, 1987) và bằng phương pháp xung điện (Newell, 2000)... để chuyển gen vào cây một lá mầm. Khi phương pháp tạo tế bào trần (protoplast) thành

công thì việc chuyển gen vào tế bào thực vật được dễ dàng hơn. Các phương pháp chuyển gen trực tiếp như súng bắn gen (gene gun), chuyển gen bằng xung điện, chuyển gen trực tiếp qua ống phấn, chuyển gen bằng vi tiêm, chuyển gen bằng siêu âm v.v... được sử dụng để chuyển các gen vào tế bào thực vật.

a) Chuyển gen bằng súng bắn gen (gene gun)

– Nguyên lý:

Nguyên tắc chung của phương pháp này là ngâm các viên đạn nhỏ (vi đạn) bằng vàng, hoặc tungsten có kích thước cực nhỏ, đường kính khoảng 0,5-1,5μm với dung dịch có chứa đoạn ADN ngoại lai cần chuyển vào tế bào thực vật. Các vi đạn này được làm khô trên một đĩa kim loại mỏng có kích thước 0,5-0,9cm. Đĩa kim loại này được gắn vào đầu một viên đạn lớn (macroprojectile) bằng nhựa, hoặc vật liệu nhẹ. Viên đạn lớn có kích thước vừa khít đầu nòng súng bắn gen (A). Khi bắn, áp suất hơi sẽ đẩy viên đạn lớn đi với tốc độ cao. Tới đầu nòng súng, viên đạn lớn sẽ bị cản lại bởi một lưới thép mịn, còn các viên đạn nhỏ (vi đạn) vẫn tiếp tục di chuyển với vận tốc lớn tới 1300m/ giây đến đối tượng bắn rồi xuyên vào tế bào (B). Sau khi bắn, tách các mô, tế bào và nuôi cấy invitro để tái sinh cây (C). Các gen cần chuyển có thể tái tổ hợp vào hệ gen của cây, từ đó tạo thành cây chuyển gen. Chỉ có một tỷ lệ nào đó của tế bào mang gen chuyển (D) do vậy cần phải chọn lọc. Người ta thường dùng khí nén là helium áp lực cao để bắn gen. Sơ đồ chuyển gen bằng súng bắn gen ở Hình 5.7.



Hình 5.7. Sơ đồ quá trình chuyển gen bằng súng bắn gen

– Phương pháp chuyển gen bằng súng bắn gen:

Chuyển gen bằng súng bắn gen qua nhiều công đoạn khác nhau. Sau đây là ví dụ về quy trình chuyển gen vào lúa mì bằng súng bắn gen.

+ Chuẩn bị phôi từ hạt lúa mì:

* Gieo 4-5 hạt lúa mì vào mỗi khay có đường kính khoảng 20cm.

* Chuyển các khay vào nhà kính, hoặc tủ nuôi với nhiệt độ, độ ẩm và thời gian cần thiết cho đến khi tạo và tách được phôi như đã mô tả ở phương pháp chuẩn bị phôi để chuyển gen nhờ Agrobacterium.

* Chuyển 25-30 phôi vào một đĩa petri đường kính khoảng 9cm có chứa môi trường tạo mô sẹo. Đặt các phôi ở giữa trung tâm của đĩa petri sao cho mặt không bị cắt của phôi hướng lên trên. Chuẩn bị một đĩa petri chứa 15 phôi làm đối chứng. Mẫu đối chứng được bắn "đạn vàng" nhưng không chứa ADN ngoại lai.

+ Chuẩn bị "đạn vàng":

* Cho 20mg hạt vàng, có đường kính 0,6μm cùng với 1ml cồn tuyệt đối vào ống eppendorf 1,5ml. Siêu âm trong 2 phút. Ly tâm nhanh trong 3 giây rồi loại bỏ dịch cồn phía trên. Lặp lại bước rửa cồn này 2-3 lần.

* Cho thêm 1ml nước cất vô trùng vào và siêu âm trong 2 phút. Ly tâm nhanh, loại bỏ phần dung dịch. Lặp lại 2-3 lần sau đó cho 1ml nước cất và hòa cho đều trước khi chia vào các ống eppendorf mới, mỗi ống 50μl dung dịch hạt vàng.

* Siêu âm 1-2 phút, sau đó thêm vào mỗi ống 5μl chứa ADN, hoặc gen cần chuyển (1mg/1ml TE, hoặc nước). Thêm 1 ống chứa 5μl nước làm mẫu đối chứng.

* Thêm 50μl dung dịch hỗn hợp 2,5M $CaCl_2$ và 20μl 0,1M Spermidine vào thành trên ống eppendorf và lắc hỗn hợp để hạt vàng và ADN được phân bố đều.

* Thêm 150μl cồn tuyệt đối, lắc đều sau đó ly tâm loại bỏ phần dung dịch và hòa tan phần còn lại vào 85μl cồn tuyệt đối rồi bảo quản trong lạnh.

+ Bắn gen vào tế bào thực vật:

Ví dụ, sử dụng hệ thống bắn gen PDS-1000/He của hãng Bio-Rad có sử dụng khí Helium áp lực cao để bắn hàng loạt "đạn vàng" với vận tốc lớn đưa gen vào tế bào như sau:

* Thiết lập các thông số cho máy bắn gen như sau: Để khe hở 2,5cm, độ hở của khe chặn đĩa 0,8cm; khoảng cách bắn 5,5cm; áp lực chân không 91,4-94,8KPa; tốc độ hút chân không 5,0; tốc độ dòng thoát 4,5...

* Khử trùng buồng bắn gen và các bộ phận của súng bắn gen bằng cồn 90°.

* Lắc nhẹ hỗn hợp vàng bọc ADN. Hút 5μl hỗn hợp này đưa vào đĩa kim loại mỏng, để khô cho đĩa bám "đạn vàng". Lắp đĩa mở (Rupture disk: loại 650, hoặc 950psi) rồi vặn chặt các ốc vít lại.

* Đặt màn chắn vào vị trí cố định. Lắp đĩa kim loại mỏng có bám "đạn vàng" vào phía trên buồng chân không.

* Đặt đĩa petri đựng phôi lúa đã chuẩn bị trước vào vị trí bắn.

* Tăng áp suất hơi helium lên 91,4-94,8 KPa và bắn.

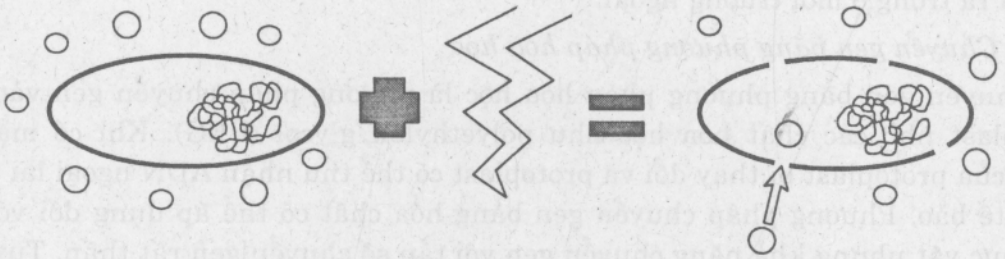
+ Nuôi cấy mô và chọn cây chuyển gen. Sau khi bắn gen, các mô được chuyển vào nuôi trong môi trường tạo mô sẹo với mật độ khoảng 10 mô trên một đĩa petri đường kính 9cm và giữ nhiệt độ 26°C, trong tối, khoảng 3 ngày. Sau đó chuyển mô sẹo sang môi trường tạo chồi và chọn lọc qua 3-4 lần chuyển bằng các chỉ thị màu, hoặc dùng kháng sinh tương ứng. Cây sống sót qua 3-4 lần chuyển sẽ tái sinh rễ, tạo cây con hoàn chỉnh. Sau đó đưa ra môi trường đất.

b) Chuyển gen bằng xung điện (electroporation)

– Nguyên lý:

Trong công nghệ di truyền thực vật, người ta sử dụng phương pháp xung điện để chuyển gen vào protoplast thực vật. Ở điện thế cao, trong thời gian ngắn có thể tạo ra các lỗ trên màng tế bào trần (protoplast) làm cho ADN bên ngoài môi trường có thể xâm nhập vào bên trong tế bào. Người ta chuẩn bị một huyền phù protoplast với các plasmid tái tổ hợp đã mang gen mong muốn cần chuyển vào thực vật.

Dùng thiết bị điện xung tạo điện thế cao (200-400V/cm) trong khoảng thời gian 4-5 phần nghìn giây. Kết quả làm màng tế bào trần xuất hiện các lỗ thủng tạm thời giúp cho plasmid tái tổ hợp có thể xâm nhập và gắn vào hệ gen của thực vật. Quá trình được thực hiện trong cuvett chuyên dụng. Sau quá trình xung điện, đem protoplast nuôi trong môi trường nuôi cấy thích hợp, môi trường chọn lọc để tách các protoplast đã được biến nạp. Tiếp theo là nuôi cấy invitro, tái sinh cây và chọn lọc cây chuyển gen (Hình 5.8).



Hình 5.8. Sơ đồ chuyển gen bằng xung điện

– Phương pháp chuyển gen bằng xung điện:

Ta có thể hình dung quy trình chuyển gen bằng xung điện như sau:

+ Chuẩn bị thiết bị, nguyên liệu:

* Thiết bị tạo xung (Life Technologies Cell Porator).

* Cuvett (cần 2-4 cuvett).

* Huyền phù protoplast và plasmid tái tổ hợp.

* Các đĩa môi trường chọn lọc, môi trường tái sinh cây.

* Tủ ấm để nuôi protoplast.

+ Tiến hành chuyển gen.

* Kiểm tra thiết bị, tắt nguồn điện.

* Cho 2µl plasmid tái tổ hợp và 20µl dung dịch chứa protoplast vào ống eppendorf rồi lắc đều tạo huyền phù.

* Cho 20µl hỗn hợp trên vào 2, hoặc 4 cuvett xung điện.

* Cho 4 cuvett vào giữa 2 cực tạo xung (cách nhau 2-4mm).

* Chọn thông số tạo xung. Bật các công tắc tăng thế và điều khiển xung.

* Tạo xung với điện thế 400 vol trong 4-5 phần nghìn giây.

* Tắt nguồn điện. Chuyển dung dịch hỗn hợp từ các cuvett sang các ống eppendorf.

* Nuôi cấy protoplast, chọn lọc, tái sinh cây, rồi đưa ra ngoài tự nhiên.

c) Chuyển gen nhờ kỹ thuật siêu âm

Kỹ thuật siêu âm dùng để chuyển gen vào tế bào trần protoplast. Sau khi tạo protoplast, tiến hành trộn protoplast với plasmid tái tổ hợp mang gen mong muốn để tạo hỗn hợp dạng huyền phù.

Cắm đầu siêu âm của máy phát siêu âm ngập trong hỗn hợp huyền phù sâu khoảng 3mm. Cho máy phát siêu âm với tần số 20KHz theo từng nhịp ngắn, mỗi nhịp khoảng 100 miligiây. Số nhịp khoảng từ 6-9 nhịp với tổng thời gian tác động từ 600 đến 900 miligiây.

Sau khi siêu âm, đem protoplast nuôi trong các môi trường thích hợp, chọn lọc để tách các protoplast đã được chuyển gen. Nuôi cấy invitro để tái sinh cây. Chọn lọc cây và đưa ra trồng ở môi trường ngoài.

d) Chuyển gen bằng phương pháp hóa học

Chuyển gen bằng phương pháp hóa học là phương pháp chuyển gen vào tế bào protoplast nhờ các chất hóa học như polyethylen glycol (PEG). Khi có mặt PEG, màng của protoplast bị thay đổi và protoplast có thể thu nhận ADN ngoại lai vào bên trong tế bào. Phương pháp chuyển gen bằng hóa chất có thể áp dụng đối với nhiều loài thực vật nhưng khả năng chuyển gen với tần số chuyển gen rất thấp. Tuy nhiên, với khả năng tạo ra số lượng lớn protoplast, do vậy khắc phục được hạn chế của phương pháp này.

e) Chuyển gen trực tiếp qua ống phấn (pollen tube)

Phương pháp chuyển gen qua ống phấn là phương pháp chuyển gen không qua nuôi cấy mô invitro. Phương pháp chuyển gen qua ống phấn được Ray Wu và các cộng sự ở trường Đại học Cornell (Mỹ) đề xuất năm 1988 trên đối tượng là cây lúa. Nguyên tắc của phương pháp này là ADN ngoại lai chuyển vào cây theo đường ống phấn, chui vào bầu nhụy cái. Thời gian chuyển gen là vào lúc hạt phấn mọc qua vòi nhụy và lúc bắt đầu đưa tinh tử vào thụ tinh. Theo các tác giả này, tốt nhất là sự chuyển gen xảy ra đúng khi quá trình thụ tinh ở noãn và cho tế bào hợp tử chưa phân chia. Như vậy sự chuyển gen chỉ xảy ra ở một tế bào sinh dục cái duy nhất và khi tái sinh cây sẽ không hình thành thể khảm.

Ta có thể hình dung phương pháp tiến hành như sau:

– Gieo hạt lúa vào khay trồng cho đến khi lúa trổ bông.

– Sau thời gian hoa nở 1-2 giờ, cắt ngang 2/3, hoặc 3/4 phần trên của hoa lúa.

– Sau khi cắt hoa, dùng ống mao quản nhỏ có đường kính 0,2mm đưa dung dịch ADN tái tổ hợp mang gen mong muốn vào đầu ống nhụy đã bị cắt. Nồng độ ADN tái tổ hợp khoảng 50μg/ml.

– Bao bông lúa lại, chờ lúa chín thu hái.

– Phân tích và xác định kết quả chuyển gen ở thế hệ sau.

g) Chuyển gen bằng vi tiêm (microinjection)

Nguyên lý cơ bản chuyển gen bằng phương pháp vi tiêm giống như chuyển gen bằng vi tiêm ở động vật như đã nêu ở chương trước. Ở thực vật, chuyển gen bằng vi tiêm là chuyển gen trực tiếp vào tế bào protoplast nhờ thiết bị vi thao tác và kim vi tiêm. Phương pháp này cần có thiết bị có độ chính xác cao, kỹ thuật và kỹ năng của người thực hiện phải chính xác.

5.3.3. Những thành tựu, triển vọng, các phương hướng chính và những hiểm họa trong tạo giống cây trồng chuyển gen

a) Những thành tựu, triển vọng chủ yếu

Công nghệ chuyển gen vào cây trồng hiện nay không còn là vấn đề phải tranh cãi mà nó trở thành kỹ thuật thông dụng để tạo ra giống cây trồng mới, phục vụ trực tiếp cho trồng trọt. Những mốc quan trọng trong sự phát triển kỹ thuật chuyển gen ở thực vật là:

Năm 1980: Lần đầu tiên thực hiện chuyển ADN ngoại lai vào cây nhờ Agrobacterium.

Năm 1983: Tạo các marker chọn lọc như chỉ thị màu sắc, chỉ thị kháng với kháng sinh. Thiết kế lại plasmid Ti (loại bỏ gen gây khối u, cài các gen mong muốn vào Plasmid Ti).

Năm 1984: Thực hiện chuyển gen trực tiếp và gián tiếp vào tế bào protoblast.

Năm 1985: Tạo các giống cây trồng kháng virus, đưa cây chuyển gen ra đồng ruộng.

Năm 1987: Chuyển gen kháng sâu bằng súng bắn gen.

Năm 1988: Tạo khoai tây chống nấm, cà chua chín chậm.

Năm 1990: Chuyển gen bất dục đực cho ngô vào phôi nuôi cấy vô tính.

Năm 1992: Chuyển gen cho lúa mì.

Năm 1994: Thương mại hóa cà chua chuyển gen. Đây là sản phẩm chuyển gen đầu tiên được thương mại hóa.

Năm 1998: Toàn thế giới có 48 giống cây trồng chuyển gen được thương mại hóa.

Năm 1999: Chuyển gen tạo giống lúa có giá trị dinh dưỡng và hàm lượng vitamin A cao.

Từ năm 2000 đến nay, cây trồng chuyển gen không ngừng phát triển. Năm 2000, toàn thế giới có 44,2 triệu ha trồng cây chuyển gen thì đến năm 2003 tăng lên 67,6 triệu ha. Có 6 nước trồng cây chuyển gen phổ biến là: Mỹ 42,8 triệu ha; Acgentina 13,9 triệu ha; Canada 4,4 triệu ha; Braxin 3 triệu ha; Trung Quốc 2,8 triệu ha; Nam Phi 0,4 triệu ha.

Các cây chuyển gen chính là đậu tương (chiếm 61%), ngô (23%), bông (11%), đu đủ (21%). Các gen chính được chuyển là gen kháng thuốc trừ cỏ, gen kháng sâu.

b) Các hướng chính trong tạo giống cây trồng chuyển gen

– Chuyển gen kháng sâu:

Trong thời gian 30 năm gần đây, trong sản xuất nông nghiệp, người ta sử dụng thuốc trừ sâu vi sinh Bt do vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* tạo ra. Vi khuẩn này sản xuất ra các protein kết tinh rất độc đối với ấu trùng của côn trùng nhưng không gây độc đối với động vật có xương sống. Vi khuẩn này sản sinh 3 ngoại độc tố α, β, γ toxin và một nội độc tố δ toxin (endotoxin). Nội độc tố δ toxin có vai trò quan trọng nhất. Tinh thể protein độc tố của vi khuẩn này khi vào một côn trùng sẽ bị các enzym protease phân giải thành các đoạn peptit, trong đó có đoạn khối lượng khoảng 68.000 dalton chứa khoảng 1200 axit amin làm hỏng ruột côn trùng. Năm 1987, các nhà nghiên cứu ở Bỉ đã tách được gen mã hóa cho protein độc tố (Bt toxin) này. Các gen mã hóa độc tố này nằm trên plasmid của vi khuẩn, được gọi chung là Cry (crystal) (theo Held và cs). Người ta phân nhóm gen δ endotoxin thành 6 nhóm chính ký hiệu từ CryI đến CryVI.

CryI diệt ấu trùng bộ Cánh vảy (Lepidoptera).

CryII diệt ấu trùng bộ Cánh vảy (Lepidoptera) và bộ Hai cánh (Diptera).

CryIII diệt ấu trùng bộ Cánh cứng (Coleoptera).

CryIV diệt ấu trùng bộ Hai cánh (Diptera).

CryV diệt ấu trùng bộ Cánh vảy và bộ Hai cánh (Diptera).

CryVI diệt tuyến trùng.

Các gen này được tách ra, xác định trình tự, tiến hành tổng hợp và thiết kế vào các vector chuyển gen, sau đó chuyển vào các cây trồng như bông, ngô, đậu tương, lúa... Kết quả là tạo ra hàng loạt cây trồng kháng sâu. Để làm tăng hiệu quả kháng sâu, người ta thiết kế lại các gen này bằng cách cắt bớt những đoạn không cần thiết, thay thế vùng khởi động, chỉ huy... làm tăng hoạt tính lên nhiều lần.

– Chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ:

Trong nền sản xuất nông nghiệp hiện đại ở quy mô sản xuất lớn cần phải sử dụng thuốc diệt cỏ dại. Vấn đề đặt ra là khi phun thuốc diệt cỏ thì chỉ diệt cỏ mà không gây hại đến cây trồng đặc biệt là lúa. Muốn vậy người ta phải tạo ra cây trồng kháng thuốc diệt cỏ. Cách làm hiệu quả nhất là chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ vào cây trồng. Cần phải tìm các gen có tác dụng kháng thuốc diệt cỏ như các gen tạo

enzym làm mất hoạt tính của thuốc diệt cỏ, hoặc các enzym tăng cường cho các enzym dễ bị phân hủy bởi thuốc diệt cỏ.

Có nhiều loại thuốc diệt cỏ khác nhau được sử dụng, trong đó phổ biến là thuốc diệt cỏ glyphosat. Đây là một thuốc có tác dụng diệt cỏ tốt, dễ tự phân hủy và ít gây ô nhiễm môi trường. Cơ chế diệt cỏ là thuốc kìm hãm sự hoạt động của một enzym có tên là enzym enol pyruvat sikimat phosphat synthetase (EPSPS). Enzym EPSPS có chức năng chuyển hóa sản phẩm quang hợp thành axit mạng mạch vòng có tên là axit sikimic. Axit sikimic không được hình thành sẽ làm rối loạn toàn bộ quá trình trao đổi chất của cỏ và làm cho cỏ chết.

Người ta đã tìm được gen mã hóa EPSPS từ vi sinh vật và từ những cây chịu được thuốc diệt cỏ glyphosat, tiến hành tách gen ra rồi cải biến gen này, sau đó chuyển chúng vào cây trồng. Kết quả đã tạo ra cây trồng có hàm lượng và hoạt tính của enzym EPSPS cao gấp 4 lần so với cây trồng bình thường và cây hoàn toàn chống chịu được với thuốc diệt cỏ glyphosat.

Nhờ phương pháp này người ta đã tạo ra nhiều loại cây trồng kháng thuốc trừ cỏ như đậu tương, ngô, bông v.v...

– Chuyển gen tạo cây kháng virus gây bệnh:

Virus thực vật gây hại nghiêm trọng cho cây trồng và là loại bệnh không thể dùng các loại thuốc thông thường để phòng trừ được. Do vậy việc tạo cây kháng virus là rất quan trọng. Có nhiều cách tạo cây kháng virus, chuyển gen mã hóa protein vỏ của virus, chuyển gen tạo enzym phân giải virus (ví dụ enzym ribozyme), hoặc chuyển gen có trình tự đối bản (antisens) với ARN của virus. Các đối bản này sẽ khóa lại sự sao chép và sự phiên mã của ARN virus. Kỹ thuật chuyển gen mã hóa vỏ protein của virus thường được dùng phổ biến. Chúng ta biết rằng, virus có cấu tạo gồm 2 phần: phần lõi là axit nucleic (ADN, hoặc ARN) và phần vỏ là protein. Khi có mặt gen mã hóa protein vỏ của virus ở trong tế bào của cây thì sẽ gây hiệu ứng kìm hãm sự tổng hợp protein vỏ của gen tạo vỏ ở virus. Do vậy virus không nhân lên được. Nhiều loại cây trồng được chuyển gen tạo vỏ của nhiều loại virus nên đã kháng được các virus gây bệnh như: Đu đủ kháng với virus gây bệnh đốm vòng (PRVS-papaya ringspot virus); cây thuốc lá kháng với virus khảm dưa chuột (CMV-cucumber mosaic virus); cây thuốc lá kháng với virus khảm alfa (AMV-Alfa mosaic virus); khoai tây kháng với virus X, virus Y (PVX & PVY- potato virus α & γ); khoai tây kháng với virus xoăn lá (PLRV- potato leafroll virus); cây cam, quýt kháng bệnh virus gây tàn lụi tristeza (CTV-citrus tristeza virus) v.v...

– Chuyển gen tạo cây sản xuất protein động vật:

Sản xuất protein động vật bằng phương pháp nuôi cấy mô, tế bào động vật rất tốn kém, dễ bị lây nhiễm. Chính vì lẽ đó, các nhà khoa học đã tìm cách giải trình tự của các gen mã hóa cho protein động vật đó, thiết kế lại, sau đó chuyển các gen này vào thực vật, biến thực vật thành cơ thể sản xuất protein động vật.

Ví dụ, gen tổng hợp lactoferrin là một protein có trong sữa người, được chuyển vào khoai tây, lúa và thu được cây khoai tây, cây lúa có khả năng tổng hợp lactoferrin. Khoai tây là thức ăn hàng ngày của nhiều nước. Tuy nhiên, hàm lượng lactoferrin được tổng hợp trong khoai tây thấp. Nếu chuyển gen lactoferrin vào lúa thì gen này biểu hiện tốt hơn, khả năng tổng hợp lactoferrin với hàm lượng cao. Ví dụ, đã tạo được giống lúa có thể đạt hàm lượng tới 5 gam lactoferrin trong 1kg gạo và khá ổn định qua các thế hệ.

Một hướng quan trọng khác là sản xuất "thực phẩm chức năng". Điều đó có nghĩa là cần chuyển nhiều gen tổng hợp ra các protein có tác dụng như là các kháng nguyên vào các đối tượng cây trồng như rau, đậu, cây ăn quả. Do vậy các cây này tạo ra các vacxin. Nhờ đó ta có thể ăn rau, đậu, hoa, quả của cây trồng được chuyển gen tạo vacxin này để thay thế cho việc tiêm vacxin phòng bệnh.

– Chuyển gen thay đổi hàm lượng và chất lượng các chất dinh dưỡng của cây:

Đậu tương và ngô là thức ăn cho người và gia súc. Tuy nhiên, trong đậu tương và ngô có các protein chứa ít axit amin methionin. Người ta đã nghiên cứu chuyển gen mã hóa cho protein chứa nhiều methionin vào đậu tương và ngô. Kết quả là các cây chuyển gen đã tăng loại protein giàu methionin lên hơn 8% trong tổng số protein có trong hạt.

Người ta cũng tách được gen mã hóa cho việc tổng hợp một loại chất là thaumatin (chất có độ ngọt gấp hàng nghìn lần so với đường mía) rồi chuyển thành công vào cây khoai tây. Kết quả toàn bộ thân, lá, rễ và củ khoai tây đều ngọt.

Gần đây một giống lúa nổi tiếng là Golden rice có khả năng tổng hợp chất β-caroten là chất tiền thân của vitamin A. Trong gạo thông thường không chứa β-caroten nhưng lại chứa các chất tiền thân của β-caroten, đó là chất geranyl pyrophosphat. Người ta đã chuyển nhóm gen mã hóa cho các enzym như: phytoen synthetase, phytoen desaturase, caroten desaturase, lycopen β-cyclase chuyển hóa các pyrophosphat thành β-caroten. Gạo có hàm lượng β-caroten giải quyết vấn đề thiếu vitamin A cho con người.

– Chuyển gen tạo giống hoa có nhiều màu sắc mới:

Màu sắc của hoa, đặc biệt là hoa có những màu xanh, nhung đen rất có giá trị. Trong mô của cánh hoa, nhất là các tế bào biểu bì thường chứa các sắc tố tạo màu sắc hoa. Có 3 nhóm antocyanin cơ bản được phát hiện là dẫn xuất của các chất pelargonidin, cyanidin và delphinidin.

Các sắc tố là dẫn xuất của pelargonidin thường có màu da cam, hồng và đỏ.

Các sắc tố là dẫn xuất của cyanidin có màu đỏ, hoặc màu hoa cà.

Các sắc tố là dẫn suất của delphinidin có màu tía, màu xanh và màu xanh đen.

Sự phối hợp của 3 nhóm antocyanin này tạo ra phổ màu sắc hoa rất rộng, Trên cơ sở biết các gen mã hóa cho các enzym tham gia vào biến đổi sắc tố, người ta đã chuyển gen mã hóa, hoặc gen ức chế hoạt động của các enzym nhằm điều khiển hướng chuyển hóa sắc tố, từ đó tạo ra hoa có màu sắc khác nhau. Nhiều màu sắc mới của hoa đã được

tạo ra nhờ tách chiết các gen chịu trách nhiệm tổng hợp sắc tố từ các sinh vật khác nhau và chuyển vào các giống hoa, tạo ra nhiều giống cho màu hoa mới lạ.

5.3.3.2. Những khó khăn và những hiểm họa của việc tạo cây trồng chuyển gen

a) Những khó khăn

Công nghệ tạo cây trồng chuyển gen ngày càng phát triển và tạo ra hàng trăm giống cây trồng chuyển gen khác nhau mang nhiều đặc tính quý. Chỉ xét trên khía cạnh tạo hạt giống biến đổi gen trên toàn Thế giới cho thấy sự gia tăng nhanh chóng. Năm 1995 hạt giống biến đổi gen đầu tiên được thương mại hóa. Năm 2001, doanh số bán hạt giống biến đổi gen là 3,7 tỷ USD, năm 2003 đạt 4 tỷ USD, năm 2003 đạt 4,5-4,7 tỷ USD, đến năm 2005 đạt tới 5 tỷ USD. Tuy nhiên, vấn đề cây trồng chuyển gen (GMO-genetically Modified Organism) còn là vấn đề tranh cãi, thậm chí còn gặp phải sự phản đối gay gắt từ nhiều nhà khoa học. Sản phẩm chuyển gen bị nhiều người tiêu dùng lo ngại. Các sản phẩm của cây trồng chuyển gen phải được dán nhãn để những người tiêu dùng lựa chọn. Nhiều nước chưa cho phép nhập khẩu sản phẩm chuyển gen cũng như cây trồng chuyển gen.

b) Những lo ngại và hiểm họa của cây trồng chuyển gen

– Lo ngại về vấn đề môi trường: Vấn đề lo ngại nhất của cây trồng chuyển gen đối với môi trường là cây kháng với côn trùng có hại thì cũng có thể diệt cả côn trùng có lợi. Ví dụ, một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng, phấn hoa của cây ngô chuyển gen kháng sâu có thể diệt các ấu trùng bướm nữ hoàng.

Điều lo ngại khác là các gen ngoại lai từ các cây trồng chuyển gen có thể được chuyển sang các thực vật khác sống gần đó. Ví dụ, cây đậu tương trồng mang gen kháng thuốc diệt cỏ, các cây đậu tương hoang dại mọc ở gần đó có thể được thụ phấn chéo và đậu tương hoang dại sẽ trở nên có khả năng kháng thuốc diệt cỏ. Theo cách này người ta cho rằng, đến một lúc nào đó sẽ có các "siêu cỏ dại" mà chúng ta sẽ không thể diệt được chúng bằng thuốc diệt cỏ.

– Lo ngại về vấn đề sức khỏe con người:

Sản phẩm chuyển gen là protein, do vậy có thể có những thực phẩm do cây chuyển gen tạo ra mang những chất gây dị ứng cho người sử dụng. Ví dụ, nếu chuyển gen từ cây lạc vào súp lơ chẳng hạn. Một người bị dị ứng với lạc khi ăn súp lơ chuyển gen sẽ bị dị ứng rất nguy hiểm. Sự nguy hiểm có thể nghiêm trọng hơn vì không ai nghĩ rằng ăn nhiều súp lơ, bắp cải lại bị dị ứng nguy hiểm đến như vậy. Nhiều vector chuyển gen mang các gen chỉ thị là các chất kháng sinh. Các gen này có thể thông qua cây trồng chuyển gen trao đổi với các vi sinh vật khác nhau, tạo nên các vi sinh vật kháng với các loại kháng sinh và chúng không bị tiêu diệt bởi kháng sinh nữa.

– Lo ngại về kinh tế:

Giá thành sản xuất của các cây trồng chuyển gen hiện nay là rất cao. Các công ty sản xuất các cây trồng chuyển gen (chủ yếu ở Mỹ) muốn kiếm lợi nhuận cao từ việc tạo ra cây trồng chuyển gen vì họ đã bỏ số kinh phí khá lớn để nghiên cứu và phát

triển các giống cây này. Do vậy những nước nghèo sẽ không thể mua được các hạt giống từ các công ty trên vì giá thành quá đắt.

5.3.4. An toàn sinh học trong công nghệ chuyển gen thực vật

5.3.4.1. Khái niệm về an toàn sinh học

An toàn sinh học của công nghệ di truyền là các lĩnh vực liên quan đến việc nghiên cứu, sản xuất và sử dụng các ADN tái tổ hợp, các sinh vật biến đổi gen và sản phẩm của chúng sao cho hợp lý, giảm thiểu tác động xấu của chúng đến sức khỏe con người và môi trường.

Liên quan đến sinh vật biến đổi gen là các sinh vật có mang ADN tái tổ hợp chứa gen lạ, bao gồm có các khái niệm sau:

GMO: Genetically Modified Organism.

GEO: Genetically Engineered Organism.

LMO: Living Modified Organism.

GMC: Genetically Modified Crop.

Sản phẩm của chúng là các thực phẩm, dược phẩm, các sản phẩm xử lý môi trường và các hàng tiêu dùng.

Trong nông nghiệp, việc sử dụng giống cây trồng chuyển gen là phổ biến nên chủ yếu chúng ta chú ý đến vấn đề cây trồng chuyển gen với những rủi ro, lo ngại như đã được nêu ở phần trên.

5.3.4.2. Các quy trình về an toàn sinh học

Công ước đa dạng sinh học được đưa ra ở Hội nghị Liên hợp quốc về Môi trường và Phát triển (UNICEP) có hiệu lực từ ngày 24/12/1993. Công ước này là công cụ Quốc tế chính thức được dùng để giải quyết những vấn đề về đa dạng sinh học và về an toàn sinh học. Công ước đã đề cập đến vấn đề nhu cầu bảo vệ sức khỏe con người và môi trường khỏi bị tác động xấu của Công nghệ sinh học hiện đại, trong đó có vấn đề về thực phẩm chuyển gen. Công ước cũng khẳng định rằng, bên cạnh những vấn đề rủi ro nhưng phải quan tâm, công nghệ sinh học hiện đại vì chúng có tiềm năng lớn đáp ứng nhu cầu về lương thực, thực phẩm và chăm sóc sức khỏe con người trong tương lai.

Các nước tham gia công ước đã xây dựng một Nghị định thư gọi là Nghị định thư Cartagena về an toàn sinh học đã thông qua ngày 29/01/2000 tại Montreal, Canada.

Nghị định thư này đưa ra những quy định về việc vận chuyển qua biên giới, xử lý và sử dụng các sinh vật sống biến đổi di truyền (LMO) có thể gây tác động bất lợi đối với việc bảo tồn, sử dụng bền vững đa dạng di truyền cũng như về những rủi ro đối với sức khỏe con người.

Trong Nghị định thư có nội dung chính là:

– Hỗ trợ các Quốc gia đang phát triển xây dựng năng lực quản lý về các vấn đề liên quan đến công nghệ sinh học hiện đại, nhất là các vấn đề về sinh vật chuyển gen.

– Tạo thủ tục thỏa thuận cho việc thông báo của các nhà xuất nhập khẩu, trước hết cần phải thông báo và phải được sự đồng ý của nước nhập khẩu lần đầu tiên các LMO (hạt giống, con giống...) khi có dự kiến đưa LMO vào các nước đó.

– Xây dựng trung tâm trao đổi thông tin về an toàn sinh học trên mạng về khoa học kỹ thuật và luật pháp về LMO.

– Việc vận chuyển hàng hóa LMO phải kèm theo các tài liệu chỉ rõ đó là hàng LMO, xuất xứ và các vấn đề liên quan đến chính LMO đang vận chuyển này.

– Việc đánh giá rủi ro phải dựa trên cơ sở khoa học và kỹ thuật đánh giá. Không được đánh giá tùy tiện, thiếu bằng chứng khoa học xác thực. Đánh giá rủi ro phải có so sánh đối chứng với các sinh vật không biến đổi gen tương tự và phải tiến hành từng trường hợp cụ thể, tránh chung chung, suy diễn không có căn cứ khoa học.

– Vấn đề dán nhãn GMO không liên quan đến sự an toàn của sản phẩm mà chỉ là sự "đề phòng" đối với sản phẩm đó và mang tính chất để người sử dụng biết mà lựa chọn.

5.3.4.3. Quản lý sinh vật chuyển gen

Ở nhiều nước đã có cơ quan quản lý động, thực vật chuyển gen.

Ví dụ, ở Mỹ có 3 cơ quan khác nhau kiểm tra, quản lý động thực vật chuyển gen, đó là:

– Cơ quan bảo vệ môi trường – EPA, làm nhiệm vụ kiểm tra, xem xét các sinh vật chuyển gen có hại cho môi trường hay không.

– Cơ quan nông nghiệp Mỹ – USDA, làm nhiệm vụ kiểm tra, đánh giá, xem xét thực vật chuyển gen có an toàn khi đem ra trồng trọt không.

– Cơ quan thực phẩm –FDA, xác định các sinh vật chuyển gen nếu dùng làm thực phẩm có thực sự an toàn không. Trên thực tế, người ta chỉ quan tâm nhiều đến thực vật chuyển gen vì tuổi thọ của chúng cao, chúng có khả năng tự dưỡng. Chỉ cần đất, nước, không khí, ánh sáng là cây trồng chuyển gen có thể tồn tại lâu dài được. Động vật chuyển gen còn ít được quan tâm.

Ở Việt Nam, hiện đang hoàn thiện Luật An toàn sinh học. Nói chung về quản lý sinh vật chuyển gen ở nước ta có quy chế, bao gồm các nội dung như sau:

– Điều khoản chung về an toàn sinh học.

– Các thủ tục khi áp dụng quy chế an toàn sinh học.

– Quy chế về sản xuất, sử dụng sinh vật biến đổi gen, kể cả các sinh vật là các loài lạ và các sản phẩm sản xuất từ chúng. Mục đích của quy chế là đặt ra các yêu cầu có liên quan đến việc sử dụng các sinh vật đã biến đổi gen, các loài sinh vật lạ, hoặc sản phẩm của chúng trong sản xuất, trong tiêu dùng, nhằm đảm bảo an toàn cho môi trường, cho tính đa dạng sinh học Quốc gia và bảo vệ sức khỏe con người.

Đối với thực vật chuyển gen, khi sản xuất phải được cách ly thích hợp ít nhất là 3 vụ trồng thử nghiệm để theo dõi. Các sản phẩm sinh vật biến đổi gen sử dụng làm thực phẩm, làm thuốc, làm thức ăn gia súc... thì phải thực hiện theo đúng quy chế của Bộ Y tế và nếu dùng vào mục đích sản xuất nông nghiệp thì phải được phép của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Sản phẩm GMO phải ghi nhãn đầy đủ và

kèm thông tin về GMO của sản phẩm đó. Trong quá trình vận chuyển GMO phải có bao bì, vật dụng chứa đựng và chuyên chở thích hợp đối với từng loại để không bị rò rỉ. Phải có người chuyên trách thực hiện chuyên chở và cần phải làm thủ tục giao nhận rõ ràng.

Việc xuất nhập khẩu sinh vật, sản phẩm của sinh vật biến đổi gen phải theo quy định nghiêm ngặt của Nhà nước và phải được kiểm tra nghiêm ngặt ngay từ ở các cửa khẩu trên toàn đất nước. Việc đánh giá rủi ro, quản lý rủi ro cũng theo những quy chế, quy định nghiêm túc do những chuyên gia và các cơ sở chuyên môn thích hợp đánh giá, thực hiện.

Chương 6

CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN ĐỐI VỚI CON NGƯỜI

6.1. CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN TRONG NHẬN DẠNG CÁ THỂ NGƯỜI

Phát triển khoa học kỹ thuật trên mọi lĩnh vực cuối cùng tựu trung đều phục vụ lợi ích cho con người. Công nghệ di truyền suy cho cùng là phục vụ cho việc ăn, mặc, bảo vệ sức khỏe và những lợi ích khác của con người. Một trong những nhiệm vụ của công nghệ di truyền là đánh giá nhận biết cá thể người, đánh giá nguồn gốc, đánh giá khả năng tiềm ẩn bệnh tật của mỗi người.

6.1.1. Phương pháp nhận biết cá thể qua vân tay

Ngay từ thế kỷ thứ VII, người Trung Hoa đã biết dùng ngón tay để điểm chỉ vào các văn kiện mang tính chất hành chính. Điều đó chứng tỏ rằng lúc đó người ta đã ý thức được sự khác biệt, tính chất riêng biệt giữa các dấu vân tay của mỗi người. Tuy nhiên, việc nghiên cứu dấu vân tay một cách khoa học thì mãi đến khoảng cuối thế kỷ XIX mới được thực hiện một cách nghiêm túc, khoa học.

Năm 1887, một viên chức người Anh làm việc tại Ấn Độ đã lấy dấu vân tay của nhiều người thuộc các thành phần xã hội khác nhau và đã phát hiện được những trường hợp man trá trong các văn bản chứng thực về hành chính.

Năm 1889, Henri Poule – một bác sĩ người Anh - đã nghiên cứu dấu vân tay của nhiều người qua các thế hệ và kết luận "dấu vân tay không có sự thay đổi trong suốt cuộc đời của con người".

Đến thế kỷ XIX, trên cơ sở nghiên cứu, Galton đã xuất bản 2 cuốn sách là "Về các dấu vân tay" và "Cách sắp xếp và sử dụng dấu vân tay" đã khẳng định vị trí khoa học của vân tay với tư cách là một khoa học. Vân tay học trong hàng trăm năm qua đã trở thành trợ thủ đắc lực cho ngành điều tra trên khắp thế giới. Trong quá trình thực hiện, người ta đã tìm được nhiều tri thức mới về di truyền dấu vân tay ở người. Để nhận dạng cá thể, người ta sử dụng các nếp gấp và vân trên lòng bàn tay bao gồm:

– Nếp gấp trên lòng bàn tay: Những nếp gấp này tương ứng với rãnh gấp và mở của các cơ lòng bàn tay. Có 2 loại nếp gấp chính là: Nếp gấp ngón cái có tác dụng gấp và mở ngón cái. Loại nếp gấp thứ hai là nếp gấp các ngón còn lại tham gia vào việc gấp mở các ngón còn lại. Hai loại nếp gấp trên lòng bàn tay được hình thành từ giai đoạn phát triển của phôi, không thay đổi hình dạng trong suốt quá trình sống và đặc trưng cho từng cá thể người.

– Đenta trục lòng bàn tay (t) và góc atd: Phía cổ tay có 3 loại đường vân nhỏ hướng

khác nhau, tiếp cận nhau tạo ra đenta trục lòng bàn tay, ký hiệu là t. Vị trí của đenta t có thể thay đổi từ nếp gấp cổ tay đến giữa lòng bàn tay. Ở u nệm ngón tay trỏ có đenta a và u nệm ngón tay út có đenta d. Nối đỉnh đenta t với đenta a và đenta d được góc atd. Góc này có độ lớn khác nhau và thay đổi theo chủng tộc, phụ thuộc vào trạng thái bệnh lý di truyền tâm thần và cũng có thể đặc trưng từng cá thể.

– Hoa vân trên các u nệm đầu ngón tay:

Vân trên các u nệm đầu ngón tay có những đặc trưng riêng. Quan sát trên 5 đầu ngón tay, tại các u nệm đầu ngón tay có thể chia ra các dạng hoa vân chính sau đây:

+ Vân cung (arch), ký hiệu A: Đường vân hình cung, mặt lõm quy về phía gốc ngón, đường vân đi từ bờ này sang bờ đối diện của mỗi ngón. Vân cung nhìn chung không có đenta tâm, trừ một số trùng hợp cung trồi lên phía đầu ngón, làm xuất hiện đenta ở chỗ lõm của cung (đenta A^+) nhưng trường hợp này rất hiếm gặp.

+ Vân nút (loop), ký hiệu là L: Đường vân xuất phát từ một phía của đầu ngón tay vòng sang phía đối diện rồi vòng lại để kết thúc vào phía xuất phát. Vân nút có thể mở về phía ngón cái, hoặc về phía ngón út. Nếu vân nút mở về phía ngón cái thì người ta ký hiệu là L^r, còn mở về phía ngón út thì ký hiệu là L^u. Số người có vân nút rất thường gặp. Loại vân nút có một đenta và một tâm. Một số trường hợp có thể có những dạng thay đổi kết hợp giữa vân nút và vân cung, hoặc ở dạng vân nút kép (twin loop), ký hiệu là TL. Có trường hợp còn có dạng vân nút bao quanh một đường vân nhỏ ở giữa, gọi là túi trung tâm (central pocket). Loại vân này ký hiệu là CP.

+ Vân vòng (whorl) ký hiệu là W: Đặc điểm điển hình của đường vân này là đường vân tạo một vòng khép kín có dạng tròn, hoặc elip. Vân vòng thường có 2 đenta và có tâm ở giữa. Người ta còn gọi dạng vân vòng là "hoa tay".

Hoa vân trên đầu ngón tay được hình thành từ lúc bào thai được 6 tháng, không đổi hình dạng suốt cả đời người và chúng chỉ thay đổi về kích thước. Những hoa vân này đặc trưng cho từng người. Không khi nào gặp hai người có hoa vân giống hệt nhau trên đầu các ngón tay (trừ trường hợp hai người sinh đôi cùng trứng). Do vậy, hoa vân trên đầu các ngón tay sử dụng rộng rãi để nhận dạng cá thể người. Tỷ lệ các loại hoa vân cũng thay đổi theo quần cư dân ở các khu vực địa lý khác nhau, theo các dân tộc khác nhau... Điều này giúp ta nghiên cứu mối quan hệ họ hàng giữa các tộc người cũng như khoanh vùng khu vực khi cần nhận dạng kiểu hình vân tay trong điều tra hình sự.

6.1.2. Phương pháp nhận biết cá thể qua phân tích protein, enzym

Xác định cá thể người có thể dựa vào đặc điểm của phản ứng hóa sinh học của các protein, enzym trong máu, trong dịch cơ thể, hoặc các mô cơ quan của người. Để xác định sự khác nhau về thành phần, cấu trúc và đặc tính sinh lý, sinh hóa của các protein, người ta sử dụng các phương pháp khác nhau như: phản ứng ngưng kết, phản ứng tan, hoặc các phương pháp điện di, sắc ký, phân đoạn các protein, enzym.

6.1.2.1. Xác định nhóm máu

Trong máu của người có các nhóm hợp chất protein tồn tại trong huyết thanh,

hoặc trên màng hồng cầu. Nhóm hợp chất nằm trong huyết thanh được gọi là kháng thể. Nhóm hợp chất nằm trên màng hồng cầu được gọi là kháng nguyên. Tùy theo nhóm máu khác nhau mà việc thể hiện phản ứng giữa kháng nguyên và kháng thể biểu hiện khác nhau. Đối với nhóm máu ABO ở người, khi ta trộn kháng nguyên hồng cầu A với kháng thể (ngưng kết tố) α thì phản ứng ngưng kết sẽ xảy ra. Nếu trộn kháng nguyên hồng cầu B với kháng thể (ngưng kết tố β) thì phản ứng ngưng kết cũng sẽ xảy ra. Mỗi một cá thể người không tồn tại đồng thời cả kháng thể và kháng nguyên tương ứng. Dựa vào đó người ta chia nhóm máu ABO ở người thành các kiểu hình nhóm máu khác nhau như: A_1, A_2, A_1B, A_2B, B và O.

Sau khi phát hiện ra hệ thống nhóm máu ABO, các nhà khoa học còn khám phá ra các hệ thống nhóm máu khác như: MNS, Rh, Lewis, Kell, Lutheran (Lu), P...

Đối với nhóm máu Rhesus (Rh) ở người, khi trộn kháng thể kháng Rh^+ với kháng nguyên tương ứng Rh^+ có bổ sung chất bổ thể thì phản ứng tan máu sẽ xảy ra. Trên cơ sở phân tích các kiểu kháng nguyên và kháng thể của nhóm máu Rh^+ người ta xác định được 8 kiểu hình nhóm máu khác nhau như Rh_1, Rh_2, Rh_1Rh_2, Rh_0, rh', rh", rh và rh'rh". Mỗi một cá thể người có một tổ hợp kiểu hình các hệ thống nhóm máu khác nhau đặc trưng riêng do các hệ thống locus gen khác nhau xác định. Sự trùng hợp hoàn toàn về kiểu hình của các hệ thống nhóm máu giữa 2 người là rất hiếm. Dựa vào đó người ta xác định cá thể người. Thông thường, người ta chỉ phân tích một số hệ thống nhóm máu chính như ABO, Rh, MNS-Le để xác định cá thể là đủ mà không cần phải phân tích toàn bộ 12 hệ thống nhóm máu, bao gồm cả những hệ thống nhóm máu thường gặp và các hệ thống nhóm máu hiếm gặp.

6.1.2.2. Xác định các nhóm protein huyết thanh

Nhờ kỹ thuật điện di trên gel tinh bột, Smithies (1955) đã phát hiện ra các nhóm protein huyết thanh máu. Khi phát hiện ra những loại protein khác nhau biểu hiện những cấu trúc đa dạng trong cùng một loài do các alen của các locus khác nhau xác định, người ta có thể xếp loại các cá thể theo những nhóm protein huyết thanh khác nhau. Những hệ thống nhóm protein huyết thanh đã được phát hiện nhờ điện di trên gel tinh bột (sau này là trên gel polyacrylamid, gel agarose...) là các hệ thống haptoglobin, hệ thống transferin, hệ thống globulin (α_1, α_2, γ globulin), hệ thống β-lipoprotein v.v... Hệ thống huyết thanh máu haptoglobulin và hệ thống γ globulin được nghiên cứu nhiều hơn. Hệ thống Haptoglobulin (Hp) có các kiểu hình nhỏ Hp^{1-1}, Hp^{1-2}, Hp^{2-2} do các alen trội Hp^1 và Hp^2 quy định. Ngoài ra còn có kiểu hình đồng hợp tử lặn Hp^{0-0} do gen lặn Hp^0 quy định. Mỗi cá thể người có một kiểu hình địa lý, khu vực và dân tộc khác nhau.

6.1.2.3. Xác định các hệ thống protein enzym

Enzym có trong tế bào sống và dịch của cơ thể người, đó là các protein đặc biệt, xúc tác cho hầu hết các phản ứng hóa sinh xảy ra trong cơ thể sống và còn được gọi là các chất xúc tác sinh học. Cho đến nay người ta đã biết khoảng 3500 enzym, trong đó có hàng trăm loại enzym đã được xác định được các gen, các alen mã hóa cho các hệ thống enzym đó. Những thành tựu về nghiên cứu enzym ở người cho thấy có rất

nhiều hệ thống enzym mang tính đa hình di truyền rõ rệt. Khi nghiên cứu các hệ enzym đa hình, người ta đã đưa ra các khái niệm là izozym và allogen.

Izozym là những biến dạng phân tử enzym được xác định về phương diện di truyền của các enzym xúc tác cho cùng một phản ứng chuyển hóa trong cơ thể, nhưng lại do các locus khác nhau quy định. Sự khác nhau của các enzym này là khác nhau về cấu trúc bậc 1 của các enzym cùng chức năng. Sản phẩm của các alen khác nhau của cùng một locus được gọi là allozym.

Tính biến dị của các enzym ở người góp phần trả lời các câu hỏi về tiến hóa của loài người, về xuất hiện của các chủng tộc, về mối quan hệ họ hàng và tính đặc trưng của mỗi cá thể người. Mỗi một cá thể người đều có đặc trưng về các alen của mỗi locus enzym và tổng hợp tất cả các alen của các locus là chỉ thị để phân biệt sự đặc trưng giữa các cá thể cũng như các tộc người.

Một số izozym ở người đã được nghiên cứu. Ví dụ, izozym amylace (Amy) do hai locus gen quy định ký hiệu là Amy1 và Amy2. Locus gen Amy1 có 2 alen là $Amy1^a$ và $Amy1^b$. Locus gen Amy2 có 2 alen là $Amy2^a$ và $Amy2^b$. Ngoài ra còn có một số alen hiếm gặp như $Amy1^c$, $Amy1^d$, $Amy1^f$ và $Amy2^d$, $Amy2^e$ và $Amy2^f$ v.v... Một số alen hiếm là đặc trưng cho vùng dân tộc. Ví dụ alen $Amy1^f$ chỉ gặp ở người Triều Tiên, Trung Quốc, Nhật Bản ... còn alen $Amy1^c$ chỉ gặp ở người da đen Châu Phi. Izozym axit phosphatase (ACP) ở người do 1 locus có 3 alen đồng trội quy định, đó là các alen ACP^a, ACP^b và ACP^c. Ngoài ta còn gặp các alen hiếm như ACP^r, ACP^d, ACP^e v.v... Alen ACP^b thường gặp ở người bản địa Châu Úc, người Châu Phi, alen ACP^a thường gặp ở người Eskimo. Alen ACP^a có tần suất cao ở người da trắng. Ở người Việt Nam chỉ gặp 2 alen ACP^a và ACP^b, trong đó ACP^b chiếm tới gần 75%.

Nhiều izozym khác ở người cũng mang tính đa hình di truyền như hệ izozym peptidase do 3 locus gen A, B, C quy định. Mỗi locus gen đều có 2 alen. Các hệ izozym như lactatedehydrogenase (LDH), phosphoglucomutase (AGM) v.v... cũng được sử dụng để xác định cá thể người và cũng mang tính đa hình di truyền.

6.1.3. Phương pháp nhận biết cá thể bằng phân tích ADN

6.1.3.1. Cơ sở khoa học của phân tích ADN xác định cá thể

Người đầu tiên đặt nền móng cho ngành di truyền học cơ bản là G. Mendel. Mendel đã ghi nhận sự tồn tại của các tính trạng trội ở đời con, còn tính trạng lặn thì có thể biến mất đi ở đời con lai nhưng lại có thể xuất hiện ở những thế hệ sau. Những nghiên cứu tiếp theo đã phát hiện bản chất di truyền là các gen nằm trên nhiễm sắc thể của người. Ở người có 23 cặp nhiễm sắc thể trong đó có 22 cặp nhiễm sắc thể thường là 1 cặp nhiễm sắc thể giới tính. Mỗi nhiễm sắc thể được cấu tạo từ một phân tử ADN. Phân tử ADN có cấu trúc xoắn kép gồm 2 mạch polynucleotit do 4 loại nucleotit sắp xếp đối diện nhau tạo thành. Đến nay người ta tính rằng, trong 46 nhiễm sắc thể có trong nhân tế bào soma của người có khoảng 3,5 tỷ cặp nucleotit. Mỗi nhiễm sắc thể chứa nhiều gen, mỗi gen có thể chứa hàng trăm ngàn cặp

nucleotit. Số lượng, trình tự sắp xếp của các gen quy định các tính trạng ở các cá thể người là khác nhau, tạo nên tính đa hình di truyền ở người.

Trình tự các nucleotit trên sợi kép ADN có 2 loại đa hình.

+ Đa hình theo trình tự: Các loại nucleotit được sắp xếp ngẫu nhiên ở các cá thể khác nhau.

Ví dụ: Ở cá thể thứ nhất tại locus A có trình tự:

...AGACTGCTAG...

Cá thể thứ hai: ...AGCCTGCGAG...

Như vậy ở vị trí thứ 3 và thứ 8 có sự thay thế A bằng C và T bằng G.

– Đa hình theo chiều dài: Có một số loại nucleotit được lặp đi lặp lại tới nhiều lần trên chiều dài của gen, hoặc đoạn ADN.

Ví dụ:

Cá thể thứ nhất: ...ATATATATATAT... → 3 đoạn lặp ATAT

Cá thể thứ hai: ... ATATATATATATATATATAT... → 5 đoạn lặp ATAT

Những trạng thái khác nhau này biểu hiện thành trạng thái alen của mỗi locus gen. Trong phương pháp phân tích điện di ADN, các alen thể hiện là các băng điện di ở vị trí khác nhau trên bản gel. Nếu hai alen của một locus có trình tự hoàn toàn giống nhau thì cá thể đó là đồng hợp tử và thể hiện 1 băng trên bản gel. Nếu hai alen của một locus có trình tự khác nhau thì cá thể là dị hợp tử, thể hiện 2 băng khác nhau trên bản gel. Trong quá trình tiến hóa của loài người, do các đột biến gen đã làm thay đổi trình tự các nucleotit và số lần lặp lại của đoạn trình tự nhất định. Kết quả tạo ra nhiều alen khác nhau. Ví dụ, locus gen THO1 mã hóa cho enzym thyrosine hydroxylase có đoạn trình tự TATT lặp lại dao động trong khoảng 6 đến 11 lần, hình thành 6 alen khác nhau. Như vậy locus này có 6 alen khác nhau nên trong thực tế có 6 kiểu đồng hợp tử (6/6, 7/7, 8/8, 9/9, 10/10, 11/11) và có 15 kiểu dị hợp tử (6/7, 6/8, 6/9, 6/10, 6/11, 7/8, 7/9 v.v...). Công thức chung để tính số lượng kiểu gen trong quần thể người là:

$$X = \frac{n(n+1)}{2}$$

Trong đó: X là số lượng kiểu gen trong quần thể;

N là số alen của mỗi locus.

Dựa vào công thức trên ta tính được số tổ hợp của các locus.

Ví dụ: Locus có 6 alen thì số kiểu gen $X_1 = (6x7)/2 = 21$

Locus có 10 alen thì số kiểu gen $X_2 = (10x11)/2 = 55$

Tổ hợp chung của 2 locus $X_1 \times X_2 = 21 \times 55 = 1155$ kiểu gen. Theo tính toán trên, nếu có 10 locus khác nhau với số alen dao động khác nhau thì khả năng có hàng tỷ cá thể khác nhau mới có 2 cá thể có cùng một kiểu gen. Do vậy khả năng

xác định chính xác cá thể người rất cao, nếu chúng ta phân tích nhiều locus trong nhận dạng người.

Thông thường người ta dùng các phương pháp phân tích ADN khác nhau: đa hình chiều dài đoạn ADN cắt giới hạn (RFLP), phân tích đoạn lặp lại ngắn (STR) kết hợp với phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR) để xác định cá thể người. Khi nghiên cứu cấu trúc của gen của động vật có vú và người cho thấy: Thông thường các đoạn intron (đoạn không mã hóa) chứa các trình tự lặp lại tùy theo số lượng nucleotit và số lần lặp lại trong genome. Các đoạn trình tự được chia làm 3 loại:

+ Loại trình tự lặp lại cao khoảng 10-20kb ở đoạn intron chiếm 10-15% hệ gen và thường tập trung ở vùng tâm động và đầu của các nhiễm sắc thể.

+ Loại trình tự lặp lại trung bình chiếm 25-40% hệ gen người. Chúng có kích thước 100-1000kb. Mang tính đa dạng cao, phân bố khắp hệ gen.

+ Loại trình tự lặp lại đơn nhất, đó là các đoạn trình tự lặp lại ở phần exon (đoạn mã hóa) và đặc trưng cho từng gen.

Trong hệ gen người có những đoạn ADN được lặp lại liên tiếp nhau. Đoạn cấu trúc này gọi là vi vệ tinh (minisatellite ADN), hoặc VNTR (viriable number tandom repeats). Các locus VNTR là các đoạn ADN có chiều dài từ 1 đến 5kb. Số nucleotit của mỗi đơn vị lặp lại thay đổi từ 15 đến 100 nucleotit. Các đoạn VNTR có cấu trúc với mỗi đơn vị lặp lại gồm từ 2 đến 6 nucleotit, được gọi là các đoạn lặp lại ngắn STR (short tandom repeats) và thường được dùng để nhận dạng cá thể người.

6.1.3.2. Các locus gen sử dụng trong phân tích cá thể người

Hiện nay trên thế giới người ta có thể sử dụng từ 3 locus đến 15 locus khác nhau để giám định cá thể trong hình sự. Sau đây là một số locus gen thường dùng.

– Locus D1S80 (tên khác pMCT118) là locus nằm trên vai ngắn của NST số 1 ở người, có số alen (số đoạn lặp) là 28 alen, ký hiệu từ 14 đến 41. Đơn vị lặp lại là 15 nucleotit:

[GAAGACCACCGGAAA]

Hoặc: [GAGACCACCAGGAAG]

– Locus D17S30 (tên khác YNZ22) là locus nằm trên vai ngắn của NST số 17 ở người, có số alen là 11, ký hiệu từ B_1 đến B_{11}. Đơn vị lặp lại gồm 70 nucleotit.

– Locus D5S818 (tên khác D5) là locus nằm trên vai dài của NST số 5 ở người, có số alen là 9, ký hiệu từ 7 đến 15. Đơn vị lặp lại gồm 4 nucleotit [AGAT].

– Locus D7S820 (tên khác D7) là locus nằm trên vai ngắn của NST số 7 ở người, có số alen là 9, ký hiệu từ 6 đến 14. Đơn vị lặp lại gồm 4 nucleotit [GATA].

– Locus D13S317 (tên khác D13) là locus nằm trên vai dài của NST số 13 ở người, có số alen là 9, ký hiệu từ 7 đến 15. Đơn vị lặp lại gồm 4 nucleotit [GATA].

– Locus D16S539 (tên khác D16) là locus nằm trên vai dài của NST số 16 ở người, có số alen là 11, ký hiệu từ 5 đến 15. Đơn vị lặp lại gồm 4 nucleotit [GATA].

– Locus HUMTH01 (tên khác TH01, hoặc TC11) là locus nằm trên vai ngắn của NST số 11 ở người thuộc vùng intron, có số alen là 7, ký hiệu từ 5 đến 11. Đơn vị lặp lại gồm 4 nucleotit [AATG].

– Locus CSF1PO (tên khác CSF) là locus nằm trên vai dài của NST số 5 ở người, có số alen là 11, ký hiệu từ 5 đến 15. Đơn vị lặp lại gồm 4 nucleotit [AGAT].

– Locus TPOX (tên khác hTPO, hoặc TPO) là locus nằm trên vai ngắn của NST số 2 ở người, thuộc vùng intron, có số alen là 8, ký hiệu từ 6 đến 13. Đơn vị lặp lại gồm 4 nucleotit [AATG].

– Locus F13A1 (tên khác FXIIIA01) là locus nằm trên vai ngắn của NST số 6 ở người, có số alen là 15, ký hiệu từ 3 đến 17. Đơn vị lặp lại gồm 4 nucleotit [AAAG]. Trên đây là 10 locus thường được sử dụng để xác định cá thể, truy nguyên nguồn gốc trong khoa học hình sự.

Ngoài ra còn một số locus gen khác như: Amel, vWA, D3S1358, D8S1179, D21S11, D18S51 v.v... cũng đã được sử dụng trong việc xác định cá thể người.

Thông thường để nhận dạng sơ bộ, người ta tách chiết ADN của nghi phạm, dùng các cặp mồi khác nhau đặc trưng riêng cho từng locus để nhân bản đoạn ADN của locus đó bằng phản ứng PCR, rồi nhuộm bản gel và phân tích các băng điện di.

6.1.3.3. Các bộ KIT xác định cá thể người

– Để thuận tiện cho việc nhận dạng cá thể người. Các hãng sản xuất các bộ KIT để giúp cho việc xác định cá thể. Các bộ KIT STR có thể xác định 8, 9 locus đánh dấu, hoặc 12, 15 locus cho phép xác định cá thể trong hàng tỷ người với một lượng là 1ng ADN mẫu trong vòng vài giờ. Bộ KIT STR đầu tiên gồm có 4 đoạn STR (locus) đánh dấu: TH01, FES/FPS, vWA và F13A1. Xác suất hai cá thể trùng nhau khi sử dụng bộ KIT 4 locus gen này khoảng 1/10.000.

Bộ KIT thứ hai gồm 6 locus đánh dấu: TH01, vWA, FGA, D8S1179, D18S51 và D21S11 với xác suất hai cá thể trùng nhau là 1/50.000.000.

– Các bộ KIT thương phẩm:

Có nhiều bộ KIT thương phẩm phục vụ cho xác định cá thể người được bán trên thị trường. Thông thường có những bộ KIT xác định từng locus đánh dấu, hoặc KIT xác định nhiều locus đánh dấu cùng một lúc (sử dụng cho PCR phức). Hai hãng chuyên sản xuất các bộ KIT này là hãng Promega và hãng Perkin Elmer (PE). Xét về hình thức xác định băng sau điện di có thể chia các bộ KIT thành 2 loại: Loại sử dụng phương pháp nhuộm bạc để phát hiện alen và loại sử dụng chất màu huỳnh quang để nhận biết alen.

+ Sau đây là một số bộ KIT thường bán trên thị trường của hãng sản xuất Promega:

* Bộ KIT TH01, TPOX, CSF1PO, sản xuất năm 1993, gồm 3 locus: TH01, TPOX, CSF1PO xác suất trùng nhau là 1/410.

* Bộ KIT CTTV, sản xuất năm 1997, gồm 4 locus: D16S539, D13S317, D7S820 và D5S818 xác suất trùng hợp là $1/8.10^4$.

* Bộ KIT Power Plex™ 1.1 & 1.2, sản xuất năm 1998, gồm 8 locus: TH01, TPOX, CSF1PO, vWA, D16S539, D13S317, D7S820 và D5S818, xác suất trùng nhau là $1/1,2.10^8$.

* Bộ KIT Power Plex™ 2.1, sản xuất năm 1999, gồm 9 locus, xác suất trùng nhau là $1/5.10^{10}$.

* Bộ KIT Power Plex™16, sản xuất năm 2000, gồm 16 gen, xác suất trùng nhau là $1/1,8.10^{17}$.

+ Hãng Perkin Elmer (PE), Applied Biosystems cùng sản xuất một số bộ KIT thương phẩm như:

* Bộ KIT Amp FISTR® Blue, sản xuất năm 1996, gồm 3 locus: D3S1358, vWA và FGA, xác suất trùng nhau là 1/5000.

* Bộ KIT AmpFISTR®Green 1, sản xuất năm 1997, gồm 4 locus: Amel, TH01, TPOX và CSF1PO, xác suất trùng nhau là 1/410.

* Bộ KIT AmpFISTR Profiler Plus KIT, sản xuất năm 1997, gồm 10 locus: D3S1358, vWA, FGA, Amel, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317 và D7S820, xác suất trùng nhau là $1/9,6.10^{15}$.

+ Thành phần các bộ KIT thương phẩm để thực hiện phản ứng PCR nhằm xác định cá thể bao gồm:

* PCR mix chứa các thành phần chính để thực hiện phản ứng PCR, các thành phần có thể để tách riêng.

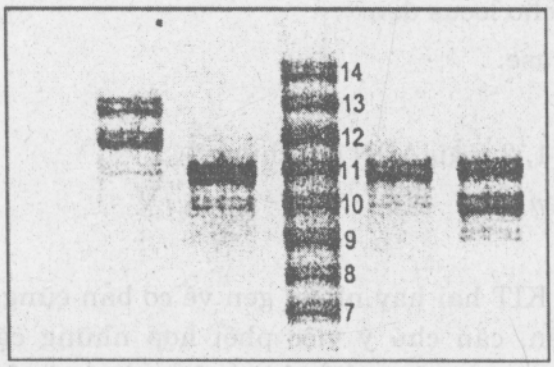
* Mồi đặc hiệu (Primer) đã gắn huỳnh quang vào đầu 5' của một trong hai chuỗi oligonucleotit. Nếu để khuếch đại gen đơn thì có 1 cặp mồi. Nếu khuếch đại phức locus thì có thể có 3, 4, thậm chí 16 cặp mồi.

+ Thang chỉ thị alen (allelic ladder): Bao gồm toàn bộ alen của một hay nhiều locus. Các thang chỉ thị alen đặc hiệu cho từng locus với một cặp mồi do hãng thiết kế, nhưng không công bố.

6.1.3.4. Nghiên cứu chế tạo thang alen

Thang alen là tập hợp các alen của locus gen đối với quần thể người, các alen này được nhân bản cùng 1 cặp mồi để nhân đoạn ADN đích có nhiều đoạn trình tự lặp lại với số lần khác nhau. Vì thế khi kiểm tra các mẫu ADN sẽ tạo ra các alen có kích thước khác nhau trong thang alen. Thang alen có tầm quan trọng lớn trong việc xác định chính xác kiểu gen của mẫu phân tích. Thang alen là thước đo chuẩn cho các trạng thái của một locus và rất cần thiết phải thống nhất định danh cho từng alen. Do vậy khi chế tạo bộ KIT giám định gen hình sự bao giờ cũng phải chế tạo thang alen (allelic ladder) cho từng locus gen.

Ví dụ: Bộ KIT D7S820 có thang alen chỉ thị gồm 8 alen ký hiệu từ 7 đến 14 (tương ứng với số đơn vị lặp lại của 4 nucleotit [GATA]) và được dùng để kiểm tra các mẫu nghiên cứu, Hình 6.1).



Hình 6.1. Kết quả thử nghiệm với bộ KIT D7S820
(ĐC (+ -) Mẫu đối chứng dương và âm. 1-2-3 các mẫu ADN cần xác định alen.
LD: thang alen chỉ thị).

– Nguyên tắc chế tạo thang alen:

+ Sử dụng các cặp mồi đã được lựa chọn để khuếch đại các đoạn ADN cần nghiên cứu.

+ Điện di sản phẩm đã khuếch đại trên gel polyacylamid. Nhuộm bạc để lựa chọn các mẫu mang alen khác nhau.

+ Đánh số alen theo thứ tự băng ADN có khối lượng phân tử thấp đến băng ADN có khối lượng phân tử cao theo quy ước quốc tế cho đến khi được đầy đủ số alen cần tìm.

+ Cắt các alen từ bản gel, tinh sạch lại ADN, rồi phối trộn lại với nhau.

+ Tạo thang alen tinh sạch bằng phản ứng PCR.

+ Xác định chính xác kích thước các alen bằng phương pháp giải trình tự để kiểm tra đoạn lặp lại.

– Tạo thang alen bằng phản ứng PCR: Quá trình tạo thang alen bằng PCR gồm các bước sau:

+ Lựa chọn các alen khác nhau trong bản gel.

+ Tiến hành PCR các alen ở các mẫu khác nhau nhờ việc quan sát các bản gel đã nhuộm bạc.

+ Đánh số alen và cắt phần gel có mang alen cần quan tâm rồi tinh sạch.

6.1.3.5. Nghiên cứu chế tạo KIT đơn gen và đa gen

a) Chế tạo KIT đơn gen

– Nguyên tắc:

+ Thiết kế mồi sao cho không có sự bắt cặp bổ sung giữa mồi xuôi và mồi ngược.

+ Trình tự mồi không trùng lặp với trình tự lặp lại trên đoạn gen.

+ Tối ưu hóa các thành phần, điều kiện của phản ứng PCR.

b) Tiến hành phản ứng PCR gồm các thành phần:

+ 4 loại dNTP.

+ Đệm PCR thích hợp.

+ Cặp mồi đặc hiệu cho locus đơn.

+ Taq ADN polymerase.

+ $MgCl_2$.

Mỗi lần PCR cần có 1, 2 mẫu ADN đối chứng.

b) Chế tạo KIT đa gen

– Nguyên tắc:

Nguyên tắc chế tạo KIT hai hay nhiều gen về cơ bản cũng tương tự như chế tạo KIT đơn gen. Tuy nhiên, cần chú ý việc phối hợp những cặp mồi khác nhau để khuếch đại các locus này trong cùng điều kiện phản ứng và chỉ khác nhau về thành phần PCR mix.

– Tiến hành phản ứng PCR mix gồm các thành phần:

+ 4 loại dNTP.

+ Đệm PCR thích hợp cho các locus đã chọn.

+ Mồi đặc hiệu cho hai hay nhiều locus đã chọn.

+ Taq-ADN polymerase.

+ $MgCl_2$.

Mỗi lần PCR cần các mẫu đối chứng đã mang các alen của hai hay nhiều locus cần xác định.

6.2. CÔNG NGHỆ DI TRUYỀN TRONG CHẨN ĐOÁN BỆNH VÀ LIỆU PHÁP GEN

6.2.1. Công nghệ di truyền trong chẩn đoán bệnh di truyền

Việc chẩn đoán và điều trị các bệnh tật của con người nhờ công nghệ di truyền bắt đầu có những hiệu quả đáng kể. Hiện nay có trên 4000 bệnh có nguồn gốc di truyền đã được xác định và nhiều trong số bệnh đó đã được nghiên cứu bằng các phương pháp phân tích về biểu hiện và cấu trúc của gen liên quan đến các bệnh đó. Một trong những phát hiện quan trọng là sử dụng phương pháp đa hình chiều dài các đoạn cắt giới hạn (RFLP) và giải trình tự ADN để chẩn đoán bệnh.

6.2.1.1. Chẩn đoán bệnh do rối loạn chuyển hóa

Lần đầu tiên kỹ thuật phân tích ADN được áp dụng để chẩn đoán xem thai nhi có bị bệnh thiếu máu do hồng cầu lưỡi liềm (HbS) hay không.

Trước đây để phát hiện bệnh này, người ta phải lấy mẫu thử trực tiếp từ thai nhi, điều này gây tổn hại cho thai nhi. Nhờ có phương pháp RFLP có thể phân tích đoạn ADN tế bào của dịch xung quanh thai nhi rồi so sánh với đoạn ADN tương ứng của tế bào hồng cầu bình thường, từ đó phát hiện ra gen hỏng. Phương pháp chẩn đoán này an toàn mà không gây nguy hiểm cho thai nhi.

Nội dung việc sử dụng phương pháp RFLP để chẩn đoán bệnh hồng cầu hình liềm như sau:

– Tách chiết ADN từ tế bào bạch cầu của cả người bố và mẹ có con bị bệnh thiếu màu hồng cầu lưỡi liềm.

– Tách chiết ADN của những người con khỏe mạnh và ADN từ dịch xung quanh của thai nhi cần chẩn đoán bệnh này.

– Dùng enzym cắt giới hạn cắt các ADN đã tách chiết ở trên của các đối tượng trên.

– Điện di các phân đoạn ADN đã bị cắt trên gel polyacrylamid.

– Tách mARN của gen globulin.

– Cho mARN sao chép ngược chiều nhờ enzym phiên mã ngược (Reverse Transcriptase) để tạo ADN bổ trợ (cADN) có gắn đồng vị phóng xạ P^{32}.

– Biến tính và trộn các đoạn ADN với cADN tạo ra các đoạn lai giữa chúng với nhau. Chính các đoạn lai giữa các sợi ADN với cADN là đoạn chứa gen mã hóa cho tổng hợp globulin.

– Phát hiện các gen đột biến trên cơ sở phân tích kích thước của các đoạn:

+ Người mạnh khỏe, gen β globulin ở phân đoạn có độ dài 7,6kb.

+ Trẻ thiếu máu hồng cầu hình liềm gen β globulin bị đột biến và nằm ở phân đoạn có độ dài 13kb.

+ Bố và mẹ của thai nhi đã có bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm có cả 2 phân đoạn 7,6kb và 13kb. Đó là cơ thể dị hợp tử.

Bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm do đột biến thay thế nucleotit ở codon thứ 6 (A thay thành T) của gen β globulin dẫn đến aminoaxit glutamic đổi thành valin.

Một số thành tựu trong hướng dẫn chẩn đoán này gồm có các bệnh như: Bệnh máu không đông dạng A, các bệnh thoái hóa cơ, hội chứng X fragile và dần độn, bệnh ung thư võng mạc (retinoblastoma) v.v...

6.2.1.2. Chẩn đoán ung thư

Ung thư là một căn bệnh nan y gây ra tử vong cao. Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO), trong Hội nghị Quốc tế về ung thư tổ chức vào ngày 01/7/2002, thì trong vòng 20 năm tới số người mắc ung thư có thể lên tới gần 300 triệu người. Người ta thường gặp một số dạng ung thư như:

– Carcinoma (nguồn gốc biểu bì) là dạng ung thư phổ biến, xuất phát từ tế bào của lá phôi trong và lá phôi ngoài. Các loại ung thư này gồm ung thư phổi, ung thư vú, ung thư trực tràng v.v...

– Sarcoma là dạng ung thư ít gặp hơn, xuất phát từ tế bào có nguồn gốc lá phôi giữa. Các loại ung thư này là ung thư sụn, ung thư mô liên kết, ung thư cơ.

– Lymphoma là ung thư nguy hiểm, thể hiện bệnh rất sớm, xuất phát từ tế bào máu non của hệ tủy xương. Các loại ung thư này là ung thư bạch cầu cấp tính. Ngày nay người ta biết có 3 nhóm gen liên quan đến quá trình phát sinh và phát triển của ung thư đó là:

+ Nhóm gen gây ung thư (Oncogene):

Nhóm gen Oncogene là dạng đột biến của nhóm gen được gọi là proto-oncogene, chịu trách nhiệm mã hóa cho các yếu tố phát triển và tăng trưởng của tế bào. Nếu nhóm gen điều hòa sinh trưởng tế bào bị đột biến sẽ dẫn đến sự sinh sản, tăng trưởng của tế bào không kiểm soát được, dẫn đến ung thư.

+ Nhóm gen áp chế Oncogene (Oncogene supperessors):

Nhóm gen này chịu trách nhiệm ức chế các gen thuộc nhóm Oncogene. Nếu nhóm gen áp chế Oncogene bị đột biến, bị mất hoạt tính thì nhóm Oncogene tự do hoạt động dẫn đến gây ung thư.

+ Nhóm gen sửa chữa ADN (ADN repair genes):

Nhóm gen sửa chữa này chịu trách nhiệm điều chỉnh những sai sót trong sao chép ADN, trong hoạt động của 2 nhóm gen trên. Nếu nhóm gen này bị đột biến, bị mất hoạt tính thì dẫn đến sự sinh sản, sinh trưởng bất thường của tế bào. Chẩn đoán bệnh ung thư dựa vào sự phát hiện tập hợp tế bào bất bình thường, trong đó có những tế bào gây ung thư. Nguyên tắc chẩn đoán là sử dụng các phương pháp, kỹ thuật phân tích ADN để xác định sự khác nhau của các dòng tế bào ung thư và tế bào bình thường. Hướng chẩn đoán này đã ứng dụng để phát hiện các dạng ung thư như: Lymphoma Burkitt, Lymphoma nang, ung thư bạch cầu v.v...

6.2.1.3. Chẩn đoán bệnh do virus, vi khuẩn và các tác nhân ngoại lai khác

Trong việc phát hiện các tác nhân như virus, vi khuẩn, ký sinh trùng v.v... việc sử dụng các phương pháp sinh học phân tử, phân tích ADN... có nhiều thuận lợi hơn so với các phương pháp chẩn đoán thông thường. *Thứ nhất* là giúp người ta chẩn đoán nhanh vì không phải nuôi cấy các tác nhân gây bệnh. Ví dụ, sử dụng phương pháp PCR để phát hiện virus HIV, chỉ cần 1 ngày thay vì phải qua 3-4 tuần nuôi cấy virus HIV như trước kia vẫn thường làm. *Thứ hai*, các phương pháp sinh học phân tử và kỹ thuật gen là biện pháp duy nhất để chẩn đoán khi mà các tác nhân gây bệnh không thể nuôi, hoặc rất khó nuôi chúng. Ví dụ như chẩn đoán trực khuẩn Koch, Brucella, Chlamydia, HBV (virus gây viêm gan B – Hepatitis B virus). *Thứ ba*, việc tạo ra đoạn ADN làm mẫu dò đơn giản hơn việc sản xuất ra kháng thể đặc hiệu. Mặt khác, với một loại mẫu dò có thể phát hiện được nhiều kiểu gen của tác nhân gây bệnh, khi mà không thể dùng một kháng thể đặc hiệu để phát hiện được các kiểu gen tác nhân gây bệnh.

Người ta đã tạo ra các KIT chẩn đoán virus vi khuẩn và các tác nhân lạ gây bệnh đã được thương mại hóa. Ví dụ, bộ KIT chẩn đoán gần 40 loại vi khuẩn gây bệnh như: *Borrelia burgdorferi, Campylobacter, Enterococcus jejuni, Haemophylus influenzae, Legjnonella pnemophila, Mycobacterium tuberculosis, Salmonella triphimurium, Streptococcus pneumoniac* v.v...

Đối với nhiều loại tác nhân virus, kỹ thuật lai ADN và PCR cho phép chẩn đoán nhiều chủng, nhóm virus như: papillomavirus, HBV, HIV, EBV, H_5N_1 v.v...

Đối với các ký sinh trùng gây bệnh, người ta cũng dùng các kỹ thuật chẩn đoán

phân tử để chẩn đoán thành công các chủng ký sinh trùng sốt rét Plasmodium, các ký sinh trùng Leishmania, Schistosoma, Trypanosoma, Toxoplasma v.v... Kỹ thuật chẩn đoán thuận lợi nhất là RFLP, trong đó có công đoạn lai phân tử ADN.

6.2.2. Liệu pháp gen

6.2.2.1. Khái niệm về liệu pháp gen

a) Khái niệm về liệu pháp gen

Liệu pháp gen (Gene therapy - GT) là phương pháp chữa bệnh bằng cách đưa các gen cần thiết (gen liệu pháp) nhằm mục đích chữa bệnh cho con người.

– Gen liệu pháp (Therapeutic gene) là các gen có chức năng sử dụng vào điều trị bệnh cho con người. Mỗi một loại gen liệu pháp có đặc điểm và chức năng riêng. Gen liệu pháp có thể là:

+ Các gen lành đưa vào tế bào sống để thay thế các gen hỏng tương ứng, từ đó khôi phục lại chức năng của gen.

+ Các gen mã hóa cho một protein đặc hiệu. Khi đưa các gen mã hóa đó vào cơ thể sống sẽ tạo ra protein đặc hiệu để ức chế, kìm hãm gen khác gây bệnh, hoặc kìm hãm sự tăng sinh quá nhanh của tế bào, hoặc cũng có thể gây chết tế bào gây bệnh.

+ Gen ức chế các gen gây bệnh, gen kìm hãm, hoặc gen phục hồi.

+ Các đoạn oligonucleotit có tác dụng kìm hãm sự hoạt động của các gen bị đột biến trong tế bào.

– Liệu pháp gen có hai nhóm phương pháp cơ bản, đó là: liệu pháp gen soma và liệu pháp gen tế bào mầm.

+ Liệu pháp gen soma (somatic gene therapy) là phương pháp điều trị thay thế hay sửa chữa gen hỏng, gen bệnh của các tế bào soma trong cơ thể người, giúp cho con người sống bình thường. Ví dụ, liệu pháp gen soma đã chữa trị, hoặc hạn chế các bệnh như thiếu hụt miễn dịch, ung thư, thiếu máu, u xương v.v... Các tế bào dùng để chữa trị bằng liệu pháp soma có thể là tế bào lympho, tế bào gan và đặc biệt là dùng tế bào gốc (stem cells).

+ Liệu pháp gen tế bào mầm (germline gene therapy) là phương pháp điều trị, sửa chữa, thay thế gen hỏng cho các giao tử (tinh trùng, hoặc trứng) nhằm tạo ra thế hệ sau bình thường.

b) Nguyên tắc cơ bản của điều trị bằng liệu pháp gen

Theo Tổ chức Y tế thế giới và quy định của nhiều Quốc gia thì điều trị bằng liệu pháp gen cần tuân thủ một số nguyên tắc sau:

– Theo dõi và hiểu biết cặn kẽ quá trình phát sinh bệnh, cơ chế phát sinh bệnh, đặc tính di truyền của bệnh.

– Nắm vững cấu trúc và chức năng của gen gây bệnh, gen hỏng, gen đột biến... đồng thời nắm vững cấu trúc, chức năng của gen liệu pháp dùng để thay thế.

– Dự đoán hiệu quả của liệu pháp. Nếu hiệu quả cao mới được áp dụng.

– Cần thử nghiệm nhiều lần đối với động vật trước khi thử nghiệm cho người. Chỉ áp dụng đối với con người khi đã thử nghiệm nhiều lần có hiệu quả cao đối với động vật thí nghiệm.

6.2.2.2. Các lĩnh vực ứng dụng và một số chiến lược của liệu pháp gen

a) Các lĩnh vực ứng dụng chủ yếu của liệu pháp gen

– Liệu pháp gen trong điều trị các bệnh rối loạn chuyển hóa do di truyền gồm các liệu pháp chữa và điều trị các bệnh rối loạn chuyển hóa do đơn gen và đa gen quy định.

+ Điều trị rối loạn chuyển hóa do đơn gen:

Một số bệnh do đơn gen bị sai hỏng, mất cấu trúc và chức năng bình thường đã gây ra bệnh tật. Sự thay thế, sửa chữa các gen hỏng này giúp cho cơ thể trở lại bình thường, đồng thời ổn định cho thế hệ sau. Các bệnh điển hình do đơn gen quy định là: thiếu máu hồng cầu hình liềm, bệnh máu khó đông, bệnh xơ nang và viêm phổi cấp, bệnh parkinson, bệnh rối loạn cholesterol.

+ Điều trị rối loạn chuyển hóa do đa gen:

Một số bệnh do nhiều gen sai hỏng gây nên. Dùng biện pháp thay thế, sửa chữa các gen để điều trị, tùy theo mức độ hư hỏng mà dùng các gen liệu pháp để chữa bệnh. Các bệnh điển hình do đa gen quy định là: bệnh tim bẩm sinh, bệnh ung thư, bệnh tiểu đường, bệnh tâm thần phân liệt v.v...

– Liệu pháp gen chữa các bệnh do nhiễm trùng: Các loại virus, vi khuẩn đã gây hàng loạt loại bệnh cho con người như ung thư, lao, HIV... Liệu pháp gen là một trong những phương pháp chữa bệnh cho hiệu quả cao. Việc thay thế bằng gen, liệu pháp, kìm hãm, hoặc phục hồi các gen hư hỏng đã giúp cho cơ chế chống lại các bệnh nhiễm trùng như chống lao, chống viêm gan siêu vi B, ung thư do virus v.v...

b) Một số chiến lược của liệu pháp gen

Những chiến lược của liệu pháp gen thường được áp dụng là: thay thế gen, tăng cường hiệu quả hoạt động của gen, tiêu diệt các tế bào đích bằng gen liệu pháp, ức chế biểu hiện của các gen hỏng ở tế bào đích v.v...

6.2.2.3. Các nguyên lý của liệu pháp gen

Mục đích của liệu pháp gen là đưa gen liệu pháp (gen lành) vào tế bào người để gắn vào vị trí cần thiết trong hệ genom của người làm cho tế bào hoạt động bình thường. Do vậy cần phải thực hiện các liệu pháp gen gồm các bước như: tách dòng gen liệu pháp, chọn vector vận chuyển phù hợp, tạo vector gắn gen liệu pháp tái tổ hợp và cuối cùng là đưa vector mang gen liệu pháp vào tế bào chủ, hoặc cơ thể chủ rồi theo dõi biểu hiện của gen liệu pháp.

a) Gen liệu pháp và tách dòng gen liệu pháp

Gen liệu pháp là các gen (hoặc đoạn ADN, đoạn ARN) cần thiết để thay thế gen hỏng, kìm hãm hoạt động của gen hỏng, hoặc bổ trợ hoạt động của gen mất làm giảm chức năng trong tế bào chủ, nhằm khôi phục hoạt động bình thường của tế bào và cơ thể.

Việc tách dòng gen liệu pháp được thực hiện như phương pháp tách dòng gen thông thường đã được đề cập ở chương trước, các gen liệu pháp sau khi tách dòng cần bảo đảm đưa được vào vị trí đích và vẫn giữ được chức năng nguyên vẹn. Gen liệu pháp có thể được tách ra từ nhiều nguồn tế bào khác nhau ở các sinh vật khác nhau, có thể là do gen ở trạng thái ADN kép, hoặc có thể từ mARN rồi cho phiên mã ngược để tạo cADN.

b) Các loại vector thường sử dụng trong liệu pháp gen

Vector chuyển các gen liệu pháp trong liệu pháp gen được gọi là vector liệu pháp. Vector liệu pháp có chức năng chuyển gen và phải có những đặc trưng cần thiết như:

– Phải đảm bảo đưa các gen liệu pháp vào tế bào, hoặc cơ thể chủ thuận tiện, dễ dàng, không gây những tác động phụ bất lợi cho tế bào, cơ thể chủ.

– Phải có khả năng mang gen liệu pháp càng lớn càng tốt.

– Phải có tính linh hoạt với các tế bào đích, mô đích và có khả năng sử dụng thuận tiện.

Hiện nay có 2 nhóm vector liệu pháp chính, đó là:

+ Vector có bản chất virus và vector retrovirus, vector adeno- associated virus (AAV) và vector herpes simplex virus (HSV).

* Vector adenovirus là virus có phần vỏ protein là khối đa diện 20 mặt và có phần lõi chứa ADN mạch kép. Phân tử ADN mạch kép dài 36kb gồm 50 gen, trong đó có 4 vùng gen quan trọng ký hiệu là E_1, E_2, E_3, E_4. Để thiết kế vector adenovirus phải cắt bỏ gen E_1 rồi thay thế bằng phức hợp promoter-gen liệu pháp và gây bất hoạt, hoặc cắt bỏ gen E_3. Vector adenovirus tái tổ hợp sau khi xâm nhiễm vào tế bào đích, nó sẽ chuyển gen liệu pháp cho tế bào đích và loại bỏ gen sai hỏng của tế bào mang gen hỏng.

* Vector retrovirus là virus có phần lõi mang phân tử ARN. Vector retrovirus vỏ protein gồm 3 lớp chứa phần lõi ARN và các loại enzym trong đó có enzym phiên mã ngược (Reverse transcriptase). Hệ gen của vector retrovirus là ARN sợi đơn nhưng luôn tồn tại 2 sợi có cấu trúc, kích thước giống nhau, dài khoảng 7-11kb. Hệ gen có chứa các gen độc (nhóm gen gây ung thư) và các gen cần thiết cho hoạt động sống của retrovirus. Muốn thiết kế vector retrovirus làm vector liệu pháp gen cần phải loại bỏ các gen độc, gắn thay thế bằng các gen liệu pháp. Các vector retrovirus thường được sử dụng trong liệu pháp gen là: Mo-Mu LV và lentivirus.

* Vector adeno-associated virus (AAV):

AAV là loại vector có kích thước nhỏ không gây bệnh cho người. AAV có thể xâm nhiễm vào tế bào và gắn hệ gen của chúng vào ADN của người ở vị trí đặc hiệu của NST số 19 tạo ra dạng tiền virus (provirus), tồn tại trong tế bào. Khi gặp điều kiện thuận lợi, AAV tách ra, tạo ra AAV mới. AAV có chứa 1 phân tử ADN sợi đơn có kích thước khoảng 4,5-4,7kb. Hệ gen của AAV có 2 nhóm gen chính là Rep và Cap, ngoài ra còn có một số gen khác điều khiển sự hoạt động sống của AAV.

Khi thiết kế các vector AAV phải loại bỏ gen Cap và gen Rep thay thế bằng gen

liệu pháp kết hợp với promoter thích hợp. Vector AAV chỉ chuyển được các gen liệu pháp có kích thước nhỏ. Đặc điểm quan trọng nhất của vector AAV là hiệu quả chuyển gen cao lại không gây bệnh cho người. AAV sử dụng để điều trị ung thư, bệnh xơ nang, bệnh nghẽn mạch vành tim và một số bệnh khác.

* Vector herpes simplex virus (HSV):

HSV là nhóm virus lớn, hệ gen là ADN mạch kép, gây bệnh cho người và động vật. HSV có vỏ là khối đa diện 20 mặt, có phân tử ADN mạch kép, kích thước khoảng 152,3kb. HSV đa dạng có nhiều type khác nhau, trong đó điển hình là HSV_1 dùng cho liệu pháp gen. Khi thiết kế vector HSV cần tổ hợp HSV_1 với Amplicon plasmid, từ đó tạo ra vector HSV có thể mang gen liệu pháp.

+ Vector không có bản chất virus (Nonviral vector):

Ngoài vector có bản chất virus, người ta còn sử dụng các vector không có bản chất virus nhưng có thể cài, gắn và vận chuyển các gen liệu pháp để điều trị và chữa bệnh như các vector lyposom, ADN trần, oligonucleotit.

* Liposom:

Liposom có thể dùng để làm vector chuyển gen liệu pháp điều trị các bệnh xơ nang, u thận... cho hiệu quả cao. Để thiết kế vector liposom, người ta tạo phức hợp liposom ADN. Phân tử ADN có điện tích âm có thể kết hợp với liposom tạo ra phức hợp ổn định liposom ADN, dùng làm vector liệu pháp gen. Ở trạng thái vector, phân tử ADN nằm giữa hai lớp màng kép của các phân tử. Khi vector liposom tiếp xúc với tế bào đích và chui qua màng tế bào, thì lớp các phân tử lipit bị phân hủy, Do vậy gen liệu pháp có thể được đưa vào tế bào đích.

* Vector ADN trần (Naked DNA vector):

Người ta có thể dùng ADN trần làm vector liệu pháp gen. Vector ADN trần được thiết kế ở dạng vòng mang gen liệu pháp. Vector ADN trần cho phép mang các gen liệu pháp có kích thước không hạn chế, dễ dàng chuyển vào tế bào. Các vector ADN trần thuận lợi khi được gen liệu pháp vào các tế bào đích như tế bào ung thư, khối u... bằng vi tiêm. Tuy nhiên, khả năng biểu hiện của gen liệu pháp còn khó khăn, nên việc sử dụng vector ADN trần để điều trị bệnh còn hạn chế.

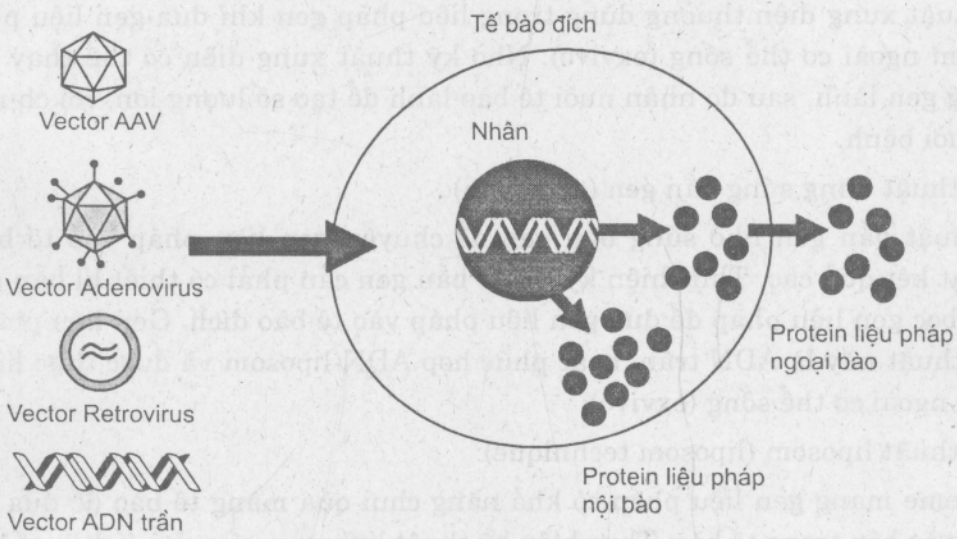
* Vector oligonucleotit:

Oligonucleotit là các đoạn ADN mạch đơn ngắn, hoặc đoạn cADN được tổng hợp trên cơ sở mạch khuôn của gen bệnh. Các đoạn oligonucleotit dùng làm vector có kích thước khoảng 20-40 nucleotit có thể tạo ra các xoắn ba (triple helix) nhằm hạn chế quá trình phiên mã, dịch mã của các gen tổng hợp protein bệnh lý. Bên cạnh đó, còn một số loại vector liệu pháp gen khác như ribozym, vector phối tử – ADN (Ligand – DNA vector) v.v...

6.2.2.4. Các kỹ thuật cơ bản của liệu pháp gen

Khi tạo ra các vector liệu pháp gen, cần phải có kỹ thuật chuyển các gen liệu pháp vào tế bào, hoặc cơ thể người. Mục đích cuối cùng là các gen liệu pháp trong cơ

thể người phải được phiên mã, dịch mã tạo ra các protein liệu pháp có tác dụng chữa bệnh. Các vector liệu pháp được sử dụng khác nhau, thích hợp cho từng loại tế bào đích, nhằm tạo ra các protein liệu pháp nội bào, hoặc ngoại bào (Hình 6.2).



Hình 6.2. Sơ đồ mục đích của liệu pháp gen
(Nguồn: Khuất Hữu Thanh, 2005)

– Các kỹ thuật chuyển gen liệu pháp vào cơ thể sống có thể là các kỹ thuật khác nhau tương tự như phương pháp chuyển gen ở động vật. Hình thức chuyển gen có thể được thao tác ở ngoài cơ thể sống (exviro), hoặc trực tiếp ở trong cơ thể sống (invivo).

+ Hình thức chuyển gen ngoài cơ thể sống (exvivo) là cách lấy tế bào bị bệnh có gen hỏng ra ngoài cơ thể, thực hiện liệu pháp chuyển gen vào tế bào để thay thế các gen lành vào chỗ các gen hỏng để tạo tế bào lành, nhân nuôi tế bào lành lên thành số lượng lớn rồi lại đưa vào cơ thể người bệnh.

+ Hình thức thứ hai là chuyển gen trực tiếp vào cơ thể sống (invivo) không cần lấy tế bào bệnh ra khỏi cơ thể. Việc chuyển trực tiếp vào tế bào gồm các bước sau:

* Lựa chọn vector liệu pháp thích hợp, tùy thuộc vào loại bệnh, loại tế bào đích.

* Tách và tạo vector tái tổ hợp mang gen liệu pháp.

* Đưa vector tái tổ hợp mang gen liệu pháp bằng các kỹ thuật chuyển gen, ví dụ vi tiêm, súng bắn gen v.v...

* Kiểm tra biểu hiện của gen liệu pháp, trạng thái sức khỏe của người bệnh.

Về kỹ thuật chuyển gen liệu pháp để điều trị bệnh, có thể dùng các kỹ thuật chính sau:

+ Kỹ thuật vi tiêm (Microinjection)

Kỹ thuật vi tiêm trong liệu pháp gen soma để đưa vector liệu pháp vào các khối ung thư. Gen liệu pháp có thể là các gen tổng hợp các chất ức chế sự phát triển khối

u. Có thể dùng cả 2 hình thức chuyển gen trực tiếp không cần lấy khối u ra ngoài cơ thể, hoặc chuyển gen liệu pháp vào tế bào khối u đã được lấy ra khỏi cơ thể.

+ Kỹ thuật xung điện (electroporection):

Kỹ thuật xung điện thường dùng trong liệu pháp gen khi đưa gen liệu pháp vào tế bào nằm ngoài cơ thể sống (exvivo). Nhờ kỹ thuật xung điện có thể thay thế gen hỏng bằng gen lành, sau đó nhân nuôi tế bào lành để tạo số lượng lớn, rồi chuyển vào cơ thể người bệnh.

+ Kỹ thuật dùng súng bắn gen (gene gun):

Kỹ thuật bắn gen nhờ súng bắn gen để chuyển gen liệu pháp vào tế bào đích thường đạt kết quả cao. Thực hiện kỹ thuật bắn gen cần phải có thiết bị bắn gen, các vi đạn có bọc gen liệu pháp để đưa gen liệu pháp vào tế bào đích. Gen liệu pháp dùng trong kỹ thuật này là ADN trần, hoặc phức hợp ADN-liposom và được thực hiện theo hình thức ngoài cơ thể sống (exvivo).

+ Kỹ thuật liposom (liposom technique):

Liposome mang gen liệu pháp có khả năng chui qua màng tế bào để đưa các gen liệu pháp vào bên trong tế bào. Thực hiện kỹ thuật liposome cần chú ý chọn tế bào đích thích hợp để nâng cao hiệu quả của liệu pháp gen. Ngoài ra còn có một số kỹ thuật khác để chuyển gen liệu pháp như kỹ thuật viên gen, kỹ thuật canxi phosphat v.v...

6.2.2.5. Các ứng dụng của liệu pháp gen

Liệu pháp gen đã được ứng dụng để điều trị một số bệnh di truyền như: rối loạn chức năng gen, ung thư, bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm, bệnh xơ nang, HIV/AIDS, bệnh máu khó đông v.v...

a) Liệu pháp gen chữa bệnh rối loạn chức năng gen

Một số bệnh do rối loạn chức năng của gen gây nên hiện tượng suy giảm khả năng miễn dịch tổ hợp trầm trọng, từ đó dễ mắc các bệnh truyền nhiễm, giảm sút sức khỏe.

Tùy theo mức độ sai hỏng của gen (defetive gene) dẫn đến rối loạn chức năng của tế bào lympho T, B, từ đó gây nên sự suy giảm, thiếu hụt miễn dịch ở cơ thể người. Sự suy giảm miễn dịch tổ hợp trầm trọng ở người chia làm 2 nhóm bệnh: Bệnh do sai hỏng gen nằm trên NST giới tính X và bệnh sai hỏng gen nằm trên NST thường.

– Bệnh suy giảm miễn dịch tổ hợp trầm trọng do gen liên kết với NST giới tính X (severe combined immuno deficiency X: X-SCID):

Bệnh X-SCID do sai hỏng gen γc (commongamma) nằm trên vai dài của NST X dẫn đến làm mất, hoặc gây rối loạn chức năng của các tế bào có thẩm quyền miễn dịch lympho T và B, gây nên sự suy giảm miễn dịch tổ hợp trầm trọng. Liệu pháp gen chữa bệnh này là phải thay thế gen γc trên NST giới tính đã bị sai hỏng bằng gen γc bình thường. Bệnh thường biểu hiện là viêm phổi nặng, kèm theo nhiều chứng bệnh nhiễm khuẩn khác để dẫn đến tử vong.

Liệu pháp gen chữa bệnh X-SCID là lấy tế bào tủy xương người bệnh, tiến hành

xạ trị, sau đó chọn lọc các tế bào khỏe đã được chuyển gen γc bình thường bằng cách sử dụng vector retrovirus, rồi đưa trở lại vào cơ thể người bệnh. Kết quả đã khôi phục được các tế bào T và B.

– Bệnh suy giảm miễn dịch tổ hợp trầm trọng do sự sai lệch của các gen ADA, PNP, CD nằm trên NST thường gây biến đổi cấu trúc của các enzym, protein tương ứng dẫn đến bệnh suy giảm miễn dịch ở mức độ khác nhau:

Gen ADA (Adenosine Diaminase) mã hóa cho enzym adenosine diaminase liên quan đến sự chuyển hóa purin. Người có gen ADA sai hỏng bị rối loạn chức năng của các tế bào lympho T và B, từ đó dẫn đến gây suy giảm miễn dịch tổ hợp trầm trọng. Liệu pháp gen là thay thế gen ADA đã bị hỏng bằng gen bình thường. Sử dụng retrovirus để chuyển gen ADA "lành" vào tế bào lympho T cho kết quả cao. Bước tiếp theo là đưa tế bào lympho T mang gen bình thường vào cơ thể nên đã điều trị được bệnh suy giảm miễn dịch tổ hợp trầm trọng (ADA-SCID).

Để điều trị bệnh ADA-SCID ở người còn có thể dùng các liệu pháp gen khác như sử dụng polyethyleneglycol (PEG-ADA), hoặc liệu pháp tế bào gốc cũng đưa đến kết quả tốt.

b) Liệu pháp gen chữa bệnh ung thư

Có nhiều loại ung thư ở người. Thông thường gặp các loại ung thư như: Ung thư dạ dày, ung thu vú, ung thư gan, ung thư phổi, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư ruột và ung thư buồng trứng. Để điều trị ung thư, người ta sử dụng nhiều biện pháp khác nhau như xạ trị, dùng hoá chất, giải phẫu kèm xạ trị, hoặc kết hợp hoá chất và liệu pháp gen.

– Sử dụng liệu pháp gen điều trị ung thư chiếm tỷ lệ cao, tới gần 70%. Trong điều trị ung thư bằng liệu pháp gen, người ta sử dụng các loại vector liệu pháp như: vector virus, vector adenovirus, vector ADN trần nhưng lại được thiết kế dạng plasmid. Trong các vector sử dụng trong liệu pháp gen chữa ung thư thì vector retrovirus được sử dụng sớm nhất và có tỷ lệ cao, tới hơn 60% (năm 2003), tiếp theo là vector adenovirus và các vector khác.

– Liệu pháp gen điều trị ung thư thường theo xu hướng tác động trực tiếp vào khối u theo các phương thức khác nhau như:

+ Ức chế sự phát triển khối u, thực hiện các liệu pháp exvivo, hoặc invivo với các vector mang các gen liệu pháp nhằm kìm hãm phát triển khối u như các gen p53, gen pRb v.v...

+ Sử dụng các gen liệu pháp tăng cường, gây kích hoạt chết theo chương trình (apotosis), làm tế bào ung thư co lại, tách khỏi sự liên kết với tế bào xung quanh rồi tự chết.

+ Thay thế gen để phục hồi các protein, enzym sai hỏng, phục hồi khả năng kìm hãm hoạt động của các gen gây ung thư.

+ Sử dụng các gen tạo ra các sản phẩm có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư. Ví dụ như gen tự tử ced (suicide gene).

+ Sử dụng các hợp chất tự nhiên tác dụng trực tiếp vào tế bào ung thư, bao vây thành mạch ngăn chặn mối liên hệ về dinh dưỡng của tế bào ung thư. Do đó tế bào ung thư thiếu dinh dưỡng và bị chết dần.

Tuỳ theo từng loại bệnh ung thư, khi thực hiện điều trị bằng liệu pháp gen cần sử dụng các gen liệu pháp khác nhau. Thực nghiệm cho thấy hơn 50% các trường hợp ung thư ở người liên quan đến việc mất hoạt tính của gen p53. Gen p53 nằm trên vai ngắn của NST 17 ở người. Gen p53 mã hoá cho một protein gọi là protein 53. Protein 53 có chức năng kiểm soát sự phân chia bất thường của tế bào. Khi tế bào phân chia nhanh, protein 53 ức chế sự sao chép gen, đồng thời kích hoạt sự chết theo chương trình (apoptosis). Nếu gen p53 bị đột biến dẫn đến tế bào tăng sinh vô hạn, tạo nên các khối u. Một số nghiên cứu cho thấy, nếu chức năng gen p53 bị mất gây nên 70% ung thư trực tràng, hơn 50% ung thư phổi và khoảng 40% ung thư vú.

Nhiều gen khác khi bị biến đổi cũng gây nên ung thư. Ví dụ, gen Rb1 nằm trên NST số 13 ở người mã hoá cho protein pRB làm nhiệm vụ phosphorin hoá trong việc điều hoà sự phân chia tế bào ở pha S và pha G1. Khi bị đột biến, gen Rb1 mất chức năng nên gây ra ung thư retinoblastoma. Có thể nói rằng, ung thư chủ yếu là do sự biến đổi của gen gây nên. Vì vậy điều trị ung thư trước hết cần phải sử dụng liệu pháp gen, đưa các gen liệu pháp thay thế các gen biến đổi gây nên ung thư như các gen p53, gen Rb, gen Ras v.v... các gen lành vào cơ thể người bệnh.

c) Liệu pháp gen chữa bệnh do sự thay đổi chức năng protein

Một số bệnh gây nên do đột biến gen làm thay đổi cấu trúc bậc một của protein dẫn đến làm thay đổi chức năng của protein. Một trong những bệnh đó là bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm SCA (Sickle Cell Anemia) do đột biến gen β globin. Đột biến gen β globin làm biến đổi hemoglobin bình thường (HbA) thành dạng hemoglobin S (HbS). Khi hồng cầu có HbS thì bị biến dạng thành cấu trúc hình liềm. Khả năng trao đổi oxy trong tế bào và mô giảm mạnh, gây bệnh lý đặc trưng cho bệnh thiếu máu.

– Có ba xu hướng khác nhau trong liệu pháp gen để chữa bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm, đó là:

+ Sửa chữa sai lệch của bộ ba mã hoá cho axit amin thứ 6 của gen β^s globin. Dùng vector retrovirus chuyển gen β globin bình thường và cả gen γ globin vào tế bào tuỷ xương của người bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm.

+ Sửa chữa các sai lệch của bộ ba mã hoá cho axit amin thứ 22 và axit amin thứ 87 trên gen β globin để tạo các dạng HbF và HbA_2 bình thường.

+ Thay thế cả gen β^s globin. Cắt bỏ gen bị hỏng (gen β^s globin), thay thế bằng gen β globin bình thường cho các tế bào máu trong tuỷ xương. Xu hướng này thường dùng đối với trẻ sơ sinh bị bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm.

– Các vector liệu pháp dùng trong chữa bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm là vector lentivirus, vector retrovirus đã cải biến, vector AAV v.v...

– Các bước điều trị bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm gồm có:

+ Tách tế bào tuỷ xương của người bị bệnh, chiếu xạ để chọn các tế bào khoẻ mạnh. Chuyển gen β globin bình thường nhờ retrovirus vào tế bào tuỷ xương. Nhân nuôi tế bào đã mang gen β globin bình thường.

+ Xạ trị kết hợp với điều trị bằng hoá chất cho người bệnh để loại bớt tế bào tuỷ xương bị đột biến mang gen β^s globin.

+ Chuyển các tế bào tuỷ xương mang gen β globin bình thường là được nhân nuôi vào người bệnh.

+ Theo dõi, đánh giá lượng tế bào mang gen β^s globin đột biến còn lại. Nếu tế bào mang gen β^s globin còn nhiều thì phải tiến hành thêm một lần lặp lại.

d) Liệu pháp gen chữa bệnh rối loạn chuyển hoá ion Chlo

– Đột biến gen trên NST (autosom) số 7 ở người gây rối loạn chuyển hoá các ion Cl^- làm xuất hiện bệnh xơ nang CF (Cystic fibrosis). Bệnh xơ nang (CF) biểu hiện là chứng viêm phổi, viêm tuỵ, viêm gan... làm giảm sút sức khoẻ rồi dẫn đến tử vong. Bệnh xơ nang do một loại protein màng tế bào (CFTR) mất chức năng, không đưa các ion Cl^- thừa ra khỏi tế bào, làm mất cân bằng ion và nước trong tế bào, từ đó gây nên biểu hiện thành một lớp dịch nhày, đặc ở các mô, tế bào của người bệnh.

– Bệnh xơ nang do đột biến gen CF: Có 400 đột biến khác nhau trên gen CF trong đó chủ yếu là đột biến làm mất 3 cặp nucleotit ở exon số 10 của gen CF. Đột biến này làm cho protein CFTR (cytic fibrosis transmembrane regulator) mất chức năng bảo đảm cân bằng các ion Na^+ và ion Cl^- ở bên trong và ngoài màng tế bào, gây tích tụ quá mức ion Cl^-, gây độc cho tế bào, kèm theo là các bệnh lý khác.

– Liệu pháp gen chữa bệnh xơ nang là tổng hợp cADN từ mARN của gen CF bình thường. Dùng vector liệu pháp đưa gen liệu pháp cADN vào người bệnh. Nhiều bệnh nhân xơ nang đã được điều trị bằng cách này. Các vector liệu pháp thường dùng để điều trị bệnh xơ nang là vector adenovirus, AAV, vector retrovirus, vector lentivirus, hoặc liposom v.v...

e) Liệu pháp gen chữa bệnh HIV/AIDS

Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS) do virus HIV (human immuno deficiency virus) gây nên và là bệnh đại dịch thế kỷ, gây tử vong lớn.

Virus HIV gồm có 2 typ chính là HIV typ I chiếm 98% và HIV typ II chiếm khoảng 2%.

Hệ gen của HIV có kích thước khoảng 10kb bao gồm 9 gen chính: gag, pol, env, vif, tat, npu, nef, vpv và rev. Sau khi xâm nhiễm vào tế bào người, hệ gen của HIV gắn và hoà nhập vào hệ gen của người tạo nên dạng tiền HIV (provirus) ở vô số tế bào lympho T và các tế bào có thẩm quyền miễn dịch khác, gây suy giảm miễn dịch ở người mắc phải. Trong những điều kiện nhất định, dạng tiền virus HIV có thể tạo ra virus HIV mới, xâm nhiễm vào nhiều tế bào khác như tế bào lympho B, đại thực bào, bạch cầu, tế bào thần kinh v.v... gây suy giảm nhanh chóng hệ miễn dịch của người. Từ đó biểu hiện các triệu chứng bệnh AIDS theo các nguồn bệnh nhiễm trùng khác nhau.

Trong nhiều năm qua, các nhà khoa học đã nghiên cứu thí nghiệm nhiều biện pháp phòng chống và điều trị HIV/AIDS. Để hạn chế nhiễm HIV và đại dịch AIDS trên toàn thế giới, người ta đã nghiên cứu điều chế nhiều loại kháng sinh và biệt dược như: starudine, lamirudine, azathioprin (AZT) antiretrovir (ARV) v.v... nhất là ARN kháng virus để góp phần điều trị HIV/AIDS, kéo dài sự sống cho những người nhiễm HIV. Có nhiều loại thuốc điều trị HIV/AIDS nhưng hiệu quả kém do HIV đã có các đột biến thích ứng. Hướng mới trong điều trị AIDS là sử dụng liệu pháp gen. Xu hướng chủ yếu của liệu pháp gen trong điều trị nhiễm HIV/AIDS là:

+ Chuyển các gen liệu pháp nhằm hạn chế khả năng xâm nhiễm và nhân bản của HIV.

+ Kích thích các gen của cơ thể để tăng cường miễn dịch chống sự phát triển của HIV.

+ Sử dụng các gen tự tử (ced) đã biến đổi làm cho các tế bào đã nhiễm HIV tự chết.

+ Tạo vacxin phòng chống nhiễm HIV bằng công nghệ di truyền.

– Một số liệu pháp gen trong điều trị HIV/AIDS là:

+ Phòng chống HIV/AIDS bằng cách ức chế hoạt động của gen của HIV, hoặc làm biến đổi gen của HIV:

Theo hướng liệu pháp này là thiết kế vector mang gen liệu pháp đưa vào tế bào, cơ thể người bị nhiễm HIV nhằm phục hồi hệ thống miễn dịch nhưng lại không gây phản ứng phụ bất lợi cho người bệnh. Các vector liệu pháp sử dụng để phòng chống HIV/AIDS là adenovirus, AAV, oligonucleotit, liposom v.v... Vector AAV được gắn một gen liệu pháp nhằm hạn chế sự sao chép, nhân bản của HIV. Vector adenovirus có gắn 2 gen của HIV đã bị biến đổi như gen gag, tpa và một số gen của adenovirus đã bị biến đổi là gen Ad5 tạo ra vector Ad5Flgag, hoặc vector Ad5tpagag. Khi đưa các vector này vào tế bào lây nhiễm HIV thì khả năng lây nhiễm HIV giảm đi. Hy vọng sẽ có ứng dụng trên người. Một số vector khác như pCMVA9 (gen virus HIV1 cắt bớt một số gen, cài thêm promotor hCMV và tín hiệu đóng gói SD), hoặc vector HIV chuyển dịch (mang gen GA, RRE và promotor hCMV) đã góp phần ngăn cản sự sao chép, nhân bản của HIV.

Bên cạnh đó còn một số vector liệu pháp khác như: các oligo-antisens, ribozym... đang được thử nghiệm nhằm hạn chế sự xâm nhiễm, hạn chế khả năng sao chép, nhân bản của HIV.

– Phòng chống HIV/AIDS bằng tăng cường miễn dịch tế bào:

Theo hướng này, người ta sử dụng các gen đột biến Rev10, gen tăng cường hoạt động của gen cytokin, hoặc sử dụng các gen tự tử và gen độc tố (toxic gene).

Sử dụng vector oligonucleotit mang gen Rev10 chuyển vào tế bào lympho TCD_4 đã kìm hãm được sự xâm nhiễm của HIV. Cũng có thể sử dụng liệu pháp gen tăng cường hoạt động của các gen cytokin tổng hợp các protein đáp ứng miễn dịch. Cytokin có nhiều loại khác nhau, trong đó các interferon (IFNα, IFNβ và IFNγ) là quan trọng nhất. Interferon ngăn cản sự xâm nhiễm của các loại virus trong đó có HIV. Cytokin được tổng hợp chủ yếu từ tế bào lympho T, trong đó có nhóm interleukin (IL1, IL2...

IL13) mà chủ yếu là interleukin IL2 có tác dụng kích thích tăng sinh của tế bào lympho TCD_4, đồng thời khống chế sự sao chép, nhân bản của HIV.

Sử dụng các gen tự tử (ced) và gen độc tố đưa vào tế bào mới bị xâm nhiễm HIV cũng là liệu pháp gen để phòng chống HIV. Gen tự tử đưa vào tế bào bị HIV xâm nhiễm làm ức chế hoạt động của enzym sao chép ADN polymerase trong tế bào, làm cho sự sao chép ADN của tế bào bị gián đoạn, tế bào co lại và chết. Do vậy HIV không có khả năng lây nhiễm sang tế bào thường khác. Việc sử dụng gen độc tố mới chỉ có những thử nghiệm ban đầu chưa có kết quả đáng kể.

f) Liệu pháp gen chữa các bệnh khác

Nhiều loại bệnh khác như bệnh teo cơ, bệnh máu khó đông, bệnh rối loạn chuyển hoá choresterol v.v... cũng đã được thử nghiệm điều trị bằng liệu pháp gen.

– Bệnh teo cơ DMD do đột biến lặn của gen dystrophin nằm trên NST X gây nên. Khi gen bị đột biến, làm cho các protein dystrophin biến dạng, gây liệt hệ cơ vận động, cơ trơn và gây bệnh cho người.

Liệu pháp gen chữa bệnh teo cơ là sử dụng vector mang cADN dystrophin bình thường đưa vào cơ thể bệnh nhân, nhằm thay thế gen dystrophin bị đột biến. Việc đưa gen cADN dystrophin bình thường có thể bằng cách vi tiêm, gen này khi đã được bao gói trong các liposom, hoặc dùng vector retrovirus để đưa gen vào động vật như chuột, sau đó là đưa vào người. Tuy nhiên, hiệu quả chưa cao.

– Liệu pháp gen chữa bệnh máu khó đông (hemophilia) cũng đã được thử nghiệm. Bệnh máu khó đông liên quan đến việc rối loạn chức năng gen mã hoá cho protein đặc hiệu FVIII và protein đặc hiệu FIX. Khi gen đột biến làm cho protein FVIII và FIX mất chức năng, làm giảm yếu tố đông máu gây nên bệnh máu khó đông. Liệu pháp gen chữa bệnh này là sử dụng các vector liệu pháp mang gen FVIII cADN, hoặc gen FIX cADN bình thường vào động vật, làm tăng khả năng đông máu. Từ đó hy vọng liệu pháp này có thể ứng dụng cho người.

6.2.2.6. Vấn đề an toàn và triển vọng của liệu pháp gen

a) Vấn đề về an toàn của liệu pháp gen

Vấn đề an toàn sinh học khi tạo ra sinh vật biến đổi gen cũng đã được đề cập ở chương trước. Liệu pháp gen là trường hợp đặc biệt của chuyển gen liên quan trực tiếp đến tính mạng của con người. Do đó phải đặc biệt quan tâm đến mức độ an toàn. Trong liệu pháp gen ở người, phải tuân thủ nghiêm ngặt các quy định của Quốc tế, Quốc gia để giảm thiểu rủi ro. Các rủi ro trong liệu pháp gen là việc gắn sai vị trí, gây đột biến gen, hoặc gen liệu pháp biểu hiện không như mong đợi; mặt khác, một số loại vector liệu pháp khi đưa vào cơ thể người như adenovirus, retrovirus v.v... có thể biến đổi trở thành tác nhân gây bệnh và sự hiểu biết về cơ chế gây bệnh của một số gen đột biến còn chưa đầy đủ. Kỹ thuật sử dụng trong liệu pháp gen phức tạp, đòi hỏi chính xác mà chỉ một số phòng thí nghiệm tiên tiến mới thực hiện được. Do vậy liệu pháp gen trong điều trị, chữa bệnh còn phải nghiên cứu và cải tiến hơn nữa thì mới có hiệu quả.

b) Triển vọng của liệu pháp gen ở Việt Nam

Trên Thế giới, liệu pháp gen đã được nhiều nước tiên tiến thực hiện và đã điều trị cho nhiều bệnh nhân. Một số bệnh hiểm nghèo như bệnh suy giảm miễn dịch tổ hợp trầm trọng (ADA SCID), điều trị ung thư. Trong tương lai là điều trị bệnh thiếu máu hình liềm, bệnh xơ nang và hạn chế bệnh HIV/AIDS. Ở Việt Nam hiện đã có một số nghiên cứu điều trị ung thư bằng liệu pháp miễn dịch như nghiên cứu và sản xuất interferon, interleukin (IL2) để điều trị ung thư. Mặt khác, một số cơ sở nghiên cứu đã sản xuất được vacxin viêm gan tái tổ hợp để phòng chống bệnh viêm gan. Hy vọng rằng, trong một tương lai không xa, liệu pháp gen trong chữa bệnh cho người sẽ được thực hiện và phát triển từng bước ở nước ta.

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. Lê Trần Bình (đồng tác giả), 1997. *Công nghệ sinh học trong cải tiến giống cây trồng*. Nxb Nông nghiệp.

2. Phạm Thành Hổ, 2005. *Nhập môn Công nghệ Sinh học*. Nxb Giáo dục.

3. Lê Đình Lương, Quyền Đình Thi, 2003. *Kỹ thuật di truyền và ứng dụng*. Nxb. ĐHQG Hà Nội.

4. Khuất Hữu Thanh, 2005. *Cơ sở phân tử và kỹ thuật gen*. Nxb KH&KT.

5. Khuất Hữu Thanh, 2005. *Liệu pháp gen - Nguyên lý và ứng dụng*. Nxb KH&KT.

6. Nguyên Quang Thạch (đồng tác giả), 2004. *Giáo trình Công nghệ Sinh học nông nghiệp*. ĐH Nông nghiệp.

7. Vũ Văn Vụ (đồng tác giả), 2005. *Công nghệ Sinh học tế bào*. Nxb. Giáo dục.

8. L.A. Babiuk, J.P. Phillip, M.Moo-young, 1989. *Animal Biotechnology*. Pergamon Press.

9. B.R. Grick, Pasternak J.J. , 2003. *Molecular Biology*. ASM Press, Washington.

10. D.L. Kelly, 1998. *Biotechnology. Vol8. Biotransformation.* Weinheim.

11. N.R. Lemoine, 2000. *Understanding Gene Therapy*. BIOS. Sci. Pub. UK.

12. S. Manlik, S.D. Patel, 1997. *Molecular Biotechnology*. Willey Liss Inc.

13. S.t. Nicholl, 1998. *An Introduction to Genetics Engineering*. Cambridge Uni. Press.

14. G. Roch, 1996. *Biotechnology - Vol6. Product of Primary Metabolism*. Weinheim.

15. P.F. Weaver, 1999. *Molecular Biology*. WCB. McGraw-Hill Press, NewYork.

Chịu trách nhiệm xuất bản:
Chủ tịch HĐQT kiêm Tổng Giám đốc NGÔ TRẦN ÁI
Phó Tổng Giám đốc kiêm Tổng biên tập NGUYỄN QUÝ THAO
Tổ chức bản thảo và chịu trách nhiệm nội dung:
Chủ tịch HĐQT kiêm Giám đốc Công ty cổ phần Sách ĐH-DN
TRẦN NHẬT TÂN

Biên tập và sửa bản in:
NGUYỄN HỒNG ÁNH
Trình bày bìa:
HOÀNG MẠNH DỨA
Chế bản:
ĐINH XUÂN DŨNG

CÔNG NGHỆ SINH HỌC
Tập bốn: Công nghệ di truyền
Mã số : 7K664M6–DAI

In 1000 bản khổ 19cm x 27cm Tại Công ty In - Thương mại TTXVN
Giấy phép xuất bản số: 10 - 2006/CXB/162-2018/GD
Do cục xuất bản cấp , In xong và nộp lưu chiểu tháng 9 - 2006

TÌM ĐỌC SÁCH THAM KHẢO
CỦA NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

1. Đất ngập nước	GS. Lê Văn Khoa
2. Động vật học có xương sống	GS. TS. Lê Vũ Khôi
3. Sinh thái học côn trùng	PGS. TS. Phạm Bình Quyền
4. Cơ sở hoá sinh	PGS. TS. Trịnh Lê Hùng
5. Tài nguyên nước Việt Nam	Nguyễn Thanh Sơn
6. Virut học	PGS. TS. Phạm Văn Ty
7. Bộ sách về công nghệ sinh học	
Tập một : Sinh học phân tử và tế bào - Cơ sở khoa học của công nghệ sinh học	PGS. TS. Nguyễn Như Hiền
Tập hai : Công nghệ tế bào động vật và thực vật	GS. TS. Vũ Văn Vụ PGS. TS. Nguyễn Mộng Hùng
Tập ba : Enzym và ứng dụng	GS. TSKH. Phạm Thị Trân Châu PGS. TS. Phan Tuấn Nghĩa
Tập bốn : Công nghệ di truyền	TS. Trịnh Đình Đạt
Tập năm : Công nghệ sinh học vi sinh và công nghệ môi trường	PGS. TS. Phạm Văn Ty TS. Vũ Nguyên Thành
8. Cơ sở lý thuyết và kỹ thuật sản xuất thực phẩm	TS. Nguyễn Xuân Phương TSKH. Nguyễn Văn Thoa
9. Di truyền học	Đỗ Lê Thăng
10. Sinh học tế bào	PGS. TS. Nguyễn Như Hiền
11. Sinh học phân tử tế bào và ứng dụng	TS. Võ Thị Thương Lan

Bạn đọc có thể tìm mua tại các Công ty Sách và Thiết bị trường học ở địa phương hoặc các cửa hàng sách của Nhà xuất bản Giáo dục :
25 Hàn Thuyên, 187B Giảng Võ, 23 Tràng Tiền - Hà Nội
15 Nguyễn Chí Thanh - TP. Đà Nẵng
240 Trần Bình Trọng, Quận 5 - TP. Hồ Chí Minh

Giá: 24.500 đ

công nghệ sinh học t4
8 934980 693070