

TS. LÊ THANH HOÀ - GS.TSKH ĐÁI DUY BAN



CÔNG NGHỆ SINH HỌC ĐỐI VỚI

cây trồng vật nuôi & bảo vệ môi trường

Quyển II



NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP

TS. LÊ THANH HOÀ - GS.TSKH ĐÁI DUY BAN

CÔNG NGHỆ SINH HỌC ĐỐI VỚI
cây trồng vật nuôi &
bảo vệ môi trường
(Sách chuyên khảo)
QUYỂN HAI

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
HÀ NỘI - 2002

LỜI NHÀ XUẤT BẢN

Khoa học kỹ thuật từ lâu đã được xác định là một lực lượng sản xuất quan trọng. Nhờ kỹ thuật tiến bộ mà sản xuất phát triển, cuộc sống của loài người không ngừng được cải thiện và nâng cao. Trong sản xuất nông nghiệp, nhờ ứng dụng khoa học kỹ thuật, nhất là ứng dụng công nghệ sinh học trong lai tạo giống cây trồng, vật nuôi, trong sản xuất phân bón, vaccin phòng bệnh, thức ăn gia súc, thuốc trừ sâu, xử lý chất thải bảo vệ môi trường. Đặc biệt trong lai tạo giống cây trồng, vật nuôi, việc ứng dụng công nghệ sinh học vài thập kỷ qua đã tạo ra sự thay đổi lớn từ thời đại giống lai (theo phương pháp di truyền Mendel, đại phân tử) sang thời đại dùng giống theo phương pháp di truyền phân tử (gọi tắt là giống công nghệ sinh học). Nhờ công nghệ sinh học phân tử, con người đã tiến từ cuộc “cách mạng xanh” sang cuộc “cách mạng gen ADN”.

Nhằm góp phần giúp bạn đọc hiểu thêm về nguyên lý và phương pháp thao tác gen trong lai tạo giống cây trồng, sản xuất thức ăn gia súc, vaccin phòng bệnh, thuốc trừ sâu và bảo vệ môi trường cũng như một số thành quả của ứng dụng công nghệ sinh học trong đời sống, Nhà xuất bản Nông nghiệp cho xuất bản tiếp quyển II “Công nghệ sinh học đối với cây trồng vật nuôi và bảo vệ môi trường”. Sách chuyên khảo do Tiến sĩ Lê Thanh Hoà và Giáo sư Tiến sĩ khoa học Đái Duy Ban đồng chủ biên.

Hy vọng cuốn sách sẽ giúp ích bạn đọc tiếp cận những vấn đề kỹ thuật mới ứng dụng trong nông nghiệp và khai thác tài nguyên bảo vệ môi sinh.

Trân trọng giới thiệu cùng bạn đọc và mong nhận được nhiều ý kiến đóng góp bổ sung của các bạn.

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP

GIỚI THIỆU VACCIN VÀ MIỄN DỊCH

TS Lê Thanh Hoà ()*

I. Khái niệm về vaccin và miễn dịch nói chung

1.1. Khái niệm chung

1.2. Các tiêu chuẩn vaccin và quá trình đáp ứng miễn dịch

II. Hướng chiến lược tạo vaccin và phân loại vaccin

2.1. Nhóm vaccin cung cấp kháng nguyên sống được nhân lên

2.1.1. Vaccin sống vô độc

2.1.2. Vaccin sống nguyên độc

2.1.3. Vaccin sống nhược độc

Vaccin nhược độc được tạo ra qua tác dụng lí-hoá

Vaccin nhược độc tạo ra bằng phương pháp tiếp truyền cổ điển

Vaccin axit nucleic

2.2. Nhóm vaccin có nguồn kháng nguyên không nhân lên

2.2.1. Vaccin vô hoạt

2.2.2. Vaccin chứa protein kháng nguyên tinh chế

2.2.3. Vaccin chứa kháng nguyên là protein được sản xuất bằng công nghệ gen

2.2.4. Vaccin tổng hợp

* *

*

Những tiến bộ về khoa học và kỹ thuật trong lĩnh vực vi sinh vật học, miễn dịch học, và sinh hoá protein nói chung, cũng như trong lĩnh vực kỹ thuật gen và công nghệ sinh học nói riêng đã cho

(*)Viện Công nghệ Sinh học.

phép chúng ta tiến xa hơn, đi sâu hơn, và ứng dụng có hiệu quả hơn những thành tựu đó trong nhiều ngành công nghệ mới, trong đó có công nghệ sản xuất và ứng dụng vaccin. Một trong những hướng mới đó là hướng nghiên cứu và ứng dụng công nghệ sinh học phân tử để thử nghiệm, sản xuất và nghiên cứu các loại hình vaccin mới: vaccin bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen, hay nói cách khác, vaccin bằng công nghệ gen. Những vaccin tạo ra bằng các phương pháp này được gọi là vaccin thuộc thế hệ mới, nhằm phân biệt với các loại vaccin trước đây được tạo ra bằng các phương pháp cổ điển.

Nhiều loại vaccin thế hệ mới đã và đang thực sự được đưa vào sử dụng có hiệu quả, góp phần to lớn trong công cuộc phòng chống bệnh tật cho động vật và người. Trong phần viết này chúng tôi xin giới thiệu 2 phần chính:

1. Khái niệm về các loại vaccin và miễn dịch nói chung
2. Hướng chiến lược tạo vaccin và phân loại vaccin

I. KHÁI NIỆM VỀ VACCIN VÀ MIỄN DỊCH NÓI CHUNG

Vaccin, dù ở bất kì dạng tồn tại nào, cho dù đó là vaccin nguyên thể, tức là vaccin chứa nguyên vẹn cả tế bào vi sinh vật (vi khuẩn hay virus chẳng hạn), hay vaccin phân tử, tức là vaccin đơn thuần chỉ chứa những thành phần protein có tính kích thích miễn dịch, đều mang một chức năng chung là tạo miễn dịch cho cơ thể người và động vật, phòng chống lại các bệnh truyền nhiễm và nhiều tác nhân gây hại khác.

Trong vòng 100 năm nay, vaccin đã góp phần có tính chất quyết định trong việc đẩy lùi và ngăn chặn nhiều loại bệnh nguy

hiếm, dần dần thanh toán một cách hoàn toàn một số bệnh, ví dụ như bệnh đậu mùa, do virus đậu gây ra, vốn là nỗi kinh hoàng trên thế giới trong vài thế kỷ gần đây. Vaccin được sử dụng trong mọi lĩnh vực nhân y và thú y, cho mọi lứa tuổi con người và động vật nuôi, chống lại hầu hết nhiều loại bệnh mà con người và động vật mắc phải. Vaccin được nghiên cứu tạo ra và được sản xuất bằng các nguyên lí khác nhau, cũng như được sử dụng theo nhiều phương thức khác nhau. Việc cải tạo các loại vaccin hiện có, khám phá tạo nên các loại vaccin mới, đang là mục tiêu phấn đấu của các nhà khoa học. Vaccin thế hệ mới bằng công nghệ gen ra đời (gọi vắn tắt là vaccin CNG), đó chính là hệ quả của sự nỗ lực bền bỉ của các nhà khoa học.

1.1. Khái niệm chung

Nói đến vaccin, phải nói đến *yếu tố quyết định tính miễn dịch* của chế phẩm được chọn làm vaccin đó. Yếu tố quyết định tính miễn dịch chính là thành phần protein đặc biệt có trên bề mặt của tác nhân gây bệnh, hay trên bề mặt của chế phẩm vaccin của chính tác nhân gây bệnh đó. Thành phần đặc biệt có bản chất là protein này được gọi là **kháng nguyên** (antigen), do một gen hay một số gen của vi sinh vật quyết định tổng hợp nên. Những gen chịu trách nhiệm về việc sản xuất thành phần protein có tính kích thích miễn dịch được gọi là gen kháng nguyên. Về nguyên lí, khi gen kháng nguyên được tách ra, và ghép vào một hệ thống vector thích ứng nào đó, thì gen này sẽ hoạt động như khi đang tồn tại trong hệ gen của vi sinh vật chủ, và sản phẩm protein của gen này cũng có thể có chức năng như cũ, tức là có thể có tính kích thích miễn dịch. Tuy nhiên, trong thực tế, hệ thống tiếp nhận gen kháng nguyên và tế bào chủ sử dụng để biểu thị sản xuất protein của gen kháng nguyên đó phải được lựa chọn phù hợp, mới có thể thu được

protein có tính kích thích miễn dịch như protein nguyên gốc. Rất nhiều trường hợp, protein thu nhận được không có tính kích thích miễn dịch như mong muốn, do cấu trúc 3 chiều của nó bị thay đổi trong quá trình sản xuất, do đó chế phẩm này không được gọi là vaccin theo đúng nghĩa như ý muốn ban đầu. Protein tái tổ hợp này vẫn có thể có tính kháng nguyên và miễn dịch, nhưng không còn là vaccin chống lại tác nhân gây bệnh cần phòng trừ.

Như vậy, tính kích thích miễn dịch là do thành phần protein đặc biệt có trên bề mặt kháng nguyên đảm nhiệm, và protein này do gen kháng nguyên chịu trách nhiệm sản xuất. Gen này được chọn lựa để sử dụng với mục đích làm vaccin CNG. Chúng được phân lập khỏi hệ gen vi sinh vật chủ, được thiết kế thêm các thành phần quan trọng khác và sản phẩm thu được của chúng được dùng làm vaccin. Những vaccin được tạo ra bằng kỹ thuật gen như thế này, được gọi là vaccin tái tổ hợp gen, hay vắn tắt là vaccin CNG. Thành phẩm vaccin thuộc loại này được coi là vaccin thuộc thế hệ mới.

Dù thế nào chăng nữa, vaccin cổ điển hay vaccin thế hệ mới (đại diện là vaccin CNG), nếu được định nghĩa về góc độ miễn dịch, thì vaccin phải là các chế phẩm sinh học của vi sinh vật hay tế bào, chứa chính tác nhân gây bệnh hay các sản phẩm của chúng (kể cả vật liệu di truyền như ADN hay ARN của chúng), nếu được làm giảm độc lực hay vô độc bằng các phương pháp lí, hoá, hay sinh học (đối với vaccin cổ điển), hoặc các phương pháp sinh học phân tử (đối với vaccin thế hệ mới), lúc đó chúng không còn khả năng gây bệnh đối với đối tượng được hưởng vaccin (là người và động vật), nhưng khi đưa vào cơ thể bằng các phương pháp khác nhau, đều có khả năng kích thích cơ thể sinh miễn dịch thuộc các loại hình như *miễn dịch dịch thể* (humoral immunity) hay *miễn*

dịch qua trung gian tế bào (cellular-mediated immunity). Cơ thể chịu sự kích thích của kháng nguyên, đã cảm ứng sản xuất một loại protein mới có chức năng bảo vệ và là thành phần tham gia tạo nên miễn dịch cho cơ thể, gọi là **kháng thể** (antibody). Trong miễn dịch thuộc loại hình dịch thể, loại protein này hoà tan vào trong hệ tuần hoàn hay trong dịch thể của cơ thể, nên chúng có tên gọi là **kháng thể dịch thể**. Tương tự như vậy, trong cơ thể có miễn dịch trung gian tế bào, thì kháng thể không phải là chất hoà tan, mà là chính các tế bào của hệ miễn dịch cảm ứng kháng nguyên mà thành, cho nên kháng thể loại này được gọi là **kháng thể tế bào**, chúng không phải là chất hoà tan mà là thành phần hữu hình. Cơ chế tạo miễn dịch cũng như loại trừ kháng nguyên của kháng thể tế bào của loại hình miễn dịch này rất khác loại hình miễn dịch dịch thể.

Sau khi tiếp nhận kháng nguyên, cơ thể có thể cảm ứng hình thành hoặc miễn dịch dịch thể, hoặc miễn dịch tế bào riêng biệt, hoặc cả hai loại hình miễn dịch cùng lúc. Với một cơ thể đã được miễn dịch, khi vi sinh vật gây bệnh thật sự xâm nhập vào, chúng sẽ không thực hiện được quá trình gây bệnh và nhanh chóng bị loại trừ khỏi cơ thể. Cơ chế loại trừ tác nhân gây bệnh và vô hiệu hoá quá trình sinh bệnh chính là sự kết hợp giữa các loại kháng thể với kháng nguyên mà cụ thể là giữa kháng thể dịch thể, hoặc kháng thể tế bào (do vaccin trước đó đã kích thích sinh ra và tồn tại trong cơ thể), với cái gọi là kháng nguyên luôn có trên bề mặt của tác nhân gây bệnh. Sự kết hợp kháng thể-kháng nguyên như thế này chính là cơ chế loại trừ tác nhân gây bệnh, bảo vệ cơ thể.

Như vậy vaccin là chế phẩm sinh học hoặc bán sinh học, được con người tạo ra và đưa vào cơ thể để gây miễn dịch, tập dượt cho cơ thể thực hiện quá trình đáp ứng miễn dịch chống lại tác nhân

gây bệnh, khi chúng thâm nhập vào những lần sau đó. Trong tự nhiên, khi người và động vật bị bệnh không chết mà qua khỏi, trong cơ thể cũng có thể hình thành miễn dịch. Một điều hết sức lưu ý về tính đặc hiệu của miễn dịch. Không phải vaccin nào cũng gây miễn dịch chung chống lại mọi tác nhân gây bệnh. Vaccin tạo ra có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh nào chỉ có tác dụng tạo kháng thể cho miễn dịch chống lại chính tác nhân gây bệnh đó.

1.2. Các tiêu chuẩn vaccin và quá trình đáp ứng miễn dịch

Một vaccin phải có đủ 3 tiêu chuẩn chính: *an toàn*, *vô trùng* và *có hiệu lực*. **An toàn** là tiêu chuẩn đánh giá khi sử dụng vaccin trên chính đối tượng được hưởng, tức là vaccin không được gây bệnh hay gây phản ứng có hại. **Vô trùng** tức là vaccin chỉ chứa duy nhất một hay một vài loại được chọn làm vaccin mà không bị nhiễm tạp các loại khác. Điều quan trọng nhất là vaccin phải có **hiệu lực**, tức là vaccin phải kích thích sinh miễn dịch cho cơ thể. Tính hiệu lực, thực chất là mức độ biểu hiện gây miễn dịch của kháng nguyên. Vaccin có hiệu lực cao hay thấp, tức là nói đến mức độ gây miễn dịch của vaccin đó. Do vậy trong chủng vi sinh vật làm vaccin nhược độc, điều cốt yếu là vaccin phải an toàn và có hiệu lực, nên gen “độc” tức là gen gây bệnh phải bị biến đổi hoặc bị xoá hoàn toàn để đảm bảo an toàn, nhưng gen kháng nguyên vẫn được tồn tại để sản xuất protein kháng nguyên kích thích miễn dịch.

Trong cơ thể đã tiếp nhận vaccin, miễn dịch được tạo ra chính là sự huy động toàn bộ *hệ thống miễn dịch* tham gia, bao gồm *hệ thống miễn dịch trung ương* và *hệ thống miễn dịch ngoại biên*, cũng như sự tham gia của nhiều loại *tế bào có thẩm quyền miễn*

dịch khác. Đó chính là sự phối hợp nhịp nhàng của hệ thống tủy xương nhằm tạo ra các loại tế bào nguồn, rồi từ đó chuyển hoá thành các tế bào có thẩm quyền miễn dịch bao gồm tế bào lymphô-B và lymphô-T, đại thực bào và một số tế bào chuyên biệt khác. Đáp ứng miễn dịch còn được hỗ trợ và tham gia của hạch, lách, các mô lymphô đường ruột, đường hô hấp, cũng như các tế bào tua (dendritic cells), các tế bào giới thiệu kháng nguyên (antigen presenting cells hay còn gọi là APC) và một số thành phần khác.

Cả hai quá trình miễn dịch mà cơ thể thu nhận được: miễn dịch dịch thể và miễn dịch trung gian tế bào, chính là hệ quả của sự tiếp nhận kháng nguyên, hoạt hoá, biệt hoá và sự tham gia của các tế bào lymphô-B và lymphô-T. Kháng thể dịch thể, thực chất bao gồm các loại globulin miễn dịch, lưu hành trong hệ tuần hoàn và các chất dịch cơ thể. Một loại khác, kháng thể tế bào, chính là loại tế bào có thẩm quyền miễn dịch lymphô-T đã được biến đổi, biệt hoá trở thành tế bào gây độc, có tác dụng tiêu diệt kháng nguyên. Ngoài ra một số tế bào có thẩm quyền miễn dịch khác, đặc biệt là lymphô-T, sau khi được biệt hoá, còn có khả năng sản xuất một số chất dịch ngoại bào, có tác dụng kích thích và điều hoà phản ứng miễn dịch, chúng được gọi là các lymphokin, đặc trưng là các loại cytokine (gồm các loại inter-leukine, như IL-1, IL-2...), và các yếu tố gây hoại tử tế bào. Chúng tham gia trợ giúp đắc lực và tăng cường quá trình đáp ứng miễn dịch.

Tóm lại vaccin là yếu tố khởi phát của quá trình đáp ứng miễn dịch, và kháng nguyên là thành phần cơ bản của vaccin. Kháng nguyên, như đã giới thiệu, đó cũng chính là thành phần bề mặt của tác nhân gây bệnh. Để tạo được miễn dịch, kháng nguyên phải có những đặc tính và phù hợp với những điều kiện cơ bản.

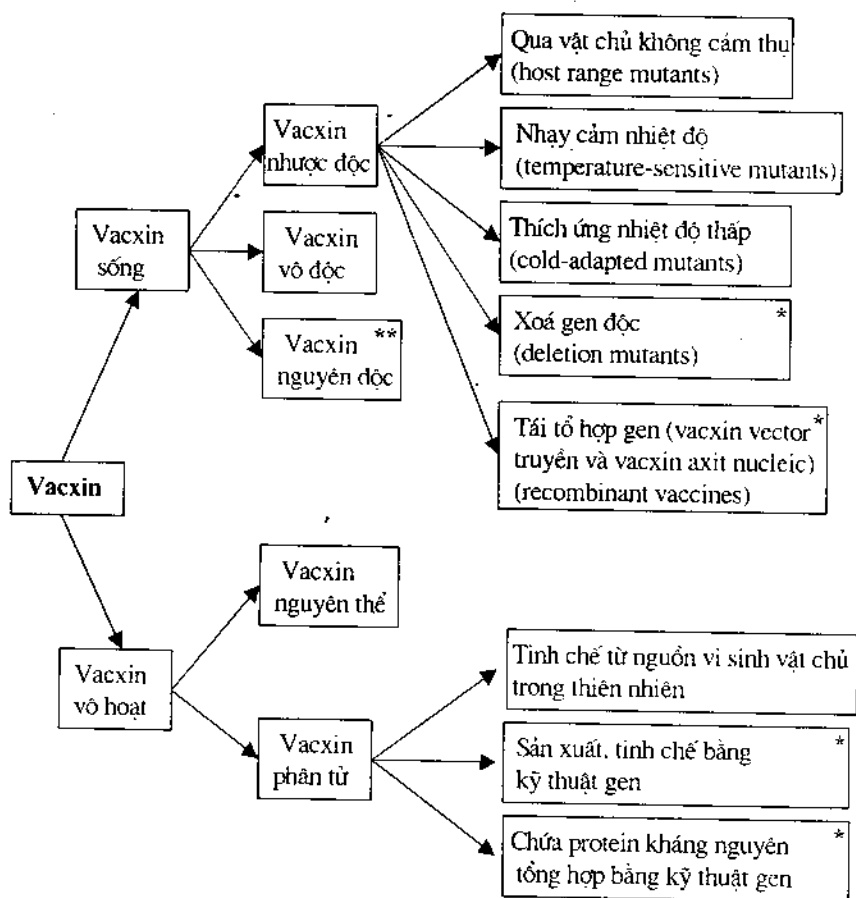
Trước hết, kháng nguyên phải là “chất lạ” đối với cơ thể, theo đúng nghĩa của nó. Kháng nguyên có thể là một protein hoàn toàn, hoặc chỉ là một polypeptit nhỏ chứa nhóm hoạt động gồm 10-12 axit amin có hoạt tính kháng nguyên, hoặc là một nguồn gen tạo sản phẩm kháng nguyên ngay tại cơ thể đối tượng được hưởng vaccin. Bằng cơ chế đặc biệt nào đó chưa được khám phá, cơ thể đã phân biệt được đâu là chất lạ để tạo miễn dịch chống lại, và đâu là thành phần cấu tạo của chính cơ thể, mà không tác động đến. Như vậy vaccin không là gì khác, mà phải là một chế phẩm có mang kháng nguyên hoặc vật liệu di truyền sản xuất kháng nguyên đó.

II. HƯỚNG CHIẾN LƯỢC TẠO VACCIN VÀ PHÂN LOẠI VACCIN

Có thể phân định 2 hướng chiến lược tạo nên vaccin: đó là vaccin tạo nên theo công nghệ cổ truyền, hay còn gọi là vaccin cổ điển (classical vaccine) và vaccin tạo nên bằng công nghệ sinh học phân tử, hay còn gọi là vaccin thế hệ mới: vaccin CNG (genetically engineered vaccine). Có thể nói vaccin cổ điển được tạo ra bằng cách gián tiếp, còn vaccin thế hệ mới được tạo ra bằng cách trực tiếp tác động vào hệ gen của đối tượng được chọn làm vaccin.

Về tính chất sinh học của vaccin, chúng ta có thể phân biệt 3 loại : vaccin vô hoạt (bằng các yếu tố lí, hoá), vaccin “sống” (bao gồm vaccin vô độc và nhược độc), và vaccin phân tử (bằng kỹ thuật gen). Hai loại đầu được tạo ra bằng công nghệ cổ truyền là chính; loại thứ 3, chỉ được tạo ra bằng kỹ thuật gen.

Về nguồn cung cấp kháng nguyên, xét dưới góc độ tạo miễn dịch cho cơ thể, vaccin có thể được gom vào một số nhóm sau đây (Hình 1):



Hình 1: Sơ đồ phân loại vaccin dựa vào nguyên lý sản xuất và hướng sử dụng các loại vaccin đó (Chi tiết xem trong bài). Ghi chú: Dấu 1 sao (*) giới thiệu loại hình vaccin mà trong quá trình tạo giống và sản xuất có sử dụng kỹ thuật gen. Dấu 2 sao (**) là loại vaccin cường độc với loài này nhưng được sử dụng như một loại vaccin vô độc cho loài khác.

2.1. Nhóm vaccin cung cấp kháng nguyên sống được nhân lên

Đây là nhóm vaccin chứa các loại vaccin “sống” theo đúng nghĩa của nó, nghĩa là chúng có khả năng nhân lên, tạo cho cơ thể nguồn kháng nguyên tồn tại lâu bền trong cơ thể. Chủ yếu có 2 loại vaccin chính: vaccin sống vô độc (live avirulent vaccine) và vaccin sống nhược độc (live attenuated vaccine).

2.1.1. Vaccin sống vô độc

Vaccin sống vô độc chính là các chủng vi sinh vật vô độc được chọn lọc từ trong quần thể vi sinh vật có trong tự nhiên. Chúng hoàn toàn không còn hay chỉ còn tính gây bệnh rất yếu đối với đối tượng được hưởng vaccin, nhưng vẫn có khả năng tạo miễn dịch rất tốt cho cơ thể. Thông thường vaccin vô độc được chọn từ những biến chủng của vi sinh vật cùng loài, cùng thích ứng với loài vật chủ. Chúng thường không gây bệnh đối với mọi lứa tuổi, hoặc gây bệnh rất yếu, hoặc chỉ gây bệnh nhẹ ở lứa tuổi này, mà không gây bệnh ở lứa tuổi khác, nên được coi là vô độc khi dùng làm vaccin cho động vật hoặc người ở lứa tuổi tương ứng. Rất nhiều loại vaccin sử dụng cho động vật được chọn lọc theo phương pháp này.

2.1.2. Vaccin sống nguyên độc

Tính vô độc như giới thiệu ở trên cần hiểu theo đúng nghĩa của đặc tính thích ứng và gây bệnh của loại vi sinh vật được chọn làm vaccin đối với đối tượng được hưởng vaccin. Một loại hình vaccin khác được chọn lọc và sử dụng khá lâu đời, tạm gọi là vaccin “nguyên độc”, và có độc lực với loài này nhưng an toàn hơn đối với loài khác. Thực chất chúng được xếp là vaccin “vô độc” đối với loài là đối tượng được hưởng vaccin, vì chúng được phân lập từ loài khác và hoàn toàn không hay có tính gây bệnh rất

yếu. Tuy nhiên, đối với loài thích ứng mà chủng vi sinh vật được phân lập để làm vaccin, thì chúng vẫn giữ nguyên tính cường độc, có nghĩa là có tính gây bệnh rất cao. Ví dụ điển hình nhất là vaccin đậu mùa dùng cho người. Đó là chủng virus gây bệnh đậu của bò (vaccinia virus) được chọn lọc để làm vaccin chống lại bệnh đậu mùa ở người. Mặc dù là virus cường độc gây bệnh ở bò, nhưng đối với người, virus này tạo nên miễn dịch rất mạnh và bền vững, tuy nhiên cũng có thể có những phản ứng nhẹ khi dùng vaccin. Cũng nhờ sử dụng vaccin này một cách bền bỉ trong suốt vài thế kỷ qua, mà ngày nay bệnh đậu mùa đã hoàn toàn được thanh toán trên trái đất.

2.1.3. Vaccin sống nhược độc

Thuộc loại hình vaccin này là tất cả các loại, mà thực chất bản thân chúng vẫn có khả năng thích ứng và nhân lên trên đối tượng hưởng vaccin, cung cấp nguồn kháng nguyên lâu dài và tạo miễn dịch vững bền cho cơ thể. Trước đó, khi lựa chọn làm vaccin, chúng vẫn chính là những vi sinh vật gây bệnh, nhưng qua một quá trình lâu dài bị tác động của công nghệ tạo vaccin theo lối cổ truyền hay bằng kỹ thuật gen, nên tính cường độc (tức là mức độ biểu hiện khả năng gây bệnh) của chúng bị giảm sút hoặc mất hẳn, và trở nên yếu, đủ điều kiện để làm vaccin. Người ta gọi chúng là vaccin nhược độc. Quá trình này được gọi là nhược độc hoá (attenuation). Có thể liệt kê ở đây một số loại vaccin tạo ra theo các phương pháp lí, hoá và sinh học, kể cả bằng phương pháp sinh học phân tử, như đã giới thiệu ở Hình 1. Phương pháp tạo vaccin nhược độc theo lối cổ truyền là dùng tác động nhiệt độ (nóng hay lạnh) hoặc nuôi cấy trong môi trường không thích hợp qua nhiều đời để làm yếu tính gây bệnh của chủng vi sinh vật làm vaccin.

Ngày nay, vaccin nhược độc còn được tạo ra bằng các phương pháp hiện đại có sự can thiệp của kĩ thuật gen.

Vaccin nhược độc được tạo ra qua tác dụng lí-hoá

Từ xa xưa có nhiều loại vaccin được tạo ra bằng cách dùng các hoá chất để xử lí. Những vaccin này tuy có thể là nhược độc, nhưng không đảm bảo tính an toàn khi sử dụng, do vậy ngày nay đã không còn dùng nữa.

Vaccin vẫn còn được tạo ra và sử dụng là vaccin nhược độc bằng cách xử lí nhiệt độ. Đó là việc chọn lựa và xử lí những chủng nhạy cảm với nhiệt độ (temperature-sensitive mutants). Các chủng này không hoặc khó tìm thấy điều kiện thích hợp ở các điều kiện nhiệt độ bất thường, và do vậy, sau khi thích ứng, chúng mất khả năng gây bệnh mà vẫn còn giữ tính kích thích miễn dịch.

Một hướng khác là làm thích ứng một số chủng gây bệnh ở điều kiện nuôi cấy liên tục với nhiệt độ thấp (25°C) để tạo vaccin. Vaccin loại này được gọi là vaccin thích ứng điều kiện lạnh (cold-adapted mutants).

Vaccin nhược độc tạo ra bằng phương pháp tiếp truyền cổ điển

Cổ truyền nhất và là phương pháp tạo vaccin có hiệu quả nhất cho đến ngày nay là phương pháp tiếp truyền chủng vi sinh vật chọn làm vaccin qua môi trường không hoặc ít cảm thụ, như tiếp truyền qua môi trường tế bào, qua trứng có phôi hay ngay trên động vật không hoặc ít cảm thụ. Người ta gọi quá trình tạo vaccin như thế là phương pháp tiếp truyền cổ điển và vaccin được gọi là vaccin sống nhược độc cổ điển.

Quá trình tiếp truyền như thế được thực hiện thông thường là từ hàng chục đến hàng trăm đời liên tục trong môi trường không

hoặc ít cảm thụ, nghĩa là môi trường đã không cung cấp điều kiện tối ưu để thực hiện đầy đủ chu kỳ sống của chúng, do vậy vì sinh vật phải có sự biến đổi để thích ứng. Chính trong quá trình biến đổi thích ứng đó, đã có sự thay đổi nhất định trong hệ gen của chúng để biểu hiện tính gây bệnh, và đối với vật chủ mới sự thích ứng gây bệnh ngày càng mạnh dần lên và chính tính gây bệnh thích ứng trên đối tượng mới đã tạo nên bệnh lí đặc trưng, mà qua đó các nhà sản xuất vaccin lấy làm tiêu chuẩn để đánh giá trong quá trình sản xuất vaccin sau này.

Vaccin sống, tái tổ hợp có vectơ dẫn truyền

Đó là loại vaccin có 2 thành phần chính: một thành phần là đoạn ADN chứa gen kháng nguyên đưa từ bên ngoài vào và một thành phần khác là bản thân hệ gen của vectơ. Hệ gen của vectơ làm nhiệm vụ tiếp nhận và biểu thị gen của gen kháng nguyên trong những điều kiện thuận lợi (xem phần sau).

Thông thường một vaccin sống, tái tổ hợp có vectơ dẫn truyền thường dựa trên hệ gen của một loại virus nào đó (cụ thể là virus Đậu hay virus Adeno) đã được cắt bỏ những gen độc và được ghép vào đó một hay vài gen kháng nguyên lấy từ những sinh vật khác. Khi gây nhiễm vào cơ thể, gen kháng nguyên này được dẫn truyền vào những loại tế bào thích ứng tạo điều kiện cho kháng nguyên được tổng hợp và đảm bảo nguồn kháng nguyên lâu bền gây miễn dịch cho cơ thể.

Vaccin axit nucleic

Chủ yếu là vaccin ADN đang được thử nghiệm. Một số ý niệm sử dụng ARN làm vaccin, nhưng do quá phức tạp nên hầu như không được chấp nhận. Thực chất vaccin ADN chính là sự sử dụng ADN của plasmid tái tổ hợp chứa gen kháng nguyên mà gen

kháng nguyên đó được lấy từ một vi sinh vật nào đó và được ghép vào vectơ dẫn truyền và biểu thị gen (là các loại plasmid) đã được thiết kế phù hợp. Plasmid tái tổ hợp gen kháng nguyên được chuyển nạp vào tế bào chủ thích ứng. Tế bào chủ tiếp nhận plasmid tái tổ hợp gen kháng nguyên được nuôi cấy và ADN của plasmid tái tổ hợp chứa gen kháng nguyên được tách chiết, tinh khiết và sử dụng như là một vaccin. Khi sử dụng làm vaccin, người ta chỉ pha loãng ADN của plasmid có chứa hệ thống gen kháng nguyên này và tiêm vào cơ thể. Bằng một cơ chế chưa được chứng minh cụ thể, ADN hỗn hợp này cảm ứng nhập gen vào tế bào cơ thể và nguồn gen kháng nguyên luôn luôn được sản xuất ra để tạo nên miễn dịch lâu bền cho cơ thể (xem giới thiệu ở phần sau).

2.2. Nhóm vaccin có nguồn kháng nguyên không nhân lên

Đó chính là các loại vaccin vô hoạt, vaccin chứa protein kháng nguyên tinh chế, vaccin chứa protein kháng nguyên sản xuất bằng công nghệ gen, hoặc vaccin chứa nhóm quyết định kháng nguyên tổng hợp nhân tạo.

2.2.1. Vaccin vô hoạt

Vaccin vô hoạt (inactivated vaccine) hay trước đây còn gọi là vaccin chết (killed vaccines), chính là chế phẩm chứa chính tác nhân gây bệnh nhưng đã bị vô hoạt (giết chết) bằng các phương pháp khác nhau, chủ yếu là lý học và hóa học. Sau khi bị vô hoạt trong các điều kiện thích ứng và trở thành vaccin, trên bề mặt của chúng vẫn còn giữ nguyên protein còn hoạt tính sinh học của kháng nguyên. Các nhóm axit amin vẫn giữ nguyên cấu trúc, và do vậy vẫn giữ nguyên tính kích thích sinh miễn dịch. Tính miễn dịch, tuy không lâu bền, vì nguồn kháng nguyên là cố định và ít

dẫn do không được nhân lên như trường hợp vaccin sống, nhưng một số vaccin vô hoạt vẫn có tác dụng nhất định đối với một số tác nhân gây bệnh.

2.2.2. Vaccin chứa protein kháng nguyên tinh chế

Một số vi sinh vật, trong quá trình nhân lên và gây bệnh có thải ra môi trường một số thành phần protein có thể thu nhận để làm kháng nguyên của vaccin, ví dụ như kháng nguyên bề mặt HBsAg (Hepatitis B surface antigen) của virus viêm gan B chẳng hạn. Các thành phần protein này được chất lọc từ đối tượng đang nhiễm bệnh do virus viêm gan B, được tinh chế và sử dụng như là một vaccin. Kỹ thuật sinh hóa protein cho phép chất lọc và tinh chế protein kháng nguyên với lượng lớn. Tuy nhiên, muốn sử dụng làm vaccin, cần thiết phải có những loại chất bổ trợ thích hợp, nếu không các loại enzym cắt protein sẽ dễ dàng phá huỷ chúng, trước khi chúng kích thích miễn dịch.

2.2.3. Vaccin chứa kháng nguyên là protein sản xuất bằng công nghệ gen

Cũng tương tự như trên, thành phần vaccin chính là protein kháng nguyên tinh chế, nhưng không phải từ nguồn cung cấp có trong tự nhiên, mà được sản xuất bằng công nghệ gen. Gen kháng nguyên của đối tượng được cắt ghép vào hệ thống vectơ thích hợp với một loại vi sinh vật dùng trong công nghệ gen, như vi khuẩn *E. coli*, nấm men *Saccharomyces* hay virus côn trùng (baculovirus chẳng hạn). Khi nuôi cấy loại vi sinh vật đã được tái tổ hợp gen kháng nguyên trong môi trường thích ứng, thì protein kháng nguyên được tổng hợp với lượng lớn. Kỹ thuật hóa sinh protein

cho phép dễ dàng sản xuất và tinh chế các loại protein này làm thành phần để sử dụng làm vaccin.

2.2.4. Vaccin tổng hợp

Vaccin tổng hợp (synthetic vaccine) là loại chỉ chứa duy nhất một đoạn ngắn polypeptit kháng nguyên hay còn gọi là *nhóm quyết định kháng nguyên*. Nhóm này có thành phần vào khoảng 8-12 axit amin, nằm ở nơi nào đó trên bề mặt protein kháng nguyên. Do vậy nhóm này còn được gọi là epitope, có vai trò quyết định tính kháng nguyên của một loại vaccin. Sau khi được tổng hợp, muốn làm vaccin, chúng phải được gắn vào các giá đỡ, đó là các hạt polyme có khả năng hấp phụ cao. Ngoài ra chúng còn được sử dụng với những loại chất bổ trợ tốt, mới có khả năng là vaccin được.

GEN CHUYỂN VỊ (TRANSPOSON), VAI TRÒ CỦA CHÚNG TRONG DI TRUYỀN VÀ CHỌN GIỐNG SINH VẬT

TS Lê Thanh Hoà ()*

1. Mở đầu
2. Khái niệm về hiện tượng chuyển vị và gen chuyển vị
 - 2.1. Hiện tượng chuyển vị, các tiểu phần ADN chuyển vị
 - 2.2. Cấu trúc cơ bản của các tiểu phần và cơ chế quá trình chuyển vị
 - 2.2.1. Cấu trúc
 - 2.2.2. Thành phần tham gia quá trình chuyển vị
 - 2.2.3. Cơ chế hình thành của quá trình chuyển vị
3. Hậu quả của sự chuyển vị gen
 - 3.1. Các trường hợp có thể xảy ra
 - 3.2. Quá trình chuyển vị tạo nên sự đa dạng sinh học và biến đổi loài

1. Mở đầu

Khoa học ngày nay đã cho phép chúng ta biết rất rõ là tất cả mọi sinh vật sống trên trái đất đều thực hiện quá trình di truyền và tạo nên thế hệ mới, nhờ vai trò của một loại axit có tên gọi là deoxyribonucleic (ADN). ADN là vật chất mang thông tin di truyền có trong tất cả, cái gọi là hệ gen (genome) của cơ thể đơn bào hoặc vi sinh vật hạ đẳng, như virus, vi khuẩn... hoặc trong hệ nhiễm sắc thể (chromosome) của tế bào của động, thực vật bậc cao.

Sự sắp xếp thứ tự các nucleotit trong chuỗi ADN dài dằng dặc

(*) Viện Công nghệ Sinh học

của nhiều nhiễm sắc thể, (ở người có 23 cặp) tạo nên các vùng có giới hạn, có chức năng nhất định được gọi là gen. Gen là một dãy nucleotit có khả năng mã hoá và sinh tổng hợp chuỗi axit amin hay gọi là polypeptit. Sản phẩm của gen rất đa dạng về cấu trúc, chức năng và hợp nhất tạo nên tính đặc thù riêng cho từng loại sinh vật, kể cả vi sinh vật.

Một gen hay một tổ hợp gen thông thường là chuỗi ADN được giới hạn bởi 2 vùng biên. Một bộ phận gồm vài chục nucleotit nằm ở đầu của gen gọi là vùng khởi động (promotor), có tác dụng thúc đẩy hoạt động của gen. Một bộ phận nằm ở cuối gen, có tác dụng đình chỉ sự hoạt động của gen gọi là vùng đình chỉ (terminator).

Trong cơ thể người, động vật, thực vật và các sinh vật hạ đẳng, có từ vài trăm đến vài trăm nghìn các bộ phận cấu thành gọi là gen. Gen quyết định tính di truyền của loài gọi là di truyền kiểu gen (genotype) và sản phẩm của chúng, qua quá trình tương tác với môi trường, quyết định tính di truyền kiểu hình (phenotype). Không phải gen nào cũng hoạt động, nghĩa là đều có khả năng tạo nên sản phẩm, và không phải gen nào cũng ổn định, nghĩa là vững bền trong suốt thời gian tồn tại của cá thể và tiến hoá của loài. Chỉ có 30% tổng số gen trong một cá thể hoạt động, số còn lại ở trong trạng thái kìm hãm hay hoàn toàn câm lặng. Trong số những gen hoạt động, có nhiều gen chịu sự kiểm soát cực kỳ chặt chẽ, nhưng cũng có không ít gen thay đổi và thoát khỏi sự điều tiết nào đó của cơ thể. Chúng là những phần tử kém vững bền, hoặc dễ chuyển đổi vị trí.

Một trong những phát hiện cực kỳ quan trọng của các nhà di truyền học là sự chuyển dịch vị trí của một số gen trong cùng một nhiễm sắc thể (gọi là gen truyền dọc), thậm chí có những gen

chuyển từ nhiễm sắc thể này sang nhiễm sắc thể khác (gọi là gen truyền ngang). Sự chuyển dịch vị trí (thuật từ gọi là *chuyển vị*) của chúng như vậy đã gây nên nhiều hậu quả di truyền nghiêm trọng, mà thế hệ tiếp theo phải gánh chịu. Hậu quả đó có thể rất nhẹ nhàng, không phương hại lớn đến sự di truyền giống loài. Tuy nhiên sự chuyển vị của gen, cũng có thể là tai hoạ lớn dẫn đến sự biến dị về loài ở mức độ cao, hoặc có thể dẫn đến sự tiêu diệt của một loài. Cũng cần phải nói rằng, không phải sự chuyển vị của gen và sự sắp xếp lại hệ gen đều có tác động xấu, mà vai trò chuyển vị của gen lại dẫn đến sự di truyền của giống, của loài tạo nên sự tiến hoá theo hướng tiến triển (progressive evolution).

Vậy gen chuyển vị là gì ? Thế nào là sự chuyển vị ? Cơ chế và hậu quả của sự chuyển vị gen trong công tác di truyền, chọn giống và lai tạo loài nói chung, và đối với cây trồng nói riêng ?

Ngay từ những năm 1947-1949, Barbara Mac - Klinton, nhà di truyền thực vật người Mỹ, đã quan sát và nghiên cứu hiện tượng thú vị, xảy ra trong những thí nghiệm về ngô. Năm 1947, trong thí nghiệm lai tạo ngô thực nghiệm, bà quan sát thấy có hiện tượng lạ xảy ra đối với sự di truyền của gen sắc tố (pigment), gen quyết định tạo sắc màu của hạt ngô. Khi lai tạo ngô có hạt màu trắng với ngô có hạt màu vàng, ngoài sự xuất hiện ngô lai phân ly tính trạng theo qui luật Men-den, đã có nhiều bắp ngô mà trong hàng hạt của chúng có chen lẫn nhiều hạt không màu (do hậu quả không có sự hoạt động của gen sắc tố) hoặc hạt màu tím, hoặc hạt màu lốm đốm tím, màu hồng khác nhau, hoặc thậm chí có nhiều hàng có những hạt có độ căng hạt khác nhau (do sự hoạt động không đều của gen tạo tinh bột). Những hiện tượng di truyền kiểu này, không thể giải thích theo qui luật di truyền thông thường được, vì qui luật đó chỉ xảy ra với các gen quyết định tính trạng định vị cố định trên nhiễm sắc thể. Vậy điều gì đã xảy ra? Bà kết luận một cách chắc

chấn, đã có nhiều gen rời chỗ, và chuyển dịch đến vị trí khác, gây phương hại đến gen quyết định sắc tố, hoặc gen tổng hợp tinh bột v.v..., do vậy các gen này đã không hoàn thành được chức năng của mình. Như vậy, những gen đó đã “nhảy” từ nơi này sang nơi khác, trong quá trình lai tạo, giữa thế hệ bố mẹ và thế hệ con cái. Chúng là những “gen nhảy cóc” (jumping genes), theo cách gọi của bà Barbara Mac-Klinton thời đó. Yếu tố ngoại cảnh, đặc biệt là nhiệt độ, có lẽ là nhân tố tích cực tạo cho chúng “nhảy cóc” một cách thuận lợi.

Thực ra sự “nhảy cóc” hay thuật ngữ ngày nay gọi là “chuyển vị” (transposition), không phải chỉ liên quan đến sự dịch chuyển của một đoạn ADN có chiều dài vài trăm đến vài nghìn nucleotit xác định cho 1 gen, mà có thể là sự chuyển vị trí của cả một tổ hợp dài hàng chục nghìn nucleotit (có thể đến 40.000 nucleotit), trong đó có rất nhiều các gen khác nhau định vị. Để thống nhất thuật ngữ biểu thị hiện tượng mới này trong di truyền, các nhà khoa học đã gọi chúng là các tiểu phần dễ chuyển vị (transposable elements), mà thông thường được gọi tắt là các transposon hay gọn hơn là “gen chuyển vị”, mặc dù thành phần của phân đoạn ADN chuyển vị chứa nhiều gen hoặc có khi không chứa gen. Chúng là đại diện của nhóm các loại ADN trong hệ gen được gọi là ADN “ích kỉ” (selfish-DNA), một bộ phận không thể thiếu được của quá trình tiến hoá ở mức độ phân tử. (Xin xem những chuyên mục về vấn đề này của cùng tác giả).

Từ đâu mà sinh ra những phân đoạn ADN có khả năng chuyển vị này, và tại sao chúng tạm thời nằm im trong nhiễm sắc thể cho đến từng thời điểm nhất định, và vì sao, cho đến lúc nào thì chúng lại thực hiện sự dịch chuyển. Những điều kiện nào quyết định thời điểm dịch chuyển của chúng ? Chúng phải có cấu trúc như thế nào để thích hợp với sự chuyển dịch vị trí ? Sự chuyển vị

nói riêng trong một nhiễm sắc thể hoặc giữa các nhiễm sắc thể với nhau như đã nói, và sự chuyển vị nói chung, ví dụ như đối với gen ung thư của virus vào tế bào (cơ chế nhập gen gây ung thư) có tuân theo quy luật nào không ?.

Ngày nay người ta đã làm sáng tỏ nhiều vấn đề xung quanh hiện tượng nói trên, đặc biệt kể từ khi cấu trúc của ADN được công bố bởi Watson và Crick vào năm 1953. Hiện tượng chuyển vị mà điển hình đầu tiên do bà Barbara Mac-Klinton phát hiện ở ngô đã đưa bà đến vinh quang, nhận giải thưởng Nobel năm 1983.

Trong khuôn khổ chương này, chúng tôi xin giới thiệu những nét cơ bản nhất của hiện tượng chuyển vị gen nói chung và tầm quan trọng của hiện tượng này xảy ra trong quá trình di truyền, chọn giống cây trồng nói riêng. Hiểu được và vận dụng nguyên lý chuyển vị, chúng ta còn có thể ước đoán được và thậm chí ngăn ngừa được sự bùng nổ của gen chuyển vị trong công tác lai tạo và bảo quản di truyền cây trồng, đặc biệt là giống cây quý.

2. Khái niệm về hiện tượng chuyển vị và gen chuyển vị

2.1. Hiện tượng chuyển vị, các tiểu phần ADN chuyển vị

Chúng ta biết rằng ADN là 1 chuỗi xoắn kép bao gồm hai sợi bổ sung cho nhau theo từng cặp nucleotit. Có tất cả 4 loại nucleotit là Guanin (G) ; Adenin (A) ; Thymin (T) và Cytosin (C). Chúng được gắn vào một sợi làm khung là đường ribôza đã khử oxy, hay còn gọi deoxyriboza và liên kết thành sợi ADN này qua cầu nối axit photphoric (H_3PO_4). Bộ liên kết bao gồm 1 phân tử G hoặc A, hoặc T, hoặc C ; đường deoxyriboza và axit photphoric, được gọi là 1 nucleotit. Các nucleotit kết lại với nhau theo hướng $5' \rightarrow 3'$; nghĩa là cầu nối axit photphoric (hay còn gọi là cầu nối photphodiester) của nucleotit trước được gắn vào gốc cac-bon số 5 (gọi là $5'$) của nucleotit sau, rồi gốc cac-bon số 3 (gọi là $3'$) của nucleotit

này tiếp tục gắn vào cầu nối axit photphoric, cứ như vậy kéo dài ra mãi.

Hai sợi đơn ADN xoắn lại tạo nên chuỗi xoắn kép ADN theo cơ chế bổ xung : A – T ; và G – C, nghĩa là giữa Adenin của sợi này với Thymin của sợi kia, có 2 cầu nối hydro và giữa Guanin và Cytosin của 2 sợi có 3 cầu nối hydro. Hai sợi bổ xung nhau này đều có trình tự nucleotit liên kết chạy theo chiều 5' - 3' và như vậy chúng chạy ngược chiều nhau. Ví dụ :

5' A G T C C T C A A G 3'

3' T C A G G A G T T C 5'

ADN là vật chất mang thông tin di truyền, bởi vì chúng là thành phần chính có trong nhiễm sắc thể tế bào (đối với động vật đa bào) hay trong hệ gen của vi sinh vật đơn bào, chịu trách nhiệm trong tổng hợp các thành phần cơ bản cho tế bào hoạt động. Bất luận dài hay ngắn, đơn giản hoặc phức tạp, ADN của tất cả mọi loài đều có cấu trúc như đã nói ở trên, mà trong đó có từng phân đoạn nhất định, có cấu trúc hợp lý tạo nên từng đơn vị di truyền được gọi là gen. Gen là một đơn vị ADN riêng biệt có vùng khởi động (promoter), vùng tổng hợp sản phẩm, vùng kết thúc (terminator). Đôi khi nhiều gen tập hợp theo nhau, chịu một sự khởi động chung và một sự kết thúc chung. Sự liên kết nhiều gen, cùng chung khởi động và kết thúc, được gọi là tổ hợp gen, hay còn gọi là operon.

Như vậy gen là đơn vị di truyền quyết định sự tổng hợp sản phẩm nào đó cho cơ thể. Sản phẩm đó có thể tham gia vào cấu trúc (ví dụ như : sợi cơ, xương...) ; cũng có thể là sản phẩm tạo hình dáng, hay liên kết (ví dụ như màu sắc).

Sự hoạt động tạo sản phẩm của một gen hay tổ hợp gen, ngoài việc phụ thuộc vào vùng khởi động promoter của gen đó, còn bị chi phối bởi các tiểu phần ADN có cấu trúc đặc biệt, gọi là các vùng kích hoạt (enhancer). Các vùng kích hoạt, có độ dài ngắn khác nhau (từ vài trăm đến vài chục nghìn nucleotit), nằm kề cận hoặc cách xa gen hoặc tổ hợp gen, mà chúng kích thích hoạt động.

Trong một gen hoạt động, trình tự nucleotit được sắp xếp theo các bộ mã (codon), cứ 3 nucleotit (1 bộ mã) mã hoá cho một axit amin, cứ thế cho đến bộ mã cuối cùng, gọi là mã kết thúc. Mã khởi phát thông thường ở hệ gen động vật bậc cao là ATG, mã hoá cho axit amin là methionine (Met) và mã kết thúc thường là TGA; TAG và TAA. Hệ gen của động vật bậc thấp hoặc hệ gen ty-lạp thể của các loài có thể sử dụng thêm GTG làm mã khởi phát hay một số mã khác để kết thúc một gen và TGA không phải là mã kết thúc mà là mã hóa cho tryptophan.

Khi tế bào phân chia, ADN có trong nhiễm sắc thể cũng được nhân lên theo cơ chế bổ sung. Chuỗi ADN xoắn kép được bung ra làm thành 2 sợi để làm khuôn và để tổng hợp nên các sợi đơn ADN mới, rồi các sợi đơn này lại xoắn lại tạo nên chuỗi kép phân chia cho các tế bào con. Tế bào phân chia theo lối trực phân, nên ADN của nhiễm sắc thể cũng phân chia đồng đều cho 2 tế bào con và cứ thế tiếp tục.

Một điều cần chú ý là, trong quá trình phân bào, ADN con bắt buộc phải giống hoàn toàn ADN mẹ. Nếu có lỗi nào xảy ra trong sự nhân lên của ADN thì phải được sửa chữa ngay nhờ một số men đặc biệt theo một cơ chế đặc biệt, người ta gọi hoạt động này là sự sửa chữa ADN (DNA - repair). Giả sử như khi phân chia, ở một tế bào con nào đó, có một đoạn ADN bên ngoài “nhảy” vào, rồi hoà nhập vào nhiễm sắc thể của nó, và ADN ngoại lai đó được sửa

chứa nhập vào hệ gen của nó coi như là của mình, và như vậy, từ lúc này trở đi, thế hệ con này đã không còn giống thế hệ mẹ nữa.

Bảng 3: Nhóm gen chuyển vị điển hình thường gặp trong các loài động, thực vật

Cấu trúc	Các gen trong tiểu phần chuyển vị	Cách thức chuyển vị	Ví dụ điển hình*
1. Là đoạn ADN, mà hai đầu có cấu trúc lặp đối xứng ngược	Chứa gen transposase (men xúc tác chuyển vị) và một số gen khác	Dịch chuyển như là 1 phân đoạn ADN, trong quá trình nhân lên của tế bào	- Tiểu phần P trong ruồi dấm (<i>Drosophila</i>) - Tiểu phần AC-DS (ngô) - Tiểu phần TN ₃ IS ₁ (<i>E. coli</i>)
2. Là đoạn ADN, mà ở 2 đầu có cấu trúc lặp đối xứng xuôi	Mã hoá cho men sao chép ngược ở retrovirus	Dịch chuyển trong quá trình sao chép từ ADN sang ARN _{ti} do chính promoter của bản thân gen này	- Tiểu phần <i>Copia</i> - Tiểu phần Ty của nấm men - Tiểu phần THE-1 - Tiểu phần bs-1
3. Là đoạn ADN, mà ở đầu 5' bị cắt, còn ở cuối đầu 3' thì có đuôi Adenin (gọi là poly-A)	Mã hoá cho men sao chép ngược	Dịch chuyển trong quá trình sao chép từ ADN sang ARN, có giả thiết cho rằng do promoter của các gen xung quanh kích hoạt	- Tiểu phần P của ruồi dấm (<i>Drosophila</i>) - Tiểu phần II của người - Tiểu phần CIN4 của ngô

Ghi chú : *Độ dài của tiểu phần chuyển vị từ 2.000 nucleotit - 12.000 nucleotit, mỗi một nhóm có nhiều đại diện, mà ở đây chỉ liệt kê một vài ví dụ tiêu biểu.

Trong hệ gen của tế bào nói chung, rất nhiều các phân đoạn

ADN đặc biệt có độ dài ngắn khác nhau, có khả năng tách ra rồi nhập vào một vị trí nào đó, nằm trong cùng một nhiễm sắc thể hoặc một nhiễm sắc thể nào đó khác với nó. Sự chuyển đổi vị trí của từng phân đoạn ADN như thế này được gọi là hiện tượng chuyển vị (transposition). Các phân đoạn ADN có khả năng di chuyển như thế này được gọi là các tiểu phần chuyển vị (transposable elements hay transposon). Các tiểu phần chuyển vị như thế này có thể là những phân đoạn ADN vô nghĩa, không chứa những gen hoạt động. Nhưng rất có thể chúng bao gồm 1 hay nhiều gen hoạt động mạnh, tổng hợp nhiều sản phẩm có chức năng lớn với cơ thể. Điều cơ bản cần quan tâm là:

- Nếu tiểu phần chuyển vị là ADN vô nghĩa, chuyển đến rồi định vị ở nơi cũng không phải là gen có hoạt động, thì nói chung không có gì xảy ra cả.

- Nếu chúng chuyển đến và gắn vào ở giữa một gen đang hoạt động nào đó, chúng có thể làm gián đoạn gen nói trên và gen đó bị vô hoạt.

- Nếu tiểu phần hoạt động lại là một hay nhiều gen hoàn chỉnh và sau khi chuyển vị, chúng lại được tái hoạt động, thì sự chuyển vị này có hậu quả to lớn trong di truyền.

Do sự phát triển của công tác lai tạo giống, loài, nên hiện tượng chuyển vị của các gen và tổ hợp gen được quan tâm rất lớn. Ngày nay, để tiện nghiên cứu người ta có xu hướng gọi tất cả các tiểu phần chuyển vị có chứa những gen hoạt động là transposon. Như vậy transposon có thể là một hay nhiều gen chuyển vị. Bảng 3 thống kê 3 nhóm gen chuyển vị điển hình xảy ra trong tự nhiên.

Như vậy các tiểu phần chuyển vị phải là những phân đoạn

ADN có cấu trúc khá đặc trưng, mà trước hết là chứa các cấu trúc lặp ở hai phần cuối của nó. Trong 3 nhóm nói trên, chúng ta chỉ quan tâm nhóm thứ nhất, vì các thành viên trong nhóm này đã được nghiên cứu kỹ, trong đó tiểu phần chuyển vị AC-DS có vai trò rất quan trọng trong di truyền chọn giống, lai tạo ngô.

Thực chất mà nói, tổng toàn bộ độ dài của các tiểu phần chuyển vị, chiếm khoảng 10% độ dài ADN của hệ gen và luôn luôn có mặt trong hệ gen chờ thời cơ là hoạt động. Đó là con số không nhỏ và nguy cơ gây đột biến di truyền là rất lớn. Vấn đề là ở chỗ: khi nào, và với điều kiện cần thiết ra sao để chúng có thể tiến hành quá trình chuyển vị. Cho đến nay, người ta thấy rằng chỉ có 1 trong 10^6 thế hệ tế bào, mới có nguy cơ bùng nổ sự chuyển vị.

Chúng ta cần phân biệt có hai sự chuyển vị : chuyển vị “lặn” và chuyển vị “trội”. Có thể khái niệm như sau :

- Sự chuyển vị “lặn” có thể hiểu nôm na là các tiểu phần chuyển vị sau khi dịch chuyển và định vị vào một nơi nào đó trong hệ gen, nhưng vẫn nằm “im lặng”, không gây nên bất kỳ một tác động di truyền nào đối với thế hệ mới. Sự “im lặng” của chúng có thể bền vững, nghĩa là chúng nằm yên mãi mãi cho đến hàng trăm nghìn thế hệ tiếp theo. Chúng cũng có thể kém bền vững, và trở nên hoạt động, vì rất có thể đến một thời điểm nào đó trong một thế hệ tiếp theo, chúng lại dịch chuyển và định vị vào một nơi mà có thể gây ảnh hưởng lớn về di truyền.

- Sự chuyển vị “trội” là biểu hiện của sự ảnh hưởng về di truyền ngay lập tức sau khi tiểu phần chuyển vị thực hiện xong quá trình chuyển vị. Chúng gây đứt đoạn của một gen đang hoạt động nào đó hoặc sản phẩm tổng hợp của gen chuyển vị gây rối

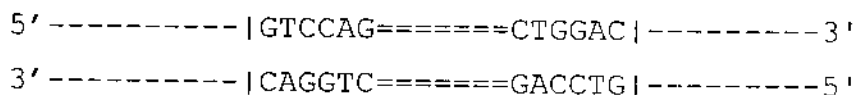
loạn hoạt động của thể hệ mới v.v... Biểu hiện sự bùng nổ của chuyển vị “trội” là rất đa dạng và hậu quả của chúng gây ra cũng rất phức tạp.

2.2. Cấu trúc cơ bản của các tiểu phân và cơ chế quá trình chuyển vị

2.2.1. Cấu trúc

Trong phần này chúng tôi chỉ xét đến cấu trúc của các phân chuyển vị nhóm 1, có liên quan đến gen chuyển vị AC-DS của ngô mà thôi.

Trước hết, về cấu trúc, tiểu phân chuyển vị của nhóm 1 phải là phân đoạn ADN có giới hạn bởi 2 đầu là các cấu trúc lặp đối xứng ngược (inverted repeats). Đó là một đoạn ngắn của ADN (từ 5 - 40 nucleotit) có trình tự sắp xếp nucleotit đối xứng ngược lại với nhau (Hình 1).



Hình 1: Minh họa một phân đoạn ADN có cấu trúc lặp đối xứng ngược.

Ghi chú : 5' -> 3': chiều chạy của chuỗi ADN. G: Guanin; T: Thymin ; C : Cytosin ; A : Adenin. Giới hạn giữa các vạch dọc là phân đoạn ADN có khả năng chuyển vị.

Như vậy ở đây đoạn CTGGAC đã có đối xứng ngược lại với GTCCAG, và do vậy xét về cấu trúc, rất có thể phân đoạn ADN

giới hạn bởi 2 cấu trúc lặp đối xứng ngược này (giữa các vạch dọc) là một tiểu phần chuyển vị. Như đã trình bày ở trên, giới hạn giữa 2 đầu cấu trúc lặp đối xứng ngược này là một đoạn ADN có độ dài ngắn khác nhau (vào khoảng 400 - 40.000 nucleotit), có khả năng thực hiện quá trình chuyển vị. Trong vùng có cấu trúc như vậy, có thể sẽ không có bất kỳ cấu trúc gen nào, nhưng cũng có thể có nhiều gen khác nhau định vị.

2.2.2. Thành phần tham gia quá trình chuyển vị

Tiểu phần chuyển vị ngoài sự phụ thuộc vào cấu trúc cơ bản đặc biệt như đã nói, vị trí tiếp nhận chuyển vị ở nơi mới và men xúc tác chuyển vị (transposase) cũng có vai trò rất quan trọng.

Hầu hết nếu không là tất cả, các tiểu phần có khả năng chuyển vị đều có chứa gen transposase mà sản phẩm của chúng là men transposase xúc tiến cho quá trình chuyển vị. Lượng men transposase trong tế bào bình thường có rất ít, trung bình chỉ có đủ để xúc tác chuyển vị của 1 gen trong số 10^7 tế bào phân chia. Những thí nghiệm cho thấy rằng, khi chủ động đưa gen tái tổ hợp men transposase vào tế bào bằng kỹ thuật gen, thì trong sự phân chia của các thế hệ tiếp theo, số tế bào thực hiện chuyển vị gen xảy ra nhiều gấp hàng trăm đến hàng nghìn lần. Như vậy gen cấu trúc và men sản phẩm của transposase có vai trò quan trọng thúc đẩy sự chuyển vị.

Một vấn đề khá quan trọng mới được phát hiện gần đây giải thích khá rõ về sự hoạt động của men transposase (ví dụ đối với transposon có tên gọi là Tn10 của vi khuẩn *E. coli*). Trong cấu trúc promoter của gen này có dãy nucleotit GATC mà ở đó Adenin đã được methyl hoá, tức là gắn thêm gốc $-CH_3$. Cũng tương tự sợi bổ

sung, gốc methyl cũng được gắn vào Adenin, do vậy 2 nucleotit đã được methyl hoá. Một khi đã bị methyl hoá, promoter không hoạt động được. Khi ADN bắt đầu thực hiện chu kỳ nhân lên, bung ra thành 2 sợi làm khuôn, thì dãy nucleotit này cũng được tổng hợp theo đúng quy luật. Tuy nhiên, Adenin trong sợi mới đã không bị methyl hoá, bởi thiếu men methylaza, do vậy promoter của gen sản xuất men transposase đã hoạt động, và men được sản xuất ngay lập tức, đủ để xúc tác cho quá trình chuyển vị.

Do vậy một số tiểu phần chuyển vị, có xu hướng chọn đúng thời điểm này để dịch chuyển vị trí. Tuy nhiên không phải quá trình chuyển vị nào cũng giống nhau như đã giới thiệu. Chúng chỉ giống nhau duy nhất đó là có sự tham gia đặc lực của men transposase.

2.3. Cơ chế hình thành của quá trình chuyển vị

Trước hết quá trình chuyển vị hoàn chỉnh chỉ xảy ra khi có một vị trí nào đó ở trên một vùng ADN khác tiếp nhận tiểu phần chuyển vị. Người ta gọi nơi tiếp nhận đó là *vị trí tiếp nhận chuyển vị* (target site). Vị trí tiếp nhận chuyển vị bao gồm 5 - 12 nucleotit, thực tế không có gì đặc biệt so với trật tự nucleotit ở nơi khác. Tuy nhiên người ta nhận thấy, tổng số nucleotit Adenin và Thymin (A + T) có vẻ nhiều hơn so với G + C.

Nhận biết vị trí này là vai trò của men transposase, hay nói cách khác, đó là nơi men này bám vào và tiến hành cắt tạo khe hở cho transposon tiếp hợp. ADN của vị trí tiếp hợp không bị cắt phẳng, mà bị cắt so le tạo nên đầu lồi (hình 2) ở tại nơi khác transposon cũng bị cắt rời, nhưng bị cắt phẳng, cũng bằng men transposase.

Có 2 trường hợp xảy ra, đó là quá trình *chuyển vị đơn giản* và quá trình *chuyển vị phức tạp*.

- Trong quá trình chuyển vị đơn giản : Transposon được cắt rời rồi chuyển dịch đến vị trí nhận. Như vậy thực chất chúng chỉ chuyển dịch từ vị trí này sang vị trí khác mà không có sự nhân lên về số lượng.

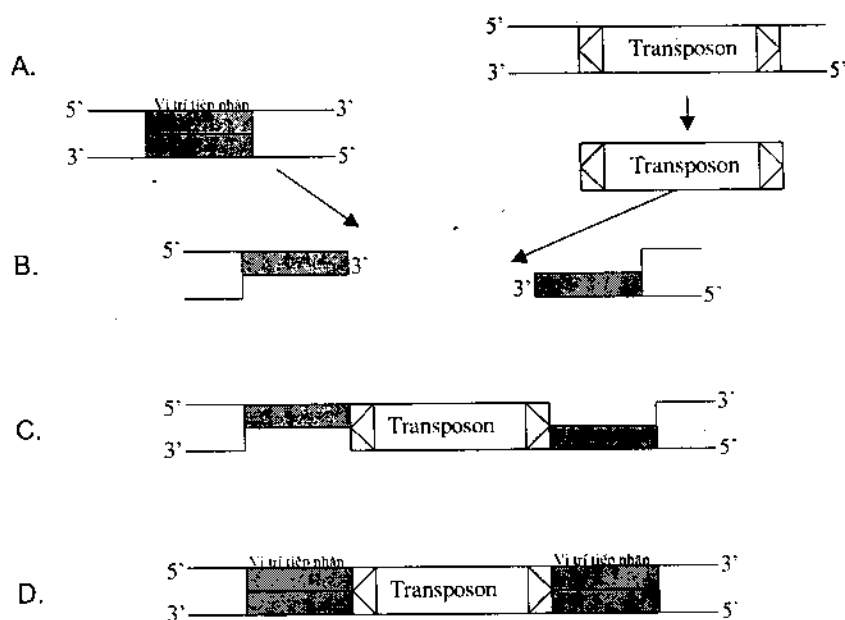
- Trong quá trình chuyển vị phức tạp: tại vị trí cắt transposon, chúng được men ADN - polymeraza tổng hợp thêm 1 phiên bản khác, và chuyển dịch đến vị trí tiếp nhận. Như vậy ở đây tại vùng ADN cho transposon, không có sự biến đổi nào chỉ duy nhất ở vị trí tiếp nhận có thêm 1 phiên bản.

Dù thế nào, quá trình chuyển vị xảy ra, phải tuân thủ 2 nguyên tắc sau :

- Transposon phải có 2 đoạn cấu trúc lặp đối xứng ngược ở cùng 2 đầu.

- Tại vị trí tiếp nhận, đoạn ADN được cắt so le, để tiếp nhận transposon, sau đó được hàn gắn lại. Do vậy 1 vị trí tiếp nhận ban đầu trở thành 2, sau quá trình chuyển vị (duplication of target site) (xem Hình 2). Như vậy sau khi xảy ra quá trình chuyển vị, bao giờ cũng có sự nhân đôi của vị trí tiếp nhận.

Rõ ràng quá trình chuyển vị chính là một sự tái tổ hợp ADN, có sự hoạt động của men transposase để phân biệt với sự tổ hợp ADN bằng kỹ thuật gen, có sự tham gia của các enzym hạn chế (restriction enzymes), người ta gọi quá trình chuyển vị gen là quá trình tái tổ hợp đặc hiệu điểm (site-specific recombination).



Hình 2: Cơ chế hình thành quá trình chuyển vị và nhân đôi của vị trí tiếp nhận.

- A. Vị trí tiếp nhận bị cắt so le; transposon bị cắt rời .
- B. Sự tiếp nhận transposon vào vị trí tiếp nhận .
- C. Quá trình tiếp nhận transposon tạo nên 2 vị trí tiếp nhận chưa hàn gắn.
- D. Sự hàn gắn tạo nên vùng gen mới có transposon và sự nhân đôi của 2 vị trí tiếp nhận.

3. Hậu quả của sự chuyển vị gen

3.1. Các trường hợp có thể xảy ra

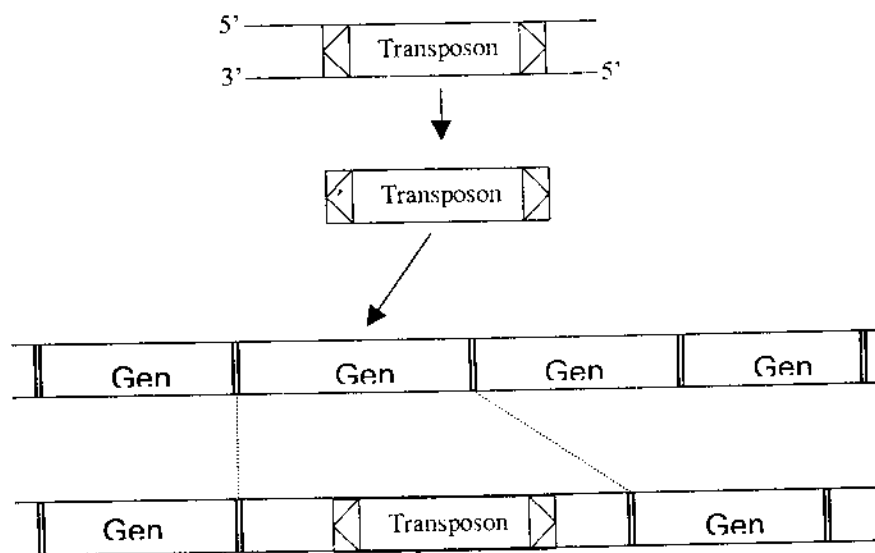
Khi có đủ điều kiện thì quá trình chuyển vị sẽ xảy ra, và thế hệ tiếp theo phải gánh chịu hậu quả về di truyền. Nói chung, có

nhiều tình huống khác nhau, nhưng chúng ta có lẽ chú ý đến ba trường hợp :

- Transposon “nhảy” vào nằm trong cấu trúc gen của một gen khác trong cùng một nhiễm sắc thể hoặc khác nhiễm sắc thể.

- Transposon được tiếp nhận vào vị trí cạnh một gen hay tổ hợp gen khác trong cùng một nhiễm sắc thể hoặc khác nhiễm sắc thể.

- Transposon là một gen hoạt động được truyền đến vị trí mới (Hình 3).



Hình 3: Transposon chứa một gen chuyển đến nằm xen vào gen khác (ví dụ Gen2). Khi chuyển vị đến, transposon cắt đứt Gen2 trong cùng một nhiễm sắc thể hoặc có thể ở nhiễm sắc thể khác.

Trong cả 3 trường hợp nói trên, ít nhiều dẫn đến hiệu quả di truyền nhất định. Hậu quả di truyền do transposon tạo nên được

gọi là sự đột biến do chuyển vị (transposon mutagenesis). Sự đột biến chuyển vị có thể ít hay nhiều, nhẹ hoặc trầm trọng tùy thuộc vào vị trí mà transposon chuyển đến, cũng như sự bùng nổ của gen mà nó mang theo. Hậu quả có thể lược tóm như sau:

- Thứ nhất, rất giản đơn là nó cắt đứt sự liên tục của một gen (ví dụ Gen2 ở Hình 3) làm cho gen đó không hoạt động. Nếu gen đó là gen quan trọng, ví dụ gen tạo màu sắc, thì sau quá trình chuyển vị, gen đó bị vô hoạt, màu sắc không được tạo ra.

- Thứ hai, nếu gen được mang theo trong transposon hoạt động và tạo sản phẩm, thì sản phẩm này sẽ ảnh hưởng đến sự điều hoà gen của vùng lân cận, thậm chí đối với hệ thống điều hoà gen của cả sinh vật nói chung.

3.2. Quá trình chuyển vị tạo nên sự đa dạng sinh học và biến đổi loài

Một trong những nét đặc trưng của quan hệ chuyển vị là một khi được định vị vào nơi mới, thì sự tương tác giữa transposon với vùng kế cận có thể xảy ra, và tạo nên nét đặc trưng di truyền mới. Nét đặc trưng này từ thời điểm đó thuộc về thế hệ tiếp nhận chuyển vị, do đó về lâu dài đã tạo nên dạng sinh học khác biệt.

Cũng cần nhắc đến là chỉ một phần triệu trường hợp có xảy ra đột biến chuyển vị (transposon mutagensis) do vậy có thể tìm thấy, lúc này chỉ có thể có một nhánh bị đột biến theo hướng khác, số còn lại tuân thủ theo quy luật di truyền vốn có từ bố mẹ.

Sự đột biến chuyển vị được quan sát đầu tiên khi lai tạo ngô và liên quan đến di truyền số lượng. Nhiễm sắc thể thường xảy ra chuyển vị, đều chứa các cấu trúc ADN lặp dài ngắn khác nhau, giữa chúng có thể hình thành nên các tiểu phân chuyển vị.

Một nét khác của đột biến chuyển vị là chúng có thể xảy ra ngay trong dòng tế bào mầm (germ line), mà quá trình biệt hoá tiếp theo phải chịu hậu quả. Người ta gọi hiện tượng này là di truyền lai thiếu năng (hybrid dysgenesis). Di truyền lai thiếu năng, sẽ cho các cá thể lai không mong muốn hoặc ngoài ý định lai tạo.

Tuy nhiên sự đột biến chuyển vị không phải lúc nào cũng tạo ra bức tranh ảm đạm về di truyền và lai tạo. Đặc biệt đối với thực vật, quá trình chuyển vị, mà phần lớn là chịu tác động khởi phát của nhân tố nhiệt độ, còn dẫn đến sự thích ứng của chúng đối với môi trường. Chỉ qua sự chuyển vị, sự chuyển dời gen ứng phó mới nhanh chóng và kịp thời tạo sản phẩm đối phó với môi trường.

Đối với động vật, đặc biệt đối với vi sinh vật, quá trình chuyển vị có tác dụng to lớn bảo vệ chúng khỏi huỷ diệt. Cụ thể là tính kháng thuốc kháng sinh của một số loài vi khuẩn. Các gen sản xuất men kháng kháng sinh, rất dễ chuyển vị từ vectơ này sang vectơ khác, và chuyển nạp vào tế bào vi khuẩn, để chúng cộng sinh chống lại kháng sinh.

VI KHUẨN CỐ ĐỊNH NITƠ PHÂN TỬ VI HIỆU KHÍ AZOSPIRILLA

TS Nguyễn Ngọc Dũng (*)

1. Lịch sử nghiên cứu
2. Một số đặc điểm đặc trưng
3. Nghiên cứu di truyền
4. Sinh thái học
5. Nghiên cứu ứng dụng tại Việt Nam

* *

*

Azospirilla là nhóm vi khuẩn được nghiên cứu nhiều trong các thập kỷ gần đây. Chúng mang thông tin di truyền cố định nitơ phân tử và tồn tại phong phú trong vùng rễ cây họ hoà thảo, đặc biệt các cây ngũ cốc. Ngoài ra chúng còn có khả năng sinh tổng hợp các chất điều hoà sinh trưởng thực vật.

1. Lịch sử nghiên cứu

Lần đầu tiên vào năm 1922, vi khuẩn Azospirilla được Beijerinck phân lập từ đất cát nghèo nitơ ở Gorssel, tỉnh Gelderland, Hà Lan và đặt tên là *Azotobacter spirillum*, khoảng một năm sau đó được đổi tên là *Spirillum lipoferum*. Đầu những năm 60 của thế kỷ 20, vi khuẩn này được Becking phân lập lại từ nhiều nguồn mẫu khác nhau và khả năng cố định nitơ phân tử của nó được khẳng định nhờ sử dụng $^{15}\text{N}_2$. Sự quan tâm nghiên cứu vi

(*) Viện Công nghệ Sinh học.

khuẩn này thực sự được chú ý, vào những năm 70, Doebereiner đã miêu tả sự phân bố phong phú của vi khuẩn này trong vùng rễ cây cỏ nhiệt đới, đặc biệt ở Brazil và tác dụng của nó lên sinh trưởng của thực vật. Dựa vào các đặc điểm sinh lý sinh hoá và lai axit nhân, Tarrand và cộng sự, 1978, đã xếp nhóm vi khuẩn này vào một chi mới gồm hai loài: *Azospirillum lipoferum* và *Azospirillum brasilense*. Cùng với thời gian các loài *A. amazonense* (1983), *A. halopraeferens* (1987) và *A. irakense* (1989) được công bố.

2. Một số đặc điểm đặc trưng

Về hình thái vi khuẩn *Azospirilla* có dạng cong nhẹ và là vi khuẩn gram âm. Tuy vậy hình dáng đó sẽ thay đổi khi điều kiện môi trường thay đổi; chẳng hạn như trong môi trường dịch thể chứa pepton và succinat, tế bào chỉ có một tiên mao đơn cực, nhưng khi sinh trưởng trên môi trường rắn, bên cạnh tiên mao đơn cực, tế bào còn cho chu mao. Trong môi trường dịch thể, tùy theo loài, tế bào sẽ mất khả năng vận động khi thời gian sống kéo dài. Sự đa dạng hình thái tế bào như vậy cũng xảy ra với các chủng *Azospirillum* được phân lập từ châu thổ sông Hồng. Krieg và Doebereiner cho rằng hiện tượng này liên quan tới sự kiềm hóa môi trường khi cơ chất malat bị oxy hóa. Bằng cách sử dụng các môi trường khác nhau, Becking đã chứng minh sự đa dạng hình thái tế bào ở *Azospirillum* liên quan tới thành phần môi trường.

Một thông số quan trọng để phân biệt các loài *Azospirillum* là khả năng sử dụng các đường làm nguồn cacbon. Chẳng hạn như chỉ có các loài *A. amazonense* và *A. irakense* mới có khả năng sử dụng saccharose trong điều kiện có nitơ liên kết hay nitơ phân tử, các loài *Azospirillum* còn lại không có khả năng đồng hoá nguồn cacbon này ngay cả trong điều kiện tồn tại nitơ liên kết. Trong

điều kiện nitơ phân tử là nguồn nitơ duy nhất, các loài *A. brasiliense* và *A. halopraeferens* không có khả năng sử dụng đường glucose; trái lại các loài còn lại có khả năng sử dụng đường đơn này làm nguồn cacbon. Các nghiên cứu về quá trình đồng hoá cacbon ở nhóm vi khuẩn này cho rằng nguyên nhân sử dụng đường khác nhau là do khả năng thu nhận qua màng tế bào hoặc do có sự khác nhau trong chu trình chuyển hoá trao đổi chất cacbon. Chẳng hạn như cả hai loài *A. lipoferum* và *A. brasiliense* đều có enzym glucokinase, nhưng chỉ có loài *A. lipoferum* mới có khả năng chuyển vận đường này qua màng tế bào. Theo tài liệu đã công bố cho thấy ở các chủng *A. brasiliense* được nghiên cứu đều tồn tại các enzym cần thiết cho chuyển hoá đường fructose theo chu trình Embden-Meyerhoff- Parnas và chuyển hoá gluconat qua chu trình Entner-Doudoroff.

Đối với *Azospirillum*, các muối hữu cơ malat, succinat và pyruvat là nguồn cacbon và là nguồn năng lượng hữu hiệu nhất. Trong môi trường vô đạm với sự có mặt của một trong các muối đã nêu làm nguồn cacbon sinh trưởng của tế bào diễn ra với tốc độ nhanh hơn so với môi trường chứa axetat hay galactose; đồng thời kéo theo nhu cầu oxy cao hơn.

Một thông số quan trọng để phân biệt các loài *Azospirillum* là nhu cầu đối với biotin. Để có thể sử dụng nitơ phân tử làm nguồn đạm trong điều kiện không có nitơ liên kết, sự có mặt của biotin trong môi trường đối với *A. lipoferum* và *A. halopraeferens* là bắt buộc. Một số đặc tính mang tính đặc trưng loài, như *A. halopraeferens* cần nhu cầu cao muối NaCl cho sinh trưởng; thiếu muối hoặc nồng độ thấp tế bào sẽ không sinh trưởng hoặc sinh trưởng yếu.

Một đặc điểm cơ bản của vi khuẩn *Azospirillum* là khả năng

cố định nitơ phân tử. Giống như ở các vi khuẩn cố định nitơ phân tử khác, hoạt động này có sự tham gia của hệ enzym nitrogenase. Theo Ludden và cộng sự, 1978, bên cạnh hai cấu tử thường có của một hệ enzym nitrogenase: một là dinitrogenase reductase hay thường được gọi Fe-Protein và thứ hai là dinitrogenase hay được gọi Mo-Fe-Protein, ở *Azospirillum* có thêm cấu tử thứ ba với chức năng hoạt hoá cấu tử Fe-Protein; nó giống như ở vi khuẩn *Rhodospirillum rubrum*.

Cố định nitơ phân tử là một quá trình đòi hỏi rất nhiều năng lượng, nên ở vi khuẩn cố định N_2 tồn tại những cơ chế điều hoà hết sức chặt chẽ. Một cơ chế điều hoà liên quan đến hoạt động của các gen *nif* và thường được gọi là cơ chế điều hoà di truyền. Đến nay cơ chế điều hoà này được làm sáng tỏ khá chi tiết ở *Klebsiella pneumoniae*. Các cơ chế điều hoà khác liên quan tới điều hoà hoạt tính enzym nitrogenase. Các chất điều hoà được nghiên cứu nhiều là các hợp chất nitơ liên kết, đặc biệt là amôn và nồng độ oxy. Theo Ludden và Roberts, 1989, khi có mặt amôn trong môi trường, cấu tử dinitrogenase reductase ở *R. rubrum* sẽ bị làm biến dạng bởi việc gắn ADP-ribose vào gốc arginin ở vị trí 101, làm cho nó bị bất hoạt. Quá trình này được gọi là sự ADP- ribozyn hóa cấu tử dinitrogenase reductase do enzym dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase, viết tắt DRAT, thực hiện. Ngược lại, khi amôn sạch khỏi môi trường gốc ADP-ribose liền bị tách khỏi cấu tử dinitrogenase reductase nhờ enzym glycohydrolase hoạt hoá dinitrogenase reductase, viết tắt DRAG (dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase). Tham gia vào quá trình hoạt hoá này còn cần có MgATP và Mn^{2+} . Khi dinitrogenase reductase trở lại hoạt động bình thường có nghĩa khi đó hai cấu tử của nitrogenase sẽ ở trạng thái tương đương nhau. Cơ chế điều hoà hoạt tính

nitrogenase này còn được gọi là cơ chế điều hoà sau sao mã hay còn được gọi là cơ chế “đóng-mở”. Một cơ chế điều hoà như vậy cũng xảy ra ở một số loài vi khuẩn *Azospirillum* nhất định. Burris và cộng sự, 1991, cho biết hệ thống điều hoà bởi DRAT và DRAG chỉ có ở *A. lipoferum* và *A. brasilense*, không có ở *A. amazonense*. Tuy vậy gen *draT* và gen *draG* có thể biểu hiện ở *A. amazonense* khi các gen này được đưa vào tế bào của nó và làm cho tế bào thể hiện cơ chế điều hoà hoạt tính nitrogenase.

Trong điều kiện tồn tại nitơ liên kết, *Azospirillum* là vi khuẩn sinh trưởng hiếu khí; trái lại khi nitơ phân tử là nguồn đạm duy nhất thì sự cố định N_2 chịu sự tác động của oxy và chỉ xảy ra ở áp lực oxy thấp. Chính vì vậy *Azospirillum* được xếp vào nhóm vi khuẩn cố định nitơ phân tử vi hiếu khí. Hartmann, 1983, nhận thấy rằng khả năng chống chịu oxy của *Azospirillum* mang tính đặc hiệu chủng hoặc loài. Tác giả cũng cho rằng khả năng chống chịu oxy ở *A. brasilense* có thể liên quan tới hàm lượng và cấu trúc của các hợp chất carotenoid của tế bào, bởi các thể đột biến của *A. brasilense* Sp7 có khả năng tổng hợp cao carotenoid đã sinh trưởng và cố định N_2 tốt hơn ở áp suất oxy không khí cao hơn so với chủng hoang dại. Như đã được công bố, khi xử lý với NNNG, chủng phân lập *Azospirillum* sp. Mat2-1b cũng cho những thể đột biến chống chịu oxy cao hơn so với chủng hoang dại, mặc dù những thể đột biến như vậy không thể hiện liên quan tới sắc tố carotenoid. Trong một số chủng phân lập có nguồn gốc từ châu thổ sông Hồng, chẳng hạn chủng Mat2-1a, tế bào sẽ kết vón với nhau khi tăng tốc độ lắc, mặc dù chúng được sinh trưởng trong môi trường chứa amôn. Giải thích hiện tượng này, có tác giả cho rằng đó là một hình thức chống chịu oxy của tế bào, nhờ kết vón lại với nhau mà tế bào hạn chế được sự thẩm thấu của oxy hoà tan.

Một số thông số như pH, nhiệt độ, nồng độ muối NaCl, liên quan tới sinh trưởng và cố định nitơ phân tử của *Azospirillum* đã được công bố. Về ảnh hưởng giá trị pH môi trường không có sự khác nhau giữa các kết quả đã công bố với kết quả thu được ở hai chủng phân lập tiêu biểu Arm2-2 và Mat2-1; chúng đều sinh trưởng tốt nhất ở pH 7,2. Hai chủng này đạt sinh trưởng cực đại ở 30°C, tương đương với sinh trưởng của các chủng có nguồn gốc ôn đới. Giống như đặc điểm của hai loài *A. lipoferum* và *A. brasilense*, các chủng phân lập sinh trưởng tốt nhất trong môi trường không chứa NaCl.

Một đặc điểm đáng chú ý khác của nhóm vi khuẩn *Azospirillum* là khả năng sinh tổng hợp các chất điều hoà sinh trưởng thực vật. Đặc tính này cũng đã được xác định ở các chủng phân lập bằng các phương pháp khác nhau như ảnh hưởng của dịch nuôi loại bỏ sinh khối lên sinh trưởng mầm lúa hoặc xác định trực tiếp bằng phương pháp hóa học.

Ngoài những đặc tính đã nêu ở trên, một số đặc điểm khác như khả năng bài tiết amôn, khả năng phản nitrat hóa, khử hydro phân tử, chống chịu muối và vận chuyển điện tử qua màng của *Azospirillum* đã được đề cập tới.

3. Nghiên cứu di truyền

Nhờ triển khai các phương pháp công nghệ gen như kỹ thuật nhân dòng gen, bản đồ hoá phân đoạn ADN bằng enzym giới hạn, lai ADN-ADN, gây đột biến điểm bằng các thể transposon và đọc trình tự nucleotid, người ta đã thu được những tiến bộ đáng kể trong việc làm sáng tỏ một số đặc điểm riêng của *Azospirillum*. Giống như ở các vi khuẩn cố định nitơ phân tử khác, ở

Azospirillum một số lượng lớn công bố về di truyền chủ yếu liên quan tới hiện tượng cố định nitơ phân tử, đặc biệt liên quan tới tổ chức, chức năng của các gen *nif*. Đến nay chỉ có hệ gen mã hoá nitrogenase của *Klebsiella pneumoniae* mới được làm sáng tỏ. Theo Arnold và cộng sự, 1988, hệ gen này bao gồm 20 gen khác nhau được tổ chức thành 7 đơn vị sao mã nằm liền kề nhau trên nhiễm sắc thể với độ lớn 24 kbp. Trong số đó chỉ có các gen *nif* HDK là những gen có chức năng sao mã các protein tạo nên enzym nitrogenase, chính vì vậy những gen này được gọi là gen cấu trúc; gen *nifH* mã hoá cấu tử Fe-Protein và gen *nifDK* mã hoá tiểu phần Mo-Fe-Protein. Các gen còn lại liên quan tới điều hoà và tổng hợp đầy đủ gen nitrogenase.

Bằng cách sử dụng các gen *nif* của vi khuẩn *K. pneumoniae* làm các mẫu dò và kỹ thuật lai ADN, sự tồn tại các gen cấu trúc *nifHDK* ở *Azospirillum* đã được xác định và sau đó đã được nhân bản bằng kỹ thuật nhân dòng. Sử dụng thể Tn5 làm tác nhân gây đột biến điểm, phương pháp phân tích bổ trợ di truyền và phương pháp phân tích sản phẩm gen cho thấy các gen *nifHDK* của *A. lipoferum* và *A. brasilense* cùng được tổ chức trong một đơn vị sao mã- operon. Kích thước và trật tự sắp xếp của các gen *nifHDK* của Operon này ở *Azospirillum* giống như của *K. pneumoniae*. De Araujo và cộng sự, 1988, Sing và Klingmueller, 1988, Galimand và cộng sự, 1988 cho thấy rằng cách operon mã hoá protein cấu trúc khoảng 10 kbp là các gen *nifE* và *nifUS*. Nhiều tác giả đã chứng minh cho thấy các gen *nifA* và *nifB* ở *Azospirillum* nằm cách khá xa các gen *nif* khác. Ngoài các gen đã nêu các gen *nif* còn lại ở *Azospirillum* chưa được biết tới, mặc dù những vùng ADN kề cạnh cụm gen *nifHDK* đã được nhân giòng và phân tích

bằng các kỹ thuật di truyền khác nhau. Như vậy rõ ràng các gen *nif* ở *Azospirillum* không được tổ chức thành chuỗi các operon nằm liền kề nhau như ở *K. pneumoniae*, mà được phân bố cách xa nhau trên nhiễm sắc thể.

Đa dạng di truyền ở *Azospirillum* là vấn đề được quan tâm nghiên cứu, đặc biệt sự đa dạng độ dài phân đoạn ADN được tạo bởi enzym giới hạn. Bằng kỹ thuật này, có tác giả cho thấy có sự phân nhóm khác nhau đối với một chủng vi khuẩn *Azospirillum*. Chẳng hạn như một chủng nào đó từng được xếp vào loài *A. lipoferum* theo phương pháp kinh điển, nhưng bằng phương pháp phân tích sự đa dạng độ dài phân đoạn ADN nó lại được xếp vào cụm vi khuẩn thuộc loài *A. brasilense*. Kỹ thuật này cho phép nhận diện sự khác nhau và mối quan hệ họ hàng giữa các chủng của một loài hay một nhóm.

Kết quả xác định theo các phương pháp kinh điển hơn 50 chủng *Azospirillum* được phân lập từ rễ lúa và đất lúa đồng bằng sông Hồng cho thấy đa số chúng được xếp và nhóm *A. lipoferum*, số ít thuộc loài *A. brasilense*, chỉ có chủng Arm2-2 có đặc tính riêng khác với đặc tính của các loài đã được công bố. Trên cơ sở đó, 15 chủng phân lập đại diện cho tập hợp chủng *Azospirillum* đồng bằng sông Hồng được phân tích đa dạng độ dài phân đoạn. Trong số đó trừ các chủng QO1-1a, QO1-1b và QO2-1 có những đặc tính của loài *A. brasilense* và chủng Arm2-2, đa số các chủng còn lại có nhiều đặc tính của loài *A. lipoferum*. Sau khi tách chiết ADN tổng số từ các chủng phân lập và ADN được xử lý với các enzym phân đoạn khác nhau, các phân đoạn ADN được tách trên điện di agarose 0,8 %, tiếp đó được làm biến tính bởi dung dịch

NaOH và chuyển lên màng lai để lai với các mẫu dò khác nhau. Một mẫu dò là phân đoạn 4 kbp được tạo bởi *Xba*I/*Hind*III từ plasmid pKK3535 chứa gen 23S-ADNr và gen 5S-ADNr với một phần tARN_{Glu} của operon *rriB* của *E. coli* và một phần của gen *tet* từ vector pBR 322. Mẫu dò thứ hai là sản phẩm nhân bản gen 16S-ADNr từ *A. brasilense* Sp7 sử dụng cặp mồi có vị trí 8-27 và 1540-1528 của 16S-ADNr ribosom(ADNr) từ *E. coli*. Các mẫu dò được đánh dấu bởi digoxigenin. Trong trường hợp DNA tổng số được xử lý với *Eco*RI kết quả tín hiệu lai cho thấy có những phân đoạn nhỏ hơn 1kbp. Điều đó chứng tỏ ngay trên gen 16S-ADNr và 23S-ADNr hoặc vùng kề cạnh các gen này tồn tại vị trí nhận biết đối với *Eco*RI ở tất cả các chủng được phân tích. Trái lại một biểu hiện tương tự như vậy đã không xảy ra khi ADN tổng số được xử lý với *Sa*I, hay có thể nói cách khác, trong phạm vi gen 16S-ADNr và 23S-ADNr của các chủng được phân tích không tồn tại các vị trí nhận biết đối với *Sa*I, trừ các chủng SS-III-3, DA9-3b và DA10-2. Vì ở hầu hết các chủng không tồn tại vị trí cắt của *Sa*I trong phạm vi operon ARNr nên ở đây là một cách để đưa ra dự đoán số operon ARNr của mỗi một chủng. Điều đáng quan tâm là số dải ở các chủng *A. halopraeferens* Au4 (5 dải), *A. amazonense* Y1 (5 dải) và *A. irakense* KBC1 (4 dải) đều ít hơn 6, trong khi đó tất cả các chủng phân lập và hai chủng *A. lipoferum* Sp59b và *A. brasilense* Sp7 cho 6-8 dải. Kết quả đó phải chăng phản ánh tính đặc trưng loài, nếu vậy các chủng phân lập sẽ không thuộc vào các loài có số dải thấp.

Mẫu phân đoạn của các chủng phân lập QO1-1a và QO1-1b, Mat1-4 và Mat2-1b cũng như mẫu cặp Arm2-2 và Gl1-1 thể hiện như nhau với tất cả enzym phân đoạn hoặc mẫu dò đã được sử

dụng. Sự giống nhau ở cặp QO1-1a và QO1-1b dễ hiểu bởi QO1-1b là một dẫn xuất của chủng QO1-1a, nó chỉ khác ở chỗ khả năng hấp thụ công ô đô. Trái lại các chủng của hai cặp còn lại là những chủng được phân lập một cách ngẫu nhiên, nên có thể lý giải sự đồng nhất như sau. Đối với các chủng Mat1-4 và Mat2-1b chúng được phân lập từ các vị trí khác nhau trên cùng một thửa ruộng, như vậy có nghĩa chúng chỉ là một chủng nhưng được phân lập hai lần. Riêng ở cặp chủng còn lại có sự khác nhau về địa lý: chủng Arm2-2 được phân lập từ đất cánh đồng Nghĩa Đô, huyện Từ Liêm và theo phương pháp mô hình mầm lúa, còn chủng Gl1-1 được phân lập từ mẫu đất Phú Thụy, Gia Lâm. Hai địa điểm này cách nhau bởi sông Hồng, nhưng có chung nguồn nước tưới, và như vậy hai chủng này có cùng nguồn gốc. Điều đó có thể được xem là căn nguyên cho sự đồng nhất của hai chủng này.

Cặp chủng Mat2-1a và Mat2-1b là những biến thể xuất hiện đồng thời khi được cấy rĩa trên môi trường rắn từ một khuẩn lạc ban đầu. Khác với cặp QO1-1a và QO1-1b, mẫu cấy của hai chủng này cho sự khác nhau, đặc biệt khi cắt với *SaI* và lai với mẫu dò là phân đoạn chứa gen 23S-ADNr: chỉ có 2 trong số 6 dải thể hiện sự tương đương, trong trường hợp xử lý với *PstI* với mẫu dò 23S-ADNr cho 3 trong tổng số 6 dải có độ dài như nhau. Trái với mẫu dò được tạo bởi *SaI* hoặc *PstI*, sự đa dạng độ dài phân đoạn ADN từ hai chủng này được tạo bởi *EcoRI* cho số đoạn có độ dài giống nhau nhiều hơn. Cụ thể trong tổng số 16 phân đoạn của chủng Mat2-1a và 18 phân đoạn của chủng Mat2-1b cho tín hiệu lai với mẫu dò 16S-ADNr có tới 15 phân đoạn có độ dài bằng nhau; với mẫu dò là gen 23S-ADNr, trong tổng số 7 phân đoạn ở Mat2-1a và 9 phân đoạn ở Mat2-1b cho 6 dải có độ lớn bằng nhau. Ngoài ra

với mẫu dò là gen *niH*, đa dạng độ dài phân đoạn ở hai chủng này hoàn toàn giống nhau. Do không tồn tại vị trí cắt *SaI* trong phạm vi operon sao mã các ARNr, nên sự khác biệt lớn hơn về đa dạng độ dài phân đoạn xảy ra khi cắt với *SaI* càng chứng tỏ ở chủng Mat2-1a đã xảy ra những sự sắp xếp lớn hơn ở vùng bao quanh các operon này.

Hai chủng phân lập DA9-3a và DA9-3b có cùng nguồn gốc từ một chủng ban đầu, chỉ khác nhau về hình thái khuẩn lạc trong quá trình bảo quản. Trong 9 phân đoạn cho tín hiệu lai giữa ADN xử lý với *EcoRI* với mẫu dò 23S-ADNr ở mỗi một chủng chỉ có 1 dải khác nhau; với mẫu dò là gen *niH* không cho sự khác nhau. Mẫu phân đoạn hoàn toàn giống nhau khi xử lý ADN với *BamHI* và lai với mẫu dò là gen 23S-ADNr. Sự thay đổi nhỏ ở cặp chủng này có thể là do đột biến điểm, tạo nên.

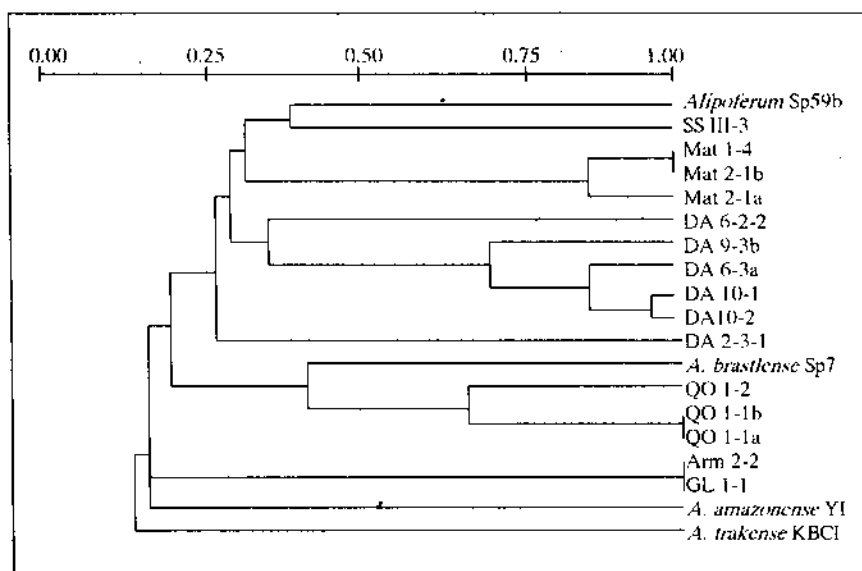
Về địa lý, hai chủng QO1-1 và QO1-2 có cùng vị trí, chỉ khác nhau ở khoảng cách so với bề mặt rễ: QO1-1 từ đất bám rễ, QO2-1 từ bề mặt rễ lúa rửa sạch đất. Tuy khoảng cách coi như không có ý nghĩa, nhưng giữa chúng vẫn có sự khác nhau, mặc dù sự khác nhau như vậy không lớn, bởi có 10 phân đoạn trong tổng số 14 phân đoạn của QO1-2 và 16 phân đoạn của QO1-1 được xác định bằng nhau trong trường hợp xử lý ADN với *EcoRI* và lai với mẫu dò là gen 16S-ADNr.

Tóm lại, trừ các chủng Arm2-2, Gl1-1 và các cặp chủng Mat1-4 và Mat2-1b, QO1-1a và QO1-1b, 9 chủng còn lại mỗi chủng cho một mẫu phân đoạn khác nhau. Mẫu phân đoạn như vậy không cho biết mối quan hệ họ hàng giữa các chủng với nhau hay giữa chúng với các chủng tiêu biểu của các loài *Azospirillum* đã

biết. Để xác định mối quan hệ họ hàng và làm rõ mối quan hệ đó giữa các chủng đã nêu, kết quả lai giữa các mẫu dò là gen 16S-ADNr và 23S-ADNr với các phân đoạn DNA tổng số qua xử lý với *EcoRI* được chuyển sang dạng ma trận nhị phân 0-1, tiếp đó với sự trợ giúp của máy tính được phân tích và trình bày dưới dạng cây phả hệ (Hình 1). Cây phả hệ cho thấy, chỉ có chủng SS-III-3 có quan hệ họ hàng gần nhất với chủng *A. lipoferum* Sp59b, lập nên một nhóm riêng, mặc dù hệ số tương quan giữa hai chủng này chưa được 50%. Liên kế nhóm này là nhóm của các chủng Mat1-4, Mat2-1a và Mat2-1b. Cách xa nhóm thứ nhất hơn một ít là nhóm của các chủng DA6-2-2, DA9-3b, DA6-3, DA10-1 và DA10-2. Trong nhóm thứ ba này, chủng DA10-1 và DA10-2 có quan hệ họ hàng gần nhất, xa dần là các chủng DA6-3, DA9-3b và DA6-2-2. Chủng DA2-3-1 lập thành một nhóm riêng và có quan hệ với chủng *A. lipoferum* Sp57b xa nhất so với các chủng vừa nêu trên. Phân nhánh kế tiếp của cây phả hệ dẫn tới một loài *Azospirillum* khác- *A. brasilense*. Lập nên nhóm này gồm các chủng *A. brasilense* Sp7, QO1-1a, QO1-1b và QO1-2. Kết quả cây phả hệ một lần nữa khẳng định kết luận được rút ra từ nghiên cứu các đặc điểm sinh lý sinh hoá các chủng phân lập là số đông các chủng có nhiều đặc điểm của loài *A. lipoferum*.

Chủng Arm2-2 và GI1-1 lập thành một nhóm riêng. Vị trí của chúng trong cây phả hệ cho thấy mối quan hệ khá xa đối với các chủng phân lập khác và các chủng của các loài *Azospirillum* đã biết. Tuy vậy, so với các chủng *A. amazonense* Y1 và *A. irakense* KBC1, chúng vẫn có mối quan hệ gần hơn với các chủng *A. lipoferum* Sp57b và *A. brasilense* Sp7. Với một mối quan hệ như

vậy cho phép nói rằng rất có thể các chủng Arm2-2 và G11-1 là đại diện cho một loài *Azospirillum* mới.



Hình 1: Cây phả hệ các chủng phân lập và các loài *Azospirillum*.

4. Sinh thái học

Đến nay đã có nhiều công trình đề cập tới sự phân bố của nhóm vi khuẩn này. Về mặt địa lý, vi khuẩn *Azospirillum* có mặt ở nhiều vùng khác nhau trên trái đất, từ miền nhiệt đới cho tới ôn đới. Chúng tồn tại phong phú trong vùng rễ cây họ hoà thảo, đặc biệt vùng rễ cây cỏ nhiệt đới, cây lúa nước, cây ngô và cây lúa mì. Ngoài ra *Azospirillum* còn được tìm thấy trong vùng rễ cây khoai

tây, cây cà chua, cây sắn củ và cây dương xỉ. Bằng các phương pháp khác nhau người ta đã khẳng định rằng vi khuẩn này có thể khu trú bên trong rễ cây của một số cây thuộc họ hoà thảo, đặc biệt trong tầng vỏ cây và cả mô gỗ (xylem).

Sự tồn tại phong phú trong vùng rễ chứng tỏ tồn tại một mối quan hệ tương tác giữa vi khuẩn này và cây chủ nhất định. Mối quan hệ tương tác này được coi là một dạng cộng sinh sơ khai và được gọi là sự hội sinh. Đây là vấn đề được nhiều nhà vi sinh vật học quan tâm nhằm làm sáng tỏ những cơ chế có liên quan. Trước hết khả năng dẫn dụ hoá học đối với vi khuẩn này bởi đường, axit amin và axit hữu cơ cũng như sự dẫn dụ bởi oxy đã được kiểm tra. Bên cạnh đó sự kết bám, quá trình khu trú và quá trình xâm nhiễm rễ cây cũng như sự phát tán tế bào vi khuẩn *Azospirillum* sau khi xâm nhiễm rễ đã được nghiên cứu. Các kết quả thu được đối nghịch nhau được coi là bằng chứng chứng minh cho sự khác nhau trong mối quan hệ tương tác giữa thực vật và vi khuẩn *Azospirillum*. Có ý kiến cho rằng các quá trình này liên quan tới di truyền, bởi sự hiện diện một số gen liên quan tới quá trình tạo nốt sần ở *Rhizobium* được phát hiện ở những chủng *Azospirillum* nhất định.

Trong mối quan hệ tương tác hội sinh cây chủ đóng vai trò thể cung cấp nguồn cacbon cho vi khuẩn *Azospirillum*. Đó là các hợp chất do rễ bài tiết ra, như đường, các axit amin, axit hữu cơ. Ngoài ra còn có các sản phẩm trao đổi chất khác do rễ tiết ra, như biotin, các enzym và các chất kích thích có tác dụng trực tiếp hoặc gián tiếp lên sinh trưởng và cố định nitơ phân tử của vi khuẩn *Azospirillum*. Ngược lại vi khuẩn này gây nên những hiệu ứng khác nhau lên cây chủ, chẳng hạn làm gia tăng bộ rễ, làm tăng số nhánh và bông, và làm tăng sản lượng hạt của các cây được xử lý như lúa nước, lúa mì, cây ngô.

Một hiệu ứng khác ở cây lúa được quan sát khi xử lý với chế phẩm *Azospirillum* trong điều kiện đồng ruộng thời gian qua là cho hạt chín sớm hơn tới 3 ngày. Ngoài ra theo tài liệu đã công bố, *Azospirillum* còn có tác dụng làm biến dạng hoặc làm phân nhánh lông rễ, làm thay đổi cấu trúc tế bào rễ cũng như làm gia tăng tốc độ phân bố proton qua màng tế bào và làm gia tăng tốc độ phân chia tế bào đỉnh rễ.

Một điều tra về sự phân bố của vi khuẩn *Azospirillum* ở đồng bằng sông Hồng cho thấy, trong tổng số 50 mẫu đất từ các tỉnh Hà Nội, Hà Tây, Nam Định, Lào Cai có tới 48 mẫu dương tính với vi khuẩn này, chỉ có 1 mẫu đất luân canh ở Sóc Sơn, Hà Nội (trong số 3 mẫu) và 1 mẫu đất luân canh ở Sa Pa, Lào Cai (trong số 2 mẫu) không thể hiện sự có mặt của *Azospirillum*. Mẫu đất âm tính ở Sóc Sơn được phân tích vào mùa khô, đất không ngập nước và được trồng cây thuốc lá. Số lượng vi khuẩn *Azospirillum* ở đất Sóc Sơn dao động khá lớn, từ khoảng một trăm cho tới hàng chục nghìn đơn vị khuẩn lạc trên 1 gram đất khô. So với đất trồng lúa ngập nước, mật độ vi khuẩn *Azospirillum* đất hoang dại ngập nước luôn thấp hơn; trái lại, mật độ của nhóm vi khuẩn này trong vùng rễ cây lúa trồng và rễ cây lúa mọc hoang dại tương đương nhau. Giống như các kết quả được công bố, mật độ vi khuẩn *Azospirillum* trong vùng rễ cây lúa ở đồng bằng sông Hồng cao hơn nhiều lần so với vùng đất bao quanh, có thể đạt tới 10^6 tế bào trong 1 gram rễ khô. Tỷ lệ giữa vi khuẩn *Azospirillum* và vi khuẩn dị dưỡng tổng số khá thấp; ở cây lúa trồng có giá trị trong khoảng 0,25% - 1,7% và ở cây lúa sống hoang dại là 0,006% - 0,4%.

Hoạt tính cố định nitơ phân tử của một số chủng phân lập trong điều kiện hội sinh với cây lúa CR203 trước hết cho thấy các chủng này không thể khử axetylen thành etylen khi không có

mầm lúa và cho hoạt tính khử khác nhau, chẳng hạn cho hoạt tính 4427 ± 150 nmol C_2H_4 với chủng GI1-2, 1230 ± 154 nmol C_2H_4 với chủng Mat2-1a, 103 ± 59 nmol C_2H_4 với chủng Da2-3-2 / 1mầm lúa/ 10 ngày. Kết quả xác định hoạt tính cố định nitơ phân tử hội sinh giữa một chủng phân lập với các giống lúa khác nhau cho thấy cũng có sự khác nhau. Có ý kiến cho rằng hiện tượng này liên quan tới tính trạng di truyền giống lúa.

5. Nghiên cứu ứng dụng tại Việt Nam

Nhiều thí nghiệm nghiên cứu ứng dụng vi khuẩn *Azospirillum* cho các cây lương thực thuộc họ hòa thảo trong các điều kiện khác nhau đã khẳng định ý nghĩa nông nghiệp của nó. Ngày nay, nhiều nước trên thế giới, trong đó có cả nước phát triển như Cộng hòa Pháp đã cho phép sử dụng vi khuẩn *Azospirillum* vào sản xuất nông nghiệp. Ở Việt Nam đã có các cơ sở khác nhau tiến hành nghiên cứu và ứng dụng nhóm vi khuẩn này vào sản xuất chế phẩm làm tăng năng suất cây lúa, như Bộ môn Vi sinh vật học, Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Việt nam. Sau đây là kết quả nghiên cứu ảnh hưởng chế phẩm hai chủng *Azospirillum* sp. Mat2-1b và DA9-3a lên năng suất lúa của Phòng Vi sinh vật đất, Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia ở một số địa điểm thuộc châu thổ sông Hồng (xem bảng). Ngoài ảnh hưởng lên năng suất hạt, việc xử lý mầm mạ với chế phẩm *Azospirillum* cho thấy cây mạ cứng chắc và lớn hơn, chống chịu rét tốt hơn nếu mạ gặp rét đậm kéo dài (dưới $10^\circ C$). Như đã được đề cập, lúa chín sớm hơn từ 3-5 ngày so với cây lúa không được xử lý với chế phẩm *Azospirillum*.

Bảng 1: Ảnh hưởng chế phẩm hai chủng *Azospirillum* sp. Mat2-1b và DA9-3a lên năng suất lúa

Năm	Địa điểm	Thời vụ	Giống lúa	Diện tích (m ²)	Sản lượng (%)
1991	Vĩnh Ngọc, Đông Đa, Hà Nội	Chiêm	CR203	360	107
	Đại Mỗ, Từ Liêm, Hà Nội	"	"	360	109
	An Khánh, Hoài Đức, Hà Tây	"	"	30	106
1992	"	"	Nếp	30	119
	"	"	CN ₂	30	117
	"	"	V14	30	110
	Đông Ngạc, Từ Liêm, Hà Nội	"	CR203	360	111
1993	"	"	Nếp	360	106
	"	"	CR203	360	116
	Hoàng Liên, Từ Liêm, Hà Nội	"	Nếp	360	115
	"	"	CR203	10000	125
1995	Trung Văn, Từ Liêm, Hà Nội	"	"	360	119
	Đông Ngạc, Từ Liêm, Hà Nội	"	Nếp	360	117
	"	"	CR203	360	105
	Thụy Phương, Từ Liêm, Hà Nội	"	Nếp	360	106
	"	"	CR203	10000	121
	Trung Văn, Từ Liêm, Hà Nội	Mùa	"	360	117
	Đông Ngạc, Từ Liêm, Hà Nội	"	"	360	108
	Thụy Phương, Từ Liêm, Hà Nội	"	Nếp	360	108
	"	Chiêm	CR203	7200	108
	Kim Phú, Yên Sơn, Tuyên Quang	Mùa	Bao thai lùn	14000	125

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

1. Klingmueller, W., 1982. Azospirillum: Genetics, Physiology, Ecology Birkhaeuser Verlag. Basel . Boston . Stuttgart.
2. Klingmueller, W., 1983. Azospirillum II: Genetics, Physiology, Ecology Birkhaeuser Verlag. Basel . Boston . Stuttgart.
3. Klingmueller, W., 1985. Azospirillum III: Genetics. Physiology. Ecology Springer Verlag. Berlin Heidelberg New York Tokyo.
4. Klingmueller, W., 1988. Azospirillum IV: Genetics. Physiology. Ecology Springer Verlag. Berlin Heidelberg New York Tokyo.
5. Nguyễn Ngọc Dũng, 1994. Isolierung und Charakterisierung azospirillenartiger Bakterien aus Reiswurzeln und Reisfeldboeden im Rot-flussdelta. Nordvietnam. Doktorarbeit. Bayreuth Univer-sitaet, Deutschland.
6. Fendrig, I., Del Gallo, M., Vanderleyden, J., M., de Zamaroczy, 1995. Azospirillum VI and related Microorganisms. Genetics. Physiology. Ecology Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
7. Malik, A.M., Sajjad, M.M, Ladha, J.K. 1998. Nitrogen Fixation with Non-Legumes Developments in Plant and soil Sciences. Kluwer Academic Publishers.

SINH HỌC ĐỘC TỔ CÁ NÓC TETRODOTOXIN

TS Lê Quang Huân (*)

1. Quá trình nghiên cứu về Tetrodotoxin
2. Sự phân bố của tetrodotoxin trong các loài sinh vật biển
 - 2.1. Phân bố của độc tố tetrodotoxin
 - 2.2. Các loài cá nóc thường gặp
3. Tính chất của tetrodotoxin
 - 3.1. Tính chất lý học
 - 3.2. Tính chất hoá học
 - 3.3. Độc tính của tetrodotoxin
 - 3.4. Nguồn gốc sinh học của tetrodotoxin
4. Tác dụng dược lý của tetrodotoxin
5. Cá nóc và sự nhiễm độc khi ăn cá nóc
6. Các nghiên cứu sinh học phân tử về cá nóc
 - 6.1. Kích thước hệ gen của cá nóc
 - 6.2. Kiểu nhân (Karyotype)
 - 6.3. Kiểu lặp lại trong trình tự nucleotit của hệ gen cá nóc
7. Các độc tố sinh học biển
8. Những kết quả nghiên cứu về cá nóc tại Việt nam
9. Phụ lục minh hoạ

* *
*

1. Quá trình nghiên cứu về Tetrodotoxin

Cá nóc (*tetraodontidae*) đã được biết tới từ xa xưa, chúng đã xuất hiện ở những bức tranh khắc trong các ngôi mộ của các Paragon Ai Cập vào thế kỷ thứ V trước công nguyên và chắc chắn

(*)Viện Công nghệ Sinh học.

rằng người Ai Cập cổ đã biết cá nóc là động vật có chất độc (Abbott và cs, 1977).

Iwao Tani trong chuyên khảo cuối cùng của mình về sự xuất hiện độc tố trong các loài cá *tetraodontidae*, đã tóm tắt một vài tác phẩm cổ về chất độc của cá Fugu (Tani, 1945). Tham khảo đầu tiên của tác giả là bài viết từ triều Đại Hán (202 B.C.-A.D.220) được dịch là “Gan cá salmon giết một người. Từ salmon trong tác phẩm Trung Hoa cổ đại có nghĩa là Fugu. Trong luận án của Chaun Yanfang viết vào triều đại vua Sui (A.D. 581-681) “Nghiên cứu nguồn gốc của bệnh tật” đã đưa ra những bằng chứng đáng tin cậy về chất độc có trong gan, trứng và noãn của một số loài cá mà qua mô tả thì đó là Fugu.

Kaempfer E. trong tác phẩm nổi tiếng của mình “Lịch sử nước Nhật, 1727” dựa trên kinh nghiệm những năm làm bác sĩ của mình tại đại sứ quán Hà Lan và cung điện Hoàng Gia Nhật Bản từ 1620-1692 đã đưa ra một vài chi tiết về chất độc của ba loài cá gọi là “Furube” (theo tiếng Nhật), hoặc “Blazer” (theo tên gọi của người Hà Lan). Chúng được xếp vào loài cá độc và nếu ăn cả con thì không tránh khỏi cái chết (Kaempfer, 1906).

Tetrodotoxin (TTX) là một độc tố thần kinh mạnh lần đầu tiên được tách chiết từ các loài cá nóc vào những năm 50 của thế kỷ 20 dưới dạng mẫu thô chứa 0,2% TTX (Yokeo và cs., 1950, Tsuda và cs., 1952, Goe và cs, 1953 ; Kao, 1966). Sau đó TTX được xác định trong các loài động vật biển khác: các loài kỳ nhông thuộc họ *Taricha* (1966), cá bống *Gobius griniger* (1973), các loài ếch nhái thuộc họ *Atelopus* ở Costa Rica (1975), Bạch tuộc tua xanh *Hapalochlaena maculosa* (1978), ba loài phúc túc *Charonia sauliae* (1981) ; *Babylonia japonica* (1981) ; *Tatufa*

lissostoma (1982), sao biển *Astropecten polyacanthus* (1983); của biển *Atergatis floridus* (1983).

Năm 1964, Mosher H.S. và cs. đã nghiên cứu cấu trúc phân tử của tetrodotoxin và đề xuất công thức phân tử là $C_{11}H_{17}O_8N_3 \cdot 1/2H_2O$. Những thập niên cuối của thế kỷ 20 nhiều nhà khoa học trên thế giới, đặc biệt là các nhà khoa học Nhật Bản đã có nhiều công trình nghiên cứu về tính chất hoá học, lý học, tác dụng dược lý cũng như quá trình sinh tổng hợp TTX, đáng chú ý nhất là các công trình nghiên cứu của Goto, Fuhsman, Mosher, Fischer.

Như vậy vấn đề ngộ độc cá nóc do độc tố TTX đã được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm, nhiều công trình nghiên cứu đã được tiến hành từ những năm 50 của thế kỷ trước nhằm mục đích khai thác sử dụng TTX, đồng thời ngăn ngừa, hạn chế và điều trị các trường hợp ngộ độc do ăn cá nóc.

2. Sự phân bố của tetrodotoxin trong các loài sinh vật biển

2.1. Phân bố của độc tố tetrodotoxin

Nhiễm độc tố thần kinh tetrodotoxin xảy ra sau khi ăn các loài cá nóc khác nhau. Thịt cá nóc được xem là loại thực phẩm ngon, có giá trị ở Nhật Bản. Món ăn này phải do đầu bếp được đào tạo đặc biệt và có giấy chứng nhận của chính phủ về việc chế biến thịt cá nóc không nhiễm độc. Mặc dù có những biện pháp phòng ngừa như vậy, song hàng năm vẫn có nhiều trường hợp ngộ độc do ăn thịt cá nóc được thông báo. Nhiễm độc thường xảy ra sau khi ăn thịt cá nóc do những người không chuyên chế biến. Lượng độc tố thường không rõ ràng bởi vì cá nóc có hàm lượng TTX rất khác nhau. Ngộ độc dẫn tới tử vong khi ăn khoảng 30-40gam cá nóc

độc. Lượng độc tố gây tử vong là 1-2mg TTX tùy theo trọng lượng cơ thể.

Từ tetrodotoxin được gọi theo tên của họ cá nóc *tetraodontidae*, các loài cá trong họ này thường có 4 răng, 2 răng hàm trên và 2 răng hàm dưới tạo thành các tấm. Một điều nghịch lý là rất nhiều tài liệu công bố đã khẳng định là cá nóc không tổng hợp tetrodotoxin mà độc tố này lại được tổng hợp bởi các loài vi khuẩn liên quan tới các loài cá nóc này. TTX còn được gọi là anhydrotetrodotoxin 4-epitetrodotoxin, tetrodonic acid.

TTX được tìm thấy trong các loài ốc biển (*gastropod mollusc*), trong trứng của một số loài sam biển (*horseshoe crabs*), ếch (*Atelopid frogs*), ságiông (newts *Taricha*), trong da và nội tạng của một số loài cá biển (*porcupine fish, globefish, balloon fish, blowfish, sunfish, toadfish*), bạch tuộc tua xanh (*blue-ringed octopus*) và một số loại kỳ giông (*salamanders*), cua biển (*red-eyed Xanthid*) (xem Phụ lục minh họa).

Các loài cá nóc được phân loại thuộc các họ (Family) Tetraodontidae; họ Triodontidae và họ Diodontidae, thuộc bộ (order) Tetraodontiformes, nhưng chỉ có cá nóc thuộc họ Tetraodontidae là có chứa độc tố Tetrodotoxin. Cá nóc thuộc hai họ sau (Triodontidae và Diodontidae) không chứa độc tố tetrodotoxin.

2.2. Các loài cá nóc thường gặp

Bộ: Tetraodontiformes

Họ: Tetraodontidae

Amblyrhynchotes honkenii (Bloch 1785)

Amblyrhynchotes rufopunctatus (Li 1962).

Arothron carduus (Cantor 1849).

Arothron diadematus (Ruppell 1829).
Arothron gillbanksii (Clarke 1897).
Arothron hispidus (Linnaeus 1758),
Arothron immaculatus (Bloch & Schneider 1801),
Arothron leopardus (Day 1878).
Arothron caeruleopunctatus (Matsuura 1994)
Arothron firmamentum (Temminck & Schlegel 1850)
Arothron hispidus (Linnaeus 1758)
Arothron immaculatus (Bloch & Schneider 1801)
Arothron inconditus (Smith 1958)
Arothron manilensis (de Proce 1822).
Arothron mappa (Lesson 1830)
Arothron meleagris (Bloch & Schneider 1801)
Arothron nigropunctatus (Bloch & Schneider 1801)
Arothron reticularis (Bloch & Schneider 1801)
Arothron stellatus (Bloch & Schneider 1801)
Canthigaster amboinensis (Bleeker 1865)
Canthigaster bennetti (Bleeker 1854)
Canthigaster callisterna (Ogilby 1889)
Canthigaster compressa (de Procô 1822)
Canthigaster coronata (Vaillant & Sauvage 1875)
Canthigaster epilampra (Jenkins 1903)
Canthigaster investigatoris (Annandale & Jenkins 1910)
Canthigaster jactator (Jenkins 1901)
Canthigaster janthinoptera (Bleeker 1855)
Canthigaster leoparda (Lubbock & Allen 1979)
Canthigaster margaritata (Ryppell 1829)
Canthigaster ocellicincta (Allen & Randall 1977)
Canthigaster punctatissimus (Günther 1870)
Canthigaster rivulata (Temminck & Schlegel 1850)

Canthigaster rostrata (Bloch 1786)
Canthigaster smithae (Allen & Randall 1977)
Canthigaster solandri (Richardson 1844)
Canthigaster tyleri (Allen & Randall 1977)
Canthigaster valentini (Blecker 1853)
Chelonodon laticeps (Smith 1948)
Chelonodon patoca (Hamilton 1822)
Chelonodon pleurospilus (Regan 1919)
Colomesus psittacus (Bloch & Schneider 1801)
Contusus brevicaudus (Hardy 1981).
Contusus richiei (Frôminville 1813)
Ephippion guttifer (Bennett 1831)
Feroxodon multistriatus (Richardson 1854)
Guentheridia formosa (Günther 1870)
Lagocephalus gloveri (Abe & Tabeta 1983)
Lagocephalus inermis (Temminck & Schlegel 1850)
Lagocephalus laevigatus (Linnaeus 1766)
Lagocephalus lagocephalus (Linnaeus 1758)
Lagocephalus lunaris (Bloch & Schneider 1801)
Lagocephalus scleratus (Gmelin 1789)
Lagocephalus spadiceus (Richardson 1845)
Omegophora armilla (Waite & McCulloch 1915)
Sphoeroides angusticeps (Jenyns 1842)
Sphoeroides annulatus (Jenyns 1842)
Sphoeroides dorsalis (Longley 1934)
Sphoeroides greeleyi (Gilbert 1900)
Sphoeroides kendalli (Meek & Hildebrand 1928)
Sphoeroides lobatus (Steindachner 1870)
Sphoeroides maculatus (Bloch & Schneider 1801)
Sphoeroides marmoratus (Lowe 1838)

Sphoeroides nephelus (Goode & Bean 1882)
Sphoeroides pachygaster (Müller & Troschel 1848)
Sphoeroides parvus (Shipp & Yerger 1969)
Sphoeroides sechurae (Hildebrand 1946)
Sphoeroides spengleri (Bloch 1782)
Sphoeroides testudineus (Linnaeus 1758)
Sphoeroides trichocephalus (Cope 1870)
Takifugu chinensis (Abe 1949)
Takifugu exascurus (Jordan & Snyder 1901)
Takifugu niphobles (Jordan & Snyder 1901)
Takifugu oblongus (Bloch 1786)
Takifugu pardalis (Temminck & Schlegel 1850)
Takifugu porphyreus (Temminck & Schlegel 1850)
Takifugu radiatus (Abe 1947)
Takifugu rubripes (Temminck & Schlegel 1846)
Takifugu stictonotus (Temminck & Schlegel 1850)
Takifugu vermicularis (Temminck & Schlegel 1850)
Takifugu xanthopterus (Temminck & Schlegel 1850)
Tetraodon duboisi (Poll 1959)
Tetraodon fluviatilis (Hamilton 1822)
Tetraodon leiurus (Bleeker 1851)
Tetraodon lineatus (Linnaeus 1758)
Tetraodon mbu (Boulenger 1899)
Tetraodon miurus (Boulenger 1902)
Tetraodon nigroviridis (Marion de Proce 1822)
Tetraodon pustulatus (Murray 1857)
Tetraodon schoutedeni (Pellegrin 1926)
Torquigener brevipinnis (Regan 1903)
Torquigener hicksi (Hardy 1983)
Torquigener hypselogeneion (Bleeker 1852)

Torquigener pallimaculatus (Hardy 1983)

Torquigener parcuspinus (Hardy 1983)

Torquigener pleurogramma (Regan 1903)

Torquigener tuberculiferus (Ogilby 1912)

Torquigener whitleyi (Paradice 1927)

Tylerius spinosissimus (Regan 1908)

3. Tính chất của tetrodotoxin

3.1. Tính chất lý học

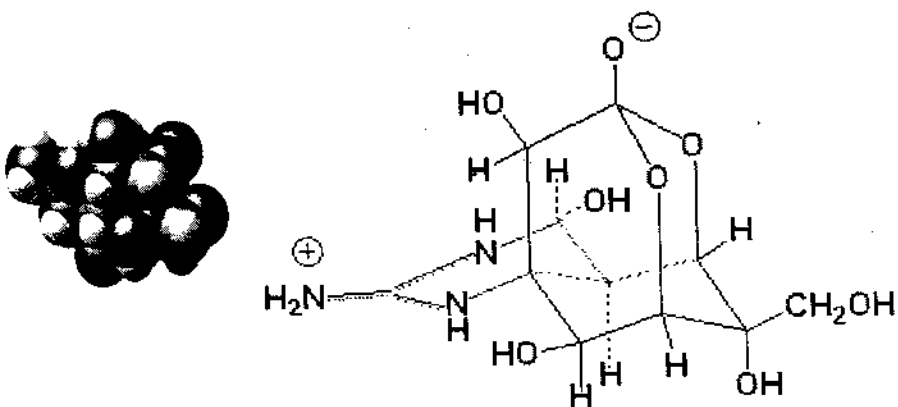
TTX là một chất rắn kết tinh màu trắng. Sẫm màu ở nhiệt độ trên 220°C nhưng không nóng chảy (Mosher, 1987). TTX ít hoà tan trong nước và không hoà tan trong các dung môi thông thường, ngoại trừ các dung môi axit, không bền trong môi trường kiềm và axit mạnh (Goto, 1965). TTX thể hiện tính bazơ yếu $pK_a=8,76$.

TTX không hấp thụ ánh sáng hồng ngoại với $\lambda=1690-2000\text{cm}^{-1}$, không hấp thụ với bước sóng trên 220nm. Các dẫn xuất quan trọng của TTX là: Các dẫn xuất quinazolin, tetrodoic axit, anhydroepitetrodotoxin, nortetrodotoxin, anhydrotetrodoic axit.

3.2. Tính chất hoá học

TTX ($C_{11}H_{17}O_8N_3 \cdot 1/2H_2O$) là một bazơ yếu ($pK_a=8,76$), dạng tinh thể hydrobromide tan trong nước và có thể thu lại bằng sự tương tác với amonia. Cả 2 axit: tetrodoic axit, anhydrotetrodoic axit đều có thể thu nhận từ TTX bằng sự tương tác với dung dịch 5% $Ba(OH)_2$.

TTX có cấu trúc lưỡng tính. Cấu trúc này phù hợp với các tính chất lý, hoá của TTX, nó giải thích khả năng kém hoà tan trong nước của TTX.



Tetrodotoxin

3.3. Độc tính của tetrodotoxin

Tetrodotoxin (TTX) là một trong số các phân tử có khả năng phong toả các kênh ion natri nhạy cảm trong tế bào. TTX có cấu trúc phức tạp với nửa guanidinium. Ion guanidinium có thể xâm nhập vào tế bào thông qua kênh Na^+ . Độc tính của TTX cao hơn độc tính của nọc độc rắn cạp nong là 10 lần, nọc độc của nhện độc từ 10 đến 100 lần và độc hơn cyanua khoảng 10 000 lần.

3.4. Nguồn gốc sinh học của tetrodotoxin

Các nghiên cứu mới đây của David Berkowitz và Ilona Kryspin Sorensen đã chứng minh nguồn gốc vi sinh vật của TTX bởi vì :

- Cá nóc nuôi không tạo độc tố TTX nếu không cho chúng ăn các mô cá nóc khác có chứa độc tố.

- Bạch tuộc tua xanh tìm thấy trong vùng biển của Úc tích tụ TTX trong tuyến nước bọt đặc biệt và tiêm độc tố vào con mồi qua các vết cắn, loài bạch tuộc này chứa các vi sinh vật tổng hợp TTX.

- Cua biển thu thập ở vùng biển này cũng chứa TTX.

Điều rõ ràng là vi sinh vật biển có sự sống cộng sinh hàng triệu năm về trước với các loài cá nóc, các loài động vật biển đã thúc đẩy đột biến điểm trong các thụ thể kênh ion natri làm cho các loài cá nóc và động vật biển này miễn dịch đối với TTX. Sự thích ứng như vậy cũng xảy ra đối với các độc tố khác như saxitoxin, ciguatera... Các chủng vi sinh vật có khả năng tổng hợp độc tố TTX và anhydrotetrodotoxin thuộc một số họ *Vibrionaceae* *q.v.*, *Pseudomonas sp.*, and *Photobacterium phosphoreum*. Những khám phá này đã kích thích sự nghiên cứu cơ chế phân tử của sự phong tỏa kênh ion Na^+ , bản chất phân tử, những thay đổi về cấu trúc của các thụ thể tiếp nhận TTX trên kênh Na^+ của các động vật biển mang TTX nhưng lại miễn dịch đối với độc tố này.

4. Tác dụng dược lý của tetrodotoxin

Lần đầu tiên con người sử dụng dược liệu giàu độc tố TTX để chữa bệnh (trứng cá puffer fish) được ghi trong tài liệu y học Trung Quốc từ năm 2838-2696 trước công nguyên. Trứng cá nóc được xác nhận như một dược liệu phòng ngừa có hiệu quả và điều trị các trạng thái xơ cứng động mạch và viêm cơ (Murtha, 1958). Tuy nhiên cũng xác nhận rằng tác dụng điều trị của trứng cá phụ thuộc vào nồng độ sử dụng và trạng thái cơ thể của người bệnh, dùng số lượng trứng cá lớn sẽ gây tử vong.

Khi độc tố cá nóc hay độc tố của sa giông tiêm vào động vật gây ra sự co cơ, làm giảm huyết áp và tê liệt, sau đó ngưng thở. Đối với chuột bạch thí nghiệm thì cái chết có thể xảy ra trong vòng 30 giây sau khi tiêm một lượng lớn, thậm chí độc tố tiêm dưới da mạnh như tiêm tĩnh mạch. Đối với chuột dấu hiệu đầu tiên của sự co cơ là đáng vẻ loạn choạng, lảo đảo và nhảy dật ngược.

TTX là một trong những chất gây nôn mạnh nhất đã được biết : Sự nôn mửa xảy ra ở chó sau khi tiêm vào tĩnh mạch một liều $\leq 0,3\mu\text{g/kg}$ (Ray, 1965). Những liều cao $1-5\mu\text{g/kg}$ tiêm cho mèo, chó gây ra sự giảm huyết áp trong vài giây sau đó cơ bắp bắt đầu giảm và mất phản ứng khi kích thích gây thần kinh vận động của nó, cuối cùng là sự ngưng thở và co cứng toàn thân (Hwang và cs, 1988 ; Takata và cs, 1965; Narahashi và cs, 1964).

TTX với liều thấp ($0,1-10\mu\text{g/lít}$) làm cản trở sự truyền các xung động thần kinh trong ếch khi tiêm trực tiếp vào thần kinh và ngăn cản sự kích thích thần kinh bằng nguồn điện (Saito và cs, 1984).

5. Cá nóc và sự nhiễm độc khi ăn cá nóc

Hiện tượng ngộ độc cá nóc ở người đã được thuyền trưởng James Cook mô tả kỹ trong nhật trình của chuyến đi vòng quanh thế giới lần thứ 2 của mình ngày 8/9/1774. Người đầu bếp đã kiếm được một con cá, đây là một loài cá mới nên được mô tả rất kỹ trước khi chuẩn bị bữa tối. Thuyền trưởng ghi “*Rất may cho chúng tôi là việc giải phẫu và mô tả mất quá nhiều thời gian, kéo dài mãi đến đêm nên chỉ đem nấu được gan và buồng trứng. Mr. Forster (nhà tự nhiên học của đoàn thám hiểm) và tôi chỉ ăn rất ít. Đến khoảng 3-4 giờ sáng chúng tôi bị co cứng lại, rã rời các chi, có cảm giác tay bị chặt đứt và chân đang từ lạnh cóng bước vào đông*”

lửa. Tôi hầu như mất hết nhận thức và không thể phân biệt giữa một vật nặng và một vật nhẹ. Trong tay tôi một bình nước đầy và một chiếc lông chim là như nhau. Cả hai chúng tôi đều nôn và sau đó mồ hôi vã ra. Sáng hôm sau phát hiện một trong số lợn ăn bộ lông cá đã chết. Khi những người địa phương (vùng tân đảo Caledonia) thấy chúng tôi phơi cá này họ đã vô cùng ngạc nhiên và cho biết cá này không ăn được”.

Vấn đề ngộ độc do ăn cá nóc là nguyên nhân gây tử vong ở nhiều vùng trên thế giới: ở Nhật Bản, năm 1957 có 176 trường hợp bị ngộ độc trong đó có 90 người bị chết (Halstead, 1965, Harada, 1979). Từ năm 1974 đến 1983 ở Nhật Bản có 646 người bị ngộ độc cá nóc, trong đó có 179 người bị tử vong. Nhiều trường hợp ngộ độc do ăn cá nóc đã xảy ra ở vùng biển New England (Sievers, 1969) hoặc ở một số địa phương thuộc vùng biển Miền Trung Việt Nam. Đặc biệt trong thời gian gần đây hiện tượng ngộ độc do ăn cá nóc không chỉ xảy ra ở các vùng ven biển Việt Nam mà còn xảy ra ở các vùng núi xa xôi như Tây Nguyên, thậm chí ngay cả trên địa bàn Hà Nội do ăn cá nóc khô hoặc tươi.

Người bị ngộ độc do ăn cá nóc thường thấy những triệu chứng khác thường sau 2-14 giờ, tùy theo tạng người, số lượng cá ăn và loài cá ăn phải. Trường hợp ngộ độc nặng triệu chứng xuất hiện sau khoảng 30 phút : nạn nhân thường bị tê môi, tê lưỡi, cảm giác kiến bò ở đầu ngón tay, ngón chân, tiếp theo là nôn mửa, đầu choáng váng, đau đớn khó chịu ở vùng trán và trong lòng con mắt đồng tử giãn nở, tay chân bị tê liệt, da tím ngắt, nhiệt độ cơ thể giảm và tụt huyết áp. Trong vòng 2 giờ nếu không cứu chữa bệnh nhân hoàn toàn tê bại, cứng hàm dưới, tuy người tỉnh táo và bệnh nhân chỉ bất tỉnh, mê man ngay trước khi chết. Nguyên nhân chính

là do tê liệt hô hấp. Tỷ lệ tử vong do ngộ độc cá nóc lên tới 60% trong vòng 1-24 giờ sau khi ăn phải cá nóc độc. Nếu bệnh nhân qua được 24 giờ thì huy vọng có thể cứu sống (Đỗ Tất Lợi, 1991, Ogura, 1971).

6. Các nghiên cứu sinh học phân tử về cá nóc

Các nhà nghiên cứu đã hoàn thành việc xác định trình tự hệ gen người cùng với việc hoàn thành bản thảo trình tự toàn bộ hệ gen cá nóc. Mặc dù hệ gen cá nóc về cơ bản chứa cùng các gen và các trình tự điều khiển giống như hệ gen người, nhưng hệ gen cá nóc mang các gen và các trình tự điều khiển với khoảng 365 triệu bazơ so với 3 tỷ bazơ trong hệ gen của người. Điều này được gọi là "Junk DNA", các gen tìm được và các trình tự điều khiển trong hệ gen cá nóc có thể dễ dàng thực hiện chức năng hơn rất nhiều so với các gen, các trình tự điều khiển trong cơ thể người. Các thông tin này có thể sử dụng để nhận diện các yếu tố tương đồng trong hệ gen người. Trình tự phác thảo hệ gen cá nóc là những công bố đầu tiên về hệ gen động vật.

6.1. Kích thước hệ gen của cá nóc

Năm 1968, Hinegardner R. đã xác định hàm lượng ADN trong tế bào của hơn 300 loài cá khác nhau và đã nhận thấy rằng các loài cá nóc *Tetraodon* có hàm lượng ADN trong mỗi tế bào rất thấp, khoảng 0,8 picogram. Lượng ADN có thể tương đương với 380 Mb (mega bazơ). Các nghiên cứu gần đây của Lamatsh và cs. cho thấy *Tetraodon* có hàm lượng ADN khoảng 0,7 picogram tương đương với hệ gen đơn bội 350 Mb. Các kết quả nghiên cứu này cho thấy rằng *Tetraodon* có hệ gen nhỏ nhất trong số các động

vật có xương sống, hệ gen của *Tetraodon* nhỏ hơn hệ gen của người khoảng 8 lần.

6.2. Kiểu nhân (Karyotype)

Hệ gen của *Tetraodon* được cấu tạo bởi 21 cặp nhiễm sắc thể. Dựa vào kết quả đo cặp nhiễm sắc thể ở giai đoạn metaphase, người ta đã xác định được kích thước của nhiễm sắc thể trong khoảng từ 3Mb đến 11Mb. Như vậy cặp nhiễm sắc thể lớn nhất của *Tetraodon* vẫn còn nhỏ hơn cặp nhiễm sắc thể nhỏ nhất của người.

6.3. Kiểu lặp lại trong trình tự nucleotit của hệ gen cá nóc

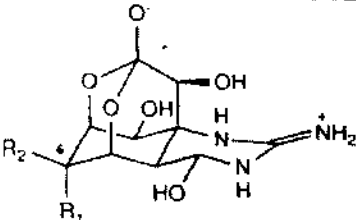
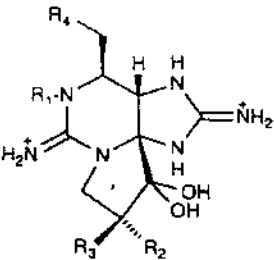
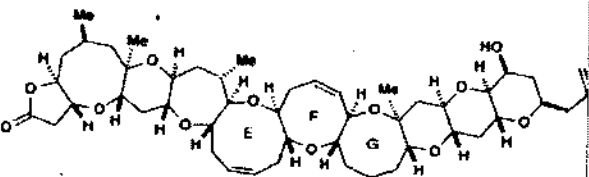
Sự lặp lại trong trình tự nucleotit của *Tetraodon* được phân tích chi tiết trên trình tự khoảng 50Mb của đầu BAC. Hai trình tự tiểu vệ tinh (satellite) đã được xác định, một trình tự lặp có kích thước 118bp đã được xác định trong vùng trung tâm (centromeres) và một tiểu vệ tinh (satellite) kích thước 10bp định vị trong phía cánh ngắn của 10 cặp nhiễm sắc thể nhỏ. Sau đây là các kiểu lặp lại khác nhau trong hệ gen của *Tetraodon*.

Bảng tổng hợp các kiểu lặp lại trong trình tự nucleotit của hệ gen *Tetraodon*

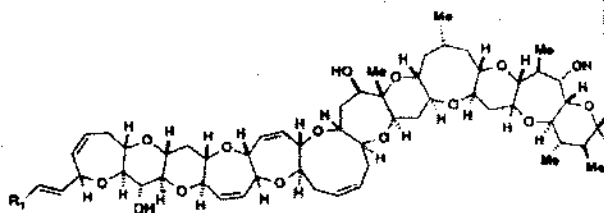
rRNA (18S-5.8S-28S và 5S)	0.77 %
Tiểu hành tinh (Microsatellites)	3.21 %
118 bp centromeric satellite	0.34 %
10 bp subtelocentric satellite	0.54 %
Hành tinh nhỏ (Minisatellite)	0.41 %
Các yếu tố có thể chuyển dịch (Transposable elements)	0.90 %
Tổng cộng	6.17 %

7. Các độc tố sinh học biển

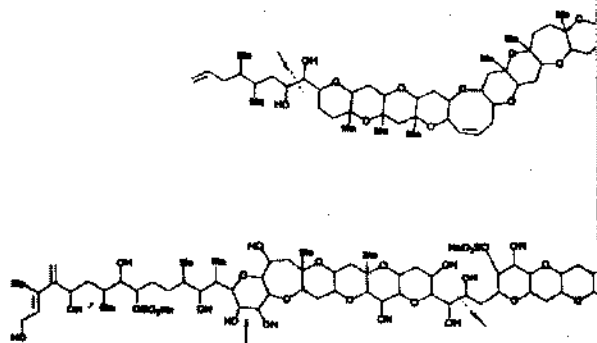
Một số độc tố mạnh trong các loại động vật biển đáng chú ý có thể kể tới như sau :

1. Tetrodotoxin	
2. Saxitoxin	
3. Brevetoxin	

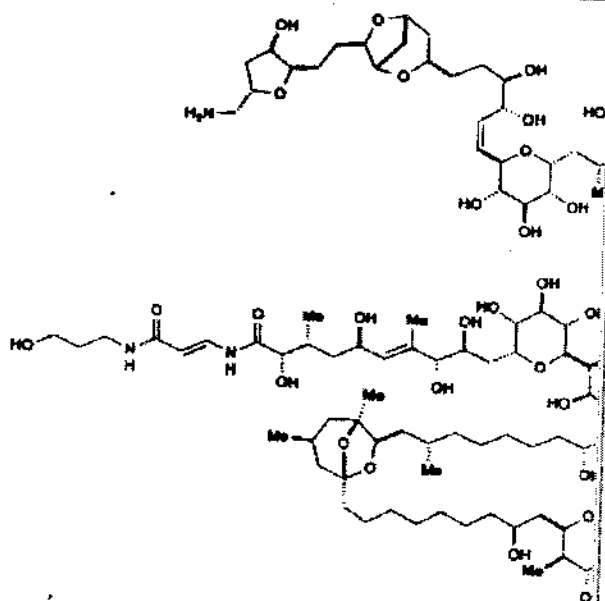
4. Ciguatoxin



5. Maitotoxin



6. Palytoxin



8. Những kết quả nghiên cứu về cá nóc tại Việt nam

Ở Việt nam vấn đề nghiên cứu độc tố, tách chiết và tính chế TTX từ các loài cá nóc và những động vật biển đã được tiến hành trong phòng thí nghiệm của chúng tôi từ những năm 90 của thế kỷ trước dưới sự lãnh đạo của GS.TSKH Lê Xuân Tú. Mục tiêu của các nghiên cứu này là khai thác nguồn độc tố TTX từ gan, nội tạng của các loài cá nóc đánh bắt được tại các vùng biển Miền Trung Việt nam để sử dụng trong y học.

Chúng tôi đã xây dựng được quy trình tách chiết độc tố TTX phù hợp và đã xác định được hàm lượng độc tố trong các loài cá nóc khác nhau được đánh bắt tại vùng biển Miền Trung Việt nam.

Các loài cá nóc có hàm lượng độc tố cao theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi (Lê quang Huân và cs, 1993 ; 1994 ; 1995 ; Lê Xuân Tú và cs, 1994) đó là cá nóc sê lê xanh (*Tetraodon sceleratus*), cá nóc thu (*T. ocelatus*), cá nóc mú (*T. stellatus*), cá nóc vàng (*T. xanthopterus*).

Các loài cá nóc được đánh bắt với lượng lớn vào mùa xuân và mùa hạ, tức là từ tháng 2 đến tháng 8 hàng năm tại các tỉnh Miền trung Việt nam, đặc biệt là vùng biển tỉnh Khánh Hoà.

9. Phụ lục minh họa

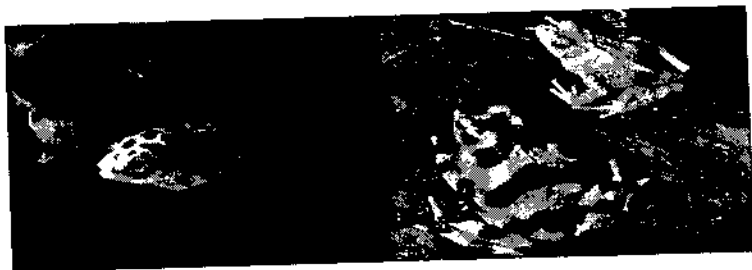
Các loài động vật biển chứa độc tố tetrodotoxin



Red-eyed Xanthid



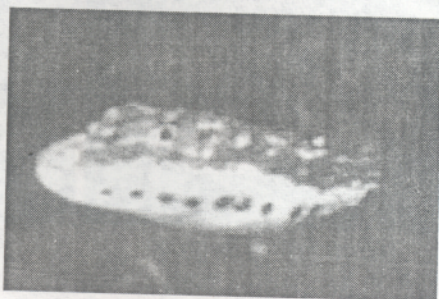
Tetraodontidae



Blue-ringed octopus

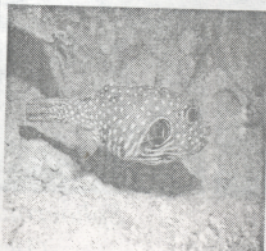
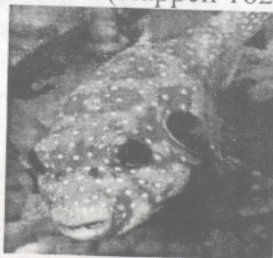
Atelopid frogs

Ảnh của một số loài cá nóc chứa độc tố tetrodotoxin

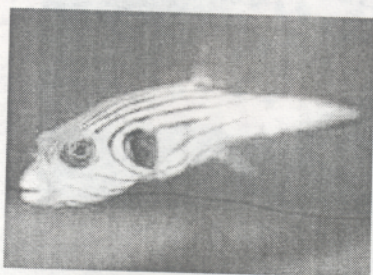


Arothron diadematus
(Ruppell 1829)

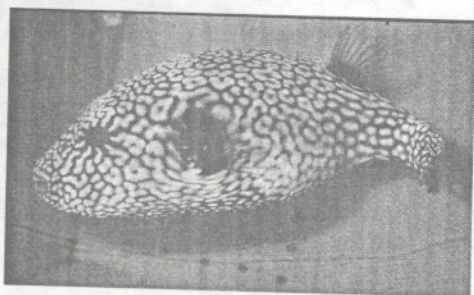
Sphoeroides spengleri
(Bloch 1785)



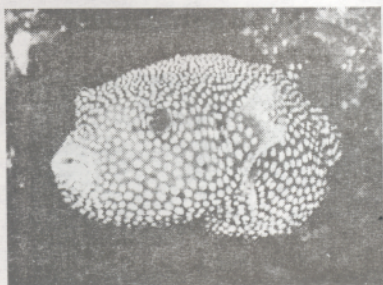
Arothron hispidus Hawai'i và *Arothron hispidus* (Linnaeus 1758)



Arothron manilensis
(de Proce 1822)



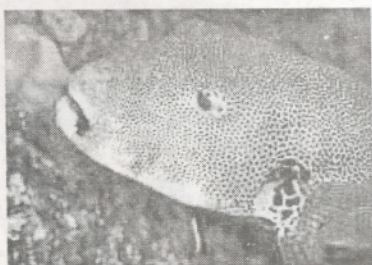
Arothron mappa
(Lesson 1831)



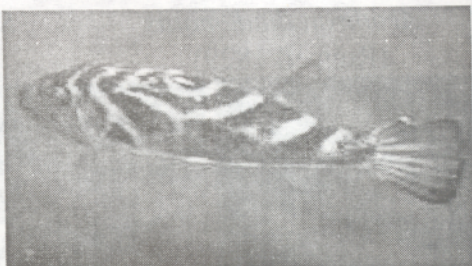
Arothron meleagris
(Lacepede 1798)



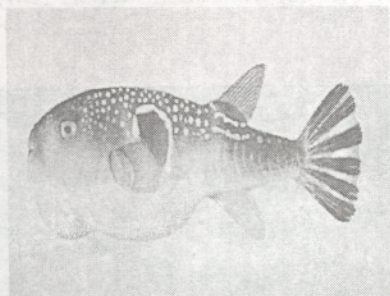
A. nigropunctatus
(Bloch & Schneider)



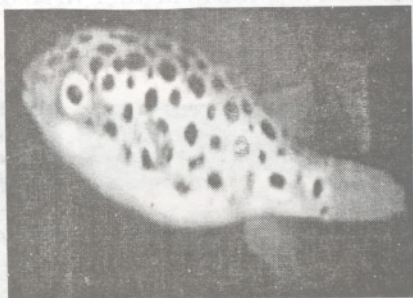
A. stellatus
(Bloch & Schneider 1801)



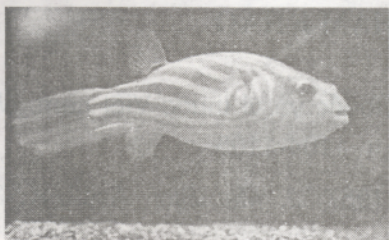
Sphoeroides annulatus
(Jenyns 1842)



Fugu rubripes
(Bloch & Schneider 1801);



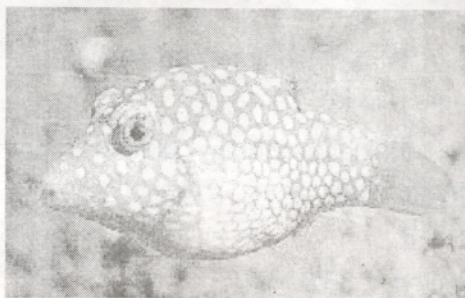
Tetraodon nigroviridis



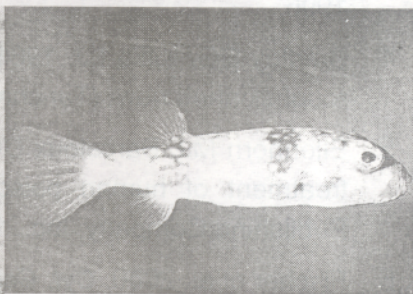
Tetraodon lineatus
(Annie Komarisky)



Tetraodon mbu
(Ian Smith)



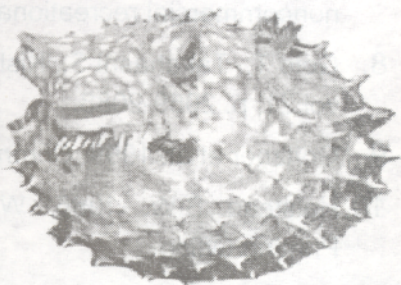
Canthigaster jactator



Chelonodon laticeps
(Vincent B. Hargreaves)



Diodon holocanthus (Vincent B. Hargreaves)



TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi, 1991, Những cây thuốc và vị thuốc Việt nam. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, tr. 1104-1105.
2. Abbot B.C. and Ballantine D., 1957. *J. Mar Biol. Ass. U.K.* 36, p.169
3. Anonymous. Poisindex toxicologic managements. Vol 88: tetrodotoxin. Englewood, Colorado: Micromedex, Inc., 1974-1996.
4. Bradley SG, Kilka LJ. 1981. A fatal poisoning from the Oregon roughskinned newt (*Taricha granulosa*). *JAMA* 246:247.
5. Ellenhorn MJ, Barceloux DG. Medical toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning. New York: Elsevier Science Publishing Company, Inc., 1988.
6. Fischer et al. 2000. *Cyt. Cell Genet.* 88:50-55.
7. Gellert GA, Ralls J, Brown C, Huston J, Merryman R. 1992. Scombrotoxic fish poisoning: underreporting and prevention among noncommercial recreational fishers. *West J Med* 157:645-7.
8. Goto T., Takahashi S., Kishi Y. and Hirata Y. 1965. *Tetrahedron*, vol.21, p. 2059-2088.
9. Grützner et al. 1999. *Chromosome Res.* 7:655-662.
10. Halstead B.W. 1965, Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office.
11. Halstead BW. Dangerous marine animals: that bite-sting-shock-are non-edible. Cambridge, Maryland: Cornell Maritime Press, 1959.
12. Harada Y, 1979. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 20, p.437.

13. Hinegardner, R. *Am. nat.* 102:517-523 (1968)
14. Hwang D.F., Arakawa O., Saito T., Noguchi T., Simsd U., Tsukamoto, Shida Y. and Hashimoto T., 1989. *Marine Biology*, vol. 100 (3), p. 327-332.
15. Kaempfer E., 1906, J.E. Scheuchzer. Transl. (Maclenos, Glasgow), Vol.1, p.217-223
16. Kao C.Y., 1966. *Pharmac. Rev.* vol. 18, p. 997
17. Karalliedde L 1995. Animal toxins. *Br J Anaesth* 74(3): 319-27
18. Kim S. Food poisoning: fish and shellfish. In: Olson KR, ed. *Poisoning and drug overdose*. 2nd ed. Norwalk, Connecticut: Appleton and Lange, 1994.
19. Lê Quang Huấn, Lê Xuân Tú, 1994. *Tạp chí sinh học*, 16(3), tr. 38-41
20. Lê Quang Huấn, Lê Xuân Tú, 1995. *Tạp chí khoa học và công nghệ*, số 2 tr.9-15
21. Lê Xuân Tú, Lê Quang Huấn, 1994. First East Asian Symposium on Biophysics. Harima Science Garden City Hyogo, Japan, May 16-20, p.87.
22. Lê Xuân Tú, Lê Quang Huấn, Phan Văn Đoàn, 1993. *Tạp chí sinh học*, 15(1), 39-40.
23. Lamatsh et al. *Cytometry* 39:91-95 (2000)
24. Lange WR 1990. Puffer fish poisoning. *Am Fam Physician* 42(4): 1029-33.
25. Mills AR, Passmore R 1988. Pelagic paralysis. *Lancet* 23; 1(8578): 161-4.
26. Mosher H.S., 1987. *Ann. N.Y. Ac. Sci.* vol. 479, p. 32-43.

27. Mosher H.S., Fuhrman F.A., Buchwald H.D., Fisher H.G., 1964. *Science*, vol.144, p.100.
28. Murtha E.F., Stabile D.E. and Wills J.H., 1958. *J. Pharmacol.* vol.122, p. 247-254.
29. Narahashi T., Moore J.W. and Scott W., 1964. *J. Gen. Physiol.* vol. 47, p.965.
30. Ogura Y., 1971, In: Neuropoisons, their Pathophysiological Actions, vol. 1, p.139.
31. Ray S.M., and Aldrich D.V. 1965. *Science*, vol.148, p. 1748.
32. Rivera VR, Poli MA, Bignami GS. 1995. Prophylaxis and treatment with a monoclonal antibody of tetrodotoxin poisoning in mice. *Toxicon* 33(9): 1231-7.
33. Roest Crolius et al. 2000. *Genome Research* 10:939-949.
34. Saito T., Maruyama J., Kanoh S., Jeon J.K., Noguchi T., Harada T., Murata O. and Hashimoto K., 1984, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific fisheries*, vol50, p.1573-1575.
35. Sievers A.M. 1969. *J. Protozool*, vol.16, p.401.
36. Takata M., Moore J.W., Kao C.Y. and Fuhrman F.A., 1965. *J. Gen. Physiol.*, vol. 49, p.977.
37. Tsuda K., Kawamura M. and Hayatsu R., 1960, *J.Chem. Pharm. Bull. Japan*, vol.8, p. 257.
38. Yokoo A., 1950. *J. Chem. Soc. Japan*, vol. 71, p. 590.

SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA PLASMID

PHÂN GIẢI CHẤT ĐỘC HỮU CƠ

VÀ ĐỀ KHÁNG I-ON KIM LOẠI

TS Lê Thanh Hoà ()*

1. Giới thiệu vi khuẩn *Pseudomonas putida* và plasmid phân giải chất độc hữu cơ
2. Các phương thức phân giải chất độc hữu cơ có các plasmid phân giải tham gia
3. Cơ chế phân tử của quá trình phân giải chất độc hữu cơ
4. Plasmid của sự đề kháng i-on kim loại

* *

*

Cũng như nhiều loại vi sinh vật, vi khuẩn là một loại vi sinh đơn bào, trong đó hệ gen của chúng chứa nhiều gen chịu trách nhiệm tổng hợp nhiều loại sản phẩm khác nhau cho quá trình sống, sinh trưởng và phát triển của chúng. Điều hết sức đặc biệt là có rất nhiều gen cực kỳ quan trọng của vi khuẩn lại không nằm trong hệ gen của chúng mà định vị trên những vòng ADN tách biệt, nằm rải rác trong nguyên sinh chất của vi khuẩn gọi là các plasmid. Plasmid là một phân tử ADN có cấu trúc khép lại thành vòng tròn độc lập, có khả năng tồn tại và nhân lên một cách độc lập với hệ gen của tế bào chủ và tương tác hoạt động một cách vững bền với tế bào chủ. Giữa chúng và hệ gen tế bào chủ có những sự tương tác cộng sinh chi phối lẫn nhau. Do vậy plasmid

(*)Viện Công nghệ Sinh học.

của loại vi khuẩn nào chỉ thích ứng với loại vi khuẩn đó (xem sách : “*Sinh học phân tử của plasmid : bản chất và ứng dụng*” của Lê Thanh Hoà, 2002). Nhiều đặc tính sinh học quan trọng của vi khuẩn lại hoàn toàn do plasmid cộng sinh trong vi khuẩn đảm nhiệm.

1. Giới thiệu vi khuẩn *Pseudomonas putida* và plasmid phân giải chất độc hữu cơ

Rất nhiều vi khuẩn trong nhóm *Pseudomonas* có khả năng tồn tại, sinh trưởng, và phát triển trong môi trường có nhiều hợp chất hữu cơ mà phần lớn lại rất độc đối với các loại vi khuẩn nhóm khác, bởi chúng có khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ độc thành những cơ chất cần thiết cho chu trình sống của chúng. Những vi khuẩn này có vai trò cực kỳ quan trọng trong sự triệt để hoá chu kỳ cacbon trong tự nhiên và đồng thời là những nhân tố hết sức lợi hại bảo vệ môi trường và tạo điều kiện sống cho loài khác.

Hợp chất hữu cơ độc bao gồm nhiều loại hình dẫn chất của cacbon hydrô thơm thải ra từ các xí nghiệp công nghiệp như toluen, xylen, xalixylat, naphtalen, alkyl-benzen, octan, camphor, axit nicotinic, hoặc được dùng trong nông, lâm nghiệp bao gồm các dẫn chất clo như các chất diệt cỏ; 2-4D (2,4-dichlorophenoxyacetic axit), hoặc p-chlorophenyl nếu không được phân giải sẽ gây ô nhiễm môi trường rất nặng nề, ảnh hưởng rất lớn đến sức khoẻ của người và động vật.

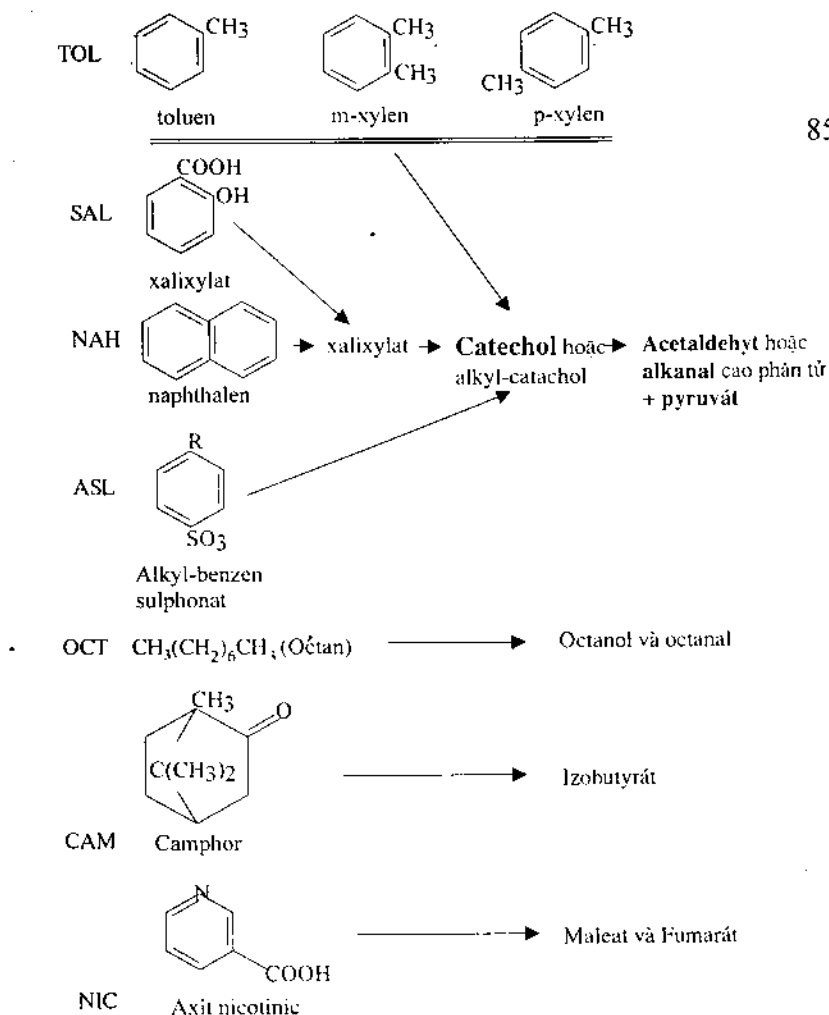
Vai trò phân giải hợp chất hữu cơ là của phần lớn các enzym do hệ gen của vi khuẩn sản xuất. Tuy nhiên, hầu hết các enzym được các gen có trong hệ gen của vi khuẩn tổng hợp chỉ phân giải được những hợp chất hữu cơ thông thường, không hoặc rất ít độc.

Những hợp chất hữu cơ độc, hoặc có cấu trúc phức tạp lại do một số enzym phân giải, sản phẩm của một số plasmid cộng sinh trong vi khuẩn sản xuất.

Điển hình nhất là vi khuẩn *Pseudomonas putida* và họ hàng của loại vi khuẩn này trong giống *Pseudomonas*. Loại vi khuẩn này sống, tồn tại và phát triển một cách bình thường trong môi trường chứa hợp chất hữu cơ độc với hàm lượng rất cao như toluene, xylen, octan, camphor, naphtalene, xalixylic, và axit nicotinic. Các hợp chất này với một hàm lượng rất nhỏ cũng đủ giết chết các vi khuẩn thông thường.

Trong vi khuẩn *Pseudomonas putida*, có chứa một hay một số plasmid có các gen sản xuất các enzym phân cắt và chuyển đổi các hợp chất nói trên sang các đơn chất vô độc thông thường khác như acetaldehyde pyruvat, và acetat. Những đơn chất hữu cơ này tiếp tục tham gia vào chu trình chuyển hoá của chính vi khuẩn chủ, hoặc làm cơ chất hữu cơ cho các loại vi khuẩn thông thường khác, mà không hề có tác động gây hại nào. Nhiều plasmid, cùng lúc có chứa đến 10 gen sản xuất 10 enzym hoạt động tham gia phân giải và trao đổi chất với các hợp chất nói trên.

Tên của plasmid, thông thường được đặt theo chức năng phân giải các hợp chất hữu cơ chính của chúng, ví dụ, plasmid TOL của toluen, SAL của xalixylat, NAH của naphtalen, CAM của campho v.v... Trong một số chủng vi khuẩn, có thể chỉ tồn tại duy nhất một plasmid nào đó, với một hay một vài gen sản xuất enzym phân giải, cũng có thể tồn tại nhiều plasmid có nhiều gen khác nhau, phân giải các hợp chất hữu cơ khác nhau. Trong trường hợp trước, người ta gọi đó là vi khuẩn chứa plasmid đơn loại, và trường hợp sau là vi khuẩn chứa plasmid đa loại (Bảng 1).



Hình 1: Các plasmid vi khuẩn nhóm *Pseudomonas* và sản phẩm phân giải các hợp chất hữu cơ độc : Plasmid TOL: SAL: NAH: ASL phân giải chất hữu cơ độc thành vô độc qua trung gian catechol; plasmid OCT: CAM và NIC phân giải các hợp chất tương ứng octan, camphor, và axit nicotinic thành các sản phẩm không gây hại một cách trực tiếp.

Bảng 1: Một số plasmid phân giải hợp chất hữu cơ độc và dễ kháng i-on kim loại

Tên plasmid	Vi khuẩn chủ	Ký hiệu chủng	Kích thước (kbp)	Đối tượng phân hủy
<u>SAL</u>	<i>Pseudomonas putida</i>	R1	60	salicylate
SAL	<i>Pseudomonas putida</i>	R1	72	salicylate
SAL	<i>Pseudomonas putida</i>	PpG2100	85	salicylate
NAH	<i>Pseudomonas putida</i>	PpG7	83	naphthalene
NIC	<i>Pseudomonas putida</i>	PpG25	?	nicotine-nicotinate
TOL	<i>Pseudomonas putida</i>	mt-2	113	toluene/xylene
pKF439	<i>Pseudomonas putida</i>	KF439	138	toluene/salicylate
OCT	<i>Pseudomonas putida</i>	PpG6	?	n-octane
CAM	<i>Pseudomonas putida</i>	PpG1	225	camphor
XYL	<i>Pseudomonas putida</i>	Pxy	15	xylene
WWO	<i>Pseudomonas putida</i>	mt-2	176	xylene/toluene
XYL-K	<i>Pseudomonas putida</i>	Pxy	135	xylene/toluene
pJP1	<i>Variovorax paradoxus</i> (<i>Alcaligenes paradoxus</i>)	JMP116	88 ± 3	2,4-D; dalapon
pJP2	<i>Ralstonia eutropha</i>	JMP363	227 ± 6	2,4-D; thủy ngân
pJP3	<i>Ralstonia eutropha</i>	JMP364	91 ± 3	2,4-D; thủy ngân
pJP4	<i>Ralstonia eutropha</i>	JMP134	76 ± 2.5	2,4-D; thủy ngân

Ghi chú: 2,4D: 2,4-dichlorophenoxyacetic axit; kbp: kilobazơ (1000 bazơ).

2. Các phương thức phân giải chất độc hữu cơ có các plasmid phân giải tham gia

Các plasmid TOL, SAL, NAH, ASL chuyển các hợp chất mạch vòng halogen như toluen, xylen, xalixylat, naphtalen và alkyl-benzen sulfonat thành catechol và dẫn chất, rồi tiếp tục phân giải thành đơn chất thường, vô độc là acetaldehyt và pyruvat. Bản thân hệ gen của chính vi khuẩn *Pseudomonas putida* cũng có gen sản xuất enzym phân giải catechol, nhưng chúng chỉ hoạt động khi cần thiết, và phải cần có sự có mặt của một hàm lượng lớn catechol để cảm ứng tổng hợp men catechol-1-2-oxygenaza để phân cắt catechol ở vị trí *ortho*-hydroxyl. Trong trường hợp nếu vi khuẩn có chứa plasmid TOL, thì plasmid này sẽ nhận nhiệm vụ phân giải toluen và dẫn chất toluen thành các đơn chất vô độc qua trung gian catechol, mà không cần đến sự có mặt sẵn của catechol môi trường để cảm ứng gen tổng hợp enzym như đã trình bày ở trên (Hình 1). Vị trí phân cắt catechol của enzym do plasmid sản xuất là ở vị trí *meta*. Bằng con đường phân cắt *meta*, lượng catechol có bao nhiêu sẽ bị phân cắt bấy nhiêu, do vậy không còn đủ đến hàm lượng cần có để kích ứng hoạt động tổng hợp men của hệ gen vi khuẩn chủ, tạo điều kiện phân cắt theo con đường *ortho* như vi khuẩn *P. putida* khi không có plasmid đảm nhận (Hình 2).

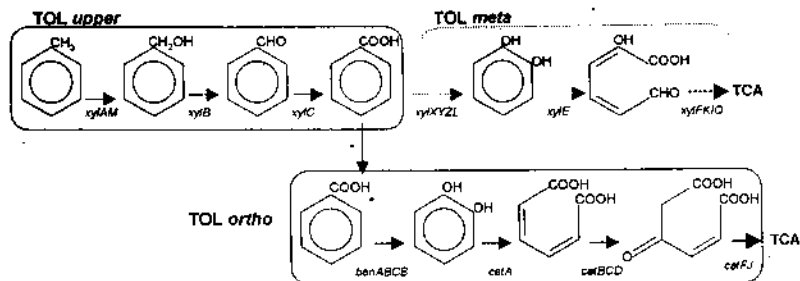
Các thế hệ vi khuẩn tiếp theo cùng nhóm hoặc kể cả vi khuẩn khác nhóm, đều có thể sử dụng cơ chất đã phân cắt, để thực hiện chu kỳ sống của mình, do vậy, sự chuyển đổi cơ chất trong thiên nhiên được luân hồi thực hiện, không còn sự ô nhiễm môi trường với các hợp chất hữu cơ độc.

Plasmid phân giải trong tự nhiên thông thường là những plasmid tiếp hợp và có phân tử lượng rất lớn, biến động từ 50×10^6 đến 200×10^6 . Chúng thuộc loại plasmid không tương hợp nhóm P (incompatible plasmid P), và chính mỗi một thành viên trong

nhóm cũng đồ kỵ tương tác với nhau. *Mitomycin-C* là một loại tác nhân diệt trừ rất hữu hiệu, bởi vì chất này ngăn cản sự nhân lên của plasmid, và do vậy plasmid sẽ bị làm sạch khỏi vi khuẩn sau một vài thế hệ phân chia của tế bào vi khuẩn được nuôi trong môi trường có *mitomycin-C*.

3. Cơ chế phân tử của quá trình phân giải chất độc hữu cơ

Một đặc tính cá biệt của các plasmid TOL, SAL, OCT, và NIC là hệ gen của chúng có khả năng tự phân cắt thành 2 hay nhiều vòng plasmid độc lập và có khả năng nhân lên độc lập. Như vậy các plasmid phân giải tự nhiên có hệ gen chứa *vùng mầm* có nhiều *điểm mầm*, để quyết định sự nhân lên trong các plasmid “anh em”. Khi phân chia từ plasmid tiếp hợp mẹ ban đầu, sẽ có thêm 1 plasmid thuộc loại tiếp hợp và một hay nhiều plasmid không tiếp hợp. Do vậy kể từ lúc đó, có 2 hướng hoạt động tiếp tục, một hướng theo con đường của plasmid tiếp hợp như trước. Còn hướng khác thuộc loại plasmid không tiếp hợp. Các plasmid không tiếp hợp có nguồn gốc từ plasmid TOL và SAL có khả năng nhập vào hệ gen của 1 loại plasmid nào đó không thuộc họ hàng thân thuộc (phân đoạn plasmid TOL có khả năng nhập gen có phân tử lượng lớn đến 40×10^6). Plasmid TOL cũng có thể phân cắt, để chỉ giữ lại một plasmid gọn nhẹ hơn, và loại bỏ những phân đoạn hệ gen có phân tử lượng đến 30×10^6 . Cho đến nay người ta đặt câu hỏi, bằng cơ chế tự cắt ra và nhập vào như thế này, liệu có phải đó là phương thức tự chọn lọc để có một thế hệ plasmid hoàn chỉnh trong tự nhiên hay không ? Sự phân cắt tự “gột bỏ” những phần không cần thiết để tạo ra plasmid mới như thế này thường xảy ra khi môi trường có những tín hiệu cảm ứng mới đối với plasmid ở thế hệ đó.



Hình 2: Phân giải toluene (TOL) của vi khuẩn *Pseudomonas putida* thông qua vai trò của plasmid bằng con đường *meta* và *ortho*. Vi khuẩn *P. putida* chứa plasmid TOL có tên gọi là pWWO có khả năng phân giải TOL bằng phản ứng oxy hoá nhóm CH_3 của toluene thành rượu, aldehyt và axit do các enzym riêng biệt là *xylene mono-oxygenaza* (sản phẩm của gen *xylAM*), *benzyl-alcohol dehydrogenaza* (gen *xylB*), và *benzylaldehyt dehydrogenaza* (gen *xylC*). Sản phẩm benzoate lúc này được chuyển tiếp để phân giải thông qua con đường *meta* có sự tham gia của các sản phẩm các gen *xylXYZL*, *xylE*, *xylFKIQ*, qua trung gian catechol để tạo nên axit tricarboxylic (TCA) tham gia chu trình chuyển hoá chất hữu cơ (chu trình Krebs). Trong trường hợp không tham gia con đường phân giải *meta*, benzoate được phân giải bằng con đường *ortho* do các enzym là sản phẩm của các gen của hệ gen vi khuẩn là *benABCD*, *catA* (catechol 1,2-dioxygenaza), *catBCD* và *catFJ* để tạo nên axit tricarboxylic (TCA).

Về cơ chế phân tử, xin giới thiệu quá trình phân giải toluene có sự tham gia của plasmid và sản phẩm của hệ gen của vi khuẩn chủ (Hình 2). Quá trình phân giải toluene (TOL) của vi khuẩn *Pseudomonas putida* thông qua vai trò của plasmid được thực hiện bằng con đường *meta* và *ortho*. Vi khuẩn *P. putida* chứa plasmid TOL có tên gọi là pWWO (Bảng 1) có khả năng phân giải toluene bằng phản ứng oxy hoá nhóm CH_3 của toluene thành rượu, aldehyt và axit do các enzym riêng biệt là *xylene mono-oxygenaza* (sản phẩm của gen *xylAM*), *benzyl-alcohol dehydrogenaza* (gen *xylB*), và *benzylaldehyt dehydrogenaza* (gen *xylC*). Sản phẩm benzoate lúc này được chuyển tiếp để phân giải thông qua con đường *meta*

có sự tham gia của các sản phẩm các gen *xylXYZL*, *xylE*, *xylFKIQ*, qua trung gian catechol để tạo nên axit tricarboxylic (TCA) tham gia chu trình chuyển hoá chất hữu cơ (trong chu trình Krebs nói chung của tế bào) để tiếp tục biến thành cacbôníc và nước. Trong trường hợp không tham gia con đường phân giải *meta*, benzoate được phân giải bằng con đường *ortho* do các enzym là sản phẩm của các gen của hệ gen vi khuẩn chủ là *benABCD*, *catA* (*catechol 1,2-dioxygenaza*), *catBCD* và *catFJ* để tạo nên axit tricarboxylic (TCA) (Hình 2) và các sản phẩm vô độc.

Một vài plasmid phân giải như TOL và NAH có hoạt phổ thích ứng tế bào chủ khá rộng và do vậy chúng có khả năng tiếp hợp với cả vi khuẩn *E. coli* và chuyển giao hệ gen sang vi khuẩn *E. coli*. Vi khuẩn *E. coli* sau khi tiếp nhận plasmid TOL trở thành chủng vi khuẩn *E. coli* có khả năng phân giải toluen và dẫn chất toluen (gọi là *E. coli*(TOL⁺)). Chúng có khả năng sử dụng toluen và xylen như là nguồn cacbon để thực hiện chu kỳ sống, tuy mức độ sinh trưởng phát triển của vi khuẩn *E. coli*(TOL⁺) chậm hơn nhiều so với vi khuẩn *Pseudomonas*(TOL⁺). Nguyên do là các gen hoạt động tham gia quá trình phân giải toluen và xylen, có mức độ sản xuất enzym phân giải kém hơn rất nhiều so với vi khuẩn *Pseudomonas*, vì trong tế bào vi khuẩn *E. coli* không có điều kiện tối ưu cho plasmid phân giải như trong tế bào vi khuẩn chủ *Pseudomonas*.

4. Plasmid của sự đề kháng i-on kim loại

Nhiều loại plasmid có trong hệ vi khuẩn đường ruột có khả năng hình thành sự đề kháng đối với các ion kim loại như arsen, bạc, coban, đồng, niken, thủy ngân và tellurium. Các loại plasmid của vi khuẩn *Staphylococcus* lại có sự đề kháng đối với arsen, bismut, cadmium, đồng, chì, thủy ngân và kẽm. Họ hàng plasmid

của vi khuẩn *Pseudomonas* có khả năng đề kháng crôm, thủy ngân và tellurium (Bảng 1 và Hình 2).

Như vậy, plasmid đề kháng thủy ngân là tương đối phổ biến. Có khoảng 25% plasmid kháng thuốc tiếp hợp có trong hệ vi khuẩn đường ruột và 75% plasmid của *Pseudomonas aeruginosa* đề kháng với ion thủy ngân. Nhiều plasmid của *P. aeruginosa* phân lập từ bệnh nhân có xu hướng chứa gen kháng ion thủy ngân hơn là gen kháng thuốc.

Cơ chế đề kháng ion thủy ngân là plasmid sản xuất men *reductaza*, men này khử ion thủy ngân (Hg^{++}) rất độc thành thủy ngân vô tính (Hg^0). Loại này không tan trong nước và rất dễ bay hơi nhanh chóng. Nếu vi khuẩn kháng thủy ngân được nuôi cấy trong môi trường lỏng có i-on thủy ngân, thì chúng có thể chuyển đổi thủy ngân hoà tan thành thủy ngân vô tính, và lượng thủy ngân này có thể thu nhận được sau khi chúng bay hơi và ngưng tụ.

Plasmid kháng thủy ngân còn hoạt động theo cơ chế cản trở sự hấp thụ i-on thủy ngân. Các gen sản xuất enzym *reductaza* và tổ hợp gen sản xuất các thành phần trong hệ thống chuyển vận qua màng, chịu sự kích ứng của ion thủy ngân. Sự đề kháng thủy ngân là do các gen có trên tiểu phần chuyển vị *Tn501* chịu trách nhiệm. Cơ chế hoạt động đề kháng các ion kim loại khác của plasmid còn biết rất ít.

Các chủng vi khuẩn ở những vùng mỏ có kim loại nặng, thường có chứa plasmid đề kháng, phân giải các i-on kim loại giúp chúng tồn tại. Dân cư sống trên vùng đất khoáng sản, thông thường trong hệ vi khuẩn đường ruột, cũng có plasmid kháng ion kim loại. Loại vi khuẩn chứa plasmid kháng kim loại biết đến nhiều nhất là *Pseudomonas aeruginosa*.

Cũng tương tự, gia súc sử dụng thức ăn giàu vi lượng, ví dụ như đồng, hoặc chân thả vùng đất giàu kim loại nặng, cũng có hệ vi khuẩn chứa plasmid kháng ion kim loại.

* *

*

Hiện nay, bằng các con đường kỹ thuật gen và tái tổ hợp gen, rất nhiều chủng vi khuẩn thuộc giống *Pseudomonas* (đặc biệt là *P. putida*) và họ hàng đã được chuyển nạp vào chúng những plasmid đa gen (chứa nhiều gen sản xuất enzym phân giải các hợp chất khác nhau) hay chứa nhiều plasmid trong cùng một vi khuẩn. Bằng con đường công nghệ sinh học chọn lọc, rất nhiều chủng vi khuẩn tái tổ hợp mang plasmid phân giải đã được sản xuất và sử dụng có hiệu quả trong công cuộc loại trừ hợp chất hữu cơ độc và kim loại nặng – các loại chất thải nguy hiểm ngày nay của nền kinh tế công nghiệp ở mọi nước trên thế giới. Sự phấn đấu vì môi trường trong sạch, không độc hại chỉ có thể đạt được qua việc tận dụng và tăng cường hiệu quả sử dụng các loại plasmid phân giải đã giới thiệu ở trên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO CHÍNH

- AEMPRAPA, S. AND WILLIAMS, P.A. (1998). Implications of the xylQ gene of TOL plasmid pWW102 for the evolution of aromatic catabolic pathways. *Microbiology*. 144(5):1387-1396.
- CALB, R., DAVIDOVITCH, A., KOPY, S., GILADI, H., GOLDENBERG, D., MARGALIT, H., HOLTEL, A., TIMMIS, K., SANCHEZ-ROMERO, J.M., DE LORENZO, V. AND OPPENHEIM, A.B. (1996). Structure and function of the *Pseudomonas putida* integration host factor. *J Bacteriol*. 178(21):6319-6326.
- FAVARO, R., BERNASCONI, C., PASSINI, N., BERTONI, G., BESTETTI, G., GALLI, E. AND DEHO, G. (1996). Organisation of the *tmb* catabolic operons of *Pseudomonas putida* TMB and evolutionary relationship with the xyl operons of the TOL plasmid pWW0. *Gene* 182(1-2):189-193.
- FURUKAWA, K., MIYAZAKI, T. AND TOMIZUKA, N. (1985). SAL-TOL in vivo plasmid pKF439. *J Bacteriol*. 162(3):1325-1328.

- HAAS, D. (1983). Genetic aspects of biodegradation by *Pseudomonads*. *Experientia*. 39(11):1199-1213.
- HARAYAMA, S., LEPIK, R.A., REKIK, M., MERMOD, N., LEHRBACH, P.R., REINEKE, W. AND TIMMIS, K.N. (1986). Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzyl alcohol by the xylA product. *J Bacteriol* 167(2):455-461.
- HARO, M.A. AND DE LORENZO, V. (2001). Metabolic engineering of bacteria for environmental applications: construction of *Pseudomonas* strains for biodegradation of 2-chlorotoluene. *J Biotechnol*. 85(2):103-113.
- HOLTEL, A., MARQUES, S., MOHLER, I., JAKUBZIK, U., TIMMIS, K.N. (1994). Carbon source-dependent inhibition of xyl operon expression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid. *J Bacteriol*. 176(6):1773-1776.
- HORN, J.M., HARAYAMA, S. AND TIMMIS, K.N. (1991). DNA sequence determination of the TOL plasmid (pWWO) xylGJF genes of *Pseudomonas putida*: implications for the evolution of aromatic catabolism. *Mol Microbiol*. 5(10):2459-74.
- JAMES, K.D. AND WILLIAMS, P.A. (1998). *ntn* genes determining the early steps in the divergent catabolism of 4-nitrotoluene and toluene in *Pseudomonas* sp. strain TW3. *J Bacteriol*. 180(8):2043-2039.
- JOHNSON, G.R. AND OLSEN, R.H. (1997). Multiple pathways for toluene degradation in *Burkholderia* sp. strain JS150. *Appl Environ Microbiol*. 63(10):4047-4052.
- Lê Thanh Hòa (2002). "Sinh học phân tử của plasmid: bản chất và ứng dụng". Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội (đang in).
- O'DONNELL, K.J. AND WILLIAMS, P.A. (1991). Duplication of both xyl catabolic operons on TOL plasmid pWW15. *J Gen Microbiol*. 137(12):2831-2838.
- PANKE, S., SANCHEZ-ROMERO, J.M. AND DE LORENZO, V. (1998). Engineering of quasi-natural *Pseudomonas putida* strains for toluene metabolism through an ortho-cleavage degradation pathway. *Appl Environ Microbiol*. 64(2):748-751.
- RAMOS, J.L., MARQUES, S. AND TIMMIS, K.N. (1997). Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu Rev Microbiol*. 51:341-373. Review.
- SENTCHILO, V.S., PEREBITUK, A.N., ZEHNDER, A.J.B. AND VAN DER MEER, J.R. (2000). Molecular Diversity of Plasmids Bearing Genes That Encode Toluene and Xylene Metabolism in *Pseudomonas* Strains Isolated from Different Contaminated Sites in Belarus. *Appl Environ Microbiol*. 66(7):2842-2852.

VAI TRÒ CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG CÔNG TÁC CHỌN TẠO GIỐNG NGÔ

TS Bùi Mạnh Cường ()*

Phân giới thiệu : Công nghệ sinh học ứng dụng chỉ thị phân tử trong nghiên cứu tạo giống

Phần thứ nhất : Chỉ thị phân tử ứng dụng trong chọn tạo giống ngô

1. Mở đầu
2. Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống ngô
 - 2.1. Các chỉ thị chịu hạn
 - 2.2. Chỉ thị phân tử trong dự đoán ưu thế lai
 - 2.3. Một số ứng dụng khác của chỉ thị phân tử
3. Thảo luận

Phân giới thiệu:

CÔNG NGHỆ SINH HỌC ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ TRONG NGHIÊN CỨU TẠO GIỐNG

Vào những thập niên cuối cùng của thế kỷ 20, với sự phát triển mạnh mẽ của công nghệ thông tin, cơ khí chế tạo, hoá chất, vật liệu mới đã hỗ trợ, thúc đẩy công nghệ sinh học (CNSH) phát triển mạnh mẽ, nhanh chóng trở thành một trong những mũi nhọn phát triển kinh tế của các nước phát triển. Hiện nay CNSH được xem như là hướng khoa học công nghệ được ưu tiên đầu tư phát triển ở hầu hết các nước trên thế giới. Theo số liệu của hiệp hội sinh học thế giới (1999) thì giá trị sản phẩm của CNSH đạt vì khoảng 280 tỷ USD trong đó giá trị sản phẩm trong lĩnh vực giống

(*)Viện nghiên cứu Ngô.

cây trồng đạt khoảng 100 tỷ USD, dự đoán đến năm 2010 sẽ đạt khoảng 1000 tỷ USD.

Qua những số liệu trên một lần nữa chúng ta thấy được tầm quan trọng của CNSH đối với sự phát triển nông nghiệp, trong đó bao gồm lĩnh vực giống cây trồng. Trong lĩnh vực giống cây trồng thì ngô là một trong những cây quan trọng chỉ sau lúa mì và lúa nước, do vậy, cây ngô đã nhanh chóng trở thành đối tượng nghiên cứu, ứng dụng của CNSH. Trên thế giới, những thành tựu CNSH về cây ngô tập trung vào các lĩnh vực sau:

Công nghệ chuyển gen: Mặc dù vấn đề này có nhiều ý kiến khác nhau, song thực tế cho thấy trong tổng số diện tích trồng cây chuyển gen (2001) là 52.6 triệu ha, thì diện tích trồng các giống ngô được chuyển gen là 8 triệu ha, đứng thứ 2 sau đậu tương 18 triệu ha, dự đoán đến năm 2005 thì diện tích trồng giống ngô được chuyển gen tăng lên 15 – 18 triệu ha. Các giống ngô được chuyển gen tập trung chủ yếu vào các gen kháng thuốc diệt cỏ, côn trùng, vi khuẩn, bệnh. Giá trị sản phẩm cây chuyển gen nói chung đạt khoảng 25 tỷ USD vào năm 2010.

Ưu điểm của công nghệ này là trong một thời gian ngắn có thể tạo ra được một số tính trạng chất lượng mong muốn mà phương pháp truyền thống không làm được, tuy nhiên chúng ta cần nhận thức mặt trái của công nghệ này.

Sử dụng chỉ thị phân tử trong đánh giá đa dạng di truyền phân nhóm ưu thế lai, chọn lọc sớm một số tính trạng chất lượng mong muốn.

Với kết quả nghiên cứu CNSH về cây ngô trên thế giới đã chứng minh rằng CNSH có vai trò lớn trong cuộc cách mạng tạo giống ngô lai ở thế kỷ 21, trợ giúp cho các nhà chọn giống đánh

giá chính xác nguồn nguyên liệu, rút ngắn tối đa thời gian tạo giống, tiết kiệm kinh phí nghiên cứu, đồng thời mở ra những hướng phát triển mới trong nghiên cứu chọn tạo giống ngô năng suất cao.

- Nhờ có chỉ thị phân tử mà các nhà chọn giống xác lập một cách nhanh chóng phả hệ của tập đoàn nguyên liệu, dựa trên kết quả đó có thể phân nhóm ưu thế lai và dự đoán được những tổ hợp có ưu thế lai về năng suất, có thể nói nhờ phương pháp này mà giảm được đáng kể thời gian và chi phí nghiên cứu, đồng thời đánh giá một cách tương đối chính xác nguồn nguyên liệu tham gia vào quá trình tạo giống lai. Phương pháp này hiện nay đang được áp dụng phổ biến ở các nước phát triển.

- Xác định hệ thống chỉ thị phân tử liên quan đến một số tính trạng chống chịu (chịu hạn, bệnh...), lập bản đồ gen của một số tính trạng số lượng, đã hỗ trợ cho các nhà chọn giống chọn lọc sớm một số tính trạng mong muốn mà không bị ảnh hưởng bởi yếu tố môi trường. Nâng cao hiệu quả chọn lọc, tạo ra hướng nghiên cứu mới, đó là chọn lọc tính trạng theo chỉ thị phân tử.

Nuôi cấy tế bào: Công nghệ nuôi cấy tế bào được áp dụng rộng rãi trong chọn tạo giống ngô là công nghệ tạo dòng thuần từ nuôi cấy bao phấn. Công nghệ này phát triển mạnh ở Mỹ, Trung Quốc, Thụy Sĩ, Ấn Độ..., các nước ở khu vực Đông Nam Á cũng bắt đầu nghiên cứu như Thái Lan, Việt Nam, Philippine...

Một trong những ưu việt của công nghệ này là trong một thời gian ngắn tạo ra được những thể dòng hợp tử (đơn bội kép), giảm được 1/2 thời gian tạo dòng thuần so với phương pháp tạo dòng truyền thống. Đây là một trong những công nghệ có nhiều triển vọng ở thế kỷ 21.

Chúng tôi sẽ từng bước trình bày với bạn đọc một số thành tựu, ứng dụng CNSH về cây ngô trên thế giới cũng như trong nước thuộc các lĩnh vực trên.

Phần thứ nhất :

CHỈ THỊ PHÂN TỬ ỨNG DỤNG TRONG CHỌN TẠO GIỐNG NGÔ

1. Mở đầu

Như chúng ta đã biết mọi sinh vật sống tồn tại trên trái đất phát triển qua các thế hệ là nhờ có vật chất di truyền mà cơ sở là các phân tử ADN (axit deoxyribonucleic). Tập hợp các phân tử ADN tạo nên hệ gen đặc trưng cho mỗi loài sinh vật gọi là genotype. Gen dưới tác động của môi trường hình thành nên phenotype. Những đặc trưng đơn lẻ của phenotype gọi là tính trạng hay chỉ thị hình thái.

Sự liên quan giữa tính trạng và gen lần đầu tiên được G. Mendel phát hiện năm 1865 khi tiến hành các thí nghiệm lai đậu Hoà Lan. Ông đã đưa ra khái niệm gen để chỉ vật chất di truyền và đồng thời chỉ ra rằng những tính trạng trên là do gen qui định, lần đầu tiên xác định được mối quan hệ giữa tính trạng với gen, với sự khám phá này đã đặt nền móng cho di truyền chọn giống dựa trên cơ sở gen thông qua các tính trạng hình thái (chỉ thị hình thái).

Kể từ năm 1953 với sự phát minh của James Watson và Francis Crick tìm ra cấu trúc phân tử ADN mở ra kỷ nguyên mới cho di truyền chọn giống dựa trên các chỉ thị phân tử.

Chỉ thị phân tử bao gồm:

Chỉ thị sinh hoá (biochemical marker), chỉ thị này được phát hiện nhờ phương pháp izozyme dựa trên nguyên lý gen qui định sinh tổng hợp protein và protein là sản phẩm của gen như vậy nếu phát hiện đánh dấu được các phân tử protein sẽ xác định được gen. Song phương pháp này còn hạn chế như thường xuyên bị ảnh

hưởng bởi môi trường, một sản phẩm protein có thể do nhiều gen tham gia tổng hợp và protein là sản phẩm trung gian giữa gen và chỉ thị hình thái.

Chỉ thị di truyền (genetic marker): chỉ thị được phát hiện thông qua phương pháp đánh dấu các đoạn oligonucleotit, có thể chia ra làm 3 nhóm phương pháp:

- Nhóm 1 : phát hiện các chỉ thị di truyền dựa trên nguyên lý lai ADN, đại diện cho phương pháp này là phương pháp RFLP.
- Nhóm 2 : phát hiện các chỉ thị di truyền dựa trên nguyên lý nhân bản gen. Phương pháp RAPD, SSR, DAFs, AFLP, SCAR...
- Nhóm 3: phát hiện các chỉ thị di truyền dựa trên nguyên lý xác định trình tự sắp xếp của các nucleotit.

Hiện nay phương pháp này đang được áp dụng rộng rãi trong lĩnh vực chọn tạo giống ngô.

Như vậy với sự phát triển của sinh học phân tử đã đem lại những thành tựu to lớn cho di truyền chọn giống, chúng ta đã tiến từ chọn giống dựa trên chỉ thị hình thái đến chọn giống dựa trên chỉ thị phân tử. phương pháp này hứa hẹn sự tiến bộ vượt bậc trong cải tiến năng suất cây trồng, vật nuôi.

2. Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống ngô

2.1. Các chỉ thị chịu hạn

Chọn tạo giống ngô chịu hạn nhằm đáp ứng ngày càng tốt hơn đối với sự biến đổi của môi trường là một trong những hướng được các nhà tạo giống ưu tiên. Sinh học phân tử đã giúp các nhà tạo giống xác định được một số chỉ thị phân tử đặc trưng cho tính chịu hạn, trên cơ sở đó xác định chính xác nguồn nguyên liệu chịu hạn đồng thời tăng hiệu quả quá trình chọn lọc hợp tử. Sau đây là một số chỉ thị chịu hạn (Bảng 1 và bảng 2).

Bảng 1: Một số chỉ thị phân tử chịu hạn

Đặc điểm	Điều kiện	Phương pháp	Nhiễm sắc thể	Chỉ thị phân tử	Nhóm liên kết	Nguồn
Tung phần*	Đủ nước	RFLP	1	UmC119	159	P1
			3	UmC50	46	P1
			4	Bnl5.71	58	P1
			6	Csu60	86	P1
			9	Bnl14.28	125	P2
			10	Csu25b	6	P1
	Hạn toàn phần	RFLP	1	UmC53b	83	P1
				UmC119	145	P1
			2	Bnl6.29c	131	P2
			4	Bnl5.71b	59	P1
			5	UmC84b	7	P2
			6	Csu60	86	P1
			9	Csu25b	100	P2
	Hạn một phần	RFLP	1	UmC53b	83	P1
				UmC119	145	P1
			2	UmC53a	17	P2
				UmC150b	163	P2
			4	Bnl5.71b	60	P1
			5	UmC147a	9	P2
			8	UmC89	103	P2
			9	Csu109b	103	P2
Khoảng cách tung phần tung râu	Đủ nước	RFLP	1	Csu20	201	P1
			2	BnlX6.29c	138	P2
			6	Csu60	90	P2
			10	Csu86	61	P2
	Hạn toàn phần	RFLP	1	Csu20	203	P1
			2	Bnl6.29c	134	P2
			5	UmC68	147	P1
			6	Csu116a	76	P2
			8	UmC120A	76	P2
			10	UmC182	101	P2

	Hạn một phần	RFLP	1	UmC174b	206	P1
			2	Bn16.29c	130	P2
			5	UmC68	147	P1
			6	Csu116c	79	P2
			8	UmC120a	75	P2
			10	Npi223b	43	P2

**Tài liệu tham khảo: J.M.Ribaut et al 1996*

Đặc điểm	Điều kiện	Phương pháp	Nhiệm sắc thể	Chỉ thị phân tử	Nhóm liên kết	Nguồn
Chiều dài bắp**	Đủ nước	RFLP	3	m47	2.4(13.3)	F _{1,2}
			6	m98	(11.9)	
			8	m126		
	Hạn toàn phần	RFLP	1	m16	1.4(3.5)	
			2	m28	(8.0)	
			5	m86	4.3 (5.0)	
			6	m98	(10.1)	
			7	m105	(4.9)	
			8	m126	5.0 (4.2)	
Khối lượng bắp	Đủ nước	RFLP	3	m44	2.6 (5.3)	
			4	m63	2.4 (6.2)	
			5	m78	2.4 (5.7)	
			8	m126	8.3 (5.2)	
	Hạn toàn phần	RFLP	2	m24	2.6 (5.2)	
				m28	1.3 (6.1)	
			4	m66	3.8 (7)	
			8	m141	3.8 (5.2)	
Khối lượng hạt/bắp	Đủ nước	RFLP	3	m47	3.6 (7.5)	
			5	m81	3.6 (5.5)	
				m83	7.5 (5.1)	
				m86	1.3 (1.3)	
	Hạn toàn phần	RFLP	2	m28	2.3 (6.6)	
			4	m66	5.8(10.5)	
				m78	5.8 (6.5)	
			9	m140	5.8 (9.0)	

Đặc điểm	Điều kiện	Phương pháp	Nhiễm sắc thể	Chỉ thị	Nhóm liên kết	Nguồn
Số lượng hạt/ bắp	Đủ nước	RFLP	2	m28	4.3 (5.4)	
			4	m66	1.2(11.1)	
			5	m86	1.2 (8.3)	
			6	m101	6.0 (8.1)	
	Hạn toàn phần	RFLP	2	28	4.3 (5.4)	
			4	66	1.2(11.1)	
			5	86	1.2 (8.3)	
			9	140	6.0 (8.1)	

**** Nguồn C.Frova et al 1998**

Năng suất hạt***	Đủ nước	RFLP	1	UmC133	168	P2
			2	Csu133	86	P1
			8	UmC30a	134	P2
			10	Npi223b	48	P2
	Hạn toàn phần		1	UmC119	154	P2
				Bnl6.29b	229	P1
			4	UmC123	14	P2
			7	Bnl15.07b	74	P1
			10	Npi223b	59	P2
	Hạn một phần		1	UmC53b	82	P1
			4	UmC104a	114	P1
			6	Csu111b	57	P1
			10	UmC64	60	P2

***** Nguồn J.M.Ribaut et al 1997**

Bảng 2 : Một số chỉ thị về hàm lượng ABA ở lá ngô trong điều kiện hạn (**)**

Điều kiện hạn	Phương pháp	Nhiễm sắc thể	Chỉ thị	Nhóm kết liên (CM.%)		Nguồn
Điều kiện hạn	RFLP	1	UmC11	86-12	22.9%	S3, S4
		2	Csu133	22-30	32.1	
			Csu109a	78-96	22.7	
		4	UmC193d	4-8	12.8	
		6	UmC38a	82-108	12.4	
			UmC132a	94-118	16.7	
		7	Asg8	12	23.4	
			UmC116a	44-70	17.0	
		9	Bnl14.28a	72-96	19.2	
		10	Csu86	48-72	14.9	
			Csu48	150-162	19.5	

**** Nguồn: *R. Tuberosa et al 1998*

2.2. Chỉ thị phân tử trong dự đoán ưu thế lai

Một trong những nội dung nghiên cứu của chương trình tạo giống ngô lai là dự đoán ưu thế lai của các dòng tự phối. Phương pháp đánh giá và dự đoán ưu thế lai truyền thống các dòng tự phối thường dựa trên một số đặc điểm hình thái, dạng nội nhũ, sự cách biệt địa lý, thông tin phả hệ, đánh giá qua lai (Hallauer và cộng sự 1988). Hiện nay, nhờ sự phát triển của các phương pháp sinh học hiện đại như iozyme (Goodman và Stubar 1983, Price và cộng sự 1986), phương pháp RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Burr và cộng tác 1993), Godshalk và cộng tác 1990, Berker và cộng tác 1995...), phương pháp RAPD (Random Amplified Polymorphism) (Welh và Mc. Clelland 1990, William

1990...) đã trợ giúp một cách đắc lực cho các phương pháp đánh giá ưu thế lai truyền thống. So với các phương pháp dự đoán ưu thế lai truyền thống các phương pháp trên có nhiều ưu điểm:

- Rút ngắn thời gian đánh giá.
- Đánh giá chính xác khoảng cách di truyền và nhóm ưu thế lai.
- Có thể dự đoán được cặp lai ưu tú.

Để góp phần nhanh chóng ứng dụng các phương pháp dự đoán ưu thế lai trên trong việc đánh giá ưu thế lai của một số nguồn nguyên liệu tại Việt Nam, chúng tôi xin trân trọng giới thiệu một số công trình nghiên cứu của một số tác giả để tham khảo (Bảng3).

Bảng 3 : Tóm tắt một số công trình nghiên cứu dự đoán ưu thế lai

Năm N.cứu	Tác giả	Phương pháp	Nội dung
1989	Lee. Met al	RFLP	Xác định mối liên kết giữa RFLPs với một số tính trạng nông học của một số dòng tự phối và con lai.
1991	J.W.Dudlay et al	RFLP	Xác định khoảng cách di truyền, phân nhóm ưu thế lai trong chương trình tạo giống ngô.
1991	A.E.Melchinger et al	RFLP	Đa dạng di truyền về mối quan hệ giữa các dòng tự phối của USA được thể hiện bởi RFLP.
1992	Monica M.Menmer	RFLP	Xác định khoảng cách di truyền và phân nhóm ưu thế lai của nguồn ngô đá và răng ngựa ở châu Âu.
1991	J.S.C.Smith và O.S.Smith	RFLP	Phân nhóm ưu thế lai tập đoàn nguyên liệu DK và một số nguồn nguyên liệu khác của Mỹ. Xác định phả hệ và chuẩn đoán cặp lai ưu tú.

1997	L.L.B.Lanza et al	RAPD	Xác định khoảng cách di truyền và dự đoán cặp lai đơn ưu tú của các dòng tự phối được tạo ra từ nguồn BR 106 và BR105.
1998	P.Ajmone Marsan	AFLP, RFLP	Xác định khoảng cách di truyền, mối tương quan giữa khoảng cách di truyền với sự hình thành cặp lai ưu tú của một số nguồn nguyên liệu thuộc 2 nhóm Lancaster và Iowa stiff stalksynthetic.
1998	A.E.Melchinger	AFLP, RFLP	Xác định khoảng cách di truyền của một số cặp bố mẹ và dự đoán ưu thế lai của các dòng F3, kiểm tra thông qua lai thử một số dòng ngô đá và <u>răng ngựa nhiệt đới</u> .
1998	I.Pejic et al		Phân tích so sánh kết quả xác định khoảng cách di truyền, phân nhóm ưu thế lai của 3 phương pháp đánh giá ưu thế lai RAPD, SSR, AFLP trên nền nguyên liệu nhóm Lancaster và Iowa.

2.3. Một số ứng dụng khác của chỉ thị phân tử

Trong những phần trước chúng tôi đã trình bày ứng dụng chỉ thị phân tử trong việc đánh giá nguồn nguyên liệu chịu hạn, chẩn đoán ưu thế lai, ngoài ra các chỉ thị phân tử còn được áp dụng rộng rãi trong việc xây dựng bản đồ liên kết gen, xác định quá trình tái tổ hợp của các alen, mức độ biến động di truyền của các thế hệ, nâng cao chỉ số chọn lọc đối với một số tính trạng số lượng (Bảng 4).

Bảng 4 : Một số công trình ứng dụng của chỉ thị phân tử

Năm nghiên cứu	Tác giả	Phương pháp	Nội dung
1989	Eric S.Lander	RFLP	Xây dựng bản đồ di truyền Mendel đối với một số tính trạng số lượng.
1996	Hasham A.S.agrama et al	RFLP	Xây dựng bản đồ di truyền tính trạng số lượng cho tính chống hạn ở ngô.
1997	B.Y.Lin et al	RAPD	Xác định 4 RAPD chỉ thị trên nhiễm sắc thể B.
1996	V.H.Beau mont et al	RAPD, RFLP	So sánh bản đồ RAPD và RFLP chỉ thị ở quần thể F_2 .
1990	Russell Lande et al	Chỉ thị phân tử	Hiệu quả chọn lọc một số đặc điểm số lượng dựa trên chỉ thị phân tử.
1992	Charles W. Stuber et al	RFLP, izozym	Sử dụng chỉ thị phân tử trong việc nhận biết các yếu tố di truyền đóng góp vào ưu thế lai của các dòng tự phối.
1993	M.Heun et al	RAPD	Hệ số di truyền của RAPD ở F_1 .
1994	L.D.Stromberg et al	Chỉ thị phân tử	So sánh chọn lọc truyền thống với chọn lọc chỉ thị phân tử ở thế hệ F_2S_4 đối với 2 quần thể (FRMo 17 x BSn) và FRB 73.
1995	Rita Hogan - Mumm và J.W.Dudley	RFLP	Xây dựng cơ sở phân loại nguyên liệu và xác định giá trị của phương pháp RFLP trong phân loại nguyên liệu ngô
1996	C.Gourmet và A.Lane RayBurn	RAPD	Nhận biết các chỉ thị RAPD trên nhiễm sắc thể B ở ngô.
1997	J.S.C Smith et al	SSD và RFLP	So sánh sự di truyền của SSRs với RFLPs trong chọn lọc phả hệ.
1997	R.Bernado et al	RFLP	Xác định sự đóng góp RFLPs của bố mẹ đối với con lai F_2 và trong lai tích lũy.

3. Thảo luận

Trên đây là một số thông tin về ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống ngô, mặc dù chưa đầy đủ song có thể khẳng định :

1. Có thể sử dụng một số chỉ thị phân tử trong việc đánh giá, chọn lọc trực tiếp nguồn nguyên liệu chịu hạn, hoặc gián tiếp qua chỉ thị khả năng tổng hợp, tích lũy hàm lượng axit abscisic (ABA) ở lá ngô thông qua phương pháp RFLP.

2. Có thể sử dụng một số phương pháp RFLP, RAPD, SSR... trong việc đánh giá ưu thế lai, xây dựng bản đồ di truyền, chọn lọc sớm cặp lai tốt và một số tính trạng chống chịu khác.

3. Tuy nhiên việc ứng dụng các phương pháp này trong chọn tạo giống ngô nói riêng và giống cây trồng vật nuôi nói chung cũng còn một số hạn chế cần nghiên cứu khắc phục:

- Hầu hết các tính trạng kinh tế quan trọng đều do đa gen quy định.

- Sự biểu hiện ưu thế lai phụ thuộc vào môi trường.

Hiện nay phương pháp chọn lọc dựa trên chỉ thị phân tử có vai trò hỗ trợ cho phương pháp chọn lọc truyền thống, làm sáng tỏ hơn một số nguyên lý di truyền, mối quan hệ gen - tính trạng, thúc đẩy và nâng cao tối đa chỉ số chọn lọc đối với một số tính trạng số lượng góp phần nâng cao hiệu quả phương pháp chọn lọc truyền thống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ajmone Marsan; P. Castilioni; F.Fusari; M.Kuiper; M.Motto. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. Theor Appl Genet (1998) 96: 219-227.

2. V.H. Beaumont; J. Mantet; T.R.Rocheford; J.M.Widholm. Comparision in maize (*Zea mays*L). *Theor Appl Genet* 93:606. 612 1996
3. Becker J, Vos. P, Keriper M, Salammili F, and Heu M. Combinet mapping of AFLP and RFLP markers in Barlay. *Mol Gene* 1995 249: 65-73.
4. R. Bernado; A. Murigneux; J.P.Maisonneuve; C.Johnsson, Z. Karaman. RFLP- based estimates of parental contribution to F2 – and BC1 – derived maize inbred. *Theor Appl Genet* (1997)94: 652- 656.
5. Burr B, Evola S.Y; Burr F.A; and Beckman J.S 1993. The Application of RFLP to plant breeding. P.45- 49 in *Genetic engineering principles and method*, vol 5. Pleum Press, Newiork.
6. Charles W.Stuber; Stephen E. Lincoln; David W.Wolff; Tim Helentjaris and Eric S. Lander.
7. Identification of Genetic factors Contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetic* 132.823.839.1992.
8. J.W. Dudley, M.A.Saghai Maroof and G.K.Rufener. Molecular markers and Grouping of parents in maize breeding programs. *Crop Sci M*: 718-723 (1991).
9. Eric S. Lander; and David Botstein. Mapping Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits Using RFLP Linkage maps.1989 *Genetic* 121:185:199.
10. C.Frova; P.Krajewski; N.diFonjo; M.Villa; M.Sari-Gorla. Genetic analysis of drought tolerance in maizr by molecular markers. 1998. *Theor Appl Genrt* 280-288.
11. Godshalk E.B., Lee M. Lamkey K.R.1990. Relationship of RFLP to Single-Cross hybrid performance of maize. *Theor Appl- Genet* V.80 (2) P.273-280.

12. Goodman M.M; Stuber C.W;N. Races of maize VI. Izozyme variation among races of maize in Bolivia (Zeamays L.Corn) Maydica V.28 (2)P.169-187.
13. C.Goumet and Lane Rayburn. Indentification of RAPD markers associated with the presence of B chromosomes in maize. Heredity 77 (1996) 240-244.
14. Hallauer A.R; Russell W.A, Lamkey K.R. corn breeding. Argronomy Madison wis (18) 463-564 ill.
15. Hesham A.S, Agrana and Monnit E.Moussa. Mapping QTLS in breeding for drought tolerance in maize (Zea mays L) Euphytica 91:89-97, 1996.
16. Heun.M; Helentjaris.T. Inheritance of RAPDs in F_1 hybrids of corn. Theor Appl Genet 85 (*) P.96968.1992.
17. Monika M.Messme, Albrecht E. Melchiner,...Relationships among Early Eutopean maize hybrids:I. Genetic diversity among Flint anf dent lines Revealed by RFLPs. Crop Sci 32: 1301-1309 (1992).
18. A.E. Melchiger; M.M.Messme; M.Lee; W.L Woodman and K.R.Lamkey. Diversity and Relationship among U.S.Maize inbreds Revealed by RFLP. Crop Sci 31:669- 678 (1991).
19. A.E.Mechinger; R.K.Gumber; R.B.Leipert; M. Vuylsteke, M.Kuiper. Prediction of tescross means and variances among F_3 pogenies of F_1 crosses from testcross means and genetic distances of their parent in maize. Theoe Appl Genet (1998) 96:503-512.
20. L.L.B.Lanza, C.L.de sonza Jr. L.M.M.Ottoboni; M.L.C. Vieira; A.P.desonza. Genetic distance of inbred lines and predition of maize single cross peformance using RAPD marker.
21. M.Lee, E.B.Godshalk; K.R. Camkey and W.W Woodman. Woodman. Association of RFLPs among maize inbreds with

- Agronomic performance of their crosses. *Crop Sci* 29:1067-1071(1989).
22. B-X.lin; H.P.Chou. Physical mapping for four RAPDs in the B Chromosome of maize. *Theor Appl Genet* (1997) 94:534-538.
 23. I.Pejić P.Ajmoné – Masan, M.Morgante; V.Kozomplik P.Castiglioni; G.Taramino; M.Motto. Comparative analysis of genetic Similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs and AFLPs. *Theor Appl Genet* (1998) 97:1248-1255.
 24. Price S.C; Kahler A.L; Hallauer A.R. Charmley P.Giegel D.A. Relationships between performance and multilocus heterozygosity at enzyme loci in single cross hybrids of maize. *J.Hered.*77 (5) P.341-344.
 25. J.M.Ribaut; D.A. Hoisington; J.A.Deutsch; C.Jiang D.Gonzalez-de-leon. Identification of quantitative trait loci under drought condition in tropical maize I. Flowering parameters and the anthesis – Silking interval. *Theor Appl Genet* (1996) 92:905-914.
 26. J.M.Ribaut; C.Jiang; D.Gonzalez – de – Leon; G.O. Edmeades; D.A.Hoisington. Identification of quantitative trait loci under drought condition in tropical maize. II. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theor Appl Genet* (1997) 94: 887-889.
 27. Rita Hogan Muman and J.W Dudley.
 28. Classification of 148 U.S.Maize inbreds; I.Cluster Analysis based on RFLPs. *Crop Sci* 43:842-851(1994).
 29. Validation of cluster Analysis based on RFLPs. *Crop Sci* 34: 852- 865(1994).
 30. Russel Lande and Robin Thompson. Efficiency of Marker – Assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124:743- 756(1990)

31. J.S.C Smith and D.S.Smith. Restriction Fragment Length polymorphism can differentiate U.S. Maize hybrids. *Crop Sci* 31:893-899 (1991).
32. J.S.C. Smith; E.C.I. chin; H.Shu; O.S.Smith; S.J Wall; M.L.Senior; S.Emitchel; S.Kresovich; J.Ziegle. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L) Comparison with data from RFLPs and pedigree. *Theor Appl Genet* (1997) 95:163-173.
33. L.D.Strombeg, J.W.Dudley, and G.K.Rufener. Comparing Conventional Early Generation Selection with Molecular Assisted selection in Maize. *Crop Sci* 34:422 1-1225 (1994)
34. Tuberosa; M.C.Sanguineti; P.Landi, S.Salvi; E.Casarini; S.Conti. RFLP mapping of quantitative trait loci controlling Ascorbic acid concentration in leaves of drought – Stressed Maize (*Zea mays* L). *Theor Appl Genet* (1998) 97:744-755.
35. Welsh J; MC Clelland M.1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acid. Res* 18. 7213-7218.
36. Williams J.K.F.Kubelkar; Livak. K. G1990. Polymorphism Amplified by arbitrary primer are useful as genetic marker. *Nucleic acid Res* 18:6531-6535.
37. Vos P.Hogers, R.B. Leckey, M.Reifmans M.and VanDe. 1995. AFLP a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acid Res* 23:4407-4414.

NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG MẦM BỆNH VI SINH VẬT TRONG PHÒNG TRỪ SÂU HẠI CÂY TRỒNG

Tống Kim Thuần ()*

1. Các mầm bệnh vi sinh vật diệt côn trùng
2. Vi khuẩn diệt côn trùng
3. Nấm diệt côn trùng
 - 3.1. Đặc tính phân loại một số loài nấm diệt côn trùng
 - 3.2. Ứng dụng nấm gây dịch bệnh tự nhiên trên cánh đồng
 - 3.3. Ứng dụng nấm chống lại côn trùng đất
 - 3.5. Ứng dụng nấm chống lại sâu hại rau trong nhà kính
 - 3.6. Ứng dụng nấm chống lại sâu hại ở hệ thống rừng và trên cánh đồng mở
4. Sản xuất các chế phẩm vi sinh vật diệt côn trùng
5. Ứng dụng công nghệ gien vào việc nâng cao chất lượng các chủng vi sinh vật diệt côn trùng
6. Tình hình nghiên cứu mầm bệnh vi sinh vật diệt côn trùng ở Việt Nam

1. Các mầm bệnh vi sinh vật diệt côn trùng

Hàng năm, côn trùng gây tổn thất rất lớn cho mùa màng và cây rừng. Vì vậy việc đấu tranh với côn trùng gây hại bảo vệ cây cối, mùa màng là một việc hết sức quan trọng để nâng cao năng suất cây trồng. Đấu tranh sinh học là sử dụng các cơ thể sống như là các tác nhân kiểm soát côn trùng. Hướng sử dụng vi sinh vật để

(*) Viện Công nghệ Sinh học.

phòng trừ sâu hại bảo vệ cây trồng đặc biệt phát triển sau năm 1945. Ở các nước trên thế giới, rất nhiều loại thuốc trừ sâu vi sinh đã được sản xuất với qui mô lớn và được sử dụng rộng rãi trong công tác phòng trừ sâu hại cho hàng triệu hecta cây trồng.

Mầm bệnh côn trùng bao gồm những vi sinh vật có khả năng gây bệnh, làm yếu, gây chết côn trùng. Các mầm bệnh này thuộc các nhóm sinh vật khác nhau như virus, vi khuẩn, nấm sợi, nguyên sinh động vật và tuyến trùng. Lịch sử nghiên cứu mầm bệnh côn trùng bắt đầu từ năm 1835, khi ở thành phố Lodi, Agostino Bassi quan sát thấy một loại bệnh do nấm trắng gây ra ở con tằm. Năm 1870 Pasteur phân lập được bào tử nấm gây bệnh tằm gai và cứu nghề nuôi tằm của Pháp hồi ấy khỏi nguy cơ diệt vong. Metchnikov năm 1879 sử dụng nấm *Metarhizium anisopliae* để kiểm soát sâu hại. De Herelle quan sát thấy hàng loạt châu chấu chết bởi vi khuẩn *Anisoplia acridiorum*. Các thông tin về các vi sinh vật gây bệnh côn trùng phân lập từ sâu hại được rất nhiều tác giả trong và ngoài nước đề cập đến [1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11]. Danh sách các giống vi sinh vật quan trọng được coi là mầm bệnh diệt côn trùng được liệt kê sau đây:

Vi khuẩn: *Bacillus thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. polillae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* và *Streptococcus faecalis*.

Nấm mốc : *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Aschersonia*, *Verticillium*, *Normurea*, *Hirsutella*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* và *Paecilomyces farinosus*.

Virus: Nhiều loại virus đã được sử dụng để diệt trừ sâu hại. Chúng thường thuộc về 3 loại: virus đa diện nhân (*Nuclear*

polyhedrosis NPV), virus thể hạt (*Granulosis virus GV*) và virus đa diện dạng tế bào chất (*Granulosis virus GV*) và *Pox virus*.

Vì sinh vật gây bệnh ở điều kiện thuận lợi sẽ gây bệnh và làm thay đổi về tập tính và cấu trúc cơ thể của côn trùng. Chúng sinh ra một số triệu chứng chung như mất cảm giác ngon miệng, ngừng ăn, ỉa chảy, tê liệt từng phần, nôn mửa, rối loạn chức năng, lơ đãng, chậm chạp, tê liệt toàn bộ và chết. Đối với côn trùng bị nấm tấn công có những triệu chứng đặc trưng như sau: toàn bộ bề mặt côn trùng được bao bọc bởi hệ sợi và bào tử khô, lúc đầu hệ sợi màu trắng, sau đó trở thành xanh hoặc nâu, hoặc ánh vàng, tùy từng loại nấm gây bệnh. Thí dụ: màu trắng bột đặc trưng cho nấm *B. bassiana*, màu xanh lá cây xám đặc trưng cho nấm *M. anisopliae*, màu vàng đặc trưng cho nấm *Paecilomyces*. Côn trùng bị vi khuẩn tấn công thì có những đặc tính sau: ngừng ăn, yếu, mất phương hướng, hấp hối và chết. Virus cũng gây một số thay đổi trong cơ thể côn trùng như ấu trùng bị nhiễm bệnh chuyển thành màu trắng, nhợt nhạt và mềm nhũn. Sự hiểu biết về các triệu chứng thay đổi hình thái do vi sinh vật gây nên cho phép chúng ta nhận biết sơ bộ những côn trùng bị bệnh để dễ dàng phân lập các mầm bệnh. Muốn phân lập các vi sinh vật diệt côn trùng trước hết cần thu thập các mẫu sâu bị vi sinh vật ký sinh. Nếu sâu chết hàng loạt và có tính chất lây lan như một dịch bệnh thì có nhiều khả năng là chết do vi sinh vật. Cần chú ý phân lập vi sinh vật từ côn trùng mới chết hoặc tốt nhất là đang mắc bệnh mà chưa chết. Làm như vậy sẽ hạn chế được việc lẫn lộn với các vi sinh vật hoại sinh.

2. Vi khuẩn diệt côn trùng

Để phân loại vi khuẩn gây bệnh côn trùng, người ta cắt côn trùng nhiễm bệnh thành những lát nhỏ, đặt trong đĩa Petri có môi

trường dinh dưỡng hoặc nghiền chúng trong cối sứ, rồi phân lập theo phương pháp pha loãng tối hạn. Sau 2-3 ngày, quan sát các khuẩn lạc và tách chúng sang ống thạch nghiêng dựa trên đặc điểm màu sắc, kích thước, hình dáng. Để kiểm tra lại xem chúng có đúng là loại vi khuẩn gây bệnh không, phải làm tiêu bản, nhuộm đơn, nhuộm Gram, nhuộm bào tử và tinh thể độc tố rồi tiến hành các thí nghiệm sinh lý sinh hoá, các tip huyết thanh khác nhau. Loài vi khuẩn diệt côn trùng được nghiên cứu nhiều là *B. thuringiensis*. Phổ tác dụng diệt côn trùng của *B. thuringiensis* ngày càng được mở rộng. Năm 1901, người ta mới phát hiện *B. thuringiensis* có phổ tác dụng diệt côn trùng thuộc bộ cánh vẩy (Lepidoptera), sau đó vào cuối thế kỷ 20 phát hiện chúng có khả năng diệt các loại côn trùng khác: năm 1977- 2 cánh (Diptera), năm 1983- cánh cứng (Coleoptera), năm 1988 diệt giun tròn ký sinh động vật, thực vật và diệt ve, vết, và diệt kiến. Trong loài *B. thuringiensis*, người ta chia ra rất nhiều thứ (variety) khác nhau. Sự phân chia này căn cứ chủ yếu vào các đặc điểm khác nhau về khả năng hình thành enzyme, cấu trúc tinh thể, khả năng gây bệnh cho các loại côn trùng và đặc tính huyết thanh học. Căn cứ vào kháng nguyên tiên mao, người ta chia loài *B. thuringiensis* ra làm 12 tip huyết thanh học khác nhau.

Hiện nay, trên thế giới đã phát hiện được dưới 50 loài với 70 thứ *B. thuringiensis* theo phân loại tip huyết thanh. Trong ngân hàng gien thế giới hiện nay có 140 gien trong 22 họ tinh thể độc Cry và 9 gien trong 2 họ Cyt đã được công bố. *B. thuringiensis* được gặp nhiều trong đất, trong sâu chết, trong lá cây. Chúng có 4 dạng tinh thể: hình tháp, hình tròn, hình vuông và không xác định. Tùy thuộc vào từng chủng mà chúng chứa các dạng tinh thể khác nhau. Một số chủng sinh ra 2-3 tinh thể có hình dạng khác nhau, một số khác chỉ có một tinh thể duy nhất.

Các loài vi khuẩn gây bệnh côn trùng thường gặp được mô tả dưới đây:

B. thurigiensis: Gram dương, hiếu khí, chuyển động, hình que, hình thành bào tử chứa độc tố gây độc cho côn trùng. Hình dáng khuẩn lạc to, không nhẵn, màu trắng. Chúng có thể mọc trên môi trường nhân tạo và nước-thịt.

B. aeruginosa: Gram dương, hình que, chuyển động, hiếu khí và kỵ khí không bắt buộc. Khuẩn lạc có màu xanh lục hoặc xanh dương.

B. popillae: Gram dương, kỵ khí, hình que. Không mọc trên môi trường thạch dinh dưỡng và nước luộc thịt.

3. Nấm diệt côn trùng

Ngay sau khi thu thập được côn trùng bị nhiễm bệnh nấm, cắt nhỏ chúng thành từng lát rồi đặt trên môi trường thạch Czapek hoặc thạch khoai tây để cho hệ sợi phát triển và hình thành bào tử. Tách các chủng nấm thuần khiết sang ống thạch nghiêng rồi tiến hành phân loại. Phân loại dựa trên các đặc điểm hình thái sợi nấm, kiểu phát sinh bào tử, cơ quan phát sinh bào tử, hình dạng màu sắc khuẩn lạc, cũng như một số tính chất sinh lý sinh hoá khác.

3.1. Đặc tính phân loại và cơ chế lây nhiễm của nấm diệt côn trùng

Trong các loại nấm gây bệnh côn trùng, người ta thường chú ý đến các loài được mô tả dưới đây:

N. rileyi là loài nấm gây bệnh nghiêm trọng cho một số sâu hại và rệp đậu tương. Vật chủ bị nhiễm nấm lúc đầu được bao phủ một lớp sợi trắng, sau đó chuyển thành màu xanh lá cây nhạt. Nhiệt độ nuôi cấy tối ưu là 25°C. Khuẩn lạc sau 7 ngày nuôi cấy

trên môi trường Czapek có kích thước nhỏ, đường kính từ 1,0-1,5 cm bám chặt vào mặt thạch. Bào tử khô, sắp xếp thành chuỗi hoặc đơn lẻ. Đầu cuống sinh bào tử không có bông. Cuống sinh bào tử xấp xỉ lỏng lẻo trong đệm nấm hoặc đơn lẻ. Bào tử dính được sắp xếp một cách khác nhau trên thể bình thành chuỗi phân ly. Thể bình có cổ rất ngắn. Cuống sinh bào tử mang nhiều nhánh và vòng thể bình chặt

N. viridulus: Tương tự như *M. anisopliae* về hình thái và màu sắc bào tử. Bào tử thường dài, hình elip tới hình trụ, 1 tế bào xanh nhạt. Khuẩn lạc màu xanh lá cây nhạt, mặt mịn. Sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường Czapek có kích thước 0,6-1,0cm. Sinh trưởng tối ưu ở 28°C

M. anisopliae: Bào tử trong chuỗi dài khô, cuống sinh bào tử không có bông. Thể bình sắp xếp một cách khác nhau. Cuống bào tử đan chặt vào nhau trong đệm nấm hình gối. Bào tử trong cột thẳng đứng. Khuẩn lạc có màu bột xanh. Sợi hệ nấm trên bề mặt côn trùng có màu trắng đến màu hồng. Bào tử hình trụ, màu xanh lục. Ký sinh trên nhiều loại côn trùng.

B. bassiana: Hệ sợi nấm trắng hoặc màu nhạt, mặt khuẩn lạc có dạng bột trắng. Giá bào tử trần không phân nhánh, thường tụ hợp lại thành cụm ở gốc tạo thành bào tử trần theo kiểu hợp trục. Bào tử cụm ở gốc, trong suốt, không vách ngăn, hình trứng hoặc hình elip đơn độc trên các mấu nhỏ ở phần ngọn của giá bào tử trần. Phần ngọn phát triển thành hình zích zắc rất đặc trưng. Ký sinh trên tằm và một số côn trùng.

Verticillium lecanii: Ký sinh trên rệp đậu. Vật chủ bị nhiễm nấm được bao phủ bởi một lớp sợi trắng đến trắng xám. Khuẩn lạc trên môi trường Czapek sau 7 ngày nuôi cấy có kích thước 2,0-2,5

cm. Mặt khuẩn lạc khô, lông mịn nhưng, màu tím xám. Thể bình dài, mảnh, không bong, mọc so le hoặc đối xứng trên cuống sinh bào tử, đâm nhánh vòng hoặc thẳng đứng. Bào tử riêng rẽ, một tế bào, được sinh ra trên thể bình, thường hình thành đầu nhẩy dạng giọt. Bào tử hình elip đến trụ ngắn, đôi khi hình trứng. Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu là 28 C.

Paecilomyces javanicus : Bào tử khô, tạo chuỗi dài. Cuống sinh bào tử không bong, mang 1 bó thể bình, sắp xếp lông lẻo trong đệm nấm hoặc đơn lẻ. Thể bình hình chai, có cổ dài, phân nhánh khác thường hoặc thẳng đứng. Bào tử xấp sếp theo chuỗi dài, hình trứng, màu xanh nhạt. Nhiệt độ tối ưu là 28°C. Ký sinh trên bọ xít, rệp đậu.

Aschersonia taitensis: Bào tử sinh ra trên thể bình ở dạng giọt, không phân chia, có dạng hình thoi. Cuống sinh bào tử sắp xếp trong đệm nấm hình bán cầu. Bào tử trần không màu, nhiều vách ngang. Ký sinh trên côn trùng.

Cho đến nay người ta đã phát hiện ra xấp xỉ 700 loài thuộc 90 giống là nấm diệt côn trùng. Những loại nấm sợi này có nhiều ưu điểm trong việc sản xuất sinh khối lớn, phạm vi vật chủ rộng, tiềm năng gây dịch bệnh tự nhiên cao, nhiệt độ, độ ẩm sinh trưởng tối ưu và chính vì vậy có tiềm năng lớn cho việc phát triển thành những tác nhân kiểm soát côn trùng. Tuy nhiên, chỉ có một số loài nấm trong số 700 loài nói trên có thể phát triển thành yếu tố kiểm soát sinh học như *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Aschersonia*, *Verticillium*, *Normurea*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Beauveria* và *Paecilomyces*. Những côn trùng thuộc đối tượng kiểm soát của nấm là muỗi (*Culicidae*), rệp (*Aphidae*), bọ chết (*Delphacidae*), bọ trĩ (*Thysanoptera*), bọ lá (*Cecadellidae*), bọ cánh cứng (*Coleoptera*), ruồi trắng (*Aleyrodidae*), côn trùng bộ cánh vẩy

(*Lepidoptera*). Không giống như các loại vi sinh vật gây bệnh cho côn trùng mà cần phải ăn vào trong bụng rồi mới gây bệnh như virus, vi khuẩn, nguyên sinh động vật, nấm gây bệnh thường thông qua lớp vỏ kitin của vật chủ. Vì vậy, nấm có khả năng lây nhiễm hầu khắp tất cả các nhóm sâu bệnh chính, bao gồm rất nhiều loài côn trùng phổ biến và gây hại nghiêm trọng trong bộ côn trùng cánh đều Homoptera. Chính kiểu lây nhiễm thông qua lớp vỏ kitin này giúp nấm ký sinh ở cả giai đoạn không sử dụng dinh dưỡng như nhộng, trứng của nhiều loại côn trùng. Ngoài ra, nấm còn là những mầm bệnh chọn lọc đối với phần lớn bộ cánh cứng Coleoptera.

Ngoại trừ một số trường hợp, thì những mầm bệnh là vi khuẩn, virus, và nguyên sinh động vật không lây nhiễm đối với những côn trùng cánh cứng. Để tạo bào tử, nảy mầm và để xuyên qua lớp vỏ kitin, các nấm gây bệnh côn trùng đòi hỏi một độ ẩm, nhiệt độ nhất định. Chính điều này hạn chế việc ứng dụng chúng như các tác nhân kiểm soát sinh học, đặc biệt ở các hệ thống cây trồng trên cánh đồng mở. Điều này còn là một điều khó khăn, nhưng các kiến thức về hệ thống mầm bệnh - vật chủ khác nhau đã mở rộng. Chiến lược mới đối với việc ứng dụng và đưa nấm bệnh vào các quần thể sâu bệnh và cho việc thao tác các dịch bệnh tự nhiên cục bộ đã xảy ra, các chu kỳ dịch bệnh được nảy sinh. Các đặc tính sinh học, sinh thái học và tập tính học của các loài sâu hại và các điều kiện vi khí hậu liên quan đã được các nhà bệnh lý học côn trùng và các nhà vi sinh học nghiên cứu kỹ. Những cố gắng mới đây trong nghiên cứu mở rộng ứng dụng cũng nhấn mạnh tầm quan trọng về việc lựa chọn và phát triển những chủng có tiềm năng gây dịch tối đa, kiểm tra các yếu tố như khả năng tạo bào tử trên vật chủ đã chết, khả năng lan truyền, tốc độ xâm nhập và sự

phát triển in Vivo, nhiệt độ và độ ẩm tối ưu và tính ổn định trong môi trường. Những loại công việc này dần dần thay thế cho các thử nghiệm tuyển chọn nhanh dựa trên các tiêu chuẩn đơn lẻ như hiệu ứng gây bệnh (LC_{50}).

3.2. Ứng dụng nấm để gây dịch bệnh tự nhiên trên cánh đồng

Nghiên cứu mô tả các hệ thống mầm bệnh- vật chủ đã được công bố trong những năm gần đây. Người ta đặc biệt chú ý đến nhóm nấm *Entomophthora* vì khả năng lây lan của chúng. Sự phân bố của mầm bệnh nấm *Erynia*, *Conidiobulus* và *Entomophthora* đối với rệp gây hại ngũ cốc trong mối liên quan đối với các yếu tố như thời gian gieo trồng, mật độ vật chủ và nhiệt độ, hàm lượng độ ẩm đã được nghiên cứu.

Gây dịch bệnh tự nhiên cho quần thể sâu hại thuộc bộ cánh phấn Lepidoptera trên đậu tương là đối tượng của nhiều nghiên cứu. Vào đầu vụ trên cánh đồng đậu tương bệnh nấm phát triển với mật độ cao trên vật chủ. Từ những ổ dịch này có thể sản xuất dịch nuôi cấy mà có thể lây lan nhanh trên cánh đồng. Dịch bệnh tự nhiên trên sâu hại do nhóm nấm *Deuteromyces* gây ra cũng là đối tượng nghiên cứu trong những năm gần đây. Người ta đã lập mô hình dịch bệnh nấm *B. bassiana* trên sâu hại ngũ cốc châu Âu. Các yếu tố ảnh hưởng, giai đoạn ấu trùng và dịch bào tử nấm được xác định trong quá trình phát triển dịch bệnh. Tính ổn định tự nhiên trên môi trường cánh đồng là yếu tố quan trọng trong việc lan truyền dịch bệnh qua mùa đông và sự nhân lên của các mầm bệnh côn trùng. Davust và Pereia đã thông báo về sự sống sót dài ngày của bào tử nấm *B. bassiana* trên xác bọ cánh cứng ở cánh đồng đậu đũa trong điều kiện được bảo vệ khỏi ánh sáng mặt trời và mưa gió. Các kiến thức về bệnh côn trùng, dịch bệnh với sự giúp đỡ của

hệ thống phân tích mô hình mô phỏng đã làm tăng nhanh kiến thức của chúng ta về vai trò của nấm gây bệnh trong việc điều hoà quần thể côn trùng tự nhiên trong các hệ sinh thái cây nông nghiệp khác nhau. Những kiến thức này đưa đến việc kiểm soát có hiệu lực côn trùng thông qua việc thao tác hệ thống vật chủ- mầm bệnh. Bào tử trần của các nấm gây bệnh rất dễ sản xuất với số lượng lớn trên các cơ chất rắn khác nhau như gạo hoặc rơm rạ, hơn nữa các bào tử này dễ thu hoạch và ổn định trong thời gian dài dưới điều kiện bảo quản bình thường. Bản chất dễ vỡ của bào tử đã kích thích các nhà khoa học nghiên cứu tiềm năng ứng dụng các xác chết hoặc côn trùng tươi nghiền nát, hoặc nấm trên lá thực vật nơi mà sự hình thành bào tử có thể xuất hiện dưới các điều kiện thích hợp của môi trường.

Gần đây, các nhà nấm học ở Trung tâm kiểm soát côn trùng USDA đã quan sát thấy rằng khuẩn lạc nấm diệt côn trùng thuộc giống *Entomophthora* có khả năng sống sót qua vài chu trình hydrat hoá tạo bào tử (qua đêm ẩm) và khử nước/ngủ (giai đoạn khô, ban ngày). Dựa trên những quan sát đó, Mc Cabe và Sobe đã hoàn thiện một hệ thống mới để sản xuất các hệ sợi nấm sống khô mà có thể bảo quản ở tủ lạnh trong một thời gian dài. Hệ sợi nấm được sản xuất trong môi trường được thông khí, thu bằng lọc và sấy khô với chất bảo vệ. Sau khi nghiền sợi nấm thành những hạt có kích thước nhỏ, vật liệu được phun lên lá cây, chúng tác dụng với nước tự do tạo nên sự hình thành bào tử sau 5 ngày đêm. Mặc dầu việc sản xuất bào tử nấm được thực hiện ở qui mô lớn và sự bảo quản mầm bệnh đã được thương mại hoá, nhưng không phải cho tất cả các loài nấm. Việc sản xuất và bảo quản số lượng lớn các bào tử nấm bệnh từ các chi như: *Nomurea*, *Hisutella* và *Culianomyces* còn gặp nhiều khó khăn. Vì vậy, việc sản xuất hệ

sợi nấm có thể mang lại nhiều lợi ích trong một số hệ thống kiểm soát côn trùng. Quá trình sản xuất sợi nấm khô được ứng dụng thành công đối với vài loài nấm *Hyphomyces* bao gồm *Bauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Culicinomyces* và *Hirsutella*. Sự chuẩn bị hệ sợi nấm khô nảy sinh ra những vấn đề cần quan tâm như: tạo công thức mới (bao gồm việc gắn những hạt lớn vào lá cây), việc bảo vệ chúng tránh khỏi các yếu tố chống đối của môi trường. Nghiên cứu bao nang sợi nấm *Hyphomycetes* trong alginat Natri với các chất bảo vệ để tránh khỏi tia UV và hình thành các công thức để bảo quản hoặc nâng cao hiệu lực của bào tử trần nấm *Hyphomycetes* là việc rất cần thiết. Người ta đã xác định chất pha loãng khô hữu ích trong việc hình thành bào tử nấm *Metarhizium*. Tính độc hại của các bào tử được hình thành với dẫn xuất dầu thơm lớn hơn các bào tử không được trộn với dầu thơm. Chất bentonit được đề nghị sử dụng như là chất bao ngoài nấm *Beauveria* để bảo vệ chúng khỏi sự phân giải sinh học của các vi sinh vật đất.

3.3. Ứng dụng nấm chống lại côn trùng đất

Nấm *Metarhizium* và *Beauveria* được ứng dụng chống lại sâu hại trong đất và hại rễ cây. Hệ sinh thái đất là môi trường có độ ẩm cao và nhiệt độ trung hoà được bảo vệ khỏi sự chiếu xạ của mặt trời được coi như tiềm năng cho sự ứng dụng phòng trừ bằng vi sinh vật. Nhiều loại đất chứa các chất kháng nấm được sinh ra bởi hệ vi sinh vật tự nhiên, hệ động vật đất, dịch tiết từ rễ thực vật và các chất hữu cơ, vô cơ có nguồn gốc khác nhau. Các bào tử màng nhày của nấm *Beauveria* bị phân huỷ bởi các vi sinh vật đối kháng và nguyên sinh động vật trong vòng 3 tuần, còn sự sống sót của bào tử trần có thể lâu hơn và phụ thuộc vào tính chống chịu của các chủng nấm. Bào tử trần của nấm *Metarhizium* sống sót hơn 21

tháng trong đất, trong khi bào tử của những chủng khác chỉ sống được qua có 6 tháng. Phương pháp ứng dụng dịch nuôi cấy nấm trong nhiều loại đất khác nhau đã được nghiên cứu. Hiệu ứng nấm *Beauveria* chống lại côn trùng đất đối với 4 loại đất với tỉ lệ sét-cát khác nhau bị hạn chế trên mặt đất khi đất không bão hoà nước. Điều này được coi như nguyên nhân thất bại của việc sử dụng *Beauveria* chống lại ấu trùng bọ da *Melolontha* ở châu Âu. Để khắc phục khó khăn này, người ta đã đưa các bào tử vào đất ở các độ sâu mong muốn để diệt sâu hại rễ cam chanh.

3.4. Sử dụng nấm chống lại sâu hại rau trong nhà kính

Cây trồng trong nhà kính mọc ở các điều kiện độ ẩm và nhiệt độ được kiểm soát và được bảo vệ tránh khỏi sự chiếu xạ của mặt trời nên rất thích hợp cho việc ứng dụng dịch nấm gây bệnh chống lại sâu hại. Các chủng *Verticillium* và *Aschersonia* được nghiên cứu và hoàn thiện để phòng trừ bướm đêm và các loài rệp ở nhà kính. Các công thức thương mại của thuốc diệt sâu từ chủng nấm *V. lecanii* đã kiểm soát được các loài sâu hại này. Gần đây, người ta đã ứng dụng công nghệ sinh học để nâng cao hiệu lực của 2 loài nấm có ý nghĩa quan trọng trong hệ thống quản lý sâu hại tổng hợp này. Kết quả nghiên cứu của một số tác giả chứng minh rằng, khi nâng cao nhiệt độ và độ ẩm trong nhà kính bằng phương pháp nhân tạo có thể nâng cao hiệu quả diệt sâu của 2 loại nấm này. Ngoài 2 loại nấm nói trên, nấm *Beauveria* và *Paecilomyces* cũng được sử dụng để phòng trừ sâu hại trong nhà kính.

3.5. Ứng dụng nấm chống lại sâu hại ở hệ thống rừng và trên cánh đồng mở

Phòng trừ sâu hại trong rừng và trên cánh đồng mở là một sự thách thức lớn đối với việc ứng dụng nấm gây bệnh côn trùng, bởi

vì còn có nhiều vấn đề khó khăn như: không thể dự báo được các điều kiện độ ẩm, nhiệt độ và tia bức xạ mặt trời. Tuy nhiên, việc tuyển chọn được những chủng nấm tốt, việc hoàn thiện các chế phẩm diệt sâu cũng như các chiến lược ứng dụng tổng hợp chặt chẽ hơn với sinh thái học và sinh học sâu bệnh đã đem lại những thành công nhất định trong lĩnh vực này. Tại Brazil nấm *M. anisopliae* được ứng dụng trên 100.000 ha để chống lại rệp mía. Mặc dầu việc sử dụng thuốc trừ sâu hoá học cũng đem lại hiệu quả cao đối với loại rệp hại mía này, nhưng nấm *M. anisopliae* thích hợp hơn vì chúng không ảnh hưởng đến các loài ký sinh có ích trên sâu đục mía.

Nấm *B. bassiana* được sử dụng rộng rãi ở Trung Quốc để chống lại sâu đục thân ngô *Ostrinia furnacalis* và sâu róm thông *Dendrolimus punctatus* trên một diện tích lớn. Kết quả cho thấy, việc phun bào tử nấm *B. bassiana* vào thân ngô non nâng cao tỉ lệ tử vong của ấu trùng tới 80% và năng suất ngô tăng hơn 14% so với đối chứng. Tiềm năng nấm *B. bassiana* chống lại bọ cánh cứng hại khoai tây được đánh giá qua một loạt nghiên cứu ở Mỹ. Kết quả cho thấy việc phun bào tử nấm trên lá để diệt sâu cũng mang lại hiệu quả như là phun thuốc trừ sâu hoá học. Việc ứng dụng nấm diệt côn trùng như thuốc trừ sâu vi sinh hoặc gây dịch bệnh tự nhiên để kiểm soát côn trùng hại lúa nước mang lại kết quả rất khả quan. Các nghiên cứu gần đây tập trung vào việc tuyển chọn các chủng nấm có khả năng gây dịch hại lớn hơn và hoàn thiện các công thức và chiến lược ứng dụng để sản xuất các chế phẩm lây nhiễm ban đầu. Người ta đã ứng dụng chủng nấm *Erynia radicans* của Izrael vào úc năm 1979 để ứng dụng nấm chống lại bệnh đốm cổ linh lăng do quần thể rệp vùng gây ra. Nghiên cứu chủng *E.*

radicans như một mầm bệnh của bộ côn trùng nhiều chân như là một bằng hùng hồn về việc lây nhiễm nấm ở qui mô nhỏ cũng có thể gây nên dịch bệnh lan rộng trong mùa mưa đối với khoai tây, đậu, cỏ linh lăng. Sự lây nhiễm của quần thể nấm *Nympha* trong khu vực trồng khoai tây tăng từ 3% đến 93% trong 12 ngày. Kết quả tương tự được quan sát thấy ở New York vào năm 1986 sau việc phun số lượng nhỏ sợi nấm *E. radicans* khô ở các vườn trồng cỏ linh lăng.

4. Sản xuất các chế phẩm vi sinh vật diệt côn trùng

Phần lớn các mầm bệnh côn trùng đều có thể sản xuất trên qui mô công nghiệp lớn. Trên thị trường có rất nhiều loại thuốc vi sinh diệt côn trùng dưới các tên gọi thương phẩm khác nhau. Các sản phẩm được liệt kê ở Bảng 1. Các thuốc vi sinh diệt côn trùng có các công thức hình thành khác nhau. Chúng có thể được sử dụng cho mỗi nhu cầu và theo mỗi tình huống. Thí dụ: chống lại sâu hại bộ cánh vẩy, người ta có thể sử dụng dịch huyền phù lỏng, nước đậm đặc hoặc bột ẩm. Để kiểm soát quần thể sâu đục thân mía, chế phẩm dạng hạt được sử dụng có hiệu quả. Bột ẩm có thể là sự lựa chọn tốt cho sâu hại vườn rau. Tên các công thức thuốc vi sinh, tên mầm bệnh và tên thuốc thương mại được trình bày ở Bảng 2.

Không giống các chất diệt sâu hoá học, tính kháng thuốc trừ sâu vi sinh của côn trùng không thường xuất hiện bởi vì thuốc diệt sâu vi sinh là các sản phẩm sinh học. Tuy nhiên cũng đã có một số thông tin về tính kháng thuốc vi sinh của côn trùng (Bảng 3).

Bảng1: Các sản phẩm thương mại của mầm bệnh côn trùng

Sản phẩm	Mầm bệnh	Vật chủ
Vì khuẩn		
Agritol	<i>B. thuringiensis</i>	Lepidoptera
Bactobacterium	<i>B. thuringiensis</i>	nt
Bacilase	<i>B. thuringiensis</i>	nt
Bactospeine	<i>B. thuringiensis</i>	nt
Baktucal	<i>B. thuringiensis</i>	nt
Bakthane	<i>B. thuringiensis</i>	nt
Bathurin	<i>B. thuringiensis</i>	nt
Bloasp	<i>B. thuringiensis</i>	nt
Biolep	<i>B. thuringiensis</i>	nt
Biospore	<i>B. thuringiensis</i>	nt
Biotrol	<i>B. thuringiensis</i>	nt
Dendrobacillin	<i>B. thuringiensis</i>	nt
Dipel	<i>B. thuringiensis</i>	nt
Parasporeine	<i>B. thuringiensis</i>	nt
Plantiab	<i>B. thuringiensis</i>	nt
Sporeine	<i>B. thuringiensis</i>	nt
Thuricide	<i>B. thuringiensis</i>	nt
Doom	<i>B. popillae</i>	<i>Popilia japonica</i>
Japademic	<i>B. popillae</i>	nt
Milky spore	<i>B. popillae</i>	nt
Virus		
Gypchek	Virus đa diện nhân	Bướm ngài đêm
Lecont virus	Virus	Sâu thông
Neoscheck-S	Virus NPV	Sâu thông
SAN-404	nt	Sâu đo
TM Biocontrol	nt	Bướm đêm
Virion	nt	Bướm đêm
VPN-80	nt	Virus
VPN-82	nt	Sâu khoang

Nấm

Boverin	<i>B. bassiana</i>	<i>Leptinotarsa</i>
Collego	<i>Colletotrichum</i>	<i>Aeschynomena</i>
Devine	<i>Phytophthora</i>	<i>Morreniaodorata</i>
Mycolal	<i>V. lecanii</i>	<i>Aphids</i>
Mycar	<i>Hirsutella</i>	<i>Phyllocopterate</i>
Vetalec	<i>V. lecanii</i>	<i>Aphids</i>

Bảng 2: Các công thức thuốc diệt sâu sinh học

Công thức	Sản phẩm	Mầm bệnh
Dịch nước	Dipel2	<i>Bt var kurstaki</i>
Dịch nhũ hoá	Dipel 4L, 8L	
Dịch đậm đặc	Foray cobit	<i>Bt vartenebrionis</i>
Dạng hạt	Dipel 10G	
Bột ẩm	Baldirhos	<i>Bt iraelesnis</i>
Sử dụng ngay	Doom	<i>B. popillae</i>
Dịch huyền phù	Agrovir	

Bảng 3: Tính kháng thuốc của côn trùng đối với chế phẩm vi sinh

Sâu hại	Mầm bệnh	Tính kháng thuốc
<i>Plodia</i>	<i>B.t.k</i>	Kháng thuốc
<i>Culex sp</i>	<i>B.t isrealensis</i>	nt
<i>Heliothis virescens</i>	<i>B.t.k</i>	nt
<i>Plutella xylostella</i>	<i>B.t.k</i>	nt
<i>Pteris brassicae</i>	GV	nt
<i>Lymentria dispar</i>	NPV	nt

5. Ứng dụng công nghệ gen vào việc nâng cao chất lượng các chủng vi sinh vật diệt sâu

Virus là loài diệt sâu hại tiềm năng. Chúng đặc trưng cho vật chủ và có một số tính chất ưu việt để có thể trở thành công cụ tốt nhất cho việc kiểm soát côn trùng. Tuy nhiên còn có một hạn chế chủ yếu khi sử dụng virus vào việc chống côn trùng là thời gian pha Lag quá dài giữa thời gian ứng dụng và sự chán ăn của côn trùng. Một biện pháp để khắc phục điểm hạn chế này là dùng kỹ thuật phân tử để gắn 1 gen vào bộ gen của vi rus AcNPV mã hoá enzyme học môn JHE để rút ngắn thời gian chán ăn của côn trùng. Một cách tiếp cận khác đối với AcNPV là loại bỏ gen Egt mã hoá enzyme ecdysteroid UDP- glycosyl transferase. Sự biểu hiện gen egt ngăn chặn việc lột xác và gây nên việc dinh dưỡng kéo dài ở côn trùng. Khi loại bỏ gen đó virus trở nên tiềm năng hơn. Một khả năng nữa là gắn gen độc tố Bt vào virus AcNPV. Việc này làm tăng giá trị LC_{50} của chúng.

Chất lượng của các mầm bệnh nấm có thể được nâng cao bằng kỹ thuật dung hợp tế bào trần. Một thí dụ là thể đột biến tự dưỡng của *B.bassiana*, *B. brongniartii* và *B. amorpha* được xử lý với enzyme xymolase hoặc novoenzyme để đạt được sự dung hợp.

Chất lượng của *B.thuringiensis* được nâng cao bằng một số phương pháp. ở Nhật Bản một thứ *B.thuringiensis* được cải biến gen đã trở nên hiệu quả hơn chống lại sâu tằm nhưng không độc hại đối với con tằm.

Các phương pháp công nghệ gen được ứng dụng trong việc sản xuất cây thực vật chuyển gen. Các gen mã hoá protein tinh thể độc tố của *B. thuringiensis* được gắn vào thực vật để thực vật có thể tự sản xuất các độc tố. Các gen tinh thể độc tố,

glucoprotein đã được phân lập và nghiên cứu từng phần. Gien này được tách và đưa vào thực vật thông qua hệ thống trung gian Ti plasmid của vi khuẩn *Agrobacterium*. Cũng bằng phương pháp này, cây thuốc lá chuyển gien có thể gây chết tới 75-100% sâu *Manduca sexta* và cũng gây nên sự chán ăn và nâng cao tỉ lệ tử vong của sâu *Heliothis zea*, *H. virescens* và *Spodoptera exigua*. Rất nhiều cây thực vật khác cũng đang được chuyển gien như cà chua, bông, rau cải, lúa, khoai tây, táo và lạc.

6. Tình hình nghiên cứu mầm bệnh vi sinh vật diệt côn trùng ở Việt Nam

Việc nghiên cứu mầm bệnh vi sinh vật ở Việt nam được bắt đầu từ những năm 1970. Viện Công nghệ Sinh học, Viện bảo vệ Thực vật, Viện Sinh học Nhiệt đới Thành phố Hồ Chí Minh cũng như các Trạm dự báo sâu hại của Bộ Lâm nghiệp là các cơ quan nghiên cứu về mầm bệnh côn trùng ở Việt Nam. Các thành tựu đạt được trong những năm gần đây chủ yếu trong việc phân lập, định tên, nghiên cứu sinh lý sinh hoá các chủng vi sinh vật, thử khả năng diệt sâu của chúng trong phòng thí nghiệm, áp dụng kỹ thuật gien vào việc tuyển chọn nhanh các chủng Bt có hiệu lực diệt sâu cao và phổ rộng, hoàn thiện các phương pháp sản xuất sinh khối lớn, ứng dụng chúng chống lại sâu hại bông, rau và các cây trồng khác trong nhà kính và ở một số vùng thí nghiệm lựa chọn.

Việc phân lập, tuyển chọn và hoàn thiện các mầm bệnh vi sinh vật diệt côn trùng rất cần thiết cho việc phát triển thuốc trừ sâu vi sinh. Khí hậu nhiệt đới gió mùa và hệ thống cây trồng nông nghiệp ở Việt Nam cung cấp một nguồn vi sinh vật phong phú cho việc phát hiện những mầm bệnh nấm mới có tính gây bệnh cao và phổ vật chủ rộng.

Mặc dù đã có số lượng lớn các chủng *B.thuringiensis* được phân lập và rất nhiều nhóm gen mã hoá tinh thể protein độc tố được tách dòng và xác định đặc tính, sự đánh giá các chủng *B.thuringiensis* mới được phân lập vẫn được coi trọng. Nhiều loại sâu hại mẫn cảm cao với *B.thuringiensis* nhưng phần lớn không mẫn cảm. Chính vì vậy tiếp tục phân lập và xác định đặc tính của các chủng *B.thuringiensis* mới và có hiệu lực cao là việc làm rất cần thiết. Nghiên cứu tính đa dạng của *B.thuringiensis* ở Việt nam chỉ ra rằng chỉ số xuất hiện trong đất Việt Nam cao hơn nhiều so với các nước Đông Nam châu Á. Hơn 60% số mẫu đất được phân tích chứa *B. thuringiensis*. Các chủng *B. thuringiensis* phân lập ở Việt Nam có hình dáng tinh thể độc tố khác nhau: hình thoi (83%), hình cầu (9,1%), hình tam giác (1,9%), hình vuông (5,7%) [7]. Một số chủng *B. thuringiensis* phân lập ở đất Việt Nam có hiệu lực diệt ấu trùng bộ cánh phấn (*Cnaphalocrosis medinalis*, *Spodoptera litura*) và ấu trùng bộ hai cánh (*Aedes aegypti*) khá cao.

Các nhà khoa học Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia đã sử dụng các kỹ thuật PCR khác nhau để xác định gen mã hoá tinh thể protein hoặc để tuyển chọn các gen đặc trưng của *B. thuringiensis* [8]. Các gen được quan tâm nhiều là gen CryI, bởi vì chúng có hiệu lực gây độc cho hầu hết các loài sâu hại quan trọng đối với nông nghiệp, bao gồm sâu hại bông, sâu xanh, bướm ngài đêm... Gen CryIVa của *B.thuringiensis var israelensis* VN6 được tách dòng và biểu hiện trong tế bào *E.coli* bằng hệ thống biểu hiện PKK. Các tế bào *E. coli* tái tổ hợp này biểu hiện protein có tính độc cao đối với ấu trùng muỗi *Aedes aegypti*.

Tính gây độc chống lại ấu trùng muỗi của *B.thuringiensis israelensis* phân lập ở Việt Nam được tuyển chọn dựa trên hình dáng của các tinh thể độc tố, thành phần protein và các gen Cry [8].

Một số chủng *B.thuringiensis* phân lập từ sâu hại đậu tương Việt Nam có hiệu lực cao đối với nhiều loại sâu ăn lá, sâu tơ, sâu đo. Chúng có tinh thể tháp đôi, trọng lượng phân tử protein độc tố là 130 KDa, giống như chủng Bt chuẩn HDi và đều có khả năng diệt côn trùng cánh vảy. Kết quả xác định sự đa dạng của các gen Cry cho thấy chúng có mang gen CryIa, CryIAb, CryAc và CryV. Như vậy chúng có khả năng diệt sâu hại đậu tương cả 2 nhóm côn trùng cánh vảy Lepidoptera và cánh cứng Coleoptera. Kết quả xác định gen Cry trùng hợp với kết quả thử hiệu lực diệt sâu của chúng [5].

Với mục đích phát hiện, khai thác và cung cấp thông tin về các loài nấm gây bệnh côn trùng mối, nhiều tác giả Việt Nam đã phân lập và thuần khiết được các loài nấm *Beauveria bassania*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces* spp. có hiệu lực diệt mối, diệt sâu hại cao từ các mẫu khác nhau [9,10,11]. Kết quả điều tra mầm bệnh vi sinh vật trên sâu hại đậu tương ở đồng bằng sông Hồng và tỉnh miền núi Hoà Bình, Việt Nam từ năm 1995-2000 của Viện Sinh thái Tài nguyên Sinh vật và Viện Công nghệ Sinh học cho thấy, mỗi sâu hại chính hiện hành hoặc tiềm ẩn ít nhất 1 mầm bệnh. Nhiều loại sâu hại thuộc bộ cánh phấn Lepidoptera chứa đến 4-5 mầm bệnh. Về lý thuyết mỗi mầm bệnh được nghiên cứu đều có thể phát triển thành một loại thuốc trừ sâu vi sinh vật an toàn và có tính chọn lọc cao trong hệ thống kiểm chế sâu hại. Thành phần mầm bệnh vi nấm trên sâu hại đậu tương phong phú hơn mầm bệnh là vi khuẩn. Mầm bệnh vi nấm gồm các loài *N. rileyi*, *N. virridulus*, *N. atypicola*, *Beauveria bassania*, *Metarhizium*

anisopliae, *Paecylomyces japonicus*, *Verticillium lecanii*. Còn mầm bệnh vi khuẩn chỉ có *B. thuringiensis*. Các mầm bệnh vi nấm phân bố theo một qui luật nhất định trên sâu hại đậu tương. Nấm *Nomurea rileyi*, *N. viridulus*, *N. atypicola* chỉ gặp ở côn trùng bộ cánh vẩy *Lepidoptera* và lần đầu tiên được mô tả ở Việt Nam [4,5]. Các loài nấm này cũng được phân lập từ sâu xanh hại đậu tương ở Mỹ, Brazil và Đài Loan. Các loài nấm *Beauveria* và *Metarhizium* gặp ở hầu hết các loại sâu hại và côn trùng trên đậu tương. Riêng 3 loài nấm *Paecylomyces* spp., *Verticillium lecanii*, *aschersonia* spp. thì chỉ gặp ở các loại bọ xít, rệp đậu và rầy trắng.

Ở vùng đồng bằng sông Hồng, việc phun thuốc trừ sâu hóa học nhiều lần (4/5 trong một vụ) làm giảm tính đa dạng sinh học của các côn trùng và vi sinh vật có ích trên đậu tương. Kết quả điều tra sâu hại đậu tương ở Hoà Bình cho thấy, chúng không nhiều như ở đồng bằng sông Hồng, nhưng thành phần vi sinh vật có khả năng diệt sâu lại phong phú và đa dạng hơn [5]. Trên sâu hại đậu tương vùng Bắc Ninh, Hà Tây, Hà Nội chỉ phát hiện thấy nấm *Nomurea rileyi*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Entomophthora*, còn ở vùng Hoà Bình, ngoài những loài nấm nói trên, còn phát hiện thấy một số loài mới như *N. viridulus*, *N. atypicola*, *Paecylomyces* spp., *Verticillium lecanii*.

Ngoài các nghiên cứu cơ bản, các nhà khoa học Việt nam còn tiến hành các nghiên cứu ứng dụng các chế phẩm thuốc trừ sâu vi sinh sản xuất trong và ngoài nước để phòng trừ sâu hại cây trồng. Bào tử nấm *Metarhizium anisopliae* và *Beauveria bassiana* được sử dụng để diệt sâu róm thông, mối cây vải thiều (*Coptotermes formosaus*), bọ hà khoai lang (*Cylas formicarius*) và bọ dừa (*Brontisa* spp) ở điều kiện cánh đồng. Các tác giả chỉ ra rằng phun bào tử nấm *M. anisopliae* và *Paecilomyces* vào đất, có thể lây

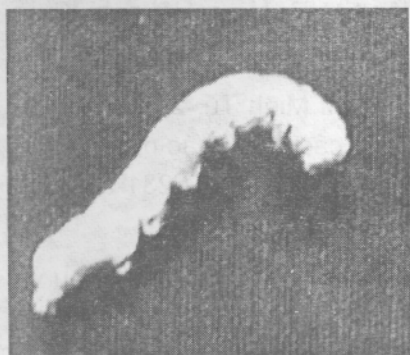
nhiễm tới 66,3-70,3% quần thể mối *Coptotemes formosaus* sau 5 ngày lây nhiễm [9]. Nhiều chủng *B. thuringiensis* có các tip huyết thanh khác nhau phân lập ở Việt Nam được sử dụng để chống lại sâu cuốn lá *Cnaphalocrosis medialis*, sâu tơ *Plutella xylostela* hại bắp cải thu được kết quả rất khả quan. Viện Sinh học nhiệt đới thành phố Hồ Chí Minh sử dụng virus đa diện nhân AcNPV với sự bổ sung các sản phẩm hữu cơ sinh học có thể nâng cao tỷ lệ tử vong của sâu hại từ 10-40%. Các nhà khoa học thuộc trạm dự báo sâu hại tỉnh Thanh Hoá đã công bố kết quả sử dụng virus NPV để phòng trừ sâu róm thông *Dendrolinus punctatus* [11].

Nghiên cứu bệnh lý côn trùng trên thế giới đã có những bước phát triển nhanh trong những năm gần đây. Nhìn lại lịch sử phát triển của môn khoa học bệnh lý côn trùng có ý kiến cho rằng chúng bắt đầu từ việc phân lập vi sinh vật từ sâu chết, từ đất, nước, và thử hoạt tính diệt sâu của chúng đến việc phát triển công nghệ sản xuất sinh khối lớn và đưa ra các thuốc thương phẩm. Những tiến bộ trong lĩnh vực công nghệ sinh học đã mở rộng khái niệm về bệnh lý côn trùng. Người ta cho rằng, giai đoạn đầu tiên bắt đầu từ việc phân loại vi sinh vật, khả năng sử dụng chúng trong việc kiểm soát côn trùng, nghiên cứu độc tố của chúng, xác định phổ vật chủ, khả năng kháng của côn trùng đối với mầm bệnh, kiểm tra tính an toàn, phát triển công nghệ sản xuất sinh khối lớn, chuẩn hoá các công thức sản phẩm, hoàn thiện và nâng cao hiệu lực của các chủng thông qua kỹ thuật gen, phát triển các cây thực vật chuyển gen và cuối cùng là hiệu quả kinh tế của việc kiểm soát côn trùng bằng vi sinh vật.

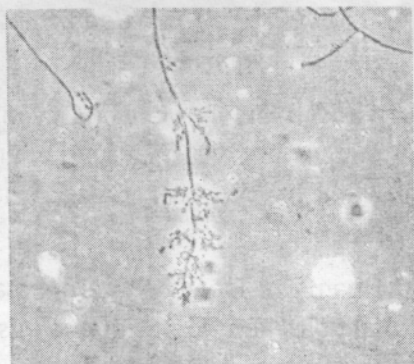
TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. K.L. Shivastava. 1996. Advances in the study of insect pathogens: bacteria, fungi, protozoa and nematodes. Recent advances in Indian Entomology. APC. Publications. Pvt. Ltd. New Delhi, P. 374-383.
2. G. Pierce. 1996. Developments in Industrial Microbiology. Insect control efforts with fungi. V.28. P. 77-87.
3. Ming Sun and Ziniu Yu. 2000. Recent development in the biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. Biotechnology Advances. V.18, P. 143-145.
4. Tống Kim Thuần, Vũ Quang Côn, 2000. Vi sinh vật diệt sâu hại đậu tương và triển vọng sử dụng chúng ở đồng bằng sông Hồng. Tạp chí Sinh học 23(3): 22-28.
5. Tống Kim Thuần, Vũ Quang Côn. 2001. Điều tra mầm bệnh vi sinh vật từ sâu hại đậu tương ở tỉnh miền núi Hoà Bình và định hướng sử dụng chúng. Hội thảo Quốc tế Sinh học, 7/2001, Hà Nội, Tr. 224-229.
6. Tống Kim Thuần, Vũ Quang Côn, 2000. Điều tra mầm bệnh côn trùng *Nomuria rileyi* trên sâu hại đậu tương ở các tỉnh Bắc Ninh, Hà Tây và Hà Nội. Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học, năm 1999. Tr.318-324.
7. Ngô Đình Quang Bính, Nguyễn Quỳnh Châu, Nguyễn Văn Thường, Nguyễn Anh Nguyệt. 2000. Sự phân bố và đa dạng sinh học của *B.thuringiensis* phân lập ở Việt Nam. Hội nghị Khoa học Quốc gia về Sinh học, Hà Nội, Việt Nam, Tr.448-459.
8. Võ Thị Thứ, Nguyễn Thị Hoa, Raj. Bhatnagar, 2000. Tách dòng và biểu hiện gen mã hoá protein diệt ấu trùng muỗi từ chủng

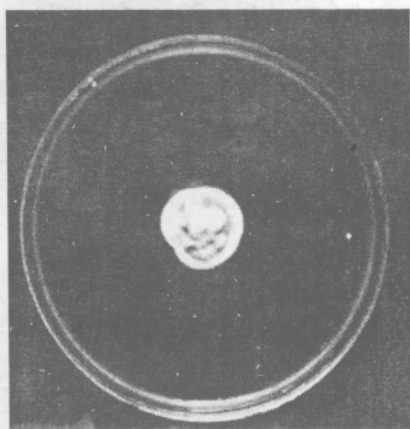
- B.thuringiensis israelensis* phân lập từ Việt Nam. Hội nghị Khoa học Quốc gia về Sinh học, Hà Nội, Việt nam, Tr.167-171.
9. Tạ Kim Chính, Hà Thị Quyến, Hoa Thị Minh Tú, 2000. Nghiên cứu vi nấm diệt côn trùng phân lập từ các mẫu khác nhau ở Việt Nam. Kỷ yếu Viện Công nghệ Sinh học 1999. Tr.231-238, Hà Nội.
 10. Phạm Thị Thuỳ 2002. Danh sách vi sinh vật trên sâu hại rau và sử dụng hỗn hợp *B.thuringiensis* và virus đa nhân của SiNPV để phòng trừ một số sâu hại rau ở Từ Liêm, Hà Nội. Hội nghị Côn trùng toàn quốc lần thứ 4, Hà Nội, Việt Nam, 4/2002, Tr.245-250.
 11. Tống Kim Thuần, 2002. Advances in study of entomopathogenic microorganisms in Vietnam. Proceedings of the Symposium on Environmental Protection and Sustainable Exploitation of Natural Resources. Hanoi 4-5/8/2002. p.468-473.



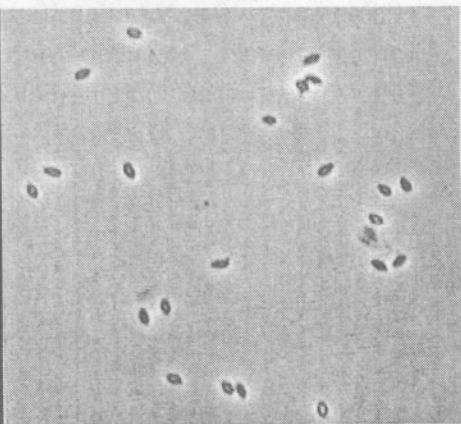
1



2



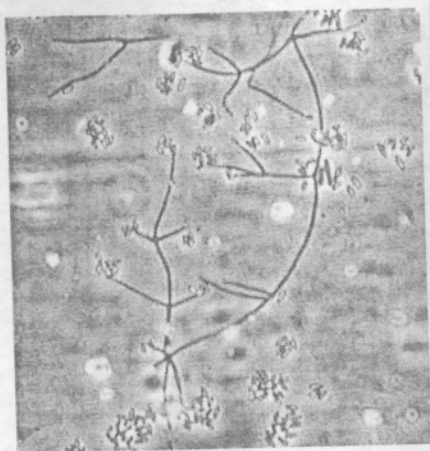
3



4

Hình 1. *Nomurea rileyi* phân lập từ *Lepidoptera*.

1. Sâu khoang chết bởi nhiễm nấm *N. rileyi*.
2. Cơ quan phát sinh bào tử của nấm *N. rileyi*.
3. Khuẩn lạc *N. rileyi* trên môi trường MPA sau 7 ngày nuôi cấy.
4. Hình dáng bào tử nấm *N. rileyi*.



5

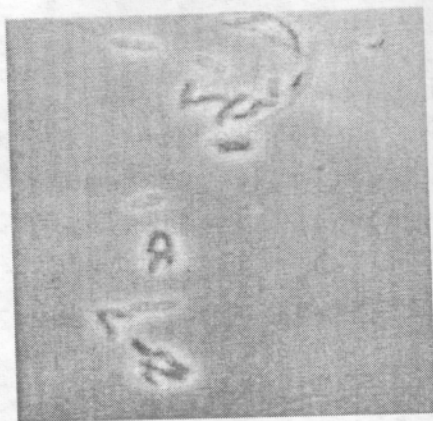


6

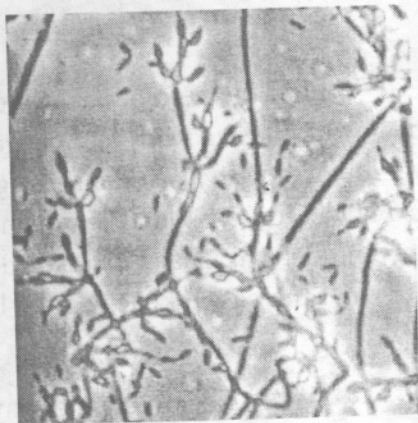
Hình 2. *Verticillium lecanii* phân lập từ rệp đậu.

5- Cơ quan phát sinh bào tử của *V.lecanii*

6- Khuẩn lạc của *V.lecanii* trên môi trường MPA sau 7 ngày.



7



8

Hình 3- *Nomurea viridulus* phân lập từ *Lepidoptera*.

7- Hình dáng bào tử của *N. viridulus*.

8- Cơ quan phát sinh bào tử của *N.viridulus*

VACXIN THUỘC THỂ HỆ MỚI BẰNG CÔNG NGHỆ GEN

TS Lê Thanh Hoà ()*

1. Vacxin tái tổ hợp có vectơ dẫn truyền
 - 1.1. Vacxin tái tổ hợp vectơ dẫn truyền *Salmonella*
 - 1.2. Vacxin tái tổ hợp vectơ truyền sử dụng virut đậu
2. Vacxin axit nucleic (vacxin ADN)
 - 2.1. Khái niệm
 - 2.2. Ưu điểm đặc trưng của vacxin ADN
3. Vacxin phối hợp với công nghệ chuyển gen thực vật

* *

*

Vacxin thể hệ mới hay vacxin bằng công nghệ gen là các chế phẩm được dùng làm vacxin, gây miễn dịch cho người và động vật, được tạo ra và sản xuất thông qua các thao tác về kỹ thuật gen. Đó là các loại kỹ thuật liên quan đến cắt, ghép, nối, phân lập, dẫn truyền, biểu thị... các đoạn axit deoxyribonucleic, và các gen từ cá thể này sang cá thể khác. Có thể liệt ra các loại vacxin sau đây :

- Vacxin xóa gen
- Vacxin phân tử hay vacxin dưới nhóm (tổng hợp)
- Vacxin tái tổ hợp vectơ truyền
- Vacxin chứa axit deoxyribonucleic

(*)Viện Công nghệ Sinh học.

Loại vaccin xóa gen (deletion mutants) đã được giới thiệu sơ bộ ở phần trước. Loại vaccin phân tử hay dưới nhóm bao gồm vaccin chứa protein kháng nguyên sản xuất bằng công nghệ gen và vaccin tổng hợp cũng được điểm qua, và không là đối tượng được đề cập đến ở phần này. Chúng tôi xin được giới thiệu 3 loại hình vaccin có ưu thế lớn, đang và sẽ được ứng dụng rộng rãi. Chúng đại diện cho hướng chiến lược mới của công nghệ vaccin và là thế hệ của những vaccin mới nhất: đó là vaccin tái tổ hợp vectơ truyền, vaccin ADN và vaccin sản xuất bằng công nghệ chuyển gen ở thực vật.

1. Vaccin tái tổ hợp có vectơ dẫn truyền

Đó là loại vaccin được tạo ra bằng kỹ thuật gen dựa vào một loại vectơ nào đó, chủ yếu là vi khuẩn hoặc virus thông dụng. Tất nhiên, về nguyên lý, loại vi sinh vật làm vectơ dẫn truyền phải là loại thông dụng cho nhiều loài, và phải giảm độc hoặc vô độc bằng cách cắt bỏ hoặc xóa đi một hay nhiều gen độc bằng kỹ thuật gen. Đồng thời muốn trở thành vaccin, loại vi sinh vật làm vectơ đó phải được ghép vào một hệ thống biểu thị bao gồm một bộ phận làm promoter khởi động mạnh và một hay vài gen kháng nguyên mà chúng ta cần để làm vaccin. Do vậy loại vaccin này được gọi vắn tắt là vaccin tái tổ hợp vectơ dẫn truyền (recombinant vectoral vaccines)

Về mặt cấu trúc, cần phân biệt 2 thành phần chính cấu trúc nên vaccin tái tổ hợp vectơ dẫn truyền:

- Đối tượng làm nhiệm vụ vectơ dẫn truyền: là các loại virus và vi khuẩn đơn giản đã bị cắt bỏ gen những gây bệnh (gen độc) và tính gây bệnh được giảm đến một mức độ nào đó mà đối tượng hưởng vaccin chịu đựng được (tức là nhược độc bằng phương pháp

sinh học phân tử), nhưng bản thân chúng vẫn duy trì được chu kỳ sống của mình trong cơ thể, và do vậy duy trì được nguồn kháng nguyên ngoại lai mà ta ghép vào.

- Đối tượng được tái tổ hợp vào: Đó là một hệ thống được ghép vào vectơ có cấu trúc gồm 2 bộ phận, một bộ phận là gen kháng nguyên có từ một loại vi sinh vật hay tác nhân gây bệnh nào đó, và một bộ phận khác là promoter khởi động được gắn vào trước gen nói trên. Tất cả các thao tác này đều sử dụng kỹ thuật gen để tạo ra sản phẩm. Gen kháng nguyên sẽ chịu sự điều hòa của vùng promoter này để sản xuất protein kháng nguyên mà chúng ta cần, duy trì nguồn kháng nguyên để tạo miễn dịch.

Vì vectơ dẫn truyền là loại vi sinh vật sống, nên chúng vẫn nhân lên được, do vậy nguồn gen kháng nguyên và sản phẩm gen kháng nguyên luôn luôn được sản xuất ra, do vậy miễn dịch sẽ rất lâu bền và đảm bảo.

Tuy nhiên, loại hình vaccin này vẫn chưa thực sự an toàn do vi sinh vật làm vectơ tuy bị cắt bỏ một số gen độc, tính gây bệnh có bị giảm nhưng không hoàn toàn và có thể gây phản ứng phụ. Hiện nay loại vaccin này chỉ được sử dụng hạn chế và đối với một số bệnh nhất định mà thôi.

Về nguyên lý, tất cả mọi gen kháng nguyên đều có thể được ghép vào hệ thống vectơ truyền là một loại vi sinh vật nào đó. Đối với vi sinh vật có đủ tiêu chuẩn làm đối tượng vectơ, có thể sử dụng vi khuẩn như : vi khuẩn *Salmonella*, vi khuẩn *Lao*..., hoặc virus, như virus đậu (vaccinia virus) hoặc virus adeno...

Trong phần viết này, chúng tôi chỉ xin giới thiệu 2 loại vectơ chính được sử dụng hiện nay là : vi khuẩn *Salmonella typhimurium* và virus đậu (vaccinia virus)

1.1. Vaccin tái tổ hợp vectơ dẫn truyền *Salmonella*

Các loại vi khuẩn là loại vi sinh vật khá thông dụng được chọn làm vectơ truyền gen kháng nguyên bởi chúng có lợi thế là dễ sử dụng qua đường tiêu hoá. Một trong các loại đó là vi khuẩn *Salmonella*, đã được làm nhược độc bằng kỹ thuật gen, không còn tính gây bệnh nhưng vẫn có khả năng xâm nhập qua đường tiêu hóa và tồn tại trong hệ lympho tiêu hóa (GALT = gut-associated lymphoid tissue) trong mảng Payer, trong lách v.v... mà từ đó chúng có khả năng tàng trữ và phân phát kháng nguyên cho hệ miễn dịch của cơ thể.

Hai loại vi khuẩn thông dụng của hệ tiêu hoá được chọn làm vectơ là *E. coli* và *Salmonella typhimurium*. Về nguyên lý, tất cả mọi loại gen kháng nguyên đều có thể ghép vào hệ gen của chúng, và nhờ chúng phân phối trong cơ thể. Dĩ nhiên, trong quá trình sinh trưởng và phát triển của vectơ chủ, gen kháng nguyên do chúng mang theo cũng được nhân lên và tổng hợp protein kháng nguyên, cung cấp nguồn kháng nguyên bền vững cho cơ thể tạo miễn dịch.

Một lợi thế khác của vectơ vi khuẩn đường ruột là bên cạnh tạo được miễn dịch dịch thể nói chung và miễn dịch qua trung gian tế bào (trong những điều kiện thích hợp nhất định), chúng là yếu tố thuận lợi không gì thay thế được trong sự hình thành miễn dịch niêm mạc (mucosal immunity), một loại hình miễn dịch được đề cập đến hiện nay và có tầm quan trọng lớn trong miễn dịch đường hô hấp, tiêu hóa và sinh dục. Kháng nguyên tiếp nhận qua đường tiêu hóa, đặc biệt là kháng nguyên qua vectơ dẫn truyền, có điều kiện tiếp xúc với một loạt các cơ quan hệ lympho chịu trách nhiệm về miễn dịch niêm mạc, nằm rải rác trong hệ hô hấp, tiêu hoá, sinh

dục... để chúng tạo miễn dịch, sản xuất kháng thể, chủ yếu là kháng thể tiết dịch IgA, một loại globulin miễn dịch niêm mạc.

Sự hoạt động nhịp nhàng của hệ miễn dịch niêm mạc (mucosal-associated lymphoid tissue = MALT), bao gồm hai hệ thống, đó là GALT (gut-associated lymphoid tissue), một hệ thống mô lymphô trong hệ tiêu hoá, và LALT (lung-associated lymphoid tissue), một hệ thống mô lympho trong hệ hô hấp. Dù vaccin vào bằng đường tiêu hoá, sự phân phối kháng nguyên vẫn đồng đều trong cả hai hệ thống (MALT) và do vậy kháng thể tiết dịch IgA vẫn được sản xuất trên bề mặt niêm mạc của cả hệ hô hấp, tiêu hoá và sinh dục. Vaccin chứa gen kháng nguyên phòng bệnh đường hô hấp, tiết niệu, sinh dục... vẫn có thể đưa vào cơ thể qua đường tiêu hoá, nhằm phòng chống các loại bệnh cục bộ của các hệ hô hấp, sinh dục nói riêng.

Ưu thế của vaccin vectơ truyền sử dụng vi khuẩn đường ruột, trước hết là *Salmonella*, là chúng dễ thao tác, dễ sử dụng, dễ nhân lên và dễ phân phối nguồn kháng nguyên cho cơ thể. Một khi đã được tái tổ hợp, gen kháng nguyên được cấy vào vectơ vi khuẩn để dẫn truyền thì việc nuôi cấy vi khuẩn tái tổ hợp cũng không phức tạp, và do vậy đảm bảo việc tiếp giống, nhân giống và sản xuất loại hình vaccin này để ứng dụng.

Do ưu thế đã nói, vi khuẩn *Salmonella* nhược độc bằng công nghệ gen, đang được hướng vào việc tạo ra và sử dụng làm vectơ chuyển gen virus các loại, trước hết là phòng chống virus đường hô hấp. Gen kháng nguyên virus cúm cũng đã được cắt ghép vào *Salmonella*, để sử dụng như là một vaccin cho uống phòng bệnh cúm.

Trên một số thành quả đạt được, nhiều loại vaccin tái tổ hợp thông qua vectơ truyền là vi khuẩn đường ruột cũng nhanh chóng được nghiên cứu và ứng dụng, trong đó có hướng nghiên cứu vaccin phòng chống bệnh sốt rét, ký sinh trùng đường hô hấp và tiêu hóa, hoặc nhiều loại vaccin phân tử khác.

Về nguyên lý và thực sự đã được ứng dụng, vi khuẩn *Salmonella typhimurium*, sau khi xóa gen *aroA* hoặc gen *cya*, hoặc gen *crp*, hoặc gen *thyA* v.v... vẫn giữ nguyên các đặc tính sinh học, sinh trưởng và phát triển như vi khuẩn ban đầu, nhưng chúng không còn gây bệnh được nữa. Những gen gây bệnh này bị cắt bỏ hoặc xóa hoạt tính bằng kỹ thuật gen, tạo ra những chủng *Salmonella* nhược độc phân tử (molecular based attenuated strains). Khi tổ hợp gen kháng nguyên cùng với hệ thống khởi động đã được thiết kế kèm theo, được ghép vào một chủng *Salmonella* nhược độc, thì chủng này tiếp nhận gen kháng nguyên đó, trở thành chủng vi khuẩn tái tổ hợp chứa gen kháng nguyên, và trở thành vaccin vi khuẩn vectơ truyền.

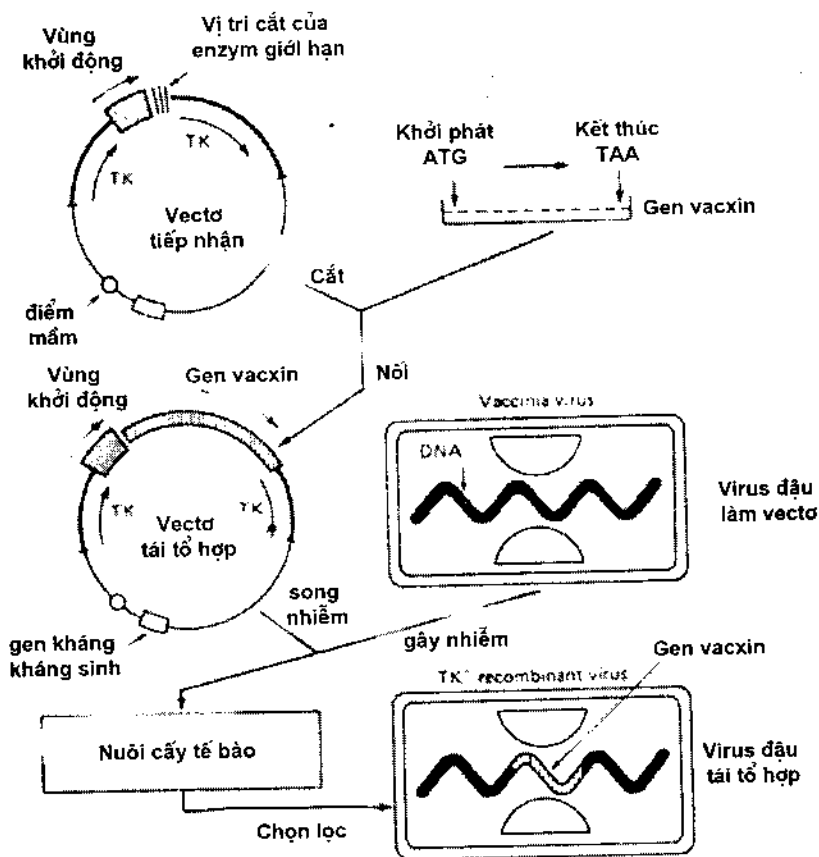
Hiện nay, *Salmonella* được sử dụng làm vectơ truyền các loại gen kháng nguyên của virus cúm, virus viêm gan B, virus sốt xuất huyết, vi khuẩn gây bệnh đường ruột, vi khuẩn tả, liên cầu khuẩn, ký sinh trùng sốt rét v.v... và nhiều loại khác.

Khai thác hệ thống miễn dịch niêm mạc, với ứng dụng vectơ vi khuẩn dẫn truyền gen làm vaccin, thực sự đã góp phần to lớn trong chiến lược vaccin và miễn dịch phòng chống bệnh ở người và động vật.

1.2. Vaccin tái tổ hợp vectơ truyền sử dụng virus đậu

Virut đậu (vaccinia virus) ngày nay không còn được sử dụng làm vaccin phòng chống bệnh đậu mùa nữa, bởi vì bệnh đậu mùa thực sự đã được xóa sạch trên toàn trái đất. Do có nhiều đặc tính

thuận lợi của một loại virus làm vectơ dẫn truyền gen kháng nguyên, nên virus đậu ngày nay đang được hướng vào sử dụng



Hình 1: Sơ đồ tạo vaccin tái tổ hợp vectơ truyền sử dụng virus đậu. Vectơ tiếp nhận là plasmid có chứa vị trí cắt của enzym hạn chế, được cắt và nối gen vaccin vào trở thành vectơ tái tổ hợp. Khi song nhiễm cùng virus đậu, và gây nhiễm tế bào thích ứng, gen kháng nguyên (vaccin) được truyền sang virus đậu tại vị trí của gen thymidine kinaza (TK), cắt đứt gen này (TK-). Tế bào nhiễm được nuôi cấy để chọn lọc virus đậu tái tổ hợp có chứa gen kháng nguyên, và vaccin tái tổ hợp có vectơ truyền là virus đậu được sản xuất với khối lượng lớn.

trong công nghệ sản xuất và ứng dụng vaccin bằng kỹ thuật gen. Virus đậu tái tổ hợp (recombinant vaccinia virus) được sử dụng làm vectơ truyền vaccin, sản xuất một số chất có hoạt tính sinh học cao, và nhiều mục đích nghiên cứu về sinh học phân tử, miễn dịch và mối quan hệ virus - tế bào. Vaccin virus đậu làm vectơ truyền được nghiên cứu rộng rãi phòng chống nhiều bệnh truyền nhiễm hiểm nghèo, đặc biệt là hướng vaccin phòng chống ung thư.

Có lẽ trong lĩnh vực virus học, virus đậu nói chung và đậu mùa (variola virus) nói riêng, được nghiên cứu sâu sắc nhất. Đặc biệt khi Et-uốt Giơ sử dụng virus đậu bò (vaccinia virus) như là một loại vaccin chống bệnh đậu mùa của người vào năm 1798, thì thật sự, họ hàng virus đậu đã được các nhà khoa học để ý nghiên cứu trong 200 năm lịch sử đã qua.

Cũng là một loại virus chứa ADN, nhưng virus đậu lại thực hiện sự nhân lên tạo virus đậu mới trong nguyên sinh chất tế bào bị nhiễm, do vậy các quá trình tổng hợp protein phục vụ cho việc tạo vỏ bọc của virus này cũng dễ dàng thực hiện trong nguyên sinh chất với một mức độ cao. Virus đậu là loại có kích thước lớn, 300-400 nm, có hình viên gạch, có axit deoxyribonucleic 2 sợi làm nhân, và bao bọc nhân là vỏ protein gọi là capxit. Đặc biệt virus đậu có 2 thể bên (lateral bodies) nằm ép vào nhân, gọi là thể bên trái và bên phải. Virus đậu có hệ gen gồm 200 nghìn nucleotit, trong đó có hơn 100 gen hoạt động, sản xuất các loại men ADN, ARN polymeraza và nhiều sản phẩm protein khác. Là loại virus thích ứng tế bào thượng bì, do vậy virus đậu có thể sử dụng các loại môi trường có nguồn gốc thượng bì để nuôi cấy, ví dụ như màng nhung niệu (CAM = chorio-allantois membrane) của phôi, hoặc môi trường tế bào nhân tạo, hoặc chính động vật sống thích ứng.

Thành quả nghiên cứu về virus đậu bò ngày nay đã cho phép chúng ta tận dụng loại virus này với mục đích làm vectơ truyền vaccin. Chúng ta đã có bản đồ gen chi tiết của virus này, và do vậy vị trí của các gen đã được biết tường tận nên có thể thao tác cắt - nối - ghép chính xác các gen ngoại lai vào vị trí thay thế một số gen của chúng. Một đặc tính tuyệt vời khác của virus đậu là tuy hệ gen của chúng chỉ có 200 nghìn nucleotit, nhưng có khả năng tiếp nhận một hoặc nhiều gen ngoại lai (gen vaccin) có tổng độ dài đến hàng chục nghìn nucleotit (đến 25 nghìn nucleotit). Do vậy chúng là vectơ lý tưởng để tạo nên vaccin đa giá, chứa một lúc nhiều gen kháng nguyên tạo miễn dịch phòng chống nhiều loại bệnh khác nhau.

Về nguyên tắc, để tạo vaccin dùng virus đậu làm vectơ, người ta thường ghép các gen kháng nguyên vào những vùng “không gen” (non - coding region) trong hệ gen virus đậu, do vậy các vùng có gen hoạt động của chúng vẫn bảo tồn và giúp chúng thực hiện chu kỳ nhân lên, đồng thời những vùng gen “mới” chứa các gen kháng nguyên cũng được hoạt hóa và sản xuất kháng nguyên. Nguồn kháng nguyên luôn luôn được nhân lên, theo cùng với sự tồn tại của virus vectơ chủ, sẽ luôn luôn đảm bảo cho hệ miễn dịch tạo miễn dịch.

Về nguyên lý, người ta phải cắt bỏ một số gen “độc” trong virus đậu, cũng như cắt bỏ một gen hoạt tính nào đó (ví dụ gen Thymidine kinaza = TK) của chúng để khống chế chúng không thực hiện nhân lên ngoài ý muốn con người. Sau khi thiết kế hệ thống gen kháng nguyên vào virus đậu này, chúng ta có một loại vaccin có vectơ virus đậu dẫn truyền. Để làm vaccin, thật sự cần có một quá trình khác phức tạp hơn, đó là hệ thống lai virus đậu - thực khuẩn thể. Hệ thống lai này cho phép chuyển giao trở lại

nguồn gen ARN - polymeraza được cung cấp từ thực khuẩn thể, đảm bảo hoạt động sống của virus. Khi cùng song nhiễm (trans-infection), hay nói cách khác khi đưa vaccin hỗn hợp lại tạo này vào cơ thể, gen ARN - polymeraza từ thực khuẩn thể sẽ chuyển nạp vào virus đậu, và từ đó virus đậu vaccin chứa gen kháng nguyên mới hoạt động, thực hiện các quá trình sao chép, trong đó có việc sản xuất protein kháng nguyên (Hình 1).

Hoạt động theo nguyên lý này là các loại vectơ đã được nghiên cứu và bước đầu sử dụng bao gồm sản xuất thụ thể CD của virus HIV, men tyrosin kinaza gắn màng tế bào, các epitope kháng nguyên, mục đích sản xuất kháng thể đơn dòng, nghiên cứu virus - tế bào, nghiên cứu ion qua màng, các receptor truyền xung thần kinh v.v... Hiện nay một số vaccin dùng trong thú y như vaccin đại cho động vật hoang dã đã được nghiên cứu sản xuất, sử dụng virus đậu làm vectơ truyền gen. Hướng tạo vaccin HIV cũng sẽ sử dụng virus đậu mang gen *gp120*, *gp160* hoặc gen *env* của HIV, nhằm tạo vaccin gây miễn dịch.

Mối lo ngại lớn nhất là khi sử dụng làm vectơ truyền gen, virus đậu, tuy là nhược độc nhưng vẫn còn sống, và do vậy có khả năng trao đổi gen trong tự nhiên để trở nên "độc", và có thể tái gây bệnh đậu. Trong khi bệnh đậu mùa thực sự đã bị đẩy lùi hoàn toàn, việc tồn tại một virus đậu sống vẫn là mối nguy cơ cho loài người.

Về góc độ làm vaccin tái tổ hợp nhược độc sống, virus đậu làm vectơ có ưu thế lớn vì chúng có khả năng kích thích cả 3 loại hình miễn dịch: miễn dịch dịch thể, miễn dịch qua trung gian tế bào và cả miễn dịch niêm mạc (trong nhiều điều kiện thích hợp). Lợi thế tiếp theo là miễn dịch có virus đậu tham gia thường kéo dài, bền lâu, hoạt phổ miễn dịch rộng, thích ứng nhiều loài, phương pháp vaccin đơn giản và tương đối an toàn, giá thành vaccin không cao.

2. Vacxin axit nucleic (vacxin ADN)

2.1. Khái niệm

Khi đưa axit deoxy-ribonucleic (ADN) của một loại plasmid vectơ có chứa gen kháng nguyên vào cơ thể, thì rất kỳ lạ, gen kháng nguyên đó lại tổng hợp ra protein kháng nguyên và kích thích cơ thể sinh miễn dịch chống lại protein do gen kháng nguyên kích thích sinh ra.

Hiện nay có rất nhiều loại plasmid, trong đó về chức năng có thể phân biệt làm 2 loại: loại plasmid có vai trò dẫn truyền gen gọi là plasmid vectơ dẫn truyền (cloning vector) và loại plasmid có vai trò biểu thị gen gọi là plasmid vectơ biểu thị (expression vector). Plasmid vectơ dẫn truyền có thể không đảm đương được vai trò của plasmid vectơ biểu thị, nhưng plasmid vectơ biểu thị có cấu trúc và chức năng phức tạp hơn plasmid dẫn truyền và có tác dụng kiểm dụng cả hai vai trò nói trên.

Plasmid là gì ? Plasmid có trong thiên nhiên là loại hoang dã, chúng là những vòng ADN khép kín, tồn tại trong tế bào chủ theo lối cộng sinh, có khả năng tự nhân lên khi tế bào phân chia và thông thường, plasmid thường cưu mang những gen sản xuất những sản phẩm quý hiếm trợ giúp tế bào chủ: như gen kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn đường ruột, gen sản xuất độc tố, gen chống chịu kim loại nặng, hay gen phân hủy hợp chất hữu cơ độc trong môi trường...

Plasmid có tính thích ứng cộng sinh vật chủ và do có kích thước gọn nhẹ, chỉ khoảng vài nghìn đến vài chục nghìn nucleotit, lại có khả năng độc lập nhân lên, nên chúng là loại lý tưởng được chọn làm vectơ dẫn truyền gen vào tế bào và thiết kế làm vectơ biểu thị gen trong tế bào thích ứng trong công nghệ sinh học ứng dụng.

Plasmid dùng làm vectơ phải là một hệ thống được thiết kế lại

hệ gen mà trước đó chúng có nguồn gốc từ một loại plasmid nào đó có trong thiên nhiên. Plasmid này được gọi là plasmid nguyên thủy. Hầu hết các plasmid sử dụng trong công nghệ gen bắt nguồn từ plasmid ký hiệu pBR322 và pUC của vi khuẩn *E. coli*. Các hệ thống plasmid thiết kế sau được cải tiến hơn, thích ứng hơn với mục đích sử dụng và bắt đầu từ một hệ thống plasmid tổ tiên trước đó.

Trong plasmid vectơ, có 3 thành phần: một vùng chịu trách nhiệm khởi đầu cho sự nhân lên của plasmid gọi là vùng mầm, ký hiệu *ori*, một vùng gọi là vùng chọn lọc, chứa một hay nhiều gen kháng lại một hay vài loại kháng sinh nào đó (ví dụ: ampicilin, kanamycin chẳng hạn) giúp cho quá trình chọn lọc trong công nghệ gen, và một vùng khác, gọi là vùng tái tổ hợp, chứa một dãy nucleotit bao gồm nhiều vị trí cắt của các enzym giới hạn, được thiết kế nằm xen giữa một gen nào đó (ví dụ: gen β -galactosidaza chẳng hạn). Vùng tái tổ hợp được đặt dưới sự điều hòa của một promotor nào đó.

Khi ghép gen kháng nguyên hoặc gen cho sản phẩm protein nào đó vào vùng tái tổ hợp thì promotor sẽ khởi động và plasmid cùng tế bào chủ sẽ sản xuất protein.

Một ý định táo bạo nảy sinh trong những năm đầu 90 là dùng ADN của một plasmid tái tổ hợp chứa gen kháng nguyên làm vaccin bằng cách tiêm một lượng ít ADN tinh khiết này vào sâu trong cơ bắp. Kết quả bất ngờ là đối tượng được tiêm ADN thuần khiết này lại được miễn dịch. Phương thức gây miễn dịch kiểu mới này bằng axit nucleic được gọi là “miễn dịch di truyền học” (genetic immunisation). Tên của loại vaccin mới này đầu tiên được gọi là “vaccin kỹ thuật gen”, sau đó năm 1994, tổ chức Y tế thế giới (WHO) thống nhất gọi tên là vaccin axit nucleic bao gồm cả vaccin chứa ADN và vaccin chứa ARN, tuy nhiên, vaccin ADN thông dụng hơn và đang được nghiên cứu sử dụng nhiều hơn.

Như vậy vaccin ADN là một loại hình vaccin đặc biệt thuộc thế hệ mới nhất, đó chính là axit deoxyribonucleic của một plasmid vector biểu thị, được tái tổ hợp gen kháng nguyên với một hệ thống promotor mạnh, được tạo ra bằng công nghệ gen. Vaccin ADN có ưu thế lớn hơn vì gọn nhẹ và phương thức gây miễn dịch đơn giản và vì vaccin chỉ chứa ADN thuần khiết, nên rất bền với nhiệt độ.

Sau khi tạo được plasmid vector tái tổ hợp có mang gen kháng nguyên, việc sản xuất một lượng lớn ADN của vaccin này rất dễ dàng. Khi chuyển nạp (transformation) plasmid vector tái tổ hợp này vào tế bào chủ thích ứng, ví dụ như *E. coli*, nấm men *Saccharomyces cerevisiae* hoặc vi sinh vật thích ứng, thì chỉ sau một thời gian ngắn nuôi cấy, chúng ta có thể tách chiết, tinh khiết một lượng lớn ADN để làm vaccin.

ADN vaccin được bảo quản hết sức đơn giản. Chúng tồn tại hàng năm ở -20°C. Trong thời gian mang đi tiêm vaccin, không cần thiết phải bảo quản trong điều kiện lạnh, vì ADN rất bền, ngay cả ở nhiệt độ phòng (25°C) chúng tồn tại vài tháng.

Khi sử dụng làm vaccin, ADN vaccin tinh khiết này được hòa vào môi trường đệm đơn giản như nước muối sinh lý (NaCl 0,9%) hoặc PBS (phosphate buffer saline), rồi tiêm một lượng nhỏ (0,2 - 0,5 ml) vào bắp cơ là được. Ngoài ra, có thể sử dụng phương tiện cơ học khác là súng bắn gen (gene shot gun) để đưa ADN vaccin vào cơ thể.

Sau khi vào cơ thể, việc tiếp xúc, thu nhận ADN vaccin này như thế nào, cơ chế sinh miễn dịch ra sao vẫn còn chưa sáng tỏ. Người ta chỉ biết chắc chắn là gen kháng nguyên có trong ADN của plasmid tái tổ hợp đã được nhận lên, sản xuất kháng nguyên và kích thích cơ thể sinh miễn dịch

2.2. Ưu điểm đặc trưng của vaccin ADN

Khả năng biểu thị của gen kháng nguyên rất mạnh, thời gian sản xuất protein kháng nguyên rất lâu, do vậy nguồn kháng nguyên duy trì lâu, và cho miễn dịch tốt, ngay cả với cơ thể bị thiếu năng miễn dịch. Thuận lợi này cho phép không cần thiết phải đưa vaccin nhiều lần, có tính chất “nhắc nhở”, cho nên việc sử dụng vaccin như vậy là thuận tiện. Nếu đưa thêm một lần vaccin nữa vào cơ thể thì miễn dịch cực kỳ tốt. Người ta cũng lo ngại, liệu nguồn kháng nguyên hiển diện lâu trong cơ thể có thể sẽ làm cho cơ thể hình thành hiện tượng “dung nạp miễn dịch” (immunity tolerance), và hiện tượng tự miễn dịch (auto-immunity). Trong nhiều năm thử nghiệm vaccin ADN, cho đến nay, chưa thấy có những thông báo về các hiện tượng trên do vaccin loại này sinh ra.

Do có nguồn kháng nguyên lâu bền, nên vaccin ADN có khả năng kích thích loại hình miễn dịch qua trung gian tế bào. Ưu thế an toàn của vaccin ADN hơn hẳn so với vaccin tái tổ hợp có vector truyền (là virus hay vi khuẩn sống có giảm độc) là ở chỗ không có hiện tượng trao đổi gen để “lại độc”, mặc dù cơ thể lúc được hưởng vaccin có thể bị tạp nhiễm nhiều vi sinh vật cùng loại. Vaccin ADN cũng góp phần tạo miễn dịch tốt đối với cơ thể bị suy giảm miễn dịch, hay mắc các chứng bệnh suy nhược. Do vậy vaccin ADN có thể sử dụng cho bất kỳ đối tượng nào, cho dù bị suy nhược, nhiễm bệnh, hay thiếu năng miễn dịch.

Vaccin ADN cực kỳ bền với nhiệt độ, nên không đòi hỏi điều kiện bảo quản lạnh như các loại vaccin khác. Trong thời gian sử dụng, cũng không cần thiết phải bảo quản lạnh nghiêm ngặt. Điều này có ý nghĩa lớn đối với các nước nhiệt đới, nghèo và cần nhiều vaccin, tiết kiệm về kinh tế và thuận lợi khi sử dụng.

Ngoài những ưu điểm chính đã nêu, vaccin ADN còn có nhiều ưu việt khác. Một trong những lợi thế là có thể tạo vaccin

ADN đa giá một cách đơn giản bằng cách trộn nhiều loại ADN plasmid có mang các gen kháng nguyên khác nhau, rồi tiêm cho cơ thể. Hỗn hợp vaccin ADN không gây tác hại cho nhau.

Ưu thế tiếp theo là có thể tái tổ hợp một plasmid mang nhiều gen kháng nguyên hoặc gen quyết định điểm quyết định kháng nguyên (hay epitope) để tạo nên vaccin ADN đa chức năng, gây miễn dịch cho nhiều bệnh.

Vaccin ADN hứa hẹn một loại hình vaccin mới và một phương thức gây miễn dịch mới cho động vật và người. Cho đến nay vaccin ADN chỉ mới được thử nghiệm trên mô hình động vật mà chưa được phép thăm dò trên người.

Một vấn đề lớn của vaccin ADN là cơ chế tạo miễn dịch còn chưa được sáng tỏ, đó là liệu gen kháng nguyên có nhập vào (integration) trong hệ gen của người và động vật không ? Nếu bị nhập gen, cơ thể chắc sẽ chịu một hậu quả di truyền nhất định trong các thế hệ tiếp theo.

Hiện nay có nhiều loại vaccin ADN khác nhau đang được thử nghiệm, trong đó có vaccin ADN chứa gen HBsAg của virus viêm gan B và vaccin ADN chứa các gen kháng nguyên của virus suy giảm miễn dịch mắc phải ở người HIV.

Như vậy thực chất vaccin ADN là một loại hình vaccin hoàn toàn mới, đang được coi là có triển vọng lớn, đặc biệt có thể giải quyết một số bế tắc trong quá trình nghiên cứu tạo vaccin đối với một số vi sinh vật và ký sinh trùng gây bệnh hiểm nghèo và nan giải.

3. Vaccin phối hợp với công nghệ chuyển gen thực vật

Công nghệ sinh học phân tử thực vật cho phép chúng ta chuyển nhiều gen quý giá vào hệ gen thực vật, tạo nên thế hệ thực vật có ưu thế mang các gen đó để sản xuất nhiều sản phẩm có lợi. Đó là các loại gen chống chịu hạn, gen nâng cao chất lượng sản

phẩm, gen chịu bệnh, gen kháng côn trùng gây hại v.v... Các gen này được phân lập, duy trì và cắt - nối - ghép vào loại plasmid Ti, một loại plasmid dẫn truyền gen ở thực vật.

Plasmid Ti là một loại plasmid lớn, có nhiều vùng gen phức tạp, trong đó có vùng gen gọi là T-ADN. Ở đây có các gen gây khối u gọi là *onc*⁽⁺⁾ và nhiều thành phần khác. Đặc trưng của T-ADN là vùng này nằm giữa giới hạn của 2 chuỗi bên có cấu trúc đối xứng, và sau khi được chuyển nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* để vi khuẩn này mang vào thực vật qua các vết thương của cây, thì T-ADN có khả năng tách ra và nhập vào hệ gen của tế bào thực vật.

Lợi dụng đặc tính này, người ta thiết kế lại hệ gen của plasmid Ti, đặc biệt là vùng T-ADN. Các gen khối u *onc*⁽⁺⁾ bị cắt bỏ và gài vào đó là chuỗi ADN chứa nhiều điểm cắt của enzym hạn chế, để tạo nên vùng tái tổ hợp. Ở vùng tái tổ hợp này, chúng ta dễ dàng gài vào đó bất kỳ gen ngoại lai nào mà chúng ta cần đưa vào thực vật.

Hệ thống plasmid Ti và vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* được sử dụng rất hữu hiệu nhằm chuyển gen ngoại lai có giá trị vào thực vật. Một khi gen ngoại lai nào đó được nhập vào thực vật, thì hệ gen thực vật coi nó như là một gen hoạt động của chúng, và gen này sản xuất sản phẩm tương ứng mà chúng chịu trách nhiệm.

Xuất phát từ nguyên lý trên, ý định gài một hay nhiều gen kháng nguyên của vaccin động vật và người vào hệ thống plasmid Ti và *A. tumefaciens* đã được thực hiện. Sau khi chuyển gen, thực vật thế hệ mới đã tiếp nhận một nguồn gen vaccin từ vi sinh vật hoặc nguồn gen sản xuất protein có hoạt tính sinh học nào đó. Khi nuôi trồng, thực vật chuyển gen (transgenic plant) có mang gen vaccin hay gen sản xuất protein hoạt tính cao có nguồn gốc động

vật, đã tiến hành sản xuất sản phẩm và chứa trong các thành phần cơ thể của chúng. Nếu chất lọc, tinh chế chúng ta sẽ thu được sản phẩm protein đó. Nếu sử dụng nguyên vẹn, động vật và người “ăn” loại thực vật này, về nguyên lý, sẽ tiếp nhận được nguồn vaccin và do vậy có được miễn dịch.

Ưu thế của thực vật chuyển gen để sản xuất vaccin và hoạt chất có hoạt tính sinh học cao, là chúng dễ nuôi trồng, thời gian gieo trồng ngắn, sản lượng cao, và do vậy cho chúng ta một lượng sản phẩm lớn. Nếu dùng chúng làm vaccin, thì phương thức đưa vaccin lại đơn giản, động vật và người chỉ cần “ăn” nguồn thực vật có vaccin, là có thể có miễn dịch.

Dĩ nhiên có một số vấn đề cần phải được giải quyết. Vấn đề thứ nhất là phải chọn loại thực vật nào đó để dễ dàng thao tác đưa gen vaccin vào, lại vừa “ngon miệng” để con người và động vật thích “ăn” chúng, nếu chúng ta muốn sử dụng theo lối vaccin cho ăn.

Vấn đề thứ hai là nên chọn loại kháng nguyên nào để ghép gen vào thực vật, để sau khi tiêu thụ, chúng không bị men của hệ tiêu hóa phân hủy, đảm bảo còn tồn tại để kích thích miễn dịch, vì có lẽ chỉ qua con đường tiêu hóa mới dễ dàng tiếp nhận thực vật có nguồn vaccin động vật như thế này.

Vấn đề thứ ba, là nếu dùng thực vật chuyển gen để sản xuất kháng nguyên làm vaccin phân tử, hay sản xuất các hoạt chất có hoạt tính sinh học, thì phải chọn loại dễ trồng, năng suất cao, dễ thu hoạch, chế biến, bảo quản và tinh chế nguồn vaccin để gây miễn dịch cho gia súc và người.

Một trong những loài thực vật được chọn đầu tiên để chuyển gen vaccin vào là cây thuốc lá, vì loại cây này dễ thao tác bằng kỹ thuật gen, dễ nhân giống, dễ trồng, nhưng loại cây này không được người và động vật thích “ăn”, vả lại chúng lại rất độc, nên coi như chúng chỉ được dùng vào mục đích nghiên cứu, hoặc sản xuất chế

phẩm sinh học bằng công nghệ gen, hơn là vào mục đích sản xuất và ứng dụng vaccin theo phương pháp nói trên.

Khoai tây và các loại cây cho quả đang là mục tiêu được chọn để chuyển gen vaccin vào. Do động vật và người thích ăn, nên các loại cây này có lợi thế, và vì thời vụ trồng ngắn, năng suất cao, nên giá thành rẻ và dễ sử dụng. Chuối là cây được chú ý vì quả chuối được ưa thích sử dụng, nếu chuyển gen vaccin phòng bệnh nguy hiểm như bệnh dại chẳng hạn, thì động vật hoang dã, gia súc nuôi và kể cả người sẽ được miễn dịch sau khi tiêu thụ loại chuối vaccin này

Một số cây cho hạt, cây thực phẩm, như rau, đậu, đỗ ... cũng là nguồn tiếp nhận gen vaccin tuy phải vượt qua nhiều khâu kỹ thuật khó khăn trong công nghệ chuyển gen mới đạt được hiệu quả.

Rất nhiều loại gen vaccin đã chuyển vào thực vật thành công và đang từng bước được ứng dụng trong thực tế. Đó là gen sản xuất kháng nguyên bề mặt HbsAg của virus viêm gan B, một bệnh mãn tính dễ dẫn đến ung thư mà người hay mắc phải. Một số loại vaccin chuyển gen vào thực vật của ký sinh trùng sốt rét, của vi khuẩn đường ruột *E. coli*, của vi khuẩn tả... cũng đang được thử nghiệm.

Tuy còn nhiều vấn đề cần phải tiếp tục được giải quyết dưới góc độ sản xuất và sử dụng, nhưng thực vật chuyển gen dùng để sản xuất và cung cấp nguồn vaccin cho động vật đang là mối quan tâm của con người, và đang được sử dụng, đặc biệt là ở các nước nhiệt đới.

Hướng nghiên cứu, sản xuất, thử nghiệm và sử dụng vaccin chuyển gen bằng thực vật đang là một lĩnh vực hợp tác chung của sinh học phân tử vaccin và công nghệ sinh học phân tử thực vật, và thực sự sẽ mở ra một hướng mới trong việc tìm tòi, phát hiện và ứng dụng miễn dịch phòng chống bệnh cho người và động vật.

VỀ CÁC LIỆU PHÁP GEN TRONG CHỮA BỆNH

GS.TSKH. Đái Duy Ban ()*

Th.S. Đái Thị Hằng Nga

1. Những khái niệm về điều trị gen
2. Các biện pháp gen trong chữa bệnh cho người
3. Liệu pháp antisense
4. Liệu pháp đưa một gen mới vào bù đắp cho gen hỏng hóc
5. Đưa một gen mới vào sản xuất ra các chất cần thiết để tiêu huỷ tế bào bị bệnh
6. Chuyển gen vào các vi khuẩn, nấm men, v.v... để sản xuất các dược phẩm quý hiếm điều trị bệnh
7. Tái tổ hợp gen trong tạo vaksin thế hệ mới, vaksin phân tử và vaksin ADN
8. Sử dụng công nghệ gen trong cấy ghép các cơ quan
9. Thay phẫu thuật bằng liệu pháp gen
10. Liệu pháp gen lymphokin điều trị ung thư

Tài liệu tham khảo

1. Những khái niệm về điều trị gen

Từ năm 1953, Watson và Crick đã tìm ra được cấu trúc xoắn kép của phân tử di truyền DNA thì từ đó cũng khai sinh nền sinh học phân tử và y học phân tử.

Trong y học phân tử, 2 ngành y học ứng dụng được phát triển, đó là :

(*)Viện Công nghệ Sinh học.

- Ngành chẩn đoán gen các bệnh, đặc biệt là các bệnh di truyền, bệnh nhiễm khuẩn (xem quyển sách *Công nghệ ADN trong chẩn đoán các bệnh nhiễm khuẩn và di truyền* của tác giả Đái Duy Ban và Lữ Thị Cẩm Vân do Trung tâm Thông tin tư liệu, Trung tâm KHTN và CNQG xuất bản năm 1996).

- Ngành điều trị gen các bệnh : chú ý nhất là các bệnh ung thư, bệnh virus, các bệnh di truyền.

Đây cũng là hai ngành của y học đang đứng trước thêm thiên niên kỷ mới.

Ngành chẩn đoán gen đối với các bệnh thì được phát triển từ những năm 1980, đặc biệt nhất từ khi có máy PCR (phản ứng dây chuyền polymerase) phóng đại gen đã giúp cho chẩn đoán dễ dàng một loạt các bệnh.

Còn đối với điều trị gen các bệnh thì trước hết phải kể đến những thành tựu của Temin, Baltimore (1975) với sự phát hiện ra enzym phiên mã ngược dòng (reverse transcriptase) người ta thấy có thể dùng nó để tổng hợp gen nhân tạo, nhất là đi từ mRNA lên DNA.

Rồi 1979 thành tựu của Aber, Nathan và Smith về enzym thủy phân hạn chế acid nucleic (restrictase), người ta có thể dùng nó cắt gen và gài gen mới vào để tạo ra giống mới có năng suất cao – và cũng từ đó người ta luôn luôn nghĩ tới liệu có thể sửa chữa gen, thay thế gen bệnh bằng gen lành và tạo ra một ngành phẫu thuật phân tử – trong điều trị của y học.

Điều trị gen trên người chính thức phải kể từ tháng 3-1991, bác sĩ Stephen Rosenberg ở Viện ung thư quốc gia Bethesda, Maryland, Mỹ đã thử nghiệm trên một phụ nữ bị ung thư da bằng cách trị liệu bằng gen đầu tiên. Ông chích lấy từ máu bệnh nhân

loại lymphocyt T rồi đưa vào đó yếu tố tiêu huỷ u (tumour necrosis factor TNF) và hoàn trở lại người bệnh. Những tế bào T biến đổi này đã sản xuất ra TNF. Kết quả khối u đã thoái hoá nhưng vẫn chưa đủ để lành bệnh.

Thao tác này đánh dấu bước khởi đầu của một giai đoạn y học mang nhiều hy vọng, đó là giai đoạn điều trị gen cho các bệnh.

2. Các biện pháp gen trong chữa bệnh cho người

Tuy điều trị gen mới ra đời, nhưng đến nay đã hình thành một số hướng về liệu pháp gen trong chữa bệnh cho người như sau :

2.1. Liệu pháp antisense, antigene.

2.2. Đưa một gen mới vào bù đắp cho gen hỏng hóc.

2.3. Đưa một gen mới vào sản xuất ra chất cần thiết để tiêu huỷ tế bào bệnh.

2.4. Cấy gen vào các vi khuẩn, nấm men... để sản xuất các dược phẩm mới quý, hiếm sử dụng trong điều trị các bệnh.

(4 loại liệu pháp trên, xem quyển *Công nghệ gen và công nghệ sinh học ứng dụng trong y dược học hiện đại* do GS.TSKH. Đái Duy Ban và PTS. Lữ Thị Cẩm Vân chủ trì - Nhà xuất bản Y học - 1994).

2.5. Tái tổ hợp gen trong tạo vaccin thế hệ mới, vaccin phân tử – vaccin DNA (xem quyển *Công nghệ gen trong sản xuất vaccin thế hệ mới* của GS. TSKH. Đái Duy Ban, năm 1994).

2.6. Sử dụng công nghệ gen trong cấy ghép các cơ quan để thay thế những bộ phận bị bệnh).

2.7. Thay phẫu thuật bằng liệu pháp gen.

Các liệu pháp trên sẽ được trình bày dưới đây.

3. Liệu pháp antisense, antigene

Điều trị antisense là điều trị ngược hướng còn điều trị antigene là điều trị chống lại gen bằng cách một chuỗi oligonucleotid trói buộc cả chuỗi kép DNA. Thực chất của các điều trị này là lai tạo bổ sung vào phân tử DNA hay RNA làm cho các gen đó không hoạt động được.

Thí dụ : hình 1 chỉ ra các kiểu liên kết của peptid nucleic acid (PNA) tới DNA chuỗi đơn và DNA chuỗi kép.

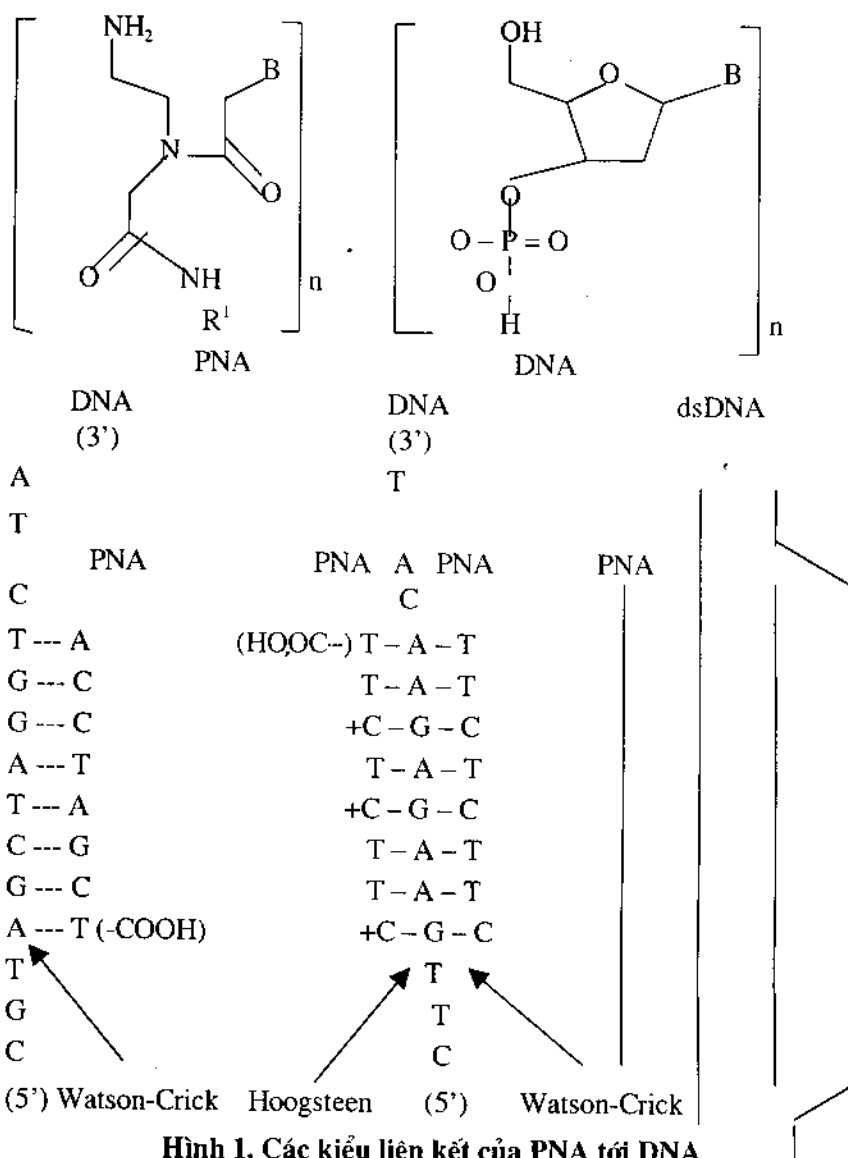
Phương pháp điều trị gen này rất hứa hẹn vì đặc hiệu và rất có ứng dụng trong điều trị bệnh do virus, trong ung thư và trong các bệnh di truyền. Bảng 1 giới thiệu một số bệnh có khả năng điều trị gen bằng kỹ thuật triple-helix...

Liệu pháp gen bằng antisense và antigene hiện nay đang nghiên cứu để chữa một số bệnh do di truyền, ung thư, virus.

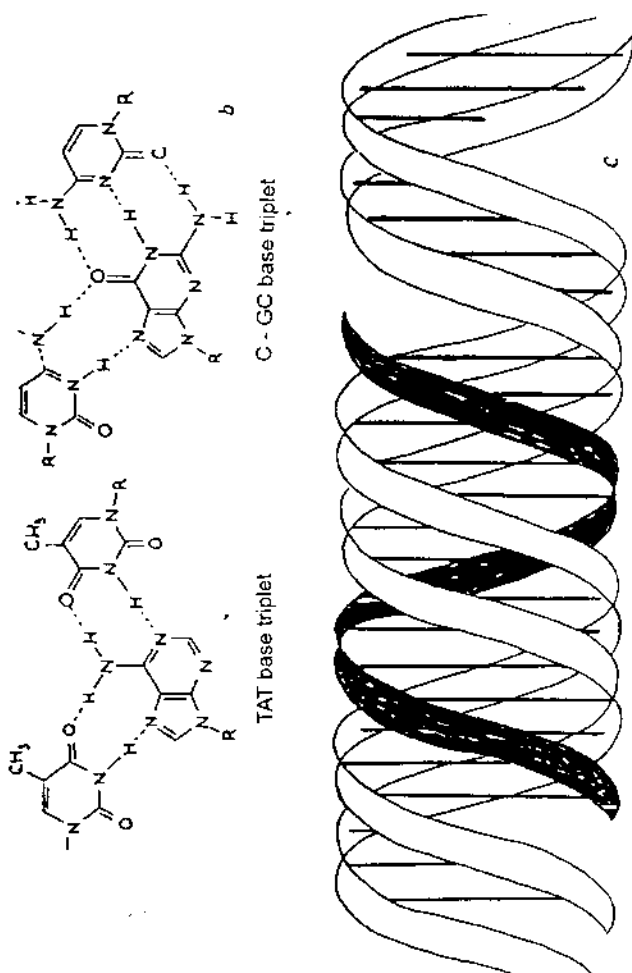
4. Liệu pháp đưa một gen mới vào bù đắp cho gen hỏng hóc

Thế giới trong những năm qua đã có một số kết quả trong điều trị gen loại bệnh kiểu này. Dưới đây có thể kể ra một số thí dụ điển hình :

- Ken Culver ở Bethesda (Mỹ) đã báo cáo chiến lược điều trị gen của bệnh thiếu enzym adenosin deaminase (ADA). Thiếu enzym này thì chất độc tích tụ lại giết tế bào lymphocyte T và B. Trẻ chết ngay năm đầu do suy giảm miễn dịch phối hợp nặng. Tác giả đã nghiên cứu chữa bệnh bằng cách tách tế bào lymphocyt T của bệnh nhân đưa ra ngoài rồi gây nhiễm bằng retrovirus có mang gen ADA, sau đó lại truyền lại tế bào T đó vào máu bệnh nhân. Kết quả 2 trường hợp đã được xử lý kiểu này thấy hiệu giá kháng thể được cải thiện rõ và các bệnh nhân đã phát triển hạch lympho.



Hình 1. Các kiểu liên kết của PNA tới DNA chuỗi đơn và chuỗi kép



Hình 2. Sơ đồ giới thiệu các Oligo nucleotide hình thành xoắn ba (triple-helix). Sợi đen đậm là sợi Oligo nucleotide thứ ba được tổng hợp để liên kết DNA duplex.

(a) và (b) : basctriplets và (c) : sự liên kết Oligonucleotide (sợi đen đậm) trong rãnh của DNA xoắn kép.

Bảng 1. Các bệnh có khả năng điều trị gen bằng kỹ thuật triple helix

Phân loại bệnh	Trên các bệnh cụ thể
Các bệnh do virus	1. Adeno virus 2. Herpes simplex virus 1 (HSV 1) 3. Herpes simplex virus 2 (HSV 2) 4. Herpes Zoster 5. Cytomegalovirus (CMV) 6. Epstein – Barr virus (EBV) 7. Human papilloma virus (HPV) 8. Human T cell lymphotropic virus – 1 (HTLV-1) 9. Human – immunodeficiency virus (HIV) 10. Influenza A 11. Influenza B 12. Farain fluense 13. Hepatitis A 14. Hepatitis B
Các bệnh ung thư	15. Lymphoma 16. Leukemia 17. Melanoma 18. Osteosarcoma 19. Carcinomas 20. Prostate carcinoma 21. Kidney carcinoma 22. Bladder carcinoma 23. Breast carcinoma
Các bệnh khác	24. Psoriasis 25. Allergy 26. Insllammation 27. Drug resistance

- Charles Coutellic ở Luân Đôn (Anh) đã điều trị gen đối với bệnh xơ nang (cystic fibrosis) gây rối loạn vận chuyển ion clo (Cl^-) ở phổi. Nguyên nhân do thiếu yếu tố điều hoà dẫn Cl^- qua màng xơ nang. Tác giả đã dùng adenovirus làm vector dẫn gen sinh yếu tố điều hoà đó - để đưa vào cơ thể cải thiện tình trạng nói trên.

- Marianne Grassman ở Michigan (Mỹ) đã mô tả sự điều trị gen đối với bệnh tăng cholesterol di truyền.

Người ta thấy thiếu gen mã hoá receptor của LDL (Low density lipoprotein) vận chuyển cholesterol vào gan để chuyển hoá, nên cholesterol ứ lại trong máu gây xơ vữa động mạch - nhất là động mạch vành tim dễ bị tắc mạch - gây nên bệnh nhồi máu cơ tim. Đó là bệnh nguy hiểm. Tác giả đã sử dụng retrovirus mang gen receptor của LDL đưa vào tế bào gan người - và thấy rằng đã giảm được 25% cholesterol trong máu bệnh nhân.

5. Đưa một gen mới vào sản xuất ra các chất cần thiết để tiêu huỷ tế bào bị bệnh

Đó là trường hợp liệu pháp gen bằng các cytokin tái tổ hợp thường được áp dụng trong điều trị ung thư.

Các gen cytokin như gen IL-2 (interleukin-2) IL-4, TNF (tumour necrosis factor) v.v... đưa vào virus đầu, rồi gây nhiễm cho lymphocyt T tách ra từ máu các bệnh nhân ung thư.

Sau lại đưa các tế bào T đã được chuyển gen đó vào trong cơ thể người bệnh. Các tế bào đó tiết ra các cytokin diệt tế bào ung thư. Đây còn gọi là vacxin tế bào sống.

Bảng 2 dưới đây nêu các tác dụng của các cytokin khi được biểu hiện bởi virus tái tổ hợp.

Bảng 2. So sánh các chức phận đã được biết của các cytokin với các hiệu quả của chúng khi được biểu hiện bởi virus được tái tổ hợp

Các cytokin	Các chức phận chủ yếu đã được biết	Hiệu quả miễn dịch khi được biểu hiện ra trong virus đậu tái tổ hợp
1. IL-1 γ	Làm hoạt hoá các tế bào T	Làm tăng sự trả lời kháng thể trí nhớ
2. IL-1 β	Làm hoạt hoá các tế bào T	
3. IL-2	Yếu tố lớn của T làm hoạt hoá các tế bào B, các monocyt và các tế bào giết tự nhiên	Làm yếu sự lớn của virus làm kích thích các tế bào giết tự nhiên sản xuất ra IFN- γ
4. IL-3	Yếu tố sinh trưởng và biệt hoá tế bào máu	Tạo máu trong các động vật bị chiếu xạ
5. IL-4	Làm điều hoà trả lời kháng thể, đặc biệt IgE	Làm tăng tính chất bệnh lý của virus
6. IL-5	Làm điều hoà sản xuất IgA	Làm kích thích sự trả lời IgA đặc hiệu kháng nguyên
7. IL-6	Được bao gồm trong sự chín của tế bào B tới những tế bào bài tiết kháng thể đặc biệt IgG1	Làm kích thích sự trả lời IgG1 đặc hiệu kháng nguyên, phục hồi bổ sung của các tế bào T giúp đỡ
8. IL-7	Chất hoạt hoá sớm tế bào B	
9. IL-10	Làm điều hoà miễn dịch trung gian tế bào	

Bảng (tiếp theo)

10. TN- α	Hoạt động chống virus invitro, hoạt hoá tế bào T độc	Hạn chế sự lớn lên của virus tái tổ hợp, cho phép chuột thiếu tế bào T chống nhiễm khuẩn
11. TNF- γ	Làm điều hoà phức hợp các phân tử hoà hợp tổ chức (MIIC) trên các tế bào trình diện kháng nguyên	Hạn chế sự lớn lên của virus tái tổ hợp cho phép chuột khuyết tế bào T vẫn chống được nhiễm khuẩn
12. TGF- β	Ức chế các chức phận của tế bào T và B in vitro làm hoạt hoá trí nhớ của T	

6. Chuyển gen vào các vi khuẩn, nấm men... để sản xuất các dược phẩm quý hiếm điều trị bệnh

Ngày nay, nhờ phát triển công nghệ gen, người ta đã làm cho các vi sinh vật – chủ yếu *E. coli* và nấm men *Saccharomyces cerevisiae* – tạo ra những thuốc hormon, protein, kháng sinh...

Vì các chức năng tạo ra những sản phẩm này không quen thuộc với chúng nên trước đó các vi sinh vật phải được cấy gen mang thông tin cần thiết để sản sinh ra những chất mong muốn bằng phương pháp tái tổ hợp gen. Sau đó chúng được nuôi cấy và sinh sôi nảy nở nhanh hơn trong những bình lên men : 5 lít, 10 lít hoặc thậm chí 100 lít, 500 lít và rồi người ta tách chiết được các

sản phẩm đó từ vi sinh vật hoặc từ môi trường cấy chủng để làm thuốc men.

Hiện nay có hàng chục công ty genetech ra đời và cạnh tranh nhau để sản xuất và thương mại hoá các sản phẩm nói trên. Họ thu về một lợi nhuận kếp sù tới hàng tỷ đô la cho mỗi hãng trong vài năm lại đây.

Ví dụ đối với hormon somatotostatin – kể từ tháng 11-1977 tại phòng thí nghiệm Genetech ở San Francisco, giống vi khuẩn được mang gen sản xuất hormon đó bằng công nghệ gen đầu tiên ra đời. Chúng sản sinh ra somatostatin để chữa bệnh tuyến yên, chỉ cần 100g vi khuẩn biến đổi gen đã tạo ra 5mg hormon một cách nhanh chóng – mà trước đây đã phải dùng đến 100 tấn não cừu để chiết xuất hormon đó.

Đối với insulin, sau đó một năm cũng do hãng Genentech đã sản xuất thành công bằng con đường tái tổ hợp gen vào vi khuẩn *E. coli* mà trước đây chúng phải tách chiết từ hàng trăm, ngàn tấn tụy bò, lợn mới thu được vài gam đến chục gam. Đây là thị trường to lớn vì có tới 5 triệu người bị bệnh tiểu đường trên thế giới phải dùng đến insulin hàng ngày cho đến suốt đời.

Đối với một loạt những chất khác như :

Somatotropin, interferon, protein đông máu yếu tố XIII, protein CD4, albumin huyết thanh v.v... cũng đều được các công ty cạnh tranh sản xuất theo con đường tái tổ hợp gen. Bảng 3 dưới đây nêu ví dụ điển hình các vi sinh vật các hãng trong sản xuất albumin huyết thanh bằng công nghệ nêu trên.

Bảng 3. Các sinh vật được dùng để sản xuất albumin huyết thanh người bằng con đường tái tổ hợp gen.

Các sinh vật	Các công ty (các hãng) tiến hành sản xuất
1. <i>E.Coli</i>	Genetech, South San Francisco, CA, USA. Upjohn; Kalamazoo, MI, USA, Genetica, Rhone Poulenc. Paris, France
2. <i>Bacillus subtilis</i>	Genex, Gaithersberg, MD, USA
3. <i>Sacharomyces Cerevisise</i>	Genetech. South San Francisco, CA, USA, Delta, Nottingham, UK Rhone Poulenc, Paris, France. Green Croó corp, Osaka, Japan. Tonen, Tokyo, Japan. Skandigenvepex Biotechnika, Stockholm, Sweden.
4. <i>Schizosaccharo myses Pombe</i>	Delta, Nottingham, UK
5. <i>Pichia Pastoris</i>	Philipps, Mahwah, NJ.USA. Green Croos corp, Osaka, Japan
6. <i>Hanseula Ro polymorpha Kluyveromyxes lactis Aspergillus niger</i>	Delta. Nottingham, UK Rhone Poulenc. Paris, France Gist Brocades, Delft. The Netherlands
7. <i>Aspergillus nidulans</i>	Delta, Nottingham. UK
8. <i>Notingham</i>	Delta, UK
9. <i>Nerospora crassa</i>	Tonen, Tokyo, Japan
10. <i>Solanum tuberosum</i> (Potato)	Mogen international NV. Leiden The Netherlands
11. <i>Sus scrofa</i> (pig)	DNX, Princeton. NJ. USA

7. Tái tổ hợp gen trong tạo vaccin thể hệ mới, vaccin phân tử và vaccin DNA

Hiện nay phòng và chống một số bệnh do virus, do vi khuẩn và cả bệnh ung thư thành công nhờ vào việc sản xuất vaccin tái tổ hợp gen.

- Một số kháng nguyên virus dễ được sản xuất từ nấm men như kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg) trong phòng và chống bệnh viêm gan B nguy hiểm cho người ; kháng nguyên glycoprotein của virus HSV-1, kháng nguyên hemagglutinin (HA) của virus cúm, kháng nguyên T của virus polioma, kháng nguyên gag của virus HTLV-III v.v...

- Một số vaccin phân tử khác cũng được sản xuất trong *E. coli*, hoặc trong virus đậu tái tổ hợp như vaccin sốt rét, vaccin dại, vaccin HIV...

- Gần đây một hướng vaccin mới được ra đời, đó là vaccin DNA. Nhờ kỹ thuật sinh học phân tử phát triển, kết hợp với việc hiểu tường tận hơn về bệnh tật và hệ miễn dịch – mà các nhà nghiên cứu đã đưa ra thử nghiệm loại vaccin này. Các thử nghiệm lâm sàng đầu tiên ở người mới bắt đầu từ năm 1955, về nguyên tắc, vaccin này có thể hầu hết chống lại bất kỳ một bệnh nào ;

Chúng ta biết rằng, hiện nay nhiều loại vaccin chỉ có tác dụng kích thích hệ miễn dịch dịch thể, nghĩa là chống bệnh dựa trên hàng rào kháng thể lưu hành trong máu và bạch huyết. Các kháng thể này trôi nổi trong dòng máu cho tới khi gặp một protein lạ vừa vận thì chúng kết hợp và làm mất tác dụng gây bệnh của kháng nguyên. Nhưng trong quá trình đó, có lúc phải theo đuổi rượt bắt protein lạ ngoại xâm, nên các đại thực bào tham gia các tế bào này báo cho hệ miễn dịch lymphocyt B và T phối hợp tạo ra kháng thể

nhanh hơn thông qua trí nhớ nhận biết protein lạ trước đây. Chính vaccin đưa cho hệ miễn dịch trí nhớ như vậy. Thế nhưng khi vào được trong tế bào chủ, tác nhân gây bệnh thoát được khỏi sự chú ý của kháng thể. Trong trường hợp này phải huy động đến hệ miễn dịch tế bào và hệ này tiêu diệt toàn bộ cả tế bào nhiễm bệnh để ngăn chặn bệnh lan rộng. Song có một số tác nhân gây bệnh tinh quái hơn, luôn luôn thay đổi hình dạng bề mặt làm khó khăn trong việc nhận dạng để tấn công. Kể đó, dù đã được làm yếu, vaccin phải thật sự “sống” mới ngăn chặn lây bệnh đúng nghĩa, nhưng như thế thì hiểm hoạ sẽ gia tăng. Vaccin DNA không đem lại hiểm hoạ như vậy. Lí do là chúng tác động bằng cách làm cho các tế bào tạo ra những protein lạ mà không có tác nhân gây bệnh bên cạnh.

Tiến sĩ Marget Liu (Mỹ) đã tạo ra được vaccin DNA đầu tiên - đó là bản sao phân tử của gen bên trong gọi là nucleoprotein. Tác giả đưa gen này vào plasmid và đưa vào vi khuẩn. Dùng vi khuẩn sinh sôi nảy nở một lượng lớn các plasmid mang gen virus cúm này trong một thời gian ngắn. Sau khi thu hoạch được các plasmid đó nhóm tác giả đưa chúng vào cơ thể chuột và họ vô cùng phấn khởi vì đã khám phá ra được chuột có đáp ứng miễn dịch mạnh đối với bệnh cúm.

Kết quả này vượt xa sự mong đợi của nhóm nghiên cứu. Mấy con chuột của họ đã thật sự miễn dịch đối với cả 2 loại cúm : Một loại có từ năm 1934 và loại kia có năm 1968. Các virus cúm thường xuyên đổi lớp áo khoác ngoài làm cho hệ miễn dịch khó nhận diện, nhưng phân tử nucleoprotein từ vaccin DNA, nhờ chức năng giới hạn xét đã tồn tại tương đương hơn 60 năm qua và đủ sức nhận ra và tấn công virus cúm.

Hiện nay nhiều nhóm nghiên cứu khác bắt chước vaccin DNA

chống cúm - đã bắt đầu chế tạo vaccin DNA khác - như vaccin DNA chống lao, vaccin DNA chống viêm gan B, vaccin DNA chống ung thư.

Đầu tháng 8-1996, tạp chí Nature medicine (Anh) đang tường trình 2 nhóm nghiên cứu chế tạo ra vaccin DNA lấy từ vi khuẩn lao. Khi họ tiêm vaccin này cho chuột nhắt, con chuột đã được miễn dịch đối với lao. Bác sĩ Douglas B.Lowrie, nhà nghiên cứu và phát triển loại vaccin mới này tại Viện Y học quốc gia Anh nói rằng những kết quả vừa khám phá sẽ giúp các nhà khoa học sản xuất một vaccin cho người chống lao hữu hiệu hơn BCG. Vaccin BCG - dùng tiêm cho người - trên cơ sở vi khuẩn sống làm yếu độc lực. Người ta hy vọng có thể sẽ tạo nên sức kháng bệnh, nhưng thật ra đến nay hiệu quả của nó không chắc chắn. Trước đây nhiều viên chức y tế cộng đồng tin rằng, giữa thập niên 80 lao không còn là mối đe dọa tới sức khoẻ con người. Thế nhưng thập niên vừa qua sự trở lại của lao là đáng sợ, bởi nhiều trường hợp lao có liên quan đến đã gia tăng của bệnh AIDS trên toàn cầu.

Mặc dù mối liên quan giữa vi khuẩn *Mycobacterium tuberculosis* và lao là một trong những vấn đề được khám phá sớm nhất, nhưng đến nay chúng ta biết tương đối ít về bệnh này. Một số loại lao kháng thuốc khiến các bác sĩ vất vả khi điều trị lao cho nhiều bệnh nhân. Theo WHO, 70% bệnh nhân lao kháng thuốc sẽ chết trong vòng 4 tháng và tổ chức này báo động chính phủ các nước cần có chương trình chống lao rộng lớn, nếu không, 30 triệu người nữa sẽ chết trong 10 năm tới và 90 triệu sẽ bị nhiễm lao. Tại Mỹ có hơn 15 triệu người mắc lao ngầm.

Loại vaccin BCG hiện nay cũng có khi không tạo được miễn dịch chống lao. Vì vậy khi thấy vaccin DNA chống lao hữu hiệu ra đời tiến sĩ Lee Reichman - Giám đốc Trung tâm lao quốc gia

thuộc Trường y New Jersey tại Newark phát biểu : “Tôi rất vui khi thấy loại vaccin mới ra đời” và Elisercarz, giáo sư miễn dịch học, Trường đại học California nhấn mạnh : vaccin từ gen dễ sản xuất hơn các vaccin chứa vi khuẩn còn sống – và rất hy vọng vaccin chống lao loại này sẽ rẻ hơn, dễ bảo quản, dễ vận chuyển và cho mức bảo vệ chắc chắn hơn – sẽ ngăn chặn được bệnh lao lây lan rộng.

- Đối với vaccin DNA chống bệnh viêm gan B, cũng đã được một số tác giả thảo ra. Heather David và cộng sự ở Trường đại học Ottawa đang tiến hành sản xuất vaccin loại này. Không giống như bệnh cúm, bệnh viêm gan B từ lâu đã có thể ngừa bằng dòng vaccin kích thích các kháng thể. Nhưng việc chủng ngừa thì dài dòng, phức tạp, người nhận cần phải được tiêm ba lần trong 6 tháng. Ở nhiều nơi, viêm gan virus B lan tràn thành dịch rộng lớn, việc tiêm chủng như trên tỏ ra rất phiền phức. Tiến sĩ David hy vọng vaccin DNA chống viêm gan B này sẽ đem đến cho cơ thể sự miễn dịch tốt và lâu dài, đồng thời cũng hy vọng cả chữa trị cho người đã mắc bệnh nữa.

- Đối với vaccin DNA chống ung thư đã ra đời cách đây 5 đến 6 năm khi các nhà khoa học nhận ra rằng có thể thuyết phục hệ thống miễn dịch của cơ thể phá huỷ các tế bào ung thư. Nếu điều này xảy ra, hệ thống miễn dịch có thể chỉ tấn công tế bào ung thư như những phân tử ngoại lai. Các tế bào ung thư có lớp protein duy nhất ở trên bề mặt của chúng và chính những protein này được sử dụng để khơi dậy sức đề kháng của hệ thống miễn dịch.

Nhóm nghiên cứu ở Southampton và Cambridge sản xuất vaccin này bằng cách lấy chuỗi DNA là mật mã của một loạt protein trên tế bào ung thư và tái tổ hợp gen vào plasmid tạo ra vector chuyển gen. Khi tiêm vector vào cơ bắp bệnh nhân, thì bộ

phân chế tạo protein của tế bào cơ sẽ bắt đầu sản xuất ra loại protein ung thư.

Sự xuất hiện đột ngột của hàng triệu phân tử protein ung thư sẽ kích thích hệ thống miễn dịch sản xuất hàng tỷ kháng thể chống lại chúng. Các nhà khoa học rất hy vọng trên cơ sở này các kháng thể cũng sẽ tấn công các protein bám trên bề mặt của tế bào ung thư và vì vậy diệt luôn ung thư ở bệnh nhân.

8. Sử dụng công nghệ gen trong cấy ghép các cơ quan

Hàng năm trên thế giới có hàng vạn bệnh nhân chờ được ghép các cơ quan nội tạng như tim, phổi, thận, giác mạc v.v... Tuy vậy các nước tiên tiến đều có ngân hàng các cơ quan đó – do những người tự nguyện hiến tặng. Song số cung bao giờ cũng thấp hơn số cầu gấp hàng chục lần. Do đó bọn maphia dựa vào cơn sốt đó buôn bán trẻ em để lấy phủ tạng, hoặc đánh cắp những phủ tạng của các bệnh nhân mới chết đem bán kiếm những khoản tiền lớn.

Để góp phần giải quyết nạn khan hiếm các phủ tạng ghép đó – các nhà khoa học đã nghiên cứu việc ghép các nội tạng thú vật vào cho người và đã bước đầu có hy vọng.

Cách đây 90 năm về trước, một nhà phẫu thuật người Pháp đã ghép thận lợn cho bệnh nhân, nhưng bị thải loại và bệnh nhân không sống được. Năm 1910, người ta đã thay thận khỉ cho một bệnh nhân khác – nhưng người này cũng chỉ sống được có 30 giờ. Những năm gần đây, người ta vẫn thực hiện các ca ghép nội tạng thú vật cho người, nhưng khó kéo dài cuộc sống.

Về mặt lý thuyết có thể bù đắp sự thiếu cơ quan người bằng cấy ghép cơ quan loài vật. Song khó khăn là ở chỗ cơ thể người bệnh không chấp nhận bộ phận được ghép – ngay cả khi dùng nội

tạng của người để ghép cho nhau. Hệ thống miễn dịch của người nhận rất nhạy cảm với vật lạ và bằng một cách tấn công để thải loại cơ quan được ghép. Vì vậy các bác sĩ mỗi khi ghép các cơ quan của người – ngay cả người cận huyết – anh em cũng phải dùng thuốc ức chế miễn dịch. Dùng nội tạng thú vật để ghép cho người còn nguy hiểm hơn. Để khắc phục tình trạng khó khăn này, người ta đã đánh lừa hệ miễn dịch. Các nhà nghiên cứu đã nghĩ đến việc tạo ra giống vật được cấy gen người đó là lợn và chuột.

David White – Giáo sư miễn dịch học và Hohn Wallword chuyên gia ghép tim ở bệnh viện Boston (Mỹ) đã thành lập tại Boston một trung tâm mang tên “Imutran” nhằm mục đích cấy gen người vào phôi lợn để cho ra đời loại lợn có nội tạng chấp thuận protein người, và những con lợn này sẽ được nuôi và hoàn thiện việc lai tạo chúng để nội tạng chúng có thể ghép được cho người.

Một thành công đầu tiên là ghép tim. Một ca ghép tiến hành đầu tiên trên thế giới thành công là do giáo sư Chris Barnard thực hiện ghép tim lợn sang người. Cho đến nay, sau một năm theo dõi, quả tim lợn nằm trong ngực người vẫn làm việc tốt, không có sự đào thải. Hiện nay các nhà bác học Mỹ có trong tay 500 con lợn giống để gửi đến các trung tâm có nhu cầu ghép.

Như vậy việc ghép gen vào phủ tạng các động vật để ghép cơ quan cho người là thắng lợi trong tầm tay, nhưng lúc ấy những người yêu nhau liệu có dám chấp nhận sống với nhau bằng quả tim lợn trong người không ?

9. Thay phẫu thuật bằng liệu pháp gen

Như trên chúng ta đã biết, liệu pháp gen ngày càng vững vàng bước vào nền y học hiện đại – trong điều trị các bệnh lỗi di truyền,

các bệnh tim mạch, ung thư v.v... Tuy nhiên, gần đây các nhà khoa học Mỹ còn hy vọng rằng, ngay cả trong những trường hợp bị kịch nhất, nhờ áp dụng liệu pháp gen, họ vẫn có thể bảo vệ được người bệnh đối với nguy cơ tàn phế. Tại những nơi mạch máu bị co thắt – họ đưa vào cơ thể một loại gen có thể thực hiện được chức năng tạo ra hợp chất thúc đẩy sự sinh sôi những mạng mạch máu phụ. Bằng cách đó các nhà khoa học Mỹ đã tạo ra được các tác phẩm “typass” kinh điển từng thực hiện trong kỹ thuật phẫu thuật tim mạch hiện đại, song không cần phải phẫu thuật phức tạp.

Giáo sư Jeffrey Isner – Trường đại học tổng hợp Tufts mới đây đã xử trí liệu pháp gen nói trên cho một nữ bệnh nhân trên 70 tuổi được tăng lưu lượng máu trên 80% ở những nơi cần thiết. Tác giả đã khẳng định trên tạp chí “Lancet” rằng : liệu pháp gen này có thể trở thành phương pháp điều trị thay thế hữu hiệu một số bệnh tim mạch trầm trọng một khi mọi tân được tỏ ra bất lực.

Ngày nay dùng liệu pháp gen, các bác sĩ đang đưa những bọc một lớp polimer chứa đầy đội quân gen vào các mạch máu như kiểu trước đây đưa những “khinh khí cầu dây gas” để mở rộng mạng mạch máu. Sau khi lớp polimer chứa gen bám vào thành mạch, thì DNA sẽ được thâm nhập vào bên trong, sản xuất ra các nhân tố làm gia tăng mạch máu. Và kết quả chỉ vài tuần đã xuất hiện cả mạng mạch máu mới. Nhờ liệu pháp này, bệnh nhân đầy lùi được những cảm giác đau đớn trong chân cũng như những vết thương cơ bắp. Các nhà khoa học đang hoàn thiện phương pháp này, điều đó mở ra một kỷ nguyên y học mới.

10. Liệu pháp gen lymphokin điều trị ung thư và biểu hiện các lymphokin bằng virus tái tổ hợp

Một số lượng lớn các lymphokin tái tổ hợp được đưa ra thị trường trong thời gian gần đây đã làm sống lại niềm hy vọng về một giải pháp miễn dịch cho bệnh ung thư. Nhiều lymphokin, đơn thuần hoặc phối hợp, đã tỏ ra có triển vọng trên các thử nghiệm động vật và trên những thử nghiệm sơ bộ ở người. Độc tính toàn thân của lymphokin là hạn chế chính của loại liệu pháp này, thường cản trở việc sử dụng liều đủ để làm khối u thoái triển. Để hiểu rõ khả năng điều trị chống ung thư của các lymphokin tái tổ hợp, cần có những mô hình phân phối thuốc mới có thể kích thích tối đa đáp ứng chống khối u tại chỗ và giảm thiểu độc tính toàn thân. Hiện nay người ta đề xuất một liệu pháp gen lymphokin tác dụng vào tế bào khối u sẽ tối ưu hoá việc phân phối lymphokin. Một số khó khăn có thể gặp phải khi thực hiện phương pháp này cũng được bàn luận.

Sự phát triển không ngừng của bệnh ung thư gây ra ấn tượng sai lầm về sự có mặt thường xuyên của phức hợp thể dịch và đáp ứng tế bào vật chủ khiến chúng ta hy vọng về một biện pháp miễn dịch trị liệu điều trị khối ung thư. Phân tích chi tiết các thâm nhiễm khối u cho thấy những số lượng và tỷ lệ khác nhau của tế bào lympho T độc và trợ giúp, tế bào diệt tự nhiên, tiền thân tế bào LAK (tế bào diệt được kích hoạt bởi lymphokin), đại thực bào, bạch cầu ưa bazơ và bạch cầu trung tính. Đặc tính thâm nhiễm có ý nghĩa tiên lượng và dưới những điều kiện thích hợp, các tủy tế bào được liệt kê ở trên có thể diệt tế bào khối u *in vitro* trực tiếp hoặc phụ thuộc kháng thể, thường song song với hoạt tính chống khối u *in vitro* trong các nghiên cứu cấy chuyển. Do đó, hình như bệnh nhân ung thư có một thứ vũ khí tế bào có thể loại trừ khối u,

nhưng vì lý do nào đó những tế bào này đã nằm ngủ trong khi khối u phát triển.

Sự phong phú của các tế bào lympho thâm nhiễm khối u (TIL) rất khác nhau giữa các loại ung thư, nhưng có đặc điểm là giảm tỷ số tế bào T trợ giúp T độc và giảm hiệu quả nhân bản. Lý do của tình trạng tê liệt chức năng tế bào T trợ giúp và hậu quả là giảm thải loại khối u bao gồm sự gia tăng tế bào T ức chế, tế bào T trợ giúp không đáp ứng do trình diện kháng nguyên sai lệch và các chất chống viêm do khối u tiết ra.

Mặc dù nhiều yếu tố khác như sự tăng sinh nhanh chóng và mất biểu hiện MHC góp phần ngăn cản thải trừ khối u, tình trạng tê liệt chức năng tế bào T trợ giúp là cơ sở của nhiều chiến lược miễn dịch trị liệu.

Liệu pháp miễn dịch lymphokin

Sự nhân bản, biểu hiện và sản xuất trên diện rộng các lymphokin tái tổ hợp gần đây đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc sử dụng các tế bào phản ứng phụ thuộc tế bào T trợ giúp. Đặc biệt, interleukin 2 (IL-2) tái tổ hợp đã được dùng để làm tăng tế bào LAK in vitro, tế bào này được cấy chuyển với liều IL-2 toàn thân cao. Nhờ đó đã giúp làm cho khối u thuyên giảm, nhất là ở u hắc tố ác tính di căn và carcinom tế bào thận. Các TIL tăng sinh nhờ IL-2, bao gồm tiền thân tế bào LAK, tế bào T độc và trợ giúp, hình như có độc tính tế bào lớn hơn tế bào LAK đối với khối u cùng chung nguồn gốc mà từ đó chúng được chiết xuất và vì thế có khả năng trị liệu tốt hơn. Nhiều lymphokin, bao gồm IL-1, IL-4, IL-5, yếu tố hoại tử khối u (TNF), yếu tố kích thích dòng bạch cầu hạt - đại thực bào (GM-CSF) và beta-interferon (IFN- β) có hoạt tính hiệp đồng với IL-2 trong các hệ thống sản sinh tế bào LAK in vitro, mở ra một hướng cho những thử nghiệm lâm sàng in vivo các phối hợp lymphokin có triển vọng.

Trở ngại chính của các phương thức chuyển tế bào TIL hoặc LAK nuôi cấy là mặc dù có đáp ứng thuận lợi toàn bộ hoặc một phần, song việc khỏi bệnh hiếm khi xảy ra, khiến cho việc sử dụng thường qui liệu pháp đắt tiền, phức tạp và tốn thời gian này khó được ủng hộ. Nhiều vấn đề cũng nảy sinh từ việc phải cho tiếp xúc in vivo liên tục với IL-2 để duy trì trạng thái diệt khối u tích cực của các tế bào cấy chuyển. Do thời gian bán huỷ in vivo của các lymphokin rất ngắn, nên cần truyền liên tục hoặc tiêm thường xuyên IL-2. Hơn nữa, nồng độ IL-2 cần để duy trì hoạt tính tế bào là độc, gây sốt, rét run, giữ nước và hội chứng thoát mạch nguy hiểm đến tính mạng. Phân phối IL-2 tại chỗ lại có thêm những khó khăn của việc tiếp cận khối u và thường không đủ cho những khối u di căn sâu.

Nhiều phương pháp mới nhằm làm tăng tỷ số trị liệu và đơn giản hoá việc phân phối IL-2 bao gồm các biến đổi hoá học để ổn định phân tử, các chế phẩm IL-2 giải phóng chậm, hệ thống phân phối liposom, và cấy ghép tế bào tiết IL-2 đã xử lý di truyền. Tuy nhiên, không có phương pháp nào trong số này được thừa nhận là có đủ khả năng cho liệu pháp IL-2 đối với ung thư, là liệu pháp cần cung cấp lymphokin tại chỗ liên tục cho mọi khối u mà chỉ giải phóng tối thiểu vào tuần hoàn toàn thân.

Liệu pháp gen lymphokin

Ít ra là về lý thuyết, việc phân phối lymphokin có thể được cải thiện nhờ một trong hai phương pháp trị liệu gen. Phương pháp thứ nhất bao gồm chuyển và biểu hiện in vitro các gen lymphokin thích hợp trong tế bào TIL trước khi cấy truyền. Các TIL “nhà thiết kế” tự kích thích đã biến đổi di truyền này có thể biểu hiện tăng độc tính tế bào chống khối u. Phương pháp này dựa trên khả

năng không chắc chắn của TIL tới đúng vị trí khối u và còn chịu thêm một nguy cơ là việc sản sinh lymphokin cấu thành này có thể khiến chính bản thân TIL chuyển dạng ác tính.

Một biện pháp thay thế cho TIL “nhà thiết kế” là liệu pháp gen lymphokin hướng tế bào u mà, bỏ qua những khó khăn trong thực hành, chắc chắn sẽ là một hệ thống phân phối lymphokin lý tưởng. Những lymphokin đơn thuần hoặc các phối hợp lymphokin được chọn lọc theo khả năng kích thích tối ưu các TIL, sẽ được tiết ra ở đúng vị trí sau khi chuyển gen với kết quả là tiêu diệt cả những tế bào ung thư không tiết interleukin. Mức độ bài tiết lymphokin, ban đầu được kiểm soát bằng những chất hoạt hoá gen phù hợp, sẽ giảm dần song song với sự phá huỷ tế bào ung thư và độc tính toàn thân sẽ được giảm thiểu.

Những lymphokin nào ?

Các lymphokin có nguồn gốc tế bào T trợ giúp bao gồm IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , TNF, lymphotoxin và GM-CSF. Tính đa dạng của chức năng lymphokin làm phức tạp những dự đoán về khả năng chết của một khối u đặc hiệu tiết ra một lymphokin đặc hiệu. Lợi ích của bài tiết lymphokin bao gồm tăng thu hút tế bào đáp ứng tới khối u và sự tăng sinh của chúng, và hoạt hoá trạng thái diệt khối u. Tiếp đó dòng thác lymphokin giải phóng từ tế bào phản ứng hoạt hoá sẽ khuếch đại thêm và duy trì đáp ứng viêm miễn dịch tại chỗ chống khối u. Trình diện kháng nguyên bởi đại thực bào được cải thiện, cùng với cải thiện tế bào T trợ giúp, cũng có thể dẫn đến tăng sản sinh kháng thể khối u, làm tăng hơn nữa hoạt động diệt tế bào u của thụ thể Fc mang tế bào phản ứng. Gen hoặc phối hợp gen lymphokin đặc hiệu được biểu hiện bởi tế bào u sẽ xác định thành phần nào trong đáp ứng của vật chủ được ưu tiên khuếch đại.

Các nghiên cứu về vai trò của tự tiết tố (autocrine) qua trung gian IL-2 trên ung thư tế bào T ở người và tính gây ung thư của tự tiết tố đã biến đổi di truyền (các dòng tế bào T chuột sinh IL-2) cho thấy sự bài tiết IL-2 của tế bào chuyển dạng làm giảm khả năng sống in vitro của chúng. Đồng thời, biểu hiện ADNc IL-2 trên các dòng tế bào ung thư chuột dẫn đến sự tăng sinh chậm hoặc đào thải in vitro thông qua khuếch đại các nhánh đáp ứng đặc hiệu (qua trung gian tế bào T) và hoặc không đặc hiệu của vật chủ.

Biểu hiện ADNc IFN- γ ở tế bào u nguyên bào thần kinh cấy ghép trên chuột làm tăng biểu hiện phức hợp tương thích mô (MHC) nhóm I và tăng tính miễn dịch chống khối u đặc hiệu trên chuột nhận.

Trong một nghiên cứu khác mới đây, dòng tế bào ung thư sinh IL-4 tạo ra bằng cách nhiễm chéo với gen IL-4 của chuột đã gây đào thải khối u khi được chúng đồng thời cho chuột trần với các dòng tế bào ung thư không sinh IL-4 khác nhau. Sự đào thải này có lẽ diễn ra qua trung gian đại thực bào và bạch cầu ưa acid, điều này hoàn toàn nằm ngoài dự kiến theo những hoạt động đã biết của IL-4. Hơn nữa, khối u sinh IL-4 phát triển trên chuột điều trị bằng kháng thể kháng IL-4 nhưng thoái triển khi dùng liệu pháp kháng thể, đưa đến kết luận quan trọng là sản sinh IL-4 tại chỗ có thể gây thoái triển khối u đã có.

Ngược với những hoạt động có lợi được bàn luận ở trên, một số lymphokin có thể ưu tiên gây ức chế đáp ứng chống khối u hoặc làm tăng hoạt động của các tế bào thâm nhiễm giúp khối u phát triển. Cũng vậy, sự kích thích tăng sinh tự tiết tố hoặc cận tiết tố (paracrine) của tế bào khối u lymphokin tiết ra sẽ làm giảm hoặc đảo ngược tác dụng có lợi. Điều này được làm rõ nhờ việc quan sát sự sản sinh tự tiết tố của IL-3 và GM-CSF trong bệnh bạch cầu tủy

tự nhiên có thể do IL-1 gây ra. Rõ ràng điều này sẽ giúp chúng ta có thêm kiến thức để thử từng lymphokine và phối hợp lymphokine trên một loạt các mô hình ung thư dễ dàng biến đổi di truyền in vitro có thể cấy ghép trên động vật.

Phân phối gen

Nếu liệu pháp gen lymphokine hướng tế bào u là một mục tiêu giá trị trong điều trị ung thư, thì làm cách nào để khắc phục những khó khăn khi thực hiện? Một khối tế bào ung thư vừa phải cỡ 100g – 1kg đại diện cho một quần thể tế bào đích gồm 10^{11} – 10^{12} tế bào, khiến ta không thể nghĩ đến một hệ thống chuyển gen nào khác ngoài virus tái tổ hợp. Trái với các phương pháp trị liệu gen được gợi ý trước đây, như thay thế gen ức chế khối u, phương pháp này không yêu cầu hiệu quả chuyển gen phải đạt 100%, mặc dù vật trung gian chuyển gen (vector) phải có khả năng đi tới một tỷ lệ đáng kể các tế bào, ung thư. May mắn thay, các ADNc lymphokine thường có kích thước phù hợp (dưới 1 kilobase) để đưa được vào hầu như tất cả các vector virus tái tổ hợp.

Vector chuyển gen tái tổ hợp có thể nhân lên không hoàn chỉnh, nhân lên hoàn chỉnh hoặc kết hợp cả hai. Mặc dù an toàn, song những nhược điểm của việc nhân lên các vector không hoàn chỉnh đối với kiểu ứng dụng này là đáng cân nhắc. Các vector phải sống *in vivo* đủ lâu để chuyển được gen của chúng, phải có số lượng bằng hoặc hơn số tế bào đích (10^{11} - 10^{12}), có thể xâm nhập cả vào những vùng khối u ít mạch máu và nhận diện đúng quần thể tế bào đích.

Các retrovirus tái tổ hợp không hoàn chỉnh hiện có bị bất hoạt bởi bề mặt của người, cho chuẩn độ tối đa là 10^2 /ml và ngoại trừ sự phụ thuộc pha S của phiên mã ngược và tích hợp, không hướng

vào các phân nhóm tế bào người đặc hiệu. Người ta có thể đạt được chuẩn độ virus cao hơn và biến đổi lớp vỏ virus để có tính kháng bổ thể và tạo ra tính hướng đích, qua trung gian kháng thể đơn dòng (mAb) kháng kháng nguyên ung thư. Tuy nhiên, thật khó hình dung ra cách khắc phục vấn đề tiếp cận với những vùng khối u ít mạch máu, ngoại trừ bằng cách sử dụng các virus hoàn chỉnh nhân lên hoặc mang gen lymphokin hoặc cung cấp các chức năng giúp cho vector không hoàn chỉnh lan tràn. Khả năng gây ung thư đã được chứng minh của các retrovirus đi đôi với sự giải phóng từ đích qua trung gian mAb sẽ xảy ra sau vòng nhiễm đầu tiên càng làm ta không thể tính đến phương pháp này.

Một hệ thống chuyển gen bằng virus khuyết tật nhân lên mới được triển khai gần đây dựa trên virus loại adeno (AAV), một pavovirus người tích hợp ổn định vào NST tế bào chủ không cần đến adenovirus trợ giúp của nó. Mặc dù vector AAV không có vỏ (do đó kháng được bổ thể) và có thể đạt được chuẩn độ cao hơn retrovirus, song những khó khăn trong việc hướng đích và tiếp cận vùng thiếu mạch máu thì vẫn nguyên.

Các vector virus hoàn chỉnh có khả năng khuếch đại in vivo, do đó có thể nhiễm vào một tỷ lệ tế bào u cao hơn, bao gồm những tế bào ở vùng thiếu oxy và bán hoại tử, bằng cách lan trực tiếp từ tế bào này sang tế bào khác. Cản trở chính của phương pháp này lại là yêu cầu virus phải nhận diện đặc hiệu quần thể tế bào đích.

Hướng đích bề mặt

Phạm vi tế bào chủ của một virus bị hạn chế chủ yếu bởi sự phân bố các thụ thể carbonhydrat, lipid hoặc protein đặc hiệu trên bề mặt tế bào, nếu một virus tái tổ hợp và các thế hệ sau của nó có được những đặc điểm gắn kết của các mAb đặc hiệu khối u in vivo

mà không làm tổn hại đến sự thâm nhập của virus cũng như gây ra các tai biến khác trong vòng đời của virus, thì vấn đề hướng đích sẽ được giải quyết phần lớn. Song không may là giải pháp này hình như quá xa vời vì nhiều lý do.

Định hướng các tiểu phân virus tạo từ trước bằng mAb đã thực hiện được in vitro và do đó, có lẽ cũng đạt được in vivo. Tuy nhiên, trừ phi phối thể (ligand) tự nhiên bị ức chế hoặc bị gỡ bỏ khỏi bề mặt virus, còn thì phương pháp này sẽ chỉ đơn thuần mở rộng phạm vi tế bào chủ của virus để bao gồm cả quần thể tế bào ung thư. Điều này có thể hữu ích đối với một virus động vật mà thụ thể không có trên tế bào người song tính gắn kết tăng không nhất thiết sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho virus thâm nhập. Hơn nữa, giả sử virus tiêm chủng ban đầu có thể hướng đích với mAb, thì các tiểu phân virus được sản xuất in vivo sau vòng nhiễm đầu tiên cũng sẽ không tuân theo hướng dẫn của kháng thể gắn kết và sự lây nhiễm hoặc sẽ ngừng lại hoặc sẽ lan sang các mô để tiếp nhận khác không phải là mô ung thư và có thể gây ra những hậu quả nghiêm trọng cho bệnh nhân.

Để hạn chế phạm vi vật chủ của một virus tái tổ hợp và con cháu của nó, cần biến đổi những vùng mã hoá thích hợp trong bộ gen của virus. Ví dụ, tất cả hoặc một phần gen virus mã hoá cho protein gắn thụ thể (kháng thụ thể) sẽ bị thay thế. Việc chuyển đơn thuần các kháng thụ thể từ những virus khác thường chẳng ích lợi gì vì rất ít (nếu có) virus có kháng thụ thể hữu ích để định hướng đặc hiệu tới những quần thể khối u nhất định. Giải pháp lý tưởng là các vùng gen immunoglobulin có thể biến đổi sẽ được đưa vào bộ gen virus theo cách nào đó để chúng có thể biểu hiện hoạt động trên bề mặt virus ở chỗ của kháng thụ thể virus tự nhiên. Sau đó tính đặc hiệu virus có thể được biến đổi không ngừng bằng

cách ghép các vùng mã hoá lg rất dễ biến đổi vào các vùng gen lg dễ biến đổi của virus. Song cho dù có thể thực hiện được sự biến đổi virus cao độ này, thì lại có thêm nhiều vấn đề nảy sinh từ việc mất những chức năng sống còn sau khi các kháng thụ thể virus tự nhiên bị loại bỏ. Ví dụ, bên việc gắn kết thụ thể, các protein kháng thụ thể virus có thể đóng vai trò quan trọng trong sự xâm nhập của virus bằng cách làm thủng màng hoặc chuyển chỗ, trong sự vận chuyển và bao gói bộ gen virus mới tổng hợp trong tế bào thành các virion con cháu.

Hướng đích nội bào

Một thay thế cho hướng đích bề mặt tế bào là hướng đích nội bào : sử dụng những virus có khả năng hoàn thành vòng đời của mình gắn liền với môi trường nội bào của tế bào ung thư. Trong tự nhiên nhiều virus có đặc tính này. Một số pavovirus tự nhân lên phụ thuộc pha S (đáng chú ý là H1 và biến thể của một virus nhỏ của chuột hay MVM(p)) còn hoàn thành vòng đời của chúng hiệu quả hơn sau khi tế bào đích của người chuyển dạng ác tính. Những virus này có thể gây bệnh cho phôi chuột nhưng ít gây tổn thương mô trưởng thành bình thường ngoại trừ gan và xương đang tái tạo.

Ngược với các retrovirus cũng phụ thuộc pha S và vì thế có khả năng hướng khối u nội bào ở một mức độ nào đó, các pavovirus được đề cập ở trên có vẻ có khả năng bảo vệ chống ung thư. Sau khi nhiễm H1 sơ sinh, chuột đồng được bảo vệ khỏi nhiều loại ung thư tự phát do hoá chất hoặc do virus. Cùng với tác dụng bảo vệ chống ung thư, tế bào người và chuột còn cho phép nhiễm H1 hoặc MVM phân ly sau chuyển dạng ác tính in vitro. Hầu hết các dòng tế bào ung thư người được thử nghiệm cho đến nay đều cho phép nhiễm bằng H1 được phân lập từ dòng tế bào ung thư

người HEp1. Hơn nữa, MVM còn làm giảm khả năng tạo khối u của tế bào ung thư Ehrlichs Ascites ở chuột cùng nguồn gốc và H1 làm thoái triển khối u của người trên chuột trần ngay cả sau khi tiêm chủng virus ở vị trí xa khối u.

Nhiễm virus H1 huyết đã được chứng minh ở hai bệnh nhân ung thư vị thành niên được tiêm chủng virus như một liệu pháp thử nghiệm, nhưng không thấy sự thoái triển của các khối u sarcom xương lan rộng của họ (mặc dù một bệnh nhân có tăng tạm thời phosphatase kiềm của xương trong huyết tương). Hình như người ta không có trực tiếp chứng minh sự nhân lên của virus trong khối u của những bệnh nhân này mặc dù họ có chuẩn độ kháng thể tương đương với khỉ rhesus mang khối u sau khi tiêm chủng H1. Điều này trái ngược với chuẩn độ kháng thể thấp sau khi tiêm chủng H1 cho khỉ rhesus bình thường.

H1 và MVM là những icosahedral virus chứa bộ gen ADN xoắn đơn 5 kilobase với những chuỗi lặp hai đầu. 2 yếu tố thúc đẩy, p4 và p38, qui định biểu hiện của hai polypeptid capsid không cấu trúc và 2 polypeptid capsid cấu trúc tương ứng (H.2). Protein không cấu trúc độc tế bào NSI cần cho sự nhân lên của bộ gen virus, cho hoạt động của yếu tố thúc đẩy p38 và diệt tế bào. Sự hạn chế hoặc dung túng cho tình trạng nhiễm virus hình như có tương quan với mức độ phiên mã NSI (hoặc đôi khi chuyển vị nhân) cho thấy p4 có thể, ít nhất ở mức độ nào đó, là yếu tố thúc đẩy "đặc hiệu cho khối u".

Các gen interleukin đưa vào chỗ của chuỗi mã hoá capsid dưới sự điều khiển của yếu tố thúc đẩy p38 sẽ tạo ra bộ gen tái tổ hợp không hoàn chỉnh sẽ khuếch đại trong tế bào chuyển dụng và gây độc cho tế bào này (nhờ đặc tính biểu hiện NSI do p4 định hướng) nhưng cũng làm cho tế bào chết sản sinh interleukin.

Biến đổi các chuỗi gắn yếu tố phiên mã trong yếu tố thúc đẩy p4 có thể làm tăng hơn nữa biểu hiện khác biệt trong tế bào ung thư. Với hiểu biết về các yếu tố phiên mã của một ung thư đặc trưng, chuỗi ADN đích của các yếu tố này có thể được thêm vào yếu tố thúc đẩy p4 của bộ gen virus tái tổ hợp, do đó làm cho virus biểu hiện phù hợp trong một quần thể tế bào đích đặc thù.

Việc bao gói bộ gen virus tái tổ hợp đã khuếch đại thành virion trưởng thành cần đến những protein capsid được cung cấp bởi cùng những tế bào nhiễm virus “mẹ” hoang dại. Từ những gì đã biết về bộ gen tái tổ hợp và không hoàn chỉnh của MVM và AAV (có liên quan gần gũi với nhau), giản đồ được phác ra ở trên khá đơn giản, ít chắc chắn hơn là khả năng gen interleukin được đưa vào MVM hoặc H1 sao cho gen capsid không bị đứt đoạn và duy trì được sự nhân lên hoàn chỉnh, nhờ đó tránh được việc phải dùng virus trợ giúp. Cho dù chấp nhận chiến lược nào đi nữa, thì virus tái tổ hợp cũng cần được khuếch đại trước hết trong khối u in vivo, khiến các tế bào đang chết tiết interleukin và thu hút các tế bào phản ứng chống khối u đặc hiệu và không đặc hiệu của vật chủ tới để diệt các tế bào ung thư không nhiễm hoặc không bắt buộc.

Người ta có thể lý luận rằng nếu tạo ra được virus gây độc đặc hiệu cho tế bào ung thư, thì liệu pháp gen interleukin là thừa. Tuy nhiên, các quần thể tế bào ung thư là không đồng nhất và việc hướng đích không bao giờ đạt hiệu quả 100%. Người ta cho rằng những tế bào ung thư trốn thoát hoặc sống sót sau khi bị virus tấn công sẽ bị phá hủy bởi các tế bào phản ứng của vật chủ được gọi đến trong một môi trường giàu lymphokin nhân tạo.

Khuôn khổ bài viết không cho phép bàn luận về các vấn đề an toàn và đạo đức liên quan đến loại biến đổi virus này. Mục đích

của bài viết là chỉ ra tính khả thi của liệu pháp gen lymphokin điều trị ung thư.

Tóm lại, liệu pháp gen lymphokin hướng tế bào ung thư là một con đường mới đầy triển vọng trong nghiên cứu ung thư, tính khả thi của nó tùy thuộc vào sự phát triển của các vector phù hợp trong phân phối và biểu hiện gen *vi vivo*.

BIỂU HIỆN CYTOKIN BẰNG VIRUS TÁI TỔ HỢP – MỘT CHIẾN LƯỢC VACXIN MỚI

Việc khám phá ra hệ miễn dịch được hoạt hoá và điều khiển bằng cytokin giống hormon đã mở ra những triển vọng mới trong điều chế vacxin tái tổ hợp. Các vector “sống” dùng trong vacxin mã hoá cho cytokin có khả năng tăng sự an toàn của vector trên cơ sở virus, cho phép tác động lên đáp ứng miễn dịch, tạo ra miễn dịch bảo vệ hiệu quả.

Cytokin và đáp ứng miễn dịch

Cytokin là các phân tử truyền tín hiệu giữa các tế bào, chủ yếu là các tế bào của hệ thống miễn dịch. Cytokin ảnh hưởng không những lên mức độ mạnh yếu của đáp ứng miễn dịch mà còn xác định loại đáp ứng miễn dịch. Đáp ứng miễn dịch do tác nhân truyền nhiễm được xác định, một phần bằng kiểu loại cytokin do các nhóm tế bào lympho T tiết ra. Nhóm tế bào lympho TH1 tiết cytokin IL-2 và interferon gamma (IFN- γ), gây ra đáp ứng miễn dịch tế bào, đóng vai trò quan trọng trong việc chống lại các ký sinh trong tế bào (ví dụ : virus), trong khi nhóm tế bào lympho T khác (TH2) tiết IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, phần lớn giúp tạo ra đáp ứng miễn dịch dịch thể, sản xuất chọn lọc các kháng thể loại IgG1,

IgE, IgA. Cytokin còn ảnh hưởng lên quá trình phát triển của các nhóm tế bào lympho T khác nhau này. Ví dụ IL-4 và IL-8 do các tế bào nhóm TH2 sinh ra ức chế sự phát triển của các nhóm tế bào TH1, hoặc IFN- γ , sản phẩm của các tế bào TH1 ức chế đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng miễn dịch tế bào. Giới hạn rộng các đáp ứng miễn dịch có khả năng được kiểm soát chặt chẽ bởi các cytokin tế bào lympho T sản xuất.

Do vậy, việc sử dụng cytokin tái tổ hợp nhằm thay đổi đáp ứng miễn dịch đã được thử nghiệm. Tuy nhiên, cytokin tái tổ hợp có thời gian bán sống rất ngắn *in vitro* nhiều khó khăn gặp phải khi sử dụng liên quan đến độc tính và việc hướng cytokin đến nơi có phản ứng miễn dịch. Chúng tôi thử nghiệm giải quyết những vấn đề trên sử dụng các virus tái tổ hợp mã hoá cytokin. Trong quá trình phát triển *in vitro*, virus tái tổ hợp sản xuất cytokin. Các cytokin này từ các tế bào nhiễm virus được ra ngoài và tác động lên đáp ứng miễn dịch. Trong bài viết này, chúng tôi bàn luận khả năng của phương pháp trong việc điều chế vaccin sống an toàn, có hiệu quả để nâng cao miễn dịch của cơ thể và chỉ ra chiến lược vaccin mới này đã góp phần làm sáng tỏ vai trò của cytokin trong miễn dịch chống virus.

Tăng cường sự an toàn của vectơ virus sống

Vaccin virus tái tổ hợp sống có nhiều ưu điểm vượt trội so với vaccin bất hoạt và vaccin tiểu phần. Một ưu điểm quan trọng của vaccin virus tái tổ hợp là khả năng tạo miễn dịch tế bào mạnh loại miễn dịch cần thiết để phòng chống một số tác nhân gây bệnh. Nhiều virus bao gồm adenovirus và herpes virus được mô tả là vectơ có khả năng để biểu hiện kháng nguyên lạ. Tuy nhiên, vaccinia virus là virus được nghiên cứu rộng rãi nhất và là ứng cử viên mạnh nhất.

Vaccinia được sử dụng trong chương trình toàn cầu xóa bỏ bệnh đậu mùa và vì vậy có rất nhiều thông tin dịch tễ về sử dụng virus này để làm vector. Chương trình xóa bỏ đậu mùa thành công một phần bởi một vài tính chất của virus này. Virus rất bền vững khi đông khô ở nhiệt độ thấp, giá thành điều chế thấp, vaccin được đưa vào cơ thể bằng kỹ thuật gây xước da đơn giản. Nhược điểm của vaccinia virus khi dùng làm vector trong vaccin các kháng nguyên khác nhau cho các đáp ứng miễn dịch khác nhau, phản ứng phụ nghiêm trọng có thể xảy ra khi virus vô ý được đưa vào cơ thể người có hệ thống miễn dịch bị ức chế. Điều này có thể là vấn đề lớn do sự gia tăng của số người bị suy giảm hệ miễn dịch khi mắc HIV. Những cố gắng hiện nay nhằm loại bỏ độc tính của virus bao gồm loại bỏ một số gen không thật cần thiết, ví dụ như thymidine kinase. Tuy nhiên việc giảm độc tính đi kèm với việc không mong muốn là mất tính gây miễn dịch. Các virus gây đậu mùa khác gây bệnh cho vật chủ nhất định đang được thử nghiệm dùng làm vector cho vaccin và tỏ ra an toàn khi sử dụng trên vật nuôi thí nghiệm. Chúng ta đã thiết kế virus tái tổ hợp mã hoá cho cytokine và chứng tỏ không những có thể làm giảm độc tính của các virus mà còn có thể kích thích gây ra một đáp ứng miễn dịch cụ thể cần thiết trong bảo vệ vật chủ một cách chọn lọc.

Biểu hiện cytokine bằng virus vaccinia tái tổ hợp

Chúng tôi đã thiết kế virus vaccinia tái tổ hợp mã hoá cho các cytokine khác nhau và cho gen haemagglutinin (HA) của virus cúm. HA mã hoá trong các virus này đóng vai trò gen báo cáo, cho phép chúng tôi quan sát tự tạo ra miễn dịch đặc hiệu đối với protein cùng được biểu hiện. Cytokine được nghiên cứu đến nay chia ra làm 2 loại dựa trên ảnh hưởng của chúng lên sự phát triển và tính gây miễn dịch của vector : (1) Loại gây thay đổi quá trình

gây bệnh virus ; (2) Loại kích thích chọn lọc đáp ứng miễn dịch đặc hiệu. Cả hai tính chất này cần thiết cho việc sản xuất vaccin an toàn và có hiệu quả. Ảnh hưởng của biểu hiện cytokine bằng virus tái tổ hợp lên đáp ứng miễn dịch được tóm tắt trong bảng 2 đã nêu trên.

Cytokin thay đổi tính gây bệnh của virus

Trước khi virus vaccinia có thể sử dụng rộng rãi làm vectơ cho vaccin, virus này cần phải được sửa đổi một số đặc tính sinh học để phòng ngừa một số ít, nhưng đôi khi nghiêm trọng, các hiệu ứng phụ quan sát thấy khi dùng virus này làm vaccin ngừa bệnh đậu mùa. Những hiệu ứng phụ gồm nhiễm virus toàn thân và hoặc nhiễm virus ở hệ thần kinh trung ương. Những hiệu ứng tương tự được quan sát thấy ở chuột bị giảm miễn dịch khi nhiễm virus. Chuột loại bỏ thymus thường thiếu hụt tế bào lympho T và không có khả năng tạo đáp ứng miễn dịch hay dịch thể có hiệu quả. Chuột loại bỏ thymus thường bị chết sau 10 - 12 ngày từ khi bị nhiễm virus vaccinia. Tuy nhiên, virus vaccinia mã hoá cho IL-2, IFN- γ hoặc TNF bị giảm hoạt cực mạnh, chuột loại bỏ thymus có khả năng điều khiển quá trình sinh trưởng của virus này, virus tự ức chế sinh trưởng.

Một điều khá thú vị là mặc dù chuột loại bỏ thymus bị suy giảm miễn dịch chúng vẫn có khả năng chống đỡ virus cúm nếu chúng được tiêm chủng trước đó với virus vaccinia tái tổ hợp mã hoá cho cả hai protein IL-2 và HA của virus cúm. Tuy những virus mã hoá cho cytokin này phát triển rất kém ở chuột thường, ví dụ chúng có số lượng thấp trong máu và không gây ra bệnh lý nào như của chủng virus dại, các virus này vẫn không bị mất đi nhiều tính gây miễn dịch. Đáp ứng miễn dịch dịch thể và tế bào do virus mã cho

IL-2 và IFN- γ tạo ra tương tự như đáp ứng miễn dịch do virus đối chứng không chứa các gen này gây nên. Cơ chế suy giảm độc tính của virus vaccinia tái tổ hợp mã hoá IL-2 được thông qua đáp ứng vật chủ chống virus. Quần thể tế bào dao phủ tự nhiên, dưới tác dụng của IL-2 do virus mã hoá sản xuất ra IFN- γ , chất kìm hãm sự phát triển của virus. Trái lại cơ chế đặc thải nhanh virus vaccinia mã hoá IFN- γ và TNF chưa được làm sáng tỏ, mặc dù trên cơ sở các quan sát của chúng tôi có thể giả thiết rằng những cytokin này tác dụng trực tiếp lên sinh trưởng virus. IFN- γ và TNF được biết có hoạt tính chống virus *in vitro* và mặc dù sự sinh trưởng của virus mã cho IFN- γ và TNF trong môi trường nuôi cấy mô không bị ức chế, hoạt tính chống virus các cytokin này có thể là nguyên nhân tự kìm hãm sinh trưởng của virus *in vitro*.

Cytokin ảnh hưởng lên đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên cùng biểu hiện

IL-5 ảnh hưởng lên sự phát triển và biệt hoá của tế bào lympho B sản xuất kháng thể *in vitro*, chẳng hạn như tăng sản xuất IgA, kháng thể đặc trưng trong miễn dịch màng nhầy. IgA được coi là hàng rào đầu tiên quan trọng chống đỡ sự nhiễm tác nhân gây bệnh vì các tác nhân thiết kế virus vaccinia mã cho HA và IL-5 và nghiên cứu hiệu ứng của virus này lên miễn dịch ở màng nhầy. Virus tái tổ hợp mã hoá IL-5 khi được nhỏ vào mũi đã làm tăng số lượng tế bào tiết IgA lên 4 đến 8 lần so với virus đối chứng, trong khi đó đáp ứng IgG không được kích hoạt. Có thể kết luận IL-5 tham gia quá trình kích thích chọn lọc IgA màng nhầy. Tương tự, ở chuột được tiêm virus vaccinia mã hoá cho IL-6 với hiệu giá IgG đặc hiệu với HA trong máu được tăng lên đáng kể so với ở chuột

được tiêm virus đối chứng. Sự tăng hiệu giá chủ yếu xảy ra ở tăng sinh tổng hợp nhóm IgG1.

Kết luận

Vaccin tái tổ hợp sống có tiềm năng rất lớn trong tiêm chủng vaccin người, đặc biệt là cho các nước đang phát triển. Tuy nhiên, vaccin loại này được xem xét để cho phép dùng rộng rãi, các câu hỏi về tính an toàn, đặc biệt ở cơ thể suy giảm miễn dịch, và hiệu quả phải được làm sáng tỏ. Kỹ thuật thiết kế vector mã hoá cho cytokin có thể giúp giải quyết nhiều vấn đề liên quan với dạng vaccin này. Không những thế, mặc dù vaccin được dùng kinh điển để phòng ngừa nhiễm bệnh, trong một số trường hợp vaccin có thể dùng để giúp trong chữa bệnh. Ví dụ vaccin cùng biểu hiện một lúc cytokin và gen HIV có thể sử dụng cho bệnh nhân HIV dương tính. Trên lý thuyết, kỹ thuật này không chỉ có ưu điểm về sự an toàn của vaccin, nhưng còn có thể giúp vượt qua những khiếm khuyết của hệ miễn dịch gây ra do nhiễm HIV và thay đổi đáp ứng miễn dịch sang đáp ứng có thể kiểm soát được bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Culliton B.J. 1989, Science 244, 1430 – 1433 Rosenberg S.A. 1988 New Engl. J. Med. 319, 1676 – 1680.
2. Swain S.L. et al. 1991. Immunol. Rev. 123, 115-144.
3. Ramshaw I.A. et al. 1992. Immunol. Rev. 127, 157 – 182.
4. Karupiah G. et al. 1992 Scand. J. Immunol. 36, 99 – 186.

UNG THƯ PHÂN TỬ VÀ CÁC NGUYÊN NHÂN GÂY UNG THƯ

*GS – TSKH. Đái Duy Ban
Th.S. Đái Thị Hằng Nga*

1. Mở đầu
 2. Các giai đoạn sinh ung thư
 3. Những gen của dòng biến dị
 4. Sự rối loạn chuyển giao thông tin
 5. Omogen và antioncogen
 6. Những gen biến dị
 7. Sự rối loạn của quá trình chu kỳ tối bào
 8. Gen và protein P.53
 9. Xây dựng bộ gen và và protein RB1
 10. Sự phosphorin hoá và chu kỳ tế bào
 11. Sự biến hình ung thư và chương trình chết định sẵn
 12. Sự sinh mạch và phát triển ung thư
 13. Sự tạo thành di căn
 14. Những tác nhân gây ra ung thư
- Tài liệu tham khảo

1. Mở đầu

Ung thư có 2 đặc điểm chính :

- (1) Sinh sản vô hạn độ
- (2) Di căn đi nơi khác

Như vậy đại bộ phận những biến đổi khác giữa tế bào ung thư với tế bào bình thường là đặc trưng về chất lượng và số lượng.

Những thay đổi chất lượng kéo theo thay đổi về số lượng.

Một số những biến đổi đặc trưng được trình bày ở bảng 1.

Song hình như những thay đổi quan trọng dẫn đến mất một phần hoặc toàn bộ khả năng dính kết tế bào bên cạnh và tế bào bố mẹ.

Chúng ta có thể nói rằng : các tế bào ung thư mất khả năng ức chế tiếp xúc và cả khi di chuyển nữa.

Để hiểu cận kề được vấn đề ung thư chúng ta cần phải hiểu biết về cơ sở phân tử của nó. Dưới đây sẽ trình bày chi tiết về các vấn đề này.

Bảng 1 - Một số những thay đổi kéo theo biến dạng ung thư ***Những thay đổi ở màng tế bào***

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. Tăng vận chuyển các sản phẩm chuyển hóa.2. Tăng tạo ra bong bóng màng.3. Tăng hoạt động các protein màng. |
|--|

Những thay đổi dính kết

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">1. Giảm sự dính kết bề mặt2. Tổ chức các sợi hoạt động không rõ ràng3. Mất cấu trúc fibronectin bên ngoài4. Sản xuất quá nhiều chất hoạt hóa plasminogen |
|---|

Những thay đổi trong phân chia tế bào

1. Giảm các yêu cầu trên các yếu tố tăng trưởng
2. Có nhiều khả năng sinh sản không hạn chế
3. Có thể lớn trong sự trì hoãn

2. Các giai đoạn sinh ung thư

Sự biến hình ung thư rất phức tạp và trải qua nhiều giai đoạn, càng ngày người ta càng thấy rằng sự biến hình ung thư tập trung trên những thay đổi các gen liên quan tới tăng trưởng, sinh sản biệt hóa và sự chết tế bào. Quá trình hình thành ung thư có thời gian yên lặng dài. Trong thời gian này tế bào bình thường phải trải qua hàng loạt những biến đổi để hình thành ra khuôn hình ung thư. Những biến cố đó có thể phân chia thành 3 giai đoạn :

Giai đoạn I	Giai đoạn II	Giai đoạn III
Tiền khởi Bị những tác nhân gây ung thư bằng hóa học, vật lý hay sinh học	Khởi phát Tập hợp những biến di dẫn đến biến hình ung thư	Tiến triển Xảy ra sự di căn

Giai đoạn đầu - gọi là giai đoạn tiền khởi, đó là giai đoạn tế bào đang chịu phải những tác nhân gây ung thư :

- Tác nhân vật lý như những tia ion hóa.
- Tác nhân hóa học do môi trường hay thực phẩm.
- Tác nhân sinh học - như virus hay một số vi khuẩn, ký sinh trùng.

Giai đoạn này xảy ra sự biến đổi trong bộ gen là chủ yếu - đó

là những thay đổi biến dị và đa hình - mà những sản phẩm của chúng tham gia trong chuyển hóa và loại trừ các yếu tố ung thư. Những biến đổi di truyền cũng liên quan với những gen đa hình mã hóa những enzym của hệ thống sửa chữa.

Giai đoạn hai là giai đoạn khởi phát. Nó bắt đầu sự biến dị đầu tiên. Các biến dị tiếp theo có thể là tự nhiên hoặc do những tác nhân đã nói ở trên. Chúng gây ra hư hại hệ thống sửa chữa ADN của tế bào.

Những biến dị biến tế bào bình thường thành ung thư tạo ra dòng biến dị. Không phải tất cả dòng biến dị thì như nhau. Sự hư hại một vài gen có thể quan trọng hơn, ví dụ như gen P_{53} . Sự hư hại gen này gặp trong hơn 50% các loại ung thư. Ở giai đoạn đầu này sự sai lệch về di truyền rất có ý nghĩa. Nếu một biến dị từ những dòng biến dị được phân chia, thì thời gian cần thiết để biến hình tế bào ung thư càng ngắn. Quá trình biến hình đáng lẽ ra kéo dài mười hai năm đến vài chục năm thì bây giờ rút ngắn xuống còn vài năm. Đặc biệt thấy rõ trong các ung thư tuổi trẻ, nhất là do biến dị di truyền một trong những gen bị áp chế.

Trong trường hợp khi hệ thống sửa chữa không chính xác và bị hư hại, ADN không được sửa thì tế bào có thể bị loại đi theo chương trình chết định sẵn - hiện tượng apoptosis. Các tế bào bị hư hại không có khả năng làm chức phận bình thường thì có thể bị loại bỏ qua hệ thống miễn dịch của cơ thể.

Nhưng nếu như hai hiện tượng loại trừ trên không được bảo đảm thì tế bào bị biến hình thành tế bào ung thư. Nó bắt đầu phân chia đồng thời tăng trưởng ung thư (carcinoma in situ). Sự tăng trưởng của nó cân bằng với sự thay đổi tế bào. Để bước qua giai đoạn khởi phát ung thư, sự di căn hay tăng sinh mạnh là cần thiết. Sự phát triển các mạch máu trong khối u làm cho các tế bào này

tăng nhận các chất dinh dưỡng và các tín hiệu ở bên ngoài. Lúc này quá trình phân chia các tế bào trong u trội hơn quá trình thay đổi tế bào. Thêm vào đó những yếu tố được tiết ra tạo mạch có thể kích thích tế bào ung thư phát triển.

Giai đoạn ba là giai đoạn tiến triển. Bộ gen tế bào ung thư trở nên càng ngày càng không bền. Số lượng gen càng ngày biến dị càng nhiều. Có sự thay đổi ở mức độ nhiễm sắc thể và thay đổi cả số lượng nhiễm sắc thể. Nhiều tế bào không chỉ ra sự biệt hóa thích hợp ; chúng bị biến hình. Các tế bào đó có đặc tính rối loạn trong sự kiểm tra sinh sản thay đổi các đặc tính của các protein dính kết màng tế bào (nhiều loại ung thư mất một số các phân tử dính kết) và thay đổi các enzym thủy phân protein ở màng (như collagenase IV).

Từ những kết quả trên, nguyên nhân làm biến hình lệ thuộc vào những thay đổi nguyên liệu di truyền tế bào. Tập hợp các biến dị gây ra tế bào kiểu hình ung thư tạo ra dòng biến dị. Trung bình dòng biến dị có từ 5-8 biến dị không lệ thuộc lẫn nhau ở các gen khác nhau (chỉ duy nhất trong ung thư bạch cầu cơ sở biến dị nhỏ nhất). Thật đáng tiếc, cho đến hiện nay người ta chỉ mới nhận biết duy nhất được dòng biến dị dẫn đến ung thư ruột già. Trong một số trường hợp khác người ta cũng có nhận biết một số những thay đổi kéo theo dòng biến dị.

Quá trình tạo thành ung thư có đặc tính liên tục mặc dù trong một số loại ung thư, tính chất nhiều giai đoạn của nó rất rõ ràng. Tế bào đơn lẻ bị biến hình đầu tiên có thể dẫn đến sự tăng trưởng ung thư nằm bên cạnh một vài dòng tế bào ung thư khác. Con đường biến dị của chúng có thể khác một vài yếu tố. Tính đa dòng của ung thư thường là nguyên nhân không hi vọng trong điều trị chúng.

3. Những gen của dòng biến dị

Trong số 40.000 gen quan trọng thì có gần 20.000 được hoạt hóa trong loại tế bào này. Đại bộ phận trong chúng là những gen chuyển hóa cơ bản. Trước tiên đó là những gen - mà sản phẩm protein của chúng tham gia vào quá trình sao chép và sửa chữa ADN tạo các bào quan như ty lập thể, màng tế bào ; dịch bào tương và dịch nhân. Phần gen còn lại thì biểu hiện sự đặc trưng của tế bào này. Trong số lượng lớn các gen duy nhất chỉ vài phần trăm gen tham gia vào dòng biến dị. Sản phẩm của chúng kiểm tra quá trình tăng trưởng, sự biệt hóa và chết, sự sao chép và sửa chữa ADN, sự chuyển giao các tín hiệu từ màng vào nhân và quá trình hoạt hóa các gen khác.

4. Sự rối loạn chuyển giao thông tin

Một tế bào ở trong tình trạng thu nhận hàng loạt những tín hiệu từ bên ngoài. Những tín hiệu đó thì không chỉ là những tín hiệu tăng trưởng mà còn có những thay đổi nồng độ các cation của tế bào như natri, kali, canxi, những yếu tố khử cực của màng tế bào và các yếu tố khác. Chúng tác dụng trực tiếp hoặc qua các receptor vào bên trong tế bào. Những thông tin vào được bào tương, được chuyển giao sang thông tin thứ hai để chuyển vào nhân. Thông tin vào nhân làm hoạt hóa những yếu tố phát hiện mã thích hợp cho sự hoạt động của những gen xác định. Đó là những vùng gen điển hình enhancer hay silencer với promotor bắt đầu quá trình hoạt hóa gen và sau đó thì kết hợp với những protein khác - tức là với những yếu tố của bộ máy phiên mã điều hòa sự

biểu hiện nó. Đó là hệ thống rất tinh vi và phức tạp cân bằng lý hóa quyết định quá trình chuyển hóa trong tế bào. Sự rối loạn trong hệ thống chuyển giao thông tin thông thường dẫn đến mất sự điều hòa chuyển hóa tế bào và làm tăng những tính không thực. Cuối cùng kết cục dẫn đến mất tính bền vững di truyền tế bào ; đó là giai đoạn biến hình di truyền.

5. Oncogen và anti-oncogen

Nghiên cứu trên những cơ chế biến hình các virus đã dẫn đến sự tách ra những đoạn gen – mà không có chúng, virus mất đặc tính sinh ung thư. Người ta gọi những đoạn đó là các oncogen (onc). ADN của tế bào bình thường chứa nhiều những gen đồng nhất với các gen Onc của virus. Để phân biệt với các oncogen của virus người ta gọi nó là protooncogen hay oncogen tế bào – hoặc viết tắt là v-onc (oncogenvirus) và C-onc (oncogen tế bào). Hiện nay chúng ta biết có trên 100 oncogen khác nhau. Phân tích sự biến dị trong bộ gen tế bào ung thư đã phát hiện thấy rằng số đông của chúng thì được khu trú trong protooncogen : Nghiên cứu về chức phận các oncogen tế bào và các oncogen virus trong quá trình biến hình ung thư thì đã xác định rằng các sản phẩm protein của nhóm gen này thực tế đóng vai trò trong quá trình chuyển giao thông tin. Nhiều những protooncogen được biết mã hoá những yếu tố tăng trưởng và các receptor của chúng. Những gen khác mã hoá các protein liên kết với GTP có nghĩa là protein G-enzym kinaza protein bào tương và những yếu tố phiên mã (bảng 2).

Bảng 2. Một số oncogen và chức phận của chúng

Tên oncogen	Chức phận của sản phẩm oncogen
Sca, Src, yes, fgr, abl, fps, kit, ros, raf, mos	Protein Kinaza : tyrosin serin / treonin
Sis int	Những yếu tố tăng trưởng : PDGF FGF
erb-B fms erb-A mas	Receptor của những yếu tố tăng trưởng EGF M-CSF hormon giáp trạng angiotensin
Ha-ras Ki-ras N-ras	Protein liên kết với GTP
myb, myc, fos, jun, ebs, rel, ski	Những yếu tố phiên mã
bcl-2	Những yếu tố khác : protein màng của ty thể, và nhân

Các oncogen virus có nhiều đặc tính giống các oncogen đó ở tế bào. Sự đồng nhất của chúng trong ADN giao động từ 20 đến trên 90%. Những biến dị của prooncogen gây ra các sản phẩm protein biến đổi của nó rất giống với chính các sản phẩm Oncogen của virus.

Trong các tế bào có chức phận bình thường các sản phẩm gen tham gia trong các chuyển hoá khác nhau. Nếu mất một gen nào đó dẫn đến biến hình tế bào bình thường thành ung thư, gen như vậy gọi là gen áp chế sự biến hình ung thư hoặc gọi là antioncogen

(tumor supressor gene). Hiện nay chúng ta biết có gần 20 gen áp chế : Các sản phẩm đại bộ phận trong chúng đóng vai trò chức phận chủ chốt của tế bào như quá trình sinh sản và biệt hoá. Một số khác là những yếu tố phiên mã hay là những yếu tố cấu trúc tế bào (bảng 3).

Bảng 3 Những gen áp chế biến hình ung thư

Gen áp chế	Sự khu trú trên nhiễm sắc thể	Chức phận sản phẩm của gen
P53	17p13.1	Yếu tố phiên mã Chất kiểm tra quá trình phân chia ở tế bào bình thường "Lính canh phòng bộ gen"
RB1	13q14	Chất kiểm tra quá trình sinh sản bình thường. Yếu tố phiên mã
APC	5q21	? Protein của bộ xương tế bào
WT1	11p13	? Yếu tố phiên mã
NF1	17q11	Protein bào tương làm hoạt hoá GTP
NF2	22q	Protein của bộ xương tế bào
VHL	3p25	? Chất ức chế sự kéo dài phiên mã
MTS1	9p21	Chất ức chế enzym kinase cdK4 và 6

6. Những gen biến dị

Những nghiên cứu được dẫn ra từ năm trước khi tìm thấy lỗi gen di truyền trong ung thư ruột già có tính chất gia đình cho đến

khí tách được nhóm gen phù hợp với những thay đổi trong toàn bộ gen.

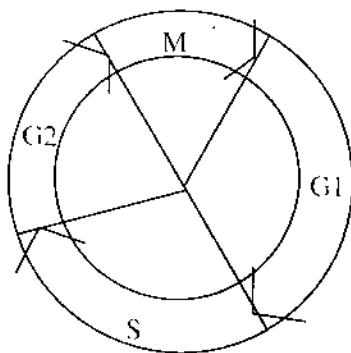
Gen đầu tiên của loại này khu trú ở nhiễm sắc thể 2p15-16. Chẳng bao lâu người ta biết rằng gen này mã hoá protein *msh2* - đó là một yếu tố của hệ thống sau sao chép sửa chữa những lỗi của các bazơ biến mất (mismatch repairs, MMR hay replicative errors, RER) và vai trò của nó trong hệ thống này là dựa trên sự nhận biết của liên kết với những bazơ biến mất do lỗi đó. Sản phẩm của gen biến dị không hoặc nhận biết được trong khoảng khắc hạn chế dẫn đến làm tăng số biến dị trong toàn bộ bộ gen. Hiện nay 4 loại gen đó đã được biết MSH2, MLH1, PMS1 và PMS2. Ngoài ra người ta cũng xác nhận sự biến dị một trong những gen biến dị làm thuận lợi biểu hiện sự biến dị trong gen biến dị tiếp theo. Điều đó làm tăng tính không bền của di truyền tế bào và làm thuận lợi cho sự biến hình ung thư.

7. Sự rối loạn của quá trình chu kỳ tế bào

Vòng phân chia tế bào có 4 giai đoạn : G1, S, G2 và M. Trong giai đoạn G1 gồm các quá trình, mà các quá trình đó chuẩn bị cho tế bào nhân đôi nguyên liệu di truyền (sao chép ADN). Sự tổng hợp các enzym và protein chiếm chỗ, chúng tham gia vào việc tạo phức hợp có khả năng sao lại ADN bố mẹ. Quá trình sao chép ADN tự xảy ra trong giai đoạn S. Ở giai đoạn G2 xảy ra sự chuẩn bị tế bào đi vào phân chia như đậm đặc nguyên liệu di truyền ở dạng nhiễm sắc thể và phân chia về hai cực ngược nhau của tế bào. Sau sự phân chia bào tương và các bào quan của tế bào, quá trình đó xảy ra chủ yếu ở giai đoạn M. Mỗi trong 2 tế bào còn có đúng số lượng nguyên liệu di truyền như tế bào đã phân chia ra nó.

Trong cơ thể bậc cao, vòng tế bào cũng bị điều hoà rất phức tạp. Tính đúng đắn của quá trình này thì được bảo đảm bởi sự tồn tại ít nhất 2 điểm giới hạn (hình 1). Điểm đầu đó là biên giới giữa giai đoạn G1 và S. Ở đây trước hết xảy ra sự kiểm tra nguyên liệu di truyền. Phát hiện sự hư hại trong ADN lập tức gây ra sự hoạt động hệ thống sửa chữa ADN và làm dừng vòng tế bào trước khi đi vào giai đoạn S. Tế bào bị đình chỉ cho đến khi những thiếu sót trong ADN không được sửa chữa.

Điểm thứ hai đó là biên giới giữa giai đoạn G2 và M, ở đó xảy ra sự kiểm tra chia tách nguyên liệu di truyền và tạo ra thoi phân chia trước giai đoạn phân chia (M). Trong sự kiểm tra tính đúng đắn của quá trình vòng tế bào, các sản phẩm protein của 2 gen áp chế P.53 và Rb1 đóng một vai trò quan trọng.



Hình 1. Vòng phân chia tế bào

8. Gen và protein P53

Gen P53 có khoảng 20 Kb, khu trú ở nhiễm sắc thể 17p13.1 gồm 11 exon. Exon đầu tiên là exon không mã hoá. Trong bộ gen có một copi đơn lẻ mở ra khung đọc 393 acid amin. Phần lớn những biến dị được quan sát trong gen P53 có đặc tính trong các vùng này. Đó là những biến dị điểm trội dẫn đến thay đổi acid amin này thành acid amin khác, hay mất đi một đoạn gen. Những biến dị xảy ra chủ yếu ở các exon 5 – 8. Trong những exon này người ta phát hiện tới 75% biến dị trong gen P53. Những biến dị đó xảy ra trong các codon 175, 248 và 273. Trong những vị trí đó luôn có sự dịch chuyển C thành G hay A.

Sản phẩm của gen P53 – là protein P53 – có 393 acid amin. Protein đó có 3 vùng khác nhau : Phần C - tận của protein chứa nhiều acid amin kiềm khu trú ở nhân và oligome hoá.

Phần trung tâm (vùng lõi) có acid amin 102-292 chứa những đoạn có khả năng liên kết protein với ADN (vùng liên kết ADN). Trong phần này được khu trú nhiều những biến dị điểm mang hoạt tính liên kết protein với ADN. Một trăm acid amin đầu tiên của phần N – tận của protein là vùng phiên mã.

Người ta cũng phát hiện tính đa dạng của protein P53. Sự khác nhau xảy ra trong phạm vi codon 21 và 72.

Protein P53 là chất điều hoà chủ yếu của vòng tế bào. Sự tham gia vào kiểm tra tính nguyên vẹn của bộ gen xác định vai trò của nó trong chu kỳ. Cũng từ đó, protein P53 được gọi là “lính canh gác phân tử” hay “lính canh gác bộ gen”. Tetrame đồng nhất được phosphoryl hoá là dạng hoạt động có tính chất sinh học của protein. Nó nhận biết đoạn ADN tức là bảo tồn yếu tố phiên mã.

Kết thúc giai đoạn G1 có số lượng P.53 khác nhau từ bào tương nó vào nhân. Trong trường hợp khi phân tử ADN biểu hiện sự hư hại, số lượng của nó trong nhân khác nhau, đồng thời làm dừng chu kỳ tế bào : Protein P.53 thì được phosphorin hoá lệ thuộc vào giai đoạn chu kỳ tế bào. Sự phosphorin hoá có ảnh hưởng đến khả năng tạo ra homotetrame và bởi vậy, có khả năng hoạt hoá những gen xác định. Mức độ phosphorin hoá tối đa được đạt tới là ở giai đoạn M của chu kỳ.

Protein P.53 có thời gian bán phân huỷ là 10 – 20 phút nhưng khi bị biến dị thì kéo dài đến 12 giờ. Đa số các trường hợp biến dị, protein biến dị không mất khả năng tạo tetrame với protein P53 bình thường, nhưng mất khả năng liên kết đặc biệt với ADN, như vậy không có khả năng hoàn thành chức phận điều hoà phiên mã. Tương tự phẩm chất như protein P.53 bị biến dị, đó là có một số protein được mã hoá qua oncogen virus – chẳng hạn kháng nguyên T của virus SV40, protein E6 của virus HPV hay protein E₁B của adenovirus. Các protein đó được liên kết với vùng polyme hoá của protein P53 bình thường. Sự tạo thành heterotetrame của protein P.53 và protein của oncogen virus thì không làm hoạt động giống như là chất điều hoà phiên mã. Bằng cách có một đoạn bổ sung vào heterotetrame thì có sự giảm số lượng P53 bình thường trong tế bào. P.53 bình thường càng giảm thì qua sự kết hợp hoặc với protein bị biến dị hoặc với protein virus sẽ dẫn đến giải phóng sớm sự phong bế sinh sản. Khi đó hiệp đầu sao chép ADN được nở rộ và sự sửa chữa ADN hư hỏng không xong có thể dẫn ra những biến dị. Mất sự kiểm tra sinh sản của tế bào sẽ đưa đến nhiều tế bào không bền về phương diện di truyền với những biến dị và sai lạc nhiễm sắc thể khác nhau, cuối cùng biến dạng tế bào nhân.

9. Xây dựng bộ gen và protein RB1

Gen RB1 có độ lớn gần 180 kilo bazơ, khu trú trên thể nhiễm sắc 13q14. Nó gồm 27 exon trong bộ gen, có một copi duy nhất, mở ra khung đọc gồm 928 amino acid :

Sự biến dị trong gen RB1 có chủ yếu ở exon 13 – 17. Sản phẩm của gen RB1 là protein pRB hay còn gọi là P110. Protein này được phosphorin hoá trong chu kỳ tế bào. Ở dạng được phosphorin hoá từng phần protein P110 có khả năng liên kết với nhóm những yếu tố phiên mã E2F. Trong phức hợp này chúng còn tham gia làm bền các protein thuộc nhóm DP. Sự khử phosphorin hoá protein P110 xảy ra ở giai đoạn cuối của kỳ phân chia. Quá trình này dẫn đến phóng thích các hợp chất trong phức hợp các yếu tố phiên mã của họ hàng E2F và như vậy lần lượt bắt đầu quá trình hoạt động phiên mã. Từ đầu đi vào kỳ S cho đến kỳ muộn của G2, P110 được phosphorin hoá, vậy những yếu tố phiên mã của gia đình E2F được liên kết trong phức hợp. Do đó protein RB bị khử phosphorin hoá làm dừng chu kỳ tế bào ở kỳ G1, còn sự phosphorin hoá thì đi vào kì hãm. Trên cơ sở khả năng được liên kết với những yếu tố phiên mã E2F người ta còn phân biệt 2 protein được đặc trưng sự đồng nhất lớn từ pRB. Đó là p107 và p130. Sự phối hợp protein RB với những yếu tố phiên mã E2F điều hoà quá trình phiên mã trong giai đoạn G1.

Protein RB giống như P53 chỉ ra khả năng liên kết với virus oncogen. Người ta xác nhận sự tạo thành phức hợp với protein E1A của adenovirus, với kháng nguyên T lớn của virus SV40 và protein E7 của virus HPV 16. Protein virus được liên kết trước hết với p110 chưa phosphorin hoá. Sự tạo ra phức hợp này kìm hãm khả năng điều hoà của p110 làm hoạt hoá quá trình phiên mã.

10. Sự phosphorin hoá và chu kỳ tế bào

Một trong các quá trình điều hoà chuyển hoá chu kỳ tế bào là sự phosphorin các protein – chất điều hoà chu kỳ tế bào. Thiếu sự phosphorin protein giai đoạn S thì không mở ra việc tổng hợp ADN. Sự phosphorin cũng cần thiết ở giai đoạn phân chia (M). Trong quá trình phosphorin, enzym đóng vai trò khá quan trọng được gọi là các kinase (CDK) – lệ thuộc vào chu kỳ tế bào. Ở dạng hoạt động đơn giản như các kinase luôn luôn có kèm theo protein điều hoà - gọi là cyclin. Nhưng có ít nhất 5 gia đình cyclin – gồm khoảng 10 cyclin khác nhau. Sự biểu hiện của nó cũng liên quan với chu kỳ tế bào. Trong các tế bào của động vật có vú, gia đình kinase (CDK) gồm ít nhất 7 thành viên. Phối hợp với gia đình khác nhau cyclin tạo ra sự phong phú khả năng điều hoà (bảng 4).

Bảng 4. Gia đình kinase CDK và các cyclin

Loại cyclin	Loại kinase	Chức phận của phức hợp
Cyclin D1, D2 và D3	CDK4, 6	Phosphorin ở giai đoạn G1
Cyclin E	CDK2, 3	Phosphorin ở biên giới G1/S
Cyclin A, B	CDK2	Phosphorin ở giai đoạn S và G2
Cyclin A và B	CDK1 cũng được gọi p34	Phosphorin ở biên giới G1/S và G2/M
Cyclin H	CDK7	Phosphorin kinase CDK ở tất cả các giai đoạn

Để hoàn toàn có khả năng phosphorin các protein điều hoà trong các giai đoạn xác định của chu kỳ, phức hợp cyclin/kinase CDK cần phải tự phosphorin qua enzym kinase đặc biệt là CAK (cdk activating kinase).

Kinase này cũng có tên là CDK7 – chỉ được hoạt hoá sau khi kết hợp với cyclin H. Vùng có tác động ảnh hưởng với protein điều hoà là chỗ phosphorin của phức hợp cyclin / kinase CDK. Ngoài ra phức hợp cyclin / kinase CDK được phosphorin hoá qua protein kinase loại Wee-1/miK-1. Thêm vào đó, người ta đã tìm ra enzym có khả năng khử hoạt tính của phức hợp cyclin / kinase CDK trong quá trình khử phosphorin.

Các kinase cần phải có vai trò điều hoà âm tính rất mạnh mẽ. Sự tìm kiếm các chất ức chế của các enzym này (INK) dẫn đến tìm thấy hàng loạt những protein phân tử thấp mà những phân tử này khi kết hợp với các kinase CDK thì không có khả năng phosphorin phức hợp kinase với cyclin. Đến nay ít ra đã có vài gia đình của các chất ức chế kinase CDK được biết (bảng 5).

Tương tự như cyclin, các chất ức chế INK tác dụng tương hỗ với nhiều kinase. Một số chất ức chế INK kìm hãm các kinase xác định một cách đặc hiệu, một số khác không hề chỉ ra tính đặc hiệu.

Chất ức chế có thể liên kết với phức hợp kinase/cyclin và kìm hãm hoạt tính phosphorin của chúng, nhưng cũng có thể kìm hãm kinase qua tách cyclin với phức hợp.

Có sự điều hoà nhiều bậc của kinase CDK như :

- Điều hoà đồng thời những chức phận khác nhau của kinase CDK.

- Phân biệt giữa duy trì kéo dài hay tạm thời của chu kỳ tế bào.

- Bảo quản giữ gìn sự kết hợp giữa những con đường khác nhau chuyển vận những tín hiệu vào trong tế bào.

Rối loạn quá trình phosphoryl hóa các protein xác định nhóm quan trọng nhất mất sự điều hòa chu kỳ tế bào dẫn đến kết cục rối loạn sinh sản và tự do dẫn đến sự biến hình ung thư thuận lợi.

Bảng 5. Những chất ức chế kinase CDK và các dẫn chất của chúng

Tên gia đình các chất ức chế	Sự ức chế tế bào
Gia đình p16 p16/INK4a p15/INK4b p18/INK4c p19/INK4d	kinase CDK4 và 6 kinase CDK4 và 6 kinase CDK4 và 6 kinase CDK4 và 6
Gia đình p21 p21, p27, p57	Tất cả phức hợp cyclin / CDK
Các gia đình khác p25 p83 p40	p56 – p34 cln – Cdc28 cln – Cdc28

11. Sự biến hình ung thư và chương trình chết định sẵn

Trong cơ thể đa bào, sự tạo ra những tế bào mới kéo theo sự loại bỏ những tế bào có lỗi. Sự loại bỏ đó xảy ra theo chương trình

chết định sẵn – còn được gọi là hiện tượng apoptosis. Các tế bào bị loại bỏ theo con đường này chỉ xảy ra một thời gian giới hạn trong quá trình phát triển bào thai, cũng như những tế bào không đạt đầy đủ chức phận – như các tế bào thần kinh. Con đường này cũng xảy ra ở các tế bào máu trong sự kiểm soát bình thường. Song con đường này loại bỏ tế bào trước hết là những tế bào già và hư hại.

Từ lâu người ta đã biết rằng, các tế bào được phân chia chỉ một số lần giới hạn. Chẳng hạn các tế bào fibroblast phát triển bình thường trong nuôi cấy chỉ phân chia khoảng từ 20 – 50 lần tùy theo cơ thể. Sau đó xảy ra hiện tượng apoptosis hàng loạt.

Để hiểu cơ chế chương trình chết định sẵn, chúng ta chú ý sự kết hợp giữa quá trình apoptosis với sự thay đổi trong biểu hiện protooncogen BCL-2. Có những protooncogen khác cũng đóng vai trò này như C-MYC - đó là protooncogen kích thích sinh sản tế bào – ngược lại tác dụng của protooncogen BCL-2. Vậy sản phẩm protein của gen MYC cho tế bào 2 con đường để lựa chọn : sinh sản hay huỷ diệt (apoptosis). Tế bào thực hiện bởi một trong hai con đường này là tùy tín hiệu từ ngoài vào. Có thể sản phẩm gen BCL-2 là một trong những tín hiệu quan trọng nhất của sự sống tế bào. Hoạt động lớn nhất của gen BCL-2 làm thuận lợi cho tế bào sống. Sự giảm hoạt động của nó có nghĩa là hướng tế bào đi vào chương trình chết định sẵn.

Sự chỉ ra vai trò của các oncogen trong apoptosis tự động đưa đến câu hỏi về sự tham gia của các anti-oncogen trong quá trình này. Người ta biết rằng các sản phẩm của gen P.53 cũng như gen RB1 là điều hoà sinh sản tế bào. Ngoài ra sản phẩm gen P.53 còn đóng vai trò “người gác cổng” của bộ gen tế bào. Hư hại ADN gây tăng hoạt tính của gen P.53, do đó tăng tổng số lượng protein P.53. Protein P.53 là chất hoạt hoá trực tiếp hoặc gián tiếp nhiều gen,

quá trình phân chia tế bào bị dừng lại và những cơ chế sửa chữa thì được hoạt động. Đồng thời người ta cũng thấy rằng protein P53 trực tiếp hoặc gián tiếp điều hoà hoạt động gia đình các gen tham gia vào quá trình apoptosis. Thuộc về gia đình này ngoài BCL-2 còn có các gen BCL-Xs, BCL-X1, BCL-N, BAX và MCL1. Tế bào hướng về con đường apoptosis hay sinh sản được quyết định bởi sự lệ thuộc số lượng giữa các sản phẩm gen kéo theo dạng dime. Chẳng hạn tạo dime đồng nhất BCL-2 thì dịch chuyển về hướng sinh sản trong khi thay protein BCL-2 qua protein BAX thì dịch chuyển theo hướng apoptosis.

Vì lý do gì đó sản phẩm gen P53 không hoàn thành chức phận và sự hư hại ADN không được sửa chữa thì sẽ xảy ra sự sao chép ADN hư hại, cuối cùng dẫn đến tạo ra biến dị. Bởi vì đồng thời không xảy ra giảm hoạt động gen BCL-2 và tế bào cũng không loại trừ được ADN hư hại. Điều đó dẫn đến tập trung nhanh chóng những biến dị và sai lệch nhiễm sắc thể làm tế bào hướng đến kiểu hình ung thư.

12. Sự sinh mạch và phát triển ung thư

Sự biểu hiện đầu tiên biến hình tế bào bình thường thành ung thư là bị bề gãy chế độ phân chia. Tế bào bắt đầu phân chia, kéo theo sự tăng trưởng ung thư. Các tế bào thế hệ sau tăng dần, tách ra những mạch máu gần đấy. Khối u lúc này duy trì vào khoảng 1 triệu tế bào (carcinoma in situ). Sở dĩ chỉ duy trì ở mức ấy một thời gian vì chúng thiếu dinh dưỡng, yếu tố tăng trưởng và oxy. Tình trạng này kéo dài nhiều năm. Chúng chỉ tăng trưởng nhanh và tiếp tục khi có điều kiện được cung cấp cho tế bào ung thư đó đầy đủ chất dinh dưỡng và oxy. Như vậy chỉ có cách duy nhất là tăng trưởng các mạch máu.

Ở cơ thể trưởng thành (người lớn) quá trình sinh mạch không xảy ra. Thực tế xảy ra chỉ trong một số trường hợp bệnh hay trong trường hợp làm lành vết thương. Quá trình sinh mạch trong cơ thể thì bị kìm hãm bởi protein trombosporin. Hình như sự tổng hợp nó được điều hoà bởi protein của gen P53. Nếu như protein P53 bị giảm cũng như trombosporin cũng giảm thì các tế bào màng nội mạc của thành mạch tăng phân chia. Chẳng bao lâu, lưới mao mạch được hình thành và xuyên vào khối u. Đồng thời người ta cũng quan sát thấy có sự kích thích các gen mà sản phẩm của chúng làm cho các tế bào của u nhanh chóng phát triển và xâm lấn. Các sản phẩm đó có thể là các hormon, các yếu tố tăng trưởng khác nhau, và interferon. Các tế bào được dinh dưỡng bắt đầu phân chia càng mạnh nhất là tạo ra những mạch máu bài tiết những yếu tố tăng trưởng để ung thư phát triển và xâm lấn.

13. Sự tạo thành di căn

Đã nhiều năm người ta biết rằng một trong những nguyên nhân chính của sự điều trị ung thư không thành công là do ung thư nguyên phát di căn đi nơi khác.

Ở các mô bình thường, trên màng bề mặt tế bào có các phân tử dính kết, chúng làm cho các tế bào gần nhau sát được vào nhau một cách chặt chẽ. Những phân tử đó có tên là cadherin.E (phân tử dính kết). Ở tế bào ung thư khi tiến triển mất đặc tính dính kết. Điều đó gây ra chúng lỏng tác dụng tương hỗ giữa các tế bào và dính vào thể ngoài tế bào. Một trong số tế bào ung thư nguyên phát thoái hoá màng cơ sở, tạo ra hàng rào, mà tế bào bình thường thì không ở tình trạng rách gián đoạn như vậy. Tế bào đó có thể tách khỏi khối ung thư nguyên phát, sau đó đi theo dòng máu hoặc bạch huyết đến vùng khác của cơ thể. Phá thành mạch, tế bào đó

ra ngoài và khu trú ở một nơi mới. Nếu như hoàn cảnh phát triển thuận lợi với sự có mặt của những yếu tố tăng trưởng thì sự sao chép ADN xảy ra và tế bào bắt đầu quá trình phát triển ung thư thứ phát.

Tạo ra ung thư thứ phát chỉ cần một lượng không nhiều tế bào ung thư nguyên phát. Vào giữa những năm 1980 người ta có thể xác định được tế bào ung thư nguyên phát có khả năng hay không tạo ra ung thư thứ phát trên cơ sở phân tử. Một số gen – tạo ra những protein có khả năng hình thành di căn - đã được tách ra. Một trong gia đình các gen đó là NM23. Gia đình gen này gồm có 2 gen :

- * Gen NM23-H1 mã hoá protein PM 18.500, và

- * Gen NM23-H2 mã hoá protein PM 17.000

Trong các tế bào di căn có mức giảm 2 protein này. Càng di căn mức protein NM23 càng giảm.

Sự giảm các phân tử dính kết – cadherin.E là điều kiện làm tăng sự di căn. Cadherin E là protein xuyên màng kết hợp với đoạn hoạt hoá bên ngoài của bộ xương trên 2 tế bào bên cạnh, do đó làm giảm hiện tượng tế bào di căn. Nhưng trong tế bào ung thư, sự biểu hiện cadherin giảm hẳn do đó làm tăng khả năng di căn của tế bào.

Gen tăng điển hình liên quan đến khả năng di căn tế bào ung thư là gen mã hoá enzym collagenase IV mà enzym này làm thoái hoá collagen tít IV.

Collagen tít này chỉ có duy nhất ở màng cơ bản. Khi tế bào ung thư kết hợp với màng cơ bản, thì enzym collagenase IV hoạt động dẫn đến gãy màng và giải phóng tế bào ung thư.

Những thay đổi bề mặt tế bào ung thư có một ý nghĩa lớn đối

với khả năng tế bào ung thư di căn và đặc biệt tác dụng tương hỗ tế bào ung thư với màng cơ bản.

Phân tử CD44 – loại glicoproteit xuyên màng có trên bề mặt lymphocyt, fibroblast và các tế bào biểu mô tham gia tác dụng tương hỗ giữa tế bào với tế bào. Các phân tử CD44 càng tăng thì làm thay đổi tính dính kết của mình và cũng làm mất khả năng chuyển giao những tín hiệu.

Tính xâm lấn của ung thư mà chủ yếu khả năng tạo di căn cũng được điều hoà qua một số sản phẩm của gen như sản phẩm dính kết, bài tiết và enzym thuỷ phân màng cơ bản để tăng di chuyển.

14. Những tác nhân gây ra ung thư

Những tác nhân được coi là nguyên nhân gây ra ung thư có nhiều loại, nhưng hiện nay có thể phân chia thành 2 loại lớn như sau : loại tự nhiên (nature) và loại hậu thành (epigene) (bảng 6) :

Bảng 6. Phân biệt ung thư loại tự nhiên và loại hậu thành

Loại tự nhiên (do lỗi gen từ lúc mới sinh ra)	Loại hậu thành
Ung thư xảy ra ở những trẻ nhỏ mang các gen bất thường lúc mới sinh ra, ví dụ như : - Neurofibromatosis liên quan đến gen NF2 - Nephroblastoma liên quan đến gen WT1 v.v...	- Hút thuốc lá - Uống rượu - Thuốc phiện - Thức ăn thịt - Thức ăn mỡ - Thức ăn nhiễm aflatoxin - Nhiễm vi khuẩn và virus - Thuốc trừ sâu - Các nội tiết tố - Các tia phóng xạ tia X và tia UV

Người ta còn phân biệt thành 4 loại nguyên nhân theo kiểu khác :

- Nguyên nhân sinh học
- Nguyên nhân vật lý
- Nguyên nhân hoá học
- Nguyên nhân di truyền

Dưới đây chúng tôi sẽ giới thiệu các loại nguyên nhân này.

1. Nguyên nhân sinh học

1.1. Sự nhiễm ký sinh trùng

Người ta thấy ở vùng Châu Á và Châu Phi các ung thư bàng quang, ung thư trực tràng, ung thư gan và đường mật có liên quan tới bệnh ký sinh trùng – như schistosom và sán lá gan.

1.2. Nhiễm khuẩn 'helicobacter - pylori

Ung thư dạ dày có liên quan đến nhiễm khuẩn helicobacter pylori. Sự nhiễm khuẩn vùng màng nhầy dạ dày xảy ra ở tuổi trẻ và gây ra viêm hang vị và loét hành tá tràng. Điều đó dẫn tới viêm dạ dày thiếu dưỡng và loạn sản đường ruột rồi cuối cùng dẫn đến ung thư dạ dày. Điều trị kháng sinh có thể loại trừ sự nhiễm khuẩn và dẫn tới làm giảm tỷ lệ ung thư.

Song người ta còn thấy *Helicobacter pylori* có thể gây ra lymphoma dạ dày (gastric lymphomas). Những thủy lymphoma rất đặc trưng cho hình ảnh của viêm dạ dày helicobacter. Loại trừ sự nhiễm khuẩn có thể làm cho lymphoma đó thoái lui hoặc bị mất đi.

1.3. Sự nhiễm khuẩn mạn tính

Sự nhiễm khuẩn mạn tính gây ung thư thì không rõ nhưng người ta thấy trong ruột có vi khuẩn thực vật (bacterial flora) cũng như trong bàng quang. Ở đây sự nhiễm khuẩn mạn tính có thể được kèm theo bởi sự hình thành các chất nitrosamin gây ung thư.

1.4. Sự nhiễm virus viêm gan B

Vaccin chống bệnh viêm gan B bây giờ được biết là loại vaccin chống ung thư gan. Ở các nước châu Á và châu Phi ung thư gan được biết khởi đầu là do virus viêm gan B, nên khi chủng vaccin này cũng có khả năng làm giảm tỷ lệ ung thư gan.

1.5. Nhiễm virus papiloma ở người

Khi sử dụng vaccin chống lại các tác nhân ung thư của virus papiloma, người ta có thể loại trừ được ung thư cổ tử cung, tử cung và âm đạo, thậm chí cả ung thư dương vật, hậu môn. Khi dùng vaccin người ta cũng thấy giảm cả tỷ lệ ung thư miệng, thanh quản và da. Sự miễn dịch hoá với những đoạn gen của loại papiloma đặc hiệu cũng đã được chỉ ra ở động vật – cách đây không lâu trước khi có vaccin xử trí cho người.

1.6. Nhiễm virus Epstein Barr (EB)

Ngày nay người ta thấy virus EB có mặt ở khắp nơi, nhưng gen của nó có trong bệnh lymphoma Burkitt, ung thư vòm, hội chứng ung thư leucemia lymphoma tế bào T trưởng thành, sarcoma kaposi v.v... Người ta cũng đang tìm ra vaccin chống lại nó và đã thử trên khỉ.

1.7. Nhiễm virus loại RNA – gây bệnh viêm gan C

Người ta thấy virus này cũng gây ra ung thư gan và sự loại trừ nó cũng không dễ dàng.

2. Nguyên nhân vật lý

Nguyên nhân vật lý gây ung thư bao gồm sự phóng xạ ion, tia tử ngoại, và các trường tần số thấp từ tần số radio tới tần số cực thấp được sản sinh ra do dòng điện đi qua.

2.1. Phóng xạ ion

Phóng xạ ion được xác định gây ra khoảng 4% ung thư, hầu như do phóng xạ tự nhiên từ những radon trong không khí, tia vũ trụ từ không gian bên ngoài, từ hạt phóng xạ, đá, đất, nguyên vật liệu xây dựng và từ sự phóng xạ bên trong các nguyên tố kali, chì, poloni có trong thức ăn.

Nồng độ radon trong nhà có thể thay đổi hàng trăm lần và tia này có thể giảm đi khi được thông gió có quạt và máy điều hoà nhiệt độ. Ung thư phổi của quảng đại quân chúng được gây ra bởi radon thì chưa rõ, còn đang bàn cãi.

2.2. Tia cực tím

Tia cực tím của ánh sáng mặt trời gây ra ung thư melanom và ung thư tế bào nền (basal cell carcinoma) của da. Trước đây ung thư da thì người ta còn nghĩ tới than, nhựa đường, hắc ín. Ung thư melanom lại được tăng lên ở quần thể da trắng đặc biệt khi bị bệnh vẩy nến.

Bây giờ cũng có bằng chứng là tia cực tím cũng liên quan đến cả bệnh ung thư lymphoma – không phải – Hodgkin và leukemia –

lymphatic mạn tính và điều đó có thể giải thích được bằng mối liên quan giữa tia UV và hệ thống miễn dịch.

2.3. Sóng có tần số radio và các sóng tần số cực thấp

Ung thư não xảy ra khi thấy dùng điện thoại cầm tay. Trong nhà khi ở điện thế cao thì có khả năng sinh ra trường điện từ ở mức $0,2\mu T$ và có khi còn hơn (bình thường trong nhà chỉ khoảng $0,05\mu T$). Trường điện từ này có thể tăng lên gấp đôi và gây nguy cơ ung thư leucemia ở trẻ nhỏ. Hiện nay cũng đã có bằng chứng rằng bệnh nghề nghiệp chịu mức sóng tương tự có thể tăng nguy cơ leucemia và bệnh ung thư não ở người lớn.

3. Nguyên nhân hoá học

Nguyên nhân hoá học gây ung thư thì rất nhiều, trước hết có thể kể ra : các chất trong thuốc lá, rượu, các chất sinh ra trong thức ăn do nấu nướng, các nội tiết, các thuốc chữa bệnh, các chất có trong môi trường nghề nghiệp, các thuốc trừ sâu, nước uống bẩn v.v...

3.1. Thuốc lá

Thuốc lá có khoảng ít nhất 50 chất đã được biết là gây ra ung thư trên các động vật thực nghiệm, trong đó gồm có chất poloni hoạt động phóng xạ, 1-benzen, 2-naphthylamine, 4-aminobiphenyl, những polycyclic aromatic hydrocarbon và các nitrosamin. Gần đây người ta biết cả nicotin của thuốc lá cũng gây ung thư.

Hút thuốc lá thường gây ra ung thư phổi, môi, mũi, họng, thực quản, dạ dày, tụy, bàng quang, thận, gan, hậu môn v.v...

3.2. Rượu

Trước đây người ta cho là phụ nữ uống rượu dễ bị ung thư vú có lẽ bởi sự can thiệp của chuyển hoá estrogen, mà còn cả ung thư tai, thực quản, thanh quản và gan. Về gan thì đầu tiên gây xơ gan vì nghiện rượu, sau đó chuyển sang ung thư gan. Rượu uống rất ít hàng ngày có thể làm giảm tỷ lệ bệnh tim thiếu máu cục bộ tới 40%.

Một điều quan trọng là rượu và thuốc lá cộng hợp với nhau dễ gây ung thư.

3.3. Thức ăn được bảo quản muối hoặc thức ăn ngâm muối

Thức ăn loại này dễ gây ung thư dạ dày, song người ta cũng không hiểu do muối hay do nhiễm bản vi khuẩn. Ở phía nam Trung Quốc cá muối có liên quan chặt chẽ với ung thư vòm họng, đặc biệt nếu được ăn chúng từ lúc nhỏ. Ung thư vòm còn liên quan đến nhiễm virus Epsteine Barr.

3.4. Thức ăn có nấm phát triển

Nấm *Aspergillus flavus* dễ phát triển ở lạc, có chất aflatoxin dễ gây ung thư gan trong sự phối hợp với virus viêm gan B.

3.5. Thức ăn mỡ

Thức ăn mỡ động vật dễ gây ung thư vú, trực tràng, tiền liệt tuyến.

3.6. Thức ăn thịt đỏ

Người ta thấy ăn nhiều thịt đỏ dễ bị ung thư đại tràng và ung thư tiền liệt tuyến.

Thịt cá nấu nướng nhiều tạo ra những chất dễ gây ung thư như nitrosamin, heterocyclic amines furan và các polycyclic aromatic hydrocarbon.

3.7. Các chế phẩm nội tiết tố

Dùng một tiết tố tránh thai cũng có thể dẫn đến ung thư, như ung thư trực tràng, ung thư vú, ung thư bìn, ung thư buồng trứng v.v...

3.8. Các dược phẩm sử dụng điều trị một số bệnh

Các nội tiết tố, các kháng sinh và một số thuốc khác sinh ra nitrosamin dùng nhiều và lâu dài đều có khả năng sinh ung thư.

3.9. Các chất sinh ra từ nghề nghiệp và nhiễm bẩn

Than, nhựa đường, hắc ín và các amin thơm gây cho công nhân cạo ống khói, công nhân làm đường dễ bị mắc ung thư các loại.

Sự đốt cháy chất thải bỏ sinh ra dioxin và các dẫn xuất của nó. Các chất này dễ gây biến dị và sinh ung thư.

3.10. Các thuốc trừ sâu diệt cỏ

Các chất trừ sâu diệt cỏ nhiễm bẩn vào đất, thức ăn cũng đều là chất carcinogen.

3.11. Nước uống nhiễm bẩn

Nước nhiễm trihalomethanes được gây ra bởi hoạt động của chất chlorin và chất bẩn vô cơ có thể dễ gây ung thư bàng quang.

4. Nguyên nhân do lỗi gen di truyền

Một loại bệnh ung thư xảy ra từ lúc mới sinh là do khiếm khuyết của những gen sửa chữa DNA. Bảng 7 dưới đây chỉ ra các bệnh đó. Ung thư vú và buồng trứng xảy ra muộn hơn trong cuộc đời thì mang gen BrCa 1 và 2. Ung thư trực tràng liên kết với khuyết tật của những gen sửa chữa DNA như hMS2 và hML1.

Bảng 7. Ung thư và sự nhạy cảm di truyền

Dạng ung thư	Vị trí ung thư	Gen
- Retinoblastoma	Retina	RB ₁
- Polyp adenomatom gia đình	Trực tràng, đại tràng	APC
- Các loại ung thư nội tiết		
+ Loại 1	Cận giáp trạng	} MENI
	Tuyến yên	
	Tụy	} RET
+ Loại 2	Giáp trạng	
	Thượng thận	
- Neurofibromatosis		
+ Loại 2	Schwannoma	
	Meningioma	
- Li-Fraumeni	Vú	} TP ₅₃
	não	
	tổ chức mềm	} VH1
- VonHippel – Lindau	thận	
	CNS angiomas	
- Nephroblastoma	thận	WT1

Những người nghiện hút có allele của gen CYP (1A1 và 2D6), làm chuyển hoá hydrocarbon thơm và debrisoquine dễ bị ung thư phổi hơn. Người du lịch tắm nắng nhất là người da trắng dễ ung thư da hơn.

Sự khác nhau thực chất một vài allele gen 5- α -reductase giữa

người Mỹ da đen, người Mỹ da trắng, người Đông Nam Á, thì cũng thấy có sự liên quan khác nhau đến tỷ lệ mắc phải ung thư tuyến tiền liệt, vì 5 alpha reductase-1 enzym tham gia chuyển hoá testosterone – chất nguyên nhân gây ra bệnh này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Freeman S.M. et al. (1996). *In situ use of scucide genes for cancer therapy Semin. Oncol.* 23, 31-45.
2. Martin L.A. et al. 1996. *Direct cell Killing by suicide genes. Cancer Metas. Rev.* 15, 301-316.
3. Greenwald P. (1994) *Experience from clinical trials in cancer prevention. Ann. Med.* 26, 73-80.

MỤC LỤC

Lời nói đầu	3
Giới thiệu vaccin và miễn dịch	5
TS. LÊ THANH HOÀ	
1. Khái niệm về vaccin và miễn dịch nói chung	6
2. Hướng chiến lược tạo vaccin và phân loại vaccin	12
Gen chuyển vị (transposon), vai trò của chúng trong di truyền và chọn giống sinh vật	21
TS. LÊ THANH HOÀ	
1. Mở đầu	21
2. Khái niệm về hiện tượng chuyển vị và gen chuyển vị	25
3. Hậu quả của sự chuyển vị gen	35
Vì khuẩn cố định nitơ phân tử vi hiếu khí Azospirilla	39
TS. NGUYỄN NGỌC DỪNG	
1. Lịch sử nghiên cứu	39
2. Một số đặc điểm đặc trưng	40
3. Nghiên cứu di truyền	44
4. Sinh thái học	51
5. Nghiên cứu ứng dụng tại Việt Nam	54
Sinh học độc tố cá nóc Tetrodotoxin	57
TS. LÊ QUANG HUẤN	
1. Quá trình nghiên cứu về Tetrodotoxin	57
2. Sự phân bố của tetrodotoxin trong các loài sinh vật biển	59
3. Tính chất của tetrodotoxin	64
4. Tác dụng dược lý của tetrodotoxin	66
5. Cá nóc và sự nhiễm độc khi ăn cá nóc	67
6. Các nghiên cứu sinh học phân tử về cá nóc	69

7. Các độc tố sinh học biển	70
8. Những kết quả nghiên cứu về cá nóc tại Việt nam	73
9. Phụ lục minh hoạ	73
Sinh học phân tử của plasmid phân giải chất độc hữu cơ và đề kháng i-on kim loại	80

TS. LÊ THANH HOÀ

1. Giới thiệu vi khuẩn <i>Pseudomonas putida</i> và plasmid phân giải chất độc hữu cơ	81
2. Các phương thức phân giải chất độc hữu cơ có các plasmid phân giải tham gia	85
3. Cơ chế phân tử của quá trình phân giải chất độc hữu cơ	86
4. Plasmid của sự đề kháng i-on kim loại	88

Vai trò của công nghệ sinh học trong công tác chọn tạo giống ngô	91
---	----

TS. BÙI MẠNH CƯỜNG

Phân giới thiệu : Công nghệ sinh học ứng dụng chỉ thị phân tử trong nghiên cứu tạo giống	91
Phân thứ nhất : Chỉ thị phân tử ứng dụng trong chọn tạo giống ngô	95
1. Mở đầu	95
2. Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống ngô	96
3. Thảo luận	104
Nghiên cứu và ứng dụng mầm bệnh vi sinh vật trong phòng trừ sâu hại cây trồng	109

TỔNG KIM THUẬN

1. Các mầm bệnh vi sinh vật diệt côn trùng	109
2. Vi khuẩn diệt côn trùng	111
	221

3. Nấm diệt côn trùng	115
4. Sản xuất các chế phẩm vi sinh vật diệt côn trùng	124
5. Ứng dụng công nghệ gen vào việc nâng cao chất lượng các chủng vi sinh vật diệt côn trùng	127
6. Tình hình nghiên cứu mầm bệnh vi sinh vật diệt côn trùng ở Việt Nam	128
Vaccin thuộc thế hệ mới bằng công nghệ gen	136
TS. LÊ THANH HOÀ	
1. Vaccin tái tổ hợp có vectơ dẫn truyền	137
2. Vaccin axit nucleic (vaccin ADN)	146
3. Vaccin phối hợp với công nghệ chuyển gen thực vật	150
Về các liệu pháp gen trong chữa bệnh	154
GS.TSKH. ĐÁI DUY BAN Th.S. ĐÁI THỊ HẰNG NGÀ	
1. Những khái niệm về điều trị gen	154
2. Các biện pháp gen trong chữa bệnh cho người	156
3. Liệu pháp antisense	157
4. Liệu pháp đưa một gen mới vào bù đắp cho gen hỏng hóc	157
5. Đưa một gen mới vào sản xuất ra các chất cần thiết để tiêu huỷ tế bào bị bệnh	161
6. Chuyển gen vào các vi khuẩn, nấm men, v.v... để sản xuất các dược phẩm quý hiếm điều trị bệnh	163
7. Tái tổ hợp gen trong tạo vaxin thế hệ mới, vaccin phân tử và vaccin ADN	166
8. Sử dụng công nghệ gen trong cấy ghép các cơ quan	170
9. Thay phẫu thuật bằng liệu pháp gen	171
10. Liệu pháp gen lymphokin điều trị ung thư	173

Ung thư phân tử và các nguyên nhân gây ung thư 190

GS – TSKH. ĐÁI DUY BAN

Th.S. ĐÁI THỊ HẰNG NGÀ

1. Mở đầu	190
2. Các giai đoạn sinh ung thư	192
3. Những gen của dòng biến dị	195
4. Sự rối loạn chuyển giao thông tin	195
5. Omogen và antioncogen	196
6. Những gen biến dị	198
7. Sự rối loạn của quá trình chu kỳ tối bào	199
8. Gen và protein P.53	201
9. Xây dựng bộ gen và và protein RB1	203
10. Sự phosphorin hoá và chu kỳ tế bào	204
11. Sự biến hình ung thư và chương trình chết định sẵn	206
12. Sự sinh mạch và phát triển ung thư	208
13. Sự tạo thành di căn	209
14. Những tác nhân gây ra ung thư	211

Chịu trách nhiệm xuất bản:

LÊ VĂN THỊNH

biên tập và sửa bản in:

HÀ HOÀNH

Tình bày bìa: **LÊ THU**

Nhà xuất bản nông nghiệp

Đ14 phố Phương Mai - Đống đa - Hà Nội

ĐT: 8521940. 5761075

Chi nhánh NXBNN

58 phố Nguyễn Bình Khiêm - Q.1 - TP. Hồ Chí Minh

ĐT: (08) 8299521. 8297157

In: 500 bản khổ 15x21cm tại xưởng in N.X.B.N.N

Giấy phép XB số 62/417 do cục Xuất Bản cấp ngày
16/4/2002. In xong và nộp lưu chiểu quý I/2003

SÁCH ĐƯỢC NHÀ NƯỚC

Nhà Sách Giáo Dục



2
CÔNG NGHỆ SINH HỌC

12.700 VND

63 - 630 - 62/417 - 2002
NN - 2002

Giá: 12.700^d