

**TRẦN QUỐC DUNG (Chủ biên)
NGUYỄN HOÀNG LỘC-TRẦN THỊ LỆ**

**CÔNG NGHỆ CHUYÊN GEN
(ĐỘNG VẬT, THỰC VẬT)**

Huế, 2006

Mở đầu

Mục đích của công tác chọn giống và nhân giống là cải tiến tiềm năng di truyền của cây trồng, vật nuôi...nhằm nâng cao năng suất, hiệu quả sản xuất nông nghiệp. Trong công tác cải tạo giống cổ truyền chủ yếu sử dụng phương pháp lai tạo và chọn lọc để cải tạo nguồn gen của sinh vật. Tuy nhiên, do quá trình lai tạo tự nhiên, con lai thu được qua lai tạo và chọn lọc vẫn còn mang luôn cả các gen không mong muốn do tổ hợp hai bộ nhiễm sắc thể đơn bội của giao tử đực và giao tử cái. Một hạn chế nữa là việc lai tạo tự nhiên chỉ thực hiện được giữa các cá thể trong loài. Lai xa, lai khác loài gặp nhiều khó khăn, con lai thường bất thụ do sai khác nhau về bộ nhiễm sắc thể cả về số lượng lẫn hình thái giữa bố và mẹ, do cấu tạo cơ quan sinh dục, tập tính sinh học... giữa các loài không phù hợp với nhau. Gần đây, nhờ những thành tựu trong lĩnh vực DNA tái tổ hợp, công nghệ chuyển gen ra đời đã cho phép khắc phục những trở ngại nói trên. Nó cho phép chỉ đưa những gen mong muốn vào động vật, thực vật...để tạo ra những giống vật nuôi, cây trồng mới..., kể cả việc đưa gen từ giống này sang giống khác, đưa gen của loài này vào loài khác.

Bằng kỹ thuật tiên tiến nêu trên của công nghệ sinh học hiện đại, vào năm 1982 Palmiter và cộng sự đã chuyển được gen hormone sinh trưởng của chuột cống vào chuột nhắt, tạo ra được chuột nhắt “không lồ”. Từ đó đến nay hàng loạt động vật nuôi chuyển gen đã được tạo ra như thỏ, lợn, cừu, dê, bò, gà, cá ...Trong hướng này các nhà nghiên cứu tập trung vào những mục tiêu: tạo ra động vật chuyên sản xuất protein quý phục vụ y học; tạo ra động vật có sức chống chịu tốt (chống chịu bệnh tật, sự thay đổi của điều kiện môi trường...); tạo ra các vật nuôi có tốc độ lớn nhanh, hiệu suất sử dụng thức ăn cao, cho năng suất cao và chất lượng sản phẩm tốt. Động vật chuyển gen còn được sử dụng làm mô hình thí nghiệm nghiên cứu các bệnh ở người để nhanh chóng tìm ra các giải pháp chẩn đoán và điều trị các bệnh hiểm nghèo như ung thư, AIDS, thần kinh, tim mạch...

Ấn hững bước phát triển của công nghệ chuyển gen vào thực vật bắt nguồn từ những thành công của công nghệ chuyển gen vào động vật. Kể từ năm 1984, là lúc người ta bắt đầu tạo được cây trồng chuyển gen và đến nay đã có những bước tiến lớn. Ấn hiều cây trồng quan trọng chuyển gen ra đời như lúa, ngô, lúa mì, đậu tương, bông, khoai tây, cà chua, cải dầu, đậu Hà Lan, bắp cải... Các gen được chuyển là gen kháng vi sinh vật, virus gây bệnh, kháng côn trùng phá hại, gen cải tiến protein hạt, gen có khả năng sản xuất những loại protein mới, gen chịu hạn, gen bất thụ đực, gen kháng thuốc diệt cỏ...

Triển vọng của công nghệ chuyển gen là rất lớn, cho phép tạo ra các giống vật nuôi, cây trồng... mang những đặc tính di truyền hoàn toàn mới, có lợi cho con người mà trong chọn giống thông thường phải trông chờ vào đột biến tự nhiên, không thể luôn luôn có được. Đôi với sự phát triển của công nghệ sinh học trong thế kỷ XXI thì công nghệ chuyển gen sẽ có một vị trí đặc biệt quan trọng. Có thể nói công nghệ chuyển gen là một hướng công nghệ cao của công nghệ sinh học hiện đại phục vụ sản xuất và đời sống.

I. Một số khái niệm cơ bản

1. Chuyển gen

Chuyển gen (transgenesis) là đưa một đoạn D_A ngoại lai vào genome của một cơ thể đa bào, sau đó đoạn D_A ngoại lai này sẽ có mặt ở hầu hết các tế bào và được truyền lại cho thế hệ sau. Vì vậy khái niệm chuyển gen chỉ được sử dụng cho thực vật và động vật. Ấn ám men, vi khuẩn và tế bào nuôi cấy mang một đoạn D_A ngoại lai được gọi là các tế bào tái tổ hợp (recombinant cell) hoặc tế bào biến nạp (transformed cell).

Chuyển gen khác với liệu pháp gen (gene therapy). Có trường hợp các tế bào mầm không mang D_A ngoại lai. Thuật ngữ liệu pháp gen mầm (germinal gene therapy) cũng được sử dụng. Liệu pháp gen mầm hãy còn chưa được thử nghiệm ở người. Các tế bào mầm này mang D_A ngoại lai và được truyền lại cho thế hệ sau.

Về mặt lịch sử, thuật ngữ GMO (genetically modified organism)-sinh vật biến đổi gen, được sử dụng chủ yếu để chỉ các thực vật chuyển gen được gieo trồng để cung cấp lương thực, thực

phẩm cho con người và động vật. Logic hơn và chính xác hơn, GMO đề cập tới tất cả các cơ thể sống biến đổi di truyền, bao gồm cả vi sinh vật. Thuật ngữ GMP (genetically modified plant)-thực vật biến đổi gen và GMA (genetically modified animal)- động vật biến đổi gen cũng được sử dụng.

Trong thực tế, các đoạn D_A ngoại lai được sử dụng để tạo sinh vật chuyển gen hầu hết là các gen luôn có sẵn một trình tự phù hợp với một promoter làm cho nó biểu hiện thành R_A, nói tóm tắt là protein.

Sản phẩm phiên mã của gen có thể là một R_A không được dịch mã thành protein. Đây là trường hợp đối với R_A ngược hướng (antisense R_A), rybozyme và các gen được phiên mã bởi R_A polymerase I và III.

Không nhất thiết là D_A ngoại lai luôn luôn được hợp nhất vào genome của sinh vật chuyển gen. D_A ngoại lai không thể tồn tại trong cơ thể mà không hợp nhất vào genome của nó. Một đoạn D_A tự do nhanh chóng bị loại trừ trong chu trình tế bào vì vậy nó sẽ không có khả năng tái bản và truyền lại cho các tế bào con. Tuy nhiên về lý thuyết thì có thể duy trì một đoạn D_A ngoại lai như một nhiễm sắc thể nhỏ (minichromosome) có khả năng tự tái bản và có mặt trong các tế bào con. Một số genome virus có đặc tính này, ví dụ như virus herpes. Một vài đoạn nhiễm sắc thể thường được tìm thấy ở các tế bào khối u, là các nhiễm sắc thể tồn tại trong một thời gian ngắn, mang các yếu tố tái bản và truyền cho các tế bào con.

2. Động vật (Thực vật) chuyển gen

Động vật (Thực vật) chuyển gen là động vật (thực vật) có gen ngoại lai (gen chuyển) xen vào trong D_A genome của nó.

Gen ngoại lai này phải được truyền lại cho tất cả mọi tế bào, kể cả các tế bào sinh sản mầm. Nếu dòng tế bào mầm bị biến đổi, các tính trạng bị biến đổi này sẽ được truyền cho các thế hệ kế tiếp thông qua quá trình sinh sản bình thường. Nếu chỉ có dòng tế bào sinh dưỡng bị biến đổi, chỉ có cơ thể mang các tế bào sinh dưỡng đó bị ảnh hưởng và không di truyền lại cho thế hệ sau. Việc chuyển gen ngoại lai vào động vật (thực vật) chỉ thành công khi các gen này di truyền lại cho thế hệ sau.

Cho đến nay, trên thế giới người ta đã thành công trong việc tạo ra nhiều thực vật, động vật chuyển gen. Ở động vật, không chỉ đối với động vật mô hình (chuột), vật nuôi (bò, lợn, dê, cừu, thỏ, gà, cá...) mà cả những loài động vật khác như khỉ, muỗi và một số côn trùng...

3. Gen chuyển

Gen chuyển (transgene) là gen ngoại lai được chuyển từ một cơ thể sang một cơ thể mới bằng kỹ thuật di truyền.

Các gen chuyển được sử dụng để tạo động vật, thực vật chuyển gen có nguồn gốc từ các loài sinh vật khác nhau: động vật, thực vật, vi sinh vật và cả con người. Ví dụ: gen của người được đưa vào chuột và các vật nuôi khác như lợn, bò, cừu, chim...

II. Mục đích chuyển gen

Áo ống chung, mục đích của chuyển gen là thêm một thông tin di truyền ngoại lai vào genome, cũng như để ức chế một gen nội sinh. Trong một số trường hợp, sự thay thế một gen hoạt động chức năng bằng một gen hoạt động chức năng khác là cần thiết. Gen ngoại lai có thể là một thể đột biến của gen nội sinh hoặc một gen hoàn toàn khác.

Sự thêm gen có thể được thực hiện để cung cấp sinh vật mang protein mới. Sự thêm gen cũng có thể được sử dụng để nghiên cứu cơ chế hoạt động của một promoter trong toàn cơ thể. Sự kết hợp của gen reporter với promoter là nguyên tắc chung của phương pháp này.

Sự thay thế gen được sử dụng chủ yếu để làm bất hoạt một gen đã biết. Trên thực tế, nó bao gồm sự thay thế gen nội sinh bằng một thể đột biến bất hoạt. Phương pháp này được dùng để cho thông tin về chức năng sinh học của gen như ở trường hợp thêm gen. Thực vậy cả thêm gen và bất hoạt gen có thể gây ra các biến đổi ở sinh vật chuyển gen, mà các biến đổi này có thể được quan sát hoặc đánh giá. Các thể đột biến của gen thay thế có thể cung cấp thông tin bằng một cách thức tinh vi hơn.

Sự thay thế một gen bằng một gen có chức năng khác nhau hoàn toàn là khó hơn nhưng có thể thực hiện để đưa một marker

hoặc một gen chọn lọc vào genome. Vị trí hợp nhất vào genome có thể được chọn lọc đối với khả năng chứa của nó để biểu hiện gen ngoại lai bằng một cách chắc chắn.

III. Nguyên tắc cơ bản trong việc tạo động vật (thực vật) chuyển gen

Để nguyên tắc cơ bản trong việc tạo động vật (thực vật) chuyển gen là đưa một hoặc vài gen ngoại lai vào động vật (thực vật) (do con người chủ động tạo ra). Các gen ngoại lai này phải được truyền thông qua dòng mầm vì vậy mọi tế bào kể cả tế bào mầm sinh sản của động vật (thực vật) đều chứa vật chất di truyền đã được sửa đổi như nhau.

IV. Cơ chế hợp nhất của DNA ngoại lai vào genome

Trong tất cả các trường hợp, sự hợp nhất của đoạn Dã A ngoại lai vào genome được thực hiện với sự tham gia của các cơ chế sửa sai Dã A của tế bào. Các protein liên quan với các cơ chế này nhận ra các cấu trúc Dã A không bình thường, có thể là sự ghép đôi không tương ứng của hai sợi đơn Dã A, các vùng sợi đơn hoặc các vị trí mà Dã A ngoại lai liên kết với Dã A chủ.

Khi Dã A ngoại lai không có trình tự chung với genome chủ, sự nhận biết giữa hai Dã A chỉ bao gồm các trình tự Dã A ngắn tương đồng ít hoặc nhiều. Sự nhận biết này là cần thiết cho các cơ chế sửa sai hoạt động. Sau đó Dã A ngoại lai hợp nhất vào genome nhờ quá trình tái tổ hợp không tương đồng (Hình 1). Sự kiện này là khá hiếm và xảy ra ở các vị trí khác nhau trong genome.

Khi Dã A ngoại lai đóng góp một trình tự dài tương đồng với genome chủ thì trình tự này sẽ được nhận biết một cách chính xác. Các cơ chế sửa sai gây ra tái tổ hợp tương đồng nghiêm ngặt làm thay thế gen nội sinh đích bằng Dã A ngoại lai. Nếu gen sau bị đột biến thì gen nội sinh được thay thế bằng một gen đột biến (Hình 2). Trong điều kiện tốt nhất, tái tổ hợp tương đồng ít xảy hơn 100 lần so với tái tổ hợp không tương đồng. Sở dĩ như vậy là do số vị trí đối với sự nhận biết không chính thức là lớn hơn nhiều so với sự nhận biết tương đồng. Thông thường sự nhận biết tương đồng là duy nhất trong mỗi genome đơn bội.

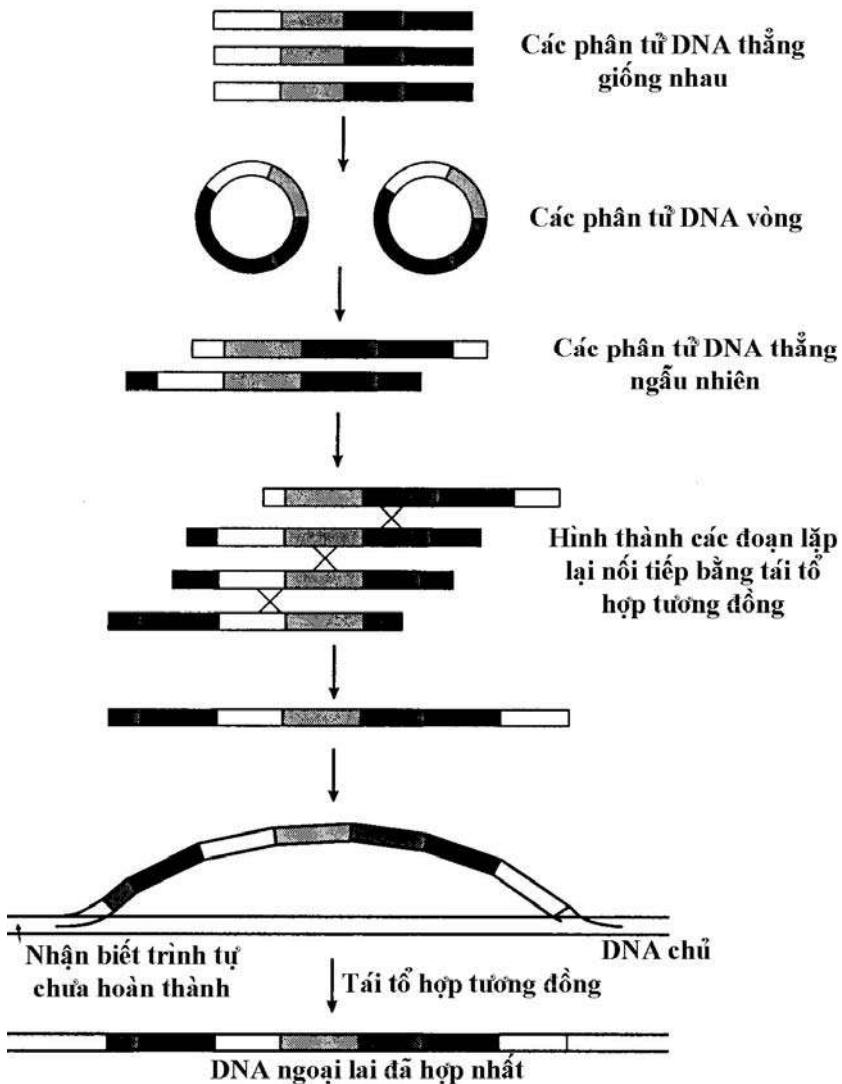
Dâ A ngoại lai phải đến nhân tế bào để hợp nhất vào genome của nó. Số phận của Dâ A ngoại lai không giống nhau và phụ thuộc vào việc nó đã xâm nhập vào tế bào chất hoặc vào nhân một cách trực tiếp.

Dâ A biến nạp vào tế bào nuôi cây nói chung là dạng plasmid vòng. Plasmid vòng bị phân cắt bởi Dâ Ase của tế bào chất tại các vị trí ngẫu nhiên. Phần lớn Dâ A bị phân hủy trong tế bào chất. Một phần nhỏ đi đến nhân và có thể được phiên mã. Ở dạng này, Dâ A ngoại lai không ổn định và nó sẽ bị loại trừ khi tế bào phân chia. Một tỉ lệ nhỏ Dâ A ngoại lai hợp nhất vào genome. Trong quá trình di chuyển từ tế bào chất đến nhân, các đoạn Dâ A ngoại lai liên kết với nhau để tạo ra dạng polymer gọi là đoạn trùng lặp (concatemer). Trong tế bào chất, các liên kết đồng hóa trị xảy ra một cách ngẫu nhiên giữa các đoạn Dâ A ngoại lai làm cho các gen sắp xếp lại ở dạng nối tiếp.

Khi Dâ A được xâm nhập vào nhân một cách trực tiếp, các đoạn Dâ A này cũng tạo thành các đoạn trùng lặp nhưng thông qua quá trình tái tổ hợp tương đồng. Dâ A ngoại lai bị phân cắt một cách ngẫu nhiên, tạo ra các đoạn trùm gói lên nhau và tái kết hợp tạo ra một đoạn trùng lặp mà ở đó các gen được xây dựng lại rất tốt. Sau đó các bản sao khác nhau của các đoạn Dâ A ngoại lai được cấu tạo chủ yếu ở dạng nối tiếp.

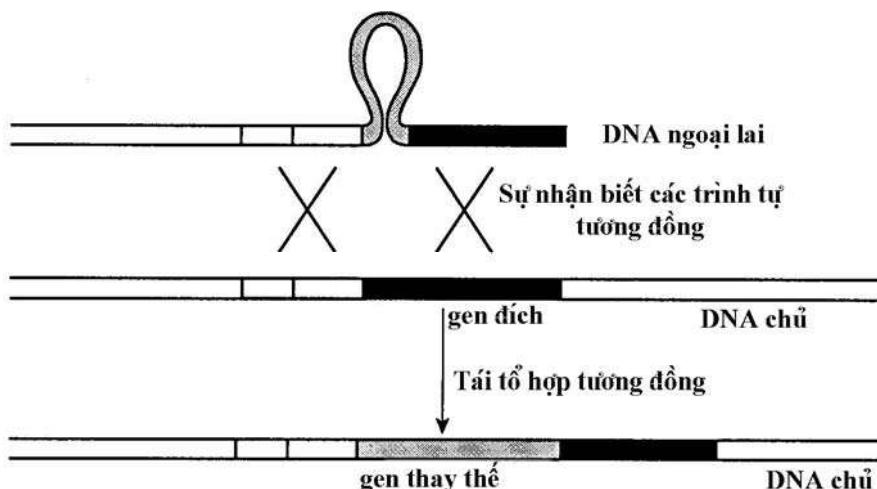
Khi các đoạn Dâ A khác nhau được xâm nhập đồng thời vào một tế bào, chúng tạo thành các đoạn trùng lặp chứa một vài bản sao của mỗi đoạn. Các đoạn trùng lặp lai (hybrid concatemers) này được hợp nhất vào genome. Vì thế đến bốn gen khác nhau có thể được chuyển đồng thời vào một tế bào.

Đối với chung, Dâ A ngoại lai được hợp nhất dưới dạng đoạn trùng lặp có kích thước khoảng 100kb, thường chứa từ một đến mươi bản sao của đoạn Dâ A gốc. Điều thú vị là khi các đoạn Dâ A lớn được chuyển vào, đoạn trùng lặp hợp nhất vào thường chứa số bản sao ít hơn mặc dù kích thước tối ưu để hợp nhất vào genome là vào khoảng 100kb.



Hình 1: Các cơ chế hợp nhất ở một vị trí ngẫu nhiên của DNA ngoại lai tiêm vào nhân của tế bào

Dâ A tiêm vào được cắt ra một cách ngẫu nhiên. Các đoạn Dâ A này lê thuộc vào quá trình tái tổ hợp tương đồng tạo ra các polymer (các đoạn trùng lặp) của gen tiêm vào xếp nối tiếp nhau. Các đầu của đoạn trùng lặp bị phân hủy bởi Dâ Ase, tạo ra các vùng sợi đơn ngắn nhận biết các vị trí bổ sung trong genome. Trong quá trình tái bản Dâ A, các cơ chế sửa sai hợp nhất Dâ A ngoại lai.



Hình 2: Cơ chế thay thế gen bằng tái tổ hợp tương đồng

Dâ A nhận biết các trình tự tương đồng trong genome một cách chính xác. Cơ chế sửa sai của tế bào gây ra sự thay thế đặc hiệu vùng genome đích bằng các đoạn Dâ A ngoại lai. Trình tự định vị giữa hai vùng tương đồng được hợp nhất trong khi trình tự nằm bên ngoài các vùng tương đồng lại bị loại ra.

Dâ A vi tiêm vào nhân hay tế bào chất là ở dạng thăng bằng cách cắt plasmid ở vị trí chọn trước. Điều này làm giảm cơ hội cắt plasmid tại các vị trí ngẫu nhiên dẫn đến tạo thành các đoạn trùng lặp chứa các gen bị cắt xén bớt.

Các đoạn Dâ A sử dụng cho chuyển gen được làm thăng còn do các lý do khác. Cách này làm cho có thể loại bỏ các trình tự plasmid (giàu GC) mà có thể phá hủy các gen chuyển (transgenes). Mặt khác, Dâ A vòng tiêm vào nhân được hợp nhất với tần số thấp hơn nhiều so với Dâ A thăng.

Vì vậy nguy cơ của Dâ A ngoại lai cơ bản là giống nhau khi chúng được chuyển vào tế bào chất bằng vi tiêm (microinjection), chuyển nhiễm (transfection) với các tác nhân hóa học hoặc biến nạp bằng xung điện (electroporation). Tiêm Dâ A vào nhân là khó hơn nhưng kết quả là tần số hợp nhất cao hơn nhiều và tình trạng nguyên vẹn của Dâ A ngoại lai được duy trì tốt hơn. Tiêm Dâ A vào nhân của phôi không phải luôn có thể thực hiện, đặc biệt là đối với các loài không phải là thú.

Tất cả những phân tích ở trên cho thấy:

- Một gen ngoại lai có thể được tách chiết và sửa đổi bằng kỹ thuật di truyền.
- Gen ngoại lai có mặt trong tế bào cơ thể bao gồm cả tế bào mầm sinh sản có thể truyền lại cho thế hệ sau.

Chương 1

Các vector sử dụng trong công nghệ chuyển gen ở động vật và thực vật

I. Vector

Trong sinh học, vector là một phân tử DNA có khả năng mang một đoạn DNA ngoại lai và khi xâm nhập vào loại tế bào chủ thích hợp thì có khả năng tự tái bản không phụ thuộc vào sự sao chép của hệ gen tế bào chủ.

Áp dụng cách khác, vector là một phương tiện truyền thông tin di truyền trong cơ thể hoặc giữa các cơ thể khác nhau.

Tế bào chủ thường được sử dụng là vi khuẩn *E.coli*. Phần lớn các vector là các phân tử DNA dạng vòng nhỏ (plasmid) hoặc là bacteriophage.

Vector có thể được cắt ở một vị trí xác định bằng một enzym hạn chế và được nối với một đoạn DNA tương hợp khác được cắt bởi cùng enzym.

Trong tạo dòng phân tử, vector là rất cần thiết bởi vì thực tế cho thấy rằng một đoạn DNA chứa gen không thể làm gì trong tế bào chủ. Vì nó không phải là một bộ phận của genome bình thường của tế bào, cho nên nó sẽ không được tái bản khi tế bào phân chia, không được biểu hiện và có khả năng bị phân huỷ khá nhanh.

Trong kỹ thuật di truyền, vector là công cụ có khả năng nghiên cứu genome người và genome các loài khác và sự sử dụng chúng trong nghiên cứu đang trở nên ngày càng phổ biến một cách rộng rãi.

II. Các đặc tính của vector

- Vector phải đủ lớn để mang DNA ngoại lai nhưng không quá lớn.
- Vector phải chứa các trình tự kiểm soát (control sequences) như khởi điểm tái bản (origin of replication), promoter.

- Vector phải mang một hoặc nhiều vị trí nhận biết của enzym hạn chế.

- Vector phải mang các gen marker chọn lọc (thường là các gen kháng chất kháng sinh). Vì vậy các tế bào chứa chúng có thể được phát hiện một cách dễ dàng.

III. Các bước trong tạo dòng phân tử

- Ảo i vector và đoạn Dã A ngoại lai cần được tạo dòng trong ống nghiệm để tạo Dã A tái tổ hợp nhờ sự xúc tác của enzym ligase.

- Biến nạp Dã A tái tổ hợp vào một dòng tế bào chủ. Chọn lọc thể biến nạp trên môi trường agar trong đĩa petri có chất kháng sinh.

- Tách dòng Dã A tái tổ hợp bằng cách sử dụng mẫu dò (probe).

IV. Các vector sử dụng để chuyển gen ở động vật và thực vật

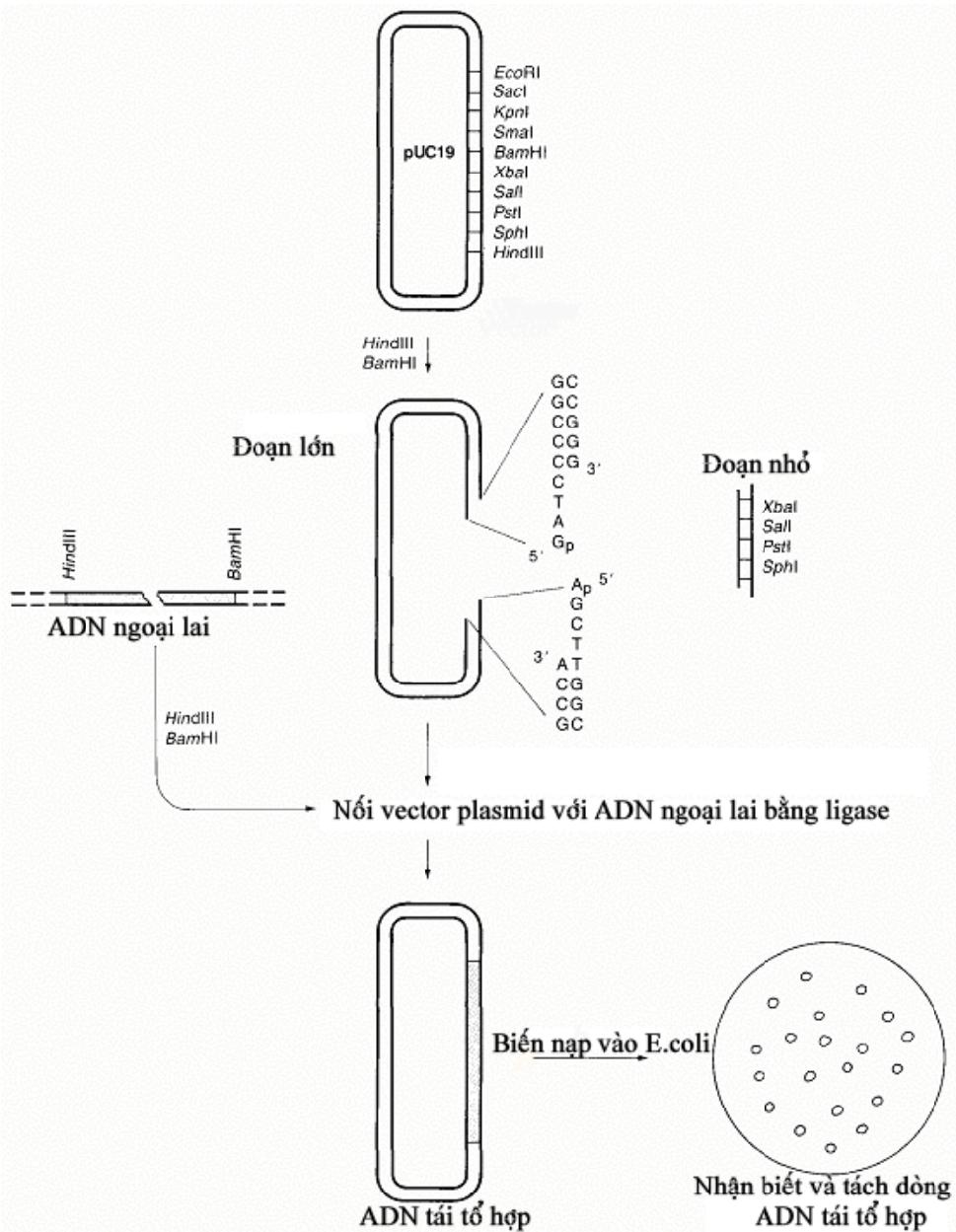
1. Các vector sử dụng để chuyển gen ở động vật

1.1. Vector sử dụng để thêm gen

Phần lớn các vector sử dụng hiện nay để tạo động vật chuyển gen bằng cách thêm gen được xây dựng để được hợp nhất vào genome. Các phương pháp đang được sử dụng hoặc nghiên cứu để tăng tần số hợp nhất của gen ngoại lai hoặc duy trì chúng như là các nhiễm sắc thể nhỏ độc lập.

1.1.1. Vector thẳng tối thiểu (Minimum linear vectors)

Ở đại đa số trường hợp, các nhà nghiên cứu sử dụng các đoạn genome chứa một hoặc hai gen hay chuẩn bị các cấu trúc gen hoạt động chúc năng từ các yếu tố khác nhau. Các đoạn của vector chứa các vùng phiên mã và điều hòa từ plasmid. Thực vậy, các vector vòng hợp nhất với tần số thấp hơn nhiều so với các đoạn Dã A thẳng và trình tự plasmid thường phá hủy các gen chuyển đã liên kết. Điều này đúng đối với các vector khác nhau như plasmid, cosmid, phage, BAC và YAC. Tuy nhiên một số nghiên cứu cho thấy rằng vector BAC vòng hợp nhất vào genome với hiệu quả giống như bản sao mạch thẳng của chúng. Ảo i cách khác, các vector mang các đoạn



Hình 1.1: : Tạo dòng bằng vector plasmid

Dã A genome dài ít nhạy với hiệu quả cảm của các trình tự của prokaryote. Điều này là thích hợp nhất nhờ sự hiện diện của các yếu tố cách ly ở các đoạn genome dài hoặc nhờ một hiệu quả khoảng cách đơn giản.

Các đoạn Dã A không chứa các trình tự đặc biệt hợp nhất vào genome với tần số tương đối thấp. Một số Dã A xen vào tạo ra số động vật chuyển gen nhiều hơn so với các Dã A khác. Điều này có thể xuất hiện từ sự có mặt của các trình tự trong đoạn xen mà nhận biết thường xuyên các trình tự genome (Hình 1). Một số các đoạn xen vào có thể chứa các trình tự ưu tiên cho sự phiên mã của chúng và sự duy trì của chúng trong phôi, tăng cường sự hợp nhất xảy ra.

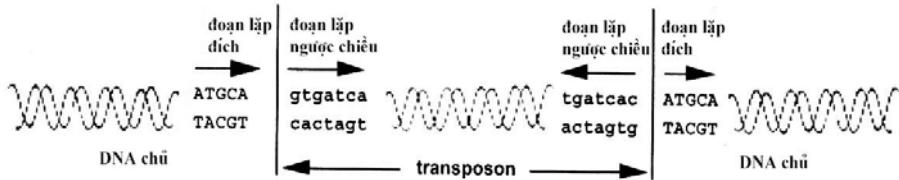
1.1.2. Vector chứa các trình tự lặp lại

Cơ chế của sự hợp nhất được mô tả ở hình 1 bao hàm sự nhận biết giữa các trình tự của đoạn xen và của genome. Tần số của sự hợp nhất được tăng lên nhờ sự có mặt ở cả hai đầu của các đoạn xen các trình tự lặp lại cao trong genome chủ ngay cả khi chúng bị thoái hóa nhiều hoặc ít. Ở bò, một trình tự có mặt nhiều ở tâm động làm tăng thêm các đoạn xen đã tăng tần số hợp nhất. Ở trường hợp đặc biệt này, các gen chuyển vẫn không hoạt động. Điều này là do tâm động là vùng không phiên mã của genome phá hủy gen chuyển.

Một phương pháp tương tự đã được tiến hành ở chuột, sử dụng các trình tự *Alu*. Các trình tự này là các yếu tố lặp lại. Các trình tự *Alu* chứa 200-300 nucleotid là có nhiều trong genome động vật có vú và đặc biệt là ở các vùng lân cận hoặc ở trong các vùng phiên mã. Một số trình tự *Alu* được phiên mã bởi Rã A polymerase III, làm cho chức năng của Rã A không rõ ràng và có thể không tồn tại. Các thí nghiệm đã cho thấy rằng tần số hợp nhất được tăng lên đôi với các đoạn xen chứa trình tự *Alu*.

1.1.3. Vector transposon

Transposon là một đoạn Dã A có khả năng tự tái bản một cách độc lập và xen vào một vị trí mới trong cùng nhiễm sắc thể hoặc một nhiễm sắc thể khác (Hình 1.2). Với tiến bộ của kỹ thuật di truyền transposon đã được sửa đổi, thiết kế thành các công cụ di truyền với mục đích đặc biệt.



Hình 1.2: Cấu trúc của transposon

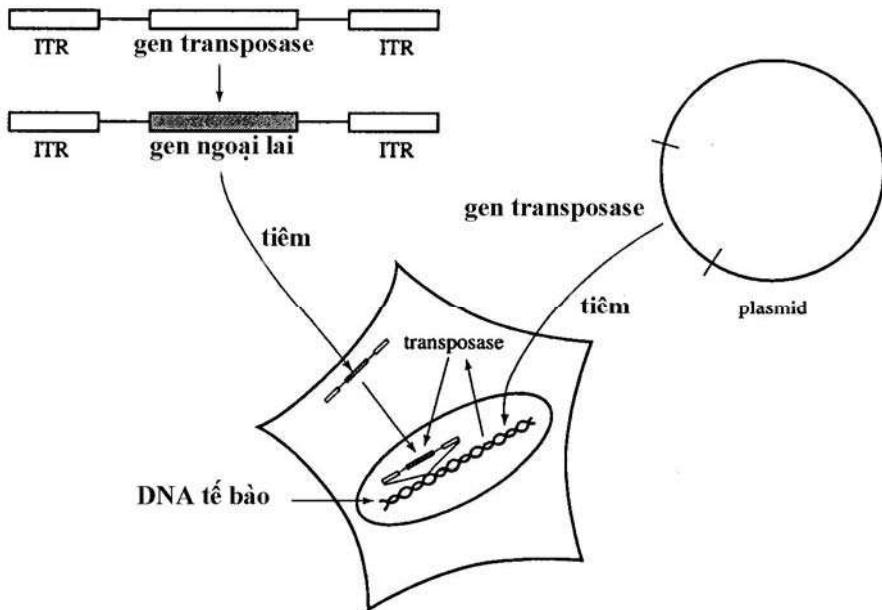
Kích thước của transposon nói chung là không dài hơn 2kb. Ở hiều bản sao của transposon có mặt trong genome tại các vị trí ngẫu nhiên một cách rõ ràng. Transposon được phiên mã thành R_A A, R_A A được phiên mã ngược thành D_A A sợi kép. D_A A sợi kép này hợp nhất vào genome với hiệu quả cao. Sự hợp nhất được điều khiển bởi gen transposase mã hóa transposon và các trình tự lặp lại đảo ngược ITR (inverted repeated sequence). Các trình tự lặp lại đảo ngược có mặt ở cả hai đầu của transposon (Hình 1.3). Cơ chế này cho phép transposon trai rộng ra một cách nhanh chóng và tỏa khắp genome, bao gồm cả sự bất hoạt gen trong một số trường hợp. Sự lan tỏa của transposon bị giới hạn bởi cơ chế tế bào làm bất hoạt sự phiên mã của transposon.

Transposon là vector có tiềm năng đối với sự hợp nhất gen ngoại lai vào genome. Để làm được điều này, một phần lớn vùng phiên mã của transposon bị mất đi, tạo ra khoảng trống đối với gen ngoại lai và ngăn cản transposon trai rộng một cách tự chủ và không kiểm soát trong genome.

D_A tái tổ hợp chứa gen ngoại lai không có khả năng đặc biệt để tự hợp nhất vào genome. Sự có mặt của gen transposase là cần thiết đối với mục đích này. Tiềm đồng thời transposon mang gen ngoại lai và plasmid vòng có khả năng biểu hiện gen transposase cho phép transposon hợp nhất với hiệu quả có ý nghĩa, khoảng 1-5 % số phôi được tiêm (Hình 1.3).

Protocol này được áp dụng trước tiên cho *Drosophila*, sử dụng transposon P và sau đó đã được sử dụng rộng rãi để tạo sinh vật chuyển gen (Kayser, 1997). Transposon thủy thủ (mariner) đã tỏ ra có hiệu quả đối với tế bào cá medaka, gà và động vật có vú. Các sửa đổi khác nhau của transposon này làm cho nó có thể mang một vector hiệu quả và an toàn đối với liệu pháp gen (Hackett, 2001).

Các vector khác được sử dụng để tạo côn trùng chuyển gen như *Aedes aegypti* hoặc tằm (Tamura, 1999). Gần đây transposon đã được sử dụng để tạo chuột chuyển gen (Dupuy, 2002).



Hình 1.3: Sử dụng vector transposon để chuyển DNA ngoại lai

Gen transposase được thay thế bằng gen mong muốn. Transposon tái tổ hợp được tiêm vào tế bào. Vector điều khiển sự tổng hợp enzyme gắn (intergrase) được cùng tiêm vào. Transposon được hợp nhất bằng cách sử dụng các trình tự lặp lại đảo ngược ITR của chúng

Trong tất cả các trường hợp, transposon và plasmid mã hóa cho transposase phải được tiêm vào tế bào chất của phôi dưới các điều kiện khác nhau tùy thuộc từng loài. Về phương diện này, gà là khác với hầu hết các loài khác. Việc tiêm gen có thể được thực hiện ở giai đoạn phôi một tế bào mà không thể đưa trở lại vào con mèo nuôi dưỡng như trường hợp đối với thú. Phôi tiêm gen phải được đưa vào noãn hoàng của một trứng không mang phôi. Sau vài tuần áp trứng dưới các điều kiện được kiểm soát tốt, gà chuyển gen được sinh ra với một tỉ lệ thành công có thể chấp nhận (Shermann, 1998).

Vì vậy, vector transposon cho phép tạo ra các động vật chuyển gen đối với các loài mà vi tiêm Dâ A thông thường không thành công. Vector này cũng được xem là an toàn. Vector transposon thủy thủ ngay cả khi thiếu gen transposase của nó cũng có thể tái bản và hợp nhất vào genome chủ với tần số thấp. Điều này là do sự có mặt của transposase nội sinh của tế bào chủ. Vấn đề này có thể giới hạn sự sử dụng transposon trong một số trường hợp. Trong khi đó, transposon BAC lợn con đã được sử dụng để tạo ra tần chuyển gen ổn định hoàn toàn sau một số thế hệ.

Transposon chỉ có thể mang các đoạn Dâ A ngoại lai với chiều dài giới hạn. Các cấu trúc phức tạp được sử dụng để biểu hiện gen ngoại lai rõ ràng cũng là một hạn chế. Ngoài ra các cơ chế tế bào phá hủy transposon có thể úc chế sự biểu hiện của gen chuyển trong một số trường hợp.

1.1.4. Vector retrovirus

a. Cấu trúc của retrovirus

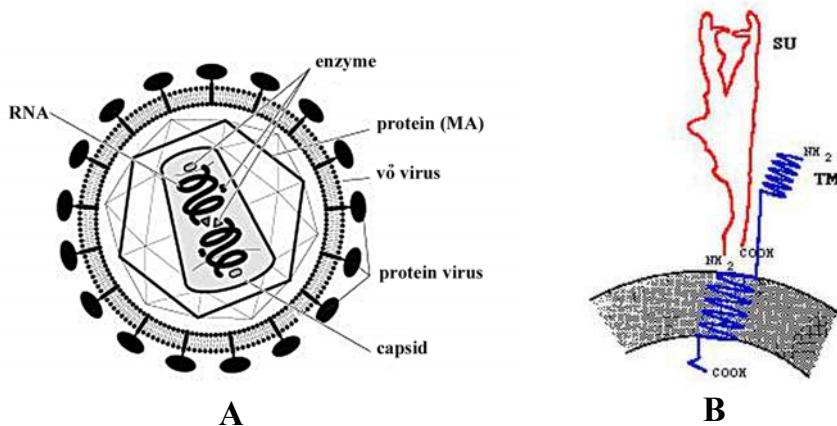
Retrovirus là loại virus Râ A, có vỏ bọc bên ngoài. Sau khi xâm nhiễm, genome virus được sao chép ngược thành Dâ A sợi kép, hợp nhất vào genome tế bào chủ và biểu hiện thành protein.

Retrovirus đặc trưng bởi chu kỳ tái bản của chúng, được mô tả lần đầu tiên vào đầu thập niên 1900 (Ellermann và Bang.O, 1908).

Hạt retrovirus có kích thước, hình dạng có thể thay đổi đôi chút nhưng đường kính khoảng 100nm. Vỏ của virus là glycoprotein, tạo thành các gai ở màng (Hình 1.4A). Protein trưởng thành này được chia làm hai loại polypeptid (Hình 1.4B):

- Glycoprotein vỏ bên ngoài (SU), kháng nguyên chủ yếu của virus, có chức năng bám vào thụ quan.

- Glycoprotein màng (TM), bám vào protein SU ở vỏ, chịu trách nhiệm đối với sự dung hợp màng.



Hình 1.4: Sơ đồ cấu trúc cắt ngang của retrovirus

A. Cấu trúc cắt ngang

B. Cấu trúc protein vỏ

Bên trong màng là protein cơ bản (MA), không định hình. Protein này bao lấp capsid (CA). CA là protein phong phú nhất trong hạt virus (chiếm khoảng 33 % trọng lượng tổng số), có hình khối 20 mặt. Bên trong capsid là lõi, thường có hình nón, bao gồm: Rã A genome, protein nucleocapsid (å C), enzym phiên mã ngược (reverse transcriptase = RT) và enzyme hợp nhất (integrase = Iå).

Genome retrovirus bao gồm hai bản sao của phân tử Rã A sợi đơn, mạch thẳng, có cap ở đầu 5' và đuôi poly A ở đầu 3' (tương đương với mRã A). Genome retrovirus có kích thước khoảng 8-11kb.

Retrovirus được chia làm hai loại là retrovirus đơn giản và retrovirus phức tạp.

Rã A của retrovirus đơn giản chứa 3 nhóm gen chủ yếu:

- Gen *gag* mã hóa protein lõi, capsid và nucleoprotein.
- Gen *pol* mã hóa enzyme phiên mã ngược và enzyme hợp nhất.

- Gen *env* mã hóa protein trong cấu trúc vỏ của virus.

Trật tự của các nhóm gen này ở tất cả các retrovirus là không thay đổi:

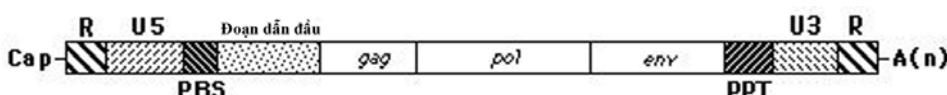
5' – gag – pol – env – 3'

Đã goài ra còn có nhóm gen *pro* mã hóa enzyme protease virus. Các retrovirus đơn giản bao gồm hầu hết các virus gây ung thư như virus bạch cầu chuột Moloney Mo-MLV (Moloney, 1960), virus ung thư tuyến vú chuột (mouse mammary tumor virus = MMTV) (Bittner, 1936).

Các retrovirus phức tạp, ngoài ba nhóm gen chủ yếu gag, pol và env còn có các gen khác như tat, rev ở HIV-1. Nhóm virus này bao gồm các lentivirus kể cả virus HIV-1, spumavirus, HFV (human foamy virus) và SFV (simian foamy virus).

Ở mỗi đầu của genome là các đoạn lặp dài tận cùng (LTR) chứa tất cả các tín hiệu cần thiết cho sự biểu hiện gen của virus. Một đoạn LTR gồm có 3 vùng: U3, R và U5. Vùng U3 bao gồm các yếu tố kiểm soát sự phiên mã, promoter và gen tăng cường (enhancer). Đây là vùng không mã hóa có kích thước 75-250 nucleotid, là phần đầu tiên của genome được phiên mã ngược, tạo ra đầu 3' của genome provirus. Vùng R thường là trình tự có kích thước ngắn chỉ khoảng 18-250 nucleotid tạo thành đoạn lặp trực tiếp ở cả hai đầu của genome. Vùng U5 là vùng không mã hóa có kích thước 200-1.200 nucleotid tạo nên đầu 5' của provirus sau khi phiên mã ngược. Vùng U5 mang vị trí poly A và cùng với vùng R xác định sự gắn thêm đuôi poly A vào. Cả hai vùng U3 và U5 đều mang vị trí gắn cần thiết cho sự hợp nhất genome của virus vào genome chủ.

Mặt khác, genome virus còn có đoạn dẫn đầu (leader), vị trí bám primer (primer binding site = PBS) và vùng polypurine (polypurine tract = PPT). Đoạn dẫn đầu không được dịch mã, khá dài, có kích thước khoảng 90-500 nucleotid, xuôi theo vị trí khởi đầu phiên mã, nằm giữa vùng U3 và R, ở phía đầu 5' của tất cả các virus mR&A. PBT dài 18 nucleotid bổ sung với đầu 3' của primer tR&A đặc hiệu được virus sử dụng để bắt đầu phiên mã ngược. PTT ngắn chỉ khoảng 10 A hoặc G có chức năng khởi đầu sự tổng hợp sợi (+) trong quá trình phiên mã ngược.



Hình 1.5 : Sơ đồ cấu trúc genome của retrovirus

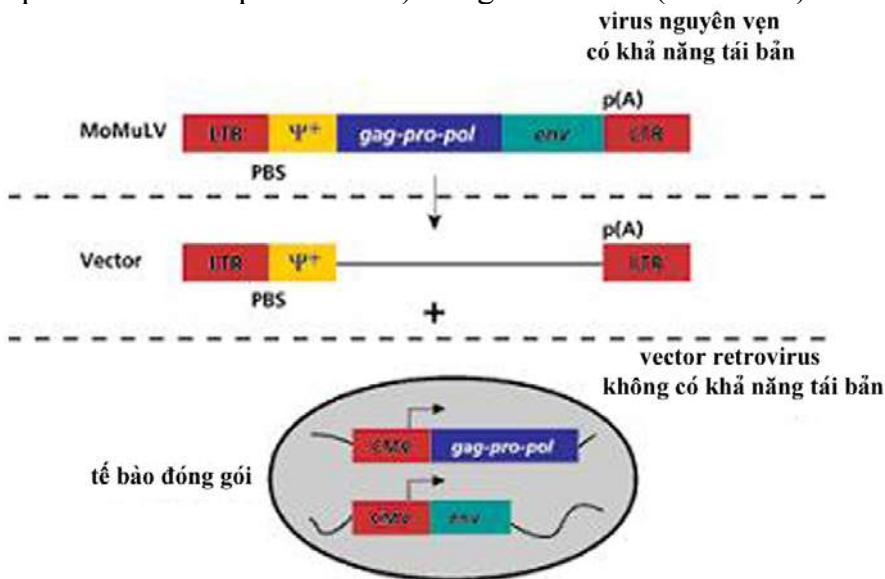
Để ngoài ra còn có các trình tự cần thiết cho sự đóng gói genome virus gọi là trình tự Ψ (psi) và các vị trí cắt Rã A ở gen *env*.

Một số retrovirus chứa protooncogene. Khi protooncogene bị đột biến có thể gây ra ung thư.

b. Vector retrovirus

Vector retrovirus là cấu trúc Då A nhân tạo có nguồn gốc từ retrovirus, được sử dụng để xen Då A ngoại lai vào nhiễm sắc thể của vật chủ.

Yếu tố chìa khóa trong việc sử dụng retrovirus làm thế truyền phân phôi gen là sự an toàn sinh học (biosafety). Mục đích chính của thiết kế vector là bảo đảm tạo ra một virus không khả năng tái bản (replication incompetent virus) trong tế bào chủ (Hình 1.6).



Hình 1.6: Virus nguyên vẹn có khả năng tái bản và vector retrovirus không có khả năng tái bản

Về nguyên tắc, có thể tạo ra vector retrovirus có khả năng tái bản (replication competent retroviral vector) bằng cách thêm các trình tự cần thiết vào virus (Hình 1.6). Để hưng một thiết kế phổ biến hơn là thay thế các gen của virus bằng các gen chuyển mong muốn để tạo ra vector tái bản không hoàn toàn (replication defective

vector). Mặt khác, kích thước của đoạn D_A ngoại lai mà vector tái bản không hoàn toàn có thể tiếp nhận lớn hơn nhiều so với vector có khả năng tái bản. Sự biểu hiện của các protein retrovirus ở hầu hết các retrovirus gây ung thư xảy ra tự nhiên do một promoter đơn (single promoter) nằm trong đoạn lặp dài tận cùng (LTR) ở đầu 5' và sự biểu hiện của các vùng mã hóa virus phức tạp xảy ra nhờ sự cắt ghép xen kẽ (alternative splicing). Tuy nhiên, việc thiết kế vector là không bị giới hạn do sử dụng promoter retrovirus đơn. Một hướng thiết kế khác là sử dụng promoter phức (multiple promoter) và các trình tự tiếp nhận ribosome ở bên trong (internal ribosome entry site = IRES).

Sự tái nạp và hợp nhất gen có hiệu quả phụ thuộc vào các yếu tố virus có mặt trong vector retrovirus.

Một điểm lưu ý quan trọng khi thiết kế vector retrovirus là hiệu quả tái bản của virus trong cấu trúc vector.

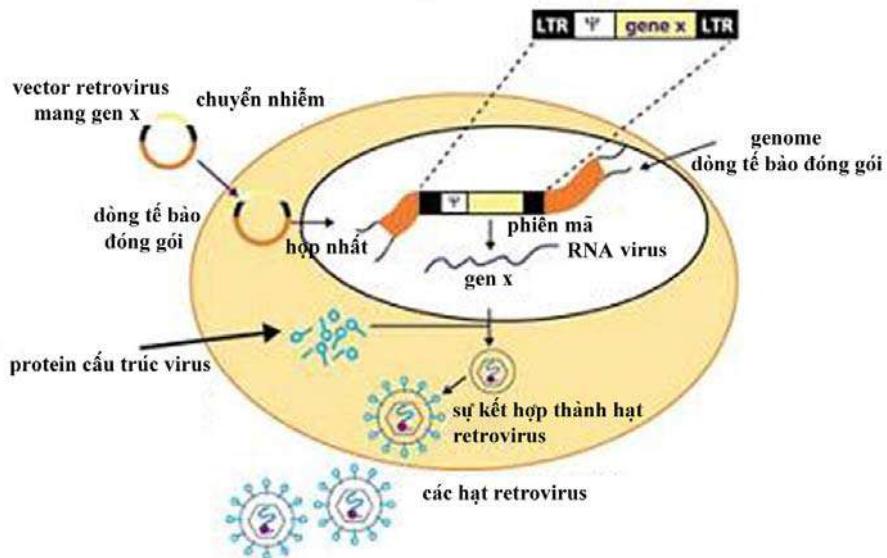
Phần lớn các vector retrovirus thường được thiết kế dựa trên virus Mo-MLV. Đây là loại virus có khả năng xâm nhiễm vào cả các tế bào chuột (có thể phát triển vector ở mô hình chuột) và tế bào người (có thể điều trị bệnh cho người). Các gen của virus (*gag*, *pol* và *env*) được thay thế bằng các gen chuyển mong muốn và được biểu hiện ở các plasmid trong dòng tế bào đóng gói. Các vùng cần thiết bao gồm các đoạn lặp dài tận cùng ở đầu 3' và 5' (3'LTR và 5'LTR) và trình tự đóng gói.

Trước đây virus hỗ trợ khả năng tái bản đã được sử dụng để đóng gói cả virus vector và virus hỗ trợ. Trong một phương pháp tinh vi hơn được sử dụng hiện nay, các dòng tế bào đã thao tác di truyền đặc hiệu đã biểu hiện các gen virus do các promoter không tương đồng được sử dụng để tạo ra các virus vector. Các dòng tế bào này được gọi là các dòng tế bào đóng gói hoặc các dòng tế bào hỗ trợ.

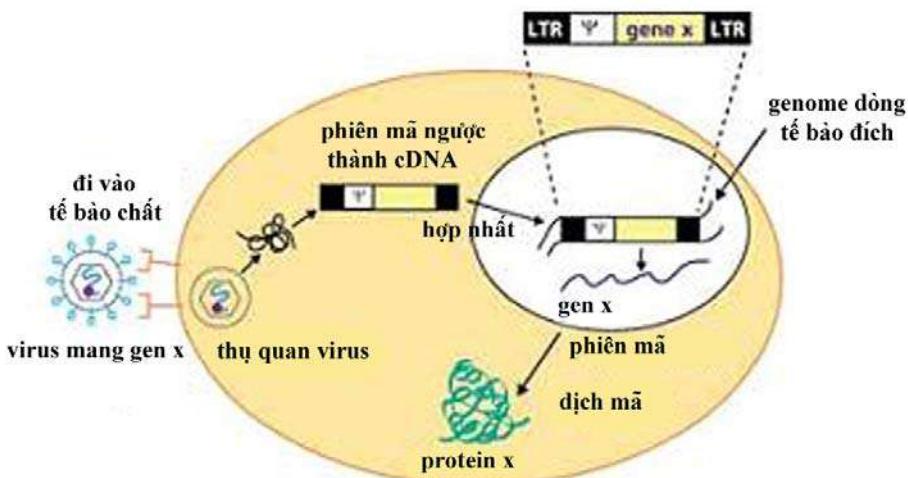
Chuyển gen và biểu hiện gen bằng một vector virus được gọi là sự tái nạp để phân biệt với quá trình xâm nhiễm của retrovirus có khả năng tái bản (replication competent retrovirus = RCR).

Sự biểu hiện của gen chuyển là do promoter hoặc gen tăng cường ở vị trí 5' LTR hoặc bởi các promoter virus (như cytomegalovirus, Rous sarcoma virus) hoặc bởi các promoter của tế bào (như beta actin, tyrosine). Sự định vị chính xác codon khởi đầu

của gen chuyển và các thay đổi nhỏ của 5'LTR ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen chuyển (Rivire, 1995).



Hình 1.7: Quá trình đóng gói tạo hạt retrovirus



Hình 1.8: Cơ chế hoạt động của vector retrovirus

Để nhận biết các tế bào biến nạp, các marker chọn lọc như neomycin và beta galactosidase được sử dụng và sự biểu hiện của gen chuyển có thể được cải tiến bằng cách thêm vào các trình tự ribosome bên trong (Saleh, 1997).

Một yêu cầu đối với sự hợp nhất và biểu hiện của các gen virus là các tế bào đích phải phân chia. Điều này giới hạn liệu pháp gen tăng sinh tế bào *in vivo* và *ex vivo*, do đó các tế bào thu nhận từ cơ thể được xử lý để kích thích tái bản và sau đó được tái nạp với retrovirus trước khi đưa trở lại bệnh nhân.

c. Ứng dụng của vector retrovirus

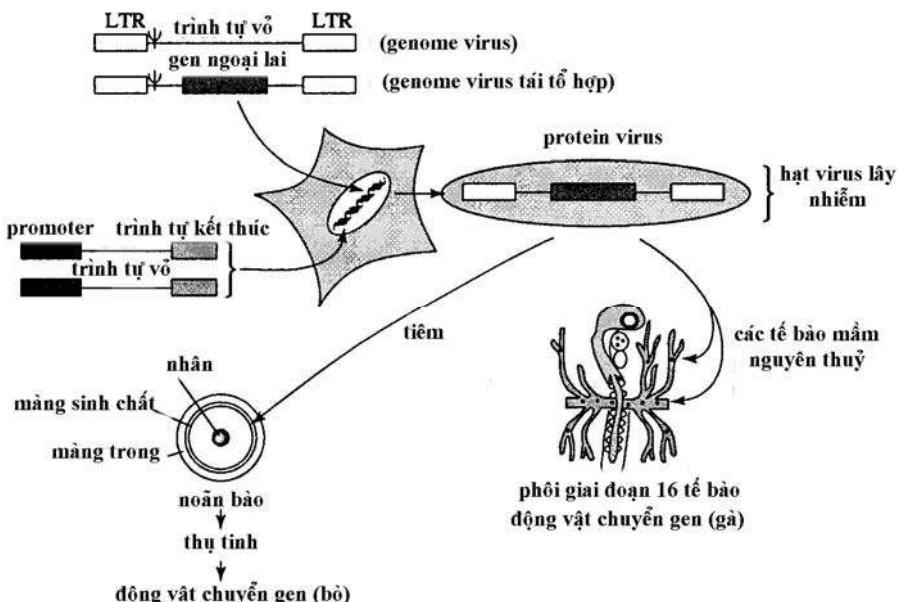
Vector retrovirus là cần thiết cho liệu pháp gen, đã được sử dụng có hiệu quả trong nhiều liệu pháp gen chữa bệnh cho người như suy giảm miễn dịch do thiếu hụt enzyme ADA, ung thư, tiêu đường, thiếu máu,...

Các vector retrovirus khác nhau đã được thiết kế để tạo động vật chuyển gen và gà chuyển gen đặc biệt (Ronfort, Legras và Verdier, 1997). Các vector này mang các trình tự *env* có khả năng nhận biết các tế bào phôi gà. Chúng được tiêm vào trứng gà mới đẻ. Ở giai đoạn này, các tế bào hatching còn đa năng và có thể tham gia vào việc tạo thành giao tử, dẫn đến truyền gen ngoại lai cho thế hệ sau. Phương pháp này cho hiệu quả không cao. Phôi ở giai đoạn này chứa khoảng 60.000 tế bào. Chỉ một tỉ lệ nhỏ các tế bào này có cơ hội mang gen chuyển nhờ vector retrovirus. Gà chuyển gen tạo thành ở dạng thể khám và có rất ít cơ hội truyền gen chuyển của chúng cho thế hệ sau. Một phương pháp khác đã chứng tỏ có hiệu quả hơn. Việc tiêm gen được thực hiện ở giai đoạn phôi 16 tế bào tại vùng lân cận của các tế bào gốc nguyên thủy. Các tế bào này được tiêm một cách ưu tiên, tạo ra các động vật chuyển gen có cơ hội truyền gen chuyển của chúng cho thế hệ sau (Hình 1.9).

Vector retrovirus cũng được sử dụng để chuyển gen vào noãn bào của bò và khỉ (Chen, 1998, 2001). Để tiến hành công việc này đòi hỏi hai điều kiện đặc biệt. Vỏ của vector là protein G của VSV (vesicular somatitis virus) có chức năng nhận biết màng phospholipid và vì vậy cho phép tiêm vào nhiều loại tế bào khác nhau. Các hạt virus được tiêm vào giữa màng trong (zona pellucida) và màng noãn bào vào lúc màng nhân đã biến mất, tạo cho genome

virus cơ hội tốt nhất để có thể đến được genome tế bào chủ (Hình 1.9).

Lentivirus là một phân lớp của retrovirus. Chúng có khả năng hợp nhất vào genome của các tế bào ở pha nghỉ, cả các tế bào tăng sinh và tế bào không tăng sinh. Khả năng này có được là do sự có mặt của một tín hiệu ở một trong số các protein virus. Protein virus này nhắm tới genome của virus ở vùng nhân. Lentivirus phức tạp hơn các retrovirus đơn giản, chứa thêm 6 gen *tat*, *rev*, *vpr*, *vpu*, *nef* và *vif*. HIV là một loại lentivirus. Vector lentivirus được nghiên cứu nhiều do tiềm năng sử dụng của chúng trong liệu pháp gen.



Hình 1.9: Sử dụng vector retrovirus để tạo động vật chuyển gen

Genome virus mang gen ngoại lai được đưa vào tế bào tổng hợp protein virus khuyết. Các hạt virus được sử dụng để tiêm vào noãn bào động vật có vú (bò, khỉ), các tế bào mầm nguyên thủy của gà hoặc phôi một tế bào của chuột.

Một nghiên cứu gần đây cho thấy rằng vector lentivirus tiêm vào phôi một tế bào hoặc ủ với phôi đã được loại bỏ màng trong là có hiệu quả đặc biệt đối với việc chuyển gen vào chuột (Lois, 2003).

Các vector này ngày càng được cải tiến tinh vi hơn. Genome của chúng có nguồn gốc từ lentivirus đã tạo ra các hạt virus tái tổ hợp có khả năng nhiễm vào tế bào phân chia hoặc tế bào không phân chia. Vector này chứa LTR đã được sửa đổi dẫn đến sự tự bất hoạt genome virus đã hợp nhất. Điều này làm giảm đáng kể khả năng tái tổ hợp tạo ra virus xâm nhiễm mang gen ngoại lai với phuong thức không kiểm soát. Các loại vector này không có các gen tăng cường. Sự vắng mặt các gen tăng cường làm cho nó có thể thay thế cho một promoter nội sinh điều khiển gen mong muốn hoạt động mà không lệ thuộc vào ảnh hưởng của các gen tăng cường LTR. Vector này cũng chứa một yếu tố điều hòa sau phiên mã ưu tiên cho việc biểu hiện gen và một đoạn của virus HIV mà đoạn này cho phép genome virus đi vào nhân của tế bào không phân chia và hợp nhất vào Dã A chủ.

Các vector này cũng có thể điều khiển sự biểu hiện gen FGFP của chuột, tạo ra màu xanh huỳnh quang ở tất cả các loại tế bào hoặc chỉ ở tế bào cơ khi promoter hoạt động ở tất cả các loại tế bào hoặc chỉ ở tế bào cơ.

Lưu ý rằng khoảng 80% chuột sinh ra là chuột đã được chuyển gen. Khoảng 90% số chuột này biểu hiện gen chuyển của chúng ở một số thế hệ. Protein VSV đã được sử dụng như là một vỏ bọc cho phép xâm nhiễm hiệu quả vào phôi.

Ưu điểm chính của vector này là hiệu quả biến nạp cao, thao tác đơn giản, sự xâm nhiễm có thể được thực hiện bằng cách ủ phôi đã loại bỏ màng trong với thế virus. Phương pháp này được mở rộng đối với các động vật có vú khác mà không có vấn đề đặc biệt. Phương pháp này thuận lợi một cách đặc biệt cho việc chuyển gen vào chuột trong khi phương pháp vi tiêm là rất khó sử dụng ở đây.

Hạn chế của vector này cũng không ít. Các hạt virus phải được kiểm soát an toàn sinh học bằng biện pháp thích hợp. Bước này ngày càng được tiêu chuẩn hóa nhằm tăng cường sử dụng các loại vector này cho liệu pháp gen. Các đoạn Dã A có kích thước không vượt quá 7-9kb có thể được đưa vào vector này. Sự biểu hiện của gen reporter là tương đối thấp trong trường hợp này. Mặt khác, sự hợp nhất độc lập của vector xảy ra trong cùng một phôi dẫn đến động vật chuyển gen thế khâm.

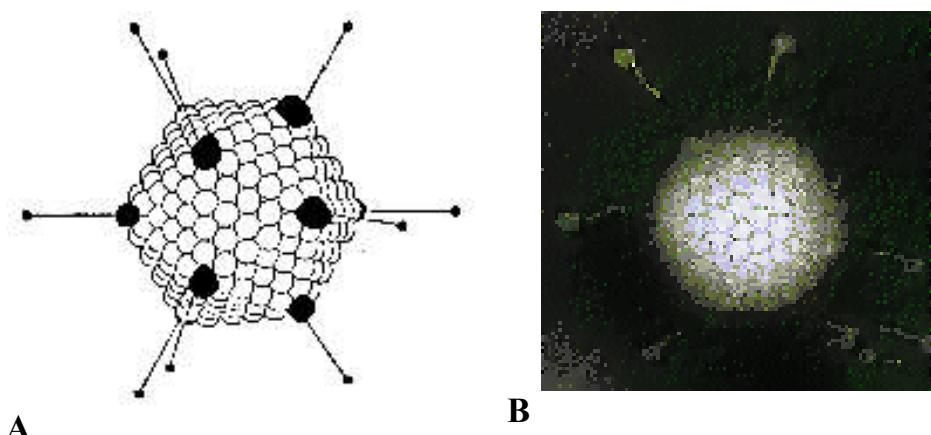
Rõ ràng, phương pháp này chỉ có thể thay thế vi tiêm trong một số trường hợp.

1.1.5. Vector Adenovius

a. Cấu trúc của adenovirus

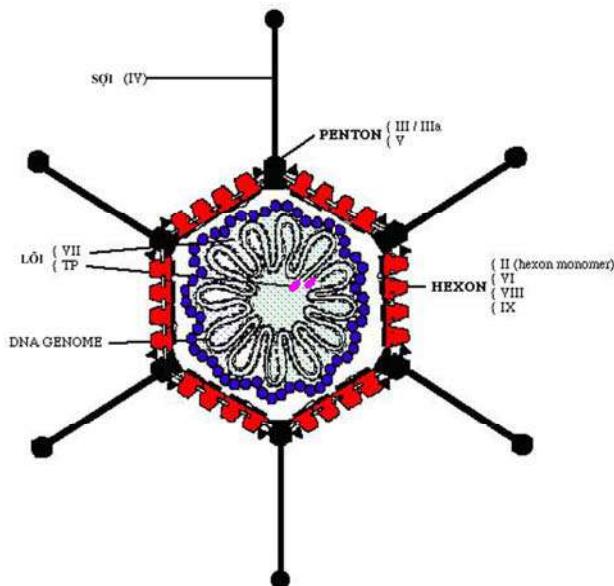
Adenovirus là loại virus không có vỏ, chứa genome DNA A sợi kép, mạch thẳng. Trong khi có hơn 40 dòng adenovirus typ huyết thanh phần lớn gây nhiễm trùng đường hô hấp ở người thì chỉ có nhóm phụ C typ huyết thanh 2 hoặc 5 được sử dụng làm vector một cách ưu thế. Chu trình sống của adenovirus thường không liên quan đến sự hợp nhất vào genome vật chủ, chúng tái bản như các yếu tố episome trong nhân của tế bào chủ và vì vậy không có nguy cơ phát sinh đột biến xen (insertional mutagenesis).

Tất cả các hạt adenovirus đều không có vỏ, đường kính 60-90nm. Chúng có tính đối xứng icosaedron, dễ dàng nhìn thấy dưới kính hiển vi điện tử khi nhuộm âm tính. Vỏ capsid của adenovirus bao gồm 252 capsomer. Lõi của hạt virus chứa tối thiểu 4 protein: protein đầu mút (terminal protein = TP), gắn với đầu 5' của genome bằng liên kết đồng hóa trị; protein V (180 bản sao/hạt virus) và protein VII (1070 bản sao/hạt virus), là các protein cơ bản và protein Mu, một protein nhỏ (4kD), vị trí và chức năng chưa được biết.



Hình 1.10: Adenovirus

- A. Mô hình cấu trúc không gian adenovirus
- B. Adenovirus nhìn dưới kính hiển vi điện tử



Hình 1.11: Sơ đồ cấu trúc cắt ngang của adenovirus

Genome của adenovirus là phân tử D_A sợi kép không phân đoạn, dài 30-38kb (các nhóm khác nhau có kích thước khác nhau), có thể mã hóa 30-40gen. Có 4 vùng gen phiên mã sớm là E₁, E₂, E₃ và E₄, có chức năng điều hòa và một sản phẩm phiên mã muộn mã hóa cho các protein cấu trúc. Các trình tự ở đầu mút của mỗi sợi là lặp lại đảo ngược vì vậy các sợi đơn đã biến tính có thể tạo ra cấu trúc “cán xoong” (“panhandle”). Ngoài ra, còn có protein 55kD liên kết với đầu 5' của mỗi sợi bằng liên kết đồng hóa tri.

b. Vector adenovirus

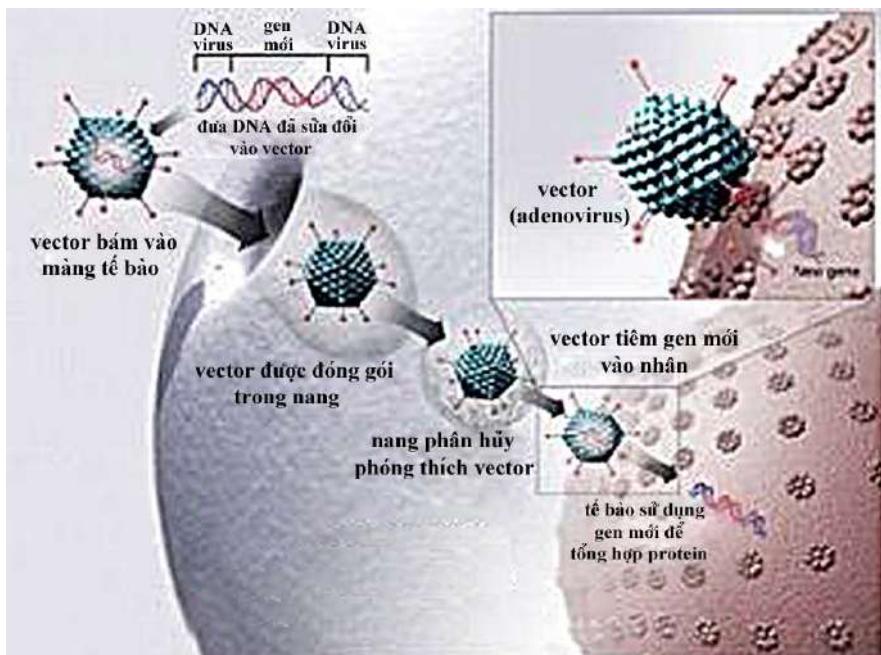
Vector adenovirus là vector chuyên gen được tạo ra từ các adenovirus tái tổ hợp.

Thế hệ adenovirus tái tổ hợp đầu tiên đã được thiết kế bằng cách loại bỏ gen E₁. Sự loại bỏ gen E₁ làm cho virus không có khả năng tái bản trong tế bào chủ. Gen E₃ thường cũng được loại bỏ để dành chỗ cho gen chuyên. Phần genome mã hóa protein cấu trúc của virus được thay thế bằng một gen marker (như β-galactosidase) hoặc gen cD_A liệu pháp. Phần lớn các vector “cán xoong” được thiết kế

gần đây chỉ chứa một trình tự lặp lại đảo ngược ITR và một trình tự đóng gói. Tất cả các gen cần thiết của virus được cung cấp bởi virus hỗ trợ.

Vector virus này không hợp nhất vào nhiễm sắc thể tế bào và nó tồn tại như một episome ở trong nhân.

Adenovirus là một vector chuyển gen an toàn, có thể xâm nhiễm một cách hiệu quả vào các tế bào không phân chia và các tế bào đang phân chia của nhiều loại tế bào khác nhau do các loại tế bào đích này chứa các thụ quan phù hợp với adenovirus. Khi xâm nhiễm vào tế bào chủ, phần lõi mang genome virus và gen ngoại lai đi qua lỗ màng nhân. Trong nhân tế bào chủ, các gen của adenovirus và gen ngoại lai sẽ phiên mã và dịch mã trong tế bào chất để tạo nên các loại protein cần thiết cho virus và protein mong muốn do gen ngoại lai mã hóa. Hạn chế của vector adenovirus thứ nhất là giảm khả năng sinh miễn dịch và vị trí ở ngoài nhiễm sắc thể của nó làm cho sự biểu hiện gen chỉ nhất thời, không bền. Kết quả của một số nghiên cứu đã cho thấy rằng sự biểu hiện gen chuyển chỉ kéo dài từ một vài ngày đến một vài tuần.



Hình 1.12: Cơ chế hoạt động của vector adenovirus

Để khắc phục những vấn đề nêu trên, các thế hệ adenovirus thứ hai và thứ ba đã được tạo ra. Trong các vector này, gen E₄ (hoặc E₂) mã hóa nhiều protein của virus được loại bỏ để giảm sự biểu hiện các protein virus.

c. Ứng dụng của vector adenovirus

Adenovirus người thế hệ thứ nhất đã được sử dụng rộng rãi làm vector chuyển gen *in vivo* (Wilson, 1996). Các vector này đã được sử dụng để chuyển gen người *in vivo* vào tế bào mũi, tế bào phổi (CFTR cD_A A), tế bào màng trong mạch, tế bào thận (Heikkila, 1996; Sukhatme, 1997), tim, gan, hệ thần kinh trung ương, cơ, các tế bào mô máu và tế bào ung thư (Jaffe, 1992; Engelhardt, 1993; Chen, 1994; Chang, 1995; Cussack, 1996; Simon, 1999). Merrrich (1996) đã so sánh tính lây nhiễm của adenovirus tái tổ hợp typ 5 tái bản không hoàn toàn ở các tế bào màng trong mạch trong môi trường nuôi cấy *in vitro*. Kết quả cho thấy trong môi trường nuôi cấy, sự lây nhiễm là tốt ở cả tế bào màng trong mạch của người và lợn.

1.1.6. Vector episome

Lợi thế của quá trình hợp nhất khi sử dụng vector này là D_A ngoại lai được truyền một cách ổn định cho thế hệ sau. Hạn chế chính là sự hợp nhất hiếm xảy ra. Một vấn đề khác là gen đã hợp nhất bị phụ thuộc vào hoạt động của môi trường chromatin của nó, làm thay đổi thường xuyên sự biểu hiện của gen chuyển. Mặt khác, số lượng bản sao hợp nhất bị hạn chế, nói chung là không vượt quá 10 và trong một số trường hợp không phải tất cả các bản sao này được phiên mã có hiệu quả.

Người ta đang mong muốn loại bỏ phần lớn các hạn chế này khỏi vector episome. Genome episome đã được phát hiện trong một số cơ thể sống. Đây là trường hợp đối với vi khuẩn chứa nhiều plasmid. Thỉnh thoảng các đoạn nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ sự suy thoái cục bộ của nhiễm sắc thể được tìm thấy trong tế bào, đặc biệt trong một số tế bào khối u. Các đoạn nhiễm sắc thể này là các nhiễm sắc thể nhỏ (minute chromosome) được tái bản một cách độc lập và truyền lại cho các tế bào con. Các lớp virus khác nhau có genome tái bản một cách độc lập và truyền lại cho các tế bào con. Đây là trường hợp đối với các virus họ herpes.

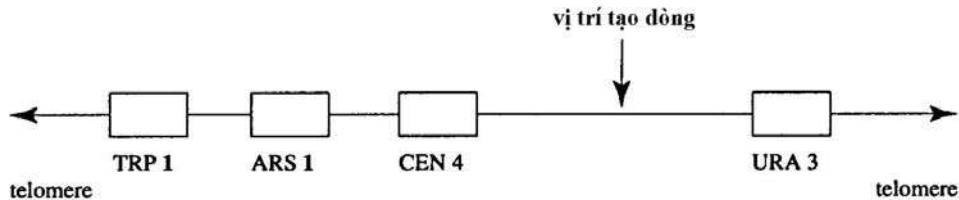
Genome episome phải chứa một số các yếu tố để được bền vững. Genome episome có dạng vòng hoặc dạng thẳng. Khi ở dạng vòng, thành phần nhỏ nhất của chúng là khởi điểm tái bản. Tại khởi điểm tái bản này sự tổng hợp DNA A được bắt đầu như là một hệ thống làm cho nó có thể truyền genome tái bản đến các tế bào con. Genome episome dạng thẳng phải mang telomere ở cả hai đầu. Cấu trúc telomere này có mặt ở các đầu mút của các nhiễm sắc thể bình thường. Chúng thường xuyên bị suy thoái bởi exonuclease và được phục hồi lại nhờ một phức hợp enzyme đặc hiệu. Telomere bảo vệ nhiễm sắc thể khỏi bị suy thoái bởi exonuclease. Khi tế bào già hơn, sự tổng hợp telomere trở nên ít hiệu quả hơn dẫn đến suy thoái nhiễm sắc thể và sự chết của tế bào.

Các loại vector episome khác nhau có thể được thiết kế để tạo động vật chuyên gen. Chúng có kích thước tương đối nhỏ, chỉ mang các yếu tố tái bản và truyền lại cho các tế bào con. Một phương pháp khác bao gồm sự sử dụng các đoạn nhiễm sắc thể mang tất cả các yếu tố tự nhiên để chuyên gen cho thế hệ sau.

Các vector episome được biết rõ và sử dụng thường xuyên nhất là plasmid, cosmid, phage, BAC và YAC. Không có một loại vector nào có thể được sử dụng ở eukaryote bậc cao do các yếu tố của chúng không hoạt động trong các tế bào động vật. Các vector này được sử dụng chủ yếu là để xây dựng DNA A và tạo DNA A tái tổ hợp để nghiên cứu và chuyển vào tế bào động vật.

Các vector vi khuẩn chỉ chứa một khởi điểm tái bản. Số bản sao tạo ra sau khi tái bản DNA A là đủ để cho phép truyền vector có tính thống kê đến các tế bào con.

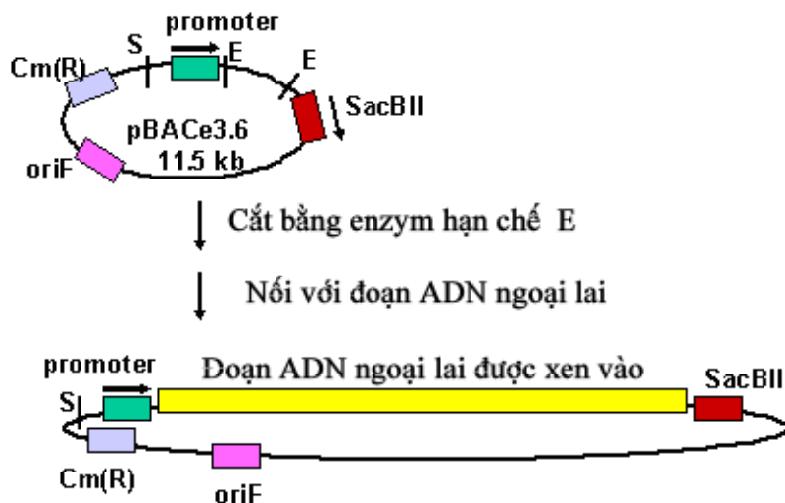
Vector YAC dạng thẳng đã được thiết kế (Hình 1.13). YAC chứa các telomere, một khởi điểm tái bản (ARS 1), một tâm động (CE 4), một gen chọn lọc (Ura 3) và các vị trí tạo dòng. Vector này tương đối ngắn và dễ thao tác. Sở dĩ như vậy là do khởi điểm tái bản và tâm động ngắn. Khởi điểm tái bản của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được tập trung trong một vùng genome ngắn trong khi ở *Saccharomyces pombe* khởi điểm tái bản dài đến trên vài nghìn base. Vector YAC có thể mang các đoạn DNA A dài 1000kb và chúng có thể được thiết kế trong nấm men bằng tái tổ hợp tương đồng. Hạn chế chủ yếu của vector YAC là không ổn định (Giraldo và Montoliu, 2001).



Hình 1.13: Cấu trúc của vector YAC

Vector này chứa một khởi điểm tái bản Dã A (ARS 1), một tâm động (CEA 4) làm cho nó có thể phân chia vector tái bản về các tế bào con, telomere bảo vệ Dã A khỏi bị suy thoái bởi exonuclease, hai gen chọn lọc (TRP 1 và UR 3) và một vị trí tạo dòng mà có thể đưa vào một đoạn có kích thước lên đến 1000kb

Vector BAC đã được thiết kế để tái bản trong *E.coli* và chỉ hiện diện một bản sao trong mỗi tế bào. Chúng có thể mang các đoạn Dã A có kích thước lên đến 250kb. Chúng có thể được xây dựng trong vi khuẩn bằng tái tổ hợp tương đồng. Điều này cho phép cả việc đưa các đoạn Dã A ngoại lai vào trong vector cũng như loại bỏ chúng đi. Vector BAC hiện là công cụ tốt nhất cho việc chuẩn bị các cấu trúc mang các đoạn Dã A có kích thước lớn để dùng cho việc tạo động vật chuyển gen (Giraldo và Montoliu, 2001) (Hình 1.14).



Hình 1.14: Sơ đồ cấu trúc vector BAC

Trong tế bào động vật, vẫn không thể tạo ra các vector ngắn mang các yếu tố tự nhiên đã tìm thấy trong nhiễm sắc thể. Khởi điểm tái bản ở genome động vật là các vùng xác định không tốt. Một số vùng đã được mô tả đặc điểm và được sử dụng để tái bản Dã A trong tế bào nuôi cấy và trong chuột chuyển gen. Ở hư thế đoạn Dã A genome chứa vài nghìn bp là luôn được yêu cầu để khởi đầu một quá trình tái bản Dã A. Một phương pháp khả thi là tạo dòng các đoạn Dã A genome vào vector và chọn lọc các đoạn có khả năng tái bản cao nhất trong tế bào động vật. Thí nghiệm này đã cho thấy rằng tối thiểu một khởi điểm tái bản là có mặt trong một đoạn Dã A động vật có kích thước khoảng 40kb (Kelleher, 1998).

Các khởi điểm tái bản là không thích hợp để cho một vector vòng được truyền một cách có hiệu quả đến các tế bào con và thế hệ động vật con. Một nghiên cứu được tiến hành cách đây vài năm cho thấy rằng vector chứa một hỗn hợp các khởi điểm tái bản động vật trong một plasmid có hiệu quả cao đối với việc tạo chuột chuyển gen. Vector này có thể được truyền từ chuột sang vi khuẩn, từ vi khuẩn sang phôi lợn và từ phôi lợn quay trở lại vi khuẩn (Attal, 1997). Tuy nhiên vector này không ổn định khi xen một gen vào trong nó. Hơn nữa nó không được duy trì trong suốt đời sống của chuột và không được truyền lại cho thế hệ con. Vì vậy vector này chứa một khởi điểm tái bản có hiệu quả đối với sự truyền lại có tính chất thống kê trong quá trình phân chia tế bào nhanh nhưng không có hiệu quả trong quá trình phân chia tế bào chậm. Điều này được giải thích là do vector này không mang bất kỳ yếu tố nào đóng vai trò của tâm động.

Ở nhiễm sắc thể eukaryote chứa các trình tự lặp lại ở phần trung tâm của chúng. Các trình tự lặp lại này bám vào bộ khung tế bào (cytoskeleton) trong suốt quá trình nguyên phân, cho phép các nhiễm sắc thể được phân chia về các tế bào con với phương thức thích hợp. Vùng tâm động đã được thêm vào một vài vector episome. Các đoạn tâm động rất dài tất nhiên được sử dụng và chúng mang tính đặc hiệu loài. Vì vậy không thể sử dụng chúng để thiết kế các vector ngắn.

Một số virus có genome dạng vòng tái bản với tần số cao trong tế bào động vật và vì vậy được truyền lại cho các tế bào con có tính chất thống kê. Đây là trường hợp của virus SV40.

Khởi điểm tái bản của virus SV40 đã được nghiên cứu kỹ. Khởi điểm này có kích thước ngắn nhưng cần có kháng nguyên T mã hoá bởi genome SV40 và các thành phần tế bào Linh trưởng để tái bản. Vector SV40 chuyển vào tế bào tổng hợp kháng nguyên T (tế bào Cos) được sử dụng phổ biến để biểu hiện gen ngoại lai với tần số cao. Vector này không tái bản trong các tế bào không thuộc bộ Linh trưởng và vì vậy không thể sử dụng để tạo động vật chuyển gen.

Virus herpes ở trạng thái tiềm sinh trong các tế bào nhiễm. Mỗi tế bào chứa một hoặc vài bản sao genome virus mà các bản sao này được truyền cho các tế bào con. Trong những trường hợp nhất định và đặc biệt khi cơ thể bị nhiễm suy giảm miễn dịch, genome virus tái bản với tần số cao gây ra trạng thái bệnh lý có liên quan. Đây là trường hợp đối với virus Herpes simplex, cytomegalovirus, virus Epstein-Barr và một số virus khác.

Các virus này có khởi điểm tái bản và một hệ thống tâm động giả (pseudocentromeric system). Hai yếu tố này đã được nghiên cứu một cách chi tiết ở virus Epstein-Barr (EBV). Các vùng có kích thước nhỏ nhất cần thiết cho sự tái bản của genome EBV và sự di truyền của chúng cho các tế bào con là vùng khởi điểm tái bản P (ori P) và gen EB_A 1 (Epstein-Barr nuclear antigen). Vùng khởi điểm tái bản P chứa hai vùng có chức năng riêng biệt. Cả hai đều bám vào protein EB_A 1. Một vùng của khởi điểm tái bản P làm đúng chức năng khởi điểm tái bản. Vùng thứ hai là cần cho sự truyền genome của virus cho các tế bào con.

Các kết quả nghiên cứu đã cho thấy rằng khởi điểm tái bản của EBV chỉ hoạt động ở tế bào Linh trưởng và chó. Khởi điểm tái bản EBV có thể bị mất và được thay thế bằng các đoạn D_A genome người hoặc các động vật có vú khác. Một số các đoạn D_A genome này chứa một khởi điểm tái bản cho phép vector tái bản và truyền lại cho các tế bào con ngay cả ở chuột chuyển gen (Kelleher, 1998). Tuy nhiên vẫn chưa có bằng chứng chứng minh rằng các vector ổn định và đã truyền lại cho thế hệ con.

Trong tất cả các trường hợp, vector EBV phải mang gen EB_A 1 và vùng khởi điểm tái bản P để cho protein EB_A 1 này bám vào. Hệ thống EBV EB_A 1-ori P không mang tính đặc hiệu loài. Các vector chứa phức hợp EB_A 1-ori P bám không đặc hiệu

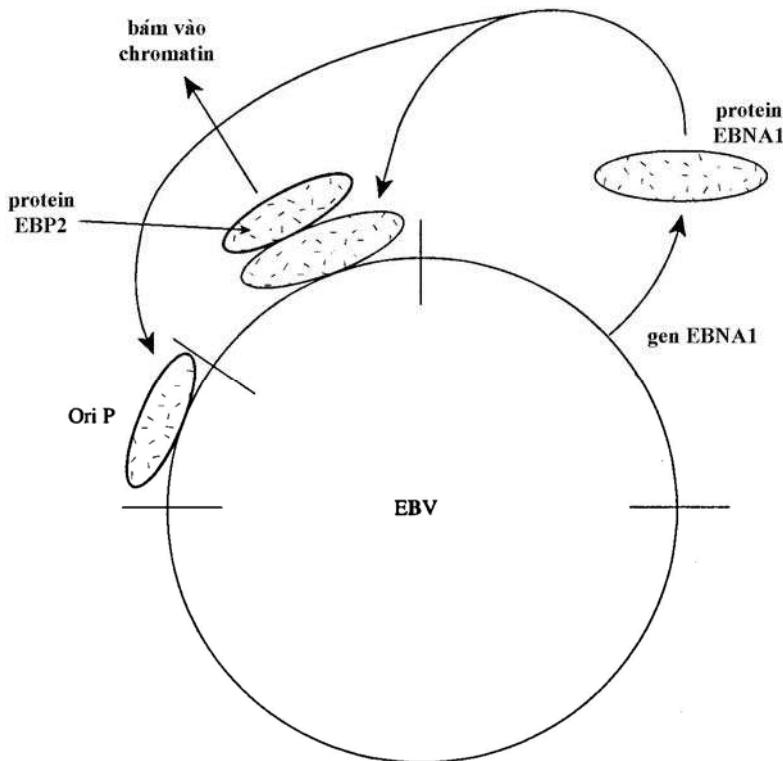
vào chromatin trong các tế bào eukaryote khác nhau. Một nghiên cứu mới đây cho thấy rằng EB_A 1 bám vào ori P và protein EBP 2 nhận ra các thành phần chưa biết được ở chromatin (Hình 1.15). Một vector vòng mang vùng ori P bám vào EB_A 1 và một khởi điểm tái bản nấm men đã được duy trì hoàn toàn hiệu quả ở nấm men biểu hiện cả các gen EB_A 1 và EBP người (Kapoor, Shire và Frappier, 2001). Điều này cho phép đưa ra giả thuyết là vector episome mang một khởi điểm tái bản hoạt động ở tế bào chuột và các gen mã hoá protein EB_A 1 và EBP 2 có thể được duy trì như vector vòng episome trong suốt đời sống của động vật và truyền lại cho thế hệ con. Genome EBV có kích thước 200kb và vector EBV có thể mang đoạn D_A ngoại lai có kích thước trên 100kb.

Vector chứa khởi điểm tái bản SV40 và một trình tự MAR cũng có khả năng duy trì ổn định như các episome trong tế bào nuôi cây (Jenke, 2002).

Các loại vector này hiện đã được nghiên cứu ở các phòng thí nghiệm là các vector con thoi (shuttle) vì chúng mang cả hệ thống tái bản của prokaryote và eukaryote. Chúng có thể được truyền đến vi khuẩn đường ruột (intestine bacteria) và gieo rắc vào trong môi trường. Điều này có thể tránh được một cách dễ dàng bằng cách loại bỏ khởi điểm tái bản của prokaryote.

Khả năng thiết kế các vector độc lập khác bao gồm sự sử dụng các đoạn D_A genome dài chứa các khởi điểm tái bản tự nhiên, một tâm động và các telomere. Các vector này là các nhiễm sắc thể nhân tạo của người (HAC), chỉ có thể có được sau khi xảy ra các đột biến ngẫu nhiên loại bỏ đi một phần lớn nhiễm sắc thể nhưng giữ lại các yếu tố nhỏ nhất để tạo ra một hệ thống tự chủ (Vos, 1998; Voet, 2001). Thao tác đối với vector này không dễ dàng và rất khó để đưa gen ngoại lai vào trong chúng. Hơn nữa, các đoạn genome dài này chứa nhiều gen có thể can thiệp vào sinh lý học động vật hoặc can thiệp vào gen quan tâm khi nó được thêm vào vector.

Ảnh hưởng của các khởi điểm tái bản có thể tạo ra một dòng tế bào lai động vật gặm nhấm/người. Cấu trúc này đã được duy trì trong một thời gian dài trong tế bào nuôi cây, ở chuột chuyển gen và đã truyền lại cho thế hệ sau (Co, 2000).



Hình 1.15: Cấu trúc của vector episome vòng dựa trên genome virus Epstein-Barr (EBV)

Protein EBÅ A 1 được mã hoá bởi genome EBV bám vào một vùng khác của genome EBV. Protein EBÅ A 1 bám vào một protein của tế bào là EBP 2. Protein EBP 2 liên kết với các yếu tố không đặc hiệu của chromatin. Hệ thống giống như tâm động này cho phép truyền vector cho các tế bào con. Khởi điểm tái bản của EBV hoạt động hầu như riêng biệt trong các tế bào Linh trưởng.

Một nghiên cứu cách đây vài năm cho thấy rằng nhiễm sắc thể số 2 của người có thể được chuyển vào genome chuột. ả ó đã tồn tại và truyền lại cho thế hệ sau. ả hiẽm sắc thể số 2 của người đã được chuyển từ nguyên bào sợi người đến tế bào gốc phôi chuột

bằng dung hợp tế bào. Các tế bào gốc phôi mang nhiễm sắc thể người được sử dụng để tạo chuột chuyển gen thể khuyết. Chuột chuyển gen thể khuyết này đã biểu hiện gen globulin miễn dịch (immunoglobulin) nằm trên nhiễm sắc thể số 2. Vì vậy có thể thu được các kháng thể đơn dòng người từ những con chuột này (Tomizuka, 1997).

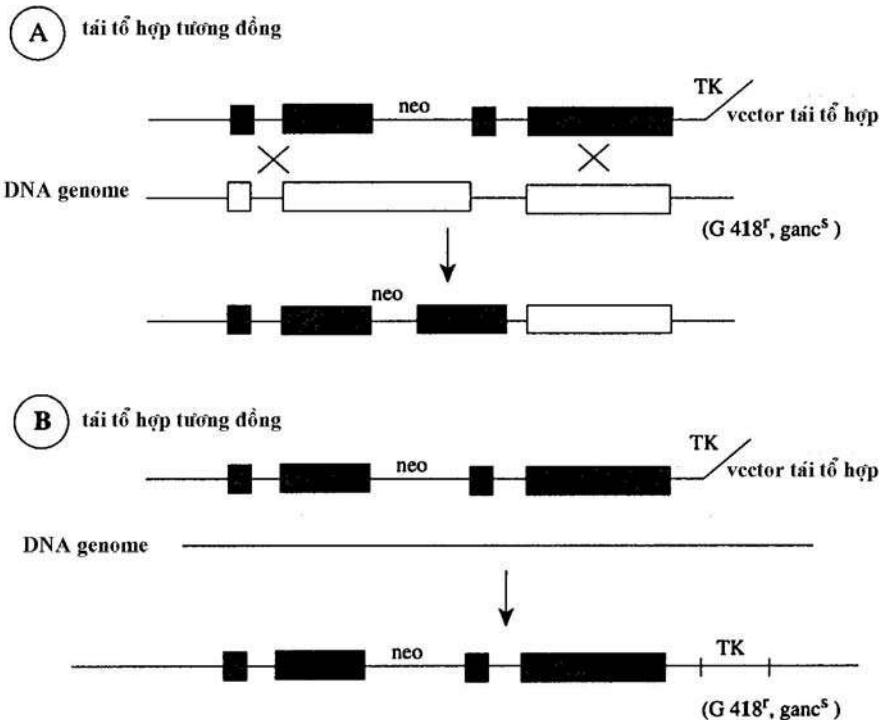
Vector episome sẽ hoàn toàn hữu dụng cho các nhà nghiên cứu, cho việc nghiên cứu gen trong các tế bào bị nhiễm cũng như đối với liệu pháp gen và việc tạo động vật chuyển gen.

1.2. Vector thay thế gen

Một tái tổ hợp tương đồng giữa hai đoạn D_A A có thể xảy ra trong các cơ thể khác nhau nếu chúng mang một trình tự D_A A chung. Ở vi khuẩn kích thước cần thiết của đoạn D_A A này là một vài trăm bp, ở nấm men tối thiểu là 20-50bp và ở tế bào động vật là vài ngàn bp để gây nên tái tổ hợp tương đồng. Cơ sở của cơ chế tái tổ hợp tương đồng được mô tả ở hình 1.16. Ảnh một trình tự tương đồng đơn có mặt trong genome và D_A A ngoại sinh thì sự tái tổ hợp dẫn đến sự hợp nhất đích (targeted integration) của D_A A ngoại lai (Hình 1.17). Ảnh hai trình tự tương đồng khác biệt hiện diện trong D_A A ngoại sinh thì hai tái tổ hợp tương đồng xảy ra một cách độc lập dẫn đến sự thay thế riêng biệt một vùng genome (Hình 1.16). Vì vậy một trình tự ngoại lai có thể được hợp nhất một cách chính xác vào vị trí đã cho của genome. Trình tự ngoại lai này có thể làm ngắt quãng gen đích, làm cho nó trở nên bất hoạt. Protocol này được gọi là *knock-out* gen. Trình tự ngoại lai có thể là một gen hoạt động có thể liên quan hoặc không liên quan với gen đích. Sự hợp nhất này được gọi là *knock-in* gen.

1.3. Vector sắp xếp lại các gen đích

Tái tổ hợp tương đồng trong một genome là sự kiện sinh lý quan trọng xảy ra trong các trường hợp khác nhau. Sự sắp xếp lại genome tạo ra các gen globulin miễn dịch hoạt động chức năng là một ví dụ. Thật là quan trọng để sắp xếp lại genome ở các vị trí mà không thể tiến hành một cách tự nhiên với một phương thức kiểm soát.

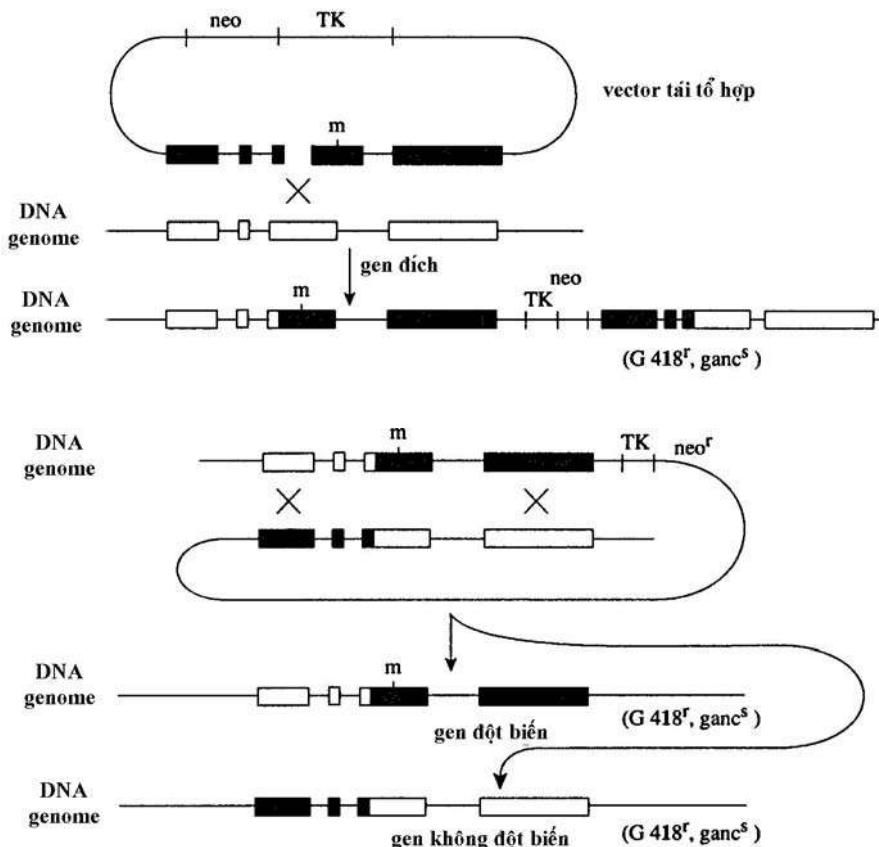


Hình 1.16: Sự chọn lọc dương tính và âm tính kép để tách chiết tế bào mà tái tổ hợp tương đồng xảy ra

- A. Tái tổ hợp tương đồng bao hàm sự hợp nhất của gen neo^r và loại bỏ gen TK. Các tế bào này là kháng với G418 và gancyclovir.
B. Sau sự hợp nhất của vector vào một vị trí ngẫu nhiên, các tế bào kháng với G418 nhưng nhạy cảm với gancyclovir

Hai hệ thống không phát hiện thấy trong giới động vật đã được bổ sung để thực hiện điều này. Một hệ thống có nguồn gốc từ bacteriophage P1. Genome này chứa các trình tự LoxP với kích thước 34 bp, có khả năng tái kết hợp và mang tính đặc hiệu cao chỉ khi có mặt enzyme recombinase của phage Cre. Hệ thống thứ hai là tương tự một cách cơ bản nhưng có nguồn gốc khởi đầu từ nấm men. Trình tự FRT tái kết hợp với hiệu quả cao và mang tính đặc hiệu khi có mặt enzyme recombinase Flp. Hệ thống Cre-LoxP là phổ biến nhất và được sử dụng trong nhiều nghiên cứu khác nhau (Agy, 2000). Các thể đột biến khác nhau của các trình tự LoxP, FRT đang được sử dụng để điều chỉnh hiệu quả và tính đặc hiệu của sự tái tổ

hợp. Hai loại enzyme recombinase cũng tồn tại dưới dạng các thê đột biến khác nhau. Trong thực tế, trình tự LoxP hoặc FRT phải được thêm vào cấu trúc của gen.



Hình 1.17: Sự thay thế gen bằng thê đột biến sử dụng tái tổ hợp tương đồng kép

Ưu điểm chính của các hệ thống LoxP và FRT là sự tái tổ hợp chỉ xảy ra khi có mặt recombinase. Các tế bào hoặc động vật có vùng Dã A tiếp giáp với các trình tự LoxP thì không có recombinase. Các enzyme này có thể được bổ sung vào trong tế bào *in vitro* hoặc *in vivo* ở động vật chuyển gen bằng cách vi tiêm trực tiếp vào tế bào chất hoặc bằng phương pháp chuyển nhiễm (transfection method) đối với protein. Gen recombinase có thể được

đưa vào tế bào bằng vector adenovirus. Các vector này được tiêm vào mô của động vật chuyển gen mang vùng Dã A tiếp giáp với các trình tự LoxP. Hơn nữa, plasmid chứa các gen recombinase cũng có thể được đưa vào phôi giai đoạn một tế bào hoặc vào các tế bào soma. Các plasmid này có ít cơ hội hợp nhất do cấu trúc dạng vòng của chúng. Chúng biến mất nhanh chóng trong quá trình nhân tế bào và sự có mặt của recombinase là nhất thời.

Các recombinase cũng có thể được truyền cho động vật chuyển gen bằng sự chuyển gen. Chuột chuyển gen mang gen recombinase có thể được lai với các dòng chứa vùng Dã A tiếp giáp với trình tự LoxP.

Một cách lý tưởng, các gen recombinase không nên biểu hiện ở nhiều trường hợp trong tất cả các mô hoặc biểu hiện thường xuyên. Để điều này là cần thiết thì recombinase có thể được đặt dưới sự kiểm soát của các promoter hoạt động trong tất cả các loại tế bào. Trái ngược lại, các promoter đặc hiệu đối với từng mô có thể hạn chế sự tái tổ hợp LoxP trong tế bào mà các promoter này hoạt động. Hệ thống biểu hiện này đã kiểm soát bởi tetracycline và các dẫn xuất của tetracycline, cho phép gen recombinase chỉ được biểu hiện trong một loại tế bào và chỉ khi động vật có tetracycline.

Một bước điều hoà khác có thể thêm vào để kiểm soát recombinase Cre. Các gen dung hợp mang trình tự mã hoá recombinase Cre và một phần các thụ quan steroid đã được xây dựng. Protein dung hợp này chỉ hoạt động khi có mặt steroid và steroid đã gây ra sự biến đổi hình thể của protein.

Trình tự LS (nuclear localization signal = tín hiệu định vị nhân) cho phép recombinase tập trung ở nhân và đạt hiệu quả ngay cả khi ở nồng độ thấp. Trường hợp này có thể xảy ra phụ thuộc vào tính đặc hiệu tế bào nhưng các promoter yêu đang được sử dụng để biểu hiện các gen recombinase.

Tất cả các hệ thống tinh vi này nhằm gây ra sự tái tổ hợp có thể càng chính xác để giống hệt như sự biểu hiện các gen tự nhiên hoặc để tạo ra các điều kiện thí nghiệm thích hợp nhất.

Điều quan trọng là tránh sự biểu hiện cao của gen recombinase. Các enzym này bộc lộ một vài đặc tính đối với tế bào ở nồng độ cao, còn hầu như là thích hợp nhờ khả năng nhận biết các vị trí giống như LoxP hoặc FRT trong genome động vật.

2. Các vector sử dụng để chuyển gen ở thực vật

2.1. Các vector biến nạp vào tế bào thực vật sử dụng *Agrobacterium*

2.1.1. Sự gây ra các khối u do *Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens và *A. rhizogenes* là hai loài vi khuẩn sống trong đất gây ra bệnh khối u hình chóp (crown gall) (Hình 1.18 và hình 1.19) và bệnh lông rẽ (hairy root) ở các vị trí tổn thương của thực vật hai lá mầm.

Chỉ rất ít thực vật một lá mầm thuộc họ *Liliaceae* và *Amaryllidaceae* là dễ bị bệnh khối u hình chóp. Lý do giới hạn vật chủ này hiện nay còn chưa được biết. Một lần khởi đầu, sự sinh trưởng khối u có thể tiếp diễn khi vắng mặt vi khuẩn và mô khối u có thể được sinh trưởng vô trùng bằng nuôi cây mô trong các môi trường thiếu sự bổ sung auxin và cytokinin ngoại sinh mà bình thường là cần thiết để xúc tiến sự sinh trưởng của mô thực vật *in vitro*. Mô khối u tổng hợp amino acid mới và các dẫn xuất của đường được biết chung là opine. Loại opine tổng hợp trong khối u (ví dụ như nopaline, octopine, agrocinopine, mannopine và agropine) phụ thuộc vào dòng *Agrobacterium* khởi đầu sự hình thành khối u. Octopine và nopaline là hai loại opine có nguồn gốc từ arginine và dễ dàng phát hiện nhất trong mô khối u hình chóp. Do đó nhiều dòng *Agrobacterium tumefaciens* phổ biến được thiết kế theo kiểu octopine hoặc nopaline. Agropine, một dẫn xuất của đường được tìm thấy phổ biến trong các khối u lông rẽ gây ra bởi *A. rhizogenes*. *Agrobacterium* chịu trách nhiệm đối với sự hình thành khối u dị hóa một cách có chọn lọc opine mà nó tổng hợp được và sử dụng opine như là một nguồn cacbon và nitơ.

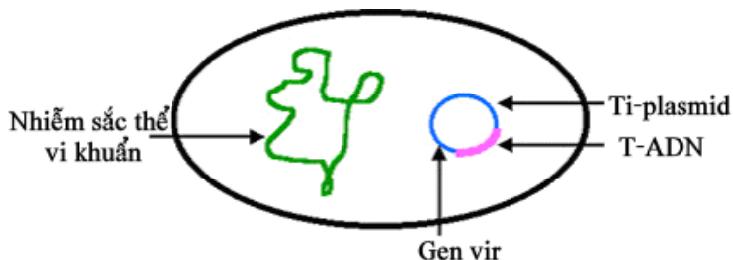
Cả việc gây ra khối u và tổng hợp opine liên quan với sự có mặt của một loại plasmid có kích thước lớn là Ti-plasmid (Tumour inducing =Ti= gây ra khối u) trong tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens* và Ri-plasmid (Root inducing = Ri = gây ra lông rẽ) ở *A. rhizogenes*.



Hình 1.18: Bệnh khối u hình chóp ở cây mâm xôi (*Rubus*) do *A.tumefaciens* gây ra



Hình 1.19: Các khối u hình chóp ở cành táo



Hình 1.20: Sơ đồ cấu trúc tế bào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

2.1.2. Ti-plasmid của *Agrobacterium tumefaciens*

Ti-plasmid (Hình 1.21A) được tìm thấy trong tất cả các dòng *A.tumefaciens* gây độc, có kích thước khoảng 200-250 kb. Chúng được duy trì ổn định trong *Agrobacterium* ở nhiệt độ dưới 30°C. Bằng phương pháp lai Dâ A-Dâ A và lập bản đồ chuỗi kép dị hợp (heteroduplex mapping), người ta đã xác định được Ti-plasmid có 4 vùng tương đồng. Kết quả phân tích di truyền cho thấy vùng T-Dâ A (transferred Dâ A) và vùng gây độc (virulence) liên quan đến sự hình thành khối u trong khi hai vùng khác liên quan đến sự tiếp hợp và sự tái bản của plasmid trong *Agrobacterium*.

Trong khi hình thành khối u, T-Dâ A được chuyển vào tế bào thực vật và hợp nhất với genome nhân. T-Dâ A ổn định trong

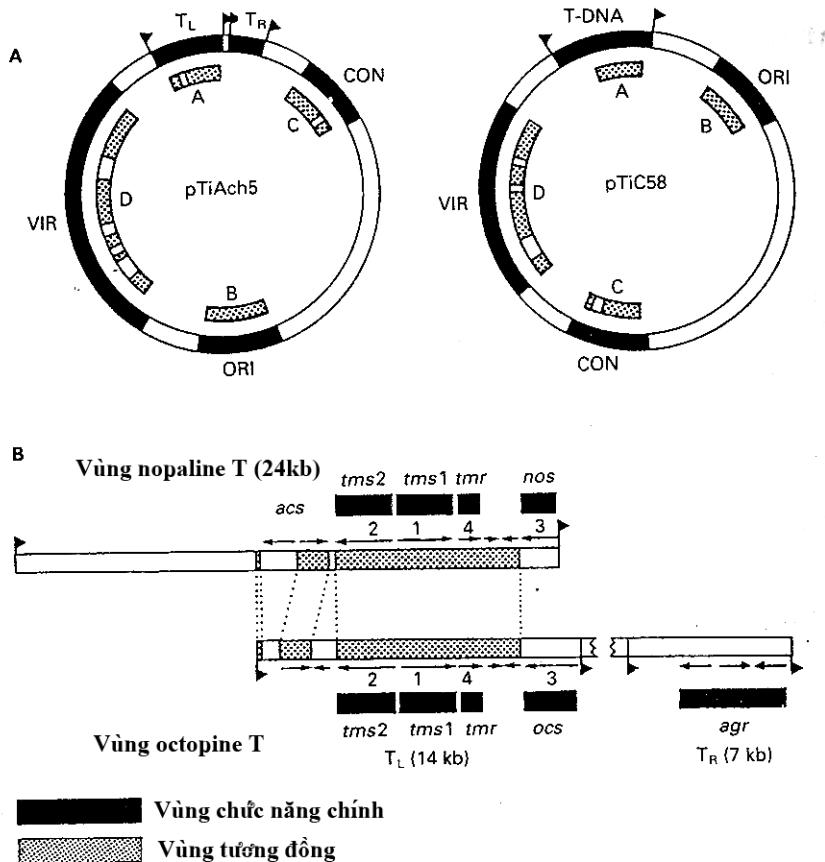
genome nhân. Lai Ti-plasmid với Dâ A của khói u đã cho thấy T-Dâ A trong tế bào thực vật là tương ứng song song với T-Dâ A trong Ti-plasmid của *Agrobacterium*. Kết quả này chứng tỏ không có sự sắp xếp lại vị trí của T-Dâ A trong lúc khói u được tạo thành. Một hoặc nhiều bản sao của T-Dâ A có thể có mặt ở các đoạn lặp nối tiếp. Chúng cũng có thể tách ra và liên kết với các vùng khác nhau của Dâ A thực vật. Vị trí hợp nhất của T-Dâ A vào Dâ A thực vật là hoàn toàn ngẫu nhiên. Các vùng tương đồng với T-Dâ A đã được tìm thấy ở các Ti-plasmid khác nhau (Hình 1.21B). Trong các dòng *A.tumefaciens* kiểu nopaline được sử dụng phổ biến. Vùng T-Dâ A có kích thước khoảng 24 kb. Ở một số khói u hình chóp kiểu octopine, hai đoạn không kề nhau đã được tìm thấy là T_L và T_R . T_L có kích thước 14 kb, có mặt trong tất cả các dòng tế bào đã biến nạp và có chức năng tương đương với T-Dâ A ở các dòng tế bào nopaline. T_R có kích thước 7 kb, được hình thành từ phía bên phải của T_L -Dâ A trong Ti-plasmid, không phát hiện thấy trong tất cả các dòng khói u nhưng khi số bản sao của nó khác với T_L người ta giả thiết là đã xảy ra một quá trình chuyển đổi lặp.

T-Dâ A được phiên mã trong các tế bào khói u (Hình 1.23B), tạo ra nhiều mRâ A polyadenyl. Các loại sản phẩm phiên mã của T-Dâ A tích lũy lại là tương đối thấp so với các mRâ A của thực vật khác. Giải trình tự T-Dâ A kiểu nopaline đã cho thấy có 13 khung đọc mở lớn (open-reading frame) trong khi ở T_L -Dâ A và T_R -Dâ A kiểu octopine tương ứng là 8 và 6. Các sản phẩm phiên mã phía cánh phải của T-Dâ A kiểu nopaline có chức năng tương đương với các sản phẩm phiên mã phía cánh phải của T_L -Dâ A (Hình 1.21B). Toàn bộ sự tổ chức của các gen trên T-Dâ A và các vùng lân cận là tương tự với các gen của genome eukaryote mặc dù chúng không chứa intron. So sánh các trình tự, sự phát sinh đột biến mất đoạn và gen nhảy cũng như sự tăng sinh của các sản phẩm gen riêng lẻ ở *E.coli* đã được sử dụng để phát hiện ra chức năng một số sản phẩm gen được mã hóa bởi T-Dâ A. Một gen ở trong vùng T_L octopine mã hóa enzyme octopine synthase. Ở Ti-plasmid nopaline, các gen opine synthase bao gồm nopaline synthase (*nos*) và agrocinopine synthase (*acs*). Trong Ti-plasmid octopine, vùng T_R mã hóa hai protein chịu trách nhiệm đối với sự tổng hợp manopine và một sản phẩm của gen xúc tác cho sự biến đổi ngược manopine thành agropine. Locus *tmr*

mã hóa một enzyme liên quan đến hệ thống cytokinin và sự đột biến ở đây dẫn đến sự tăng sinh rễ từ các khối u hình chóp đã gây ra ở một số loài (các thể đột biến rẽ). Các locus *tms 1* và *tms 2* liên quan đến sự tổng hợp không điều hòa của auxin và sự đột biến một trong hai locus gây nên sự tăng sinh chồi từ các khối u hình chóp ở nhiều loại thực vật (các thể đột biến chồi). Vì vậy, T-DNA A mang các gen (*tms 1*, *tms 2* và *tmr*) mà sản phẩm của chúng không chịu sự điều hòa bình thường của các con đường chuyển hóa thực vật liên quan đến sự tổng hợp phytohormone và điều này gây ra kiểu hình ung thư. Do đó các gen *tms 1*, *tms 2* và *tmr* được xem là các gen ung thư. Tuy nhiên cần lưu ý rằng các gen được mã hóa bởi T-DNA A không đòi hỏi phải chuyển T-DNA A vào tế bào thực vật và cũng không duy trì sự ổn định của nó trong genome thực vật.

2.1.3. Ri-plasmid của *Agrobacterium rhizogenes*

Sự khởi đầu của bệnh lông tơ do *A.rhizogenes* tương tự như sự biến nạp nhò *A.tumefaciens*. Dưới sự kiểm soát của vùng gây độc, hai vùng phân tán của Ri-plasmid được chuyển vào genome thực vật (Huffman, 1984; De Paolis, 1985). Các vùng này có tên là T_L (T-left T-DNA A) và T_R (T-right T-DNA A). T_R T-DNA A chứa các gen sản xuất opine (mannopine hoặc agropine) và các dòng được định rõ đặc điểm nhờ các gen opine đặc trưng của chúng (De Paolis, 1985). Mặt khác T_R T-DNA A còn chứa hai gen mã hóa cho sự tổng hợp auxin. Các gen này tương đồng rất cao với các gen auxin của *A.tumefaciens* và cho thấy có thể bổ sung thêm các dòng mang các gen auxin đột biến của chúng (Offringa, 1986). T_L T-DNA A không tương đồng với T-DNA A của *A.tumefaciens* (Huffman, 1984). Toàn bộ T_L T-DNA A của đã được giải trình tự và nó chứa tối thiểu 11 khung đọc mở, tương tự với các khung đọc mở đã được tìm thấy ở genome của eukaryote. Chúng có promoter và các yếu tố polyadenine hóa cần thiết để thực hiện chức năng khi chuyển vào trong genome thực vật (Simpson, 1986). Các gen này không tương đồng với bất kỳ gen nào



Hình 1.21: Cấu trúc và sự biểu hiện của Ti-plasmid kiểu octopine và nopaline

A. Bản đồ của Ti-plasmid kiểu octopine (pTiAch5) và kiểu nopaline (pTiC58) cho thấy vị trí tương đối và kích thước của các vùng chức năng chính.

Các vị trí tô đậm chí các vùng tương đồng lớn của 2 plasmid.

//: Các đoạn lặp trực tiếp 25 bp; CO_A: vùng mã hóa chức năng tiếp hợp ORI: vùng mã hóa chức năng tái bản và khởi điểm tái bản

B. Bản đồ của vùng T kiểu nopaline và octopine cho thấy các vùng chức năng chính, các vùng tương đồng và các sản phẩm phiên mã.

Các sản phẩm phiên mã đã được biết là: 3(nos): nopaline synthase; 3(ocs): octonopaline synthase; acs: agrocinopine synthase; 1(tms 1): tryptophan mono-oxygenase; 2(tms 2): indole-3-acetamide hydrolase; 4(tmr): DMA transferase; agr: 3 sản phẩm phiên mã cần cho sự tổng hợp agropine.

đã biết và cũng không có sự tương đồng có ý nghĩa nào đối với T-DNA A (kiểu octopine) của *A.tumefaciens*. Trong T-DNA A là không cần thiết đối với sự duy trì kiểu hình lông to. Tuy nhiên ở nhiều loài, các dòng *Agrobacterium* có cả T_L và T_R T-DNA A là độc nhiều hơn so với các dòng chỉ mang một T-DNA A (Vilaine và Case-Delbart, 1987).

2.2. Cơ chế chuyển T-DNA A

Các vùng T-DNA A của cả *A.tumefaciens* và *A.rhizogenes* đều nằm ở bên cạnh các đoạn lặp trực tiếp 25 bp (Hình 1.11) và các điểm kết thúc của T-DNA A đã hợp nhất trong genome thực vật nằm sát với các trình tự này. Trình tự liên ứng của biên T-DNA A là GGCAGGATATT^{C/GA/G} G^{T/G}TCTAA^{A/TT/C}. Hầu hết các nghiên cứu cơ chế chuyển T-DNA A từ *Agrobacterium* vào tế bào thực vật đã được tiến hành ở *A.tumefaciens*. Việc loại bỏ bờ phải của Ti-plasmid kiểu nopaline đã làm mất sự hình thành khối u, nhưng khi đoạn oligonucleotid tương đồng với bờ phải được tạo dòng với sự định hướng chính xác với Ti-plasmid thiếu bờ phải thì sự hình thành khối u lại được phục hồi (Wang, 1984), cho thấy rằng các trình tự lặp 25 bp phân cực và tác động đều (cis-acting).

Sự tiếp xúc của *Agrobacterium* với các hợp chất giải phóng từ mô thực vật bị tổn thương đã làm cho vùng vir của Ti-plasmid phiên mã (Hình 1.22). Trong quá trình này một chất có hoạt tính hóa học cao và đặc trưng đã được nhận biết là acetosyringone. Gen vir A và gen vir C được biểu hiện ở vi khuẩn sinh trưởng sinh dưỡng mặc dù gen vir C chỉ được phiên mã ở mức độ thấp. Khi *Agrobacterium* gặp dịch rỉ của các tế bào thực vật bị tổn thương, hoặc acetosyringone tinh khiết, sản phẩm của gen vir A (có thể liên kết với màng) sẽ nhận diện và tương tác với acetosyringone và truyền tín hiệu ngoại bào vào trong tế bào này làm hoạt hóa sản phẩm của gen vir C. Sau đó protein vir C đã biến đổi hoạt hóa làm cho các gen vir B, C, D và E không hoạt động và làm tăng cường sự phiên mã của gen vir C.

Sự cảm ứng gen vir xảy ra nhờ sự xuất hiện các điểm đứt sợi đơn trong các trình tự biên 25 bp nằm ở mép của T-DNA A (Stachel và Zambryski, 1986; Albright, 1987) và sự xuất hiện phân tử sợi đơn mạch thẳng tương ứng với T-DNA A (Hình 1.22). Các sản phẩm của operon vir D có hoạt tính endonuclease (Yanofsky, 1986). Bằng một

cơ chế tương tự sự tiếp hợp của vi khuẩn, T-DNA A được chuyển sang tế bào thực vật và xen một cách ổn định vào DNA A nhân (Stachel và Zambryski, 1986). Sự kiện này có thể liên quan đến protein được mã hóa bởi operon vir E (Winans, 1987). Mô hình mô tả các sự kiện xảy ra ở mức phân tử trong sự tương tác giữa tế bào thực vật và *Agrobacterium* để hình thành khối u hình chóp được trình bày ở hình 1.22.

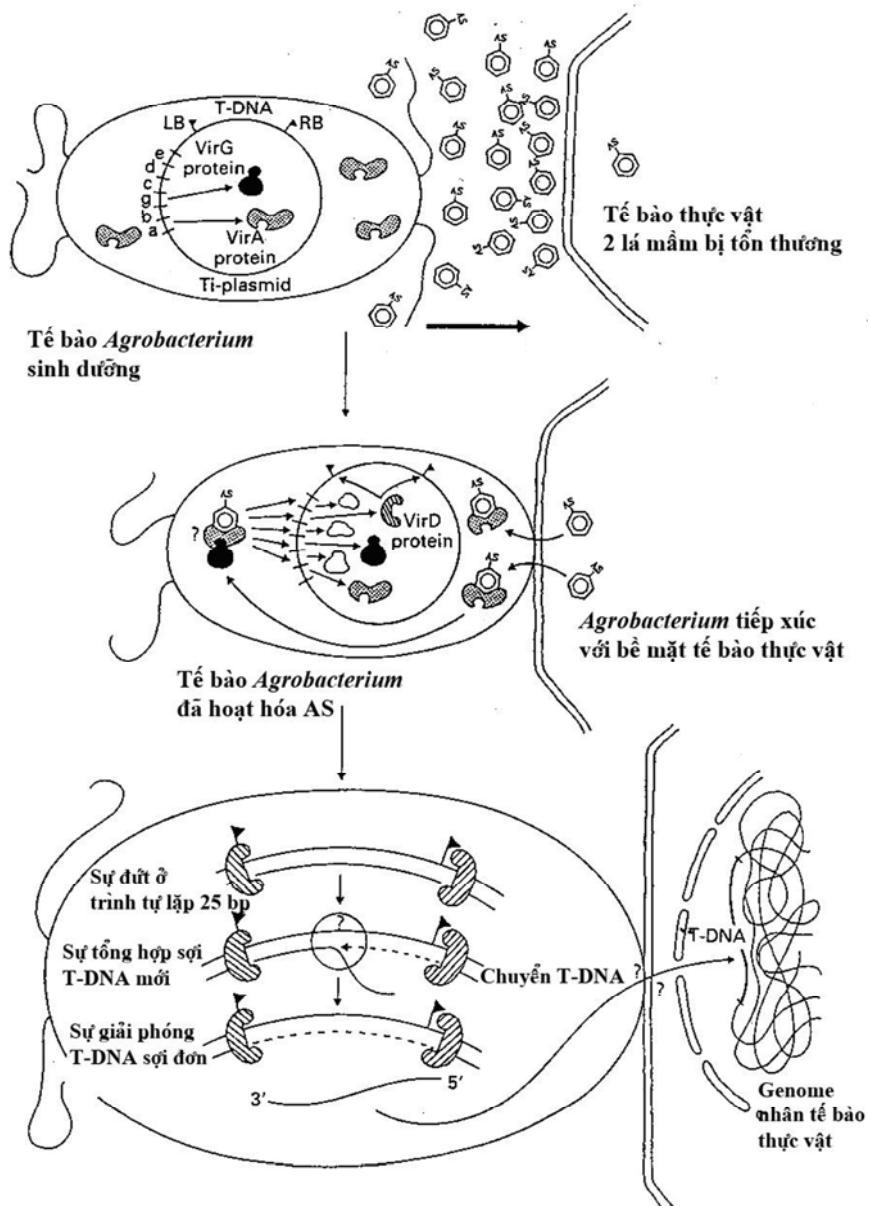
2.3. Plasmid *Agrobacterium* là vector biến nạp

Khả năng chuyển một cách tự nhiên các trình tự DNA A xác định vào genome thực vật của *Agrobacterium* đã được sử dụng vào việc phát triển các vector biến nạp thực vật. Các vector này lợi dụng một số đặc tính bẩm sinh của *Agrobacterium* là quá trình biến nạp trung gian (mediated transformation process). Vào đầu thập niên 1980, một số nhóm nghiên cứu Ti-plasmid đã loại bỏ tất cả các gen *onc* của T-DNA A. Khám phá quan trọng thứ nhất là các gen *onc* này không cần thiết đối với việc chuyển T-DNA A vào tế bào thực vật và không hợp nhất vào DNA A nhân. Vì vậy các gen này có thể được thay thế. Ở đó không chỉ cho phép xen DNA A ngoại lai vào mà còn cho phép loại bỏ các chức năng của gen *onc*. Tuy nhiên cần lưu ý rằng, *nos* hoặc *ocs* là các gen marker hữu ích đối với sự biến nạp bởi vì hoạt tính enzyme của các sản phẩm gen của chúng có thể được phát hiện bằng một xét nghiệm đơn giản. Cho đến nay, giới hạn kích thước của đoạn DNA A xen vào chưa được công bố. Sự kiện quan trọng thứ ba là sự khám phá các sản phẩm của gen vir còn hoạt động chức năng trong trans. Cuối cùng, T-DNA A không gây ung thư có mặt trong toàn bộ thực vật tái sinh được truyền lại cho thế hệ sau theo kiểu di truyền Mendel.

2.4. Các thành phần cơ bản của vector Ti-plasmid không gây ung thư

Đặc điểm của chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium* là bất kỳ DNA A nào đã tạo dòng đều có thể được chuyển vào genome của tế bào thực vật hai lá mầm. DNA A ngoại lai phải được nằm ở mép các trình tự biến của T-DNA A và duy trì ổn định trong dòng *Agrobacterium* mang nhóm bổ sung đầy đủ của các gen vir dạng cis hoặc trans (định vị trên plasmid hỗ trợ gây độc phân tán). Các gen trên nhiễm sắc thể của *Agrobacterium* kết hợp với vùng gây độc đã

được mô tả và có liên quan với việc vi khuẩn nhện ra một thành phần của bề mặt tế bào thực vật, rồi gắn vào sau đó.



Hình 1.12: Sự tương tác giữa *Agrobacterium* với tế bào thực vật và cơ chế chuyển *T-DNA*

Để nhận ra các tế bào đã được biến nạp, các gen trội kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn đã được xen vào trong các trình tự lặp 25 bp dưới sự kiểm soát của T-DNA A promoter và các tín hiệu polyadenyl hóa. Các gen kháng thuốc kháng sinh dạng khám như thế biểu hiện một cách có hiệu quả trong tế bào thực vật ở bất kỳ môi trường di truyền nào. Việc liên kết một cách chặt chẽ các gen marker với DNA ngoại lai có 2 lợi ích: thứ nhất là để chọn lọc trực tiếp các mô thực vật đã được biến nạp DNA ngoại lai vào một cách chắc chắn; thứ hai là đảm bảo DNA ngoại lai trong các dòng biến nạp đặc trưng đã chọn lọc không xen vào vùng genome không được phiên mã.

2.5. Các vector biến nạp thực vật không gây ung thư dựa trên Ti-plasmid

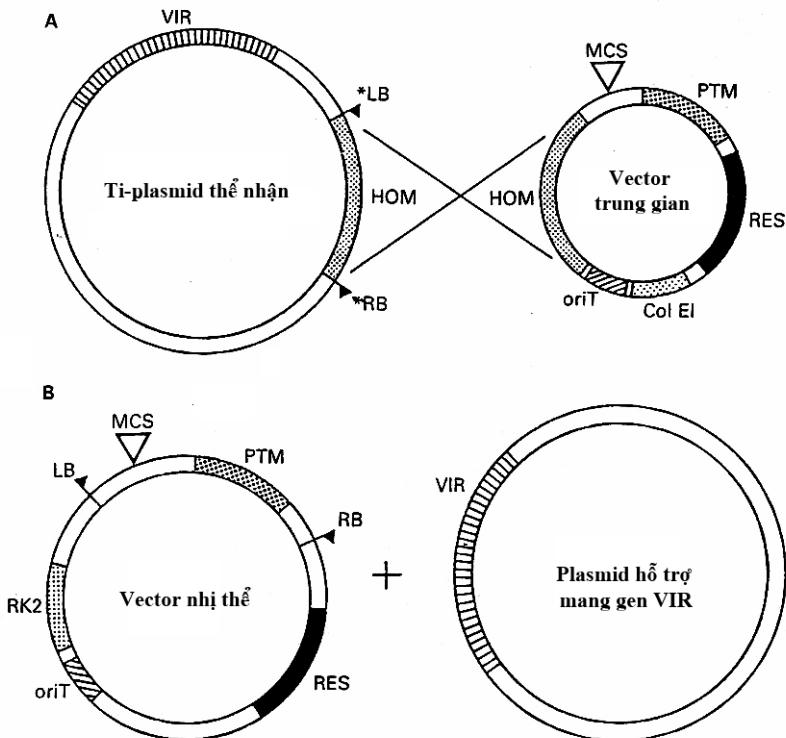
Cả *A.tumefaciens* và *A.rhizogenes* đều được sử dụng để chuyển DNA ngoại lai vào tế bào thực vật. Ảnh hưởng vector biến nạp dựa trên Ti-plasmid đã được phát triển (Bảng 1.1 và bảng 1.2). Các vector này không chứa bất kỳ trình tự ung thư nào và vì vậy tế bào thực vật có thể sinh trưởng bình thường sau khi chuyển DNA vào nhân của nó. Các vector không gây ung thư hiện đang sử dụng có thể được chia làm hai loại là cis và trans, dựa vào việc có hay không các vùng T-DNA nằm ở mép các trình tự lặp trực tiếp 25 bp trên cùng đơn vị tái bản (replicon) như các gen vir hoặc trên một plasmid phân tán (Hình 1.13). Trước đây, loại vector thường được đề cập đến là vector liên hợp (co-intergrative vector), tuy nhiên gần đây vector nhị thể (binary vector) là phổ biến hơn.

2.5.1. Cis vector

Đây là các vector có nguồn gốc từ Ti-plasmid kiểu đại mà gen *onc* trên T-DNA A đã được loại bỏ và trong một số trường hợp được thay thế bằng một đoạn DNA đặc hiệu có vùng tương đồng với một vector tạo dòng nhỏ mà chỉ có thể tái bản ở *E.coli*. Chiến lược vector này phụ thuộc vào sự liên hợp trong *A.tumefaciens* giữa các vùng tương đồng trên Ti-plasmid đã sửa đổi (hỗ trợ mang gen vir) và một vector tạo dòng nhỏ ở *E.coli* (vector trung gian) mang gen marker

chọn lọc sẽ hoạt động chức năng trong các tế bào thực vật và các trình tự duy nhất cho việc xen Dã A ngoại lai vào.

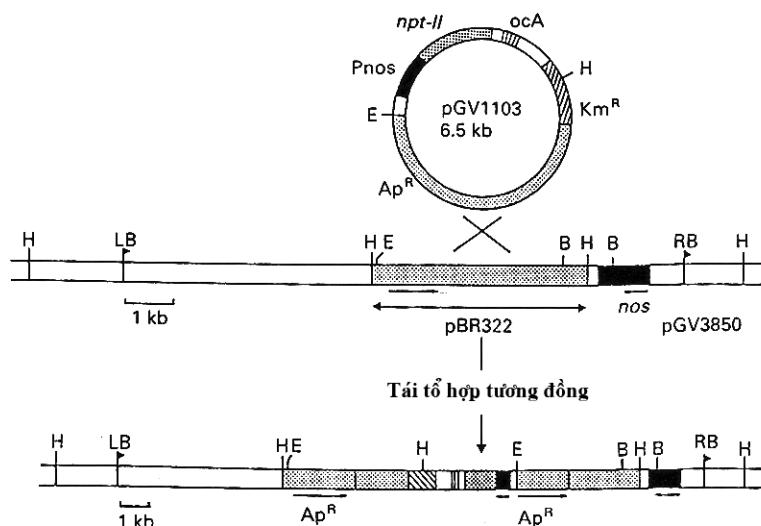
Vector trung gian mang trình tự Dã A ngoại lai thường được đưa vào *A.tumefaciens* bằng sự tiếp hợp và sử dụng sự chọn lọc thích hợp sẽ thu được thể nhận tiếp hợp với Dã A ngoại lai đã ổn định trong T-Dã A là kết quả của tái tổ hợp tương đồng (Hình 1.23A).



Hình 1.23: Sơ đồ hệ thống vector liên hợp (A) và vector nhị thể (B)

VIR: vùng gây độc; HOM: các vùng tương đồng trong đó sự tái bản có thể xảy ra đôi với sự liên hợp; LB: biên trái; RB: biên phải; MCS (multicloning site): các trình tự tạo dòng; PTM: marker biến nạp thực vật; RES: marker kháng thuốc kháng sinh để chọn lọc đối với sự có mặt của các trình tự vector trong vi khuẩn chủ; oriT: khởi điểm chuyên; ColE1: khởi điểm tái bản từ plasmid ColE1; RK2: vùng có phô khởi điểm tái bản rộng, có nguồn gốc từ pKR2

Ở một số vector như pGV3850 (Hình 1.24), cả hai biên của T-Då A là ở trên Ti-plasmid đã sửa đổi. Trong các vector như pGV2260 (Debleare, 1982), các trình tự lặp 25 bp là ở trên vector trung gian, trong khi ở vector pTiBS3-SE (Fraley, 1985), biên phải là ở trên vector trung gian và biên trái ở trên gen vir của plasmid. Bất kỳ ở đâu trong các vị trí khởi đầu của các trình tự lặp 25 bp, kết quả thực sau khi liên hợp là sự xen các trình tự Då A ngoại lai ở biên T-Då A lặp lại trên Ti-plasmid đã sửa đổi. Vì vậy ở các dòng *A.tumefaciens* mang cấu trúc này, T-Då A được chuyển vào genome thực vật trong suốt sự biến nạp là kết quả hoạt động của vùng vir dạng cis.



Hình 1.24 : Cấu trúc và sự sử dụng vector liên hợp pGV3850

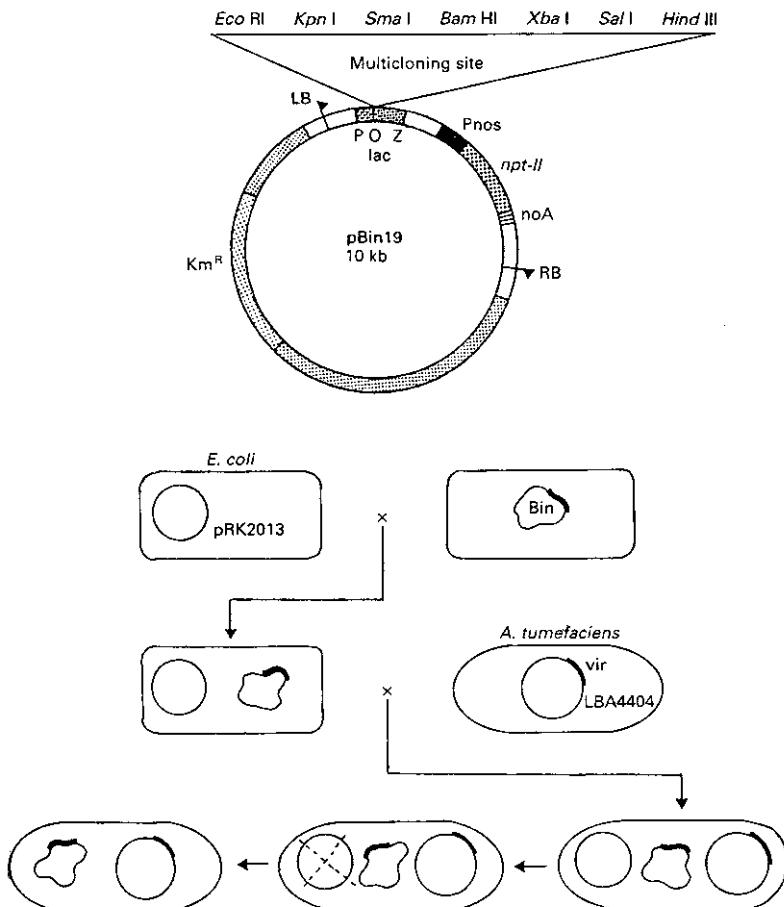
Bản đồ cho thấy cấu trúc của vector biến nạp thực vật pGV3850 và vector trung gian pGV1103 và kết quả của việc hợp nhất pGV1103 vào pGV3850. LB: biên trái; RB: biên phải; Pnos: promoter nopaline synthetase; npt-II: trình tự mã hóa neomycin phosphotransferase-II từ Tn5; ocA: trình tự polyadenyl hóa octopine synthetase; E: EcoRI; H: HindIII; B: BamHI; nos: nopaline synthetase; Ap^R: gen kháng ampicillin; Km^R: gen kháng kanamycin

Một ví dụ chi tiết về vector cis là pGV3850 (Zambryski, 1983). Vector này đã được loại bỏ các gen *onc* của Ti-plasmid kiêu nopaline (C58) và thay bằng pBR322 (Hình 1.25). Bất kỳ trình tự Dã A ngoại lai nào đã được tạo dòng trong pBR322 đều có thể đưa vào pGV3850 bằng quá trình chuyển vào *Agrobacterium* theo cách tiếp hợp tái tổ hợp bao gồm hai bước. Trước hết pBR322 mang gen cần chuyển và một marker kháng thuốc kháng sinh cho phép chọn lọc *Agrobacterium* (kanamycin hoặc streptomycin/spectinomycin) được đưa vào dòng *E.coli* chứa hai plasmid hỗ trợ pGJ28 và pRGdrd11. Các plasmid này cung cấp ColE1 có chức năng hỗ trợ, cho phép chuyển cả 3 plasmid vào *Agrobacterium* qua tiếp hợp. Tuy nhiên pBR322 không thể tái bản trong *Agrobacterium* và vì vậy nó sẽ không được bảo tồn, nhưng sự tái tổ hợp có thể xảy ra giữa pBR322 và pGV3850 làm cho gen quan tâm được chuyển vào Ti-plasmid. Thể nhận tiếp hợp có thể được chọn lọc nhờ tính kháng do plasmid mã hóa và tính kháng rifampicin do nhiễm sắc thể của *Agrobacterium* mã hóa.

2.5.2. Vector nhị thể

Vector trans hoặc vector nhị thể được dựa trên các plasmid có thể tái bản ở cả *E.coli* và *Agrobacterium* và các plasmid này có chứa các trình tự biên của T-Dã A (Hình 1.23B). Các vector này có thể được thiết kế sao cho các trình tự biên cạnh MCS cho phép xen Dã A ngoại lai vào và các marker cho phép chọn lọc trực tiếp các tế bào thực vật đã được biến nạp. Plasmid có thể được thao tác ở trong *E.coli* và được chuyển vào qua sự tiếp hợp với các dòng *Agrobacterium* mang plasmid có chứa vùng vir nhưng thiếu T-Dã A và các trình tự lặp 25 bp. Các plasmid như thế thường là các thể đột biến mất đoạn đơn giản của Ti-plasmid octopine kiêu dại hoặc kiêu nopaline (Bảng 1.2). Việc chuyển Dã A ngoại lai trên vector tạo dòng vào tế bào thực vật có thể được thực hiện do hoạt động chức năng của vùng vir.

pBin19 là một vector nhị thể phổ biến dựa trên đơn vị tái bản (replicon) vật chủ mỏ rộng của pRK252 (Hình 1.25A). Vì vậy nó có thể tái bản trong cả *E.coli* và *Agrobacterium*, cho phép xen Dã A ngoại lai vào vector và sàng lọc trong *E.coli* trước khi chuyển vào *Agrobacterium*. Vector này chứa marker kháng kanamicin (Km^r)



Hình 1.25 : Cấu trúc và sự sử dụng vector nhị thể pBin19

A. Bản đồ của vector nhị thể pBin19

LB: biên trái; RB: biên phải; lac: vùng bô sung α của operon lac; Pnos: promoter gen nopaline synthetase; npt-II: trình tự mã hóa neomycin phosphotransferase-II từ Tn5; nosA: trình tự polyadenyl hóa gen nopaline synthase.

B. Sự xâm nhập của pBin19 vào *A.tumefaciens* LBA4404 sử dụng plasmid hỗ trợ pRK2013 và sau đó loại bỏ plasmid hỗ trợ trong *Agrobacterium*.

giúp chọn lọc trực tiếp ở trong vi khuẩn cũng như các trình tự biên T-DNA ở cạnh một marker chọn lọc trội với mục đích sử dụng trong

các tế bào thực vật (một gen kháng kanamicin nằm cạnh promoter nos và trình tự poly(A) thêm vào) và một MCS ở trong vùng bối sung α của β-galactosidase. Sự sàng lọc các thể tái tổ hợp có thể được tiến hành ở Lac⁻ *E.coli* nhờ sự bối trợ α với sự có mặt của IPTG và X-GAL (Groneborn và Messing, 1978). Vector này có thể được đưa vào *Agrobacterium* bằng sự tiếp hợp sử dụng các chức năng hỗ trợ của pKR2013. *Agrobacterium* chủ LBA4404 chứa Ti-plasmid (pLBA4404) đã loại bỏ T-DNA A nhưng vùng vir vẫn không đổi. Thể nhận tiếp hợp có thể được chọn lọc nhờ tính kháng kanamicin và rifampicin.

Ví dụ về hệ thống vector nhị thể được trình bày ở bảng 1.2. Các vector nhị thể này khác nhau về kích thước, sự tái bản ổn định trong *Agrobacterium*, các vị trí tạo dòng, sự bối trợ α để có thể sàng lọc plasmid tái tổ hợp trên các đĩa X-GAL, các gen marker để chọn lọc các thực vật biến nạp và các gen marker để chọn lọc các thể nhận tiếp hợp, nhưng phần lớn được biết là thích hợp với một số plasmid hỗ trợ mang gen vir của *A.tumefaciens* cũng như với nhiều Ri-plasmid.

2.6. Vector biến nạp thực vật sử dụng *A.rhizogenes*

Các vector này được sử dụng lần đầu tiên khi biến nạp vào các loại thực vật mà sự tái sinh toàn bộ cơ thể từ các tế bào đơn lẻ là khó khăn. Ở một số loài, sự tái sinh cơ thể có thể xảy ra từ sự nuôi cấy rễ gây ra bởi *A.rhizogenes* thông qua sự phát triển phôi soma hoặc sự phát sinh cơ quan. Cơ chế kiểu hình lông rễ bị ức chế làm phát sinh hình thái chồi hiện nay chưa rõ. Thực vật tái sinh từ lông rễ thường bị biến đổi hình thái: lá bị gấp nếp, hệ thống rễ ăn nghiêng, sinh trưởng cằn cỗi và khả năng sinh sản kém.

2.6.1. Vector liên hợp

Đây là vector trung gian được thiết kế cho phép thao tác ở *E.coli* và chứa vùng T-DNA của Ri-plasmid. Sự dẫn nhập vector vào *A.rhizogenes* mang một Ri-plasmid bình thường làm ổn định các trình tự của vector trung gian là kết quả của tái tổ hợp tương đồng nội phân tử trong Ri-plasmid (Jensen, 1986).

2.6.2. Vector nhị thể

Vector nhị thể đã loại bỏ hết khả năng gây hại có nguồn gốc từ *A.tumefaciens* (Bevan, 1984; Van den Elzen, 1985) có thể đưa vào *A.rhizogenes* và sẽ tái bản ổn định miễn là sự chọn lọc được duy trì. Sau đó nhiễm *A.rhizogenes* mang vector nhị thể với thực vật sẽ làm chuyển T-DNA từ vector nhị thể cùng với T-DNA của *A.rhizogenes* vào genome thực vật (Shalin, 1986; Simpson, 1986). Các gen này khi chuyển vào genome thực vật được định vị ở giữa các trình tự biên của vector nhị thể. Các trình tự biên của vector nhị thể này có tác dụng sau khi sự cảm ứng của vùng vir của Ri-plasmid kiểu dại ở ngay tại chỗ (Simpson, 1986; Trulson, 1986). Điều này có thể xảy ra là do độ tương đồng lớn, ở mức DNA, giữa các vùng gây độc (virulence region) của *A.tumefaciens* và *A.rhizogenes* (Huffman, 1984).

Gần đây lông tơ (hairy root) cà chua và dưa chuột đã được tạo ra bởi *A.rhizogenes* kiểu dại mang vector nhị thể với marker chọn lọc Km^r. Thể tái sinh từ môi trường nuôi cây lông rẽ kháng kanamycin này đã được sàng lọc đối với thực vật kiểu hình bình thường và một số đã được phục hồi mà thiếu T-DNA của *A.rhizogenes* nhưng có mặt T-DNA của vector nhị thể (Shalin, 1986; Trulson, 1986) là do sự chuyển đổi lặp của các T-DNA tách rời. Đặc tính này của *A.rhizogenes* làm cho nó trở nên hấp dẫn như là một vector biến nạp nếu như quá trình này có thể được mở rộng đối với nhiều loại cây trồng khác.

Tài liệu tham khảo chính

- Makrides SC. 2003. Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. Elsevier Science B. V. USA.
- Louis-Marie H. 2003. Animal Transgenesis and Cloning. John Wiley and Sons, Ltd. USA.
- Leland HH, Leroy H, Michael LG, Ann ER, Lee MS, Ruth CV. 2000. Genetics, The McGraw-Hill Companies, Inc. USA.
- Winter PC, Hickey GI, Fletcher HL. 1998. Instant Notes on Genetics. Printed by Biddles Ltd, Guildford. UK.

Glick BR, Jackj P. 1994. Molecular Biotechnology. ASM Press. Washington D.C. USA.

Chopra VL, Anwan Å. 1990. Genetic Engineering and Biotechnology. Oxford and IBH Publishing CO.PVT, Ltd. UK.

John D, Roderick S, Philip A, Richard W. 1988. Plant Genetics Transformation and Gene Expression (A Laboratory Manual). Blackwell Scientific Publications. UK.

Chương 1

Các vector sử dụng trong công nghệ chuyển gen ở động vật và thực vật

I. Vector

Trong sinh học, vector là một phân tử DNA có khả năng mang một đoạn DNA ngoại lai và khi xâm nhập vào loại tế bào chủ thích hợp thì có khả năng tự tái bản không phụ thuộc vào sự sao chép của hệ gen tế bào chủ.

Nói cách khác, vector là một phương tiện truyền thông tin di truyền trong cơ thể hoặc giữa các cơ thể khác nhau.

Tế bào chủ thường được sử dụng là vi khuẩn *E.coli*. Phần lớn các vector là các phân tử DNA dạng vòng nhỏ (plasmid) hoặc là bacteriophage.

Vector có thể được cắt ở một vị trí xác định bằng một enzym hạn chế và được nối với một đoạn DNA tương hợp khác được cắt bởi cùng enzym.

Trong tạo dòng phân tử, vector là rất cần thiết bởi vì thực tế cho thấy rằng một đoạn DNA chứa gen không thể làm gì trong tế bào chủ. Vì nó không phải là một bộ phận của genome bình thường của tế bào, cho nên nó sẽ không được tái bản khi tế bào phân chia, không được biểu hiện và có khả năng bị phân huỷ khá nhanh.

Trong kỹ thuật di truyền, vector là công cụ có khả năng nghiên cứu genome người và genome các loài khác và sự sử dụng chúng trong nghiên cứu đang trở nên ngày càng phổ biến một cách rộng rãi.

II. Các đặc tính của vector

- Vector phải đủ lớn để mang DNA ngoại lai nhưng không quá lớn.
- Vector phải chứa các trình tự kiểm soát (control sequences) như khởi điểm tái bản (origin of replication), promoter.

- Vector phải mang một hoặc nhiều vị trí nhận biết của enzym hạn chế.

- Vector phải mang các gen marker chọn lọc (thường là các gen kháng chất kháng sinh). Vì vậy các tế bào chứa chúng có thể được phát hiện một cách dễ dàng.

III. Các bước trong tạo dòng phân tử

- Nối vector và đoạn DNA ngoại lai cần được tạo dòng trong ống nghiệm để tạo DNA tái tổ hợp nhờ sự xúc tác của enzym ligase.

- Biến nạp DNA tái tổ hợp vào một dòng tế bào chủ. Chọn lọc thể biến nạp trên môi trường agar trong đĩa petri có chất kháng sinh.

- Tách dòng DNA tái tổ hợp bằng cách sử dụng mẫu dò (probe).

IV. Các vector sử dụng để chuyển gen ở động vật và thực vật

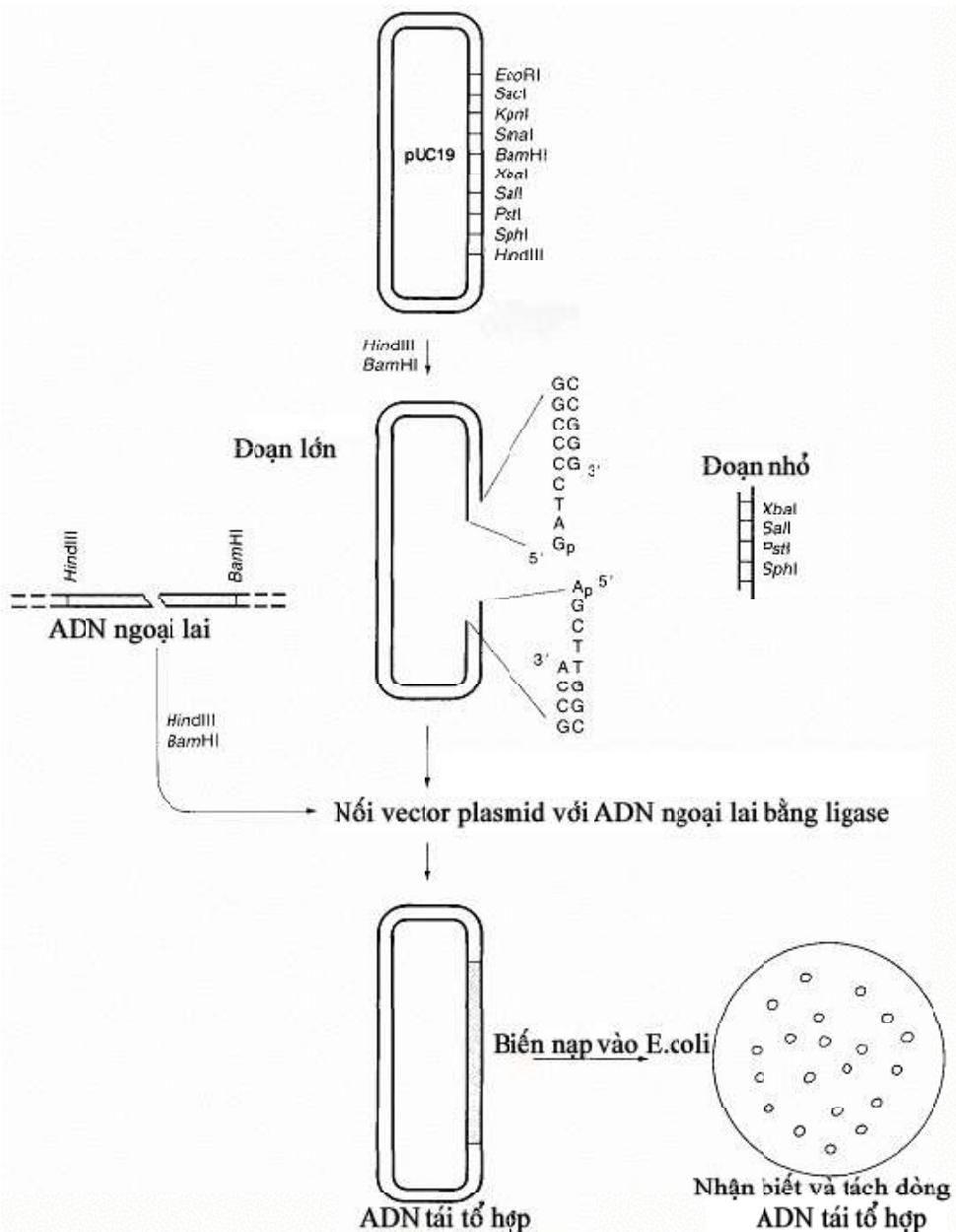
1. Các vector sử dụng để chuyển gen ở động vật

1.1. Vector sử dụng để thêm gen

Phần lớn các vector sử dụng hiện nay để tạo động vật chuyển gen bằng cách thêm gen được xây dựng để được hợp nhất vào genome. Các phương pháp đang được sử dụng hoặc nghiên cứu để tăng tần số hợp nhất của gen ngoại lai hoặc duy trì chúng như là các nhiễm sắc thể nhỏ độc lập.

1.1.1. Vector thẳng tối thiểu (Minimum linear vectors)

Ở đại đa số trường hợp, các nhà nghiên cứu sử dụng các đoạn genome chứa một hoặc hai gen hay chuẩn bị các cấu trúc gen hoạt động chức năng từ các yếu tố khác nhau. Các đoạn của vector chứa các vùng phiên mã và điều hòa từ plasmid. Thực vậy, các vector vòng hợp nhất với tần số thấp hơn nhiều so với các đoạn DNA thẳng và trình tự plasmid thường phá hủy các gen chuyển đã liên kết. Điều này đúng đối với các vector khác nhau như plasmid, cosmid, phage, BAC và YAC. Tuy nhiên một số nghiên cứu cho thấy rằng vector BAC vòng hợp nhất vào genome với hiệu quả giống như bản sao mạch thẳng của chúng. Nói cách khác, các vector mang các đoạn



Hình 1.1: : Tạo dòng bằng vector plasmid

DNA genome dài ít nhạy với hiệu quả cảm của các trình tự của prokaryote. Điều này là thích hợp nhất nhờ sự hiện diện của các yếu tố cách ly ở các đoạn genome dài hoặc nhờ một hiệu quả khoảng cách đơn giản.

Các đoạn DNA không chứa các trình tự đặc biệt hợp nhất vào genome với tần số tương đối thấp. Một số DNA xen vào tạo ra số động vật chuyển gen nhiều hơn so với các DNA khác. Điều này có thể xuất hiện từ sự có mặt của các trình tự trong đoạn xen mà nhận biết thường xuyên các trình tự genome (Hình 1). Một số các đoạn xen vào có thể chứa các trình tự ưu tiên cho sự phiên mã của chúng và sự duy trì của chúng trong phôi, tăng cường sự hợp nhất xảy ra.

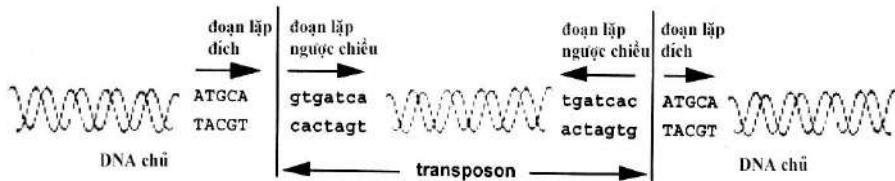
1.1.2. Vector chứa các trình tự lặp lại

Cơ chế của sự hợp nhất được mô tả ở hình 1 bao hàm sự nhận biết giữa các trình tự của đoạn xen và của genome. Tần số của sự hợp nhất được tăng lên nhờ sự có mặt ở cả hai đầu của các đoạn xen các trình tự lặp lại cao trong genome chủ ngay cả khi chúng bị thoái hóa nhiều hoặc ít. Ở bò, một trình tự có mặt nhiều ở tâm động làm tăng thêm các đoạn xen đã tăng tần số hợp nhất. Ở trường hợp đặc biệt này, các gen chuyển vẫn không hoạt động. Điều này là do tâm động là vùng không phiên mã của genome phá hủy gen chuyển.

Một phương pháp tương tự đã được tiến hành ở chuột, sử dụng các trình tự *Alu*. Các trình tự này là các yếu tố lặp lại. Các trình tự *Alu* chứa 200-300 nucleotid là có nhiều trong genome động vật có vú và đặc biệt là ở các vùng lân cận hoặc ở trong các vùng phiên mã. Một số trình tự *Alu* được phiên mã bởi RNA polymerase III, làm cho chức năng của RNA không rõ ràng và có thể không tồn tại. Các thí nghiệm đã cho thấy rằng tần số hợp nhất được tăng lên đối với các đoạn xen chứa trình tự *Alu*.

1.1.3. Vector transposon

Transposon là một đoạn DNA có khả năng tự tái bản một cách độc lập và xen vào một vị trí mới trong cùng nhiễm sắc thể hoặc một nhiễm sắc thể khác (Hình 1.2). Với tiến bộ của kỹ thuật di truyền transposon đã được sửa đổi, thiết kế thành các công cụ di truyền với mục đích đặc biệt.



Hình 1.2: Cấu trúc của transposon

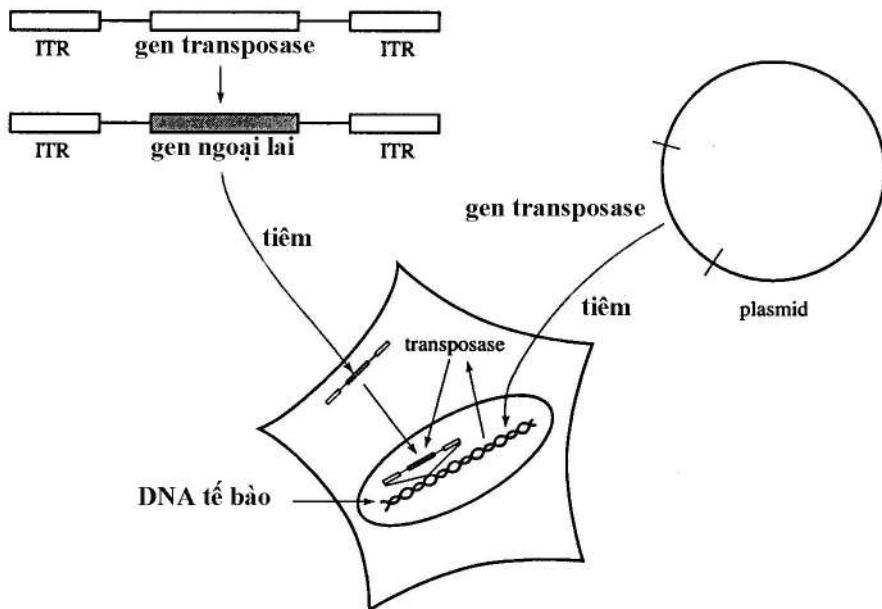
Kích thước của transposon nói chung là không dài hơn 2kb. Nhiều bản sao của transposon có mặt trong genome tại các vị trí ngẫu nhiên một cách rõ ràng. Transposon được phiên mã thành RNA, RNA được phiên mã ngược thành DNA sợi kép. DNA sợi kép này hợp nhất vào genome với hiệu quả cao. Sự hợp nhất được điều khiển bởi gen transposase mã hóa transposon và các trình tự lặp lại đảo ngược ITR (inverted repeated sequence). Các trình tự lặp lại đảo ngược có mặt ở cả hai đầu của transposon (Hình 1.3). Cơ chế này cho phép transposon trai rộng ra một cách nhanh chóng và tỏa khắp genome, bao gồm cả sự bất hoạt gen trong một số trường hợp. Sự lan tỏa của transposon bị giới hạn bởi cơ chế tế bào làm bất hoạt sự phiên mã của transposon.

Transposon là vector có tiềm năng đổi với sự hợp nhất gen ngoại lai vào genome. Để làm được điều này, một phần lớn vùng phiên mã của transposon bị mất đi, tạo ra khoảng trống đối với gen ngoại lai và ngăn cản transposon trai rộng một cách tự chủ và không kiểm soát trong genome.

DNA tái tổ hợp chứa gen ngoại lai không có khả năng đặc biệt để tự hợp nhất vào genome. Sự có mặt của gen transposase là cần thiết đối với mục đích này. Tiềm đồng thời transposon mang gen ngoại lai và plasmid vòng có khả năng biểu hiện gen transposase cho phép transposon hợp nhất với hiệu quả có ý nghĩa, khoảng 1-5 % số phôi được tiêm (Hình 1.3).

Protocol này được áp dụng trước tiên cho *Drosophila*, sử dụng transposon P và sau đó đã được sử dụng rộng rãi để tạo sinh vật chuyển gen (Kayser, 1997). Transposon thủy thủ (mariner) đã tỏ ra có hiệu quả đối với tế bào cá medaka, gà và động vật có vú. Các sửa đổi khác nhau của transposon này làm cho nó có thể mang một vector hiệu quả và an toàn đối với liệu pháp gen (Hackett, 2001).

Các vector khác được sử dụng để tạo côn trùng chuyển gen như *Aedes aegypti* hoặc tằm (Tamura, 1999). Gần đây transposon đã được sử dụng để tạo chuột chuyển gen (Dupuy, 2002).



Hình 1.3: Sử dụng vector transposon để chuyển DNA ngoại lai

Gen transposase được thay thế bằng gen mong muốn. Transposon tái tổ hợp được tiêm vào tế bào. Vector điều khiển sự tổng hợp enzyme gắn (intergrase) được cùng tiêm vào. Transposon được hợp nhất bằng cách sử dụng các trình tự lặp lại đảo ngược ITR của chúng

Trong tất cả các trường hợp, transposon và plasmid mã hóa cho transposase phải được tiêm vào tế bào chất của phôi dưới các điều kiện khác nhau tùy thuộc từng loài. Về phương diện này, gà là khác với hầu hết các loài khác. Việc tiêm gen có thể được thực hiện ở giai đoạn phôi một tế bào mà không thể đưa trở lại vào con mèo nuôi dưỡng như trường hợp đối với thú. Phôi tiêm gen phải được đưa vào noãn hoàng của một trứng không mang phôi. Sau vài tuần áp trứng dưới các điều kiện được kiểm soát tốt, gà chuyển gen được sinh ra với một tỉ lệ thành công có thể chấp nhận (Shermann, 1998).

Vì vậy, vector transposon cho phép tạo ra các động vật chuyển gen đối với các loài mà vi tiêm DNA thông thường không thành công. Vector này cũng được xem là an toàn. Vector transposon thủy thủ ngay cả khi thiếu gen transposase của nó cũng có thể tái bản và hợp nhất vào genome chủ với tần số thấp. Điều này là do sự có mặt của transposase nội sinh của tế bào chủ. Vấn đề này có thể giới hạn sự sử dụng transposon trong một số trường hợp. Trong khi đó, transposon BAC lợn con đã được sử dụng để tạo ra tần chuyển gen ổn định hoàn toàn sau một số thế hệ.

Transposon chỉ có thể mang các đoạn DNA ngoại lai với chiều dài giới hạn. Các cấu trúc phức tạp được sử dụng để biểu hiện gen ngoại lai rõ ràng cũng là một hạn chế. Ngoài ra các cơ chế tế bào phá hủy transposon có thể úc chế sự biểu hiện của gen chuyển trong một số trường hợp.

1.1.4. Vector retrovirus

a. Cấu trúc của retrovirus

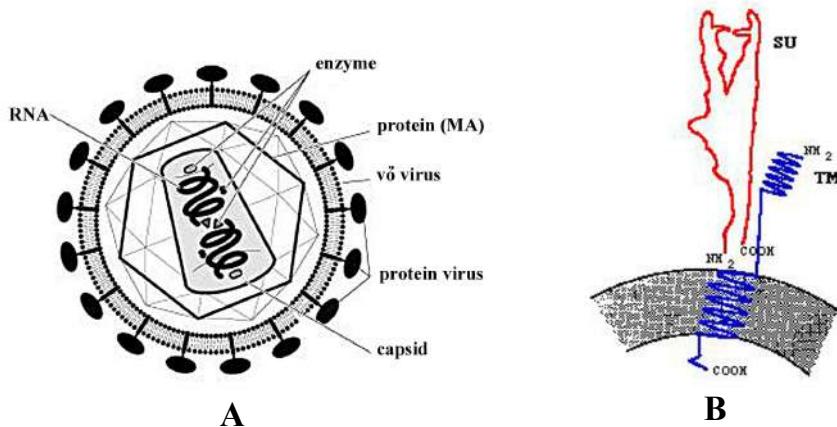
Retrovirus là loại virus RNA, có vỏ bọc bên ngoài. Sau khi xâm nhiễm, genome virus được sao chép ngược thành DNA sợi kép, hợp nhất vào genome tế bào chủ và biểu hiện thành protein.

Retrovirus đặc trưng bởi chu kỳ tái bản của chúng, được mô tả lần đầu tiên vào đầu thập niên 1900 (Ellermann và Bang.O, 1908).

Hạt retrovirus có kích thước, hình dạng có thể thay đổi đôi chút nhưng đường kính khoảng 100nm. Vỏ của virus là glycoprotein, tạo thành các gai ở màng (Hình 1.4A). Protein trùm thành này được chia làm hai loại polypeptid (Hình 1.4B):

- Glycoprotein vỏ bên ngoài (SU), kháng nguyên chủ yếu của virus, có chức năng bám vào thụ quan.

- Glycoprotein màng (TM), bám vào protein SU ở vỏ, chịu trách nhiệm đối với sự dung hợp màng.



Hình 1.4: Sơ đồ cấu trúc cắt ngang của retrovirus

A. Cấu trúc cắt ngang

B. Cấu trúc protein vỏ

Bên trong màng là protein cơ bản (MA), không định hình. Protein này bao lấp capsid (CA). CA là protein phong phú nhất trong hạt virus (chiếm khoảng 33 % trọng lượng tổng số), có hình khối 20 mặt. Bên trong capsid là lõi, thường có hình nón, bao gồm: RNA genome, protein nucleocapsid (NC), enzym phiên mã ngược (reverse transcriptase = RT) và enzyme hợp nhất (integrase = IN).

Genome retrovirus bao gồm hai bản sao của phân tử RNA sợi đơn, mạch thẳng, có cap ở đầu 5' và đuôi poly A ở đầu 3' (tương đương với mRNA). Genome retrovirus có kích thước khoảng 8-11kb.

Retrovirus được chia làm hai loại là retrovirus đơn giản và retrovirus phức tạp.

RNA của retrovirus đơn giản chứa 3 nhóm gen chủ yếu:

- Gen *gag* mã hóa protein lõi, capsid và nucleoprotein.
- Gen *pol* mã hóa enzyme phiên mã ngược và enzyme hợp nhất.

- Gen *env* mã hóa protein trong cấu trúc vỏ của virus.

Trật tự của các nhóm gen này ở tất cả các retrovirus là không thay đổi:

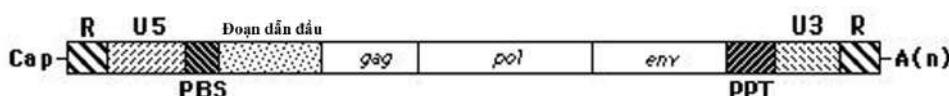
5' – *gag* – *pol* – *env* – 3'

Ngoài ra còn có nhóm gen *pro* mã hóa enzyme protease virus. Các retrovirus đơn giản bao gồm hầu hết các virus gây ung thư như virus bạch cầu chuột Moloney Mo-MLV (Moloney, 1960), virus ung thư tuyến vú chuột (mouse mammary tumor virus = MMTV) (Bittner, 1936).

Các retrovirus phirc tạp, ngoài ba nhóm gen chủ yếu gag, pol và env còn có các gen khác như *tat*, *rev* ở HIV-1. Nhóm virus này bao gồm các lentivirus kể cả virus HIV-1, spumavirus, HFV (human foamy virus) và SFV (simian foamy virus).

Ở mỗi đầu của genome là các đoạn lặp dài tận cùng (LTR) chứa tất cả các tín hiệu cần thiết cho sự biểu hiện gen của virus. Một đoạn LTR gồm có 3 vùng: U3, R và U5. Vùng U3 bao gồm các yếu tố kiểm soát sự phiên mã, promoter và gen tăng cường (enhancer). Đây là vùng không mã hóa có kích thước 75-250 nucleotid, là phần đầu tiên của genome được phiên mã ngược, tạo ra đầu 3' của genome provirus. Vùng R thường là trình tự có kích thước ngắn chỉ khoảng 18-250 nucleotid tạo thành đoạn lặp trực tiếp ở cả hai đầu của genome. Vùng U5 là vùng không mã hóa có kích thước 200-1.200 nucleotid tạo nên đầu 5' của provirus sau khi phiên mã ngược. Vùng U5 mang vị trí poly A và cùng với vùng R xác định sự gắn thêm đuôi poly A vào. Cả hai vùng U3 và U5 đều mang vị trí gắn *att* cần thiết cho sự hợp nhất genome của virus vào genome chủ.

Mặt khác, genome virus còn có đoạn dẫn đầu (leader), vị trí bám primer (primer binding site = PBS) và vùng polypurine (polypurine tract = PPT). Đoạn dẫn đầu không được dịch mã, khá dài, có kích thước khoảng 90-500 nucleotid, xuôi theo vị trí khởi đầu phiên mã, nằm giữa vùng U3 và R, ở phía đầu 5' của tất cả các virus mRNA. PBS dài 18 nucleotid bổ sung với đầu 3' của primer tRNA đặc hiệu được virus sử dụng để bắt đầu phiên mã ngược. PTT ngắn chỉ khoảng 10 A hoặc G có chức năng khởi đầu sự tổng hợp sợi (+) trong quá trình phiên mã ngược.



Hình 1.5 : Sơ đồ cấu trúc genome của retrovirus

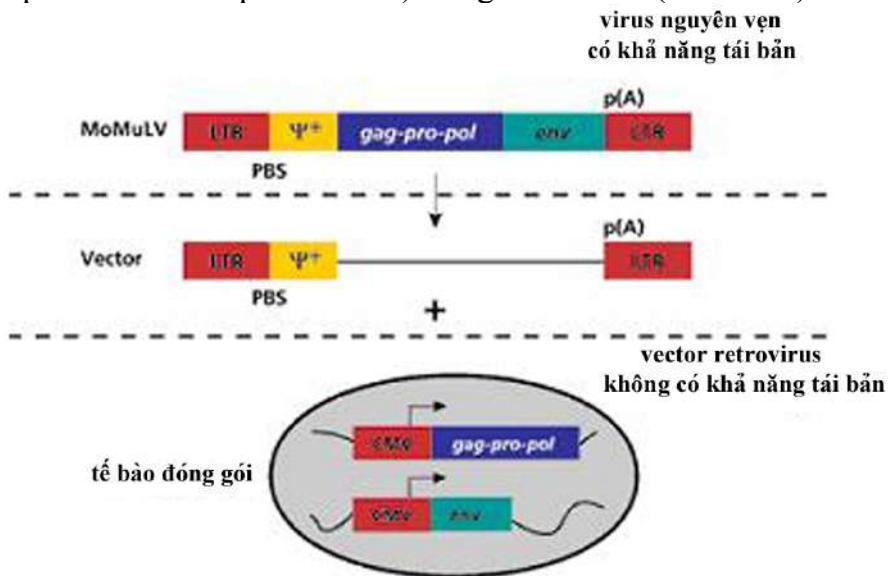
Ngoài ra còn có các trình tự cần thiết cho sự đóng gói genome virus gọi là trình tự Ψ (psi) và các vị trí cắt RNA ở gen *env*.

Một số retrovirus chứa protooncogene. Khi protooncogene bị đột biến có thể gây ra ung thư.

b. Vector retrovirus

Vector retrovirus là cấu trúc DNA nhân tạo có nguồn gốc từ retrovirus, được sử dụng để xen DNA ngoại lai vào nhiễm sắc thể của vật chủ.

Yếu tố chìa khóa trong việc sử dụng retrovirus làm thể truyền phân phôi gen là sự an toàn sinh học (biosafety). Mục đích chính của thiết kế vector là bảo đảm tạo ra một virus không khả năng tái bản (replication incompetent virus) trong tế bào chủ (Hình 1.6).



Hình 1.6: Virus nguyên vẹn có khả năng tái bản và vector retrovirus không có khả năng tái bản

Về nguyên tắc, có thể tạo ra vector retrovirus có khả năng tái bản (replication competent retroviral vector) bằng cách thêm các trình tự cần thiết vào virus (Hình 1.6). Nhưng một thiết kế phổ biến hơn là thay thế các gen của virus bằng các gen chuyển mong muốn để tạo ra vector tái bản không hoàn toàn (replication defective

vector). Mặt khác, kích thước của đoạn DNA ngoại lai mà vector tái bản không hoàn toàn có thể tiếp nhận lớn hơn nhiều so với vector có khả năng tái bản. Sự biểu hiện của các protein retrovirus ở hầu hết các retrovirus gây ung thư xảy ra tự nhiên do một promoter đơn (single promoter) nằm trong đoạn lặp dài tận cùng (LTR) ở đầu 5' và sự biểu hiện của các vùng mã hóa virus phức tạp xảy ra nhờ sự cắt ghép xen kẽ (alternative splicing). Tuy nhiên, việc thiết kế vector là không bị giới hạn do sử dụng promoter retrovirus đơn. Một hướng thiết kế khác là sử dụng promoter phức (multiple promoter) và các trình tự tiếp nhận ribosome ở bên trong (internal ribosome entry site = IRES).

Sự tái nạp và hợp nhất gen có hiệu quả phụ thuộc vào các yếu tố virus có mặt trong vector retrovirus.

Một điểm lưu ý quan trọng khi thiết kế vector retrovirus là hiệu quả tái bản của virus trong cấu trúc vector.

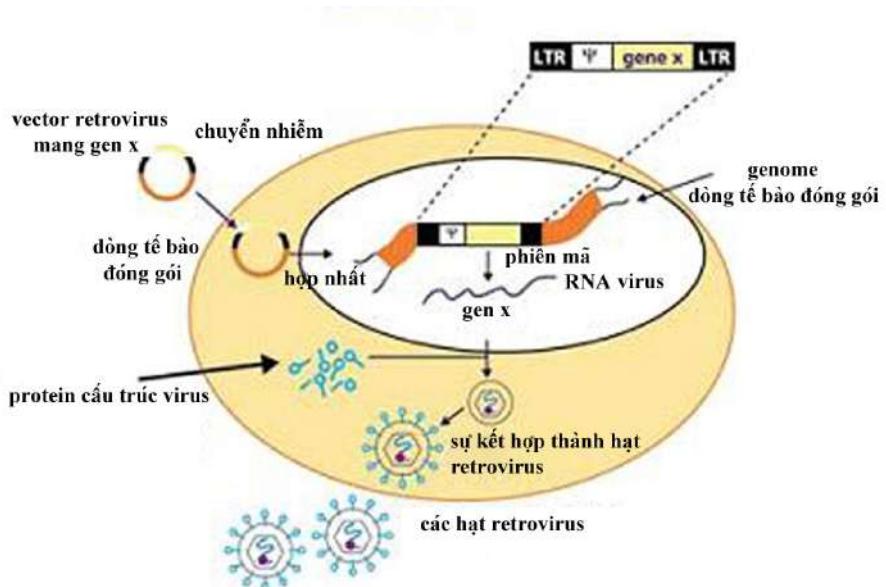
Phần lớn các vector retrovirus thường được thiết kế dựa trên virus Mo-MLV. Đây là loại virus có khả năng xâm nhiễm vào cả các tế bào chuột (có thể phát triển vector ở mô hình chuột) và tế bào người (có thể điều trị bệnh cho người). Các gen của virus (*gag*, *pol* và *env*) được thay thế bằng các gen chuyên mong muốn và được biểu hiện ở các plasmid trong dòng tế bào đóng gói. Các vùng cần thiết bao gồm các đoạn lặp dài tận cùng ở đầu 3' và 5' (3'LTR và 5'LTR) và trình tự đóng gói.

Trước đây virus hỗ trợ khả năng tái bản đã được sử dụng để đóng gói cả virus vector và virus hỗ trợ. Trong một phương pháp tinh vi hơn được sử dụng hiện nay, các dòng tế bào đã thao tác di truyền đặc hiệu đã biểu hiện các gen virus do các promoter không tương đồng được sử dụng để tạo ra các virus vector. Các dòng tế bào này được gọi là các dòng tế bào đóng gói hoặc các dòng tế bào hỗ trợ.

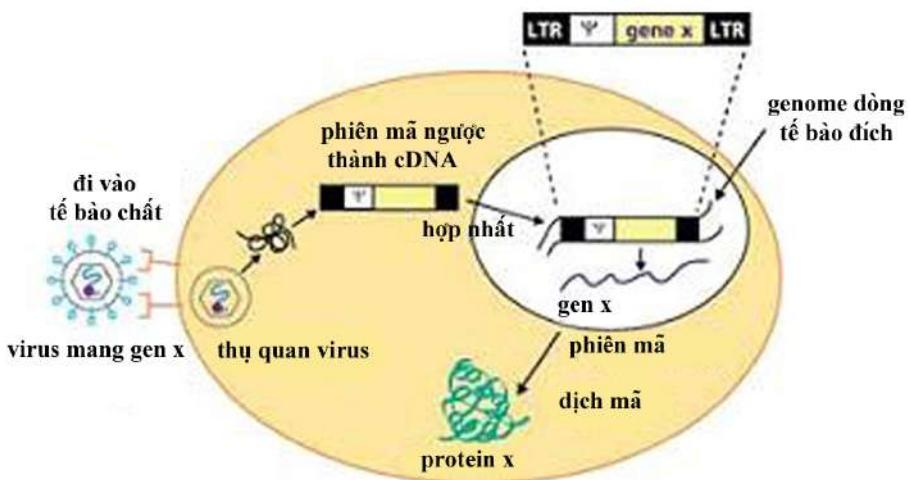
Chuyển gen và biểu hiện gen bằng một vector virus được gọi là sự tái nạp để phân biệt với quá trình xâm nhiễm của retrovirus có khả năng tái bản (replication competent retrovirus = RCR).

Sự biểu hiện của gen chuyển là do promoter hoặc gen tăng cường ở vị trí 5' LTR hoặc bởi các promoter virus (như cytomegalovirus, Rous sarcoma virus) hoặc bởi các promoter của tế bào (như beta actin, tyrosine). Sự định vị chính xác codon khởi đầu

của gen chuyển và các thay đổi nhỏ của 5'LTR ảnh hưởng đến sự biểu hiện của gen chuyển (Rivire, 1995).



Hình 1.7: Quá trình đóng gói tạo hạt retrovirus



Hình 1.8: Cơ chế hoạt động của vector retrovirus

Để nhận biết các tế bào biến nạp, các marker chọn lọc như neomycin và beta galactosidase được sử dụng và sự biểu hiện của gen chuyển có thể được cải tiến bằng cách thêm vào các trình tự ribosome bên trong (Saleh, 1997).

Một yêu cầu đối với sự hợp nhất và biểu hiện của các gen virus là các tế bào đích phải phân chia. Điều này giới hạn liệu pháp gen tăng sinh tế bào *in vivo* và *ex vivo*, do đó các tế bào thu nhận từ cơ thể được xử lý để kích thích tái bản và sau đó được tải nạp với retrovirus trước khi đưa trở lại bệnh nhân.

c. Ứng dụng của vector retrovirus

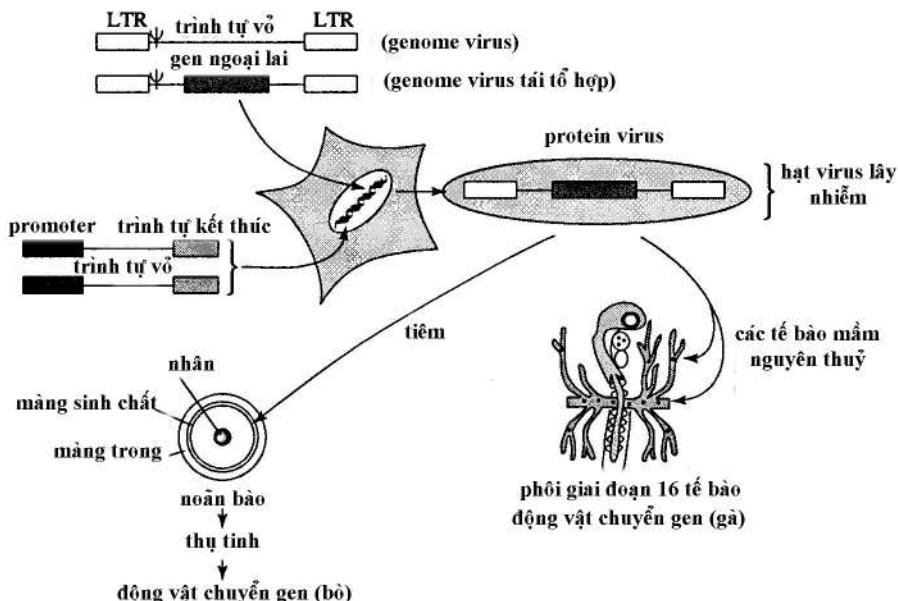
Vector retrovirus là cần thiết cho liệu pháp gen, đã được sử dụng có hiệu quả trong nhiều liệu pháp gen chữa bệnh cho người như suy giảm miễn dịch do thiếu hụt enzyme ADA, ung thư, tiểu đường, thiếu máu,...

Các vector retrovirus khác nhau đã được thiết kế để tạo động vật chuyển gen và gà chuyển gen đặc biệt (Ronfort, Legras và Verdier, 1997). Các vector này mang các trình tự *env* có khả năng nhận biết các tế bào phôi gà. Chúng được tiêm vào trứng gà mới đẻ. Ở giai đoạn này, các tế bào hatching còn đa năng và có thể tham gia vào việc tạo thành giao tử, dẫn đến truyền gen ngoại lai cho thế hệ sau. Phương pháp này cho hiệu quả không cao. Phôi ở giai đoạn này chứa khoảng 60.000 tế bào. Chỉ một tỉ lệ nhỏ các tế bào này có cơ hội mang gen chuyển nhờ vector retrovirus. Gà chuyển gen tạo thành ở dạng thể khám và có rất ít cơ hội truyền gen chuyển của chúng cho thế hệ sau. Một phương pháp khác đã chứng tỏ có hiệu quả hơn. Việc tiêm gen được thực hiện ở giai đoạn phôi 16 tế bào tại vùng lân cận của các tế bào gốc nguyên thủy. Các tế bào này được tiêm một cách ưu tiên, tạo ra các động vật chuyển gen có cơ hội truyền gen chuyển của chúng cho thế hệ sau (Hình 1.9).

Vector retrovirus cũng được sử dụng để chuyển gen vào noãn bào của bò và khỉ (Chen, 1998, 2001). Để tiến hành công việc này đòi hỏi hai điều kiện đặc biệt. Vỏ của vector là protein G của VSV (vesicular somatitis virus) có chức năng nhận biết màng phospholipid và vì vậy cho phép tiêm vào nhiều loại tế bào khác nhau. Các hạt virus được tiêm vào giữa màng trong (zona pellucida) và màng noãn bào vào lúc màng nhân đã biến mất, tạo cho genome

virus cơ hội tốt nhất để có thể đến được genome tế bào chủ (Hình 1.9).

Lentivirus là một phân lớp của retrovirus. Chúng có khả năng hợp nhất vào genome của các tế bào ở pha nghỉ, cả các tế bào tăng sinh và tế bào không tăng sinh. Khả năng này có được là do sự có mặt của một tín hiệu ở một trong số các protein virus. Protein virus này nhắm tới genome của virus ở vùng nhân. Lentivirus phức tạp hơn các retrovirus đơn giản, chứa thêm 6 gen *tat*, *rev*, *vpr*, *vpu*, *nef* và *vif*. HIV là một loại lentivirus. Vector lentivirus được nghiên cứu nhiều do tiềm năng sử dụng của chúng trong liệu pháp gen.



Hình 1.9: Sử dụng vector retrovirus để tạo động vật chuyển gen

Genome virus mang gen ngoại lai được đưa vào tế bào tổng hợp protein virus khuyết. Các hạt virus được sử dụng để tiêm vào noãn bào động vật có vú (bò, khỉ), các tế bào mầm nguyên thủy của gà hoặc phôi một tế bào của chuột.

Một nghiên cứu gần đây cho thấy rằng vector lentivirus tiêm vào phôi một tế bào hoặc ủ với phôi đã được loại bỏ màng trong là có hiệu quả đặc biệt đối với việc chuyển gen vào chuột (Lois, 2003).

Các vector này ngày càng được cải tiến tinh vi hơn. Genome của chúng có nguồn gốc từ lentivirus đã tạo ra các hạt virus tái tổ hợp có khả năng nhiễm vào tế bào phân chia hoặc tế bào không phân chia. Vector này chứa LTR đã được sửa đổi dẫn đến sự tự bất hoạt genome virus đã hợp nhất. Điều này làm giảm đáng kể khả năng tái tổ hợp tạo ra virus xâm nhiễm mang gen ngoại lai với phương thức không kiểm soát. Các loại vector này không có các gen tăng cường. Sự vắng mặt các gen tăng cường làm cho nó có thể thay thế cho một promoter nội sinh điều khiển gen mong muốn hoạt động mà không lệ thuộc vào ảnh hưởng của các gen tăng cường LTR. Vector này cũng chứa một yếu tố điều hòa sau phiên mã ưu tiên cho việc biểu hiện gen và một đoạn của virus HIV mà đoạn này cho phép genome virus đi vào nhân của tế bào không phân chia và hợp nhất vào DNA chủ.

Các vector này cũng có thể điều khiển sự biểu hiện gen FGFP của chuột, tạo ra màu xanh huỳnh quang ở tất cả các loại tế bào hoặc chỉ ở tế bào cơ khi promoter hoạt động ở tất cả các loại tế bào hoặc chỉ ở tế bào cơ.

Lưu ý rằng khoảng 80% chuột sinh ra là chuột đã được chuyển gen. Khoảng 90% số chuột này biểu hiện gen chuyển của chúng ở một số thế hệ. Protein VSV đã được sử dụng như là một vỏ bọc cho phép xâm nhiễm hiệu quả vào phôi.

Ưu điểm chính của vector này là hiệu quả biến nạp cao, thao tác đơn giản, sự xâm nhiễm có thể được thực hiện bằng cách ủ phôi đã loại bỏ màng trong với thế virus. Phương pháp này được mở rộng đối với các động vật có vú khác mà không có vấn đề đặc biệt. Phương pháp này thuận lợi một cách đặc biệt cho việc chuyển gen vào chuột trong khi phương pháp vi tiêm là rất khó sử dụng ở đây.

Hạn chế của vector này cũng không ít. Các hạt virus phải được kiểm soát an toàn sinh học bằng biện pháp thích hợp. Bước này ngày càng được tiêu chuẩn hóa nhằm tăng cường sử dụng các loại vector này cho liệu pháp gen. Các đoạn DNA có kích thước không vượt quá 7-9kb có thể được đưa vào vector này. Sự biểu hiện của gen reporter là tương đối thấp trong trường hợp này. Một khác, sự hợp nhất độc lập của vector xảy ra trong cùng một phôi dẫn đến động vật chuyển gen thể khuyết.

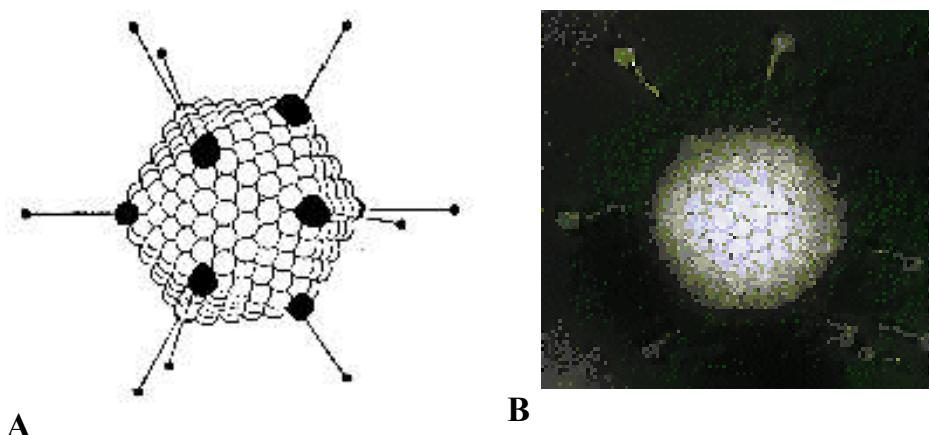
Rõ ràng, phương pháp này chỉ có thể thay thế vi tiêm trong một số trường hợp.

1.1.5. Vector Adenovirus

a. Cấu trúc của adenovirus

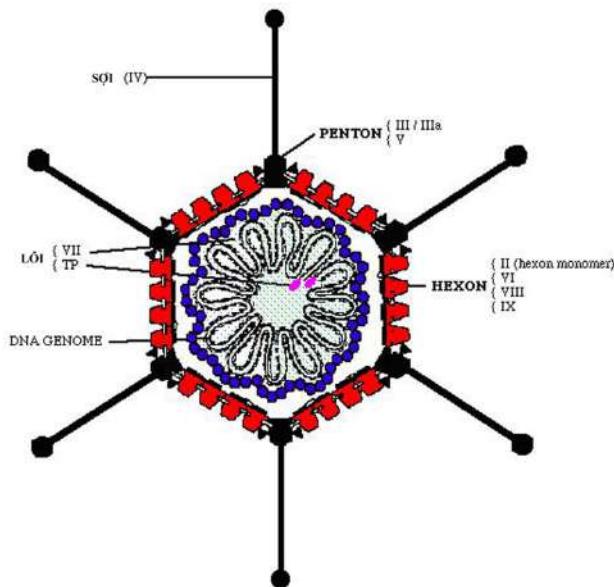
Adenovirus là loại virus không có vỏ, chứa genome DNA sợi kép, mạch thẳng. Trong khi có hơn 40 dòng adenovirus typ huyết thanh phần lớn gây nhiễm trùng đường hô hấp ở người thì chỉ có nhóm phụ C typ huyết thanh 2 hoặc 5 được sử dụng làm vector một cách ưu thế. Chu trình sống của adenovirus thường không liên quan đến sự hợp nhất vào genome vật chủ, chúng tái bản như các yếu tố episome trong nhân của tế bào chủ và vì vậy không có nguy cơ phát sinh đột biến xen (insertional mutagenesis).

Tất cả các hạt adenovirus đều không có vỏ, đường kính 60-90nm. Chúng có tính đối xứng icosaedron, dễ dàng nhìn thấy dưới kính hiển vi điện tử khi nhuộm âm tính. Vỏ capsid của adenovirus bao gồm 252 capsomer. Lõi của hạt virus chứa tối thiểu 4 protein: protein đầu mút (terminal protein = TP), gắn với đầu 5' của genome bằng liên kết đồng hóa trị; protein V (180 bản sao/hạt virus) và protein VII (1070 bản sao/hạt virus), là các protein cơ bản và protein Mu, một protein nhỏ (4kD), vị trí và chức năng chưa được biết.



Hình 1.10: Adenovirus

- A. Mô hình cấu trúc không gian adenovirus
- B. Aenovirus nhìn dưới kính hiển vi điện tử



Hình 1.11: Sơ đồ cấu trúc cắt ngang của adenovirus

Genome của adenovirus là phân tử DNA sợi kép không phân đoạn, dài 30-38kb (các nhóm khác nhau có kích thước khác nhau), có thể mã hóa 30-40gen. Có 4 vùng gen phiên mã sớm là E₁, E₂, E₃ và E₄, có chức năng điều hòa và một sản phẩm phiên mã muộn mã hóa cho các protein cấu trúc. Các trình tự ở đầu mút của mỗi sợi là lặp lại đảo ngược vì vậy các sợi đơn đã biến tính có thể tạo ra cấu trúc “cán xoong” (“panhandle”). Ngoài ra, còn có protein 55kD liên kết với đầu 5' của mỗi sợi bằng liên kết đồng hóa trị.

b. Vector adenovirus

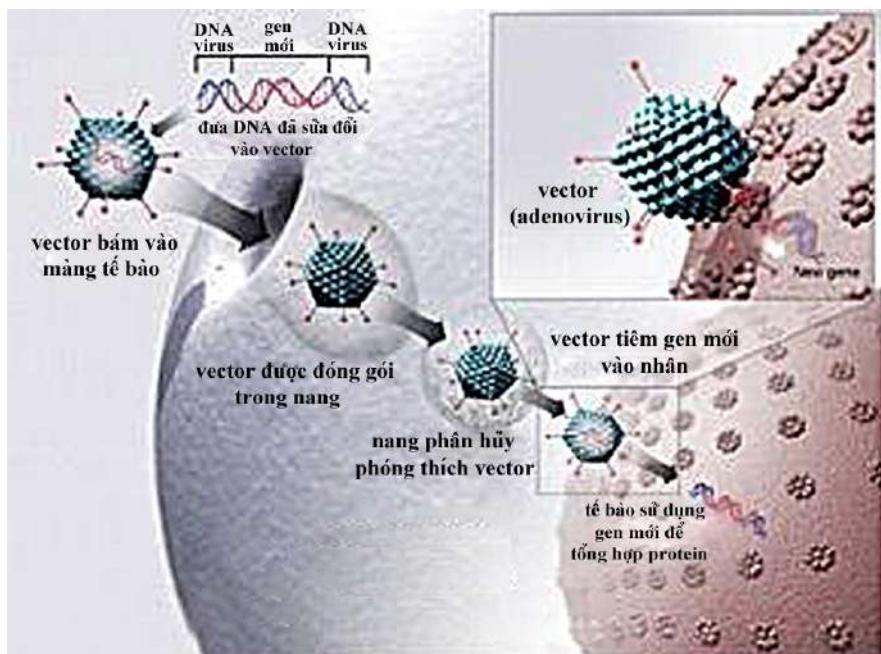
Vector adenovirus là vector chuyển gen được tạo ra từ các adenovirus tái tổ hợp.

Thế hệ adenovirus tái tổ hợp đầu tiên đã được thiết kế bằng cách loại bỏ gen E₁. Sự loại bỏ gen E₁ làm cho virus không có khả năng tái bản trong tế bào chủ. Gen E₃ thường cũng được loại bỏ để dành chỗ cho gen chuyên. Phần genome mã hóa protein cấu trúc của virus được thay thế bằng một gen marker (như β-galactosidase) hoặc gen cDNA liệu pháp. Phần lớn các vector “cán xoong” được thiết kế

gần đây chỉ chứa một trình tự lặp lại đảo ngược ITR và một trình tự đóng gói. Tất cả các gen cần thiết của virus được cung cấp bởi virus hỗ trợ.

Vector virus này không hợp nhất vào nhiễm sắc thể tế bào và nó tồn tại như một episome ở trong nhân.

Adenovirus là một vector chuyển gen an toàn, có thể xâm nhiễm một cách hiệu quả vào các tế bào không phân chia và các tế bào đang phân chia của nhiều loại tế bào khác nhau do các loại tế bào đích này chứa các thụ quan phù hợp với adenovirus. Khi xâm nhiễm vào tế bào chủ, phần lõi mang genome virus và gen ngoại lai đi qua lỗ màng nhân. Trong nhân tế bào chủ, các gen của adenovirus và gen ngoại lai sẽ phiên mã và dịch mã trong tế bào chất để tạo nên các loại protein cần thiết cho virus và protein mong muốn do gen ngoại lai mã hóa. Hạn chế của vector adenovirus thứ nhất là giảm khả năng sinh miễn dịch và vị trí ở ngoài nhiễm sắc thể của nó làm cho sự biểu hiện gen chỉ nhất thời, không bền. Kết quả của một số nghiên cứu đã cho thấy rằng sự biểu hiện gen chuyển chỉ kéo dài từ một vài ngày đến một vài tuần.



Hình 1.12: Cơ chế hoạt động của vector adenovirus

Để khắc phục những vấn đề nêu trên, các thế hệ adenovirus thứ hai và thứ ba đã được tạo ra. Trong các vector này, gen E₄ (hoặc E₂) mã hóa nhiều protein của virus được loại bỏ để giảm sự biểu hiện các protein virus.

c. Ứng dụng của vector adenovirus

Adenovirus người thế hệ thứ nhất đã được sử dụng rộng rãi làm vector chuyển gen *in vivo* (Wilson, 1996). Các vector này đã được sử dụng để chuyển gen người *in vivo* vào tế bào mũi, tế bào phổi (CFTR cDNA), tế bào màng trong mạch, tế bào thận (Heikkila, 1996; Sukhatme, 1997), tim, gan, hệ thần kinh trung ương, cơ, các tế bào mô máu và tế bào ung thư (Jaffe, 1992; Engelhardt, 1993; Chen, 1994; Chang, 1995; Cussack, 1996; Simon, 1999). Merrrich (1996) đã so sánh tính lây nhiễm của adenovirus tái tổ hợp typ 5 tái bản không hoàn toàn ở các tế bào màng trong mạch trong môi trường nuôi cấy *in vitro*. Kết quả cho thấy trong môi trường nuôi cấy, sự lây nhiễm là tốt ở cả tế bào màng trong mạch của người và lợn.

1.1.6. Vector episome

Lợi thế của quá trình hợp nhất khi sử dụng vector này là DNA ngoại lai được truyền một cách ổn định cho thế hệ sau. Hạn chế chính là sự hợp nhất hiếm xảy ra. Một vấn đề khác là gen đã hợp nhất bị phụ thuộc vào hoạt động của môi trường chromatin của nó, làm thay đổi thường xuyên sự biểu hiện của gen chuyển. Mặt khác, số lượng bản sao hợp nhất bị hạn chế, nói chung là không vượt quá 10 và trong một số trường hợp không phải tất cả các bản sao này được phiên mã có hiệu quả.

Người ta đang mong muốn loại bỏ phần lớn các hạn chế này khỏi vector episome. Genome episome đã được phát hiện trong một số cơ thể sống. Đây là trường hợp đối với vi khuẩn chứa nhiều plasmid. Thỉnh thoảng các đoạn nhiễm sắc thể có nguồn gốc từ sự suy thoái cục bộ của nhiễm sắc thể được tìm thấy trong tế bào, đặc biệt trong một số tế bào khối u. Các đoạn nhiễm sắc thể này là các nhiễm sắc thể nhỏ (minute chromosome) được tái bản một cách độc lập và truyền lại cho các tế bào con. Các lớp virus khác nhau có genome tái bản một cách độc lập và truyền lại cho các tế bào con. Đây là trường hợp đối với các virus họ herpes.

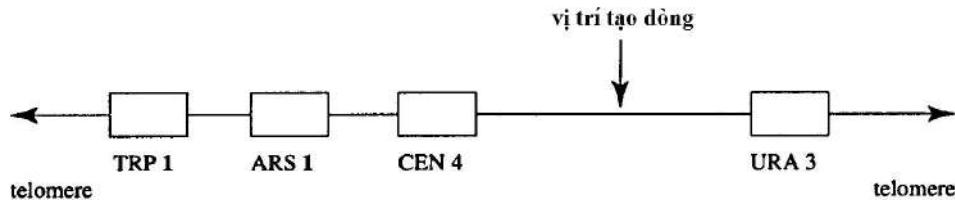
Genome episome phải chứa một số các yếu tố để được bền vững. Genome episome có dạng vòng hoặc dạng thẳng. Khi ở dạng vòng, thành phần nhỏ nhất của chúng là khởi điểm tái bản. Tại khởi điểm tái bản này sự tổng hợp DNA được bắt đầu như là một hệ thống làm cho nó có thể truyền genome tái bản đến các tế bào con. Genome episome dạng thẳng phải mang telomere ở cả hai đầu. Cấu trúc telomere này có mặt ở các đầu mút của các nhiễm sắc thể bình thường. Chúng thường xuyên bị suy thoái bởi exonuclease và được phục hồi lại nhờ một phức hợp enzyme đặc hiệu. Telomere bảo vệ nhiễm sắc thể khỏi bị suy thoái bởi exonuclease. Khi tế bào già hơn, sự tổng hợp telomere trở nên ít hiệu quả hơn dẫn đến suy thoái nhiễm sắc thể và sự chết của tế bào.

Các loại vector episome khác nhau có thể được thiết kế để tạo động vật chuyên gen. Chúng có kích thước tương đối nhỏ, chỉ mang các yếu tố tái bản và truyền lại cho các tế bào con. Một phương pháp khác bao gồm sự sử dụng các đoạn nhiễm sắc thể mang tất cả các yếu tố tự nhiên để chuyên gen cho thế hệ sau.

Các vector episome được biết rõ và sử dụng thường xuyên nhất là plasmid, cosmid, phage, BAC và YAC. Không có một loại vector nào có thể được sử dụng ở eukaryote bậc cao do các yếu tố của chúng không hoạt động trong các tế bào động vật. Các vector này được sử dụng chủ yếu là để xây dựng DNA và tạo DNA tái tổ hợp để nghiên cứu và chuyển vào tế bào động vật.

Các vector vi khuẩn chỉ chứa một khởi điểm tái bản. Số bản sao tạo ra sau khi tái bản DNA là đủ để cho phép truyền vector có tính thống kê đến các tế bào con.

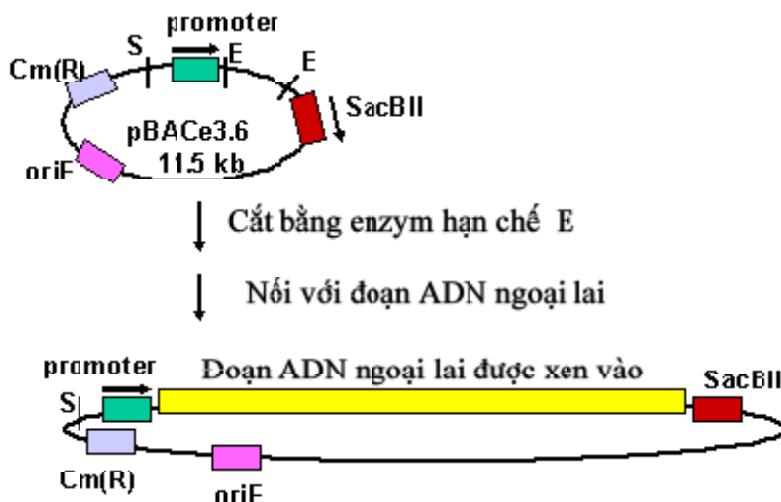
Vector YAC dạng thẳng đã được thiết kế (Hình 1.13). YAC chứa các telomere, một khởi điểm tái bản (ARS 1), một tâm động (CEN 4), một gen chọn lọc (Ura 3) và các vị trí tạo dòng. Vector này tương đối ngắn và dễ thao tác. Sở dĩ như vậy là do khởi điểm tái bản và tâm động ngắn. Khởi điểm tái bản của nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được tập trung trong một vùng genome ngắn trong khi ở *Saccharomyces pombe* khởi điểm tái bản dài đến trên vài nghìn base. Vector YAC có thể mang các đoạn DNA dài 1000kb và chúng có thể được thiết kế trong nấm men bằng tái tổ hợp tương đồng. Hạn chế chủ yếu của vector YAC là không ổn định (Giraldo và Montoliu, 2001).



Hình 1.13: Cấu trúc của vector YAC

Vector này chứa một khơi điểm tái bản DNA (ARS 1), một tâm động (CEN 4) làm cho nó có thể phân chia vector tái bản về các tế bào con, telomere bảo vệ DNA khỏi bị suy thoái bởi exonuclease, hai gen chọn lọc (TRP 1 và UR 3) và một vị trí tạo dòng mà có thể đưa vào một đoạn có kích thước lên đến 1000kb

Vector BAC đã được thiết kế để tái bản trong *E.coli* và chỉ hiện diện một bản sao trong mỗi tế bào. Chúng có thể mang các đoạn DNA có kích thước lên đến 250kb. Chúng có thể được xây dựng trong vi khuẩn bằng tái tổ hợp tương đồng. Điều này cho phép cả việc đưa các đoạn DNA ngoại lai vào trong vector cũng như loại bỏ chúng đi. Vector BAC hiện là công cụ tốt nhất cho việc chuẩn bị các cấu trúc mang các đoạn DNA có kích thước lớn để dùng cho việc tạo động vật chuyển gen (Giraldo và Montoliu, 2001) (Hình 1.14).



Hình 1.14: Sơ đồ cấu trúc vector BAC

Trong tế bào động vật, vẫn không thể tạo ra các vector ngắn mang các yếu tố tự nhiên đã tìm thấy trong nhiễm sắc thể. Khởi điểm tái bản ở genome động vật là các vùng xác định không tốt. Một số vùng đã được mô tả đặc điểm và được sử dụng để tái bản DNA trong tế bào nuôi cấy và trong chuột chuyển gen. Như thế đoạn DNA genome chứa vài nghìn bp là luôn được yêu cầu để khởi đầu một quá trình tái bản DNA. Một phương pháp khả thi là tạo dòng các đoạn DNA genome vào vector và chọn lọc các đoạn có khả năng tái bản cao nhất trong tế bào động vật. Thí nghiệm này đã cho thấy rằng tối thiểu một khởi điểm tái bản là có mặt trong một đoạn DNA động vật có kích thước khoảng 40kb (Kelleher, 1998).

Các khởi điểm tái bản là không thích hợp để cho một vector vòng được truyền một cách có hiệu quả đến các tế bào con và thế hệ động vật con. Một nghiên cứu được tiến hành cách đây vài năm cho thấy rằng vector chứa một hỗn hợp các khởi điểm tái bản động vật trong một plasmid có hiệu quả cao đối với việc tạo chuột chuyển gen. Vector này có thể được truyền từ chuột sang vi khuẩn, từ vi khuẩn sang phôi lợn và từ phôi lợn quay trở lại vi khuẩn (Attal, 1997). Tuy nhiên vector này không ổn định khi xen một gen vào trong nó. Hơn nữa nó không được duy trì trong suốt đời sống của chuột và không được truyền lại cho thế hệ con. Vì vậy vector này chứa một khởi điểm tái bản có hiệu quả đối với sự truyền lại có tính chất thống kê trong quá trình phân chia tế bào nhanh nhưng không có hiệu quả trong quá trình phân chia tế bào chậm. Điều này được giải thích là do vector này không mang bất kỳ yếu tố nào đóng vai trò của tâm động.

Nhiễm sắc thể eukaryote chứa các trình tự lặp lại ở phần trung tâm của chúng. Các trình tự lặp lại này bám vào bộ khung tế bào (cytoskeleton) trong suốt quá trình nguyên phân, cho phép các nhiễm sắc thể được phân chia về các tế bào con với phương thức thích hợp. Vùng tâm động đã được thêm vào một vài vector episome. Các đoạn tâm động rất dài tất nhiên được sử dụng và chúng mang tính đặc hiệu loài. Vì vậy không thể sử dụng chúng để thiết kế các vector ngắn.

Một số virus có genome dạng vòng tái bản với tần số cao trong tế bào động vật và vì vậy được truyền lại cho các tế bào con có tính chất thống kê. Đây là trường hợp của virus SV40.

Khởi điểm tái bản của virus SV40 đã được nghiên cứu kỹ. Khởi điểm này có kích thước ngắn nhưng cần có kháng nguyên T mã hoá bởi genome SV40 và các thành phần tế bào Linh trưởng để tái bản. Vector SV40 chuyển vào tế bào tổng hợp kháng nguyên T (tế bào Cos) được sử dụng phổ biến để biểu hiện gen ngoại lai với tần số cao. Vector này không tái bản trong các tế bào không thuộc bộ Linh trưởng và vì vậy không thể sử dụng để tạo động vật chuyển gen.

Virus herpes ở trạng thái tiềm sinh trong các tế bào nhiễm. Mỗi tế bào chứa một hoặc vài bản sao genome virus mà các bản sao này được truyền cho các tế bào con. Trong những trường hợp nhất định và đặc biệt khi cơ thể bị nhiễm suy giảm miễn dịch, genome virus tái bản với tần số cao gây ra trạng thái bệnh lý có liên quan. Đây là trường hợp đối với virus Herpes simplex, cytomegalovirus, virus Epstein-Barr và một số virus khác.

Các virus này có khởi điểm tái bản và một hệ thống tâm động giả (pseudocentromeric system). Hai yếu tố này đã được nghiên cứu một cách chi tiết ở virus Epstein-Barr (EBV). Các vùng có kích thước nhỏ nhất cần thiết cho sự tái bản của genome EBV và sự di truyền của chúng cho các tế bào con là vùng khởi điểm tái bản P (ori P) và gen EBNA 1 (Epstein-Barr nuclear antigen). Vùng khởi điểm tái bản P chứa hai vùng có chức năng riêng biệt. Cả hai đều bám vào protein EBNA 1. Một vùng của khởi điểm tái bản P làm đúng chức năng khởi điểm tái bản. Vùng thứ hai là cần cho sự truyền genome của virus cho các tế bào con.

Các kết quả nghiên cứu đã cho thấy rằng khởi điểm tái bản của EBV chỉ hoạt động ở tế bào Linh trưởng và chó. Khởi điểm tái bản EBV có thể bị mất và được thay thế bằng các đoạn DNA genome người hoặc các động vật có vú khác. Một số các đoạn DNA genome này chứa một khởi điểm tái bản cho phép vector tái bản và truyền lại cho các tế bào con ngay cả ở chuột chuyển gen (Kelleher, 1998). Tuy nhiên vẫn chưa có bằng chứng chứng minh rằng các vector ổn định và đã truyền lại cho thế hệ con.

Trong tất cả các trường hợp, vector EBV phải mang gen EBNA 1 và vùng khởi điểm tái bản P để cho protein EBNA 1 này bám vào. Hệ thống EBV EBNA 1-ori P không mang tính đặc hiệu loài. Các vector chứa phức hợp EBNA 1-ori P bám không đặc hiệu

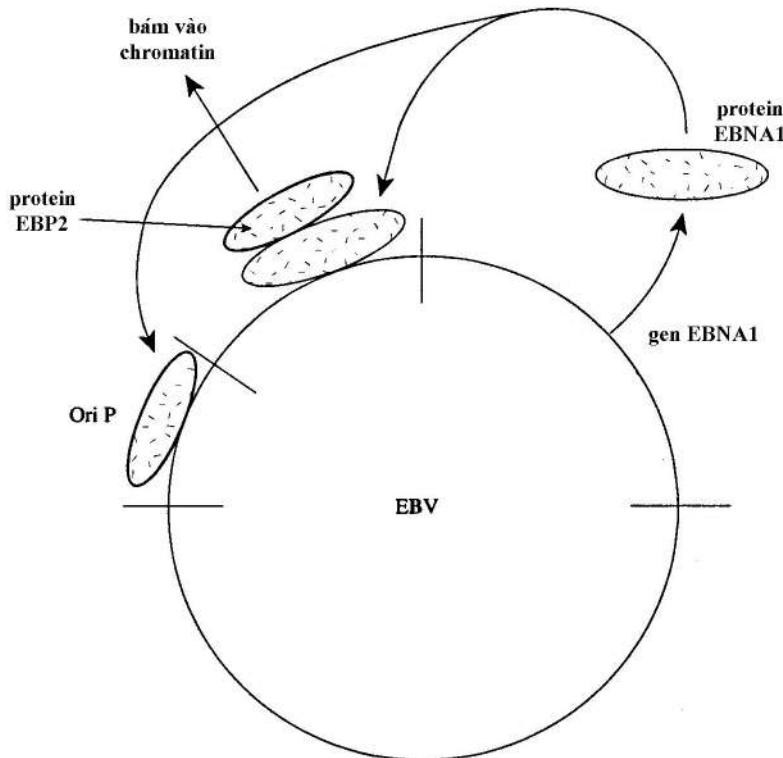
vào chromatin trong các tế bào eukaryote khác nhau. Một nghiên cứu mới đây cho thấy rằng EBNA 1 bám vào ori P và protein EBP 2 nhận ra các thành phần chưa biết được ở chromatin (Hình 1.15). Một vector vòng mang vùng ori P bám vào EBNA 1 và một khởi điểm tái bản nấm men đã được duy trì hoàn toàn hiệu quả ở nấm men biểu hiện cả các gen EBNA 1 và EBP người (Kapoor, Shire và Frappier, 2001). Điều này cho phép đưa ra giả thuyết là vector episome mang một khởi điểm tái bản hoạt động ở tế bào chuột và các gen mã hoá protein EBNA 1 và EBP 2 có thể được duy trì như vector vòng episome trong suốt đời sống của động vật và truyền lại cho thế hệ con. Genome EBV có kích thước 200kb và vector EBV có thể mang đoạn DNA ngoại lai có kích thước trên 100kb.

Vector chứa khởi điểm tái bản SV40 và một trình tự MAR cũng có khả năng duy trì ổn định như các episome trong tế bào nuôi cấy (Jenke, 2002).

Các loại vector này hiện đã được nghiên cứu ở các phòng thí nghiệm là các vector con thoi (shuttle) vì chúng mang cả hệ thống tái bản của prokaryote và eukaryote. Chúng có thể được truyền đến vi khuẩn đường ruột (intestine bacteria) và gieo rác vào trong môi trường. Điều này có thể tránh được một cách dễ dàng bằng cách loại bỏ khởi điểm tái bản của prokaryote.

Khả năng thiết kế các vector độc lập khác bao gồm sự sử dụng các đoạn DNA genome dài chứa các khởi điểm tái bản tự nhiên, một tâm động và các telomere. Các vector này là các nhiễm sắc thể nhân tạo của người (HAC), chỉ có thể có được sau khi xảy ra các đột biến ngẫu nhiên loại bỏ đi một phần lớn nhiễm sắc thể nhưng giữ lại các yếu tố nhỏ nhất để tạo ra một hệ thống tự chủ (Vos, 1998; Voet, 2001). Thao tác đối với vector này không dễ dàng và rất khó để đưa gen ngoại lai vào trong chúng. Hơn nữa, các đoạn genome dài này chứa nhiều gen có thể can thiệp vào sinh lý học động vật hoặc can thiệp vào gen quan tâm khi nó được thêm vào vector.

Nhiễm sắc thể chuột có kích thước 60Mb bao gồm DNA vây tinh quanh thể trung tâm của chuột đã được tạo ra trong một dòng tế bào lai động vật gâm nhâm/người. Cấu trúc này đã được duy trì trong một thời gian dài trong tế bào nuôi cấy, ở chuột chuyển gen và đã truyền lại cho thế hệ sau (Co, 2000).



Hình 1.15: Cấu trúc của vector episome vòng dựa trên genome virus Epstein-Barr (EBV)

Protein EBNA 1 được mã hoá bởi genome EBV bám vào một vùng khác của genome EBV. Protein EBNA 1 bám vào một protein của tế bào là EBP 2. Protein EBP 2 liên kết với các yếu tố không đặc hiệu của chromatin. Hệ thống giống như tâm động này cho phép truyền vector cho các tế bào con. Khởi điểm tái bản của EBV hoạt động hầu như riêng biệt trong các tế bào Linh trưởng.

Một nghiên cứu cách đây vài năm cho thấy rằng nhiễm sắc thể số 2 của người có thể được chuyển vào genome chuột. Nó đã tồn tại và truyền lại cho thế hệ sau. Nhiễm sắc thể số 2 của người đã được chuyển từ nguyên bào sợi người đến tế bào gốc chuột

bằng dung hợp tế bào. Các tế bào gốc phôi mang nhiễm sắc thể người được sử dụng để tạo chuột chuyển gen thể khuyết. Chuột chuyển gen thể khuyết này đã biểu hiện gen globulin miễn dịch (immunoglobulin) nằm trên nhiễm sắc thể số 2. Vì vậy có thể thu được các kháng thể đơn dòng người từ những con chuột này (Tomizuka, 1997).

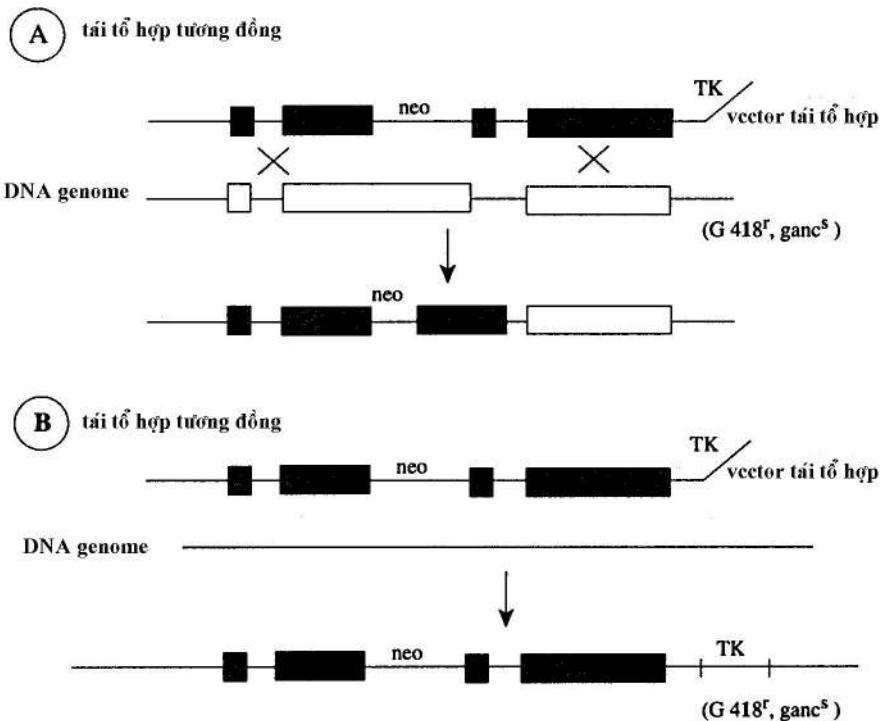
Vector episome sẽ hoàn toàn hữu dụng cho các nhà nghiên cứu, cho việc nghiên cứu gen trong các tế bào bị nhiễm cũng như đối với liệu pháp gen và việc tạo động vật chuyển gen.

1.2. Vector thay thế gen

Một tái tổ hợp tương đồng giữa hai đoạn DNA có thể xảy ra trong các cơ thể khác nhau nếu chúng mang một trình tự DNA chung. Ở vi khuẩn kích thước cần thiết của đoạn DNA này là một vài trăm bp, ở nấm men tối thiểu là 20-50bp và ở tế bào động vật là vài ngàn bp để gây nên tái tổ hợp tương đồng. Cơ sở của cơ chế tái tổ hợp tương đồng được mô tả ở hình 1.16. Nếu một trình tự tương đồng đơn có mặt trong genome và DNA ngoại sinh thì sự tái tổ hợp dẫn đến sự hợp nhất đích (targeted integration) của DNA ngoại lai (Hình 1.17). Nếu hai trình tự tương đồng khác biệt hiện diện trong DNA ngoại sinh thì hai tái tổ hợp tương đồng xảy ra một cách độc lập dẫn đến sự thay thế riêng biệt một vùng genome (Hình 1.16). Vì vậy một trình tự ngoại lai có thể được hợp nhất một cách chính xác vào vị trí đã cho của genome. Trình tự ngoại lai này có thể làm ngắt quãng gen đích, làm cho nó trở nên bất hoạt. Protocol này được gọi là *knock-out* gen. Trình tự ngoại lai có thể là một gen hoạt động có thể liên quan hoặc không liên quan với gen đích. Sự hợp nhất này được gọi là *knock-in* gen.

1.3. Vector sắp xếp lại các gen đích

Tái tổ hợp tương đồng trong một genome là sự kiện sinh lý quan trọng xảy ra trong các trường hợp khác nhau. Sự sắp xếp lại genome tạo ra các gen globulin miễn dịch hoạt động chức năng là một ví dụ. Thật là quan trọng để sắp xếp lại genome ở các vị trí mà không thể tiến hành một cách tự nhiên với một phương thức kiểm soát.

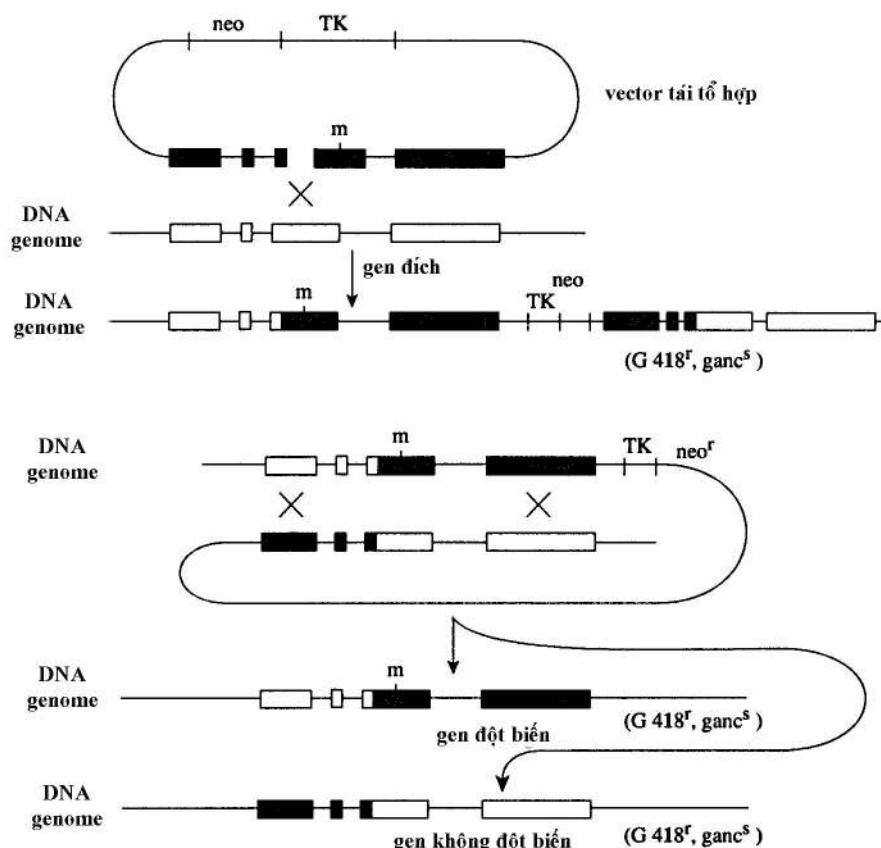


Hình 1.16: Sự chọn lọc dương tính và âm tính kép để tách chiết tế bào mà tái tổ hợp tương đồng xảy ra

- A. Tái tổ hợp tương đồng bao hàm sự hợp nhất của gen neo^r và loại đi gen TK. Các tế bào này là kháng với G418 và gancyclovir.
- B. Sau sự hợp nhất của vector vào một vị trí ngẫu nhiên, các tế bào kháng với G418 nhưng nhạy cảm với gancyclovir

Hai hệ thống không phát hiện thấy trong giới động vật đã được bổ sung để thực hiện điều này. Một hệ thống có nguồn gốc từ bacteriophage P1. Genome này chứa các trình tự LoxP với kích thước 34 bp, có khả năng tái kết hợp và mang tính đặc hiệu cao chỉ khi có mặt enzyme recombinase của phage Cre. Hệ thống thứ hai là tương tự một cách cơ bản nhưng có nguồn gốc khởi đầu từ nấm men. Trình tự FRT tái kết hợp với hiệu quả cao và mang tính đặc hiệu khi có mặt enzyme recombinase Flp. Hệ thống Cre-LoxP là phổ biến nhất và được sử dụng trong nhiều nghiên cứu khác nhau (Nagy, 2000). Các thể đột biến khác nhau của các trình tự LoxP, FRT đang được sử dụng để điều chỉnh hiệu quả và tính đặc hiệu của sự tái tổ

hợp. Hai loại enzyme recombinase cũng tồn tại dưới dạng các thê đột biến khác nhau. Trong thực tế, trình tự LoxP hoặc FRT phải được thêm vào cấu trúc của gen.



Hình 1.17: Sự thay thế gen bằng thê đột biến sử dụng tái tổ hợp tương đồng kép

Ưu điểm chính của các hệ thống LoxP và FRT là sự tái tổ hợp chỉ xảy ra khi có mặt recombinase. Các tế bào hoặc động vật có vùng DNA tiếp giáp với các trình tự LoxP thì không có recombinase. Các enzyme này có thể được bổ sung vào trong tế bào *in vitro* hoặc *in vivo* ở động vật chuyển gen bằng cách vi tiêm trực tiếp vào tế bào chất hoặc bằng phương pháp chuyển nhiễm (transfection method) đối với protein. Gen recombinase có thể được

đưa vào tế bào bằng vector adenovirus. Các vector này được tiêm vào mô của động vật chuyển gen mang vùng DNA tiếp giáp với các trình tự LoxP. Hơn nữa, plasmid chứa các gen recombinase cũng có thể được đưa vào phôi giai đoạn một tế bào hoặc vào các tế bào soma. Các plasmid này có ít cơ hội hợp nhất do cấu trúc dạng vòng của chúng. Chúng biến mất nhanh chóng trong quá trình nhân tế bào và sự có mặt của recombinase là nhất thời.

Các recombinase cũng có thể được truyền cho động vật chuyển gen bằng sự chuyển gen. Chuột chuyển gen mang gen recombinase có thể được lai với các dòng chứa vùng DNA tiếp giáp với trình tự LoxP.

Một cách lý tưởng, các gen recombinase không nên biểu hiện ở nhiều trường hợp trong tất cả các mô hoặc biểu hiện thường xuyên. Nếu điều này là cần thiết thì recombinase có thể được đặt dưới sự kiểm soát của các promoter hoạt động trong tất cả các loại tế bào. Trái ngược lại, các promoter đặc hiệu đối với từng mô có thể hạn chế sự tái tổ hợp LoxP trong tế bào mà các promoter này hoạt động. Hệ thống biểu hiện này đã kiểm soát bởi tetracycline và các dẫn xuất của tetracycline, cho phép gen recombinase chỉ được biểu hiện trong một loại tế bào và chỉ khi động vật có tetracycline.

Một bước điều hoà khác có thể thêm vào để kiểm soát recombinase Cre. Các gen dung hợp mang trình tự mã hoá recombinase Cre và một phần các thụ quan steroid đã được xây dựng. Protein dung hợp này chỉ hoạt động khi có mặt steroid và steroid đã gây ra sự biến đổi hình thể của protein.

Trình tự NLS (nuclear localization signal = tín hiệu định vị nhân) cho phép recombinase tập trung ở nhân và đạt hiệu quả ngay cả khi ở nồng độ thấp. Trường hợp này có thể xảy ra phụ thuộc vào tính đặc hiệu tế bào nhưng các promoter yếu đang được sử dụng để biểu hiện các gen recombinase.

Tất cả các hệ thống tinh vi này nhằm gây ra sự tái tổ hợp có thể càng chính xác để giống hệt như sự biểu hiện các gen tự nhiên hoặc để tạo ra các điều kiện thí nghiệm thích hợp nhất.

Điều quan trọng là tránh sự biểu hiện cao của gen recombinase. Các enyzme này bộc lộ một vài đặc tính đối với tế bào ở nồng độ cao, còn hầu như là thích hợp nhờ khả năng nhận biết các vị trí giống như LoxP hoặc FRT trong genome động vật.

2. Các vector sử dụng để chuyển gen ở thực vật

2.1. Các vector biến nạp vào tế bào thực vật sử dụng *Agrobacterium*

2.1.1. Sự gây ra các khối u do *Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens và *A. rhizogenes* là hai loài vi khuẩn sống trong đất gây ra bệnh khối u hình chóp (crown gall) (Hình 1.18 và hình 1.19) và bệnh lông rẽ (hairy root) ở các vị trí tổn thương của thực vật hai lá mầm.

Chỉ rất ít thực vật một lá mầm thuộc họ *Liliaceae* và *Amaryllidaceae* là dễ bị bệnh khối u hình chóp. Lý do giới hạn vật chủ này hiện nay còn chưa được biết. Một lần khởi đầu, sự sinh trưởng khối u có thể tiếp diễn khi vắng mặt vi khuẩn và mô khối u có thể được sinh trưởng vô trùng bằng nuôi cấy mô trong các môi trường thiếu sự bổ sung auxin và cytokinin ngoại sinh mà bình thường là cần thiết để xúc tiến sự sinh trưởng của mô thực vật *in vitro*. Mô khối u tổng hợp amino acid mới và các dẫn xuất của đường được biết chung là opine. Loại opine tổng hợp trong khối u (ví dụ như nopaline, octopine, agrocinopine, mannopine và agropine) phụ thuộc vào dòng *Agrobacterium* khởi đầu sự hình thành khối u. Octopine và nopaline là hai loại opine có nguồn gốc từ arginine và dễ dàng phát hiện nhất trong mô khối u hình chóp. Do đó nhiều dòng *Agrobacterium tumefaciens* phổ biến được thiết kế theo kiểu octopine hoặc nopaline. Agropine, một dẫn xuất của đường được tìm thấy phổ biến trong các khối u lông rẽ gây ra bởi *A. rhizogenes*. *Agrobacterium* chịu trách nhiệm đối với sự hình thành khối u dị hóa một cách có chọn lọc opine mà nó tổng hợp được và sử dụng opine như là một nguồn cacbon và nitơ.

Cả việc gây ra khối u và tổng hợp opine liên quan với sự có mặt của một loại plasmid có kích thước lớn là Ti-plasmid (Tumour inducing =Ti= gây ra khối u) trong tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens* và Ri-plasmid (Root inducing = Ri = gây ra lông rẽ) ở *A. rhizogenes*.

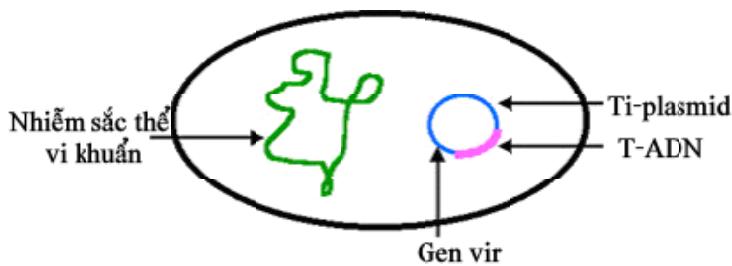


Hình 1.18: Bệnh khói u hình chóp ở cây mâm xôi (*Rubus*) do *A.tumefaciens* gây ra



Crown gall on apple branch

Hình 1.19: Các khói u hình chóp ở cành táo



Hình 1.20: Sơ đồ cấu trúc tế bào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

2.1.2. Ti-plasmid của *Agrobacterium tumefaciens*

Ti-plasmid (Hình 1.21A) được tìm thấy trong tất cả các dòng *A.tumefaciens* gây độc, có kích thước khoảng 200-250 kb. Chúng được duy trì ổn định trong *Agrobacterium* ở nhiệt độ dưới 30°C. Bằng phương pháp lai DNA-DNA và lập bản đồ chuỗi kép dị hợp (heteroduplex mapping), người ta đã xác định được Ti-plasmid có 4 vùng tương đồng. Kết quả phân tích di truyền cho thấy vùng T-DNA (transferred DNA) và vùng gây độc (virulence) liên quan đến sự hình thành khói u trong khi hai vùng khác liên quan đến sự tiếp hợp và sự tái bản của plasmid trong *Agrobacterium*.

Trong khi hình thành khói u, T-DNA được chuyển vào tế bào thực vật và hợp nhất với genome nhân. T-DNA ổn định trong

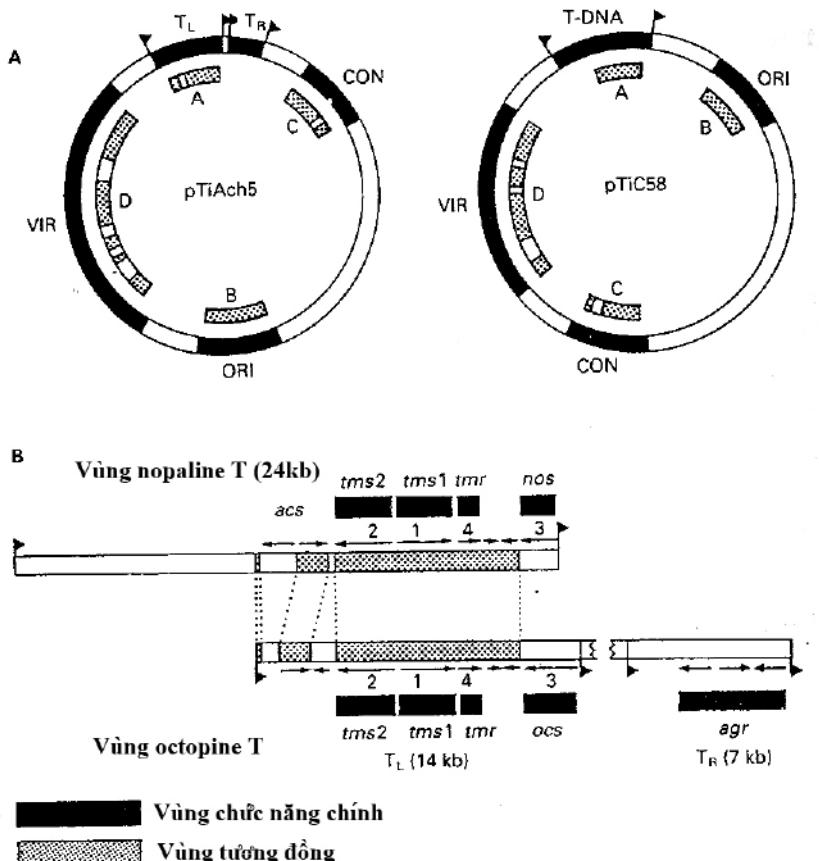
genome nhân. Lai Ti-plasmid với DNA của khói u đã cho thấy T-DNA trong tế bào thực vật là tương ứng song song với T-DNA trong Ti-plasmid của *Agrobacterium*. Kết quả này chứng tỏ không có sự sắp xếp lại vị trí của T-DNA trong lúc khói u được tạo thành. Một hoặc nhiều bản sao của T-DNA có thể có mặt ở các đoạn lặp nối tiếp. Chúng cũng có thể tách ra và liên kết với các vùng khác nhau của DNA thực vật. Vị trí hợp nhất của T-DNA vào DNA thực vật là hoàn toàn ngẫu nhiên. Các vùng tương đồng với T-DNA đã được tìm thấy ở các Ti-plasmid khác nhau (Hình 1.21B). Trong các dòng *A.tumefaciens* kiểu nopaline được sử dụng phổ biến. Vùng T-DNA có kích thước khoảng 24 kb. Ở một số khói u hình chóp kiểu octopine, hai đoạn không kề nhau đã được tìm thấy là T_L và T_R . T_L có kích thước 14 kb, có mặt trong tất cả các dòng tế bào đã biến nạp và có chức năng tương đương với T-DNA ở các dòng tế bào nopaline. T_R có kích thước 7 kb, được hình thành từ phía bên phải của T_L -DNA trong Ti-plasmid, không phát hiện thấy trong tất cả các dòng khói u nhưng khi số bản sao của nó khác với T_L người ta giả thiết là đã xảy ra một quá trình chuyển đổi lặp.

T-DNA được phiên mã trong các tế bào khói u (Hình 1.23B), tạo ra nhiều mRNA polyadenyl. Các loại sản phẩm phiên mã của T-DNA tích lũy lại là tương đối thấp so với các mRNA của thực vật khác. Giải trình tự T-DNA kiểu nopaline đã cho thấy có 13 khung đọc mở lớn (open-reading frame) trong khi ở T_L -DNA và T_R -DNA kiểu octopine tương ứng là 8 và 6. Các sản phẩm phiên mã phía cánh phải của T-DNA kiểu nopaline có chức năng tương đương với các sản phẩm phiên mã phía cánh phải của T_L -DNA (Hình 1.21B). Toàn bộ sự tổ chức của các gen trên T-DNA và các vùng lân cận là tương tự với các gen của genome eukaryote mặc dù chúng không chứa intron. So sánh các trình tự, sự phát sinh đột biến mất đoạn và gen nhảy cũng như sự tăng sinh của các sản phẩm gen riêng lẻ ở *E.coli* đã được sử dụng để phát hiện ra chức năng một số sản phẩm gen được mã hóa bởi T-DNA. Một gen ở trong vùng T_L octopine mã hóa enzyme octopine synthase. Ở Ti-plasmid nopaline, các gen opine synthase bao gồm nopaline synthase (*nos*) và agrocinopine synthase (*acs*). Trong Ti-plasmid octopine, vùng T_R mã hóa hai protein chịu trách nhiệm đối với sự tổng hợp manopine và một sản phẩm của gen xúc tác cho sự biến đổi ngược manopine thành agropine. Locus *tmr*

mã hóa một enzyme liên quan đến hệ thống cytokinin và sự đột biến ở đây dẫn đến sự tăng sinh rễ từ các khối u hình chóp đã gây ra ở một số loài (các thể đột biến rễ). Các locus *tms 1* và *tms 2* liên quan đến sự tổng hợp không điều hòa của auxin và sự đột biến một trong hai locus gây nên sự tăng sinh chồi từ các khối u hình chóp ở nhiều loại thực vật (các thể đột biến chồi). Vì vậy, T-DNA mang các gen (*tms 1*, *tms 2* và *tmr*) mà sản phẩm của chúng không chịu sự điều hòa bình thường của các con đường chuyển hóa thực vật liên quan đến sự tổng hợp phytohormone và điều này gây ra kiểu hình ung thư. Do đó các gen *tms 1*, *tms 2* và *tmr* được xem là các gen ung thư. Tuy nhiên cần lưu ý rằng các gen được mã hóa bởi T-DNA không đòi hỏi phải chuyển T-DNA vào tế bào thực vật và cũng không duy trì sự ổn định của nó trong genome thực vật.

2.1.3. Ri-plasmid của *Agrobacterium rhizogenes*

Sự khởi đầu của bệnh lông tơ do *A.rhizogenes* tương tự như sự biến nạp nhò *A.tumefaciens*. Dưới sự kiểm soát của vùng gây độc, hai vùng phân tán của Ri-plasmid được chuyển vào genome thực vật (Huffman, 1984; De Paolis, 1985). Các vùng này có tên là T_L (T-left T-DNA) và T_R (T-right T-DNA). T_R T-DNA chứa các gen sản xuất opine (mannopine hoặc agropine) và các dòng được định rõ đặc điểm nhờ các gen opine đặc trưng của chúng (De Paolis, 1985). Mặt khác T_R T-DNA còn chứa hai gen mã hóa cho sự tổng hợp auxin. Các gen này tương đồng rất cao với các gen auxin của *A.tumefaciens* và cho thấy có thể bổ sung thêm các dòng mang các gen auxin đột biến của chúng (Offringa, 1986). T_L T-DNA không tương đồng với T-DNA của *A.tumefaciens* (Huffman, 1984). Toàn bộ T_L T-DNA của đã được giải trình tự và nó chứa tối thiểu 11 khung đọc mở, tương tự với các khung đọc mở đã được tìm thấy ở genome của eukaryote. Chúng có promoter và các yếu tố polyadenine hóa cần thiết để thực hiện chức năng khi chuyển vào trong genome thực vật (Simpson, 1986). Các gen này không tương đồng với bất kỳ gen nào



Hình 1.21: Cấu trúc và sự biểu hiện của Ti-plasmid kiểu octopine và nopaline

A. Bản đồ của Ti-plasmid kiểu octopine (pTiAch5) và kiểu nopaline (pTiC58) cho thấy vị trí tương đối và kích thước của các vùng chức năng chính.

Các vị trí tô đậm chí các vùng tương đồng lớn của 2 plasmid.

//: Các đoạn lặp trực tiếp 25 bp; CON: vùng mã hóa chức năng tiếp hợp
ORI: vùng mã hóa chức năng tái bản và khởi điểm tái bản

B. Bản đồ của vùng T kiểu nopaline và octopine cho thấy các vùng chức năng chính, các vùng tương đồng và các sản phẩm phiên mã.

Các sản phẩm phiên mã đã được biết là: 3(nos): nopaline synthase; 3(ocs): octonopaline synthase; acs: agrocinopine synthase; 1(tms 1): tryptophan mono-oxygenase; 2(tms 2): indole-3-acetamide hydrolase; 4(tmр): DMA transferase; agr: 3 sản phẩm phiên mã cần cho sự tổng hợp agropine.

đã biết và cũng không có sự tương đồng có ý nghĩa nào đối với T-DNA (kiểu octopine) của *A.tumefaciens*. T_R T-DNA là không cần thiết đối với sự duy trì kiểu hình lông tơ. Tuy nhiên ở nhiều loài, các dòng *Agrobacterium* có cả T_L và T_R T-DNA là độc nhiều hơn so với các dòng chỉ mang một T-DNA (Vilaine và Case-Delbart, 1987).

2.2. Cơ chế chuyển T-DNA

Các vùng T-DNA của cả *A.tumefaciens* và *A.rhizogenes* đều nằm ở bên cạnh các đoạn lặp trực tiếp 25 bp (Hình 1.11) và các điểm kết thúc của T-DNA đã hợp nhất trong genome thực vật nằm sát với các trình tự này. Trình tự liên ứng của biên T-DNA là GGCAGGATATT^{C/GA/G} G^{T/G}TCTAA^{A/TT/C}. Hầu hết các nghiên cứu cơ chế chuyển T-DNA từ *Agrobacterium* vào tế bào thực vật đã được tiến hành ở *A.tumefaciens*. Việc loại bỏ bờ phải của Ti-plasmid kiểu nopaline đã làm mất sự hình thành khối u, nhưng khi đoạn oligonucleotid tương đồng với bờ phải được tạo dòng với sự định hướng chính xác với Ti-plasmid thiếu bờ phải thì sự hình thành khối u lại được phục hồi (Wang, 1984), cho thấy rằng các trình tự lặp 25 bp phân cực và tác động đều (cis-acting).

Sự tiếp xúc của *Agrobacterium* với các hợp chất giải phóng từ mô thực vật bị tổn thương đã làm cho vùng vir của Ti-plasmid phiên mã (Hình 1.22). Trong quá trình này một chất có hoạt tính hóa học cao và đặc trưng đã được nhận biết là acetosyringone. Gen vir A và gen vir C được biểu hiện ở vi khuẩn sinh trưởng sinh dưỡng mặc dù gen vir C chỉ được phiên mã ở mức độ thấp. Khi *Agrobacterium* gặp dịch rỉ của các tế bào thực vật bị tổn thương, hoặc acetosyringone tinh khiết, sản phẩm của gen vir A (có thể liên kết với màng) sẽ nhận diện và tương tác với acetosyringone và truyền tín hiệu ngoại bào vào trong tế bào này làm hoạt hóa sản phẩm của gen vir C. Sau đó protein vir C đã biến đổi hoạt hóa làm cho các gen vir B, C, D và E không hoạt động và làm tăng cường sự phiên mã của gen vir C.

Sự cảm ứng gen vir xảy ra nhờ sự xuất hiện các điểm đứt sợi đơn trong các trình tự biên 25 bp nằm ở mép của T-DNA (Stachel và Zambryski, 1986; Albright, 1987) và sự xuất hiện phân tử sợi đơn mạch thẳng tương ứng với T-DNA (Hình 1.22). Các sản phẩm của operon vir D có hoạt tính endonuclease (Yanofsky, 1986). Bằng một

cơ chế tương tự sự tiếp hợp của vi khuẩn, T-DNA được chuyển sang tế bào thực vật và xen một cách ổn định vào DNA nhân (Stachel và Zambryski, 1986). Sự kiện này có thể liên quan đến protein được mã hóa bởi operon vir E (Winans, 1987). Mô hình mô tả các sự kiện xảy ra ở mức phân tử trong sự tương tác giữa tế bào thực vật và *Agrobacterium* để hình thành khối u hình chóp được trình bày ở hình 1.22.

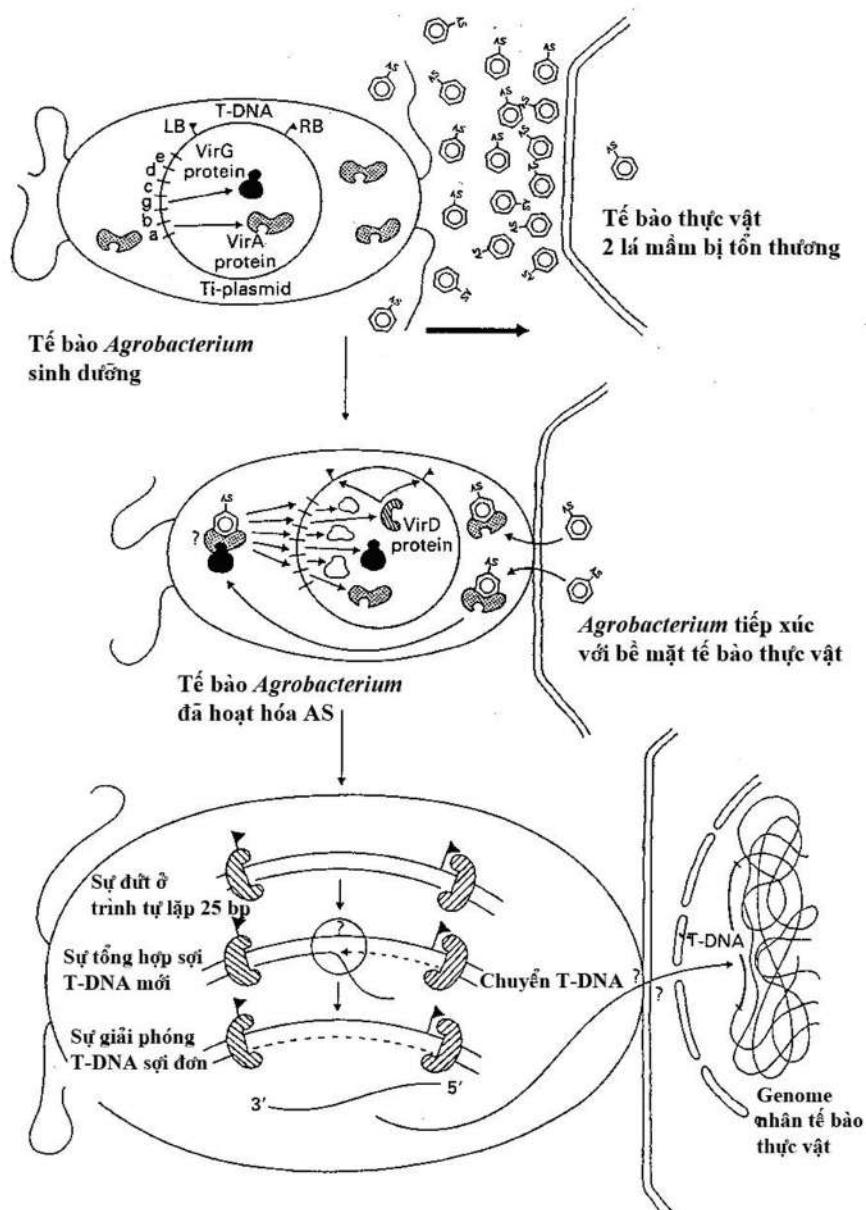
2.3. Plasmid *Agrobacterium* là vector biến nạp

Khả năng chuyển một cách tự nhiên các trình tự DNA xác định vào genome thực vật của *Agrobacterium* đã được sử dụng vào việc phát triển các vector biến nạp thực vật. Các vector này lợi dụng một số đặc tính bẩm sinh của *Agrobacterium* là quá trình biến nạp trung gian (mediated transformation process). Vào đầu thập niên 1980, một số nhóm nghiên cứu Ti-plasmid đã loại bỏ tất cả các gen *onc* của T-DNA. Khám phá quan trọng thứ nhất là các gen *onc* này không cần thiết đối với việc chuyển T-DNA vào tế bào thực vật và không hợp nhất vào DNA nhân. Vì vậy các gen này có thể được thay thế. Nó không chỉ cho phép xen DNA ngoại lai vào mà còn cho phép loại bỏ các chức năng của gen *onc*. Tuy nhiên cần lưu ý rằng, *nos* hoặc *ocs* là các gen marker hữu ích đối với sự biến nạp bởi vì hoạt tính enzyme của các sản phẩm gen của chúng có thể được phát hiện bằng một xét nghiệm đơn giản. Cho đến nay, giới hạn kích thước của đoạn DNA xen vào chưa được công bố. Sự kiện quan trọng thứ ba là sự khám phá các sản phẩm của gen vir còn hoạt động chức năng trong trans. Cuối cùng, T-DNA không gây ung thư có mặt trong toàn bộ thực vật tái sinh được truyền lại cho thế hệ sau theo kiểu di truyền Mendel.

2.4. Các thành phần cơ bản của vector Ti-plasmid không gây ung thư

Đặc điểm của chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium* là bất kỳ DNA nào đã tạo dòng đều có thể được chuyển vào genome của tế bào thực vật hai lá mầm. DNA ngoại lai phải được nằm ở mép các trình tự biến của T-DNA và duy trì ổn định trong dòng *Agrobacterium* mang nhóm bô sung đầy đủ của các gen vir dạng cis hoặc trans (định vị trên plasmid hỗ trợ gây độc phân tán). Các gen trên nhiễm sắc thể của *Agrobacterium* kết hợp với vùng gây độc đã

được mô tả và có liên quan với việc vi khuẩn nhận ra một thành phần của bề mặt tế bào thực vật, rồi gắn vào sau đó.



Hình 1.12: Sự tương tác giữa *Agrobacterium* với tế bào thực vật và cơ chế chuyển T-DNA

Để nhận ra các tế bào đã được biến nạp, các gen trội kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn đã được xen vào trong các trình tự lặp 25 bp dưới sự kiểm soát của T-DNA promoter và các tín hiệu polyadenyl hóa. Các gen kháng thuốc kháng sinh dạng khám như thế biểu hiện một cách có hiệu quả trong tế bào thực vật ở bất kỳ môi trường di truyền nào. Việc liên kết một cách chặt chẽ các gen marker với DNA ngoại lai có 2 lợi ích: thứ nhất là để chọn lọc trực tiếp các mô thực vật đã được biến nạp DNA ngoại lai vào một cách chắc chắn; thứ hai là đảm bảo DNA ngoại lai trong các dòng biến nạp đặc trưng đã chọn lọc không xen vào vùng genome không được phiên mã.

2.5. Các vector biến nạp thực vật không gây ung thư dựa trên Ti-plasmid

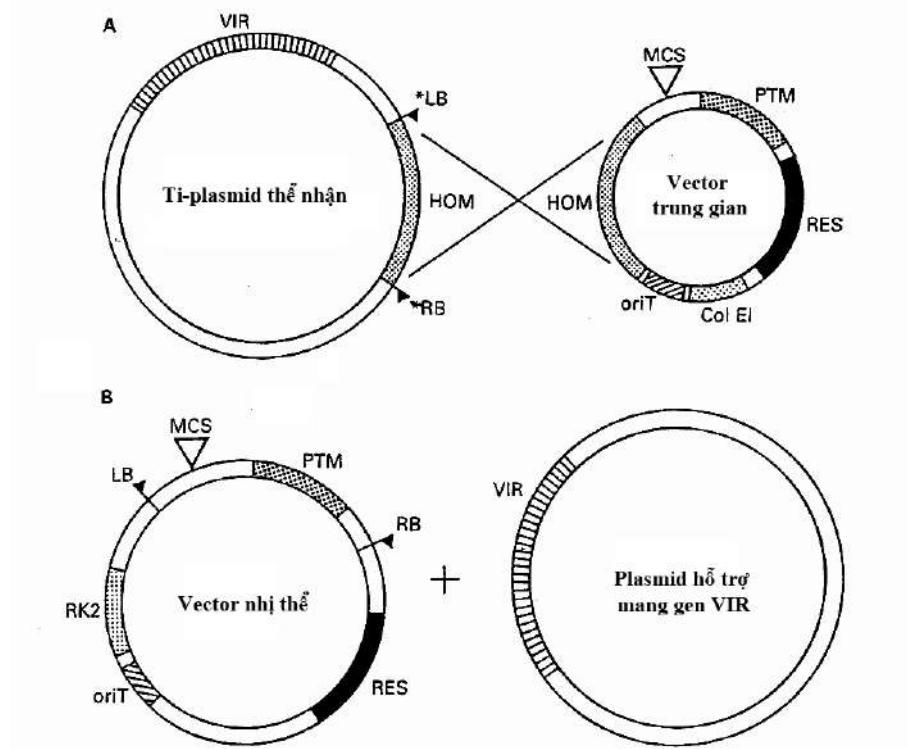
Cả *A.tumefaciens* và *A.rhizogenes* đều được sử dụng để chuyển DNA ngoại lai vào tế bào thực vật. Nhiều vector biến nạp dựa trên Ti-plasmid đã được phát triển (Bảng 1.1 và bảng 1.2). Các vector này không chứa bất kỳ trình tự ung thư nào và vì vậy tế bào thực vật có thể sinh trưởng bình thường sau khi chuyển DNA vào nhân của nó. Các vector không gây ung thư hiện đang sử dụng có thể được chia làm hai loại là cis và trans, dựa vào việc có hay không các vùng T-DNA nằm ở mép các trình tự lặp trực tiếp 25 bp trên cùng đơn vị tái bản (replicon) như các gen vir hoặc trên một plasmid phân tán (Hình 1.13). Trước đây, loại vector thường được đề cập đến là vector liên hợp (co-intergrative vector), tuy nhiên gần đây vector nhị thể (binary vector) là phổ biến hơn.

2.5.1. Cis vector

Đây là các vector có nguồn gốc từ Ti-plasmid kiểu dài mà gen *onc* trên T-DNA đã được loại bỏ và trong một số trường hợp được thay thế bằng một đoạn DNA đặc hiệu có vùng tương đồng với một vector tạo dòng nhỏ mà chỉ có thể tái bản ở *E.coli*. Chiết lược vector này phụ thuộc vào sự liên hợp trong *A.tumefaciens* giữa các vùng tương đồng trên Ti-plasmid đã sửa đổi (hỗ trợ mang gen vir) và một vector tạo dòng nhỏ ở *E.coli* (vector trung gian) mang gen marker

chọn lọc sẽ hoạt động chức năng trong các tế bào thực vật và các trình tự duy nhất cho việc xen DNA ngoại lai vào.

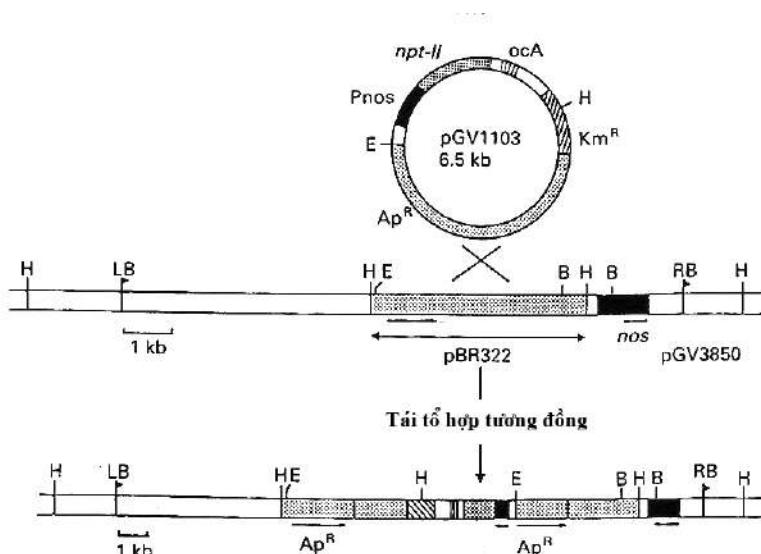
Vector trung gian mang trình tự DNA ngoại lai thường được đưa vào *A.tumefaciens* bằng sự tiếp hợp và sử dụng sự chọn lọc thích hợp sẽ thu được thể nhận tiếp hợp với DNA ngoại lai đã ổn định trong T-DNA là kết quả của tái tổ hợp tương đồng (Hình 1.23A).



Hình 1.23: Sơ đồ hệ thống vector liên hợp (A) và vector nhị thể (B)

VIR: vùng gây độc; HOM: các vùng tương đồng trong đó sự tái bản có thể xảy ra đôi với sự liên hợp; LB: biên trái; RB: biên phải; MCS (multicloning site): các trình tự tạo dòng; PTM: marker biến nạp thực vật; RES: marker kháng thuốc kháng sinh để chọn lọc đối với sự có mặt của các trình tự vector trong vi khuẩn chủ; oriT: khởi điểm chuyển; ColE1: khởi điểm tái bản từ plasmid ColE1; RK2: vùng có phô khởi điểm tái bản rộng, có nguồn gốc từ pKR2

Ở một số vector như pGV3850 (Hình 1.24), cả hai biên của T-DNA là ở trên Ti-plasmid đã sửa đổi. Trong các vector như pGV2260 (Debleare, 1982), các trình tự lặp 25 bp là ở trên vector trung gian, trong khi ở vector pTiBS3-SE (Fraley, 1985), biên phải là ở trên vector trung gian và biên trái ở trên gen vir của plasmid. Bất kỳ ở đâu trong các vị trí khởi đầu của các trình tự lặp 25 bp, kết quả thực sau khi liên hợp là sự xen các trình tự DNA ngoại lai ở biên T-DNA lặp lại trên Ti-plasmid đã sửa đổi. Vì vậy ở các dòng *A.tumefaciens* mang cấu trúc này, T-DNA được chuyển vào genome thực vật trong suốt sự biến nạp là kết quả hoạt động của vùng vir dạng cis.



Hình 1.24 : Cấu trúc và sự sử dụng vector liên hợp pGV3850

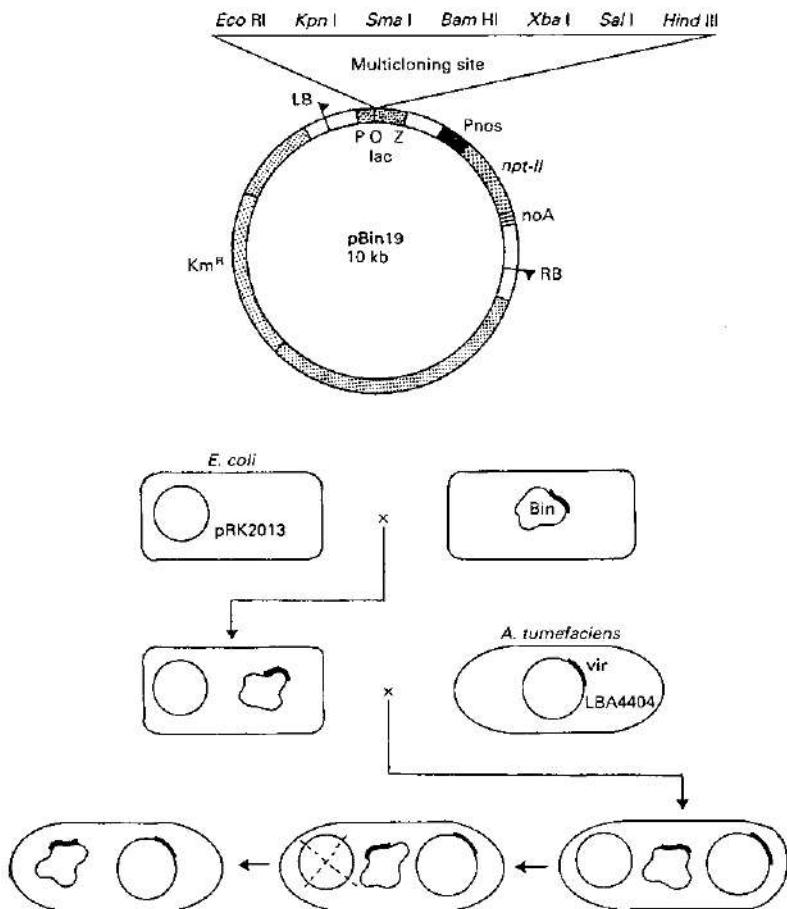
Bản đồ cho thấy cấu trúc của vector biến nạp thực vật pGV3850 và vector trung gian pGV1103 và kết quả của việc hợp nhất pGV1103 vào pGV3850. LB: biên trái; RB: biên phải; Pnos: promoter nopaline synthetase; npt-II: trình tự mã hóa neomycin phosphotransferase-II từ Tn5; ocA: trình tự polyadenyl hóa octopine synthase; E: EcoRI; H: HindIII; B: BamHI; nos: nopaline synthase; Ap^R: gen kháng ampicillin; Km^R: gen kháng kanamycin

Một ví dụ chi tiết về vector cis là pGV3850 (Zambryski, 1983). Vector này đã được loại bỏ các gen *onc* của Ti-plasmid kiếu nopaline (C58) và thay bằng pBR322 (Hình 1.25). Bất kỳ trình tự DNA ngoại lai nào đã được tạo dòng trong pBR322 đều có thể đưa vào pGV3850 bằng quá trình chuyển vào *Agrobacterium* theo cách tiếp hợp tái tổ hợp bao gồm hai bước. Trước hết pBR322 mang gen cần chuyển và một marker kháng thuốc kháng sinh cho phép chọn lọc *Agrobacterium* (kanamycin hoặc streptomycin/spectinomycin) được đưa vào dòng *E. coli* chứa hai plasmid hỗ trợ pGJ28 và pRGdrd11. Các plasmid này cung cấp ColE1 có chức năng hỗ trợ, cho phép chuyển cả 3 plasmid vào *Agrobacterium* qua tiếp hợp. Tuy nhiên pBR322 không thể tái bản trong *Agrobacterium* và vì vậy nó sẽ không được bảo tồn, nhưng sự tái tổ hợp có thể xảy ra giữa pBR322 và pGV3850 làm cho gen quan tâm được chuyển vào Ti-plasmid. Thể nhận tiếp hợp có thể được chọn lọc nhờ tính kháng do plasmid mã hóa và tính kháng rifampicin do nhiễm sắc thể của *Agrobacterium* mã hóa.

2.5.2. Vector nhị thể

Vector trans hoặc vector nhị thể được dựa trên các plasmid có thể tái bản ở cả *E. coli* và *Agrobacterium* và các plasmid này có chứa các trình tự biên của T-DNA (Hình 1.23B). Các vector này có thể được thiết kế sao cho các trình tự biên cạnh MCS cho phép xen DNA ngoại lai vào và các marker cho phép chọn lọc trực tiếp các tế bào thực vật đã được biến nạp. Plasmid có thể được thao tác ở trong *E. coli* và được chuyển vào qua sự tiếp hợp với các dòng *Agrobacterium* mang plasmid có chứa vùng vir nhưng thiếu T-DNA và các trình tự lặp 25 bp. Các plasmid như thế thường là các thể đột biến mất đoạn đơn giản của Ti-plasmid octopine kiếu dại hoặc kiếu nopaline (Bảng 1.2). Việc chuyển DNA ngoại lai trên vector tạo dòng vào tế bào thực vật có thể được thực hiện do hoạt động chức năng của vùng vir.

pBin19 là một vector nhị thể phổ biến dựa trên đơn vị tái bản (replicon) vật chủ mở rộng của pRK252 (Hình 1.25A). Vì vậy nó có thể tái bản trong cả *E. coli* và *Agrobacterium*, cho phép xen DNA ngoại lai vào vector và sàng lọc trong *E. coli* trước khi chuyển vào *Agrobacterium*. Vector này chứa marker kháng kanamicin (Km^r)



Hình 1.25 : Cấu trúc và sự sử dụng vector nhị thể pBin19

A. Bản đồ của vector nhị thể pBin19

LB: biên trái; RB: biên phải; lac: vùng bô sung α của operon lac; Pnos: promoter gen nopaline synthetase; npt-II: trình tự mã hóa neomycin phosphotransferase-II từ Tn5; nosA: trình tự polyadenyl hóa gen nopaline synthase.

B. Sự xâm nhập của pBin19 vào *A.tumefaciens* LBA4404 sử dụng plasmid hỗ trợ pRK2013 và sau đó loại bỏ plasmid hỗ trợ trong *Agrobacterium*.

giúp chọn lọc trực tiếp ở trong vi khuẩn cũng như các trình tự biên T-DNA ở cạnh một marker chọn lọc trội với mục đích sử dụng trong

các tế bào thực vật (một gen kháng kanamicin nằm cạnh promoter nos và trình tự poly(A) thêm vào) và một MCS ở trong vùng bô sung α của β-galactosidase. Sự sàng lọc các thể tái tổ hợp có thể được tiến hành ở Lac⁻ *E.coli* nhờ sự bô trợ α với sự có mặt của IPTG và X-GAL (Groneborn và Messing, 1978). Vector này có thể được đưa vào *Agrobacterium* bằng sự tiếp hợp sử dụng các chức năng hỗ trợ của pKR2013. *Agrobacterium* chủ LBA4404 chứa Ti-plasmid (pLBA4404) đã loại bỏ T-DNA nhưng vùng vir vẫn không đổi. Thể nhận tiếp hợp có thể được chọn lọc nhờ tính kháng kanamicin và rifampicin.

Ví dụ về hệ thống vector nhị thể được trình bày ở bảng 1.2. Các vector nhị thể này khác nhau về kích thước, sự tái bản ổn định trong *Agrobacterium*, các vị trí tạo dòng, sự bô trợ α để có thể sàng lọc plasmid tái tổ hợp trên các đĩa X-GAL, các gen marker để chọn lọc các thực vật biến nạp và các gen marker để chọn lọc các thể nhận tiếp hợp, nhưng phần lớn được biết là thích hợp với một số plasmid hỗ trợ mang gen vir của *A.tumefaciens* cũng như với nhiều Ri-plasmid.

2.6. Vector biến nạp thực vật sử dụng *A.rhizogenes*

Các vector này được sử dụng lần đầu tiên khi biến nạp vào các loại thực vật mà sự tái sinh toàn bộ cơ thể từ các tế bào đơn lẻ là khó khăn. Ở một số loài, sự tái sinh cơ thể có thể xảy ra từ sự nuôi cấy rễ gây ra bởi *A.rhizogenes* thông qua sự phát triển phôi soma hoặc sự phát sinh cơ quan. Cơ chế kiểu hình lông rễ bị ức chế làm phát sinh hình thái chồi hiện nay chưa rõ. Thực vật tái sinh từ lông rễ thường bị biến đổi hình thái: lá bị gấp nếp, hệ thống rễ ăn nghiêng, sinh trưởng cằn cỗi và khả năng sinh sản kém.

2.6.1. Vector liên hợp

Đây là vector trung gian được thiết kế cho phép thao tác ở *E.coli* và chứa vùng T-DNA của Ri-plasmid. Sự dẫn nhập vector vào *A.rhizogenes* mang một Ri-plasmid bình thường làm ổn định các trình tự của vector trung gian là kết quả của tái tổ hợp tương đồng nội phân tử trong Ri-plasmid (Jensen, 1986).

2.6.2. Vector nhị thể

Vector nhị thể đã loại bỏ hết khả năng gây hại có nguồn gốc từ *A.tumefaciens* (Bevan, 1984; Van den Elzen, 1985) có thể đưa vào *A.rhizogenes* và sẽ tái bản ổn định miễn là sự chọn lọc được duy trì. Sau đó nhiễm *A.rhizogenes* mang vector nhị thể với thực vật sẽ làm chuyển T-DNA từ vector nhị thể cùng với T-DNA của *A.rhizogenes* vào genome thực vật (Shalin, 1986; Simpson, 1986). Các gen này khi chuyển vào genome thực vật được định vị ở giữa các trình tự biên của vector nhị thể. Các trình tự biên của vector nhị thể này có tác dụng sau khi sự cảm ứng của vùng vir của Ri-plasmid kiểu dại ở ngay tại chỗ (Simpson, 1986; Trulson, 1986). Điều này có thể xảy ra là do độ tương đồng lớn, ở mức DNA, giữa các vùng gây độc (virulence region) của *A.tumefaciens* và *A.rhizogenes* (Huffman, 1984).

Gần đây lông tơ (hairy root) cà chua và dưa chuột đã được tạo ra bởi *A.rhizogenes* kiểu dại mang vector nhị thể với marker chọn lọc Km^r. Thể tái sinh từ môi trường nuôi cây lông rẽ kháng kanamycin này đã được sàng lọc đối với thực vật kiểu hình bình thường và một số đã được phục hồi mà thiếu T-DNA của *A.rhizogenes* nhưng có mặt T-DNA của vector nhị thể (Shalin, 1986; Trulson, 1986) là do sự chuyển đổi lập của các T-DNA tách rời. Đặc tính này của *A.rhizogenes* làm cho nó trở nên hấp dẫn như là một vector biến nạp nếu như quá trình này có thể được mở rộng đối với nhiều loại cây trồng khác.

Tài liệu tham khảo chính

- Makrides SC. 2003. Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. Elsevier Science B. V. USA.
- Louis-Marie H. 2003. Animal Transgenesis and Cloning. John Wiley and Sons, Ltd. USA.
- Leland HH, Leroy H, Michael LG, Ann ER, Lee MS, Ruth CV. 2000. Genetics, The McGraw-Hill Companies, Inc. USA.
- Winter PC, Hickey GI, Fletcher HL. 1998. Instant Notes Genetics. Printed by Biddles Ltd, Guildford. UK.

Glick BR, Jackj P. 1994. Molecular Biotechnology. ASM Press. Washington D.C. USA.

Chopra VL, Anwan N. 1990. Genetic Engineering and Biotechnology. Oxford and IBH Publishing CO.PVT, Ltd. UK.

John D, Roderick S, Philip A, Richard W. 1988. Plant Genetics Transformation and Gene Expression (A Laboratory Manual). Blackwell Scientific Publications. UK.

Chương 2

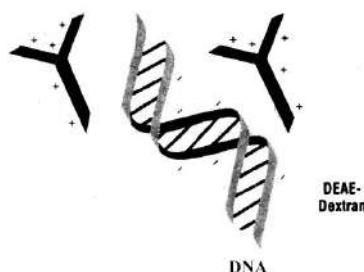
Các phương pháp chuyển gen

Nhiều phương pháp khác nhau đã được phát minh để đưa gen vào tế bào và mô động vật và thực vật. Kỹ thuật đơn giản nhất là chuyển DNA tràn bắn vi tiêm (microinjection), xung điện (electroporation), súng bắn gen. Các phương pháp phức tạp và hiệu quả hơn bao gồm sử dụng các phức hợp lipid-DNA (liposome), vector virus, tế bào gốc phôi, chuyển gen gián tiếp nhờ vi khuẩn *Agrobacterium*, chuyển gen bằng súng bắn gen... Tuỳ thuộc vào đối tượng chuyển gen mà người ta lựa chọn phương pháp chuyển gen phù hợp.

I. DEAE-dextran

DEAE-dextran là một polycation. Đây là tác nhân hóa học đầu tiên được sử dụng để chuyển DNA vào tế bào động vật nuôi cấy.

Trong phương pháp này, DNA ngoại lai được cho vào một trường nuôi cấy với sự có mặt của DEAE-dextran. DEAE-dextran sẽ kết hợp với DNA tích điện âm (Hình 2.1). Sự dư thừa điện tích dương trong phức hợp DNA-polycation do sự đóng góp của polycation, cho phép phức hợp này đi đến kết hợp chặt chẽ hơn với màng tế bào tích điện âm. Sự xâm nhập của phức hợp có thể đạt được nhờ sự nhập bào (endocytosis).



Hình 2.1: Sự kết hợp giữa DEAE-dextran và DNA

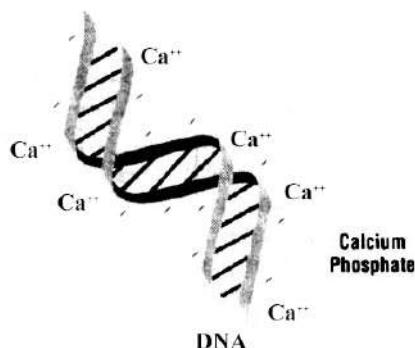
Phương pháp này được sử dụng thành công trong việc chuyển DNA vào các tế bào biểu hiện nhất thời, có nghĩa là thời gian biểu hiện ngắn chỉ vài ngày trong quá trình nghiên cứu. Tuy nhiên, phương pháp này nói chung là không hữu ích đối với các nghiên cứu cần sự chuyển nhiễm ổn định dựa vào sự hợp nhất của DNA ngoại lai vào nhiễm sắc thể, hiệu quả biến nạp thấp, chỉ được sử dụng cho một số loại tế bào và cho kết quả tốt đối với tế bào *ex vivo*.

Các polycation khác cũng đã được sử dụng để chuyển DNA vào tế bào như polybrene, polyethyleneimine và dendrimers.

II. Kỹ thuật calcium phosphate

Kỹ thuật calcium phosphate (calcium phosphate technique) đã được phát triển đầu tiên là để xác định sự lây nhiễm của DNA virus (Graham, 1973) và hiện nay được sử dụng rộng rãi để thử nghiệm hoạt động biến nạp của DNA virus cũng như DNA tách chiết từ các tế bào eukaryote (Wigler, 1978; Graham, 1979; Pellicer, 1980).

Kỹ thuật này yêu cầu ủ các tế bào nhận với các chất đồng kết tủa DNA và calcium phosphat (Hình 2.2). Kết tủa này bám vào tế bào và sau đó sẽ hấp thụ vào tế bào qua quá trình ảm bào (Loyter, 1982). Trong tế bào, các phân tử DNA ngoại lai nằm trong không bào được tạo thành do ảm bào và lysosome thứ hai nhưng rất ít DNA đi đến nhân và hợp nhất vào genome chủ.



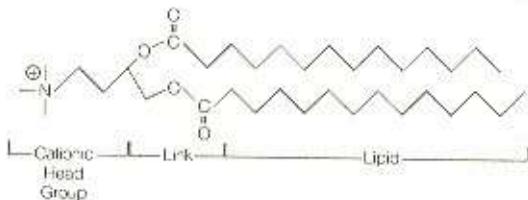
Hình 2.2: Phức hợp DNA-calcium phosphat

Cho đến nay, đây là kỹ thuật vô cùng có giá trị đối với các nghiên cứu chuyển gen vào các tế bào soma nuôi cấy và đang được sử dụng nhiều để chuyển các dòng genome vào tế bào đích. Tỉ lệ các tế bào được biến nạp ổn định của kỹ thuật này là tương đương với phương pháp vi tiêm nhưng khác với vi tiêm là nhiều tế bào được biến nạp cùng một lần. Hơn nữa, biến nạp DNA tách chiết từ các tế bào ung thư vào các tế bào nhận không ung thư đã cho thấy đây là phương pháp duy nhất để nghiên cứu sự kiểm soát di truyền của ung thư. Phương pháp này được sử dụng phổ biến bởi vì đơn giản, protocol dễ thực hiện, ít tốn kém, số tế bào chết sau biến nạp không đáng kể, sự biểu hiện gen có thể là nhất thời hoặc ổn định và quan trọng trong việc thiết kế vector virus tái tổ hợp. Tuy nhiên hiệu quả biến nạp và mức độ biểu hiện của gen chuyển thấp.

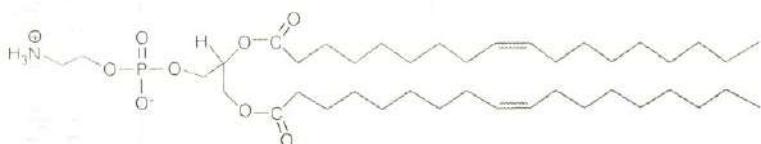
III. Chuyển gen qua liposome

Vào thập niên 1980, liposome nhân tạo đã được sử dụng để đưa DNA vào tế bào. Lipid với toàn bộ lưới tích điện dương ở pH sinh lý là thành phần lipid tổng hợp phổ biến nhất của liposome được phát triển cho chuyển gen (Hình 2.3). Thường thì lipid cation được trộn với một lipid trung tính như L-dioleoyl phosphatidyl-ethanolamine (DOPE) (Hình 2.4). Phần cation của phân tử lipid kết hợp với DNA tích điện âm và kết quả là chứa đầy DNA trong phức hợp liposome-DNA (Hình 2.5). Đối với các tế bào nuôi cấy, toàn bộ lưới tích điện dương của phức hợp liposome-DNA nói chung là gây ra hiệu quả chuyển gen cao hơn bởi vì nó cho phép phức hợp này kết hợp với màng tế bào tích điện âm bền hơn. Nhờ cơ chế nhập bào, các phức hợp xuất hiện trong endosome và sau đó đi vào nhân (Hình 2.6). Chưa rõ DNA được phóng thích từ endosome và đi qua màng nhân như thế nào. DOPE được xem là một lipid kích thích sử dụng hợp và vai trò của nó là phóng thích các phức hợp này từ endosome cũng như làm cho sự dụng hợp của màng tế bào phía ngoài với phức hợp liposome-DNA xảy ra dễ dàng. Trong phương pháp này, các đại phân tử trước hết được đưa vào trong các túi phospholipid. Các loại túi khác nhau đã được mô tả, nhưng túi một lớp mỏng là thích hợp nhất cho chuyển gen vì chúng có tỉ lệ khoảng trống chứa nước ở bên trong tương đối cao đối với mỗi đơn vị lipid và bởi vì chúng có tỉ lệ

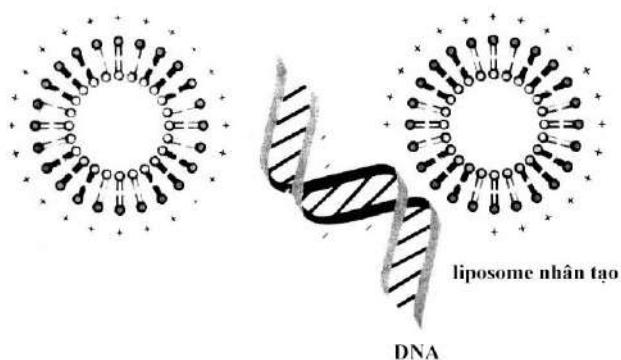
phân phối cao hơn. Sự dung hợp của liposome với màng plasma là một sự kiện hiếm. Hiệu quả bén nạp của phương pháp này thấp hơn so với phương pháp vi tiêm vào tiền nhâm. Các nỗ lực nghiên cứu đang được tiến hành để tìm ra các điều kiện thí nghiệm mà có thể làm tăng sự phỏng thích các phân tử đã kết nang từ con đường âm bào.



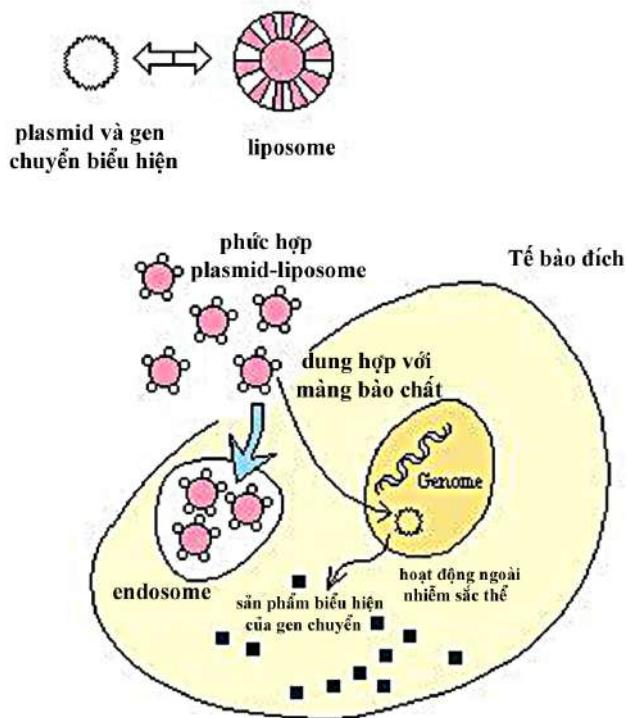
Hình 2.3: Cấu trúc tổng quát của lipid cation tổng hợp



Hình 2.4: Cấu trúc của DOPE (L-dioleoyl phosphatidylethanolamine)



Hình 2.5: Phức hợp liposome-DNA



Hình 2.6: Sơ đồ hoạt động của vector liposome

Liposome đã được sử dụng để đưa protein, lipid và các phân tử nhỏ vào nhiều loại tế bào nuôi cấy, tuy nhiên hiệu quả thấp hơn vi tiêm đối với RNA hoặc protein. Cũng như thế, chuyển gen qua liposome và sự biểu hiện của gen chuyển là không vượt qua được các phương pháp chuyển gen thông thường (như hệ thống virus), sự biểu hiện gen chuyển thường nhất thời, sự ức chế bởi các thành phần của huyết thanh có thể xảy ra. Bên cạnh đó, kỹ thuật này có nhiều ưu điểm là gen chuyển sẽ không hợp nhất vào genome chủ, có hiệu quả tốt đối với cả tế bào *in vitro* và *in vivo*, có thể mang được các DNA có kích thước rất lớn, độ tinh khiết cao, không gây miễn dịch, có thể sử dụng với các tế bào mà biến nạp bằng kỹ thuật calcium phosphat không có hiệu quả..

Ứng dụng trong tương lai của kỹ thuật này chủ yếu sẽ là khả năng phân phôi thuốc vào các tế bào của cơ thể sống. Hiện nay kỹ thuật này đang được phát triển để cải tiến sự phân phôi đặc hiệu của liposome bằng cách ghép các kháng thể đặc hiệu với bề mặt của liposome đích.

IV. Phương pháp vi tiêm

Sự thành công đầu tiên trong nghiên cứu tạo chuột chuyển gen bằng phương pháp vi tiêm vào tiền nhân đã được công bố vào năm 1980 (Gordon, 1980). Mặc dù cấu trúc tổ hợp gen chuyển được chứng minh là đã tích hợp vào genome của chuột, nó đã được sắp xếp lại nhưng gen ngoại lai không được biểu hiện. Các công bố tiếp theo (Brister, 1981; Costantini và Lacy; 1981) chứng minh rằng với phương pháp vi tiêm, các gen chuyển đã tích hợp và có khả năng biểu hiện. Vào năm 1982, lần đầu tiên sự thay đổi kiểu hình có thể nhìn thấy ở chuột nhắt chuyển gen đã được mô tả (Palmiter, 1982). Đây là kết quả biểu hiện của gen hormon sinh trưởng chuột công ở chuột nhắt. Từ đó đến nay đã có rất nhiều các công trình về chuyển gen, trong đó phần lớn là các nghiên cứu hiệu quả của gen vi tiêm với sự sinh trưởng của động vật có vú và bệnh học.

Nguyên tắc của phương pháp vi tiêm là một lượng nhỏ DNA được tiêm trực tiếp vào nhân tế bào phôi trần hoặc tế bào nguyên vẹn một cách cơ học dưới kính hiển vi. Phương pháp này cho phép đưa gen vào đúng vị trí mong muốn ở từng tế bào với hiệu quả tương đối cao. Tuy nhiên do đòi hỏi phải tinh vi, tỉ mỉ và cực kỳ chính xác nên hạn chế số lượng tế bào vi tiêm và ngoài ra còn có thể làm tổn thương đến tế bào phôi do tác nhân cơ học gây ra khi tiến hành vi tiêm.

Để biến nạp gen vào tế bào bằng phương pháp vi tiêm trước hết phải chế tạo kim tiêm và kim giữ. Kim được tạo ra từ những ống thuỷ tinh dẻo capillar đường kính 0,1-1,5 mm có sợi bằng wolfram mảnh ở trong nhờ hệ thống thiết bị làm kim. Hệ thống này gồm có máy kéo kim tự động (pipette puller), máy mài kim và máy gia cố kim.

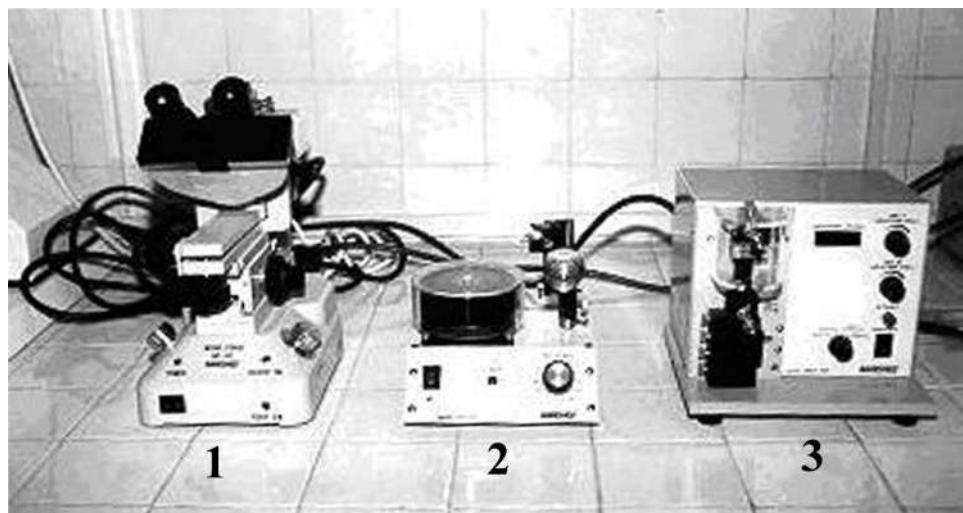


Hình 2.7: Vi tiêm gen ngoại lai vào tiền nhân của trứng thụ tinh

Để tạo kim tiêm trước hết phải tạo ra đầu kim nhọn nhờ máy kéo kim. Sau đó sử dụng máy gia cố để cắt đầu nhọn của ống capillar sau khi kéo tạo ra mũi kim tiêm có đường kính thích hợp. Đường kính bên trong mũi kim tiêm tuỳ thuộc vào loại tế bào chuyển gen. Đối với trứng tiền nhân động vật có vú có đường kính khoảng 70 µm thì đường kính của kim tiêm khoảng 0,75 µm là thích hợp, đối với phôi cá một tế bào đường kính của kim tiêm là khoảng 3-4 µm. Cuối cùng đưa kim lên máy mài để làm sắc nhọn và trơn láng đầu kim (Hình 2.8).

Kim giữ được chế tạo từ những ống capillar có đầu nhẵn bình thường để cố định trứng trong quá trình vi tiêm. Để tạo kim giữ, dùng máy kéo kim tự động để tạo ra đầu kim nhỏ sau đó dùng bút kim cương hoặc sợi platin đốt nóng cắt bớt đầu nhọn để tạo ra đầu kim với đường kính thích hợp. Làm nhẵn đầu kim giữ bằng cách để đứng kim này ngay trên mặt đoạn cong platin của máy gia cố. Đốt nóng sợi platin và điều chỉnh đầu kim giữ cho nó chảy tự từ. Quan sát dưới kính hiển vi và dừng lại khi đầu kim đã đạt yêu cầu.

Vi tiêm được tiến hành trên hệ thống thiết bị vi tiêm (Hình 2.9). Hệ thống này gồm có hai bộ phận chính là kính hiển vi và máy vi thao tác.



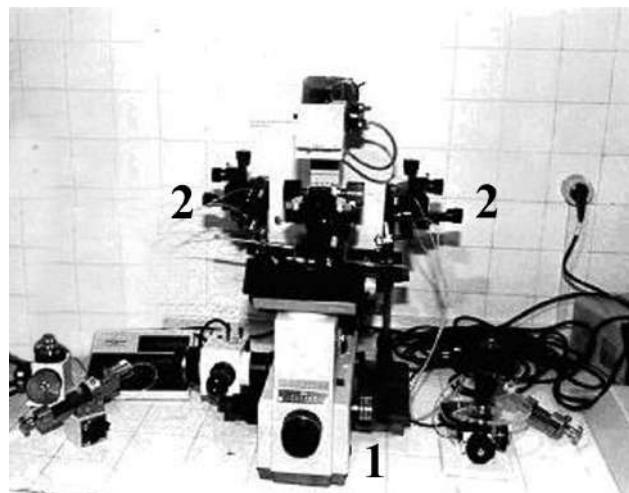
Hình 2.8 : Các máy làm kim (Hãng Narishige)

1. Máy gia cỗ kim Microforge
2. Máy mài kim
3. Máy kéo kim tự động Pipette Puller

Kính hiển vi dùng cho mục đích này là kính hiển vi soi ngược (vật kính xoay ngược lên). Độ phóng đại thích hợp cho việc tiến hành vi tiêm vào phôi cá một tế bào là khoảng từ 40-60 lần. Máy vi thao tác gồm 2 phần giống hệt nhau được bố trí hai bên kính hiển vi, một dùng để điều chỉnh kim tiêm, một dùng cho kim giữ. Tính năng của máy này là cho phép điều chỉnh các kim theo không gian 3 chiều. Kim tiêm và kim giữ được lắp vào máy vi thao tác và được nối với syringe qua ống bằng chất dẻo được nạp đầy dầu parafin.

Chuẩn bị dung dịch gen chuyển: gen chuyển được xen vào trong một vector plasmid và tạo dòng trong *E.coli*. Các vi khuẩn biến nạp mang plasmid tái hợp được phát hiện trong môi trường

nuôi cấy có thuốc kháng sinh do plasmid mang các gen kháng thuốc đặc hiệu. Các vi khuẩn sống sót được sinh trưởng trong môi trường dinh dưỡng thích hợp và plasmid tái tổ hợp mang gen chuyển sẽ được sao chép mỗi khi tế bào vi khuẩn phân chia. Sau đó, hàng triệu bản sao của plasmid tái tổ hợp mang gen chuyển được tách chiết từ các tế bào vi khuẩn này và các đoạn gen chuyển được tách ra từ plasmid tái tổ hợp nhờ sử dụng enzym hạn chế. Để



Hình 2.9: Máy vi thao tác Olympus (Hãng Narishige)

1. Kính hiển vi soi ngược 2. Máy vi điều chỉnh

tinh sạch, gen chuyển được điện di trên gel agarose. Hoà tan gen chuyển trong dung dịch đệm đặc trưng (như dung dịch Tris-EDTA; dung dịch TE...) và tính nồng độ dung dịch gen chuyển nhờ quang phổ kế. Nồng độ dung dịch DNA sử dụng cho vi tiêm thường là 1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Trước khi chuyển vào phôi, gen chuyển được kiểm tra sự biểu hiện trong các tế bào nuôi cấy bằng sự chuyển nhiễm (transfection).

Vi tiêm được tiến hành qua các bước: nạp gen vào kim tiêm bằng phương pháp capillar (ngâm đầu kim tiêm vào dung dịch gen khoảng 10-12 giờ) hoặc bơm trực tiếp dung dịch gen vào, lắp kim tiêm và kim giữ vào máy vi thao tác, chuyển trứng tiền nhân vào đĩa

petri có chứa môi trường được đặt dưới kính hiển vi, giữ trứng tiền nhân vào đầu kim giữ bằng lực hút của syringe, điều chỉnh kính hiển vi để xác định đĩa phôi và điều chỉnh máy vi thao tác để đưa kim tiêm vào vị trí của trứng tiền nhân, đẩy gen vào trứng tiền nhân bằng cách vặn nhẹ syringe. Khi thấy trứng tiền nhân hơi phồng to và trở nên sáng hơn thì dừng lại và kéo nhanh kim tiêm ra. Trứng tiền nhân sau khi tiêm được di chuyển xa đến cuối đĩa petri trước khi tiêm trứng tiền nhân tiếp theo. Mỗi một nhóm trứng tiền nhân đã hoàn thành được chuyển sang một đĩa môi trường khác để ấp và đánh giá bằng mắt trong một vài tiếng. Sau đó tất cả các trứng tiền nhân được nhìn thấy rõ ràng và được chuyển vào ống dẫn trứng của con cái nhận.

Cho đến nay, trong các kỹ thuật chuyển gen vào động vật thì phương pháp vi tiêm dung dịch DNA vào hợp tử là phương pháp có hiệu quả nhất trên động vật có vú và hiện là phương pháp chủ yếu được sử dụng để chuyển gen vào vật nuôi.

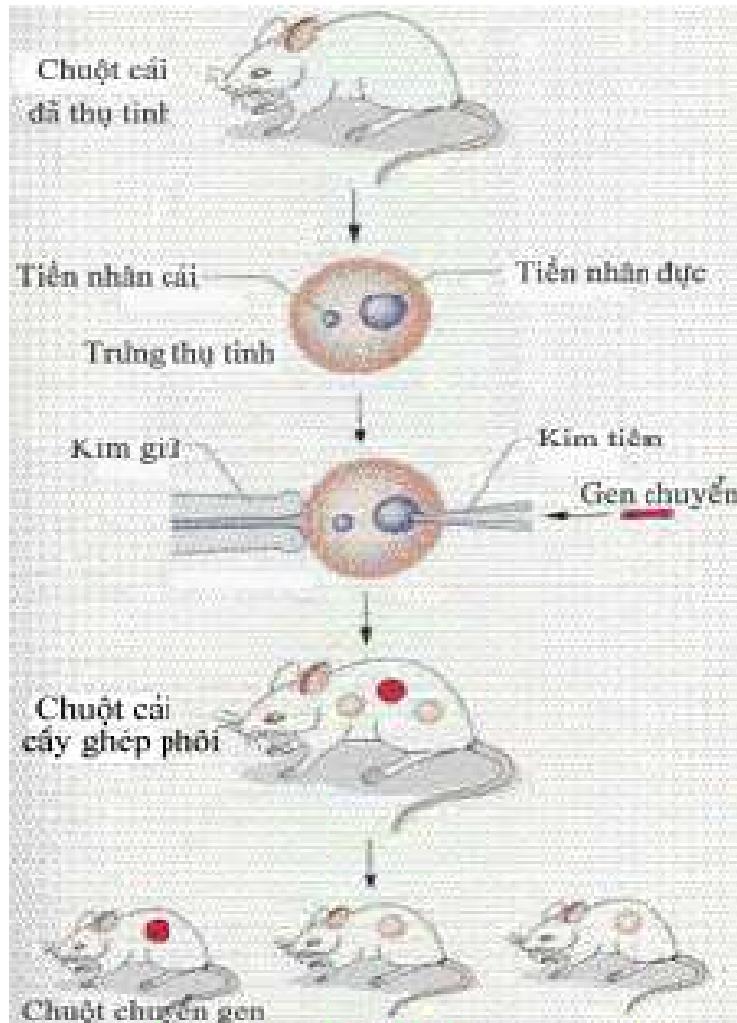
Đối với thực vật thì phương pháp này được sử dụng đối với các tế bào tiền phôi của hợp tử hoặc các tế bào tiền phôi của hạt phấn.

Tuy nhiên sự xâm nhập của gen chuyển vào DNA tế bào vật chủ là một quá trình ngẫu nhiên và xác suất để gen chuyển xen vào vị trí DNA vật chủ mà sẽ cho phép nó biểu hiện là thấp. Hiệu quả của vi tiêm là không cao (Bảng 2.1).

Bảng 2.1: Hiệu quả vi tiêm ở một số loài động vật

(Hammer và cộng sự, 1985)

Loài động vật	Số lượng trứng được vi tiêm	Số lượng con sinh ra từ trứng vi tiêm	Số lượng con chuyển gen
Thỏ	1907	218 (11,4%)	28 (1,5%)
Cừu	1032	73 (7,1%)	1(0,1%)
Lợn	2035	192 (9,4%)	20 (1%)



Hình 2.10: Chuyển gen bằng vi tiêm

V. Phương pháp chuyển gen nhờ vector virus

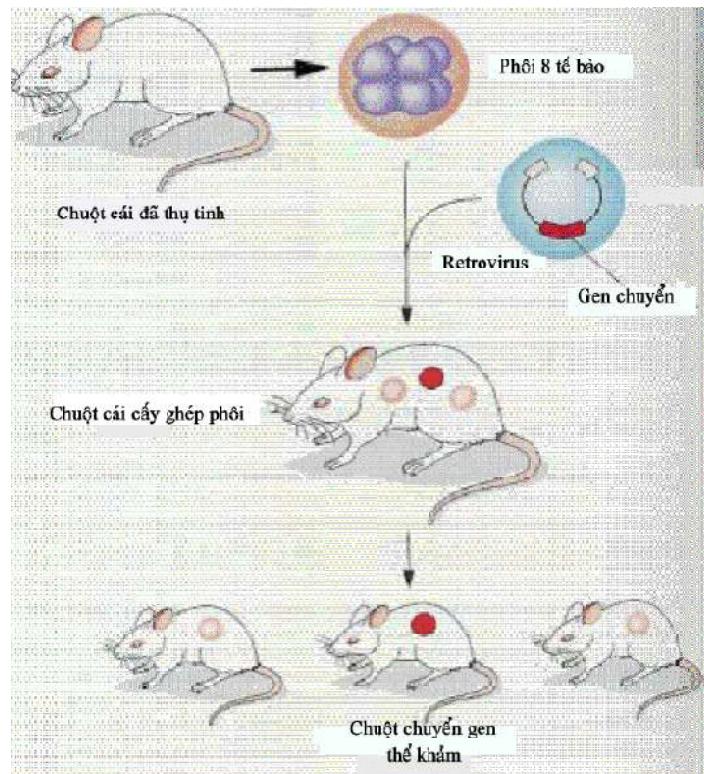
Vào năm 1974, lần đầu tiên các nhà khoa học phát hiện thấy rằng, sau khi tiêm DNA của retrovirus SV40 vào khoang phôi (blastocoel) của túi phôi chuột, DNA này có thể được tìm thấy sau đó trong các tế bào của chuột trưởng thành (Jaenisch, 1974; Jaenisch và Mintz, 1974). DNA provirus Mo-Mulv sử dụng trong các thí nghiệm như thế này đã tích hợp vào genome và truyền lại cho thế hệ

sau, do đó đã tạo nên các dòng chuột ổn định (Stuhlmann, Jahner và Jaenisch, 1981). Từ đó, việc sử dụng virus làm vector cho các DNA ngoại lai đã được phát triển.

Phương pháp này tuy thao tác hơi phức tạp nhưng có ưu điểm là hiệu quả chuyển gen cao. Hơn nữa gen cấu trúc gắn vào vector virus sẽ sử dụng promoter của virus, các promoter này thường có hoạt tính cao do đó gen cấu trúc này sẽ được biểu hiện mạnh trong tế bào chủ.

Về nguyên tắc, bất kỳ loại virus nào cũng có thể được sử dụng làm vector để chuyển vật liệu di truyền vào trong tế bào. Nhiều nhóm trong số đó, các papovavirus, adenovirus, retrovirus...được sử dụng vào những mục đích chuyên biệt. Để sử dụng làm vector, các phần khác nhau của genome virus được thay thế bằng gen cấu trúc quan tâm. Virus có thể được sử dụng để lấy nhiễm vào tế bào giai đoạn sớm của phôi trước khi được chuyển ghép vào con mẹ. Gen chuyển với vector retrovirus xâm nhập một cách hiệu quả vào hệ gen của vật chủ nhưng virus sử dụng phải là virus an toàn, không gây bệnh.

Các cơ thể chuyển gen sinh ra từ phương pháp này là ở dạng khám, có nghĩa là không phải tất cả các tế bào của cơ thể đều mang retrovirus. Gen chuyển chỉ có thể di truyền được nếu retrovirus hợp nhất vào một số tế bào sinh dục. Đối với phương pháp này tỉ lệ sống của các động vật chuyển gen sơ sinh là rất thấp. Nếu như các thao tác di truyền là chuẩn xác, không gây ra sự sẩy thai, thì thế hệ động vật đầu tiên (F_1) cần kiểm tra sự biểu hiện của gen chuyển. Khi gen chuyển đã hợp nhất trong các tế bào sinh dục thì được gọi là thế khám dòng mầm và sau đó chúng được lai cùng dòng khoảng 10-20 thế hệ cho đến khi thu được các động vật chuyển gen đồng hợp tử và gen chuyển có mặt ở trong tất cả mọi tế bào. Ở giai đoạn này, phôi mang gen chuyển có thể được đông lạnh và được bảo quản cho các quá trình cấy chuyển về sau.



Hình 2.11: Chuyển gen nhờ vector là virus

VI. Chuyển gen bằng cách sử dụng tế bào gốc phôi

Xuất phát từ lý do các tế bào gốc phôi (tế bào phôi ở giai đoạn 16-32 tế bào) là các tế bào đa năng (totipotent) nghĩa là có thể phân hoá thành bất kỳ loại mô nào và từ đó sẽ tạo nên cơ thể hoàn chỉnh. Từ các túi phôi nuôi cấy in vitro, người ta đã tiến hành tách chiết các tế bào gốc phôi và biến nạp gen ngoại lai vào những tế bào này.

Sau khi chọn ra những tế bào đã được biến nạp lạ người ta đưa nó vào phôi khác ở giai đoạn phôi nang để tạo ra động vật chuyển gen thể kiểm. Trên 30% động vật chuyển gen tạo thành là những động vật chuyển gen thể kiểm dòng mầm mang kiểu gen của dòng tế bào này. Ở đây các tế bào gốc phôi được sử dụng như là một phương tiện để chuyển gen (Mintz, 1977).

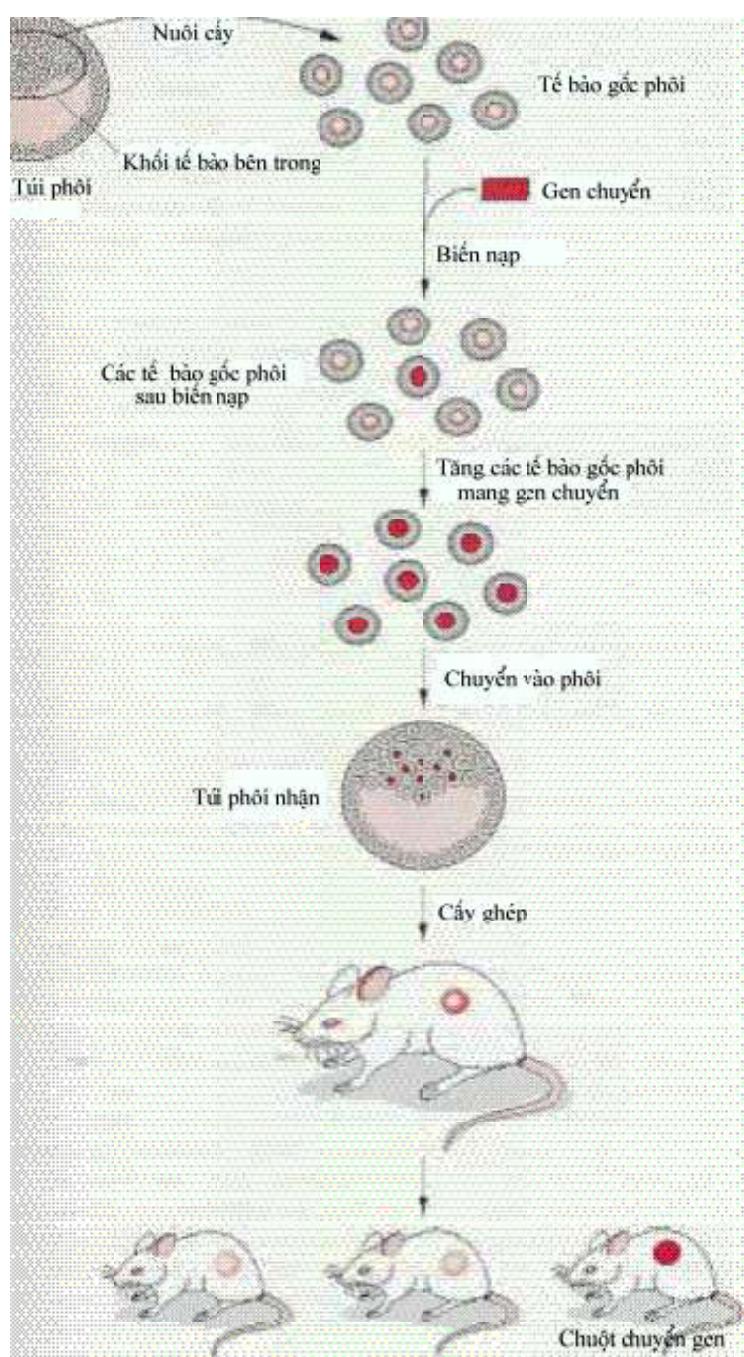
Ưu điểm của phương pháp chuyển gen này là tỉ lệ phôi sống sót sau thao tác, sự tích hợp và biểu hiện tính trạng của gen mới khá cao. Điều quan trọng hơn là trong thực tế việc chuyển gen có thể được tiến hành thông qua sự thao tác với phôi dâu và túi phôi. Phôi ở các giai đoạn này có thể thu nhận mà không cần phẫu thuật (đặc biệt là đối với bò), do vậy công việc chuyển gen được tiến hành rất dễ dàng.

Phương pháp này có ý nghĩa đặc biệt đối với sự nghiên cứu kiểm tra di truyền của các quá trình phát triển. Sự thuận lợi của nó là cho phép tạo ra một cách chính xác các đột biến gen xác định bằng tái tổ hợp đồng dạng.

Trong tương lai phương pháp sử dụng tế bào gốc phôi sẽ được sử dụng rộng rãi để tạo động vật chuyển gen.

Có ba cách tạo động vật chuyển gen từ các tế bào gốc phôi mang gen chuyển:

- Thứ nhất, phương pháp được dùng trước mắt là bơm một số tế bào gốc phôi (khoảng 5-10 tế bào) vào trong xoang phôi nang của tế bào động vật.
- Thứ hai, xen một số tế bào gốc phôi vào giữa bào thai thời kỳ 8 tế bào.
- Thứ ba, nuôi cây chung tế bào gốc phôi với phôi qua đêm.



Hình 2.12: Phương pháp chuyển gen bằng cách sử dụng tế bào gốc phôi



Hình 2.13: Chuyển tê bào gốc phôi vào túi phôi

VII. Chuyển gen trực tiếp vào protoplast

Để DNA dễ xâm nhập được vào tế bào thực vật, phải loại bỏ vách tế bào tạo protoplast. Protoplast có thể được duy trì trong môi trường nuôi cấy như các tế bào sinh trưởng một cách độc lập hoặc với một môi trường đặc hiệu, vách tế bào có thể được tạo thành và toàn bộ các cây có thể được tái sinh từ các tế bào này. Quá trình chuyển gen như thế này được thực hiện một cách trực tiếp bằng một cơ chế vật lý đơn giản, không cần có vector.

Để nâng cao hiệu quả biến nạp, người ta đã đã xử lý protoplast với PGE (polyethylene glycol) hoặc bằng xung điện.

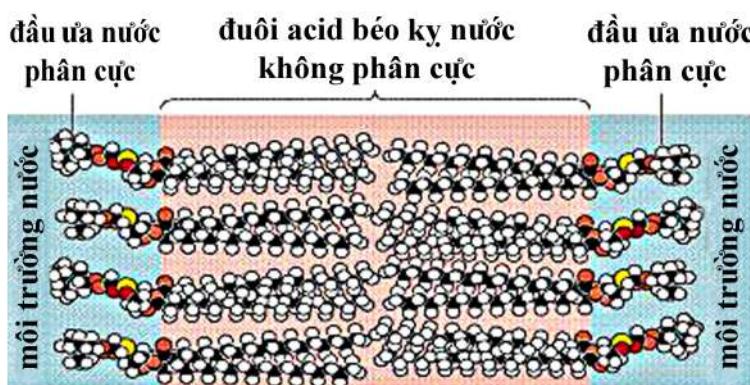
Phương pháp chuyển gen này rất có hiệu quả, đặc biệt đối với những loài thực vật mà phương pháp chuyển gen gián tiếp nhờ *Agrobacterium* không thể thực hiện được. Tuy nhiên, việc tạo protoplast cũng như tái sinh cây từ protoplast không đơn giản, tốn nhiều công sức, bị ảnh hưởng của nhiều yếu tố môi trường. Với phương pháp này, các nhà khoa học đã chuyển gen thành công vào

một số loài cây một lá mầm như loài lúa phụ *Japonica* (Datta, 1990), ngô (Doon, 1990), lúa mì (Vassil, 1992).

VIII. Chuyển gen bằng kỹ thuật xung điện

Kỹ thuật xung điện (electroporation) là một phương pháp cơ học được sử dụng để đưa các phân tử phân cực vào trong tế bào chủ qua màng tế bào. Trong phương pháp này, một xung điện cao thế trong khoảnh khắc (vài phần nghìn giây) có khả năng làm rối loạn cấu trúc màng kép phospholipid, tạo ra các lỗ thủng tạm thời cho phép các phân tử DNA ngoại lai từ môi trường xâm nhập vào bên trong tế bào.

Nhiều kỹ thuật nghiên cứu trong sinh học phân tử yêu cầu đưa gen hoặc protein ngoại lai vào trong tế bào chủ. Vì lớp phospholipid kép của màng sinh chất có một đầu ưa nước phía ngoài và một đầu ưa nước phía trong (Hình 2.14), nên bất kỳ phân tử phân cực nào, bao gồm cả DNA và protein, đều không có khả năng đi qua màng một cách tự do (Farabee, 2001).



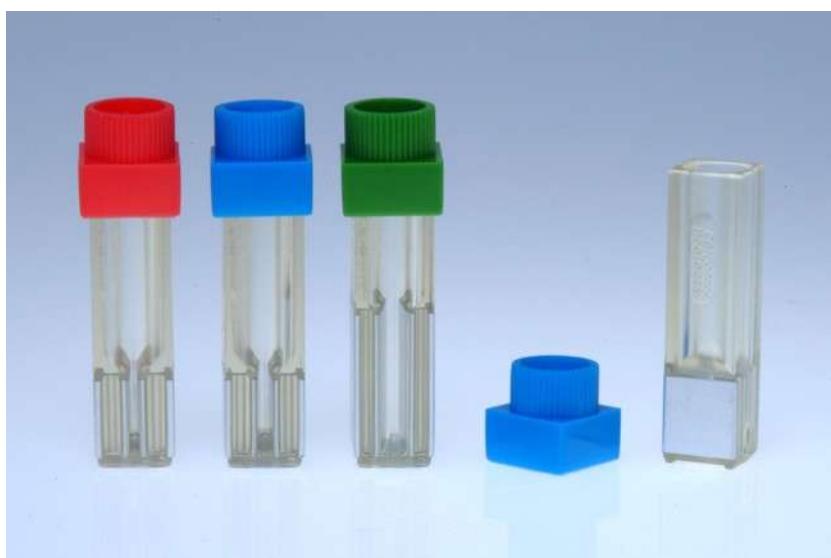
Hình 2.14: Sơ đồ màng phospholipid kép

Sơ đồ này cho thấy các thành phần hóa học của màng sinh chất. Các đầu ưa nước phân cực hướng về phía ngoài trong khi các đuôi ky nước hướng về phía trong và tương tác với đuôi ky nước khác để cùng bám giữ màng. Các phân tử phân cực không thể đi qua màng này nếu như không có sự hỗ trợ bên ngoài.

Nhiều phương pháp đã được phát triển để vượt qua rào cản này, cho phép đưa DNA và các phân tử khác vào trong tế bào đã được nghiên cứu. Một trong những phương pháp này là kỹ thuật xung điện.

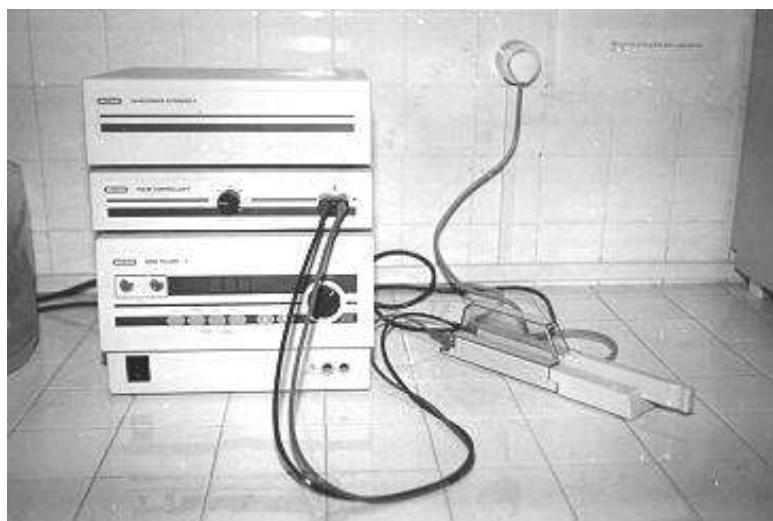
Kỹ thuật xung điện dựa trên trạng thái tương đối yếu của các tương tác kỵ nước của phospholipid kép và khả năng tập hợp lại một cách tự động của nó sau khi bị rối loạn (Purves, 2001). Vì vậy, một xung điện chớp nhoáng có thể gây ra rối loạn ở các vị trí của màng một cách nhất thời, làm cho các phân tử phân cực có thể đi qua, nhưng sau đó màng có thể đóng kín lại nhanh chóng và tế bào không bị ảnh hưởng gì cả.

Các tế bào chủ và DNA ngoại lai được tạo thành dịch huyền phù và cho vào trong một cuvette nhựa có điện cực (Hình 2.15).

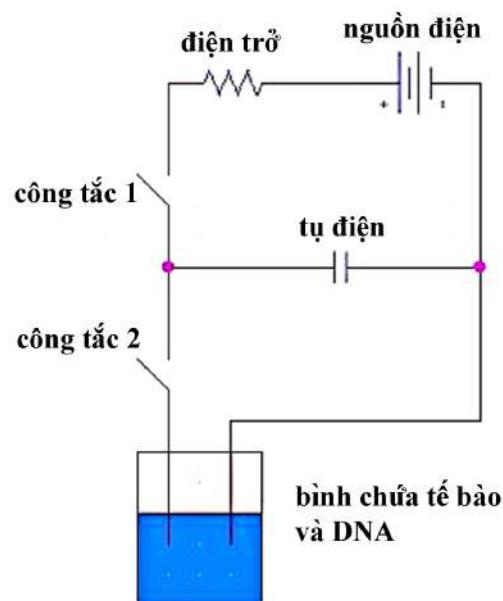


Hình 2.15: Cuvette nhựa có điện cực

Để tạo ra xung điện cao thế trong một thời gian ngắn người ta sử dụng một thiết bị gọi là máy xung gen (gene pulser) (Hình 2.16). Quá trình cơ bản diễn ra bên trong máy này có thể được trình bày bằng sơ đồ hình 2.17.



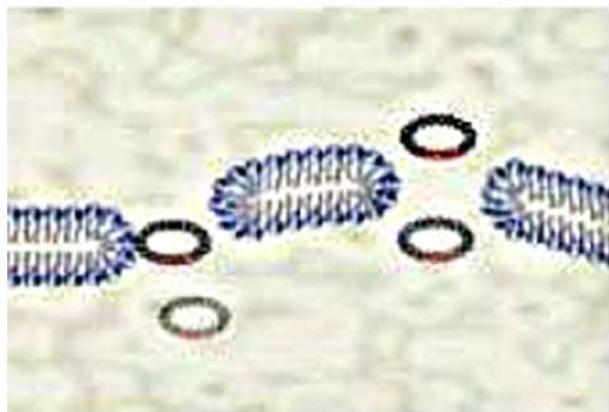
Hình 2.16: Máy xung gen (Gene pulser) (Hãng Biorad)



Hình 2.17: Sơ đồ bố trí mạch cơ bản của máy xung điện

Sơ đồ này cho thấy mạch điện cơ bản cung cấp điện cho kỹ thuật xung điện

Khi công tắc thứ nhất đóng, tụ điện nạp điện vào và tích một điện áp cao. Khi công tắc thứ hai đóng, điện áp này phóng qua dịch huyền phù tế bào. Một xung điện cần thiết cho kỹ thuật này thường là khoảng 10.000-100.000 v/cm (thay đổi tùy theo kích thước của tế bào) trong vài phần triệu giây đến một phần ngàn giây. Xung điện này làm rối loạn phospholipid kép của màng tế bào và tạo ra các lỗ tạm thời. Khả năng điện qua màng tế bào cùng lúc tăng lên 0,5-1,0 v vì vậy các phân tử đã được nạp điện này đi qua màng tế bào thông qua các lỗ bằng cách thức tương tự như điện di (Hình 2.18).



Hình 2.18: Sơ đồ plasmid chứa DNA ngoại lai đi qua các lỗ tạm thời trên màng bào chất

Lối DNA đi vào tế bào không thể quan sát thấy dưới kính hiển vi, nhưng hình vẽ này cho thấy khái niệm cơ bản của sự tạo thành các lỗ trên màng mà DNA có thể đi qua.

Khi các ion đã nạp điện và các phân tử đi qua các lỗ, màng tế bào phóng điện và các lỗ này đóng lại một cách nhanh chóng và phospholipid kép phục hồi lại cấu trúc cũ (Weaver, 1995). Lúc này các phân tử mong muốn đã ở trong tế bào và chúng được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp này có thể sử dụng đối với gần như tất cả các loại tế bào của các loài. Lúc đầu phương pháp này được sử dụng để chuyển gen vào các tế bào động vật có vú, về sau cho cả tế bào thực

vật ở dạng protoplast... Với một số cây một lá mầm quan trọng (loài lúa phụ *Japonica*, ngô, lúa mì) mà không thể thể thực hiện được bằng phương pháp chuyển gen gián tiếp nhờ *Agrobacterium* thì người ta đã thành công với phương pháp này. Hiệu quả biến nạp cao. Trong một nghiên cứu ở *E.coli*, 80% số tế bào nhận được DNA ngoại lai (Miller và Nickoloff, 1995). Lượng DNA ngoại lai cần thiết là ít hơn so với các phương pháp khác (Withers, 1995). Phương pháp này có thể thực hiện với các mô *in vivo* còn nguyên vẹn (Weaver, 1995). Đoạn DNA ngoại lai được biến nạp có kích thước lớn. Tuy nhiên nếu các xung điện có cường độ và chiều dài không đúng thì một số lỗ của tế bào sẽ trở nên quá lớn hoặc bị hỏng không thể đóng lại sau khi tế bào phóng điện, làm cho tế bào bị tổn thương hoặc bị thủng (Weaver, 1995). Một hạn chế nữa là sự vận chuyển DNA ngoại lai vào và ra khỏi tế bào trong suốt thời gian điện biến nạp là tương đối không đặc hiệu. Điều này dẫn đến kết quả là không cân bằng ion mà sau đó sẽ làm rối loạn chức năng của tế bào và tế bào chết (Weaver, 1995).

Kỹ thuật xung điện được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau của sinh học phân tử và y học. Các ứng dụng của kỹ thuật xung điện bao gồm:

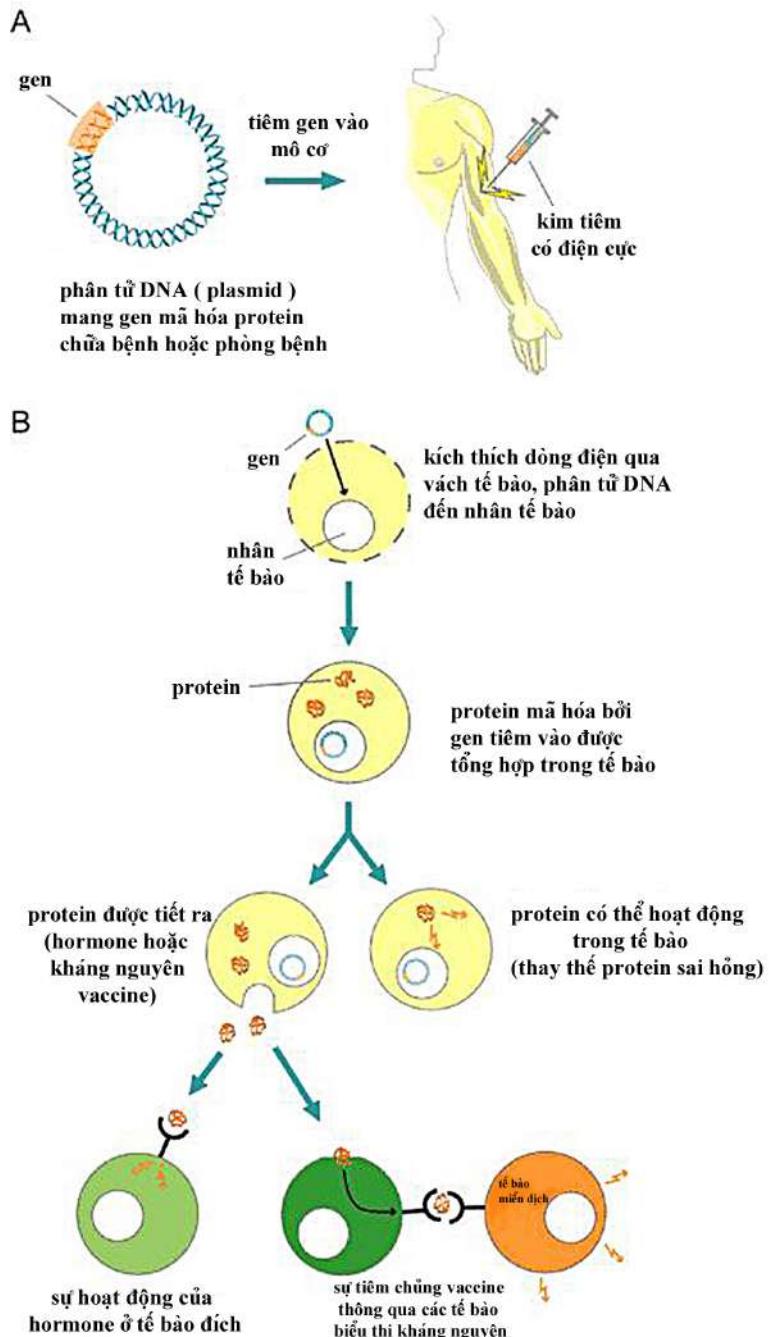
- Biến nạp DNA: các gen đặc hiệu có thể được tạo dòng trong plamid và sau đó plasmid này được đưa vào tế bào chủ để nghiên cứu cấu trúc và chức năng của gen và protein.
- Chuyển plasmid trực tiếp giữa các tế bào: tế bào vi khuẩn đã chứa plasmid có thể được ủ với một dòng khác không mang plasmid nhưng lại có đặc tính mong muốn khác. Điện áp của xung điện sẽ tạo ra các lỗ, cho phép một số plasmid đi ra khỏi tế bào và lại đi vào tế bào khác. Sau đó các tế bào mong muốn sẽ được chọn lọc bằng tính kháng thuốc kháng sinh hoặc bằng phương pháp tương tự khác (Withers, 1995). Kiểu chuyển gen này cũng có thể được thực hiện giữa các loài khác nhau. Vì vậy, một lượng lớn plasmid sinh trưởng trong các khuẩn lạc vi khuẩn được nhân lên một cách nhanh chóng và sau đó được chuyển vào các tế bào nấm men bằng kỹ thuật xung điện để nghiên cứu (Gunn, 1995).

- Dung hợp tế bào đã kích thích: sự tạo thành các lỗ thủng trên màng xảy ra do xung điện chớp nhoáng tạo ra cho thấy đã kích thích sự dung hợp tế bào (Weber và Berrg, 1995).

- Phân phôi thuốc qua da: Chỉ khi xung điện gây ra các lỗ tạm thời trên màng sinh chất, các lỗ tương tự đã tạo ra ở màng lipid kép của lớp da chết ở phía ngoài cùng. Các lỗ này cho phép thuốc đi qua da đến các mô đích. Các bệnh nhân thích phương pháp này hơn phương pháp tiêm (không cần kim tiêm) và có thể tránh được các vấn đề phân hủy hoặc hấp thu không đúng của liệu pháp uống thuốc (oral medication) trong hệ tiêu hóa (Praustmitz, 1993).

- Liệu pháp hóa điện khối u ung thư (cancer tumor electrochemotherapy): các nhà khoa học đang nghiên cứu tiềm năng của kỹ thuật xung điện để tăng tính hiệu quả của liệu pháp hóa học. Khi sử dụng kỹ thuật xung điện để biến nạp DNA, xung điện này sẽ phá vỡ màng tế bào ung thư và làm tăng lượng thuốc đi đến các vị trí. Một số nghiên cứu cho rằng đã làm giảm sự phát triển khối u khi áp dụng phương pháp này cho các tế bào ung thư ở hệ thống mô hình động vật (Maeda, 1998).

- Liệu pháp gen: kỹ thuật xung điện cho phép các vector mang các gen quan tâm được biến nạp qua da đến các mô đích. Khi đã hợp nhất vào các tế bào của cơ thể, các protein được tổng hợp từ các gen này có thể thay thế gen sai hỏng và vì vậy đã điều trị các rối loạn di truyền (Hình 2.19)(Inovio, 2002).



Hình 2.19: Úng dụng của kỹ thuật xung điện trong liệu pháp gen

IX. Chuyển gen bằng súng bắn gen

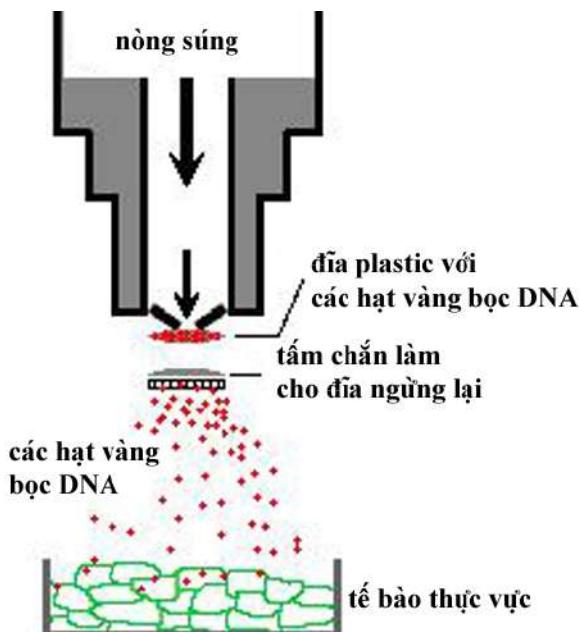
Súng bắn gen (Gene gun) là một thiết bị sử dụng để đưa thông tin di truyền vào tế bào, được thiết kế đầu tiên cho biến nạp DNA ngoại lai vào tế bào thực vật và được phát triển vào đầu thập niên 1980 do các nhà thực vật học ở Đại học Cornell cùng với các nhà nghiên cứu ở Cornell Nanofabrication Facility, Newyork, USA. Súng bắn gen được bán trên thị trường vào năm 1990. Đạn sử dụng cho loại súng này là các hạt kim loại nặng cơ bản được bao bọc DNA. Tên chính xác và đầy đủ của súng bắn gen là hệ thống phân phối hạt biolistics (biolistic particle delivery system) và kỹ thuật này thường được gọi một cách đơn giản là biolistics (sự kết hợp giữa hai thuật ngữ biology (sinh học) và ballistics (sự bắn tung)). Mặc dù có nhiều thiết kế kỹ thuật khác nhau nhưng nguyên lý chung của phương pháp này là sử dụng áp lực xung của khí helium để gai tốc các hạt.



Hình 2.20 : Súng bắn gen (Hãng Biorad)

Súng bắn gen bao gồm hai buồng bắn thép không gỉ, kích thước $6'' \times 7'' \times 10''$ nối với hai bơm chân không. DNA ngoại lai được gắn vào các hạt tungsten có đường kính rất nhỏ, khoảng $1\mu\text{m}$ (các kim loại nặng khác như vàng và bạc cũng được sử dụng nhưng không thường xuyên do giá cả đắt). Các hạt này được đặt trên một

cái đĩa ở mặt bên trong của súng. Sự bùng nổ khí helium ở 1000psi làm cho cái đĩa bắn về phía trước với tốc độ 1300 food/s, tương đương với tốc độ khi một viên đạn rời khỏi nòng súng. Một tấm chắn làm dừng đĩa lại và các hạt vàng hay tungsten được phóng về phía các tế bào đích. Chúng xuyên qua vách tế bào và phóng thích các phân tử DNA (Hình 2.21). Súng bắn gen sử dụng kỹ thuật DNA tái tổ hợp để hợp nhất sự biểu hiện các gen đã phân phối. Các tế bào biến đổi di truyền có thể được sử dụng để tạo thực vật bao gồm cả sự sửa đổi di truyền mong muốn ở trong tất cả các tế bào của chúng (Voiland, 1999).

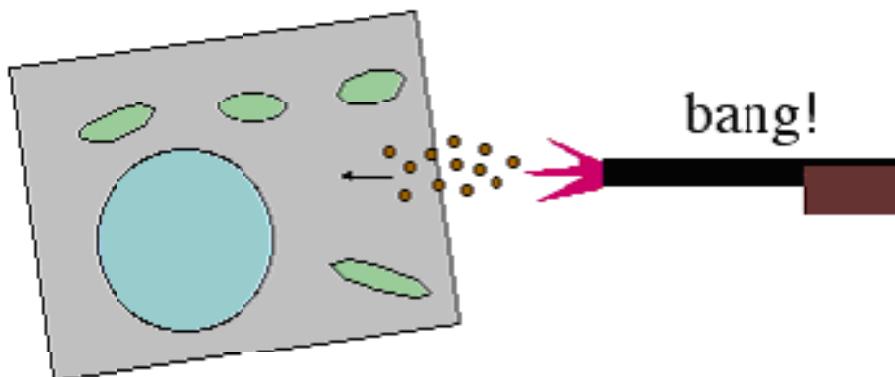


Hình 2.21: Sơ đồ nguyên lý hoạt động của súng bắn gen

Mục tiêu của súng bắn gen thường là callus của các tế bào thực vật giống nhau sinh trưởng trong môi trường gel trên đĩa petri. Sau khi các hạt tungsten đã va chạm vào đĩa, gel và callus bị phá vỡ nhiều. Tuy nhiên một số tế bào không bị phá vỡ khi va chạm mạnh

và đã tiếp nhận các hạt tungsten được bao bọc DNA và cuối cùng các phân tử DNA ngoại lai đã xâm nhập và hợp nhất vào nhiễm sắc thể thực vật. Các tế bào từ đĩa petri được tập hợp lại và chọn lọc các tế bào đã hợp nhất thành công và biểu hiện DNA ngoại lai bằng các kỹ thuật hóa sinh hiện đại như sử dụng gen chọn lọc nối tiếp và Northern blots.

Các tế bào đơn đã chọn lọc từ callus có thể được xử lý với một số hormone thực vật như auxin, gibberelin và mỗi một tế bào có thể phân chia, biệt hóa thành các tế bào mô, cơ quan, tế bào chuyên hóa của toàn bộ cây. Cây mới có nguồn gốc từ một tế bào nảy mầm thành công có thể mang các đặc tính di truyền mới.



Hình 2.22: Chuyển gen bằng súng bắn gen

Phương pháp này có ưu điểm là thao tác dễ dàng, có thể chuyển gen vào nhiều loại tế bào và mô, các tế bào được biến nạp có tỉ lệ sống sót cao, cho phép đưa các gen vào tế bào ở vị trí mong muốn....Do vậy nó được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực. Các ứng dụng của kỹ thuật bắn gen bao gồm

- Tạo thực vật chuyển gen: đây là phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất hiện nay trong lĩnh vực tạo ngũ cốc chuyển gen. *Bacillus thuringiensis* là loài vi khuẩn tổng hợp ra protein crystal (crys1Ab và crys1Ac) có khả năng giết một cách chọn lọc các nhóm côn trùng nhất định. Gen mã hoá protein crystal được gọi là gen

Bt. Gen *Bt* đã được bắn vào mô sẹo của cây ngũ cốc (Rassmussen, 1994). Trong khi các tế bào này sửa chữa tổn thương, DNA ngoại lai xâm nhập vào genome tế bào chủ. Vì vậy cho phép tế bào chủ phiên mã và giải mã gen *Bt*. Sau mỗi lần quá trình biến nạp được hoàn thành người ta cũng tiến hành sàng lọc theo phương pháp truyền thống là dựa trên cơ sở các marker chọn lọc được xen vào DNA cấu trúc (Brettschneider, 1997). Các marker chọn lọc mang tính kháng (kháng thuốc kháng sinh hay kháng thuốc diệt cỏ) như kanamycin là một là một trong những marker phổ biến nhất được sử dụng.

- Tiêm chủng vaccine di truyền: các gen được đưa vào cơ thể bằng súng bắn gen với mục đích gây ra phản ứng miễn dịch với protein biểu hiện bởi gen chuyển. Phương pháp tiêm chủng vaccine này an toàn hơn các phương pháp khác bởi vì chỉ DNA ngoại lai được đưa vào và không có các protein ngoại lai (Lin, 2000).

- Liệu pháp gen tự sát (Suicide gene therapy): phương pháp bắn gen đã được sử dụng trong điều trị bệnh ung thư. Một gen biểu hiện protein gây độc có promoter đặc hiệu khối u được đưa vào các tế bào khối u. Khi protein này được biểu hiện thì tế bào khối u chết. Protein này chỉ gây độc đối với các tế bào khối u bởi vì promoter đặc hiệu cần cho sự biểu hiện chỉ được tạo ra trong các tế bào khối u (Lin, 2000).

- Sự điều biến miễn dịch (Immunomodulation): phương pháp này còn được sử dụng để chống lại ung thư. Sử dụng súng bắn gen, một protein chỉ biểu hiện trong tế bào khối u nhưng làm cho phản ứng miễn dịch tăng lên được đưa vào tế bào. Phản ứng miễn dịch tăng lên nhắm vào các tế bào khối u và hiển nhiên gây ra hiệu quả mong muốn (Lin, 2000).

- Dược lý di truyền: súng bắn gen có thể được sử dụng để đưa các gen tổng hợp protein hữu ích hay protein liệu pháp vào cơ thể. Ví dụ như các yếu tố đông máu ở các cơ thể rối loạn sự đông máu hoặc tăng sự tổng hợp hồng cầu trong các cơ thể thiếu máu. Sự biểu hiện kéo dài của các gen đưa vào là một vấn đề, trong nhiều trường hợp thường đòi hỏi sự phân phôi gen phức tạp (Lin, 2000).

- Súng bắn gen là một công cụ nghiên cứu: súng bắn gen có thể được sử dụng để xen các promoter mà sẽ dẫn đến sự biểu hiện của

các gen nhất định. Hiệu quả khuyếch đại các protein nhất định là một phương pháp có giá trị lớn đối với các nhà khoa học để nghiên cứu chức năng của các protein này (Lin, 2000).

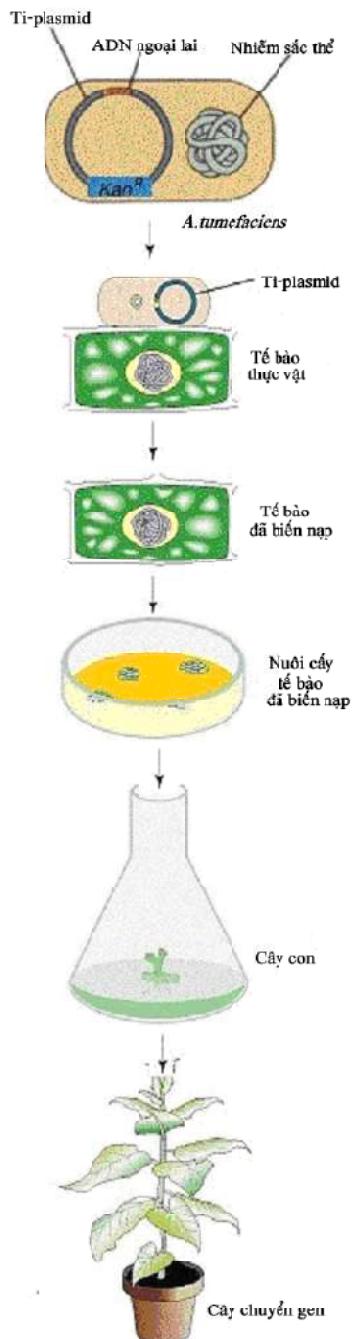
X. Phương pháp chuyển gen gián tiếp nhờ *Agrobacterium*

Agrobacterium có khả năng xâm nhiễm tế bào thực vật bằng cách chuyển một đoạn DNA của nó vào tế bào thực vật. Khi DNA vi khuẩn được hợp nhất với nhiễm sắc thể thực vật, nó sẽ tấn công vào hệ thống tổ chức của tế bào một cách có hiệu quả và sử dụng nó để đảm bảo cho sự sinh sôi của quần thể vi khuẩn. Thật không may mắn cho các nhà trồng cây ăn quả khi gặp phải loài vi khuẩn này. Bởi vì nó chính là thủ phạm gây ra bệnh khói u hình chóp và bệnh lông rẽ ở nhiều loài cây cảnh và cây ăn quả.

Mặc dù hệ thống chuyển gen gián tiếp nhờ *Agrobacterium* là có hiệu quả đối với một số loài nhưng không phải tất cả thực vật có thể được biến nạp bằng con đường này. Đặc biệt, lớp một lá mầm bao gồm các cây ngũ cốc chính trên thế giới như lúa, lúa mì và ngô là không được biến nạp dễ dàng nhờ *A. tumefaciens*.

Để khai thác và sử dụng *A. tumefaciens* như là một vector chuyển gen các nhà khoa học đã loại bỏ các gen gây khói u và gen mã hoá opine của T - DNA và thay thế vào đó là các marker chọn lọc, trong khi vẫn duy trì các vùng bờ phải và bờ trái của T-DNA và các gen vir. Gen chuyển được xen vào giữa các vùng bờ của T-DNA. Nó sẽ được chuyển vào tế bào và trở nên hợp nhất với nhiễm sắc thể tế bào thực vật.

Phương pháp chuyển gen gián tiếp nhờ *Agrobacterium* đã được kiểm tra đối với sự xâm nhập bền vững, sự biểu hiện và sự di truyền của các gen chuyển đặc biệt. Tuy nhiên, một vài yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả biến nạp là loại mô được biến nạp, giai đoạn phát triển của mô, mức độ khởi đầu của vi khuẩn *A. tumefaciens* sử dụng, môi trường để nuôi cây mô sau khi biến nạp, marker được sử dụng để chọn lọc thể biến nạp, loại vector sử dụng và kiểu gen của thực vật.



Hình 2.23: Tạo thực vật chuyển gen bằng phương pháp chuyển gen gián tiếp nhờ *Agrobacterium*

XI. Chuyển gen vào tinh trùng và các tiền thể của tinh trùng

1. Chuyển gen vào tinh trùng

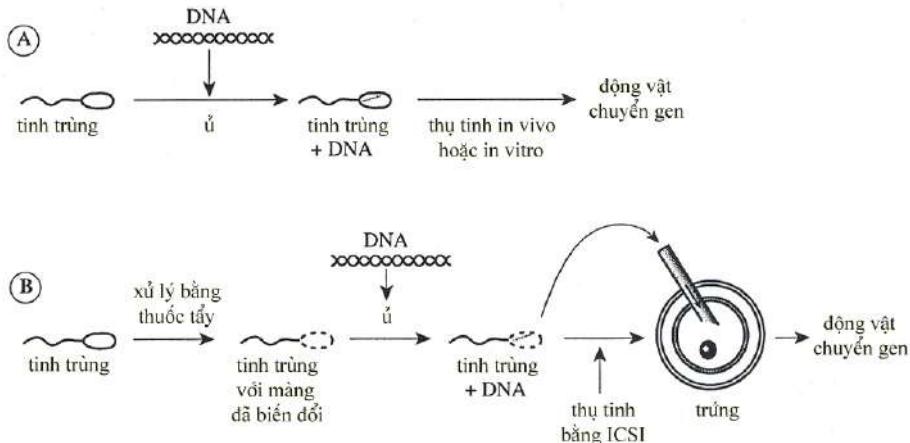
Tinh trùng trưởng thành có genome bất hoạt không có khả năng tái bản. DNA của nó được bao phủ bởi protamine làm cho DNA ngoại lai rất khó đi vào trong genome tinh trùng. Vì vậy DNA ngoại lai không có cơ hội để hợp nhất vào DNA tinh trùng.

Các thí nghiệm thực hiện cách đây khoảng gần một thập kỷ cho thấy rằng tinh trùng ủ với DNA có thể mang DNA đến trứng trong quá trình thụ tinh dẫn đến kết quả là tạo ra chuột chuyển gen. Các nghiên cứu hóa sinh học cho thấy DNA bám vào tinh trùng một cách dễ dàng nhưng không chứng minh được rằng điều này xảy ra do sự xâm nhập của DNA. Vì thế tinh trùng đóng vai trò là một thể truyền đồi với DNA ngoại lai.

Sau một vài năm, phương pháp này được áp dụng rộng rãi với bò, lợn, cừu và cá medaka (Hình 2.24). Trong tất cả các trường hợp này không hiểu tại sao các thí nghiệm rất khó thành công. Hơn nữa, phần lớn các trường hợp, DNA ngoại lai hợp nhất vào genome vật chủ đã được sắp xếp lại ở mức độ cao. Một nghiên cứu đã cho thấy rằng ngay cả sau khi đã rửa cẩn thận, tinh trùng chứa DNase đã phân hủy DNA ngoại lai. DNase có rất nhiều trong nguyên sinh chất của tinh trùng và lượng enzyme này bám vào tinh trùng là thay đổi đã giải thích tại sao thí nghiệm này không thành công và tại sao DNA ngoại lai bị phân cắt. DNA ngoại sinh dường như gây ra hoạt tính DNase ở tinh trùng đã tách chiết ra. Có thể giải thích hiện tượng này là DNase một phương tiện để bảo vệ tinh trùng tránh khỏi sự nhiễm DNA ngoại sinh trên đường từ mào tinh hoàn đến tế bào trứng (Baccetti và Spadafora, 2000).

Các thử nghiệm để tăng DNA xâm nhập vào tinh trùng đã được thực hiện. Sự xung điện hoặc chuyển nhiễm với các tác nhân hóa học đã làm tăng sự hấp thu DNA vào tinh trùng. Hiện tượng này thường được kèm theo do khả năng thụ tinh cho bào trứng của tinh trùng.

Ở *Xenopus*, chuyển gen vào phôi bằng vi tiêm dẫn đến sự biểu hiện của gen ngoại lai và nó tồn tại từ vài ngày đến vài tuần nhưng lại không hợp nhất vào genome vật chủ. Để khắc phục khó



Hình 2.24: Chuyển gen vào tinh trùng

- A. Tinh trùng đã rửa ủ với DNA được sử dụng để thụ tinh *in vivo* hoặc *in vitro*. Phương pháp này không có hiệu quả đặc hiệu đối với việc tạo động vật chuyển gen và các gen đã hợp nhất thường bất hoạt do sự sắp xếp lại DNA
- B. Màng tinh trùng bị tổn thương bởi chất tẩy nhẹ. DNA ngoại lai đi vào tinh trùng một cách tự do. Các tinh trùng này được sử dụng để thụ tinh *in vitro* bằng phương pháp ICSI

khăn này, các nhà nghiên cứu đã sử dụng tinh trùng làm thể mang (carrier). Protocol đã được xác định sớm hơn cho động vật có vú đã chứng tỏ không hiệu quả ở *Xenopus*. Để tăng khả năng hấp thu DNA, tinh trùng được xử lý với Triton, một chất tẩy nhẹ. Điều này dẫn đến sự không ổn định của màng tinh trùng làm cho DNA tự do đi vào tinh trùng. Kết quả tương tự cũng đạt được khi làm lạnh và ám tinh trùng. Chromatin đã bị phân hủy do enzyme hạn chế nhận biết một vài vị trí ở chromatin của tinh trùng nhưng đối với DNA ngoại lai thì không xảy ra. Điều này gây ra cơ chế sửa chữa và làm tăng cơ hội hợp nhất DNA ngoại lai vào genome của phôi. Phương

pháp này có tên gọi là REMI (restriction enzyme mediated intergration=sự hợp nhất qua trung gian enzyme hạn chế), một phương pháp làm tăng sự biến nạp của tế bào. Sau các xử lý này, tinh trùng mất khả năng thụ tinh cho trứng. Tiêm trực tiếp tinh trùng vào trứng (intra-cytoplasmic sperm injection=ICSI) được sử dụng đối với sự thụ tinh *in vitro* ở người. Phương pháp này đã được áp dụng cho *Xeponus* và đã tạo ra *Xeponus* chuyển gen với kết quả có thể chấp nhận (Hình 2.12B). Đặc biệt hiện nay các nhà sinh học đã ứng dụng chuyển gen vào loài này để nghiên cứu sự phát triển (Marrsh-Arrmstrong, 1999; Perry, 2001).

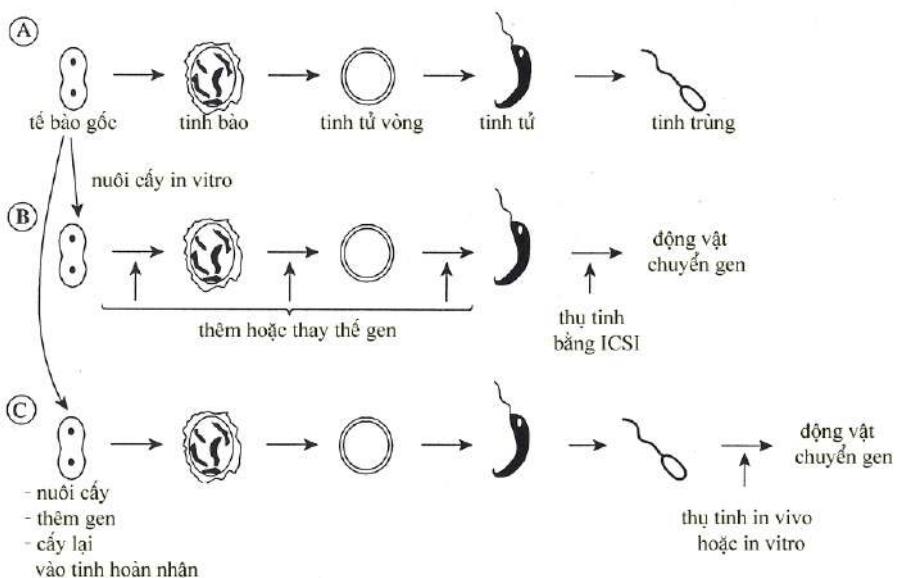
Phương pháp này, trước tiên được sử dụng cho *Xeponus*, đã chứng tỏ thành công ở chuột. Tuy nhiên nó không cho kết quả cao hơn phương pháp vi tiêm vào tiền nhân là một phương pháp đơn giản hơn nhiều. Phương pháp ICSI đã được sử dụng thành công hoàn toàn ở chuột khi chuyển các đoạn DNA dài được thiết kế trong các vector BAC và YAC (Perry, 2001). Vì vậy phương pháp này có thể được áp dụng rộng rãi đối với các loài khác kể cả gia súc lớn. Hiện nay hạn chế của việc sử dụng ICSI ở các loài này là khó khăn. Dường như là không thể áp dụng với các loài không thuộc bộ Linh trưởng mà việc chuyển gen là khó khi sử dụng các phương pháp khác.

Gần đây, một phương pháp tuyệt vời đã được đề xuất (Qian, 2001). DNA bám vào kháng thể đơn dòng nhận biết một protein trên bề mặt tinh trùng hình thành nên một phức hợp ổn định với tinh trùng. Phương pháp này đã được sử dụng để thụ tinh *in vitro* ở chuột, gà bằng thụ tinh nhân tạo và lợn bằng cách tiêm vào sừng tử cung. Trong ba trường hợp này, khoảng 30% cá thể con sinh ra là động vật chuyển gen. Gen chuyển đã không bị sắp xếp lại. Nó đã biểu hiện và truyền lại cho thế hệ sau. Điều quan trọng là kháng thể đơn dòng giống nhau nhận biết tinh trùng của động vật có xương sống thấp hơn và cao hơn kể cả con người. Phương pháp này có thể được dùng để tạo Linh trưởng chuyển gen.

2. Chuyển gen vào tiền thể tinh trùng *in vitro*

Tinh trùng thành thực được tạo ra từ các tế bào gốc thông qua các giai đoạn khác nhau của sự biệt hóa (Hình 2.25). Các tế bào gốc

tinh trùng có thể được tách chiết, nuôi cấy *in vitro* trong một thời gian ngắn và được cấy chuyển vào tinh hoàn nhện. Các tế bào cấy chuyển này hoạt động theo chương trình biệt hóa của chúng làm cho tinh trùng hoạt động chức năng. Tỉ lệ tinh trùng tạo thành từ các tế bào gốc cấy chuyển được tăng lên nhiều nhờ sự xử lý các con đực nhện với bisulfan. Bisulfan là một loại thuốc ngăn cản sự biệt hóa của tế bào gốc tinh hoàn. Protocol này đã được sử dụng một cách thành công để chuyển gen vào tế bào gốc trong quá trình nuôi cấy. Điều này đạt được nhờ sử dụng vector retrovirus hiệu quả. Các tế bào gốc cấy chuyển vào con đực nhện đã xử lý bisulfan dẫn đến kết



Hình 2.25: Sử dụng các tế bào tiền thể của tinh trùng để chuyển gen

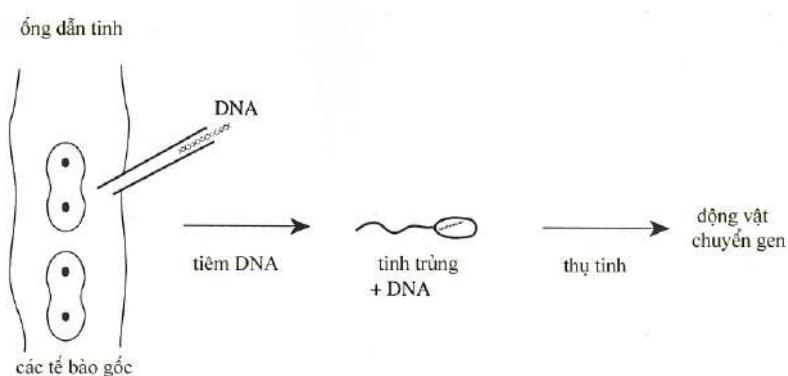
- Các bước khác nhau của sự biệt hóa tế bào gốc thành tinh trùng
- Các tế bào gốc hoặc các tế bào đã biệt hóa một cách cục bộ được tách chiết, nuôi cấy và chuyển DNA chọn lọc vào. Tinh trùng mang DNA ngoại lai này được sử dụng để thụ tinh bằng phương pháp ICSC
- Tế bào gốc được tách chiết, nuôi cấy dưới những điều kiện ngăn cản sự biệt hóa của chúng, được chuyển DNA ngoại lai vào, được

chọn lọc và đưa vào lại một tinh hoàn nhện, nơi mà chúng biệt hóa. Tinh trùng tạo ra được sử dụng để thụ tinh trứng bằng phương pháp thông thường

quá là tạo ra chuột chuyển gen với tỉ lệ cao, khoảng 4% (Nagano, 2001). Phương pháp này là hữu dụng để nghiên cứu ảnh hưởng sinh học của gen trong quá trình thành thực tế bào gốc tinh trùng và để tạo động vật chuyển gen. Có thể suy ra phương pháp này ít thành công hơn đối với các loài lớn hơn chuột. Dường như cần thiết phải sử dụng các tế bào đã được biến nạp cao hơn để tăng cơ hội định cư ở tinh hoàn với một tỉ lệ chấp nhận được.

2.2. Chuyển gen vào tiền thể của tinh trùng *in vivo*

DNA liên kết với thể chuyển nhiễm có thể được tiêm vào các ống sinh tinh (Hình 2.26). Một số nhóm nghiên cứu đã thành công trong việc tạo chuột chuyển gen bằng cách sử dụng tinh trùng của các động vật đã được xử lý (Sato, 2002). Những kết quả khích lệ này có hiệu quả vừa phải và hãy còn chưa đạt chuẩn. Hiện chúng đang được cải tiến nhưng chắc chắn là chưa có cách nào làm cho có thể áp dụng rộng rãi phương pháp này đối với các động vật lớn hơn chuột. Quả thực cấu trúc của các ống dẫn tinh khác nhau và việc tiêm DNA là khó. Mặt khác, lượng DNA tiêm vào có thể là rất lớn và khó điều khiển.



Hình 2.26: Chuyển gen vào tiền thể của tinh trùng một cách trực tiếp

DNA bình thường hoặc DNA bám vào thể chuyển nhiễm được tiêm trực tiếp vào các ống sinh tinh. Các tế bào đã hợp nhất DNA ngoại lai sẽ tạo ra động vật chuyển gen sau khi thụ tinh bình thường

Một điểm khác cũng cần được nghiên cứu. Đó là ở chuột, gen chuyển vào tiền thể của tinh trùng *in vivo* xảy ra một cách độc lập trong các tế bào khác nhau dẫn đến tạo ra các động vật sơ sinh có sự hợp nhất khác nhau. Đây là một thuận lợi vì sự hợp nhất khác nhau có thể cho các kiểu hình hơi khác biệt. Với phương pháp này, các nhà nghiên cứu có thể đánh giá các dòng động vật chuyển gen phức tạp từ một thí nghiệm đơn giản.

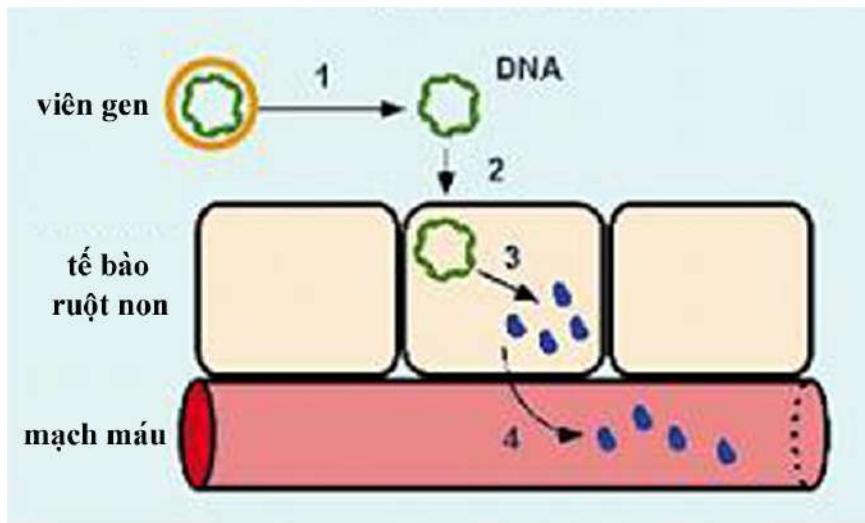
XII. Kỹ thuật viên gen (Gene pill)

Kỹ thuật viêm gen một phương pháp điều trị bệnh bằng liệu pháp gen thông qua đường uống thuốc.

Một lượng DNA liệu pháp (dạng plasmid hay phức hợp DNA-peptid) được bọc bởi một màng lipid hỗn hợp đặc hiệu như màng bọc các viên thuốc thông thường tạo ra viên gen. Viên gen được đưa vào cơ thể theo đường miệng bằng cách uống. Sau khi được đưa phỏng thích, gen liệu pháp được hấp thụ qua màng đi vào tế bào biểu mô ruột. Ở đây gen liệu pháp được phiên mã và dịch mã thành protein dược phẩm. Protein dược phẩm tiết vào máu, đến các mô bệnh để ức chế sự hoạt động của các gen bệnh (Hình 2.27).

Kỹ thuật viên gen là một phương pháp mới (được cấp bằng phát minh vào ngày 3/5/2001) lần đầu tiên được sử dụng để chữa bệnh tiểu đường bằng cách sử dụng một viên gen được tạo thành từ DNA mã hóa insulin. Phương pháp này đã khắc phục được các hạn chế của các phương pháp truyền thống như vấn đề liều lượng và phân phối thuốc. Nó có thể cách mạng hóa liệu pháp gen và cho các bệnh nhân một sự chọn lựa để đưa insulin vào cơ thể hàng ngày.

Tuy nhiên, tính có ích của viên gen sẽ phụ thuộc vào sự biểu hiện và phân phối của gen trong các tế bào ruột non và hãy còn chưa chắc chắn là có thích hợp đối với các protein cần thiết với liều lượng khớp một cách tinh vi không.



Hình 2.27: Sơ đồ cơ chế hoạt động của viên gen

1. Viên gen phân phối DNA đến ruột non
2. DNA được hấp thụ vào các tế bào ruột
3. Protein được phâmr tổng hợp trong các tế bào
4. Protein được phâmr tiết vào máu

Kỹ thuật viên gen khai thác một cách tích cực khoảng thời gian sống ngắn của các tế bào biểu mô và tính có lợi của sự phân chia một cách nhanh chóng của các tế bào đích xếp thành hàng trong ruột non. Về mặt lý thuyết, liệu pháp gen thông qua đường uống có thể phân phối gen tổng hợp bất cứ protein nào cho một loại tế bào đơn trong ruột non, đáp ứng được yêu cầu tìm ra vector hoặc chiến lược biến nạp mới cho mỗi một loại tế bào đích. Tuy nhiên phương pháp này cho hiệu quả chưa cao do sự sử dụng các tế bào ruột non làm các tế bào đích bị giảm bởi nhiều nhóm tế bào có thời gian sống ngắn (2-3 ngày), môi trường acid và DNase trong hệ dạ dày ruột. Mặt khác, viên gen chỉ có thể mang các gen ngoại lai có kích thước nhỏ. Hiện nay người ta mới chỉ tạo ra được một số loại viên gen sử

dụng trong điều trị thử nghiệm. Trong tương lai gen sẽ trở thành một kỹ thuật có hiệu quả để điều trị bệnh bằng liệu pháp gen.

Tài liệu tham khảo chính

- Makrides SC. 2003. Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. Elsevier Science B. V. USA.
- Louis-Marie H. 2003. Animal Transgenesis and Cloning. John Wiley and Sons, Ltd. USA.
- Glick BR., Jackj P. 1994. Molecular Biotechnology. ASM Press. Washington D.C. USA.
- Chopra VL., Anwan N. 1990. Genetic Engineering and Biotechnology. Oxford and IBH Publishing CO.PVT, Ltd. UK.
- John D, Roderick S, Philip A, Richard W. 1988. Plant Genetics Transformation and Gene Expression (A Laboratory Manual). Blackwell Scientific Publications. UK.

Chương 3

Các phương pháp xác định sự hiện diện và biểu hiện của gen ngoại lai

I. Southern blot

Southern blot là một trong những phương pháp trung tâm của Sinh học phân tử. Nó còn có tên gọi khác là Southern blotting, phương pháp lai Southern hay phương pháp lai DNA.

Nguyên tắc của Southern blot là màng lai nitrocellulose có khả năng tiếp nhận DNA đã được biết từ lâu và đã được sử dụng trong các nghiên cứu lai axit nucleic khác nhau vào những thập niên 1950 và 1960. Vào thời kỳ này DNA cố định không được phân đoạn, chỉ đơn giản bao gồm DNA tổng số được gắn trên màng lai nitrocellulose. Sự ra đời của phương pháp điện di trên gel vào đầu thập niên 1970 đã cho phép các đoạn DNA được cắt bởi enzyme hạn chế có thể được phân tách dựa trên cơ sở kích thước của chúng. Từ đó bước phát triển tiếp theo của phương pháp là chuyển các đoạn DNA phân tách từ gel lên màng lai nitrocellulose. Phương pháp này được E. M. Southern mô tả tại Đại học Edinburgh vào năm 1975. Phương pháp Southern blot đơn giản và hiệu quả. Mặc dù đã được cải tiến nhưng phương pháp đang được sử dụng ở nhiều phòng thí nghiệm sinh học phân tử sai khác không đáng kể so với phương pháp ban đầu.

Southern blot bao gồm các bước cơ bản sau:

- Cắt DNA bằng enzyme hạn chế thích hợp.
- Điện di sản phẩm cắt trên gel agarose.
- Làm biến tính DNA (thông thường khi nó còn ở trên gel): ví dụ có thể nhúng nó vào trong dung dịch NaOH 0.5M, DNA sợi kép sẽ được tách thành DNA sợi đơn. Chỉ DNA sợi đơn mới có thể chuyển lên màng lai.

- Chuyển DNA đã biến tính lên màng lai. Thông thường màng lai được sử dụng là màng nitrocellulose. Người ta cũng có thể sử dụng màng nylon. Màng nitrocellulose điển hình có khả năng tiếp nhận $100\mu\text{g DNA/cm}^2$, trong khi màng nylon có khả năng tiếp nhận $500\mu\text{g DNA/cm}^2$. Mặt khác màng nylon có khả năng giữ DNA chắc hơn và ít đứt gãy hơn. Việc chuyển DNA thường được tiến hành bằng hoạt tính mao dẫn trong khoảng vài tiếng hoặc có thể dùng một thiết bị thám chân không. Nếu dùng thiết bị thám chân không thì sẽ nhanh hơn, chỉ mất khoảng một tiếng. Trong quá trình chuyển, vị trí các đoạn DNA vẫn được giữ nguyên không thay đổi.
- Lai DNA đã được cố định trên màng với mẫu dò (probe) DNA có đánh dấu. Quá trình này dựa trên nguyên tắc bổ sung (giữa DNA trên màng lai với mẫu dò). Để đánh dấu người ta thường sử dụng P^{32} , biotin/streptavidin hoặc một mẫu dò phát quang sinh học.
- Định vị các phân tử lai DNA-mẫu dò. Nếu sử dụng mẫu dò đánh dấu phóng xạ thì dùng phương pháp phóng xạ tự ghi (autoradiograph) để xác định, nếu sử dụng biotin/streptavidin thì dùng phương pháp so màu hoặc nếu sử dụng mẫu dò phát quang sinh học thì phát hiện bằng sự phát quang.

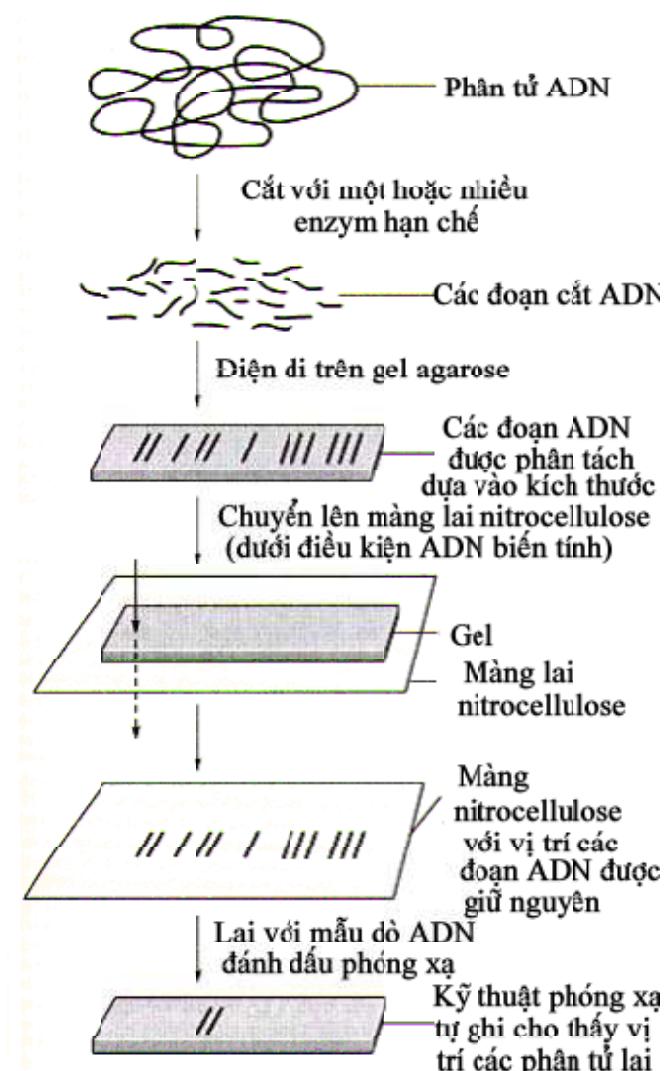
Phương pháp Southern blot được thiết kế để xác định sự hiện diện, kích thước, số lượng bản sao, tính đồng dạng của DNA trong một phức hợp. Ví dụ, Southern blot có thể được sử dụng để phát hiện một gen đặc biệt ở trong một genome nguyên vẹn.

II. Northern blot

Sau khi E. M. Southern mô tả phương pháp Southern blot vào năm 1975, người ta đã dùng một phương pháp tương tự để xác định các đoạn RNA đặc biệt gọi là Northern blot. Phương pháp này còn được gọi là Northern blotting, phương pháp lai Northern hay phương pháp lai RNA.

Northern blot bao gồm các bước cơ bản sau:

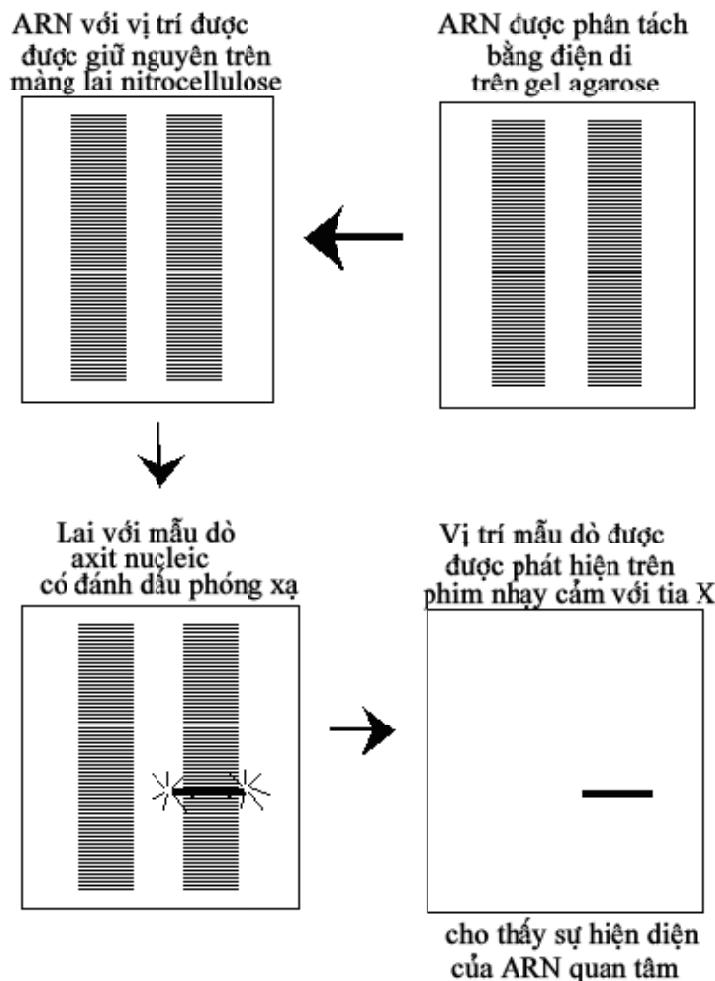
- RNA (RNA tổng số hoặc chỉ mRNA) được phân tách bằng điện di trên gel agarose.



Hình 3.1: Sơ đồ示意 pháp Southern blot

- RNA sau khi đã phân tách được chuyển lên màng lai (các phân tử RNA giữ nguyên vị trí như ở trên gel).

- RNA cố định trên màng được lai với mẫu dò DNA sợi đơn (hoặc RNA) có đánh dấu phóng xạ hoặc được gắn với một enzyme (alkalin phosphatase hoặc horseradish peroxidase) tạo thành phân tử lai RNA-DNA (hoặc RNA-RNA) sợi kép.



Hình 3.2: Sơ đồ mô tả phương pháp Northern blot

- Vị trí của mẫu dò được phát hiện nhờ kỹ thuật phóng xạ tự ghi nếu nó được đánh dấu phóng xạ. Trong trường hợp mẫu dò được gắn với enzyme thì đem ủ với một cơ chất không

màu. Enzyme liên kết với nó sẽ biến đổi thành một sản phẩm màu có thể nhìn thấy hoặc phát ra ánh sáng mà sẽ được phát hiện bằng phim X quang một cách trực tiếp.

Phương pháp Northern blot cho phép phát hiện sự có mặt, xác định kích thước, trọng lượng phân tử, khối lượng mRNA ở trong các mẫu khác nhau. Đây là một phương pháp rất tốt để phân tích sự biểu hiện của gen khi chúng ta cần định lượng để phân biệt sự khác nhau giữa hai mẫu và nó rất nhạy bởi vậy chúng ta có thể điện di một lượng lớn RNA tổng số hoặc mRNA trên gel.

III. Western blot

Western blot là phương pháp có độ nhạy cao dựa trên tính đặc hiệu của kháng thể để phát hiện protein đã được điện di trên gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) và chuyển lên màng lai.

Western blot cho phép xác định sự có mặt, trọng lượng phân tử, định lượng protein có mặt trong các mẫu khác nhau.

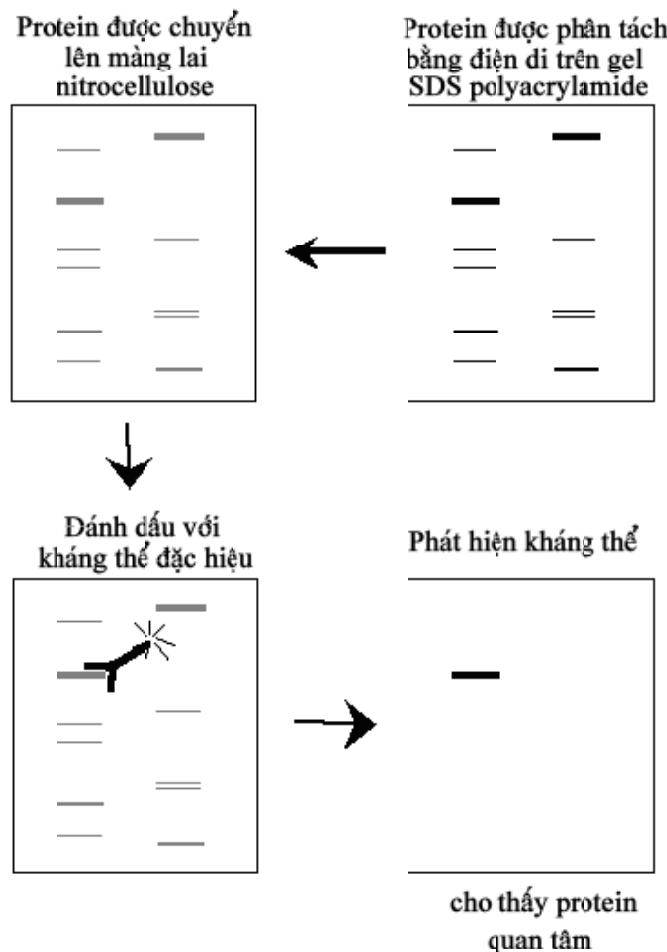
Western blot còn có tên gọi khác là Western blotting hay là phương pháp lai thẩm protein.

Western blot bao gồm các bước cơ bản sau:

- Protein được phân tách bằng điện di trên gel SDS-PAGE.
- Các protein được chuyển sang màng lai nitrocellulose, giữ nguyên vị trí như đã phân tách trên gel.
- Ủ màng lai đã cố định protein với một kháng thể sơ cấp (primary antibody). Kháng thể sơ cấp là một kháng thể đặc hiệu, sẽ bám vào protein và tạo thành một phức hợp protein-kháng thể đối với protein quan tâm.
- Tiếp theo ủ màng lai với một kháng thể thứ cấp (secondary antibody) có enzyme (alkaline phosphatase hoặc horseradish peroxidase) đi kèm. Kháng thể thứ cấp sẽ bám vào kháng thể sơ cấp giống như kháng thể sơ cấp đã bám vào protein.
- Tiếp tục ủ màng lai trong một hỗn hợp phản ứng đặc hiệu với enzyme. Nếu mọi việc đều diễn ra một cách chính xác sẽ phát hiện thấy các băng ở bất kỳ nơi nào có mặt phức

hợp protein-kháng thể sơ cấp- kháng thể thứ cấp-enzyme hay nói cách khác là ở bất kỳ nơi nào có mặt protein quan tâm.

- Đặt một phim nhạy cảm với tia X lên màng lai để phát hiện các điểm sáng phát ra do enzyme.



Hình 3.3: Sơ đồ mô tả phương pháp Western blot

IV. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

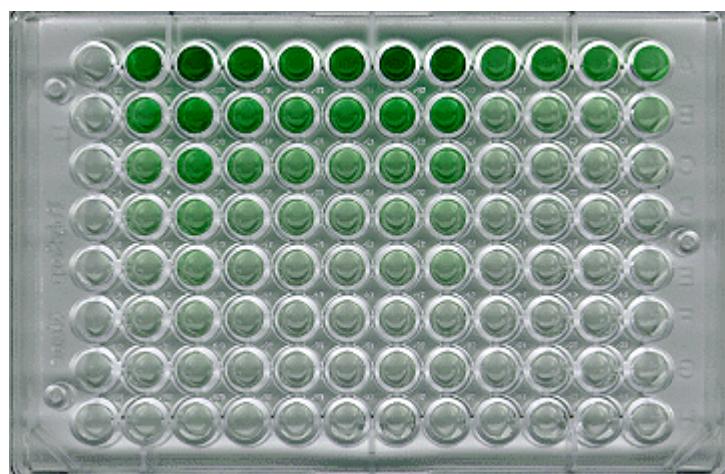
ELISA được mô tả lần đầu tiên vào năm 1971 và từ đó đã trở thành một phương pháp được sử dụng ngày càng rộng rãi và quan trọng hơn trong nghiên cứu, chẩn đoán và xét nghiệm bởi vì nó có khả năng phát hiện nhạy bén với một lượng vật chất rất nhỏ.

ELISA đã thay thế một số kỹ thuật huyết thanh “cổ điển” phức tạp, cồng kềnh tốn nhiều thời gian hơn và mở rộng phạm vi phương pháp phát hiện virus cũng như các marker liên quan đến sự nhiễm của chúng.

Xét nghiệm ELISA có thể được tiến hành với một số phương pháp như ELISA “trực tiếp”, “gián tiếp”, “sandwich” và “cạnh tranh”.

Nguyên tắc cơ bản của phương pháp ELISA là kháng nguyên đã hoà tan trong dung dịch đệm thích hợp có thể phủ lên bề mặt plastic (như polystyrene). Quá trình này có thể là trực tiếp hoặc thông qua một kháng thể. Khi huyết thanh được thêm vào, các kháng thể có thể kết hợp với kháng nguyên ở pha đặc (solid phase).

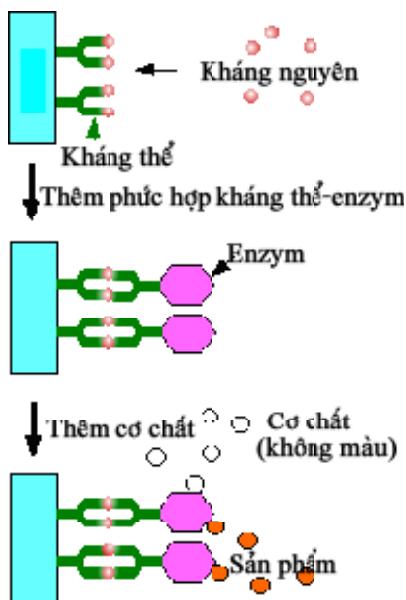
Xét nghiệm ELISA được thực hiện trong đĩa plastic kích thước 8cm x 12cm, chứa 8x12 giếng. Mỗi giếng có chiều cao khoảng 1cm và đường kính là 0,7cm (Hình 3.4).



Hình 3.4: Đĩa plastic sử dụng để tiến hành xét nghiệm ELISA

Các kháng thể sử dụng trong phương pháp ELISA được gắn với enzyme bằng liên kết đồng hoá trị. Kháng nguyên được gắn với giếng plastic và kháng thể liên kết với enzyme được gắn với kháng nguyên. Kháng thể không gắn kháng nguyên sẽ bị rửa trôi đi. Enzyme được giữ lại và vì vậy lượng kháng thể gắn enzyme được phát hiện bằng cách cho thêm vào một cơ chất làm thay đổi màu do hoạt tính của enzyme. Độ màu tạo thành là tỉ lệ với lượng enzyme bám ở giếng plastic, từ đó suy ra lượng kháng thể, sau đó tiếp tục suy ra lượng kháng nguyên (Hình 3.5).

Tính nhạy của ELISA là do sự khuyếch đại bởi hoạt tính enzyme. Mỗi một phân tử enzyme bám vào kháng thể có thể tạo ra hàng ngàn phân tử màu do hoạt tính enzyme. Trước khi các kháng thể gắn enzyme có thể được sử dụng rộng rãi, các kháng thể phóng xạ đã được sử dụng trong kỹ thuật miễn dịch phóng xạ (radio immuno assays-RIA). Kỹ thuật RIA như là một đột phá có ý nghĩa và người sáng tạo ra nó là Rosalyn Yalow đã được nhận giải thưởng Nobel Sinh lý và Y học vào năm 1977.



Hình 3.5: Nguyên tắc của phương pháp ELISA

V. Phương pháp PCR

Phương pháp PCR (polymerase chain reaction-phản ứng tổng hợp dây chuyền nhờ polymease) là một trong những phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất trong lĩnh vực Sinh học phân tử. Phương pháp này do Kary Mullis phát minh vào năm 1985 và được giới thiệu lần đầu tiên tại Hội thảo lần thứ 51 ở Cold Spring Harbor vào năm 1986 và ông đã nhận được giải thưởng Nobel Hoá sinh học vào năm 1993.

Phương pháp PCR cho phép tổng hợp rất nhanh và chính xác từng đoạn DNA riêng biệt. Đây thực sự là phương pháp hiện đại và thuận tiện cho việc xác định sự có mặt của một gen nào đó trong tế bào với độ chính xác cao.

Phương pháp này dựa trên sự khám phá hoạt tính sinh học ở nhiệt độ cao của DNA polymerase được tìm thấy trong các sinh vật ưa nhiệt (vi khuẩn sống trong các suối nước nóng). Phần lớn các DNA polymerase chỉ làm việc ở nhiệt độ thấp. Nhưng ở nhiệt độ thấp, DNA xoắn chặt vì vậy DNA polymerase không có nhiều khả năng làm biến tính phần lớn các phân của phân tử. Nhưng các polymerase chịu nhiệt này hoạt động ở nhiệt độ rất cao, có thể lên đến 100°C. Ở nhiệt độ này DNA (dạng thẳng) sẽ bị biến tính.

1. Các thành phần chủ yếu của phản ứng PCR

2.1. DNA mẫu (DNA template)

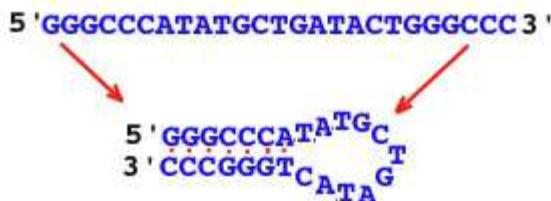
Đây là mẫu DNA sinh học mà chúng ta muốn khuyếch đại. Phản ứng PCR tối ưu xảy ra trên DNA thật tinh sạch nhưng phản ứng PCR vẫn cho kết quả tốt với DNA thu nhận trực tiếp từ dịch chiết tế bào. Lượng mẫu DNA sử dụng có khuynh hướng giảm khi sử dụng các enzyme DNA polymerase cho hiệu quả cao (<100ng). Lượng DNA mẫu nếu cao quá phản ứng PCR sẽ không xảy ra. PCR còn cho phép khuyếch đại cả những mẫu DNA không được bảo quản tốt, các mẫu DNA đã bị phân hủy từng phần như ở các vết máu để lâu ngày, tinh dịch đã khô, tóc, móng tay của người chết....

2.2. Mồi (primer)

Mồi là những đoạn DNA sợi đơn ngắn và cần thiết cho việc xúc tiến phản ứng dây chuyền tổng hợp DNA. Chúng nhận ra phần DNA cần được nhân lên, bắt cặp bổ sung với một đầu của DNA mẫu và tạo ra vị trí bắt đầu tái bản. Các mồi này có chiều ngược nhau, bao gồm một mồi xuôi (forward primer) và một mồi ngược (reverse primer).

Mồi là yếu tố quan trọng nhất của phản ứng PCR, quyết định hiệu quả của phản ứng. Do đó việc thiết kế mồi cần được tuân thủ một số nguyên tắc nhất định:

- + Cả hai mồi trong một phản ứng PCR phải có nhiệt độ nóng chảy (T_m) gần nhau bởi vì chúng được ủ ở cùng một nhiệt độ.
- + Kích thước tối thiểu của mồi là 18 base (thông thường là 18-24 base) để quá trình lai xảy ra tốt hơn.
- + Mồi phải đặc hiệu có nghĩa là nó phải đặc trưng cho trình tự DNA cần được khuyếch đại, một mồi chỉ bám vào một vị trí nhất định trên gen.
- + Không có nút cài tóc (hairpin loop): trong mỗi một mồi cần tránh trình tự đối xứng bậc hai (palindromic sequences) có thể làm tăng cấu trúc sợi bên trong ổn định do đó hạn chế việc mồi bám vào DNA mẫu (Hình 3.6).



Hình 3.6: Sự hình thành nút cài tóc do mồi chứa trình tự đối xứng bậc hai

- + Tránh sự bổ sung giữa hai mồi: sự bổ sung giữa hai mồi sẽ làm tăng sản phẩm primer dimer (Hình 3.7).



Hình 3.7: Sự bổ sung giữa hai mồi tạo nên primer dimer

+ Trật tự các base cũng ảnh hưởng đến sự ổn định việc bám của mồi dưới nhiệt độ cao. Hai trong ba base ở đầu 3' của mồi nên là G hoặc C, vì G và C có 3 liên kết hydro do đó sự polymer hoá sẽ tốt hơn.

+ Khoảng cách tối ưu giữa hai mồi: đây là một ứng dụng rất đặc trưng, nhưng đối với phần lớn các thử nghiệm PCR chẩn đoán, tốt nhất khoảng cách giữa hai mồi khi đã bám vào DNA khuôn là 150-500 base.

2.3. Enzyme polymerase chịu nhiệt

Vào thập niên 1960, nhà Vi sinh vật học Thomas Brock đã đến Công viên Quốc gia Yellowstone (Bang Wyoming, Mỹ) để nghiên cứu các vi sinh vật ưa nhiệt sống trong suối nước nóng 80-95 °C. Ông đã phát hiện một loài vi khuẩn phát triển mạnh ở nhiệt độ cao, có tên là *Thermus aquaticus*. Hai mươi năm sau, các nhà khoa học của tập đoàn Cetus (Tập đoàn Công nghệ Sinh học California) đã nhận thấy rằng DNA polymerase từ *Thermus aquaticus* (Tag-polymerase) có khả năng giải quyết vấn đề của enzyme biến tính sau mỗi chu kỳ. DNA polymerase chịu nhiệt sử dụng cho phản ứng PCR lần đầu tiên được bán trên thị trường là Tag-polymerase.

Từ đó đến nay, một số vi sinh vật chịu nhiệt khác đã được khám phá và người ta đã tách chiết thêm được các DNA polymerase chịu nhiệt để sử dụng cho phản ứng PCR như Vent- polymerase (Tli-polymerase), Pfu- polymerase, rTth... Các hoạt tính của chúng được trình bày ở bảng 3.1.

2.4. Các loại nucleotid

Trong phản ứng PCR, bốn loại nucleotid thường được sử dụng ở dạng deoxynucleotid: dATP, dCTP, dGTP, dTTP với nồng độ cân bằng trong một phản ứng ($200\mu M$ /loại nucleotid).

Bảng 3.1: Hoạt tính của một số enzyme DNA polymerase chịu nhiệt khác nhau

Enzyme	Hiệu suất tương đối (Relative efficiency)	Tần số lỗi (Error rate)	Tần số mở rộng (Extention rate)	Exo 3'-5'	Exo 5'-3'
<i>Taq-polymerase</i>	88	2×10^{-4}	75	Không	Có
<i>Vent-polymerase</i>	70	4×10^{-5}	67	Có	Không
<i>Pfu-polymerase</i>	60	7×10^{-7}	Không xác định	Có	Không
<i>rTth</i>	Không xác định	Không xác định	60	Không	Có

2.5. Nước

Nước sử dụng cho phản ứng PCR phải thật tinh khiết, không chứa ion nào, không chứa DNAase, RNAase, enzyme cắt hạn chế... Nói cách khác là không chứa bất kỳ một thành phần nào khác.

2.6. Dung dịch đệm

Dung dịch đệm 10X (100mM KCl, 100mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 200mM Tris-Cl pH 8.8, 20mM MgSO_4 , 1% (w/v) Triton X-100)

2.7. Ion Mg^{2+}

Nồng độ ion Mg^{2+} cũng là một yếu tố ảnh hưởng mạnh đến phản ứng PCR và nó tuỳ thuộc vào từng phản ứng. Nồng độ ion Mg^{2+} tối ưu là 150-200 μM . Người ta thấy rằng nếu nồng độ DNA quá cao thì enzyme polymerase sẽ gây ra nhiều lỗi hơn.

2. Ba giai đoạn trong một chu kỳ của phản ứng PCR

Có 3 giai đoạn chính trong phản ứng PCR và chúng được lặp đi lặp lại nhiều lần (chu kỳ) (thường từ 25 đến 75 chu kỳ).

2.1. Giai đoạn biến tính (denaturation)

Trong giai đoạn này phân tử DNA mẫu bị biến tính ở nhiệt độ cao (thường là từ 94-95 °C, lớn hơn nhiệt độ nóng chảy của phân tử) trong vòng 30 giây đến 1 phút, tất cả các liên kết hydro giữa hai mạch của phân tử bị bẻ gãy và tạo thành các DNA sợi đơn.

2.2. Giai đoạn lai (hybridization)

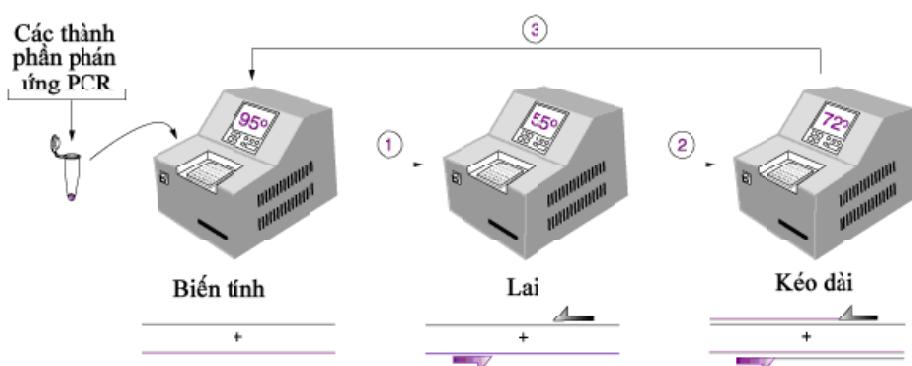
Nhiệt độ được hạ thấp (thường từ 40-70 °C, thấp hơn nhiệt độ nóng chảy của mồi) được sử dụng khoảng từ 3-5 °C) cho phép các mồi bám vào các phân tử DNA sợi đơn, đánh dấu phần DNA cần được khuyếch đại. Giai đoạn này kéo dài từ 30 giây đến một phút (còn được gọi là giai đoạn ủ).

Nếu nhiệt độ quá thấp thì các mồi sẽ gây nên nhiều lỗi và kết quả là sẽ tạo nên nhiều sản phẩm phụ. Nếu nhiệt độ quá cao thì phản ứng sẽ không có kết quả.

Công thức để xác định nhiệt độ nóng chảy (T_m) một cách tương đối là $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$

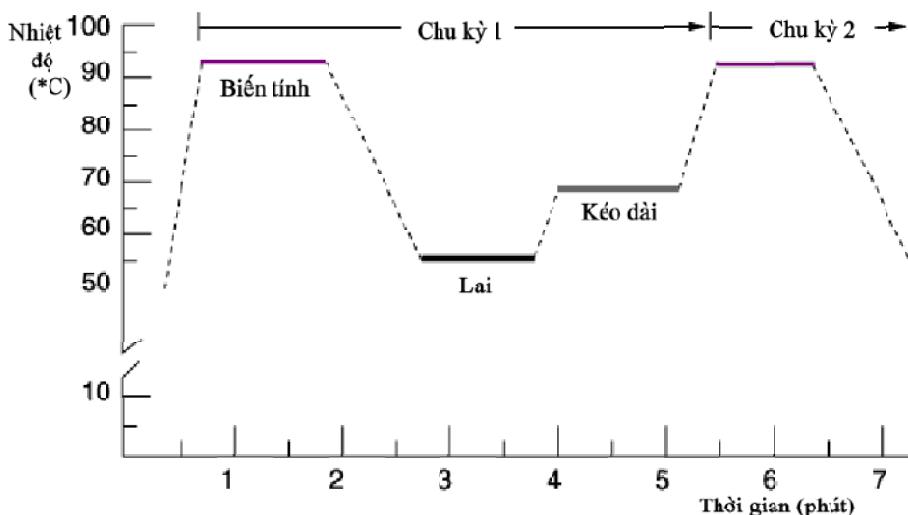
2.3. Giai đoạn kéo dài (elongation)

Nhiệt độ được tăng lên đến 72°C giúp cho DNA polymerase xúc tác tổng hợp DNA tốt nhất. Công việc của DNA polymerase là di chuyển đọc theo DNA sợi đơn và sử dụng nó làm khuôn để tổng



Hình 3.8: Ba giai đoạn trong một chu kỳ của phản ứng PCR

hợp sợi DNA mới bổ sung với DNA mẫu bằng cách kéo dài các phân đã được đánh dấu bởi các mồi. Thời gian của giai đoạn này phụ thuộc vào kích thước của DNA mẫu, thường kéo dài từ 30 giây đến nhiều phút.



Hình 3.9: Đồ thị biểu diễn mối quan hệ giữa thời gian và nhiệt độ trong một chu kỳ của phản ứng PCR

Ở giai đoạn này của chu kỳ cuối cùng, thời gian được tăng thêm vài phút để các sợi DNA chưa được sao chép xong hoàn thành quá trình tổng hợp.

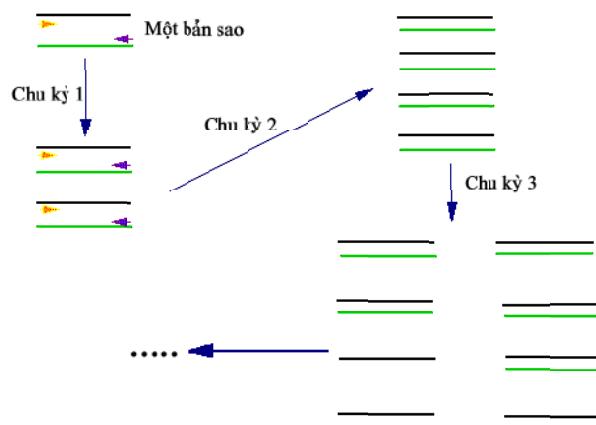
Sau mỗi chu kỳ, số bản sao của DNA mẫu lại được tăng gấp đôi. Đây là sự nhân bản theo cấp số nhân. Như vậy cứ 1 phân tử DNA mẫu, sau phản ứng PCR với n chu kỳ sẽ tạo thành 2^n bản sao phân tử DNA (Hình 3.10 và bảng 3.2).

Bảng 3.2: Số bản sao của 1 phân tử DNA mẫu tạo thành qua các chu kỳ của phản ứng PCR

Chu kỳ	Số bản sao
1	$2^1=2$
2	$2^2=4$
4	$2^4=16$
10	$2^{10}=1.024$
15	$2^{15}=32.768$
20	$2^{20}=1.048.576$
25	$2^{25}=33.554.432$
30	$2^{30}=1.073.741.824$
...	...
n	2^n

Ưu điểm của phương pháp PCR là chỉ cần một thời gian ngắn đã cho một số lượng DNA theo mong muốn.

Sản phẩm của phản ứng PCR được phân tách trên gel agarose đã nhuộm ethidium bromide và quan sát dưới máy chiếu tia UV.



Hình 3.10: Phản ứng PCR với lượng sản phẩm tăng theo cấp số nhân

Phương pháp RT-PCR

Taq-polymerase không có hoạt tính với RNA vì vậy phản ứng PCR không thể sử dụng để khuyếch đại RNA một cách trực tiếp. Tuy nhiên có thể sử dụng kết hợp enzyme sao chép ngược (reverse transcriptase-RT) với PCR để khuyếch đại RNA. Phản ứng này sử dụng khả năng của enzyme sao chép ngược để sao chép RNA thành DNA bô sung sợi đơn và từ DNA bô sung sợi đơn thành DNA bô sung sợi kép. Sau đó DNA bô sung sợi kép sẽ được khuyếch đại nhờ *Taq-polymerase*.

Sản phẩm của phản ứng RT-PCR là các phân tử DNA sợi kép tương ứng với phân tử RNA khuôn mẫu. RNA tế bào tổng số tách chiết từ mô hoặc tế bào được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng sao chép ngược.

Ưu điểm của phương pháp này là cho phép nghiên cứu các mRNA với hàm lượng rất thấp mà các phương pháp như Northern blot... không thể thực hiện được.

PCR được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như tạo dòng phân tử, kỹ thuật di truyền, phát hiện chẩn đoán các bệnh (do virus, vi khuẩn, ký sinh trùng...) cho kết quả rất chính xác, di truyền học để sản xuất các marker phân tử, nghiên cứu sự phát sinh các đột biến..., đấu tranh chống tội phạm, nghiên cứu phát hiện mối quan hệ giữa người chết với người sống hoặc giữa các nhóm dân tộc... Mặt khác, việc phân tích trình tự và thành phần nucleotid của DNA có giá trị rất lớn trong việc định loại các loài sinh vật.

Tài liệu tham khảo chính

Makrides SC. 2003. Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. Elsevier Science B. V. USA.

Louis-Marie H. 2003. Animal Transgenesis and Cloning. John Wiley and Sons, Ltd. USA.

Leland HH, Leroy H, Michael LG, Ann ER, Lee MS, Ruth CV. 2000. Genetics, The McGraw-Hill Companies, Inc. USA.

Winter PC, Hickey GI, Fletcher HL. 1998. Instant Notes Genetics. Printed by Biddles Ltd, Guildford. UK.

Glick BR, Jackj P. 1994. Molecular Biotechnology. ASM Press. Washington D.C. USA.

Chopra VL, Anwan N. 1990. Genetic Engineering and Biotechnology. Oxford and IBH Publishing CO.PVT, Ltd. UK.

Chương 4

Công nghệ chuyển gen ở động vật

I. Khái niệm chung

1. Động vật chuyển gen

Động vật chuyển gen là động vật có gen ngoại lai (gen chuyển) xen vào trong DNA genome của nó. Gen ngoại lai này phải được truyền lại cho tất cả mọi tế bào, kể cả các tế bào mầm. Việc chuyển gen ngoại lai vào động vật chỉ thành công khi các gen này di truyền lại cho thế hệ sau.

2. Sự phát triển của khoa học chuyển gen ở động vật

Vào thập kỷ 1970, các thí nghiệm nghiên cứu đã được thực hiện với các tế bào ung thư biểu bì phôi và các tế bào ung thư quái thai để tạo nên chuột thê khám (Brinster, 1974; Mintz và Illmensee, 1975; Bradley, 1984). Trong các động vật thê khám này, các tế bào nuôi cấy lấy từ một dòng chuột được đưa vào phôi của một dòng chuột khác bằng quần tụ phôi trực tiếp (direct embryo aggregation) hoặc bằng cách tiêm vào phôi ở giai đoạn phôi nang (blastocyst). Chuột thê khám trưởng thành có thể được sinh ra bằng sự đóng góp tế bào từ các bố mẹ khác nhau và sẽ biểu hiện tính trạng của mỗi dòng. Một kiểu chuyển genome khác ở động vật là chuyển nhân nguyên từ một phôi vào tế bào trứng chưa thụ tinh của một dòng nhận khác một cách trực tiếp (Mc Grath và Solter, 1983). Những động vật biến đổi gen bằng chuyển nhân này được tạo ra mà không cần một kỹ thuật tái tổ hợp DNA nào và chúng là sự kiện quan trọng trong việc làm sáng tỏ các cơ chế điều hoà di truyền ở động vật có vú.

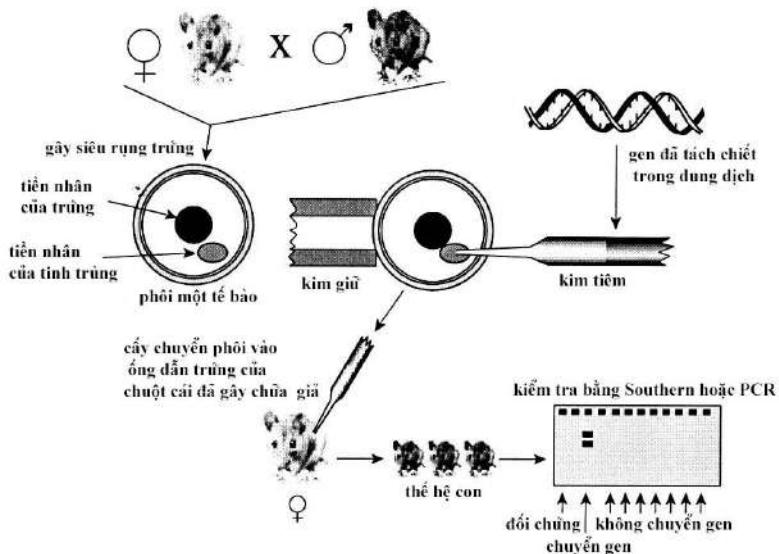
Bước phát triển tiếp theo của kỹ thuật chuyển gen được thực hiện bằng cách tiêm retrovirus vào các phôi chuột đã được nuôi cấy trước (Jeanish và Mintz, 1974; Jeanish, 1976). Thông tin di truyền của virus được chuyển một cách hiệu quả vào genome của động vật nhận và sau đó ít lâu kỹ thuật sử dụng retrovirus làm vector cho các

đoạn DNA ngoại lai đặc biệt đã được phát triển (Stuhmann, 1984). Sử dụng retrovirus như là vật truyền trung gian đối với việc chuyển gen đã tạo nên hiện tượng khám ở mức độ cao. Tuy nhiên kích thước của gen chuyển bị giới hạn và các trình tự của virus có thể làm nhiễu sự biểu hiện của gen chuyển. Sự đính các bản sao đơn của gen chuyển nằm bên cạnh DNA của virus có thể là có lợi nếu có yêu cầu tách dòng các locus đính vào.

Trong những năm gần đây, một số kỹ thuật tạo động vật chuyển gen khác đã được công bố: phương pháp chuyển gen bằng cách sử dụng tế bào gốc phôi (Grossler, 1986), phương pháp chuyển các đoạn nhiễm sắc thể nguyên (ví dụ như chuột “transomic”, Richa và Lo, 1988), chuyển gen trực tiếp vào tinh trùng kết hợp với thụ tinh *in vitro* (Lavitrano, 1989). Tuy nhiên, phương pháp vi tiêm DNA vào tiền nhân của hợp tử là phương pháp có hiệu quả nhất, được sử dụng rộng rãi nhất để tạo động vật chuyển gen. Sử dụng phương pháp này, các gen chuyển có chiều dài trên 50 kb của virus, sinh vật tiền nhân, thực vật, động vật không xương sống hoặc động vật có xương sống có thể được chuyển vào genome của động vật có vú và chúng có thể được biểu hiện ở cả tế bào sinh dưỡng và tế bào sinh sản.

II. Công nghệ tạo động vật chuyển gen

Trên cơ sở công nghệ DNA tái tổ hợp, ngành chăn nuôi đang đứng trước những cơ hội thay đổi có tính cách mạng. Ngày nay người ta có thể tạo ra những động vật mang các đặc tính kỳ diệu mà bằng phương pháp lai tạo bình thường không thể thực hiện được. Công nghệ tạo động vật chuyển gen là một quá trình phức tạp và ở những loài khác nhau có thể khác nhau ít nhiều nhưng nội dung cơ bản gồm các bước chính sau: tách chiết, phân lập gen mong muốn và tạo tổ hợp gen biểu hiện trong tế bào động vật; tạo cơ sở vật liệu biến nạp gen; biến nạp gen vào phôi động vật; nuôi cấy phôi và cấy truyền hợp tử (đối với động vật bậc cao); phân tích đánh giá tính ổn định và sự biểu hiện của gen lạ và tạo ra dòng động vật chuyển gen gốc một cách liên tục, sản xuất động vật chuyển gen.



Hình 4.1: Sơ đồ tạo động vật chuyển gen

1. Tách chiết, phân lập gen mong muốn và tạo tổ hợp gen biểu hiện trong tế bào động vật

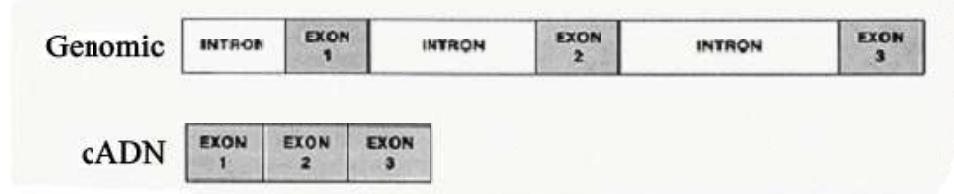
1.1. Tách chiết, phân lập gen mong muốn

Một gen ngoại lai trước khi được chuyển vào genome của tế bào vật chủ để tạo ra động vật chuyển gen phải được phân lập và tinh chế hay nói cách khác là nó phải được tạo dòng. Các công cụ sử dụng để tạo dòng bao gồm các enzyme đặc biệt có hoạt tính cắt và nối DNA (enzyme hạn chế và ligase), các mẫu dò (probe), vector và tế bào vật chủ. Tế bào vật chủ thường được sử dụng là tế bào vi khuẩn *E.coli* và vector thường được sử dụng là plasmid.

Việc tách chiết một gen riêng lẻ là rất phức tạp bởi vì DNA mẫu chứa hàng triệu gen. Do đó để thực hiện điều này, DNA mẫu chứa gen mong muốn và vector plasmid phải được cắt bởi cùng một loại enzyme hạn chế. Các đoạn DNA mẫu sau khi được cắt có mang gen mong muốn sẽ được xen vào vector plasmid và các đầu của các đoạn DNA mẫu này và các đầu của vector plasmid sẽ được nối với nhau nhờ ligase tạo thành plasmid tái tổ hợp. Sau đó các plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào các tế bào vi khuẩn *E.coli* và các tế bào vi

khuẩn tiến hành sinh trưởng. Vào thời điểm này, các tế bào vi khuẩn chứa plasmid mang gen mong muốn sẽ được phát hiện bằng mẫu dò. Chúng được nuôi cấy trong môi trường thích hợp để sinh trưởng phát triển tạo ra hàng triệu bản sao của vector chứa gen này. Vector chứa gen này sẽ được tách ra khỏi tế bào vi khuẩn và gen mong muốn sẽ được tách chiết. Phương pháp này có thể tạo ra hàng triệu bản sao của gen mong muốn mà không bị nhiễm bởi các gen khác. Gen chuyển có nguồn gốc từ genome này chứa các đoạn exon mã hoá và các đoạn intron không mã hoá (Hình 4.2).

Người ta cũng có thể phân lập được gen mong muốn từ sản phẩm biểu hiện của nó như mRNA hoặc protein. Từ mRNA dưới tác động của enzyme sao chép ngược sẽ tổng hợp ra DNA bô sung mạch đơn (single strand complement DNA-ss cDNA), tiếp theo là DNA bô sung mạch kép (double strand complement DNA- ds cDNA). DNA bô sung (complement DNA- cDNA) này khác với DNA gốc là không chứa các intron mà chỉ bao gồm các exon (Hình 4.2). Hoặc từ sản phẩm protein, có thể suy ra trình tự nucleotid của gen cấu trúc trên cơ sở trình tự các axit amin trong phân tử protein. Sau đó có thể thiết kế cặp mồi (primer) để dò tìm đoạn gen mong muốn.



Hình 4.2: So sánh hai dạng gen chuyển

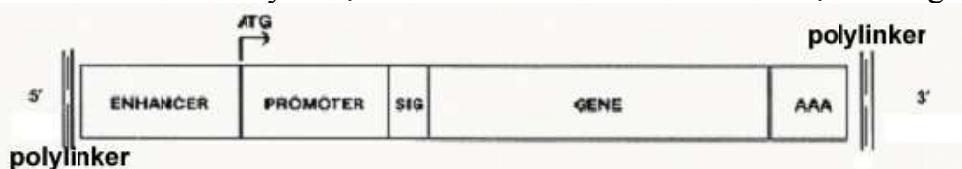
Dạng genome bao gồm tất cả các đoạn exon và intron xuất hiện một cách tự nhiên. Các đoạn intron liên quan đến việc cắt ghép mRNA và biểu hiện của gen. Dạng cDNA là một trình tự chỉ bao gồm các đoạn exon mã hoá protein của gen.

1. 2. Tạo tổ hợp gen chuyển biểu hiện trong tế bào động vật

Để tạo tổ hợp gen chuyển biểu hiện trong tế bào động vật, các vùng chức năng khác nhau của gen có nguồn gốc từ các loài khác

nhau có thể được kết hợp lại với nhau trong ống nghiệm bằng cách sử dụng enzyme hạn chế và ligase. Tất cả các thành phần của gen có thể được tách chiết và tái tổ hợp để tạo thành một cấu trúc gen chuyển biểu hiện (Hình 4.3).

Ở các đầu của cấu trúc dài đù này có thể được sửa đổi bằng cách bổ sung các trình tự polylinker chứa một số vị trí nhận biết các enzyme hạn chế khác nhau. Trình tự polylinker cho phép có thể xen vào cấu trúc này một vector để kiểm tra và tạo dòng.



Hình 4.3: Sơ đồ cấu trúc gen chuyển biểu hiện

enhancer: gen tăng cường

SIG: trình tự tín hiệu

ATG: vị trí khởi đầu phiên mã

AAA: đuôi polyA

Gen chuyển được đi kèm với các trình tự không mã hoá có vai trò điều hoà sự biểu hiện của gen. Các yếu tố điều hoà cũng có thể nằm ở trong đoạn intron. Yếu tố điều hoà ở gần đầu 5' của gen là promoter, có vai trò quyết định trong việc điều hoà sự biểu hiện của gen. Sự biểu hiện của gen có thể xảy ra trong tất cả các mô của cơ thể (không đặc hiệu) hoặc chỉ ở các mô đặc biệt. Hay nói cách khác gen cấu trúc muốn hoạt động để biểu hiện ra protein mà nó qui định trong hệ thống tế bào nhất định thì phải có promoter thích hợp với hệ thống mà nó hoạt động. Promoter ở tế bào động vật có nguồn gốc hoặc từ động vật như methallothionein (MT), thymidine kinase, β -actin, amylase, insulin, β -lactoglobulin, adipose P2 ... hoặc từ virus động vật như Simian virus (SV40), Rous sarcoma virus (RSV)...

Một yếu tố điều hoà khác là yếu tố tăng cường (enhancer), có chức năng tăng cường sự biểu hiện của gen, không phụ thuộc vào vị trí và sự định hướng đối với gen. Các yếu tố tăng cường xuất hiện có tương quan với các trình tự quá mẫn cảm với Dnase và ở cách gen một đoạn khoảng vài kilobase. Đầu 3' của gen cũng phải mang một trình tự poly-A để đảm bảo thích hợp cho quá trình phiên mã và dịch mã.

2. Tạo cơ sở vật liệu biến nạp gen

Ở động vật có vú thì giai đoạn biến nạp gen thích hợp nhất là trứng ở giai đoạn tiền nhân (pronucleus), giai đoạn mà nhân của tinh trùng và trứng chưa dung hợp (fusion) với nhau. Ở giai đoạn này tổ hợp gen lặn có cơ hội xâm nhập vào genome của động vật nhờ sự tái tổ hợp DNA của tinh trùng và của trứng. Do tế bào phôi chưa phân chia và phân hoá nên tổ hợp gen lặn được biến nạp vào giai đoạn này sẽ có mặt ở tất cả các tế bào kể cả tế bào sinh sản của động vật trưởng thành sau này.

Đối với động vật có vú, trứng chín được thu nhận bằng phương pháp sử dụng kích dục tố theo chương trình đã được xây dựng cho mỗi loài hoặc bằng phương pháp nuôi cấy trứng trong ống nghiệm. Sau đó thụ tinh nhân tạo để tạo ra trứng tiền nhân.

Các phương pháp sử dụng hiện nay để chuyển gen vào tế bào chủ nói chung là hiệu quả không cao. Để tạo ra một động vật chuyển gen, yêu cầu cần phải sử dụng hàng trăm thậm chí hàng ngàn trứng thụ tinh. Ở bò để đạt được một lượng phôi lớn như thế, nó phải được kích thích để rụng một lượng lớn trứng (siêu rụng trứng) thành thực và được thụ tinh nhân tạo. Sự hiểu biết về sự kiểm soát chức năng buồng trứng tăng lên đang cải tiến hiệu quả để có đủ số lượng trứng thụ tinh. Việc kích thích gây siêu rụng trứng đòi hỏi sự hiểu biết một cách chi tiết các yếu tố hormone kiểm soát sự phát triển của trứng ở trong buồng trứng. Quá trình phát triển của trứng đã được nghiên cứu mạnh mẽ và đã đạt được một số kết quả trong những năm qua. Các nghiên cứu đã tập trung khảo sát các cơ chế cơ bản kiểm soát sự sinh trưởng và thành thực của trứng và chức năng của thể vàng. Chúng mở đường cho sự phát triển các phương pháp điều hoà chu trình động dục để gây siêu rụng trứng một cách tỉ mỉ và chính xác hơn.

Có lẽ sự phát triển quan trọng nhất trong sinh lý học buồng trứng trong những năm mới đây là sự khám phá ra hormone inhibin. Inhibin là hormone ức chế sự rụng trứng, nó làm giảm tỉ lệ rụng trứng. Một vài giống động vật có tốc độ rụng trứng cao hiếm thấy như dòng Booroola của cừu Merino ở Úc có mức inhibin trong máu thấp. Trâu bò miễn dịch với inhibin có mức inhibin trong máu thấp

và tăng tỉ lệ rụng trứng. Các gen kiểm tra sự sản xuất inhibin đã được tạo dòng và khả năng tạo ra động vật chuyển gen mà trong đó các gen này bị ức chế hoặc bị loại bỏ là hoàn toàn có thể.

Một quá trình nghiên cứu khác cũng đã được thực hiện để tìm hiểu các cơ chế kiểm soát điều hoà chức năng của thê vàng và sự sản xuất hormone progesterone của nó. Hormone này điều hoà thời gian chu kỳ động dục và giúp duy trì sự thụ thai. Sự hiểu biết này mở đường cho sự phát triển các phương pháp điều hoà chu kỳ động dục cho khopr với con mẹ thay thế và gây siêu rụng trứng. Sự xử lý gây siêu rụng trứng được bắt đầu khi hai buồng trứng chịu ảnh hưởng của progesterone. Hiện nay các xử lý gây siêu rụng trứng sử dụng các hormone có độ tinh khiết cao được sản xuất bằng kỹ thuật DNA tái tổ hợp và đã tạo ra trung bình khoảng 10 trứng có thể phát triển đối với một lần xử lý (trong khi đó một con bò bình thường mỗi lần rụng trứng tạo ra 1 trứng có thể phát triển). Khi sự hiểu biết mới về các yếu tố kiểm soát sự phát triển của trứng và hoạt động chức năng của thê vàng được áp dụng, số lượng phôi có thể phát triển tạo ra sau một lần xử lý sẽ tăng lên như mong muốn.

Sự thành thục và thụ tinh nhân tạo của trứng đã tăng lên nhờ sự gây siêu rụng trứng, cung cấp một phương tiện khắc phục vấn đề sinh sản ít hiệu quả của vật nuôi. Thông thường một buồng trứng bò chứa khoảng 50.000 trứng chưa thành thục. Tuy nhiên, trung bình chỉ 3-4 trong số trứng này sẽ có kết quả trong việc sinh sản ra các bê con trong suốt thời gian sống của một bò mẹ. Sự sử dụng các phương pháp gây siêu rụng trứng hiện nay, từ một con bò đã xử lý có thể thu nhận được 10 trứng có thể phát triển và một nửa số trứng này phát triển thành phôi thích hợp cho chuyển gen. Kỹ thuật siêu rụng trứng cải tiến có thể dẫn đến sự tăng số lượng trứng thích hợp cho thụ tinh nhân tạo. Như thế số con sinh ra từ một động vật có thể hoàn toàn cao.

Sự thụ tinh nhân tạo chỉ xảy ra khi một tinh trùng đã chuẩn bị một cách đặc biệt để xâm nhập vào tế bào trứng gấp một trứng ở trạng thái thành thục tối ưu.

Đối với cá, giai đoạn biến nạp thích hợp là phôi ở giai đoạn 1-4 tế bào. Giai đoạn này được tạo ra bằng thu nhận trứng, tinh dịch bằng phương pháp sử dụng kích dục tố (kích thích tố trong nhau thai của người (HCG) hoặc nǎo thuỷ thể cá chép...), rồi thụ tinh nhân tạo.

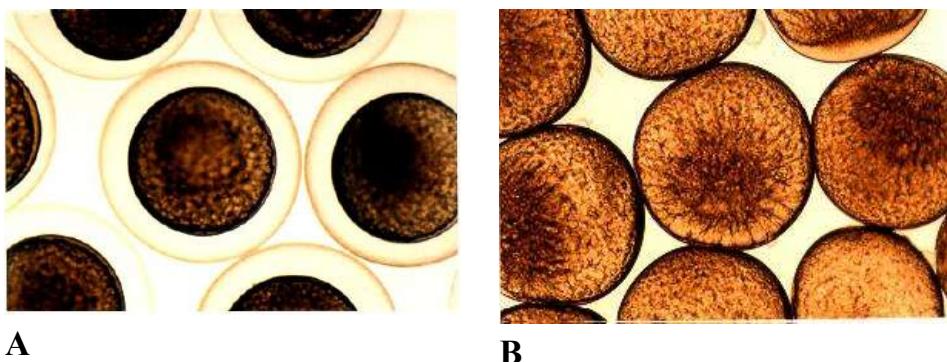
3. Chuyển gen vào động vật

Việc đạt được mục đích của việc tạo ra động vật chuyển gen đòi hỏi sự phát triển của các phương pháp có hiệu quả để chuyển gen mong muốn vào phôi. Hiện nay có nhiều phương pháp khác chuyển gen nhau đang được sử dụng để tạo động vật chuyển gen: vi tiêm, chuyển gen bằng cách sử dụng các tế bào gốc phôi, chuyển gen bằng cách sử dụng vector virus...(xem chương 2).

4. Nuôi cấy phôi trong ống nghiệm (đối với động vật bậc cao)

Tế bào trứng tiền nhân sau khi vi tiêm được nuôi cấy trong ống nghiệm để phát triển đến giai đoạn phôi đậu (morula) hoặc túi phôi (blastocyst). Ở giai đoạn này màng trong (pellucida) bị bong ra và phôi có thể làm tổ được ở dạ con. Những phôi này được cấy chuyển vào con nhận đã được gây chửa giả (pseudopregnant) để phát triển thành cá thể con.

Đối với động vật bậc thấp như cá không cần giai đoạn này. Tuy nhiên ở cá, trứng sau khi thụ tinh màng thứ cấp (chorion) dày lên, rất dai và dính gây trở ngại cho việc định vị chính xác mũi kim tiêm vào vị trí mong muốn để có thể đưa được DNA vào trứng (Hình 4.4A). Một khía cạnh khác giai đoạn phôi một tế bào ở cá rất ngắn trong khi đó việc vi tiêm đòi hỏi nhiều thao tác tỉ mỉ và chính xác. Để khắc phục các nhược điểm này, người ta có thể tiến hành loại màng thứ cấp (Hình 4.4B), kéo dài giai đoạn phôi 1-4 tế bào và áp nhân tạo phôi trần để tạo cá bột.



Hình 4.3: Trứng cá chạch (*Misgurnus anguillicaudatus*) trước và sau khi khử màng thứ cấp (chorion)

- A. Trứng cá chạch chưa khử màng thứ cấp
- B. Trứng cá chạch đã được khử màng thứ cấp

5. Kiểm tra động vật được sinh ra từ phôi chuyển gen

Để khẳng định động vật có được chuyển gen lạ vào hay không, người ta phải kiểm tra xem gen lạ có xâm nhập được vào bộ máy di truyền của động vật trưởng thành hay không và sản phẩm của gen lạ có được tổng hợp ra hay không.

Đối với vấn đề thứ nhất người ta sử dụng phương pháp lai phân tử trên pha rắn (Southern blot, Northern blot...) hoặc PCR.

Đối với vấn đề thứ hai, sản phẩm của gen lạ được đánh giá ở hai mức độ: phiên mã và dịch mã. Sản phẩm phiên mã được đánh giá bằng phương pháp RT-PCR, sản phẩm dịch mã được đánh giá bằng phương pháp Western blot, ELISA hoặc kỹ thuật miễn dịch phóng xạ (RIA) để phát hiện protein lạ trong động vật.

Theo dõi các thế hệ sau của động vật chuyển gen (F_1, F_2, F_3, \dots) để xác định gen lạ có di truyền hay không.

6. Tạo nguồn động vật chuyển gen một cách liên tục

Sau khi kiểm tra thấy gen ngoại lai đã được di truyền ổn định, tiến hành lai tạo và chọn lọc để tạo dòng động vật chuyển gen.

III. Những hướng nghiên cứu và kết quả đạt được trong lĩnh vực tạo động vật chuyển gen

1. Những hướng nghiên cứu tạo động vật chuyển gen

Hiện nay trên thế giới có nhiều phòng thí nghiệm đã và đang tập trung nghiên cứu để tạo ra động vật chuyển gen theo những mục đích khác nhau, tuy nhiên chủ yếu tập trung vào những hướng sau:

1 .1. Tạo ra những động vật có tốc độ lớn nhanh, hiệu quả sử dụng thức ăn cao

Trong hướng này, người ta tập trung chủ yếu vào việc đưa tổ hợp bao gồm gen cấu trúc của hormone sinh trưởng và promoter methallothionein vào động vật. Cho đến nay người ta đã đưa thành công gen này vào thỏ, lợn và cừu. Kết quả là những động vật chuyển gen này không to lèn như ở chuột. Tuy nhiên ở Đức, trong trường hợp ở lợn chuyển gen hormone sinh trưởng lượng mỡ giảm đi đáng kể (giảm từ 28,55mm xuống 0,7mm) và hiệu quả sử dụng thức ăn cao hơn. Ở Australia, lợn chuyển gen hormone sinh trưởng có tốc độ lớn nhanh hơn đối chứng là 17%, hiệu suất sử dụng thức ăn cao hơn 30%. Tuy nhiên động vật nuôi chuyển gen hormone sinh trưởng có biểu hiện bệnh lý lớn quá cỡ và chưa có ý nghĩa lớn trong thực tiễn. Các nhà khoa học ở Granada (Houston, Texas) đã tạo ra được bò chuyển gen tiếp nhận estrogen người (human estrogen receptor) có tốc độ lớn nhanh. Các nhà khoa học ở đây đã thành công trong việc đưa gen hormone sinh trưởng giống insulin bò (bovine insulin like growth hormone) vào gia súc để tạo ra giống gia súc thịt không dính mỡ. Hảng Granada đã chi 20 triệu USD để áp dụng kỹ thuật trên vào lợn, cừu, dê và gà để tạo ra vật nuôi có hiệu quả chuyển hóa thức ăn thành thịt, sữa... cao.

Để tạo ra động vật chuyển gen thật sự có ý nghĩa trong thực tiễn cho chăn nuôi cần phải tìm được gen khởi động (promoter) thích hợp. Gần đây, Sutrave (1990) đã khám phá ra gen *Ski*, mà dưới tác động của gen này protein cơ được tổng hợp rất mạnh, trong khi đó lượng mỡ lại giảm đi đáng kể. Phát hiện này mở ra triển vọng tạo ra giống lợn nhiều nạc, ít mỡ, hiệu suất sử dụng thức ăn cao.

1. 2. Tạo ra động vật chuyên sản xuất protein quý dùng trong y dược

Đây là hướng có nhiều triển vọng nhất bởi vì nhiều protein dược phẩm quý không thể sản xuất qua con đường vi sinh hoặc sinh vật bậc thấp, do những sinh vật này không có hệ enzyme để tạo ra những protein có cấu tạo phức tạp.

Ý định sử dụng tuyến sữa của động vật bậc cao để sản xuất ra protein quý lần đầu tiên được Clark (1987) đề xuất. Nội dung của kỹ thuật này là gắn gen cấu trúc với β -lactoglobulin (là promoter điều khiển sự biểu hiện của gen ở tuyến sữa). Khi đưa tinh hợp có chứa promoter β -lactoglobulin vào cừu, chuột, Clark thấy chúng biểu hiện rất cao ở tuyến sữa (Hình 4.5).

Sản xuất protein thông qua việc sản xuất sữa có nhiều lợi thế:

- Tuyến sữa của động vật có vú là một cơ quan sản xuất sinh học thích nghi cao độ cho sự bài tiết.
- Tuyến sữa là một hệ thống sản xuất không lò có khả năng tạo ra từ 23g (bò sữa) đến 205g (chuột) protein/kg cơ thể trong thời kỳ tiết sữa tối đa.
- Nồng độ tế bào trong tuyến sữa của động vật có vú lớn hơn trong nuôi cấy tế bào thông thường từ 100 đến 1000 lần.
- Nhiều protein được sản xuất ở tuyến sữa của động vật có vú có hoạt tính được cao do cơ quan này có đủ điều kiện thực hiện “chín hóa” (maturation) protein.
- Sữa là dịch tiết của cơ thể có thể được thu nhận một cách dễ dàng nhất, đặc biệt là từ động vật nhai lại.
- Sự biểu hiện của gen ở tuyến sữa của động vật có vú là chính xác về thời gian.
- Sản lượng sữa tiết ra ở động vật có vú là khá lớn: ở dê lên đến 800 lít/năm, cừu 400 lít/năm, bò 8000 lít/năm, ở chuột là 1,5ml/lần... (Bảng 4.1).

Bảng 4.1: Một vài thông số liên quan đến việc tiết sữa ở động vật có vú

(Pollock Daniel P., 1999)

Động vật	Thời gian mang thai (tháng)	Thời gian thành thực (tháng)	Số con trong một lứa	Sản lượng sữa tiết ra	Số tháng tiết sữa
Chuột	0,75	1	10	1,5ml	3 - 6
Thỏ	1	6	8	1 - 1,5l	7 - 8
Lợn	4	8	9	200 - 400l	15 - 16
Cừu	5	6	2	200 - 400l	16 - 18
Dê	5	6	2	600 - 800l	16 - 18
Bò	9	15	1	8000l	30 - 33

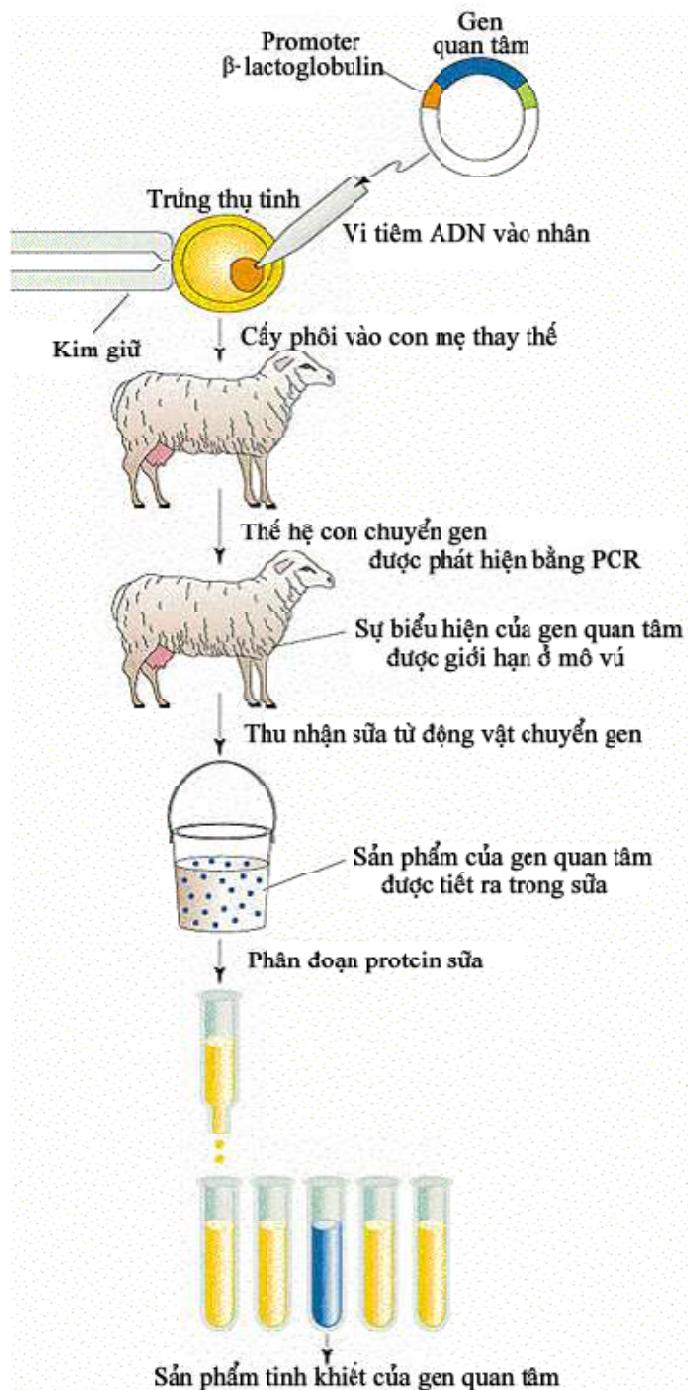
Cho đến nay rất nhiều protein dược phẩm quý đã và đang được nghiên cứu để sản xuất qua tuyến sữa của động vật (Bảng 4.2) như:

- α1- antitrypsin và yếu tố làm đông máu IX (blood clotting factor IX) của người đã được tiết ra trong sữa chuột, sữa cừu với nồng độ tương ứng là 5mg/ml và 25mg/ml.

- Chất hoạt hóa plasminogen mô người (human tissue plasminogen activator) làm tăng đông máu đã được tiết ra ở sữa dê và sữa chuột.

- Gen urokinase người đã được đưa thành công vào lợn và tiết ra ở tuyến sữa nhờ gen khởi động alpha-casein bò.

- Protein C người được tạo ra từ sữa chuột và sữa lợn chuyển gen...



Hình 4.5: Sơ đồ qui trình sản xuất protein thông qua tuyến sữa

Hiện tại đã có 2 protein được sản xuất bằng con đường này là α_1 -antitrypsin người và chất hoạt hoá plasminogen mô người. Chất đầu được sản xuất qua sữa cừu với nồng độ 35g/l, còn chất sau sản xuất qua sữa dê. Hãng Genetech (Mỹ) hàng năm thu được 196,4 triệu USD từ sản phẩm chất hoạt hoá plasminogen mô với giá 2,2 USD/liều. Hormone sinh trưởng người cũng là sản phẩm của kỹ thuật gen do vi sinh vật tổng hợp với mức thu hàng năm 122,7 triệu USD. Hiện tại các nhà khoa học Mỹ muốn giảm giá thành của sản phẩm này bằng cách sản xuất qua sữa thỏ. Người ta dự đoán giá thành sản xuất hormone này qua sữa thỏ chỉ bằng 1/3 giá thành hiện tại sản xuất nhờ vi sinh. Lý do là chu kỳ sinh sản của thỏ ngắn và lượng protein sữa của thỏ lại cao. Trong một năm lượng protein sữa của 6 con thỏ bằng của một con bò. Hiện tại chuột chuyển gen hormone sinh trưởng đã tiết ra protein này với nồng độ 0,5g/l. Tập đoàn Genzyme Transgenic (Mỹ) đã sản xuất ra nhiều loại protein quý từ sữa của chuột và dê chuyển gen (Bảng 4.3).

Mặt khác, các protein được phẩm mong muốn cũng được tạo ra trong dịch cơ thể không thuộc mô vú như máu. Cho đến nay phương pháp này chỉ mới được sử dụng để biểu hiện hemoglobin người với mức cao ở lợn chuyển gen (Sharma, 1994).

Bên cạnh hai phương pháp trên, các nhà khoa học đã phát triển động vật chuyển gen sản xuất ra được phẩm ở trong bàng quang của chúng. Khả năng sử dụng nước tiểu của động vật để sản xuất protein tăng lên vào năm 1995, khi Tung-Tien Sung ở Đại học New York chứng minh rằng có những gen chỉ hoạt động ở bàng quang. Các gen này mã hóa cho protein uroplakins. Protein này là một thành phần tham gia hình thành nên màng bàng quang. Kerr (1998) đã nghiên cứu tạo ra chuột chuyển gen sản xuất hormone sinh trưởng người từ nước tiểu. Gen hormone sinh trưởng người được nối với promoter urolapkin. Promoter này kiểm soát vị trí và thời gian hoạt động của gen. Chuột mang gen ngoại lai đã tạo ra 500 nanogram hormone sinh trưởng người trong một mili lít nước tiểu thải ra. Mặc dù sản phẩm của chuột chuyển gen chỉ là một lượng nhỏ nhưng chúng cho thấy rằng trong tương lai nước tiểu của vật nuôi có thể sẽ được lựa chọn. Nước tiểu có những ưu thế vượt trội so với sữa. Cả động vật đực và cái đều tiết nước tiểu, được bắt đầu ngay sau khi

Bảng 4.2: Tóm tắt các nghiên cứu biểu hiện trực tiếp protein dược phẩm trong sữa động vật chuyển gen

(Wall, R. J, 1997)

Loài chuyển gen	Gen chuyển		Promoter		Tài liệu tham khảo
	Gen	Nguồn	Promoter	Nguồn	
Chuột	α_1 - antitrypsin	Chuột	WAP	Thỏ	Bischoff, 1992
Chuột	α_1 - antitrypsin	Người	β -LG	Cừu	Archibald, 1990
Chuột	β -interferon	Người	WAP	Chuột	Schellander, 1992
Chuột	γ -interferon	Người	β -LG	Cừu	Dobrovolsky, 1993
Chuột	CFTR	Người	β -CN	Dí	DiTullio, 1992
Chuột	Yếu tố đông máu IX	Người	β -LG	Cừu	Yull, 1995
Chuột	Protein C	Người	WAP	Chuột	Valender, 1992
Chuột	Albumin huyết thanh	Người	β -LG	Cừu	Shani, 1992
Chuột	Superoxide dismutase	Người	β -LG	Cừu	Hansson, 1994
Chuột	Superoxide dismutase	Người	WAP	Chuột	Hansson, 1994
Chuột	Chất hoạt hóa plasminogen mô	Người	WAP	Chuột	Gordon, 1987
Chuột	Chất hoạt hóa plasminogen mô	Người	α_{S1} -CN	Bò	Riego, 1993
Chuột	Trophoblastin	Cừu	α -LA	Bò	Stinnakre, 1991
Chuột	Urokinase	Người	α_{S1} -CN	Bò	Meade, 1990
Thỏ	Interleukin-2	Người	β -CN	Thỏ	Buhler, 1995
Thỏ	Chất hoạt hóa plasminogen mô	Người	α_{S1} -CN	Bò	Riego, 1993
Lợn	Protein C	Người	WAP	Chuột	Velander, 1992
Cừu	α_1 - antitrypsin	Người	β -LG	Cừu	Wright, 1991
Cừu	Yếu tố làm đông máu IX	Người	β -LG	Cừu	Simons, 1988
Dê	Chất hoạt hóa plasminogen mô	Người	WAP	Chuột	Ebert, 1991

Bảng 4.3: Mức độ biểu hiện của một số protein trong sữa động vật chuyển gen (g/l)

(Pollock Daniel P., 1999)

Loại protein	Chuột	Dê
AAT	35	20
Longer acting tPA	6	6
AT III	10	10
BR 96 Mab	4	14
Single chain antibody	1	
α -Human transferring receptor	2	
Soluble receptor CD4	8	
AT III Syn	1	
Antibody fusion protein	1	
β -IFN	0,2	
Mab	1	
Chitotriosidae	2	
Galactosyl transferase	1	
Sialyl transferase	0,1	
GAD	8	
Human growth hormone	4	
Proinsulin	8 -14	
Myelin basic protein	4	
Single chain antibody fusion protein	0,2	
Prolactin	4	
Soluble HMW receptor	0,2	
CFTR membrane protein	0,001	
Factor Xa	0,3	
Urokinase	1	
Human transferrin receptor MAb	1	

sinh ra. Nước tiểu của các đại gia súc chứa nhiều protein hơn ở trong sữa của chúng. Mặt khác, trên thực tế chi phí cho việc tinh chế thuốc từ nước tiểu thấp hơn so với sữa. Một vài protein có thể không thích hợp đối với việc khai thác từ sữa bởi vì chúng làm tổn thương mô vú.

1. 3. Tạo ra động vật chống chịu được bệnh tật và sự thay đổi của điều kiện môi trường

Đến nay người ta đã biết được một số gen có khả năng kháng bệnh và chống chịu được sự thay đổi điều kiện môi trường của vật nuôi. Tiêm gen Mx vào lợn để tạo ra được giống lợn miễn dịch với bệnh cúm. Người ta cũng đã thành công trong việc tiêm gen IgA vào lợn, cừu, mèo ra khả năng tạo được các giống vật nuôi miễn dịch được với nhiều bệnh...

Ở cá, người ta đã chuyển gen chống lạnh AFP (antifreeze protein) và đã tạo ra được các giống cá có khả năng bảo vệ cơ thể chống lại sự lạnh giá (cá hồi, cá vàng...). Cá chuyển gen AFP có khả năng chịu lạnh tốt hơn cá đối chứng khi nuôi chúng trong môi trường có nhiệt độ thấp. Kết quả này đã mở rộng khả năng sống của các loài cá nuôi vào mùa đông. Đây là một thuận lợi lớn cho việc nuôi trồng các nguồn thuỷ sản quan trọng.

1. 4. Nâng cao năng suất, chất lượng động vật bằng cách thay đổi các con đường chuyển hóa trong cơ thể động vật

Nhiều phương pháp đã được đề xuất để nâng cao chất lượng dinh dưỡng và để cải tiến hiệu quả của các sản phẩm được sản xuất từ sữa như phô-mát, kem và sữa chua (Bảng 4.4).

Trong hướng này nổi bật là những nghiên cứu nâng cao chất lượng sữa bò, sữa cừu bằng cách chuyển gen lactose vào các đối tượng quan tâm. Sự biểu hiện của gen này được điều khiển bởi promoter của tuyến sữa. Trong sữa của những động vật chuyển gen này, đường lactose bị thủy phân thành đường galactose và đường glucose. Do vậy những người không quen uống sữa cũng có thể sử dụng được sữa này mà không cần quá trình lên men. Mới đây, các nhà khoa học (Brigid Brophy, 2003) đã chuyển thêm các gen mã hoá

β -casein (CSN2) và kappa-casein (CSN3) bò vào các nguyên bào sợi của bò và tạo ra bò chuyển gen cho sữa có mức β -casein và kappa-casein cao hơn bình thường: hàm lượng β -casein tăng lên 8-20%, hàm lượng kappa-casein tăng gấp 2 lần và tỉ lệ kappa-casein so với casein tổng số thay đổi một cách đáng kể. Hai loại casein là protein chủ yếu ở trong sữa và là thành phần chính của sữa đông, chìa khoá của sự sản xuất phô-mát và sữa chua. Các protein này rất quan trọng, chúng làm cho sữa có hàm lượng protein cao nhưng chứa nhiều nước.

Hiện tại người ta chú ý tới việc đưa một số gen của vi sinh vật vào cơ thể động vật. Tiến bộ nổi bật nhất trong hướng này là đưa gen mã hóa enzyme chịu trách nhiệm tổng hợp axít amin cystein vào cùu. Cystein là axít amin được tổng hợp từ serine nhờ hai enzyme là: serine transacetylase và O-acetylserine sulfhydrylase. Hai gen chịu trách nhiệm tổng hợp hai enzyme này là cys E và cys K. Cystein là axít amin cơ bản rất quan trọng trong sự phát triển của lông. Những cố gắng để bổ sung axít amin này vào thức ăn đều không đạt kết quả do chúng bị phân hủy trong ống tiêu hóa của động vật. Bởi vậy, nếu đưa được gen tổng hợp cystein vào cơ thể động vật sẽ làm tăng năng suất lông lên rất nhiều.

Các nhà khoa học Australia đã dùng gen tổng hợp cystein có nguồn gốc từ vi sinh vật (*E.coli* và *S. typhimurium*) để đưa vào cùu. Hai gen cys E và cys K phân lập từ hai chủng vi sinh được gắn với nhau thành một đoạn DNA, sau đó được gắn tiếp với promoter methallothionein. Ở chuột được chuyển tổ hợp gen này thì ở hầu hết các cơ quan đều có mặt tổ hợp và lượng lông tăng lên rất nhiều. Sự biểu hiện ở chuột và cùu giống nhau nên trong tương lai không xa sẽ tạo ra được giống cùu chuyển gen cystein với năng suất lông tăng lên rất nhiều lần.

Bảng 4.4: Một số thay đổi các thành phần của sữa được đề xuất
 (Wall. R. J, 1997)

Sự thay đổi	Kết quả
Tăng α-CN và β-CN	Tăng khả năng bền vững của sữa đồng cho việc làm phó-mát, cải tiến tính bền vững đối với nhiệt và tăng hàm lượng calcium
Tăng vị trí phosphoryl hoá trong casein	Tăng hàm lượng calcium và cải tiến sự hoà nhũ tương
Đưa các trình tự phân giải protein vào casein	Tăng tốc độ phát triển kết cấu (cải tiến sự chín của phó-mát)
Tăng nồng độ kappa-CN	Tăng tính ổn định của sự kết tụ casein, giảm kích thước mixen và giảm đông keo (gelation) và đông tụ (coagulation)
Tiết β-LG	Giảm đông keo ở nhiệt độ cao, cải tiến tính tiêu hoá, giảm dị ứng và giảm nguồn cystein sơ cấp trong sữa.
Giảm α-LA	Giảm lactose, tăng khả năng thương mại của sữa, giảm sự hình thành các tinh thể nước đá, làm giảm sự điều khiển tính thẩm của tuyến sữa
Thêm lactoferrin người	Tăng cường sự hấp thu sắt và bảo vệ chống lại sự nhiễm trùng ruột
Thêm các trình tự phân giải protein vào ?-CN	Tăng tốc độ chín của phó-mát
Giảm sự biểu hiện của acetyl-CoA cacboxylase	Giảm hàm lượng mỡ, cải tiến chất lượng dinh dưỡng và giảm giá thành sản xuất sữa
Biểu hiện gen Ig	Bảo vệ chống lại các bệnh như Salmonella và Listeria
Thay thế các gen protein sữa bò bằng các gen protein sữa người	Tạo ra sữa giống như sữa người

Tương tự, việc đưa gen tổng hợp axít amin cơ bản như threonine và lysine có nguồn gốc vi sinh vật vào cơ thể động vật để làm tăng hiệu quả sử dụng thức ăn của vật nuôi là có triển vọng trong tầm tay.

Việc nghiên cứu để tạo ra vật nuôi chuyển gen hormone sinh trưởng có tốc độ lớn nhanh, hiệu suất sử dụng thức ăn cao và hướng sản xuất các protein quý dùng chữa bệnh cho con người nhờ tuyến sữa động vật là có nhiều triển vọng hơn cả. Lý do là hormone sinh trưởng cũng như nhiều protein quý chỉ do một gen chịu trách nhiệm tổng hợp nên dễ biểu hiện hơn là những tính trạng do nhiều gen tham gia. Các protein được cơ thể động vật sản xuất phần lớn tiết ra qua tuyến sữa nhờ promoter β -lactoglobulin nên không gây độc hại cho cơ thể vật nuôi và có thể khai thác nhiều lần.

1. 5. Tạo ra vật nuôi chuyển gen cung cấp nội quan cấy ghép cho người

Hiện nay trên thế giới số bệnh nhân cần tế bào hay cơ quan đang sinh trưởng để cấy ghép ngày một nhiều, nhưng nguồn tế bào và cơ quan người không đủ. Ý tưởng sử dụng cơ quan động vật để thay thế đã xuất hiện cách đây gần một thế kỷ. Các thí nghiệm cấy ghép cơ quan các loài động vật khác nhau cho bệnh nhân đã được tiến hành. Trong một số trường hợp đã dẫn đến kết quả cấy ghép thành công nhưng phản ứng loại thải xảy ra nhanh. Hai cơ quan là tinh hoàn và buồng trong của mèo thì sự loại thải xảy ra chậm hơn nhiều. Các mèo này biểu hiện một phân tử có tên là phôi tử Fas trên bề mặt của chúng, làm chết các tế bào miễn dịch đã hoạt hoá.

Các loài khác nhau đã được thử nghiệm làm nguồn cơ quan cung cấp cho con người. Đầu tiên Linh trưởng, bao gồm hắc tinh tinh được cho là thích hợp nhất. Nhưng sau đó nhận thấy ngay rằng sự lựa chọn này không phải là tốt nhất. Các cơ quan của Linh trưởng bị loại thải sau khi cấy ghép. Linh trưởng là loài đang được bảo vệ và giá của nó cực kỳ đắt. Hơn nữa, Linh trưởng có nguy cơ truyền bệnh cho con người cao nhất. Cho nên ý tưởng sử dụng Linh trưởng làm nguồn cơ quan cho con người đã được loại bỏ. Lợn được cho là tốt nhất. Loài này có quan hệ gần gũi với con người, ăn tạp và các cơ quan của nó có kích thước tương tự với con người. Lợn không có

quan hệ họ hàng gần gũi với người như Linh trưởng nên khả năng truyền bệnh của nó cho người là không dễ dàng hơn. Hơn nữa sự sản xuất lợn giống có thể tiến hành trong những điều kiện kiểm soát được bệnh tật với một giá thành thấp. Mặt khác, hiện nay lợn được sử dụng làm nguồn thức ăn phong phú cho con người.

Sự ghép mô khác loài hãy còn chưa được ứng dụng phổ biến trong thực tế. Vấn đề thứ nhất cần giải quyết là một lĩnh vực khoa học. Các cơ chế loại thải chưa được hiểu biết đầy đủ và tất cả các protocol sử dụng để ức chế cơ chế này, có liên quan đến chuyển gen hay không hãy còn chưa được xác định. Tính nghiêm ngặt của sự loại thải sẽ khác nhau đối với các tế bào và cơ quan được ghép. Thực vậy, mô mạch máu bị loại thải mạnh nhất. Điều này là do tế bào nội bì cơ quan được ghép của lợn bị phân huỷ một cách nhanh chóng bởi thể bổ sung của người (human complement). Nó gây ra sự nghẽn mạch và phân huỷ nhanh cơ quan ghép. Các tế bào tách ra hoặc toàn bộ脱离 khỏi tập hợp của cơ quan là không nhạy cảm với hiện tượng này. Tuy nhiên các đảo tuy của lợn bị loại thải nhanh chóng khi ghép vào Linh trưởng.

Vấn đề thứ hai này sinh từ thực tế là các cơ quan lợn nói chung là không hoạt động một cách hiệu quả ở người. Một quả tim lợn sẽ hoạt động chính xác ở người. Một quả thận sẽ không thích nghi quá tốt với người được ghép. Hiện nay đường như chưa có dự tính ghép gan lợn cho người. Các chức năng của gan quá phức tạp nên không thể tương hợp một cách dễ dàng giữa các loài động vật có vú khác nhau. Các tế bào tách chiết hoặc các khối tập hợp của cơ quan có thể gây ra ít vấn đề hơn. Các tế bào tuyến tụy của lợn tiết insulin có thể hoạt động một cách chính xác ở người. Tương tự đối với các neuron tiết dopamine hoặc đối với các tế bào da.

Người ta cho rằng việc ghép mô khác loài có thể đưa ra một giải pháp nhất thời giúp cho bệnh nhân có thể sống được cho đến khi có được cơ quan người để thay thế. Trong các trường hợp đặc biệt, các tế bào lợn tồn tại không dài hơn một ngày sau khi ghép cho bệnh nhân hoặc có thể được sử dụng trong tuần hoàn máu nhân tạo. Các tế bào gan lợn được sử dụng để ghép cho các bệnh nhân bị viêm gan cấp tính. Các tế bào gan này được duy trì trong một lò phản ứng nhân tạo (extracorporeal reactor) và chúng giải độc cho máu người tuần hoàn trong lò phản ứng này. Các tế bào lợn có thể hoạt động

chức năng dài hơn nếu chúng được lấy từ lợn chuyển gen kháng với thể bô sung của người.

Vấn đề thứ ba là khả năng nhiễm nguồn bệnh virus của lợn đối với bệnh nhân được cấy ghép.

Mặc dù trong thực tiễn ghép mô khác loài chưa trở nên phổ biến, nhưng nó vẫn là một phương pháp hấp dẫn cho việc thay thế cơ quan và liệu pháp tế bào (cell therapy). Sử dụng tế bào gốc của người có thể là thích hợp hơn đối với liệu pháp tế bào trong tương lai. Cho đến nay việc tạo cơ quan người *in vitro* vẫn là một thách thức. Chỉ tế bào da và tế bào máu nuôi cấy *in vitro* được chuẩn bị đều đặn để cấy ghép cho bệnh nhân. Vì vậy lợn vẫn là một nguồn cơ quan đầy tiềm năng đối với người.

Yếu tố căn bản trong việc tạo ra vật nuôi chuyển gen để cung cấp nội quan cấy ghép cho các bệnh nhân là ngăn cản sự loại thải tế ghép nhờ sự hoạt hoá các nhân tố bô sung thuộc hệ miễn dịch của người. Các nhà khoa học đã tạo ra lợn chuyển gen biểu hiện gen mã hoá các nhân tố ngăn cản sự bô sung của người (human complement inhibitory factors) như nhân tố làm tăng nhanh sự phân huỷ (decay-accelerating factor) (Rosengard, 1995). Mục tiêu này đang được tiếp tục nghiên cứu.

1. 6. Tạo ra động vật chuyển gen làm mô hình nghiên cứu bệnh ở người

Hơn 3000 bệnh di truyền của người đã được biết và việc nghiên cứu các nguyên nhân chủ yếu của chúng đã được quan tâm với mục đích để phát minh các liệu pháp gen tế bào sinh dưỡng và tìm ra các phương pháp điều trị hiệu quả. Các dòng chuột nội phôi đặc biệt di truyền các kiểu hình mong muốn một cách tự phát đã cung cấp các mô hình hữu ích cho việc nghiên cứu sự phát sinh bệnh của người. Tuy nhiên một số vấn đề liên quan với sự nghiên cứu bệnh di truyền người xảy ra một cách tự nhiên bằng cách sử dụng động vật là:

- Các dòng động vật cho thấy các triệu chứng bệnh đặc biệt thường khó gặp và phải tốn nhiều tiền để duy trì.

- Các khuyết điểm di truyền đặc biệt của động vật có thể khó nhận ra và mô tả như các khuyết điểm di truyền tương ứng ở người.
- Các động vật bị bệnh thường khác với các động vật đối chứng không bị bệnh ở các nhân tố di truyền thêm vào với gen bệnh.

Trong thập kỷ qua, nhiều dòng chuột chuyển gen đã được tạo ra như các mô hình nghiên cứu bệnh tâm thần, tim mạch, phổi, ung thư, viêm nhiễm và miễn dịch cũng như để nghiên cứu cơ chế và sự rối loạn của chuyển hóa, sự sinh sản và sự phát triển sớm ở người... (Bảng 1.5). Các mô hình này đã được chứng minh bằng các tài liệu về động vật chuyển gen trong các cơ sở dữ liệu như TBASE hoặc IMR.

Sử dụng mô hình chuột chuyển gen đã giúp các nhà khoa học thấy được vai trò của gen trong sự phát triển và tính nội cân bằng của động vật một cách nhanh chóng và hy vọng sẽ xác định được vị trí và chức năng của gen người từ sự hiểu biết về vị trí và chức năng của gen chuột. Ngày nay, lĩnh vực y học đang ngày càng gặt hái nhiều lợi ích của kỹ thuật mới này. Chuột chuyển gen an toàn, không đắt và là nguồn phong phú cho các nghiên cứu sinh lý bệnh học cũng như thiết kế và đánh giá việc can thiệp của các liệu pháp mới. Thực tế, khi cơ sở phân tử của nhiều bệnh được rõ ràng, mô hình chuột chuyển gen hứa hẹn một cuộc cách mạng táo bạo trong việc hiểu biết và điều trị bệnh.

Bảng 1.5: Một số bệnh được điều trị bằng mô hình chuột chuyển gen
 (Jeff D Hardin, 1994)

Bệnh	Gen	Tài liệu tham khảo
Cystic fibrosis	CFTR	O'Neal, 1993; Dorin, 1992; Snowaert, 1992
Atherosclerosis	Apo E, Ape(a), Apo A-II	Havel, 1989; Zhang, 1992; Shimano, 1992; Fabry, 1993
Liệu pháp gen kháng Atherosclerosis	Apo AI, Ape E, LDLR	Plump, 1992; Goldstein, 1989; Warden, 1993
β-Thalassemia	β-globin	Yokode, 1990
Thiếu máu hồng cầu hình liềm	βs (và các dạng đột biến)	Yokode, 1990
Bệnh viêm ruột	Interleukine-2, Interleukine-10, T-cell receptor, β, MHC II	Podolsky, 1991; Mombaerts, 1993; Kuhn, 1993; Sadlack, 1993
Thiếu hụt miễn dịch kết hợp nặng	Rag-1, Rag-2	Rubin, 1991; Mombaerts, 1992
Liệu pháp gen loạn dưỡng cơ	Dystrophin	Shinkai, 1992
Bệnh Alzheimers	β-amyloid	Cox, 1993; Sandhu, 1991
ALS (Amyotrophic lateral sclerosis)	Neurofilament heavy chain	Kawabata, 1993
Bệnh tiểu đường phụ thuộc insulin	Interferon	Stewart, 1993
Ung thư	Các gen ung thư và các gen úc chế ung thư	Fowlis, 1993

1. 7. Tạo ra dòng động vật chuyển gen làm mô hình nghiên cứu trong chất độc học

Phần lớn các dòng động vật chuyển gen sử dụng trong chất độc học để thử nghiệm các chất gây đột biến và các chất gây ung thư. Trong trường hợp các chất gây đột biến, các phương pháp phát hiện các đột biến gen hiện nay được giới hạn chủ yếu *in vitro*. Các phương pháp *in vitro* phần lớn liên quan đến việc phân tích sự tồn thương nhiễm sắc thể trong một loại mô riêng biệt đối với tác động gây đột biến. Lý do căn bản đối với việc sử dụng động vật chuyển gen là để phát triển một xét nghiệm phát hiện chất gây đột biến *in vivo* trong một loạt các loại mô khác nhau, kể cả các tế bào mầm.

1.7.1. Thủ nghiệm các chất gây đột biến

Các mô hình chuột chuyển gen có giá trị thương mại bao gồm chuột Mutamouse và Big Blue chứa gen chuyển *lacZ* và *lacI* của *E.coli* một cách tương ứng. Các gen chuyển này được tạo dòng trong vector phage và chúng đã tích hợp vào trong genome của chuột. Theo cách xử lý chuột chuyển gen với một thử nghiệm hoá học, vector phage đã tích hợp được tách khỏi DNA genome bằng việc đóng gói *in vitro*. Phage đột biến với các gen *lac* đã phân huỷ được nhận ra nhờ khả năng sinh trưởng của chúng trên các dòng tế bào chủ *E.coli* dễ bị tổn thương và nhờ màu của các đĩa phân giải.

Các tác nhân là các chất gây đột biến mạnh được phát hiện với mức chính xác cao nhưng khả năng của các xét nghiệm này để phát hiện đúng các chất không gây ung thư đòi hỏi cần phải tiếp tục nghiên cứu. Ngoài ra, khó có thể phát hiện các chất gây nên các đột biến mất đoạn lớn. Dựa vào thực tế là chỉ các đoạn DNA có chiều dài đặc trưng được đóng gói là có hiệu quả vì vậy các đột biến mất đoạn lớn hoặc thêm đoạn sẽ chắc chắn không được phát hiện. Để khắc phục vấn đề này, chuột chuyển gen đã được tạo ra mang một plasmid với hệ thống *lacZ*, trong đó các đột biến mất đoạn lớn có thể được phát hiện (Gossen, 1995).

1.7.2. Thủ nghiệm các chất gây ung thư

Xét nghiệm sinh học thường sử dụng một lượng lớn động vật (400-500 con cho một chất) và dễ tạo ra số liệu không chính xác ở liều cao. Nguyên lý sử dụng cơ bản động vật chuyển gen cho việc thử nghiệm các chất gây ung thư là sự có mặt của một gen chuyển thích hợp sẽ không trực tiếp gây ra khối u nhưng sẽ cho thấy một bẩm chất dễ mắc bệnh cao với chất gây ung thư. Vì sự xuất hiện một dòng ác tính yêu cầu một số thay đổi di truyền thêm vào các tế bào đã nhiễm, thời gian cần thiết cho điều này xảy ra được rút ngắn. Bẩm chất dễ mắc bệnh với chất gây ung thư này đã dẫn đến tình trạng ung thư mà không tăng tốc độ xảy ra, nó không chỉ cho phép sự thử nghiệm chất gây ung thư ít tốn thời gian hơn mà còn làm giảm số lượng động vật yêu cầu khi xét nghiệm.

Ba dòng chuột chuyển gen khác nhau đã được tạo ra cho việc thử nghiệm các chất gây ung thư:

- Chuột chuyển gen Eμ-pim-1 mang gen ung thư đã hoạt hoá pim-1 (gen này có tốc độ gây ra khối u tự phát thấp và xuất hiện rất nhẹ với chất gây ung thư).
- Chuột chuyển gen mang một gen ung thư đã hoạt hoá (v-H-ras, c-H-ras) hoặc một gen ức chế khối u bất hoạt (p53).
- Chuột chuyển gen với gen sửa đổi DNA đã bất hoạt (XPA).

Tuy nhiên, động vật chuyển gen mang bệnh ung thư riêng lẻ kết hợp với các đột biến có thể cung cấp những thông tin sai lạc. Trong các tế bào động vật gặm nhấm, các đột biến riêng lẻ có thể dẫn đến một kiểu hình thay đổi nhưng không đủ để gây ra sự thay đổi hoàn toàn của các tế bào người. Do đó các mô hình động vật chuyển gen có thể quá nhạy cảm với các chất gây ung thư thêm vào và vì vậy đánh giá quá cao sự rủi ro của con người đối với bệnh này.

2. Một số thành tựu trong lĩnh vực tạo động vật chuyển gen

Bằng kỹ thuật vi tiêm DNA vào tiền nhân người ta đã tạo ra nhiều động vật chuyển gen như chuột, thỏ, lợn, cừu, bò, gà, cá... Tuy nhiên, sự thành công này đã bị hạn chế bởi sự tồn kén, mất nhiều thời gian, khó khăn về kỹ thuật, không hiệu quả của phương pháp này khi áp dụng đối với các loài động vật ngoại trừ chuột. Đối với

cừu và trâu bò thì việc cung cấp trứng là rất hạn chế. Một vấn đề nữa là ở động vật nuôi chỉ khoảng 1% hợp tử vi tiêm phát triển thành động vật chuyển gen, trong khi đó ở chuột là 10%.

2. 1. Chuột chuyển gen

Vào năm 1982, Palmiter và Brinster đã thành công trong việc tạo ra động vật chuyển gen đầu tiên trên thế giới, bằng cách chuyển gen của loài chuột này sang phôi loài chuột khác. Gen chuyển đã biểu hiện ở chuột chuyển gen và các thế hệ con cháu của chúng. Hai nhà khoa học này đã nhận được giải thưởng Charles Leopold Mayer, giải thưởng cao quý nhất của Viện Hàn lâm khoa học Pháp vào năm 1994.



Hình 4.6: Chuột chuyển gen horrnone sinh trưởng (bên phải) và chuột đôi chung (bên trái)

Palmiter và Brinster đã chuyển một gen ngoại lai vào trứng chuột thụ tinh. Sau đó cấy các trứng này vào chuột mẹ thay thế và đã chứng minh được rằng gen chuyển hoạt động chức năng trong một

số chuột con sinh ra. Nhân giống chuột thê hệ con, các nhà khoa học đã cho thấy gen chuyển có thể được truyền từ thê hệ này sang thê hệ khác theo qui luật di truyền Mendel. Với kỹ thuật chuyển gen, Palmiter và Brinster tin tưởng rằng công việc này sẽ làm sáng tỏ vấn đề thông tin trong bản “thiết kế” di truyền của chúng ta không được mã hoá trong các cơ thể sống như thế nào và các gen hoạt động trong quá trình phát triển bình thường cũng như trong trạng thái bệnh tật ra làm sao. Việc tạo ra chuột chuyển gen là một định hướng quan trọng trong nghiên cứu liệu pháp gen để điều trị các rối loạn gây nên bởi các lỗi của mã di truyền.

Palmiter và Brinster đã hiểu được cơ chế tế bào đọc mã di truyền và dịch các thông tin đó thành các cấu trúc sinh học. Kỹ thuật chuyển gen mà họ sử dụng dựa trên cơ sở là gen có hai phần chính: vùng mã hóa protein và vùng điều hòa hoạt động của gen. Một gen ngoại lai có nguồn gốc từ cơ thể khác được nối với một vùng kiểm tra đóng-mở (on-off) và chịu tác động của vùng này. Palmiter và Brinster đã tiến hành sử dụng công tắc mở là promoter MT (metallothionein). Promoter MT hoạt hóa bởi các ion kim loại đồng, kẽm và catmi, được nối với gen mã hóa enzyme thymidine kinase. Tổ hợp gen này được đưa vào trứng chuột vừa mới thụ tinh. Các nhà khoa học đã thấy rằng, bình thường ion catmi có tác dụng mở (turn on) gen MT, nhưng bây giờ nó mở gen thymidine kinase khi ở trong phôi chuột. Bằng cách tương tự, promoter MT được nối với gen hormone sinh trưởng chuột cống và sau đó chuyển vào chuột nhắt. Kết quả là các chuột nhắt “siêu hạng” có kích thước lớn hơn chuột bình thường nhiều lần đã ra đời.

Chuột chuyển gen đã cung cấp cho Palmiter và Brinster phương pháp để kiểm tra các mô hình thí nghiệm và điều trị bệnh.

Cho đến nay hàng trăm gen khác nhau đã được đưa vào các dòng chuột khác nhau và kết quả là hàng trăm dòng chuột chuyển gen đã được tạo ra và được phân tích. Các nghiên cứu này đã góp phần cung cấp các hiểu biết về sự điều hòa hoạt động của gen, sự phát triển khối u, tính đặc hiệu của miễn dịch, di truyền học phân tử của sự phát triển và các quá trình sinh học cơ bản khác. Các mô hình chuột chuyển gen điều trị các bệnh như ung thư, bệnh thiếu máu hồng cầu hình liềm, tiêu đường... cũng đã được nghiên cứu. Chuột

chuyển gen còn được sử dụng để sản xuất các protein quý hiếm thông qua tuyến sữa và nước tiểu.

DNA có thể được đưa vào chuột nhờ vector retrovirus bằng cách nhiễm vào các tế bào ở giai đoạn phôi sớm trước khi cấy vào con cái nhận; vi tiêm vào tiền nhân đực của trứng đã thụ tinh và đưa các tế bào gốc phôi đã thao tác di truyền vào phôi đang phát triển ở giai đoạn sớm trước khi cấy vào con cái nhận.

Các nghiên cứu này đã được mở rộng áp dụng trên các đối tượng khác như thỏ, gà, cá, cừu, lợn, trâu bò, dê...

2. 2. Thỏ chuyển gen

Thỏ đã được sử dụng làm mô hình thực nghiệm trong các thí nghiệm chuyển gen. Việc tạo ra thỏ chuyển gen thành công đã được công bố vào năm 1985 với gen chuyển là hormone sinh trưởng có cấu trúc MT-hGH (Hammer, 1985; Brem, 1985). Tỉ lệ các hợp tử thỏ bị thoái hoá do vi tiêm là dưới 10% (Ross, 1988). Khả năng phát triển của các phôi đã vi tiêm trước khi chuyển ghép hợp tử là thấp hơn đáng kể so với các phôi đối chứng.

Hiện nay thỏ là đối tượng chuyển gen nhằm mục đích tạo ra protein quý sử dụng trong y dược thông qua tuyến sữa bởi các lý do sau đây:

- Giá phôi thỏ thấp nên có thể tạo ra một lượng lớn thỏ chuyển gen. Điều này đã cung cấp cho các nhà nghiên cứu tăng đáng kể khả năng tạo ra được một hoặc vài dòng thỏ chuyển gen sản xuất ra protein hoạt động sinh học với số lượng đầy đủ.

- Thời gian mang thai của thỏ ngắn và thành thục sinh dục nhanh vì vậy cho phép tạo ra dòng thỏ chuyển gen nhanh hơn so với các động vật chuyển gen khác như dê, cừu hoặc bò...

- Giá sản xuất thấp.

- Về mặt di truyền, thỏ gần với người hơn bất kỳ động vật cho sữa nào khác do vậy nó là mô hình được chọn cho việc sản xuất các protein chữa bệnh ở người đặc biệt là các protein phức tạp.

- Không truyền các bệnh nghiêm trọng do virus gây ra cho người.

- Một thỏ cái có thể tiết một lượng sữa lên đến 250ml sữa mỗi ngày. Trong qui trình chuẩn, mỗi ngày chỉ có 100-150ml sữa được lấy từ một thỏ cái điển hình, tương đương với 15 lít mỗi năm đối với một thỏ cái.

- Lượng protein tái tổ hợp trong sữa thỏ chuyên gen biến đổi từ 1-10g trong một lít.

Các loại protein có thể được sản xuất trong sữa thỏ là các kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody), vaccin...

Vào năm 2001, Eduardo Kac, giáo sư thuộc Học viện Nghệ thuật Chicago, Mỹ đã kết hợp với các nhà Di truyền học Pháp đã tạo một con thỏ chuyên gen có khả năng phát ra ánh sáng màu lục ở trong tối bằng cách vi tiêm gen mã hóa protein huỳnh quang màu xanh lá cây có nguồn gốc từ súra vào hợp tử thỏ (Hình 4.7). Đây là hướng nghiên cứu mới phục vụ cho mục đích nghệ thuật. “Nó là một vật để cho họa sĩ thí nghiệm trên nền của khung vẽ và hoàn toàn khác với thí nghiệm để tạo ra một sự sống”. Nhiều nhà nghệ thuật khác đang nghiên cứu Công nghệ Sinh học và ý nghĩa xã hội của nó mà không nhầm mục đích tạo ra động vật chuyên gen.



Hình 4.7: Elba, thỏ chuyên gen protein huỳnh quang màu xanh lá cây

2. 3. Lợn chuyển gen

Năm 1985, Hammer và cộng sự đã công bố tạo được lợn chuyển gen GH bằng phương pháp giống như đã được sử dụng để tạo ra chuột “không lò” từ năm 1982.



Hình 4.8: Lợn chuyển gen siêu nạc

Khác với chuột, các hợp tử của lợn phải được ly tâm để nhìn thấy tiền nhân. Sau khi ly tâm, khoảng 50% hợp tử phát triển *in vivo* đến giai đoạn phôi đậu (morula) hoặc phôi nang (blastocyst). Các hợp tử vi tiêm, 10 - 20% phát triển đến các giai đoạn phôi khác nhau. Trong số các hợp tử vi tiêm thì 5,6 - 11% số hợp tử đã phát triển và tạo thành lợn con. Tỉ lệ hợp nhất gen ngoại lai vào DNA của con chủ là khoảng 10%. Các gen hormone sinh trưởng sử dụng trong các thí nghiệm đầu tiên đã cho tỉ lệ biểu hiện 50%. Sự di truyền Mendel đơn giản đã được chứng minh với các dòng tế bào mầm được chuyển gen. Mức độ biểu hiện được duy trì trong những lần sinh sản tiếp theo. Cấu trúc và biểu hiện của các gen chuyển đã được nhiều tác giả công bố.

Các gen ngoại lai được sử dụng để chuyển vào lợn là mMT-hGH (mouse methallothionein-human growth hormone), mMT-bGH (mouse methallothionein-bovin growth hormone), mMT-pGH (mouse methallothionein-porcine growth hormone), PRL-bGH (prolactin-bovin growth hormone), Alb-hGRF (albumin-human growth hormone releasing factor), mMT-hiGF1 (methallothionein-human insulin like growth factor 1). Lợn chuyển gen mMT- hGRF (mouse methallothionein-human growth hormone releasing factor)

cho tỉ lệ biểu hiện 29%. Lợn chuyển gen mMT - hGH và mMT - bGH cho tỉ lệ biểu hiện tới 61%. Số lượng những bản gen lạ tìm thấy ở DNA genome của con chủ là rất khác nhau, từ 1 - 500 bản sao trong một tế bào đối với lợn chuyển gen mMT-hGH, 1-28 đối với mMT-bGH, 1-15 đối với mMT-pGH và 10 đối với PRL-bGH.

Những kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng sinh lý của sự biểu hiện gen lạ cho thấy có sự tăng hormone sinh trưởng ở lợn chuyển gen hGH và bGH. Sự tăng hormone đó làm thay đổi sinh lý của cơ thể động vật. Người ta thấy có sự phân phối lại trọng lượng giữa các thành phần của vật nuôi như cơ, da, xương và các bộ phận khác. Lợn chuyển gen mMT - bGH thì giảm độ ngon nhưng tăng trọng lượng cơ thể.

2. 4. Cừu chuyển gen

Đối với cừu khi vi tiêm không cần thiết phải ly tâm phôi để nhìn thấy tiền nhân. Khả năng phát triển *in vivo* của hợp tử cừu vi tiêm (10%) và không vi tiêm (26%) bằng một nửa phôi lợn sau khi xử lý tương tự. Sau 7 ngày nuôi cấy *in vivo* các hợp tử cừu không vi tiêm, Rexroad và Wall (1987) đã quan sát được tỉ lệ phát triển là 86%. Một thí nghiệm nuôi cấy *in vivo* trong 5 giờ đã giảm tỉ lệ phát triển này xuống còn 65% và sau khi tiêm một dung dịch đệm đã giảm xuống đến 42%. Sau khi vi tiêm dung dịch DNA, 19% số hợp tử phát triển đến giai đoạn 32 tế bào. Ở những thí nghiệm đầu tiên, tỉ lệ hợp nhất là khoảng 1% trong khi tỉ lệ sống sót của phôi vi tiêm đến con non là 7% và 6,2% (theo Brem, 1991).

Các gen GH đã được sử dụng để chuyển vào cừu. Ngoài các gen GH như đã dùng để chuyển vào lợn (mMT-hGH, mMT-bGH, PRL-bGH , mMT-hGRF), người ta còn sử dụng các gen sMT-sGH 5(sheep methallothionein-sheep growth hormone 5), sMT-sGH 9(sheep methallothionein-sheep growth hormone 9). Các kết quả thu được không được tốt như ở lợn. Chỉ có cừu chuyển gen sMT-sGH cho tỉ lệ mỡ thấp hơn so với cừu đối chứng. Người ta cho rằng các tổ hợp MT-gen chuyển không có khả năng cảm ứng với các kim loại nặng khi cừu ăn vào. Mặt khác cũng có thể do ở cừu thiếu các yếu tố nội bào thích hợp cho sự cảm ứng, cho sự tái sắp xếp các gen chuyển và cho sự tích hợp gen chuyển vào genome của tế bào chủ ở các vị

trí thuận lợi. Bên cạnh các gen hormone sinh trưởng, một số các gen khác cũng đã được chuyển vào cừu như gen mã hoá yếu tố đông máu IX, gen α 1-antitrypsin, gen cysE, gen cysK.

2. 5. Dê chuyển gen

Một thử nghiệm cũng đã được thực hiện để tạo ra gen chuyển gen bằng kỹ thuật vi tiêm vào hợp tử đã ly tâm (Armstrong và cộng sự, 1987; Fabricant và cộng sự, 1987). Tỉ lệ đê con cho sữa chuyển gen sinh ra là 5 - 10%. Một số protein dược phẩm đã được biểu hiện ở sữa đê chuyển gen (Bảng 4.3).

2. 6. Bò

Giống như lợn, tiền nhân của hợp tử bò được thấy rõ nhờ ly tâm. Lohse, robl và First (1985) đã tiêm gen thymidine - kinase vào hợp tử bò và đã thấy rằng, 24 giờ sau khi tiêm khoảng 30% phôi có thymidine - kinase. Roschlaw và cộng sự (1988) đã vi tiêm 513 hợp tử bò với 3 cấu trúc gen khác nhau có nguồn gốc từ virus và đã tìm thấy DNA ngoại lai trong 14 phôi. Loskutoff và cộng sự (1986) đã thu được 3 thai sau khi tiêm 72 hợp tử và 17 phôi ở giai đoạn 2 tế bào. Mc. Evoy và cộng sự (1987) đã thu được 4 thai sau khi chuyển 43 hợp tử vi tiêm và 8 trứng ở giai đoạn 2 tế bào vào 17 thể nhận. Church, Mc. Rae và Mc. Whir (1986) đã tiêm 852 hợp tử bò với gen alpha-fetoprotein và thấy 4 phôi có sự hợp nhất gen trong số 111 phôi phát triển.

Trong thí nghiệm vi tiêm hợp tử bò, tỉ lệ bê con sinh ra từ phôi vi tiêm là 19,9%, tương ứng với các phôi đối chứng không vi tiêm là 42,8%. Theo Church và cộng sự (1987) thì 7 trong 126 bê con vi tiêm (5,6%) DNA ngoại lai đã hợp nhất với DNA genome. Biery, Bondioli và Mayo (1988) đã đạt được tỉ lệ hợp nhất từ 0,22 - 1,76% số hợp tử vi tiêm.

2. 7. Gà chuyển gen

Gà chuyển gen được phát triển nhằm các mục đích chủ yếu: phát triển, cải tiến các phương pháp và kỹ thuật thí nghiệm; sản xuất dược phẩm và các protein khác trong trứng để sử dụng trong y học

người và vật nuôi; nhận biết và khai thác các tính trạng sinh học có lợi cho sản xuất thịt gia cầm; nghiên cứu sự phát triển phôi.

2.7.1. Phát triển, cải tiến các phương pháp và kỹ thuật thí nghiệm

Không như các động vật khác, việc nghiên cứu chuyển gen ở gà gặp phải một số hạn chế nhất định. Ở động vật có vú và cá, trứng là một tế bào có tiền nhân có thể được nhìn thấy để vi tiêm DNA ngoại lai vào. Trong khi đó trứng gà ngay khi vừa được đẻ ra phôi đã bắt đầu phát triển ở noãn hoàng và chứa khoảng 50.000-60.000 tế bào.

Vào giữa thập niên 1980, một nhà nghiên cứu ở Viện Sinh lý học Động vật và Di truyền ở Edinburgh đã vi tiêm DNA ngoại lai vào các tế bào phôi gà đơn lẻ. Các phôi được chuyển từ ống dẫn trứng của gà mái đặt vào trong các bình chứa các dung dịch tương tự như ở trong trứng. Sau đó mỗi một phôi được chuyển vào trong một vỏ trứng nhân tạo, hàn gắn lại bằng keo được chế tạo từ lòng trắng trứng và thuốc kháng sinh. Các trứng này được đem áp nhân tạo. Kết quả là các chú gà con ra đời. Tạp chí New Scientist đã gọi chúng là các “gà con ống nghiệm” đầu tiên trên thế giới cho phép các nhà nghiên cứu tạo ra “gà siêu hạng” bằng cách xen DNA ngoại lai vào phôi.

Vào năm 1993, một nghiên cứu về khả năng của gan gà để biểu hiện protein tái tổ hợp *in vivo*. Nghiên cứu này được thiết kế để đánh giá sự sử dụng gan gà “tác động đến tốc độ sinh trưởng, sự chuyển hoá, thành phần cấu tạo mỡ cơ thể và hiệu quả của các loại thuốc khác nhau” và để nghiên cứu mô hình chữa bệnh di truyền người. Trong thí nghiệm này, gen kháng neomycin tái tổ hợp của chuột được gắn với vector retrovirus leukosis gà và được đưa vào phôi.

Vào năm 1994, một phương pháp tạo gà chuyển gen bằng vi tiêm DNA ngoại lai từ hai loại vi khuẩn khác nhau đã được mô tả. Trước tiên gà mái được thụ tinh nhân tạo với tinh dịch của gà trống khỏe mạnh. Sau đó giết chết gà mái bằng cách tiêm vào tĩnh mạch của nó chất gây mê với liều cao. Mổ bụng gà mái đã chết và di chuyển bộ phận ống dẫn trứng chứa trứng thụ tinh không vỏ. Sau đó đặt trứng vào các vỏ thay thế và tiêm DNA plasmid vi khuẩn vào đĩa phôi của hợp tử (phôi 1 tế bào). Đổ đầy vỏ trứng dung dịch nuôi cấy và hàn gắn lại. Tiếp theo là phân tích tình trạng của DNA plasmid đã

tiêm vào đĩa phôi tối thiểu sau 12 ngày trong môi trường. Với 128 trứng vi tiêm, 7 gà con vi tiêm sống đến thành thục sinh dục. Trong đó 1 gà trống đã truyền DNA plasmid vi khuẩn cho 3,4% con cái của nó. Các gà con chuyển gen này sống đến thành thục sinh dục và được nhân giống để sản xuất gà chuyển gen. Kết quả này chứng tỏ sự di truyền DNA ngoại lai ổn định có thể đạt được bằng phương pháp này.

Mục đích của một nghiên cứu được công bố vào năm 1995 trong tạp chí *Transgenic Research* là để phát triển một hệ thống vector retrovirus an toàn cho việc tạo gà chuyển gen. Vấn đề là trong thực tế sự tái bản *in vivo* của virus gà được sử dụng có thể gây bệnh sau một thời gian dài. Nó làm tăng nguy cơ tình trạng nhiễm virus mãn tính. Virus hoại tử lách gà (ANV=Avian Necrosis Virus) là tương đối gần gũi với retrovirus động vật có vú và vì vậy có thể thấy rằng ANV có thể nhiễm cho tế bào người. Các nhà nghiên cứu đã tìm ra một phương pháp tạo gà chuyển gen bằng cách sử dụng các vector tái bản đã sửa đổi dựa trên một hệ thống ngoại hướng (ecotropic system) mà làm cho nó chỉ có thể nhiễm vào tế bào gà.

Sử dụng vector có nguồn gốc từ virus leukosis của chim (ALV= Avian Leukosis Virus), các nhà nghiên cứu đã tiêm gen ngoại lai vi khuẩn vào khoang dưới đĩa mầm của phôi gà không áp. Sau đó tách chiết DNA từ các phôi này và đem tiêm vào một nhóm phôi gà không áp khác. Trứng vi tiêm được đem áp. Trong số 1550 trứng gà vi tiêm gen gắn với vector ngoại hướng được đem áp thì chỉ có 36 trứng nở. Theo các nhà nghiên cứu, phần lớn phôi chết sớm sau khi vi tiêm chủ yếu là do việc mở vỏ trứng của chúng. Một gà trống chuyển gen thành thục sinh dục sống sót được truyền gen cho thế hệ sau với tần số 2,2%.

Vào năm 2002, các nhà nghiên cứu của Công ty AviGenics và Khoa Di truyền của trường Đại học Georgia ở Athens đã tìm ra một hệ thống vector ALV có giá trị hơn đối với việc tạo gà chuyển gen cũng như để phát triển cách nhận diện thế hệ sau chuyển gen một cách nhanh chóng với các phương pháp ít tốn công sức hơn. Họ đã sản xuất được 3 đàn gà mang gen chuyển (với hệ thống vector ALV) hợp nhất, ổn định và đã truyền lại cho các thế hệ sau. Gần 5% gà

trống sinh ra từ phôi vi tiêm được sử dụng để nhân giống. Các gà trống này đã truyền gen lại cho con cháu với tần số 1%.

2.7.2. Sản xuất dược phẩm và các protein khác trong trứng để sử dụng cho y học người và vật nuôi

Trong lĩnh vực này, gà mái và trứng của chúng đang được sử dụng như là các nhà máy sản xuất protein và kháng thể. Các nhà khoa học đã tạo ra gà chuyển gen có thể sản xuất protein trong trứng. Đây là một bước quan trọng để tiến đến mục tiêu nhân giống gà mái có thể để những “quả trứng vàng” mà thuốc được đóng gói trong đó. Sản xuất thuốc trong lòng trắng trứng có nhiều lợi thế. Gà có thể để nhiều thế hệ trong một thời gian ngắn. Một thế hệ của gà là khoảng 6 tháng, ngắn hơn rất nhiều so với các động vật có vú lớn như dê chẵng hạn phải cần 18 tháng sinh trưởng từ phôi chuyển gen mới có khả năng cho sữa. Gà cũng sản xuất được nhiều protein, hàng năm mỗi gà mái có thể để xấp xỉ khoảng 330 quả trứng chứa 6,5 gam các protein khác nhau. Về mặt sinh học thì lòng trắng trứng ít phức tạp hơn sữa và có nhiều phương pháp tách chiết các protein khác nhau từ trứng một cách dễ dàng. Harvey và cộng sự (2002) thuộc trường Đại học Georgia ở Athens đã đưa gen mã hóa enzyme beta-lactamase vào trong phôi của gà Leghorn trắng. Khoảng 2% các phôi này đã sinh trưởng đến thành thục và đã biểu hiện enzyme beta-lactamase trong một số tế bào. Bước tiếp theo, các nhà nghiên cứu đã cho lai các gà bình thường với các gà trống và gà mái đã biểu hiện beta-lactamase trong tinh trùng hay trong trứng của chúng. Thế hệ con sinh ra đã mang các bản sao của gen beta-lactamase ở trong tất cả các tế bào và các gà mái thế hệ con này đã đẻ ra các quả trứng mặc dù nhỏ nhưng có chứa beta-lactamase. Các gen chuyển ổn định trong gà. Mỗi gà mái chuyển gen có thể đẻ trứng chứa enzyme tối thiểu là 16 tháng và gen chuyển hoạt động chức năng tối thiểu qua 4 thế hệ gà mái.

Tuy nhiên, loại virus được sử dụng làm vector hiện nay chỉ có thể mang các gen có kích thước nhỏ vào DNA của gà. Đây là một vấn đề quan trọng bởi vì trong thực tế nhiều gen hữu ích có kích thước lớn hơn gấp 10 lần so với gen beta-lactamase. Hai hướng nghiên cứu tiếp theo mà các nhà khoa học đang tập trung vào là

chuyển các gen mã hoá các protein sử dụng cho chữa bệnh và phát triển các phương pháp để tạo ra nhiều protein ngoại lai duy nhất trong các mô đặc biệt như ống dẫn trứng chẳng hạn.

Nghiên cứu gà chuyển gen đang được sử dụng để:

- Chế tạo vaccin.
- Sản xuất kháng thể trong trứng. Các kháng thể này được thêm vào trong thức ăn của lợn để để chống nhiễm khuẩn (như *E. coli*).
- Sản xuất kháng thể thúc đẩy sự sinh trưởng trong noãn hoàng để cung cấp nguyên liệu cho vật nuôi nhằm mục đích tăng tốc độ sinh trưởng của chúng.
- Sản xuất protein tái tổ hợp lactoferrin và lysozym. Đây là các chất bổ sung với thuốc kháng sinh thúc đẩy sự sinh trưởng hoặc kháng thể trong khẩu phần thức ăn gia cầm.
- Sản xuất kháng thể chống ung thư ở người.
- Tiết ra hormone sinh trưởng người để chữa bệnh lùn.
- Sản xuất trứng có hàm lượng cholesterol thấp hơn phục vụ cho con người.
- Sản xuất isoflavon đậu nành trong trứng để bán cho người tiêu dùng.
- Sản xuất các kháng thể như immoglobulin chim hoặc IgY một cách đặc biệt, thay thế cho việc sử dụng các động vật thí nghiệm.
- Tạo dòng sản xuất gà thịt (broiler). Khi trứng gà mái thịt thụ tinh mang các tế bào “kiểu thịt” thì sẽ cho phép tạo dòng gà thịt. Trong chương trình này, các cá thể nhất định từ các đàn gà phả hệ sẽ được tạo dòng và vật chất di truyền được đưa vào trong trứng thụ tinh. Các nhà khoa học nuôi cấy tế bào mang gen ngoại lai và sau đó đưa các tế bào này vào trong phôi của trứng nhận đã thụ tinh và tạo ra được gà thè khám. Trứng nhận đã thụ tinh có thể thu thập từ các đàn gà như Leughorn chẳng hạn. Gà Leughorn có thể sinh sản một số lượng lớn trứng với giá thành không đắt. Khi các trứng chuyển gen này được áp nở sẽ thu được gà thịt.

2.7.3. Nhận biết và khai thác các tính trạng sinh học có lợi cho sản xuất thịt gia cầm

Vào đầu thập niên 1990, Công ty Merck- một trong những công ty gia cầm lớn nhất trên thế giới đã đăng ký bằng sáng chế Châu Âu về gà chuyển gen hormone sinh trưởng bò dưới cái tên “gà vĩ mô” (Macro Chicken).

Trong lúc đó các nhà Di truyền học đang nghiên cứu một gen giảm mỡ để xen vào gà broiler bởi vì tốc độ sinh trưởng nhanh đã làm tăng số lượng tế bào mỡ ở những con gà này. Ở giai đoạn 6 tuần tuổi, gà chuyển gen hormone sinh trưởng có tốc độ sinh trưởng nhanh gấp 3,5 lần so với gà bình thường. Nhưng tỉ lệ tử vong của gà mái để chuyển gen là gấp 7 lần và hơn 2% gà chuyển gen chết do suy tim ở giai đoạn đầu của sự phát triển. Tối thiểu 1/4 gà broiler bị què và các nghiên cứu cho thấy rằng chúng bị đau. Với nhiều vấn đề gây nên do sự sinh trưởng với tốc độ mạnh mẽ của gà chuyển gen hormone sinh trưởng như vậy, ngành kỹ nghệ gia cầm đang xem xét các phương pháp sửa đổi di truyền khác để nhân giống gà cho thị trường thế giới. Trong thế kỷ 21 này, chắc chắn các công ty giống sẽ trở nên ngày càng quan tâm đến các tính trạng khác hơn là tốc độ sinh trưởng. Các công ty Công nghệ Sinh học cho rằng các kế hoạch của họ không chỉ tăng số lượng gà nuôi để giết thịt mà còn rút ngắn thời gian sinh trưởng của gà hoặc ngay cả việc gà có trọng lượng cơ thể lớn hơn.

2.7.4. Nghiên cứu sự phát triển phôi

Vào năm 2003, các nhà khoa học gia cầm trường Đại học North Carolina đã phát triển một công cụ mới hữu dụng để hiểu được phôi gà phát triển như thế nào.

Các nhà nghiên cứu đã thành công khi chuyển gen vào gà và tạo ra được một dòng gà mang gen marker đặc hiệu. Hiện nay các phôi gà chuyển gen này được sử dụng như là một mô hình để hiểu được sự phát triển của phôi bình thường và phôi không bình thường. Các dòng gà chuyển gen mới này được sử dụng trong các nghiên cứu với mục đích tìm hiểu các khuyết điểm sinh sản như tình trạng biến dạng của chi, tật nứt đốt sống (Hình 4.8). Các nhà nghiên cứu cho rằng việc hiểu các cơ chế phía sau các tế bào hoạt động có tốt không trong quá trình phát triển của phôi cuối cùng có thể cung cấp manh mối để làm ngừng sự phát triển của bệnh tật và có thể dẫn đến

nhiều hữu ích khác kể cả việc cải tiến sức khoẻ của con người và động vật.



Hình 4.9: Gà chuyển gen để nghiên cứu quá trình phát triển phôi

Các nhà nghiên cứu đã tạo ra gà chuyển gen bằng cách vi tiêm gen *lacZ* với một tín hiệu định vị ở nhân (gen *lacZ* dễ phát hiện và biểu hiện protein β-galactosidase) được nối với vector retrovirus SNTZ vào khoang dưới đĩa phôi hoặc lớp tế bào trên bề mặt của noãn hoàng của trứng vừa mới đẻ. Sau đó trứng được áp nở và gen *lacZ* được phát hiện bằng phản ứng PCR. 8 trong số 15 gà trống vi tiêm sống đến thành thực sinh dục mang gen *lacZ* ở trong tinh trùng. Các gà trống này được đem lai với gà mái bình thường không chuyển gen. Một trong 8 gà trống mang gen *lacZ* được đem lai đã tạo ra được 224 gà thế hệ F₁, trong đó có 2 gà trống mang gen *lacZ*, chiếm tỉ lệ 0,89%. Hai gà trống F₁ này được đem lai với gà mái bình thường tạo ra thế hệ F₂. 46,5% gà F₂ mang gen *lacZ* như mong đợi đối với một alen trội đồng hợp tử. Sản phẩm của gen *lacZ* là β-galactosidase định vị ở nhân được biểu hiện ở môi trường nuôi cấy nguyên bào sơ cấp có nguồn gốc từ gà F₂ và nó cũng được biểu hiện trong toàn bộ phôi gà F₂. Đây là lần đầu tiên một dòng gà chuyển gen biểu hiện β-galactosidase đã được phát triển.

2.8. Khi chuyển gen

Như chúng ta đã biết, nguyên tắc của tinh trùng trong quá trình thụ tinh là chuyển genome đơn bội của mình vào trứng để tạo thành hợp tử. Khả năng này đã được khai thác như là một chiến lược đổi mới sự phân phát DNA ngoại lai đối với sự sinh sản của động vật chuyển gen. Bằng phương pháp vi tiêm tinh trùng mang plasmid tái tổ hợp một cách trực tiếp vào tế bào chất của trứng (intracytoplasmic sperm injection =ICSI), các nhà khoa học thuộc Trường Đại học Khoa học Sức khoẻ Oregon, Mỹ đã tạo ra các phôi biểu hiện gen chuyển ở khỉ rhesus. Plasmid tái tổ hợp được sử dụng trong thí nghiệm bao gồm gen marker mã hoá protein huỳnh quang màu xanh lá cây GFP (green fluorescent protein) kết hợp với promoter CMV (cytomegalovirus). Gen GFP được tách chiết lần đầu tiên từ các con sứa có màu sắc sặc sỡ và là gen được các nhà nghiên cứu ưa chuộng vì khi GFP được tạo ra với số lượng đầy đủ chúng sẽ phát ra ánh sáng màu xanh. Các phôi biểu hiện GFP đã được tạo ra bằng phương pháp ICSI mặc dù không thông qua thụ tinh nhân tạo. Tinh trùng của khỉ rhesus vẫn mang plasmid tái tổ hợp sau khi vi tiêm vào trong khi thành thực sinh dục. Sự biểu hiện GFP thể khám đã được phát hiện ở giai đoạn 1-4 tế bào. Số lượng tế bào phôi và tỉ lệ % phôi biểu hiện ngày càng tăng lên trong sự phát sinh phôi cho tới giai đoạn túi phôi. Cả khối tế bào phôi bên trong và ngoại phôi bì dinh dưỡng (trophectoderm) đều cho thấy huỳnh quang màu xanh của GFP. Từ 7 phôi chuyển gen đã tạo thành 3 khỉ con: một cặp sinh đôi bình thường gồm một đực và một cái bị sinh thiếu 35 ngày và đã chết yêu; một con đực sức khoẻ tốt sinh đúng thời hạn được đặt tên là “George”. Kết quả này chứng tỏ rằng với phương pháp ICSI, tinh trùng khỉ mang DNA ngoại lai vẫn duy trì khả năng sinh sản của chúng một cách bình thường. Tuy nhiên, về mặt lý thuyết các nhà khoa học vẫn lo lắng rằng phương pháp này có thể truyền thêm vật chất di truyền cho thế hệ sau do nhiễm từ bên ngoài vào một cách tình cờ (ví dụ như nhiễm virus và vi khuẩn).

Bằng phương pháp chuyển gen nhò vector là virus, các nhà khoa học thuộc Trường Đại học Khoa học Sức khoẻ Oregon, Mỹ cũng đã tạo ra được một chú khỉ rhesus chuyển gen khác có tên là ANDi (inserted DNA=iDNA nhưng được đảo ngược) được sinh

vào ngày 2 tháng 10 năm 2000. Ở đây, một vector virus không lây nhiễm đã được sử dụng để mang gen GFP vào trứng của khỉ mẹ một cách trực tiếp. Sau đó vector virus này bám vào bề mặt của trứng và bị mất đi còn gen GFP tiếp tục con đường của nó để đi vào nhiễm sắc thể của mẹ. Các trứng chuyển gen này sẽ được thụ tinh nhân tạo. Phôi thụ tinh thu được sẽ được đưa vào các con mẹ thay thế.

Các nhà nghiên cứu đã chuyển gen GFP vào 224 trứng. Sau khi các trứng thụ tinh tạo ra 40 phôi và hình thành nên 5 bào thai. Trong đó chỉ có 3 bào thai sống sót và cuối cùng duy nhất chỉ một chú khỉ chuyển gen thành công là ANDi. Tuy nhiên ANDi không phát sáng trong tối (Hình 4.10).



Hình 4.10: ANDi - chú khỉ rhesus chuyển gen được chào đời vào ngày 2 tháng 10 năm 2000

Với phương pháp này các nhà khoa học hy vọng sẽ lắp được chỗ trống khoa học giữa chuột chuyển gen và người. Kết quả thu được đã cung cấp một công cụ nghiên cứu đầy tiềm năng và hữu hiệu để khám phá nguyên nhân của các bệnh như ung thư, Parkinson, Alzheimer, tiểu đường, tim mạch, các bệnh về trí tuệ... Nghiên cứu này cũng cho thấy một bước mới trong hướng liệu pháp gen dòng mầm (germ line genetic therapies). Các gen xác định các vấn đề di truyền có thể được đưa một cách trực tiếp vào trứng người chưa thụ tinh của cơ thể mẹ được biết mang các gen bệnh nhất định.

Cho đến nay tất cả các nghiên cứu liệu pháp gen của người đã được giới hạn để tập trung vào các mục tiêu tế bào ở đó các gen được đưa vào không trở thành một bộ phận của genome.

2.9. Muỗi chuyển gen

Theo Tổ chức Sức khoẻ Thế giới (The World Health Organization), hàng năm, bệnh sốt rét đã ảnh hưởng đến khoảng 500 triệu người trên trái đất. Nguyên nhân gây ra bệnh là do ký sinh trùng sốt rét. Ký sinh trùng sốt rét được truyền từ muỗi cái. Nó gây sốt, co cứng cơ, đổ mồ hôi, run và đã cướp đi 2 triệu sinh mạng mỗi năm, trong đó phần lớn là trẻ em Châu Phi dưới 5 tuổi. Trong khi các phương pháp thông thường để kiểm soát bệnh sốt rét đã không còn có hiệu quả như trước đây cho nên sự ra đời một biện pháp mới là rất cấp thiết.

Vào năm 2000, các nhà khoa học ở Học viện Hoàng gia London và Phòng Thí nghiệm Sinh học phân tử Châu Âu lần đầu tiên trên Thế giới đã thành công trong việc đưa một gen ngoại lai vào genome của muỗi *Anopheles stephensi* và đã tạo ra muỗi chuyển gen.

Thành tựu này có ý nghĩa rất lớn, giúp các nhà khoa học đi đến một bước gần hơn để tạo ra muỗi không truyền bệnh sốt rét. Nói cách khác, sự truyền căn bệnh quái ác này có thể được kiểm soát thông qua sự thao tác trên các gen của muỗi để phá vỡ sự tương tác qua lại giữa muỗi với ký sinh trùng sốt rét, bằng cách tạo ra một môi trường ở trong cơ thể muỗi mà có thể ngăn cản ký sinh trùng sốt rét sống ở đó. Cũng có thể thay đổi tập tính của muỗi làm cho nó thích hút máu động vật hơn máu người hoặc tạo ra muỗi bất đục đục một cách chọn lọc để làm giảm quần thể muỗi. Các nhà khoa học đều nhất trí về tiềm năng to lớn của sự phát triển này để chống lại bệnh sốt rét và cho rằng trong thời gian tới muỗi chuyển gen sẽ được tạo ra ổn định, an toàn và không có khả năng truyền bệnh sốt rét.

Các nhà nghiên cứu đã xen vào phôi *A. stephensi* gen mã hoá protein huỳnh quang màu xanh lá cây- GFP (green fluorescent protein) sử dụng một yếu tố vận động của *Drosophila hydei*. Gen mã hoá protein này được sử dụng bởi vì nó hoạt động như là một marker

và GFP tạo thành có khả năng được nhìn thấy dễ dàng dưới tia UV để nhận biết muỗi đã được tích hợp thành công gen ngoại lai.

Sự biểu hiện GFP của áu trùng vi tiêm là cao, chiếm gần 50% số áu trùng sống sót sau khi vi tiêm. Tuy nhiên, đến giai đoạn trưởng thành thì chỉ còn khoảng 10%. Sự xâm nhập vào nhiễm sắc thể và sự di truyền của gen GFP cho thế hệ sau cũng được chứng minh một cách chi tiết.

Một vấn đề khó khăn gặp phải trong nghiên cứu này là các quả trứng muỗi vừa mới đẻ trở nên cứng rất nhanh làm cho việc vi tiêm gen vào là rất khó. Chỉ sau khi khám phá ra dung dịch p-nitrophenol p-guanidinobenzoate (pNpGB), một hợp chất làm chậm tốc độ cứng và không ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi muỗi thì mới có thể tiến hành đưa gen ngoại lai và một cách tự nhiên. Muỗi cái được cho đẻ trứng trong dung dịch pNpGB, chất này sẽ ngăn cản enzyme phenoloxidase, bước đầu tiên trong quá trình melanin hoá.

Vào năm 2002, các nhà nghiên cứu thuộc trường Đại học Case Western Reserve (CWRU) ở Cleveland, Ohio, Mỹ đã phát triển một loại muỗi chuyển gen chống sốt rét ở chuột.

Chúng ta biết rằng có nhiều loại muỗi nhưng duy nhất chỉ có giống *Anopheles* truyền bệnh sốt rét ở động vật có vú. Muỗi là vật chủ bắt buộc đối với ký sinh trùng sốt rét kể từ khi nó không thể truyền trực tiếp từ người sang người. Khi muỗi hút máu một người bệnh, ký sinh trùng *Plasmodium* xâm nhập vào cơ thể và sinh sản ở ruột giữa của muỗi và tạo thành một dạng trung gian, dạng này xuyên qua vách ruột giữa đến khoang bụng và biến thành nang. Sau khoảng thời gian từ 10-15 ngày, các nang vỡ bung ra, hàng ngàn bào tử được giải phóng. Các bào tử này đi qua vách tuyến nước bọt và sẽ tồn tại ở tuyến này cho đến khi muỗi tiến hành chích người tiếp theo.

Với mục đích tìm ra gen có thể phá hoại quá trình này, nhóm nghiên cứu đã nuôi muỗi *A. Stephensi* bằng các hạt được phủ các sợi axit amin khác nhau và sau đó kiểm tra xem loại hạt nào dính với màng ruột của muỗi. Bằng cách chọn lọc và phối hợp các nhà khoa học đã tạo ra một hợp chất có khả năng dính rất cao gọi là SM1. Chất này có tác dụng làm giảm một cách có ý nghĩa số lượng ký sinh trùng xuyên qua vách ruột để biến thành nang.

Để việc sản xuất SM1 đúng lúc, người ta đã tìm ra gen mã hoá cho một loại enzyme tiêu hoá mà ruột muỗi tiết ra trong khi hút máu và nối nó với một gen được thiết kế để tổng hợp SM1. Sau đó cấu trúc này được đã được vi tiêm vào phôi muỗi *A. Stephensii* và nó đã tự tích hợp vào genome và trở thành một bộ phận của DNA muỗi. Protein SM1 sau khi được tổng hợp sẽ bám vào bề mặt biểu mô ruột, cạnh tranh với áu trùng muỗi. Áu trùng muỗi không có khả năng bám vào ruột sẽ chết. Bằng cách này SM1 đã ức chế khoảng 80% sự phát triển của áu trùng. Tính trạng này đã được di truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác. Mặt khác, muỗi chuyển gen SM1 không bị ảnh hưởng đến sức sống kể cả tuổi thọ và sự sản xuất trứng.

Tuy nhiên các nhà khoa học cảnh báo rằng sự cần thiết phải tiến hành thử nghiệm nhiều hơn nữa để chứng minh phương pháp này là an toàn đối với người.

Trong việc tìm kiếm các gen kháng ký sinh trùng sốt rét, người ta cũng đã thành công khi chuyển gen phospholipase A2 (PLA2) của nọc độc ong vào muỗi *A. Stephensii*. Gen này được gắn với promoter carboxypeptidase của *A. gambiae* (AgCP). Kết quả phân tích bằng phương pháp Northern blot cho thấy mRNA của gen PLA2 được biểu hiện một cách đặc hiệu ở ruột của muỗi chuyển gen. Sự biểu hiện cao nhất ở thời điểm 4 tiếng sau khi hút máu. Phân tích Western blot và huỳnh quang miễn dịch đã phát hiện protein PLA2 ở biểu mô ruột giữa của rmuỗi chuyển gen khoảng 8-24 tiếng sau khi hút máu. Nhưng điều quan trọng là sự biểu hiện của gen chuyển đã làm giảm số lượng các nang, trung bình là 87% và làm giảm một cách đáng kể sự truyền ký sinh trùng sốt rét sang chuột. Kết quả này cho thấy gen PLA2 có thể được sử dụng để ngăn cản sự phát triển của ký sinh trùng sốt rét ở muỗi.

Một hướng nghiên cứu khác đang được tiến hành là ngăn cản sự xâm nhập của ký sinh trùng vào tuyến nước bọt của muỗi. Sự ngăn cản ký sinh trùng xâm nhập vào các thời điểm khác nhau trong quá trình phát triển của nó là rất quan trọng bởi vì không có phương pháp nào là đạt hiệu quả 100% cả.

Các nhà nghiên cứu khác trước đây đã sử dụng một loại virus đã được sửa đổi tiêm vào muỗi để làm ngưng sự lan truyền ký sinh trùng. Nhưng phương pháp này có một số hạn chế là trong thực tế

virus cũng có thể nhiễm vào người và virus không thể di truyền được từ thế hệ này sang thế hệ sau ở muỗi. Một khi muỗi chết thì sẽ chấm dứt khả năng của virus chống lại sốt rét.

Một thách thức mà các nhà nghiên cứu đang phải đối mặt đó là sự phát triển của các ký sinh trùng có khả năng kháng. Bởi vì áp lực của quá trình chọn lọc cao, khi một gen được đưa vào quần thể ký sinh trùng sốt rét thì sự phát triển của các dòng kháng có khả năng để xuất hiện. Nó tương tự như khi xử lý sự nhiễm khuẩn với kháng sinh, sau một thời gian vi khuẩn sẽ trở nên kháng thuốc. Một vấn đề được đặt ra là sự sử dụng gen phức (multiple genes), trong đó mỗi một gen ngăn cản sự phát triển của ký sinh trùng một cách khác nhau là một phương pháp hiệu quả hơn.

Sau khi tạo ra muỗi chuyển gen, chiến lược tiếp theo để khắc phục sốt rét là đưa dòng muỗi chuyển gen kháng ký sinh trùng sốt rét vào trong tự nhiên. Phương pháp này phải được nghiên cứu trong phòng thí nghiệm một cách cẩn thận để kiểm tra xem muỗi chuyển gen sống như thế nào khi được trộn chung với các quần thể muỗi không chuyển gen.

Kết quả nghiên cứu quần thể muỗi chuyển gen đầu tiên trong phòng thí nghiệm đã được các nhà khoa học thuộc Học viện Hoàng gia London công bố vào năm 2003.

Các nhà nghiên cứu đã chuyển gen marker huỳnh quang đỏ hoặc xanh vào 4 dòng muỗi *A. stephensi*. Ở các quần thể đối chứng bao gồm toàn muỗi chuyển gen, marker huỳnh quang đã duy trì một cách nguyên vẹn qua hơn 30 thế hệ. Nhưng khi muỗi chuyển gen được nhân giống với muỗi bình thường thì số lượng muỗi mang marker trong quần thể giảm mạnh và trong một số thí nghiệm gen marker biến mất hoàn toàn trong khoảng từ thế hệ thứ 4 đến thế hệ thứ 16. Giáo sư Charles Godfray-Giám đốc Trung tâm Hội đồng nghiên cứu môi trường tự nhiên về Sinh học Quần thể (NERC) của Hoàng gia đã thực hiện mô hình toán học về động lực học của quần thể muỗi. Nghiên cứu này cho phép khảo sát tỉ mỉ các quá trình khác mà có thể giải thích được sự hoạt động của muỗi chuyển gen trong quần thể hỗn hợp. Tác giả cho rằng, thông qua sự nhân giống của muỗi chuyển gen, gen chuyển có khả năng bị một hoặc nhiều đột biến có hại. Các đột biến có hại này không giết chết muỗi nhưng làm

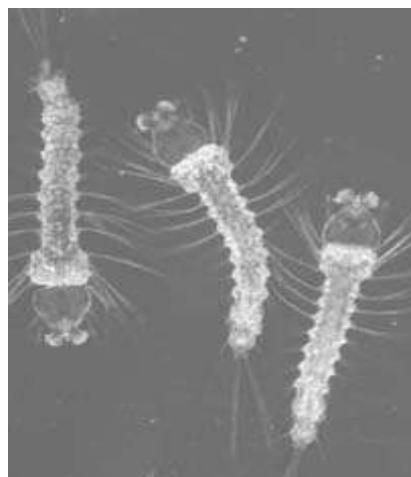
ch
đe
gi
đo
tạ

tr
cu
tí
tậ
pl
go

nh tranh với muỗi bình thường. Vấn
ng cách sử dụng các chế độ lai làm
h hưởng của giống. Như vậy hoạt
ng ảnh hưởng lớn đến khả năng tồn

Để này quyết định hoàn toàn các giá trị sự an toàn và hậu quả môi trường còn giúp đánh giá một cách toàn bộ ối chuyên gen để chống lại các bệnh xuất huyết và đóng vai trò là một bộ n lược phát triển trong tương lai để iy ra sự khô sở cho nhân loại.

**Hình 4.11: Vi tiêm DNA vào phôi
giai đoạn sớm của muỗi gây sốt
vàng da**



Hình 4.12: Ấu trùng muỗi nhìn dưới kính hiển vi

2.10. Cá chuyển gen

Hiện nay nghiên cứu tạo cá chuyên gen ngày càng được nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới quan tâm. Khoảng 10 năm trở lại đây hàng loạt cá chuyên gen đã được tạo ra: cá hồi cầu vòng, cá hồi, cá rô phi, cá vàng, cá mú vằn, cá medaka, cá chép, cá nheo Mỹ, cá trê châu Phi, cá vây biển (seabream), cá hồi chấm hồng Bắc cực (Arctic charr). Những gen ngoại lai được sử dụng để biến nạp vào cá là gen

hormone sinh trưởng (GH) người, gen GH bò, gen GH cá, gen δ-crystalline gà, gen β-galactosidase vi khuẩn, gen kháng hygromycin, gen α-globin, gen protein chống lạnh ở cá, gen neomycin phosphotransferase (neo)... Ví dụ Mc. Envoy và cộng sự đã chuyển gen β-galactosidae vào cá hồi Đại tây dương (Atlantic salmon), Ozato và cộng sự (1986) đã chuyển gen δ-crystalline gà vào cá medaka, Zhang và cộng sự (1989) đã chuyển gen GH cá hồi cầu vòng vào cá chép và cá trê. Trong cả ba trường hợp này gen ngoại lai đã được biểu hiện trong một số cá biến nạp.

Trong một số trường hợp, các sản phẩm sinh ra từ gen ngoại lai ở động vật chuyển gen có thể làm biến đổi kiểu hình của chúng. Ở cá chép chuyển gen GH cá hồi cầu vòng, polypeptid GH cá hồi cầu vòng đã được tìm thấy trong cá chép và do đó chúng lớn lên rất nhanh so với cá đối chứng. Những kết quả này cho thấy tiềm năng to lớn của việc sử dụng kỹ thuật chuyển gen để đưa các gen quy định các tính trạng mong muốn vào một số loài cá quan trọng.

Có nhiều phương pháp khác nhau để chuyển gen cho động vật nói chung và cá nói riêng. Phương pháp có hiệu quả nhất là vi tiêm trực tiếp DNA vào phôi. Gần đây người ta cũng đã thử nghiệm thành công chuyển gen trực tiếp vào tinh trùng trước khi cho thụ tinh. Muller F. và cộng sự (1992) lần đầu tiên công bố đã thành công trong việc sử dụng các tế bào tinh trùng đã xung điện để tạo cá chuyển gen. Phương pháp này được tiến hành bằng cách ủ tế bào tinh trùng cá trong dung dịch citrate loãng với DNA plasmid. Tiếp theo sử dụng xung điện có cường độ và điện trường cao để tăng lượng DNA xâm nhập vào tinh trùng. Tách chiết dịch mô và DNA genome của cá bột phát triển từ trứng thụ tinh với tinh trùng đã xử lý để kiểm tra hiệu quả của gen chuyển. Bằng phương pháp lai phân tử Dot blot và thử nghiệm sự biểu hiện của gen đã chứng minh sự có mặt và biểu hiện của gen ngoại lai trong 2,6 - 4,2% số cá bột của cá chép thường (*Cyprinus carpio* L.), cá trê Châu Phi (*Clarias gariepinus*) và cá rô phi (*Oreochromis niloticus*). Không có gen chuyển nào được tìm thấy trong cá bột thu được từ các thí nghiệm tương tự nhưng không xung điện tinh trùng.

Inoue (1992) đã chuyển gen vào phôi và cá bột thành công bằng phương pháp xung điện. Zuoyan Zhu (1993) cũng đã thành

công trong việc chuyển gen ngoại lai vào cá bằng phương pháp biến nạp bằng xung điện: tổ hợp gen MThGH được chuyển vào trứng cá thụ tinh đã được loại bỏ màng chorion. Thông số biến nạp tối ưu là 250V / 22 µF / 20Ω / 1ms. Kết quả đạt được là khoảng 10% số trứng nở và phát triển cá thành cá chạch chuyển gen. Muller và cộng sự (1993) đã dùng gen luciferase đom đóm và lacZ của *E. coli*, cả hai gen này đều được gắn với promoter CMV-IE1, để chuyển vào trứng thụ tinh đã loại bỏ màng chorion của cá trê Châu Phi và cá mú vằn bằng phương pháp xung điện. Kết quả đạt được khoảng 25 - 50% phôi đã phát triển thành cá chuyển gen.

Anderson và cộng sự (1996) đã thành công trong việc chuyển gen trực tiếp vào cơ vân của cá hồi cầu vồng (*Oncorhynchus mykiss*). Gen ngoại lai được sử dụng là gen luciferase đom đóm gắn với promoter CMV-IEP (cytomegalovirus immediate early promoter). Sự biểu hiện của gen được phát hiện trong các tế bào cơ dọc theo đường tiêm và các tế bào cơ phân tán trước vị trí tiêm. Tan và cộng sự (1997) đã chuyển gen chloramphenicol acetyltransferase (CAT) trực tiếp vào cơ vân cá mú vằn (zeabrafish) sử dụng plasmid pCMV-CAT1. Sự hoạt động biểu hiện của gen CAT đạt cực đại tương quan với lượng plasmid tiêm vào là 5 µg pCMV-CAT1. Sự hoạt động của gen CAT tăng lên một cách đều đặn qua 7 ngày đầu sau khi tiêm, với mức biểu hiện cao liên tục đến 1 năm. Gen CAT gắn với promoter virus cũng cho kết quả biểu hiện cao. Sự định vị hóa học mô sử dụng CMV β-gal cho thấy rằng chỉ các sợi cơ ở vị trí tiêm biểu hiện enzyme β-gal. Sự biểu hiện mạnh mẽ và liên tục của gen tiêm vào cho phép đưa ra giả thuyết có thể cá mú vằn là một hệ thống đơn giản và dễ bị ảnh hưởng đối với những nghiên cứu trực tiếp chuyển gen vào cơ. Zohrah Haji Sulaiman (1999) đã thành công trong việc chuyển gen trực tiếp vào cơ vân của cá mú (Seabass, *Lates calcarifer*) và tôm sú (Black Tiger Prawn, *Penaeus monodon*). Sự biểu hiện của gen sau khi tiêm plasmid pCMV β-gal được theo dõi đến 14 ngày sự biểu hiện của gen β-gal được phát hiện đầu tiên ở cá sau khi tiêm 1 ngày và ở tôm là 2 ngày. Sự biểu hiện liên tục đến 7 ngày sau khi tiêm ở cá và 14 ngày sau khi tiêm ở tôm. Tỉ lệ mẫu dương tính đối với sự biểu hiện của gen β-gal ở cá là 33,3% và ở tôm là 20%.

Cho đến nay, ở cá người ta đã và đang tập trung nghiên cứu theo những hướng cơ bản sau:

2.10.1. Chuyển gen hormone sinh trưởng (GH = growth hormone) vào cá

Hormone sinh trưởng là một protein có trọng lượng phân tử thay đổi tùy theo loài, ở người là 21.500 Da. GH được tiết ra từ thùy trước tuyến yên của động vật có xương sống. Ở động vật có vú GH cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển. GH có 191 axit amin, cấu trúc phân tử có 2 cầu nối disulfua

Sự bài tiết GH do hormone của hypothalamus là hormone giải phóng hormone sinh trưởng (GRH = growth hormone releasing hormone), hormone ức chế hormone sinh trưởng (GIH = growth hormone inhibiting hormone) theo cơ chế điều hòa ngược.

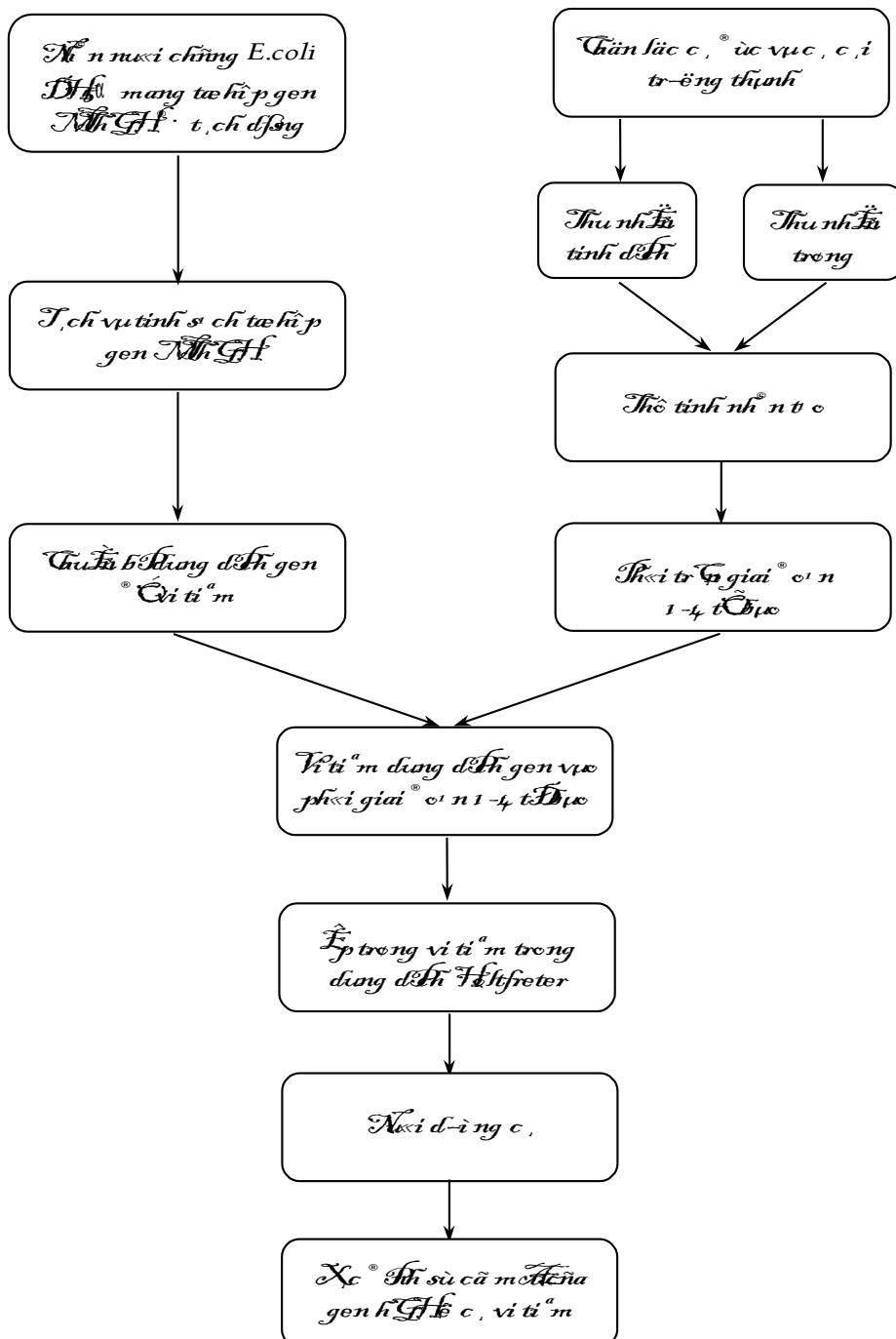
Cá đã được xử lý thí nghiệm với hormone sinh trưởng hoặc tuyến yên chiết từ các nguồn khác nhau như bò, lợn, cá. Tất cả các thí nghiệm đều làm tăng tốc độ sinh trưởng của cá. Sự sinh tổng hợp hormone sinh trưởng tái tổ hợp của gà, bò và cá hồi cầu vòng cũng đã cho thấy chức năng sinh học của gen hormone sinh trưởng bằng sự tăng cường tốc độ sinh trưởng của cá. Thật là có lý khi mong đợi cá chuyển gen hormone sinh trưởng người sẽ có chức năng giống như hormone sinh trưởng của các loài khác.

Qui trình công nghệ tạo cá chuyển gen hormone sinh trưởng người có thể tóm tắt bằng sơ đồ hình 4.13.

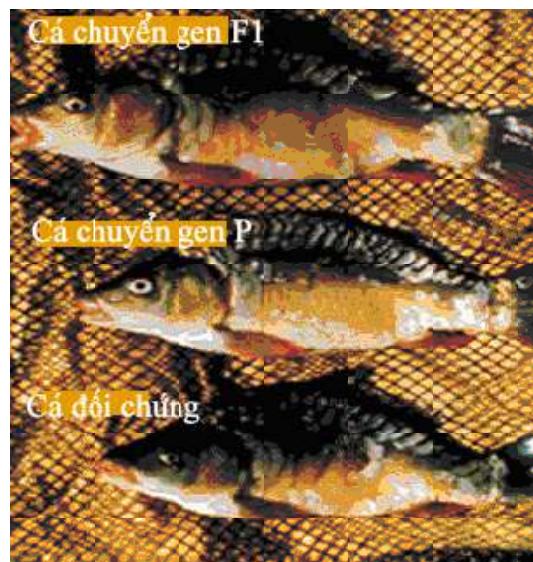
Sự tăng cường tốc độ sinh trưởng đã được quan sát ở cá chép chuyển gen MThGH.

Cơ chế của sự tăng cường sinh trưởng trong cá chuyển gen đã được khám phá dựa vào chức năng của hormone sinh trưởng người trên cơ sở sự tăng trưởng bộ xương và sự kích thích tổng hợp protein. Một số cá chép chuyển gen này vì vậy đã tăng cường độ dày cơ lưng và tăng trưởng bè ngang cơ thể và chúng đã có hình thái khác thường một cách đột ngột. Bè ngang cơ thể cho tới chiều dài cơ thể là một trong những tính trạng phân loại phổ biến. Con số này ở cá chép là 35% - 47%, nhưng ở một vài cá chép chuyển gen lại tăng lên đến 51% - 53,3%.

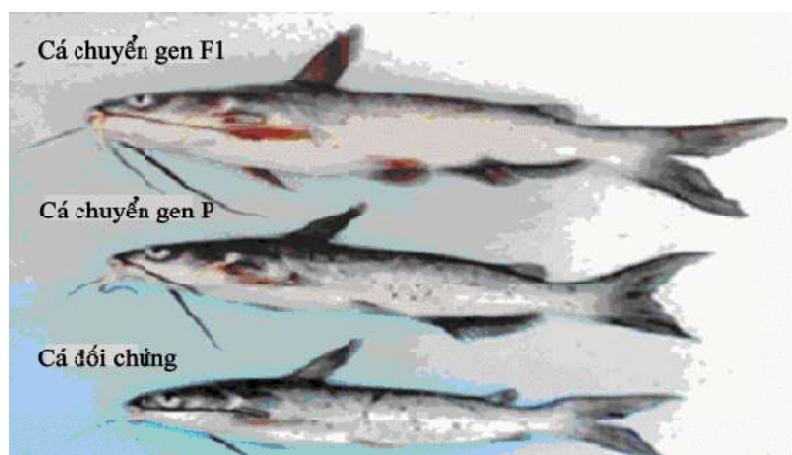
Mặc dù Trung Quốc không phải là nước đi đầu của cuộc cách mạng Sinh học phân tử nhưng vào năm 1985, giáo sư Zuoyan Zhu đã làm ngạc nhiên các nhà nghiên cứu Mỹ và Châu Âu khi công bố rằng nhóm nghiên cứu của ông đã chuyển được gen hormone sinh trưởng người vào cá. Theo Zhu thì thể hệ F₁ của cá đã được chuyển gen này lớn gấp hai lần so với cá đồi chưng. Mặc dù Zhu và cộng sự không trình bày bằng chứng đối với việc hợp nhất và biểu hiện của gen GH ngoại lai đó nhưng người ta đã thấy rằng gen GH cá có thể chuyển vào trứng của một số loài cá và được hợp nhất với DNA genome của các loài cá này.



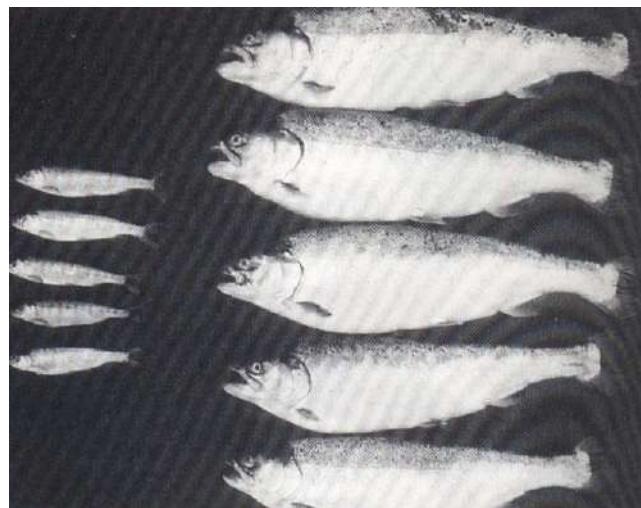
Hình 4.13: Sơ đồ qui trình tạo cá mang gen hormone sinh trưởng bằng vi tiêm



Hình 4.14: Cá chép (*Common carp*) chuyển gen hormone sinh trưởng



Hình 4.15: Cá trê Châu Phi (*Channel catfish*) chuyển gen hormone sinh trưởng



Hình 4.16: Cá hồi chuyển gen hormone sinh trưởng (phải) và cá hồi đối chứng (trái)

Những nghiên cứu tiếp theo đã sử dụng một số gen GH động vật có vú, gen GH cá và các cDNA của GH. Chẳng hạn Zhang và cộng sự (1988, 1990) đã sử dụng plasmid tái tổ hợp chứa đoạn lặp lại đầu tận cùng (LTR = Long Terminal Repeat) của virus Rous sarcoma (RSV) ở chim và cDNA của GH cá hồi để vi tiêm vào phôi cá chép đang phát triển. Tách chiết DNA genome từ vây ngực cá vi tiêm và đem phân tích dot blot và Southern blot, sử dụng LTR của RSV và cDNA của GH cá hồi làm mẫu dò, người ta đã tìm thấy đoạn hợp nhất p RSV - LTR - GH - cDNA của cá hồi ổn định và đã biểu hiện ra polypeptid GH cá hồi. Cá chuyển gen có kích thước trung bình lớn hơn 22% so với cá đối chứng. Mặt khác, một số cá thể được chọn một cách ngẫu nhiên từ thế hệ con lai của các cá đực chuyển gen với một cá cái không chuyển gen đã di truyền gen ngoại lai này. Chúng không những lớn nhanh hơn cá không chuyển gen trong cùng một lứa mà còn lớn nhanh hơn rất nhiều lần so với bố mẹ. Gần đây, Du và cộng sự (1992) đã công bố kết quả chuyển gen GH cá vào cá hồi Đại tây dương. Du đã sử dụng promoter của gen protein chống lạnh của cá lon chạch lớn (ocean pout, *Macrozoarces americanus*) nối với cDNA của GH cá hồi trắng (chinook salmon, *Oncorhynchus*

tschawytscha) và kết quả là kích thước cá hồi Đại tây dương chuyển gen một năm tuổi tăng lên từ 2 - 6 lần so với cá đối chứng.

Ở Phần Lan, tại Trường Đại học Kuopio, các nhà khoa học đang nghiên cứu sản xuất cá hồi cầu vòng chuyển gen có tốc độ sinh trưởng cao, có khả năng chuyển hóa tốt các thành phần thức ăn, đặc biệt là các carbohydrate rẻ tiền. Molsa, Krasnov và Pitkanen (1992) đã sử dụng gen hormone sinh trưởng cá hồi Đại tây dương (ASGHG = Atlantic Salmon Growth Hormone Gene) để chuyển vào cá hồi cầu vòng và bằng kỹ thuật PCR đã chứng minh được sự hợp nhất của gen này vào genome cá hồi cầu vòng. Tuy nhiên, gen ASGHG đã được chuyển vào các loài khác một cách rộng rãi trên thế giới nhưng không thật sự làm tăng đột ngột tốc độ sinh trưởng của các loài nhận. Các nhà nghiên cứu Kuopio tin tưởng rằng các gen này ảnh hưởng đến hiện tượng chuyển hóa, chúng có thể cải tiến hiện tượng chuyển hóa carbohydrate nên có thể sử dụng carbohydrate rẻ tiền hơn để làm thức ăn cho cá hoặc có thể tăng cường khả năng kháng bệnh. Các gen này sẽ có ý nghĩa nhiều hơn đối với các gen tăng cường sinh trưởng trong kỹ nghệ nuôi trồng thủy sản. Hiện tại, các nhà nghiên cứu thấy rằng kỹ nghệ nuôi trồng thủy sản của Phần Lan sẽ phải đợi 5 - 10 năm trước khi có thể đánh giá được cá chuyển gen thương mại. Để chứng minh sự hợp nhất của gen chuyển vào nhiễm sắc thể của động vật nhận và sự hoạt động của gen này các nhà nghiên cứu Kuopio sử dụng cá zebra danios. Cá zebra danios nhỏ, là loại cá nuôi nhiệt đới, thành thục trong 3 - 4 tháng và có thể nhân giống nhanh trong bể nuôi. Trứng cá được chọn và vi tiêm gen dễ dàng. Có thể thu được cá con vi tiêm và kiểm tra hoạt động gen một cách nhanh chóng. Với kết quả thu được, người ta đã thừa nhận lợi ích của gen chuyển với một thời gian rất ngắn khi so sánh với thời gian cần thiết để thừa nhận nó trong sự phát triển chậm chạp của cá hồi sống trong môi trường nước lạnh.

Pitkanen và cộng sự (1999) đã chuyển gen hormone sinh trưởng cá hồi vào cá hồi chấm hồng Bắc cực (*Salvelinus alpinus* L.). Các tổ hợp gen hormone sinh trưởng được sử dụng là OnGH1, CMVGH1, OnH3GH1 và SsGH2. Cá mang gen OnGH1, CMVGH1, OnH3GH1 có tốc độ sinh trưởng tăng lên đột ngột và không có sự

thay đổi gì về tốc độ sinh trưởng ở cá mang gen SsGH2. Sự có mặt của gen chuyển ở một số mô cá hồi đã được xác định.

2.10.2. Chuyển gen chống lạnh vào cá

Trong tự nhiên, cá sống trong nước lạnh ở hai cực quả đất, ở biển nhiệt đới ám áp và ở những vùng nước ôn hòa. Ở những nơi này các điều kiện nhiệt độ thay đổi theo ngày cũng như thay đổi theo mùa. Trải qua tiến trình tiến hóa lâu dài, cá đã có các cơ chế sinh lý thích nghi với những điều kiện nhiệt độ thay đổi này. Cũng như nhiều sinh vật khác, cá sử dụng các gen sôc nhiệt để phản ứng với nhiệt độ tăng cao, nhưng trong điều kiện lạnh quá, một vài loài cá đã tiến hóa theo hướng gen chống lạnh mã hóa protein giữ cho máu của chúng khỏi đông. De Vries đã phát hiện ra protein chống lạnh (AFPs = antifreeze proteins). Theo De Vries (1969, 1971), cá ở vùng Bắc cực và Nam cực thì gen AFP biểu hiện suốt cả năm, trong khi các loài cá sống ở vùng nước ôn hòa (như cá bơn mùa đông) AFPs chỉ biểu hiện trong mùa đông. Các protein này cho phép cá sống được ở điều kiện nhiệt độ lạnh.

De Vries và cộng sự (1971), Lin và cộng sự (1972) đã phát hiện protein chống lạnh của cá Nam cực bao gồm những đơn vị lặp lại Ala-Ala-Thr với một disaccharide, galactosyl-n-acetylgalactose amine, nhóm gốc đường này liên kết với threonine. AFPs cá bơn mùa đông là một protein xoắn giàu alanin, không có disaccharide. Các cấu trúc bậc 1, bậc 2, bậc 3 của chúng đã được xác định. Cơ chế tối ưu của các protein này là chúng liên kết với những vi tinh thể nước đá và do đó làm hạ thấp điểm đông của máu. Các gen protein chống lạnh của một số loài cá đã được làm sáng tỏ.

Hew và cộng sự (1988) đã vi tiêm gen AFP cá bơn mùa đông vào cá hồi không có AFP. Mặc dù họ đã chứng minh được sự hợp nhất của gen AFP vào genome của cá hồi nhưng không có bằng chứng đối với sự biểu hiện của gen AFP. Tuy nhiên, sau đó họ đã có các chứng cứ sơ bộ về sự biểu hiện của gen AFP cá bơn mùa đông (*Pseudopleuronectes americanus*) ở cá hồi chuyển gen mặc dù mức độ biểu hiện của gen AFP còn quá thấp để bảo vệ cơ thể chống lại sự lạnh giá. Những kết quả nghiên cứu bước đầu này rất khả quan và cho ta giả thiết một cách chắc chắn rằng, khi các mức AFP thích hợp

được biểu hiện chúng sẽ mở rộng khả năng sống của cá hồi vào mùa đông trong các bể nuôi cá nước mặn. Đây là một thuận lợi lớn cho việc nuôi trồng nguồn thủy sản quan trọng này. Với mục đích đó, việc nghiên cứu đang được tiến hành thăm dò đối với các promoter riêng.

Wang và cộng sự (1995) đã tiêm gen AFP cá lon chạch lớn (*Macrozoarces americanus*) vào trứng cá vàng (*Carassius auratus*) thành công và đã chứng minh được sự biểu hiện của gen AFP ở cá vàng. Cá vàng chuyển gen có khả năng chịu lạnh tốt hơn cá đối chứng khi đưa chúng vào môi trường có nhiệt độ thấp.

2.10.3. Chuyển gen kháng bệnh vào cá

Một hướng ứng dụng khác của cá chuyển gen là khả năng kháng bệnh. Cho đến nay, hai phương pháp khác nhau đã được thử nghiệm. Một phương pháp với mục đích là tăng sức đề kháng đối với các bệnh do vi khuẩn và một phương pháp nhằm vào các mầm bệnh virus đặc trưng.

Một ứng dụng của phương pháp đầu tiên liên quan đến việc tăng cường enzyme kháng khuẩn lysozyme ở cá bằng cách đưa trình tự mã hóa lysozyme cá hồi cầu vòng gắn với promoter AFP của các lon chạch Mỹ (*Macrozoarces americanus*) vào cá hồi Đại tây dương (Hew, 1995). Đây là một cấu trúc mà tất cả đều bắt nguồn từ cá với trình tự mã hóa protein có nguồn gốc từ một loài cá khác thuộc. Một hiệu quả tương tự có thể được tạo ra bằng cách lai khác loài và chọn lọc (cá hồi Đại tây dương lai với cá hồi nâu (*Salmo trutta*), cá hồi nâu có thể được lai với cá hồi cầu vòng) và các kỹ thuật chuyển gen sẽ làm tăng tốc độ của quá trình này một cách đơn giản và tạo ra một giống cá có kiểu gen xác định tốt hơn rất nhiều.

Cấu trúc gen chuyển lysozyme đã được đưa vào cá hồi Đại tây dương nhưng cho đến nay chưa có kết quả nào về năng suất của cá và hiệu quả của gen chuyển được công bố.

Một ứng dụng thứ hai của việc sử dụng kỹ thuật chuyển gen để tăng khả năng kháng bệnh là bảo vệ cá hồi cầu vòng chống lại sự nhiễm virus hematopoietic necrosis (IHNV). IHNV là một nguồn bệnh của cá hồi gây ra tỷ lệ chết cao, đặc biệt là đối với cá bột và cá hồi nhỏ. Các loại vaccine chết-bất hoạt (killed vaccine), vaccin giảm

độc lực (attenuated vaccine) và vaccine tiêu đơn vị (subunit vaccine) đều đã được phát triển nhưng cả ba loại đều có những hạn chế nhất định. Sự tiêm chủng vaccine DNA sử dụng các trình tự mã hóa protein G và N của IHNV đã được Anderson thực hiện ở cá hồi cầu vòng vào năm 1996. Các plasmid tái tổ hợp được tiêm trực tiếp vào cơ của cá bột. Một mình trình tự protein N không đủ gây ra miễn dịch nhưng trình tự mã hóa protein G hoặc một mình hoặc kết hợp với trình tự N gây ra miễn dịch do hiệu quả làm virus chết.

2.10.3. Những hướng nghiên cứu cá chuyển gen khác

Ngoài việc chuyển gen GH, gen chống lạnh và gen kháng bệnh đã nói ở trên, một số các gen khác cũng đã được chuyển vào cá chép, cá trê, cá hồi, cá vàng, cá medaka, cá chó Bắc cực (Northern pike) và một số loài cá khác. Các gen này có nguồn gốc từ tập hợp các nguồn sinh vật khắp nơi (gen kháng hygromycin, gen neomycin phosphotransferase (neo), gen chloramphenicol transacetylase, gen crystalline gà, gen α -globin, gen luciferase, gen β -galactosidase, gen chống lạnh...). Khi chuyển vào cá, các gen vi tiêm được gắn với nhiều promoter khác nhau (mouse metallothionein (mMT), Rous sarcoma virus (RSV), fish antifreeze protein promoter (AFP)...).

Vào năm 1986, Ozato và cộng sự đã chứng minh rằng cá medaka (*Oryzas latipes*) được vi tiêm tổ hợp mMT chuột với gen crystalline (Cry) gà thì gen ngoại lai này đã hợp nhất với DNA genome của cá medaka và đã biểu hiện gen mới này. Oshiro và cộng sự (1989) đã công bố gen α -globin cá chép đã gắn được vào DNA genome cá hồi cầu vòng. Mc Evoy và cộng sự (1988) đã chỉ ra rằng cá hồi Đại tây dương chuyển gen có thể biểu hiện gen β -galactosidase khi kết hợp với mMT. Yoon và cộng sự (1990) đã đưa ra bằng chứng về sự chuyển gen, sự hợp nhất và sự phiên mã của gen neo trong cá vàng nhưng bằng chứng về sự biểu hiện gen không được làm sáng tỏ. Stuart và cộng sự (1988) sử dụng cá mú vằn (zebrafish) làm mô hình chuyển gen kháng hygromycin, đã chứng minh được sự hợp nhất vào hệ gen và sự di truyền lại cho thế hệ sau của gen này. Chen và Power (1990) đã chứng minh được sự hợp nhất, sự biểu hiện và sự di truyền lại cho thế hệ sau của tổ hợp gen chloramphenicol transacetylase.

Lu và cộng sự (1997) đã sử dụng vector retrovirus đa hướng (pantropic retrovirus vector) để chuyển gen vào cá medaka Nhật bản (*Orizias latipes*). Các vector này chứa LTR của virus bạch cầu chuột Moloney (Moloney murine leukemia virus = Mo-MLV) và một gen chuyển (neo hoặc lacZ) được điều hòa bởi đoạn LTR của RSV. Kết quả nghiên cứu đã chứng minh được sự xâm nhập, sự biểu hiện và sự di truyền lại cho thế hệ con lai F₁ của tổ hợp gen này.

Trong một số nghiên cứu cá chuyển gen, hiệu quả đạt được thấp, trung bình chỉ từ 5-10%. Một số nhà nghiên cứu khác cho rằng khi nghiên cứu chuyển gen người vào cá chép, sự hợp nhất gen ngoại lai với genome vật chủ đạt được từ 40 - 88%.

Ngoài việc góp phần tăng năng suất lên nhiều lần cho ngành nuôi trồng thủy sản, cá chuyển gen còn cung cấp các mô hình thí nghiệm tuyệt vời cho các nghiên cứu khoa học cơ bản cũng như các nghiên cứu ứng dụng Công nghệ Sinh học.

Ở Việt Nam, tại Phòng Công nghệ gen Động vật, Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia, Việt Nam, Nguyễn Văn Cường và cộng sự đã và đang nghiên cứu chuyển tổ hợp gen hormone sinh trưởng người (MThGH) vào chuột, cá vàng (*Carassius auratus*), cá chạch (*Misgurnus anguillicaudatus*) và cá chép (*Cyprinus carpio*). Với một số kết quả bước đầu đã đạt được, việc nghiên cứu tạo cá chuyển gen đang được tiếp tục tiến hành.

IV. Ứng dụng của động vật chuyển gen

Với những ưu điểm nổi bật, công nghệ tạo động vật chuyển gen đã, đang và sẽ tạo ra các tiềm năng phát triển vô cùng to lớn trong nhiều lĩnh vực của đời sống xã hội. Trước các ứng dụng đa năng của sinh vật chuyển gen chung và động vật chuyển gen nói riêng, nhiều quốc gia trên thế giới đã chú trọng đầu tư nghiên cứu và phát triển sinh vật chuyển gen.

1. Trong nghiên cứu cơ bản

Chuyển gen là một công cụ lý tưởng cho việc nghiên cứu các ngành sinh học. Trong sinh học phân tử, động vật chuyển gen được

sử dụng để phân tích sự điều hoà biểu hiện của gen để đánh giá một biến đổi di truyền đặc biệt ở mức độ toàn bộ cơ thể động vật. Động vật chuyển gen còn được sử dụng để nghiên cứu trong di truyền học phát triển ở động vật có vú.

2. Trong nông nghiệp và công nghiệp thực phẩm

Công nghệ chuyển gen động vật ra đời đã cho phép khắc phục những trở ngại của phương pháp cải tạo giống cổ truyền để tạo ra các động vật biểu hiện các tính trạng mong muốn trong một thời gian ngắn hơn và chính xác hơn. Mặt khác, nó cho các nhà chăn nuôi một phương pháp dễ dàng để tăng sản lượng, tăng năng suất. Các nhà khoa học đã tạo ra các vật nuôi chuyển gen có tốc độ lớn nhanh, hiệu suất sử dụng thức ăn cao, cho năng suất cao (nhiều thịt, nhiều sữa, nhiều trứng...) và chất lượng sản phẩm tốt (nhiều nạc, ít mỡ, sữa chứa ít lactose hoặc cholesterol...). Mặt khác, công nghệ chuyển gen đã cố gắng tạo ra các động vật có khả năng kháng bệnh như lợn có khả năng kháng bệnh cúm... Tuy nhiên, hiện nay số lượng gen kháng bệnh ở vật nuôi đã được biết là hạn chế.

3. Trong y học

Hàng năm có nhiều bệnh nhân chết vì thiếu các cơ quan thay thế như tim, gan hoặc thận... Lợn chuyển gen có thể cung cấp các cơ quan cấy ghép cần thiết làm giảm bớt sự thiếu hụt. Hiện nay, sự cấy ghép cơ quan bị cản trở bởi protein lợn có thể gây ra sự loại thải nhưng các nghiên cứu này đang được phát triển theo hướng loại bỏ protein lợn và thay thế bằng protein người.

Động vật chuyển gen sản xuất protein tái tổ hợp qua tuyến sữa có một vai trò đặc biệt đối với y học. Vào năm 1997, con bò chuyển gen đầu tiên, Rosie, đã sản xuất protein người chất lượng cao ở trong sữa với hàm lượng 2,4g/lít. Sữa chuyển gen này là một sản phẩm cân bằng dinh dưỡng hơn sữa bò tự nhiên và có thể sử dụng cho em bé hoặc người lớn với nhu cầu dinh dưỡng hoặc tiêu hoá đặc biệt. Sữa bò này chứa alpha-lactalbumin người....

Trong kỹ nghệ dược phẩm, động vật chuyển gen được sử dụng để sản xuất protein dược phẩm, thuốc chữa bệnh.

Liệu pháp gen người bao gồm cả việc thêm một bản sao gen bình thường (gen chuyển) vào genome của một người mang các bản sao gen có thiếu sót. Khả năng chữa bệnh đối với khoảng 5.000 bệnh di truyền mà con người đang mắc phải là khổng lồ và động vật chuyển gen có thể đóng một vai trò quan trọng. Học viện A.I.Virtanen ở Phần Lan đã tạo ra một con bê mang gen mã hoá cho protein có khả năng đẩy mạnh sự sinh trưởng các tế bào đỏ ở người....

Động vật chuyển gen còn được sử dụng làm mô hình thí nghiệm nghiên cứu các bệnh ở người để nhanh chóng tìm ra các giải pháp chẩn đoán và điều trị các bệnh hiểm nghèo như ung thư, AIDS, thần kinh, tim mạch...

4. Trong công nghiệp

Động vật chuyển gen còn được sử dụng trong công nghiệp sản xuất các vật liệu đặc biệt và làm đối tượng để thử nghiệm an toàn hoá học.

Vào năm 2001, hai nhà khoa học ở Viện Công nghệ sinh học Nexia ở Canada đã chuyển gen của nhện vào trong tế bào của cừu đang ở thời kỳ tiết sữa. Các con cừu này đã tạo ra tơ ở trong sữa và tiết ra các sợi tơ rất nhỏ từ cơ thể của chúng. Bằng cách tách chiết các sợi polymer từ sữa, và bện chúng lại thành sợi các nhà khoa học có thể tạo ra một vật liệu nhẹ, bền, dẻo mà có thể được sử dụng để sản xuất các bộ quần phục đặc biệt, chỉ khâu y học siêu nhỏ, dây vợ tennis.

Động vật chuyển gen nhạy cảm với chất độc có thể được tạo ra cho việc thử nghiệm an toàn hoá học.

V. Một vài vấn đề nhận thức xung quanh động vật chuyển gen

Mặc dù động vật chuyển gen đóng vai trò quan trọng nhưng vẫn có một số lo lắng và các quan niệm khác nhau về giá trị của chúng.

Trong nghiên cứu, việc chuyển một gen vào động vật có thể là rất phức tạp và khả năng gây ra các tác dụng phụ là khó có thể tiên đoán. Tác động gây thiệt hại có thể tăng lên từ những kỹ thuật phẫu

thuật sử dụng để thu nhận và cấy lại phôi, các tác động không đặc hiệu gây nên bởi sự tổn thương của gen nằm sát với khu vực DNA đã biến đổi. Nó cũng làm giảm khả năng thụ tinh và thai quá cỡ có thể là kết quả của kỹ thuật này. Trong phần lớn các trường hợp, đột biến tác động lớn đến các quá trình chuyển hóa đặc biệt hoặc các thụ quan tế bào mà không thực sự gây nên bệnh, sự khó chịu, đau đớn hoặc khuyết tật dị dạng ở động vật.

Các kiểm soát của luật pháp đối với các giá trị của động vật chuyển gen là rất chặt chẽ. Trước khi được sử dụng làm thực phẩm và lưu hành trên thị trường chúng phải vượt qua được các thử nghiệm rất ngặt nghèo về mặt an toàn thực phẩm mà đối với các thực phẩm bình thường thì không cần. Công việc này cần phải được thực hiện bởi nhiều cơ quan, nhiều tổ chức của quốc gia, quốc tế để đảm bảo về mặt sức khỏe cho người tiêu dùng.

Khả năng rủi ro của chuyển gen đối với môi trường và hệ sinh thái là tồn tại khi nuôi trồng động vật chuyển gen. Một số nước đã đề cập đến những rủi ro của nghiên cứu chuyển gen với động vật và tác động đến môi trường khi động vật chuyển gen bị sảy ra ngoài một cách tình cờ hoặc có kế hoạch. Khi đó động vật chuyển gen sẽ có cơ hội lai với các quần thể hoang dã làm phát tán gen chuyển sang các cơ thể động vật khác vì thế sẽ dẫn đến sự thay đổi ở quần thể bản địa. Giá trị nội tại của động vật có thể bị giảm và tình trạng toàn vẹn của chúng bị vi phạm do sự biến đổi di truyền. Mặt khác, sự phát triển lan tràn của chúng làm mất tính cân bằng của hệ sinh thái, làm giảm tính đa dạng sinh học của quần thể. Do vậy hiện nay động vật chuyển gen được nuôi ở những khu vực được giám sát hết sức chặt chẽ để giảm thiểu tối đa khả năng lây lan vào môi trường.

Tài liệu tham khảo chính

Makrides SC. 2003. Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. Elsevier Science B. V. USA.

Louis-Marie H. 2003. Animal Transgenesis and Cloning. John Wiley and Sons, Ltd. USA.

Pew Initiative on Food and Biotechnology. 2003. Future Fish. A Report Prepare for the Pew Initiative on Food and Biotechnology. USA.

Norman M, Richard JL. 2000. Transgenic fish: an evaluation of benefit and risk. *Fish and Fisheries* 1, pp 146-172.

Leland HH, Leroy H, Michael LG, Ann ER, Lee MS, Ruth CV. 2000. *Genetics*, The McGraw-Hill Companies, Inc. USA.

Glick BR, Jackj P. 1994. *Molecular Biotechnology*. ASM Press. Washington D.C. USA.

Hew CL, Fletcher GL. 1993. *Transgenic Fish*. World Scientific. Singapore.

Chopra V.L, Anwan N. 1990. *Genetic Engineering and Biotechnology*. Oxford and IBH Publishing CO.PVT, Ltd. UK.

Chương 5

Công nghệ chuyển gen ở Thực vật

I. Khái niệm chung

Trước đây, để tạo một giống mới các nhà tạo giống thường sử dụng phương pháp truyền thống để tổ hợp lại các gen giữa hai cá thể thực vật tạo ra con lai mang những tính trạng mong muốn. Phương pháp này được thực hiện bằng cách chuyển hạt phấn từ cây này sang nhụy hoa của cây khác. Tuy nhiên, phép lai chéo này bị hạn chế bởi nó chỉ có thể thực hiện được giữa các cá thể cùng loài (lai gần), lai giữa những các thể khác loài (lai xa) thường bị bất thụ do đó không thể tạo ra con lai được. Tuy nhiên, lai gần cũng phải mất nhiều thời gian mới thu được những kết quả mong muốn và thông thường những tính trạng quan tâm lại không tồn tại trong những loài có họ hàng gần nhau.

Ngày nay, công nghệ chuyển gen cho phép nhà tạo giống cùng lúc đưa vào một loài cây trồng những gen mong muốn có nguồn gốc từ những cơ thể sống khác nhau, không chỉ giữa các loài có họ gần nhau mà còn ở những loài rất xa nhau. Phương pháp hữu hiệu này cho phép các nhà tạo giống thực vật thu được giống mới nhanh hơn và vượt qua những giới hạn của kỹ thuật tạo giống truyền thống.

Cây chuyển gen (transgenic plant) là cây mang một hoặc nhiều gen được đưa vào bằng phương thức nhân tạo thay vì thông qua lai tạo như trước đây. Những gen được tạo đưa vào (gen chuyển) có thể được phân lập từ những loài thực vật có quan hệ họ hàng hoặc từ những loài khác biệt hoàn toàn. Thực vật tạo ra được gọi là thực vật “chuyển gen” mặc dù trên thực tế tất cả thực vật đều được “chuyển gen” từ tổ tiên hoang dại của chúng bởi quá trình thuần hóa, chọn lọc và lai giống có kiểm soát trong một thời gian dài.

Nhìn chung, việc ứng dụng cây chuyển gen đã có những lợi ích rõ rệt như sau:

- Tăng sản lượng.
- Giảm chi phí sản xuất.
- Tăng lợi nhuận nông nghiệp.
- Cải thiện môi trường.

Những cây chuyển gen “thế hệ thứ nhất” đã giúp giảm chi phí sản xuất. Ngày nay, các nhà khoa học đang hướng đến việc tạo ra những cây chuyển gen “thế hệ thứ hai” nhằm tăng các giá trị dinh dưỡng hoặc có những đặc điểm thích hợp cho công nghiệp chế biến. Lợi ích của những cây trồng này hướng trực tiếp hơn vào người tiêu dùng. Chẳng hạn như:

- Lúa gạo giàu vitamin A và sắt.
- Khoai tây tăng hàm lượng tinh bột.
- Vaccine thực phẩm (edible vaccine) ở ngô và khoai tây.
- Những giống ngô có thể trồng được trong điều kiện nghèo dinh dưỡng.
- Dầu ăn có lợi cho sức khoẻ hơn từ đậu nành và cải dầu.

Tuy nhiên, bên cạnh những ưu điểm cũng có những nguy cơ tiềm ẩn trong việc phát triển những kỹ thuật mới. Bao gồm:

- Mối nguy hiểm trong việc vô tình đưa những chất gây dị ứng hoặc làm giảm dinh dưỡng vào thực phẩm.
- Khả năng phát tán những gen biến nạp trong cây trồng sang họ hàng hoang dại.
- Sâu bệnh có nguy cơ tăng cường tính kháng với các chất độc tiết ra từ cây chuyển gen.
- Nguy cơ những chất độc này tác động tới các sinh vật không phải là loại sinh vật cần diệt, vì thế có thể làm mất cân bằng sinh thái.

Nhìn chung, mặc dù còn những điểm còn chưa rõ ràng về cây chuyển gen nhưng với khả năng tạo ra những giống cây trồng mới có giá trị kinh tế, công nghệ này có vai trò không thể phủ nhận được. Tuy vậy, vẫn còn một số vấn đề đáng lo ngại. Để giải quyết những vấn đề này thì những kết luận thu được phải dựa trên những thông tin tin cậy và có cơ sở khoa học.

Cuối cùng, vì tầm quan trọng của lương thực thực phẩm cho con người, nên các chính sách liên quan tới cây chuyên gen sẽ phải dựa trên những cuộc tranh luận cởi mở và trung thực có sự tham gia của mọi thành phần trong xã hội.

1. Khái niệm về thực vật chuyên gen

Muốn tạo một sinh vật biến đổi gen (genetically modified organism-GMO) cần phải có phương pháp thích hợp để đưa DNA ngoại lai (foreign DNA) vào trong tế bào của chúng. Ở vi khuẩn, tế bào được xử lý bằng dung dịch muối calcium chloride. Ở tế bào nấm men, sự tiếp nhận DNA tăng lên khi tế bào tiếp xúc với lithium chloride hoặc lithium acetate. Tuy nhiên, đối với phần lớn sinh vật bậc cao cần phải có các phương pháp khác tinh vi hơn.

Chuyên gen ở thực vật đã phát triển cùng với sự phát triển của các kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào thực vật. Nó đã trở thành phương tiện quan trọng để nghiên cứu cơ bản trong sinh học thực vật. Ngoài việc mở ra triển vọng chuyên các gen có ý nghĩa kinh tế vào cây trồng, các kỹ thuật này còn cho phép nghiên cứu cấu trúc và điều khiển hoạt động của gen.

Quá trình đưa một DNA ngoại lai vào genome (hệ gen) của một sinh vật được gọi là quá trình biến nạp (transformation). Những cây được biến nạp được gọi là cây biến đổi gen (genetically modified plant-GMP). Ứng dụng công nghệ gen trong công tác giống cây trồng hiện đại có rất nhiều ưu điểm, chẳng hạn như:

- Bằng việc biến nạp một hoặc một số gen có thể thu được cây mang một đặc tính mới xác định.
- Rào cản về loài không còn có tác dụng, vì không chỉ các gen từ thực vật mà còn từ vi khuẩn, nấm, động vật hoặc con người được chuyển thành công vào thực vật. Về nguyên tắc chỉ thay đổi vùng điều khiển gen, promoter¹ và terminator². Tuy nhiên, trong một số trường hợp đòi hỏi những thay đổi tiếp theo như sự phù hợp codon.

¹ Gen khởi động cho quá trình phiên mã.

² Gen kết thúc quá trình phiên mã.

- Những đặc điểm không mong muốn của thực vật. Chẳng hạn, sự tổng hợp các chất độc hoặc chất gây dị ứng có thể được loại trừ bằng công nghệ gen.

- Thực vật biến đổi gen có thể là lò phản ứng sinh học (bioreactor) sản xuất hiệu quả các protein và các chất cần thiết dùng trong dược phẩm và thực phẩm..

- Mở ra khả năng nghiên cứu chức năng của gen trong quá trình phát triển của thực vật và các quá trình sinh học khác. Vì vậy, thực vật biến đổi gen có ý nghĩa trong nghiên cứu cơ bản.

- Trong lai tạo giống hiện đại, công nghệ gen giúp làm giảm sự mâu thuẫn giữa kinh tế và môi trường sinh thái. Bằng việc sử dụng cây trồng kháng thuốc diệt cỏ có thể giảm được lượng thuốc bảo vệ thực vật.

Mục đích của nông nghiệp hiện đại không chỉ là tăng năng suất mà còn hướng đến những lĩnh vực quan trọng sau:

- + Duy trì và mở rộng đa dạng sinh học (biodiversity).
- + Tăng khả năng kháng (sức khỏe cây trồng và chống chịu các điều kiện bất lợi).
- + Nâng cao chất lượng sản phẩm.
- + Cải thiện khả năng tích lũy dinh dưỡng.
- + Tăng cường tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học.
- + Tạo ra sản phẩm không gây hại môi trường.

2. Tóm tắt lịch sử phát triển của công nghệ chuyển gen thực vật

Lịch sử phát triển công nghệ gen của thực vật chắc chắn có rất nhiều sự kiện quan trọng. Ở đây chỉ nêu lên những mốc có ý nghĩa đặc biệt nhằm làm rõ sự phát triển rất nhanh của lĩnh vực này:

- Trước hết, vi khuẩn đất *Agrobacterium tumefaciens* được sử dụng làm phương tiện vận chuyển DNA. Bình thường vi khuẩn này tạo nên khối u ở thực vật. Một phần nhỏ của Ti-plasmid có trong vi khuẩn này, được gọi là T-DNA, được vận chuyển từ *Agrobacterium* vào cây hai lá mầm. Năm 1980, lần đầu tiên DNA ngoại lai (transposon Tn7) được chuyển vào thực vật nhờ *A. tumefaciens*, tuy nhiên T-DNA vẫn chưa được thay đổi. Năm 1983, nhiều nhóm

nghiên cứu đã biến đổi T-DNA và đưa DNA ngoại lai vào, tạo ra tính kháng một số chất kháng sinh. Ngoài ra, các gen tạo khối u được cắt ra. DNA ngoại lai cùng với phần còn lại được chuyển vào thực vật và được biến nạp. Thành công này nhờ nghiên cứu chính xác con đường lây nhiễm của *A. tumefaciens* trước đó và khả năng của hệ thống chọn lọc đối với thực vật.

Từ kết quả thành công đầu tiên này số lượng các loài được biến nạp ngày càng tăng. Lúc này có thêm nhiều phương pháp khác để biến đổi gen:

- Năm 1984, biến nạp bằng tế bào trần (protoplast) ở ngô được thực hiện. Ở đây thành tế bào được phân giải bằng enzyme, xuất hiện tế bào trần. Nhờ polyethylene glycol (PEG) hoặc xung điện (electroporation) mà DNA được đưa vào tế bào trần.

- Năm 1985, lần đầu tiên cây biến đổi gen được mô tả có tính kháng thuốc diệt cỏ. Một năm sau, người ta đã thành công trong việc tạo ra thực vật kháng virus. Năm 1996, các thí nghiệm về cây biến đổi gen đã được phép đưa ra đồng ruộng.

- Năm 1987, phương pháp biến nạp phi sinh học được sử dụng. Ở đây tế bào thực vật được bắn phá bằng các hạt vàng hoặc wolfram bọc DNA ngoại lai. Nhờ phương pháp này mà sự biến nạp đã thành công đã ở các cây một lá mầm quan trọng như lúa (1988), ngô (1990) và lúa mì (1992). Cũng trong năm 1987, cà chua và thuốc lá kháng côn trùng đã làm cho công nghệ gen đạt được một bước phát triển quan trọng hơn. Một thành công quan trọng khác là đã điều khiển được quá trình chín ở cà chua, sau này có tên là FlavrSaver. Năm 1994, lần đầu tiên cà chua biến đổi gen được bán trên thị trường.

- Năm 1989, không những đã thành công trong việc chuyển các gen mã hóa các kháng thể vào thực vật, mà người ta còn tạo nên các sản phẩm gen này như mong muốn. Kết quả này đã mở ra một khả năng hoàn toàn mới mẽ cho việc sản xuất vaccine và cả khả năng chống bệnh ở thực vật.

- Năm 1990, thành công trong việc tạo ra cây biến đổi gen bắt buộc đặc, không có khả năng tạo hạt phán. Loại cây trồng này có ý nghĩa lớn trong việc sản xuất hạt giống.

- Từ năm 1991, thành phần carbohydrate của thực vật được biến đổi và năm 1992 là các acid béo. Cùng năm đó, lần đầu tiên thành phần alkaloid ở một loại cà được cải thiện, là một bước quan trọng đối với thực vật trong việc tổng hợp nhóm hợp chất này. Những thực vật này có ý nghĩa lớn đối với việc thu nhận dược liệu. Sau khi thực vật biến đổi gen này xuất hiện, chất nhân tạo phân giải sinh học được tổng hợp. Điều này cho phép chúng ta hy vọng rằng, trong tương lai sẽ có những thực vật có đặc tính mới, được sử dụng như là các bioreactor thực vật để sản xuất “nguyên liệu tái sinh”.

- Năm 1994, cà chua Flavr Savr^R là cây trồng đầu tiên biến đổi gen và quả của nó được đưa ra thị trường. Năm 1998, trên thế giới đã có 48 giống cây trồng biến đổi gen và sản phẩm được thị trường hóa. Năm 1999, cây lúa biến đổi gen được đưa ra với 7 gen được biến nạp.

Đến đầu năm 1999, trên thế giới đã có khoảng 9.000 thí nghiệm đồng ruộng cho phép, trong đó khoảng 1.360 là ở EU.

Cuối cùng, là một số nhận xét về việc thị trường hóa cây biến đổi gen trong nông nghiệp. Cho đến năm 1999, diện tích gieo trồng trên thế giới đạt hơn 40 triệu ha. Trong đó 20% là ngô, 50% là đậu tương và 1/3 diện tích bông là ở Mỹ. Ngoài ra có hơn 70% diện tích cải dầu ở Canada được trồng với giống biến đổi gen. Khoảng 90% thực vật biến đổi gen chống chịu thuốc diệt cỏ hoặc sâu bệnh hại. Cần chú ý rằng, ở Mỹ sản phẩm đậu tương có trong hơn 20.000 loại thực phẩm khác nhau. Điều này cho thấy rằng, công nghệ gen đã ảnh hưởng đến sản xuất thực phẩm của chúng ta.

II. Một số nguyên tắc cơ bản của việc chuyển gen

1. Một số nguyên tắc sinh học

Khi đặt ra mục đích và thực hiện thí nghiệm chuyển gen cần chú ý một số vấn đề sinh học ảnh hưởng đến quá trình chuyển gen như sau:

- Không phải toàn bộ tế bào đều thể hiện tính toàn năng (totipotency).

- Các cây khác nhau có phản ứng không giống nhau với sự xâm nhập của một gen ngoại lai.

- Cây biến nạp chỉ có thể tái sinh từ các tế bào có khả năng tái sinh và khả năng thu nhận gen biến nạp vào genome.

- Mô thực vật là hỗn hợp các quần thể tế bào có khả năng khác nhau. Cần xem xét một số vấn đề như: chỉ có một số ít tế bào có khả năng biến nạp và tái sinh cây. Ở các tế bào khác có hai trường hợp có thể xảy ra: một số tế bào nếu được tạo điều kiện phù hợp thì trở nên có khả năng, một số khác hoàn toàn không có khả năng biến nạp và tái sinh cây.

- Thành phần của các quần thể tế bào được xác định bởi loài, kiểu gen, từng cơ quan, từng giai đoạn phát triển của mô và cơ quan.

- Thành tế bào ngăn cản sự xâm nhập của DNA ngoại lai. Vì thế, cho đến nay chỉ có thể chuyển gen vào tế bào có thành cellulose thông qua *Agrobacterium*, virus và bắn gen hoặc phải phá bỏ thành tế bào để chuyển gen bằng phương pháp xung điện, siêu âm và vi tiêm.

- Khả năng xâm nhập ổn định của gen vào genome không tỷ lệ với sự biểu hiện tạm thời của gen.

- Các DNA (trừ virus) khi xâm nhập vào genome của tế bào vật chủ chưa đảm bảo là đã liên kết ổn định với genome.

- Các DNA (trừ virus) không chuyển từ tế bào này sang tế bào kia, nó chỉ ở nơi mà nó được đưa vào.

- Trong khi đó, DNA của virus khi xâm nhập vào genome cây chủ lại không liên kết với genome mà chuyển từ tế bào này sang tế bào khác ngoại trừ mô phân sinh (meristem).

2. Phản ứng của tế bào với quá trình chuyển gen

Mục đích chính của chuyển gen là đưa một đoạn DNA ngoại lai vào genome của tế bào vật chủ có khả năng tái sinh cây và biểu hiện ổn định tính trạng mới. Nếu quá trình biến nạp xảy ra mà tế bào không tái sinh được thành cây, hoặc sự tái sinh diễn ra mà không kèm theo sự biến nạp thì thí nghiệm biến nạp chưa thành công.

Ở rất nhiều loài thực vật, điều khó khăn là phải xác định cho được kiểu tế bào nào trong cây có khả năng tiếp nhận sự biến nạp. Hạt phấn hay tế bào noãn sau khi được biến nạp có thể được dùng để tạo ra cây biến nạp hoàn toàn, thông qua quá trình thụ tinh bình

thường. Hạt phấn thường được coi là nguyên liệu lý tưởng để gây biến nạp. Trong khi đó, việc biến nạp gen vào hợp tử *in vivo* hay *in vitro* lại gặp nhiều khó khăn. Trong trường hợp này, người ta thường phải kết hợp với kỹ thuật cứu phôi. Việc biến nạp gen đối với các tế bào đơn của các mô phức tạp như phôi hay mô phân sinh thường cho ra những cây khảm.

Từ nhiều thập kỷ qua người ta đã biết rằng, tính toàn thể của tế bào thực vật đã tạo điều kiện cho sự tái sinh cây hoàn chỉnh *in vitro* qua quá trình phát sinh cơ quan (hình thành chồi) hay phát sinh phôi. Các chồi bất định hay phôi được hình thành từ các tế bào đơn được hoạt hóa là những bộ phận dễ dàng tiếp nhận sự biến nạp và có khả năng cho những cây biến nạp hoàn chỉnh (không có tính khảm).

3. Các bước cơ bản của chuyển gen

Từ khi người ta khám phá ra rằng các thí nghiệm chuyển gen có thể thực hiện nhờ một loại vi khuẩn đất *Agrobacterium tumefaciens*, thì các nhà khoa học tin rằng *Agrobacterium* có thể chuyển gen vào tất cả các cây trồng. Nhưng sau đó kết quả thực tế cho thấy chuyển gen bằng *Agrobacterium* không thể thực hiện được trên cây ngũ cốc (một lá mầm) vì thế hàng loạt kỹ thuật chuyển gen khác đã được phát triển đó là các kỹ thuật chuyển gen trực tiếp như bắn gen bằng vi đạn (*bombardement/gene gun*), vi tiêm (*microinjection*), xung điện (*electroporation*), silicon carbide, điện di (*electrophoresis*), siêu âm (*ultrasonic*), chuyển gen qua ống phấn (*pollen tube*)... Đến nay, nhờ cải tiến các vector chuyển gen nên kỹ thuật chuyển bằng *A. tumefaciens* đã thành công cả ở cây ngũ cốc đặc biệt là lúa. Kỹ thuật này trở nên một kỹ thuật đầy triển vọng đối với cây chuyển gen ở thực vật.

Quá trình chuyển gen được thực hiện qua các bước sau :

- Xác định gen liên quan đến tính trạng cần quan tâm.
- Phân lập gen (PCR hoặc sàng lọc từ thư viện cDNA hoặc từ thư viện genomic DNA).
- Gắn gen vào vector biểu hiện (expression vector) để biến nạp.
- Biến nạp vào *E. coli*.
- Tách chiết DNA plasmid.

- Biến nạp vào mô hoặc tế bào thực vật bằng một trong các phương pháp khác nhau đã kể trên.

- Chọn lọc các thể biến nạp trên môi trường chọn lọc.

- Tái sinh cây biến nạp.

- Phân tích để xác nhận cá thể chuyển gen (PCR hoặc Southern blot) và đánh giá mức độ biểu hiện của chúng (Northern blot, Western blot, ELISA hoặc các thử nghiệm *in vivo* khác...).

Nguyên liệu để thực hiện sự biến nạp là các tế bào thực vật riêng lẽ, các mô hoặc cây hoàn chỉnh.

Cản trở lớn nhất của sự tiếp nhận DNA ở phần lớn sinh vật là thành tế bào. Muốn làm mất thành tế bào thực vật người ta thường sử dụng enzyme và dưới những điều kiện thích hợp người ta có thể tạo ra tế bào trần, tế bào trần tiếp nhận DNA nói chung dễ dàng. Chẳng hạn sử dụng phương pháp xung điện, ở đây tế bào được đặt ở trong một xung điện ngắn, xung điện này có thể làm xuất hiện những lỗ tạm thời ở trên màng tế bào, những phân tử DNA có thể đi vào bên trong tế bào. Sau khi biến nạp người ta tách những enzyme phân giải và để cho tế bào phát triển, thành tế bào mới được tạo nên. Các tế bào biến nạp này được nuôi cấy trên các môi trường nhân tạo thích hợp cùng với các chất kích thích sinh trưởng để tạo nên cây hoàn chỉnh. Sau đó bằng các phương pháp phân tích genome như PCR, Southern blot, Northern blot được thực hiện để tìm ra chính xác những cây biến đổi gen.

Bên cạnh các phương pháp biến nạp *Agrobacterium* hoặc xung điện, hiện nay có hai phương pháp khác cũng thường được sử dụng để đưa DNA vào trong tế bào. Phương pháp thứ nhất là vi tiêm: với một cái pipet rất nhỏ người ta có thể đưa các phân tử DNA trực tiếp vào nhân tế bào mà người ta muốn biến nạp. Phương pháp này đầu tiên chỉ được sử dụng ở tế bào động vật, nhưng sau này người ta đã sử dụng cho tế bào thực vật. Phương pháp thứ hai là bắn vào tế bào các vi đạn (microprojectile), thường bằng vàng hoặc wolfram, được bao bọc bởi DNA. Phương pháp này được gọi là phi sinh học và được sử dụng thành công ở nhiều loại tế bào khác nhau.

Ở động-thực vật chuyển gen, sản phẩm cuối cùng thường không phải là tế bào biến nạp, mà là một cơ thể biến nạp hoàn toàn.

Phần lớn thực vật được tái sinh dễ dàng bằng nuôi cấy mô tế bào. Tuy nhiên, tái sinh cây một lá mầm như ngũ cốc và các loại cỏ khác cũng gặp một vài khó khăn. Từ một tế bào biến nạp duy nhất người ta có thể tạo ra một cây chuyển gen, trong đó mỗi tế bào mang DNA ngoại lai và tiếp tục chuyển cho thế hệ sau sau khi nở hoa và tạo hạt.

III. Các hướng nghiên cứu và một số thành tựu trong lĩnh vực tạo thực vật chuyển gen

1. Các hướng nghiên cứu

Trong những năm qua, các phương pháp biến nạp gen ở thực vật đã có rất nhiều tiến bộ. Hiện nay, các phòng thí nghiệm công nghệ gen đang bắt tay vào việc cải thiện các đặc điểm di truyền cho một số loài cây trồng có giá trị nhờ các công cụ của sinh học tế bào và sinh học phân tử. Trong một vài trường hợp đặc biệt (đậu tương, lúa, ngô và bông) các phương pháp biến nạp gen bị giới hạn bởi genotype. Một số các cây trồng quan trọng khác, cần thiết cho nhu cầu sử dụng của người dân ở các nước đang phát triển hiện cũng ít được chú ý.

Công nghệ di truyền thực vật là một bước ngoặt quyết định. Một số cây trồng quan trọng đã được biến nạp gen; mặc dù một vài vấn đề kỹ thuật vẫn đang còn tồn tại, nhưng chúng đang từng bước được giải quyết. Để có kết quả cần phải thay đổi dần dần sang một phạm vi khác, như là phát hiện và tạo dòng các gen mang các tính trạng đa gen (multigenic traits). Một điều không thể quên là vấn đề nhận thức của xã hội và dự báo nguy cơ tác động xấu đến môi trường do các sản phẩm có nguồn gốc từ công nghệ DNA tái tổ hợp (DNA recombinant technology) mang lại. Hiện nay, công nghệ chuyển gen đang được quan tâm hơn thông qua các quỹ tài trợ của các cơ quan quốc tế như là chương trình Rockefeller Foundation (Mỹ), và vấn đề đang được thảo luận nhiều đó là cần phải xác định một phương thức tốt nhất để chuyển các lợi ích do công nghệ biến nạp gen mang lại đến các nước đang phát triển.

Cây biến nạp gen đầu tiên thu được vào năm 1983. Điều này cho phép nhận xét rằng mới chỉ hơn hai thập niên, các công cụ của công nghệ DNA tái tổ hợp và sinh học tế bào đã giúp ích rất nhiều

cho các nhà tạo giống thực vật. Việc lựa chọn phương thức sử dụng các cây trồng thu được từ công nghệ DNA tái tổ hợp có thể cung cấp thêm nguồn tài nguyên mới cho công nghiệp và người tiêu dùng, như vậy có thể mở rộng cơ sở kinh tế ở cả các nước công nghiệp lẫn các nước đang phát triển.

Sau đây là một số hướng nghiên cứu chính trong công nghệ chuyển gen ở thực vật.

1.1. Cây trồng chuyển gen kháng các nấm gây bệnh

Nấm bệnh là những tác nhân gây hại cây trồng rất nặng, nhất là ở các nước nhiệt đới có độ ẩm cao. Các enzyme làm thoái hóa các thành phần chính của vỏ tế bào nấm chitin và β -1,3 glucan là loại đang được chú ý. Khi chuyển gen chitinase vào cây thuốc lá đã tăng hoạt tính kháng nấm gây hại. Sự biểu hiện đồng thời của cả hai gen chitinase và glucanase trong thuốc lá làm cho cây có tính kháng nấm gây hại cao hơn cây có một gen độc lập.

Tương tự, cà chua cho tính kháng nấm *Fusarium* cao hơn hẳn sau khi được chuyển cả hai gen nói trên. Protein úc chế ribosome (ribosomal inhibition protein-RIP) cũng biểu hiện tính kháng nấm tốt. Cây thuốc lá cho tính kháng nấm rất cao, khi cây được chuyển giao đồng thời gen RIP và chitinase.

1.2. Cây trồng chuyển gen kháng các vi khuẩn gây bệnh

Đối với bệnh vi khuẩn, hướng nghiên cứu tạo giống mới bằng công nghệ gen chỉ mới bắt đầu. Về cơ bản có ba hướng :

- Dùng gen mã hóa enzyme làm thoái hóa thành tế bào vi khuẩn. Chẳng hạn, gen lysozyme từ các nguồn tế bào động vật hoặc từ thực khuẩn thế T₄ (bacteriophage T₄) đưa vào cây thuốc lá và khoai tây. Các gen này biểu hiện hoạt tính lysozyme mạnh và các tế bào có khả năng phòng trừ vi khuẩn *Erwinia carotovora* rất tốt.

- Gen mã hóa α -thionin-cystein được chuyển giao sang cây thuốc lá cũng phòng ngừa được vi khuẩn *Pseudomonas syringae*.

- Chuyển gen sản xuất protein làm giảm độc tố của vi khuẩn là hướng có nhiều hứa hẹn. Gen này chủ yếu là gen sản xuất các loại

enzyme phân hủy độc tố của vi khuẩn, do vậy vô hiệu hóa tác hại của chúng.

1.3. Cây trồng chuyển gen kháng virus gây bệnh

Các virus gây ra những thiệt hại đáng kể trong hầu hết các cây trồng lương thực và cây cho sợi trên phạm vi thế giới. Phương pháp chủ yếu để khắc phục tình trạng trên là khai thác tính kháng xuất phát từ các tác nhân gây bệnh. Chẳng hạn, sử dụng các trình tự có nguồn gốc từ virus được biểu hiện trong các cây chuyển gen để cung cấp tính kháng đối với các virus thực vật. Hướng này dựa trên cơ sở các nghiên cứu về sự gây nhiễm (inoculation) hay xâm nhiễm (infection) ở thực vật, khởi đầu với các chủng virus nhẹ tạo ra phản ứng bảo vệ chống lại sự gây nhiễm tiếp theo với cùng loại virus hoặc các virus liên quan gần gũi.

1.4. Cây trồng chuyển gen kháng côn trùng phá hoại

Sử dụng hóa chất để phòng trừ sâu bọ côn trùng vừa đắt tiền vừa tác động xấu đến môi trường. Các cây trồng như bông, ngô và khoai tây chuyển gen đang được sản xuất thương mại biểu hiện độc tố của *Bacillus thuringensis* (Bt) để tạo ra tính kháng đối với các côn trùng loại nhai-nghiền (chewing insects). Vi khuẩn *B. thuringensis* tổng hợp các protein δ-endotoxin tinh thể được mã hóa bởi các gen *Cry*. Khi côn trùng ăn vào bụng, các prototoxins bị đứt gãy trong dạ dày kiềm của côn trùng để tạo thành độc tố hoạt động. Các liên kết này tạo ra các receptor đặc trưng trong các tế bào biểu mô ruột làm thành các lỗ chân lông và cuối cùng là gây chết côn trùng.

1.5. Cây trồng chuyển gen cải tiến các protein hạt

Hàm lượng protein và thành phần amino acid thay đổi rất nhiều trong thực phẩm thực vật. Ngoài protein thì các amino acid không thay thế, phải được tiếp nhận cùng thức ăn vì con người và động vật không tự tổng hợp được. Đặc biệt, trong thức ăn gia súc chủ yếu là đậu tương và ngô, phải bổ sung các amino acid được sản xuất bằng phương pháp lên men như lysine, methionine, threonine và tryptophan. Trong tương lai, không cần thiết phải bổ sung các amino

acid này theo phương thức như vậy. Phương thức có khả năng hơn là tạo dòng các gen ở cây đậu tương hoặc ngô mà các gen này mã hóa cho protein giàu những amino acid này.

Người ta đã đưa gen mã hóa cho một loại protein chứa các amino acid có lưu huỳnh cao bất thường vào cây đậu lupin với mục đích biểu hiện ở hạt. Kết quả là tăng 100% hàm lượng protein trong hạt. Hạt này được dùng để nuôi cừu, tăng trọng lượng 7% và sản lượng lông tăng 8% so với cừu nuôi bằng loại hạt bình thường. Thành công này thúc đẩy các nhà nghiên cứu đưa gen này vào biểu hiện ở lá cây cỏ, nhằm cải tiến cân bằng amino acid không thay thế ở dạ cỏ.

1.6. Cây trồng chuyển gen sản xuất những loại protein mới

Thực ra việc sản xuất protein trong thực vật dễ dàng, nhưng tinh sạch protein này từ mô thực vật là khó khăn và trước hết là giá thành cao. Vì vậy, người ta hy vọng vào một phương pháp mới, được giới thiệu bởi Raskin và cs (1999). Những gen mã hóa cho protein được gắn với một promoter và đảm bảo cho protein chỉ được tổng hợp ở rễ. Tiếp theo protein tạo thành có một hệ thống tín hiệu, đảm bảo cho nó được vận chuyển vào một vị trí xác định trong tế bào. Trong trường hợp đặc biệt protein được vận chuyển vào mạng lưới nội chất (endoplasmatic reticulum: ER).

Protein đi vào ER có thể được thả ra bên ngoài và chỉ ở vùng rễ, vì promoter chỉ đặc hiệu cho vùng này. Người ta dùng một số dung dịch muối để tách protein một cách dễ dàng và với giá thành hợp lý.

Một ví dụ điển hình của hướng ứng dụng này: Người ta đã tạo ra được hai loại thuốc lá chuyển gen, mỗi loại có khả năng sản xuất một trong hai mạch immunoglobin nhẹ và nặng. Thể hệ con sinh ra từ sự lai hai loại cây trên biểu hiện được một kháng thể hoạt động gồm hai loại mạch với hàm lượng cao (1,3% tổng protein của lá) và có tất cả các đặc tính của một kháng thể đơn dòng sản sinh từ hybridoma.

Thaumatin là những protein được chiết xuất từ thịt quả của cây *Thaumatococcus danielle*, có độ ngọt gấp 1.000 lần đường

saccharose. Người ta đã thành công trong việc chuyển một gen mã hóa cho thaumatin (thaumatin II) vào cây khoai tây, tạo một cây khoai tây có lá, thân rễ, củ đều ngọt. Kết quả này mở ra một triển vọng rất lớn đối với cây ăn quả ngọt.

1.7. Cây trồng chuyển gen mang tính bất dục đực

Các cây hoa màu đạt năng suất cao hiện nay đều được trồng từ hạt lai qua một quá trình chọn lọc khắt khe. Các hạt này có ưu thế lai cao vì là kết quả của các quá trình lai xa. Ở những cây tự thụ phấn như ngô, trước kia người ta rất tốn công lao động để loại bỏ cỏ bắp (cụm hoa đực) nhằm tránh hiện tượng tự thụ phấn.

Tuy nhiên, công trình thử nghiệm mới đã chuyển một phức hợp gồm gen *rolC* của *A. tumefaciens* và promoter CaMV 35S (cauliflower mosaic virus: virus gây bệnh khâm ở súp-lơ) vào cây thuốc lá và đã thu được cây chuyển gen bất thụ. Kết quả này đang được nghiên cứu và áp dụng trên những loại cây khác.

1.8. Thực vật biến đổi gen để sản xuất các acid béo thiết yếu

Như chúng ta biết, nguồn cung cấp chủ yếu về các acid béo thiết yếu là dầu cá và tài nguyên hải sản đang bị cạn kiệt và sự gia tăng độc tố ở các loại hải sản khác nhau cũng đang trở thành một nguy cơ tiềm tàng. Do vậy, việc nghiên cứu sản xuất các acid béo thiết yếu có tiềm năng to lớn trong việc phát triển một nguồn cung cấp thay thế.

Gần đây, các nhà nghiên cứu của Đại học Bristol (Anh) đã thông báo về việc sản xuất hai chuỗi dài acid béo không sản sinh ra cholesterol với số lượng lớn ở thực vật bậc cao. Việc sản xuất ra các loại dầu thiết yếu ở cây *Arabidopsis thaliana* cho thấy thực vật chuyển gen có thể trở thành nguồn cung cấp các acid béo quan trọng dùng trong ăn uống mà chúng ta thường chỉ nhận được từ cá.

Người ta cũng đã áp dụng thành công kỹ thuật gen đồi với cây *Arabidopsis thaliana* để tạo ra các acid béo thiết yếu khác như arachidonic acid và eicosapentaenoic acid.

1.9. Phát triển hệ thống marker chọn lọc

Việc sử dụng các marker kháng sinh hoặc chống chịu thuốc diệt cỏ cho cây chuyển gen thường là mối lo ngại chính của công chúng và là lý do phản đối công nghệ này.

Các nhà khoa học tại Trung tâm Khoa học Thực vật Umeo (Thụy Điển) đã xây dựng một hệ thống marker ưu việt để xác định cây trồng biến đổi gen mà không phụ thuộc vào các marker truyền thống bằng cách phát triển một biện pháp dựa trên gen *dao1*, gen này mã hóa D amino acid oxidase (DAAO). DAAO là tác nhân làm mất quá trình tạo nhóm amin oxy hóa của một dãy D-amino acid, và phương thức chọn lọc này dựa trên mức độ độc tính của các D-amino acid khác nhau và sự trao đổi của chúng đối với thực vật.

Mặc dù nghiên cứu này còn mới và được thực hiện trên cây *Arabidopsis thaliana*, nhưng người ta tin tưởng rằng phương pháp chọn lọc này sẽ có thể sử dụng trong các loại cây nông nghiệp quan trọng khác.

1.10 Làm sạch đất ô nhiễm

Cây mù tạt Ấn Độ chuyển gen (GM) đã hút sạch lượng selen dư thừa trên một cánh đồng tại California. Đây là cuộc thử nghiệm đầu tiên trên thực địa đối với một số loại cây GM chống ô nhiễm.

Selen là một nguyên tố hóa học, gây độc đối với thực vật nếu hàm lượng của chúng quá cao trong đất. Đất canh tác tại một số vùng của bang California được tưới tiêu mạnh và nước hòa tan selen có trong đá phiến sét. Khi nước bốc hơi trên mặt đất, selen sẽ tích tụ ngày càng nhiều.

Cây mù tạt Ấn Độ (*Brassica juncea*) vốn có khả năng kháng và hấp thụ selen qua rễ. Tuy nhiên, Terry và cs (Đại học California) đã thúc đẩy thêm khả năng trên của cây mù tạt bằng cách bổ sung một số gen tạo enzyme đói selen. Kết quả là loại thực vật GM này có thể hấp thụ selen cao gấp 4,3 lần so với mù tạt Ấn Độ dạng hoang dại, và chúng được thu hoạch 45 ngày sau khi trồng.

Cuộc thử nghiệm thực địa nói trên đã được tiến hành cẩn thận để đảm bảo không có họ hàng nào của cây mù tạt Ấn Độ sinh trưởng ở xung quanh. Hoa mù tạt GM cũng được hái ngay khi chúng xuất

hiện. Mù tạt chuyển gen sẽ được dùng làm thức ăn cho trâu bò thiếu selen trong bữa ăn.

Hiện nay việc xử lý đất ô nhiễm vẫn mang tính thô sơ, chủ yếu là đào đất và chôn nó ở một nơi khác hoặc rửa đất. Cả hai phương pháp đều tốn kém, làm giảm chất lượng đất. Việc sử dụng thực vật để loại bỏ chất ô nhiễm khỏi đất ít tốn kém hơn song có thể mất nhiều năm. Chẳng hạn, cây dương xỉ Trung Quốc (*Pteris vittata*) đã được sử dụng để hút thạch tín khỏi đất. Nhưng dùng cây chuyển gen có thể giúp tăng tốc tiến trình dọn ô nhiễm này.

Tuy nhiên, khả năng cây GM sẽ lai với các loại hoa màu khác là một điều đáng lo ngại. Theo Rugh (Đại học Michigan) nếu chuyển một gen hấp thụ nhiều kim loại vào cây dùng để xử lý ô nhiễm, thì chúng ta phải đảm bảo rằng gen đó không xâm nhập vào hoa màu. Nếu không, hoa màu cũng sẽ hút nhiều kim loại, ảnh hưởng tới sức khỏe người tiêu dùng.

1.11. Làm thức ăn chăn nuôi

Một thế hệ cây trồng chuyển gen mới, được thiết kế đặc biệt cho ngành chăn nuôi đang được phát triển. Những loại cây trồng này được thiết kế với những thay đổi quan trọng về hàm lượng các thành phần chính (ví dụ: protein và amino acid) hay các thành phần thứ yếu (ví dụ: các loại vitamin và khoáng chất). Vì những loại cây trồng chuyển gen này được dùng với mục đích làm thức ăn chăn nuôi nên sẽ khác với các loại cây trồng bình thường, tiến trình chuẩn y các loại cây trồng này sẽ cần có thêm những đánh giá về sự an toàn của chúng khi để con người và vật nuôi tiêu dùng.

Các sản phẩm tiềm tàng bao gồm các loại đậu tương và ngô chuyển gen, có hàm lượng dầu cao hơn cung cấp nhiều năng lượng hơn cho bò, lợn và gia cầm. Các nhà nghiên cứu cũng tạo ra loại đậu tương và ngô có hàm lượng các loại amino acid không thay thế cao hơn. Ngoài ra, các nghiên cứu khác cũng đang được tiến hành nhằm làm tăng hàm lượng phosphore trong thức ăn chăn nuôi.

2. Một số thành tựu trong lĩnh vực tạo thực vật chuyển gen

Nói chung, hầu hết các loài thực vật đều có thể biến nạp được gen. Thông thường, hiệu quả biến nạp gen khác nhau tùy thuộc vào từng loại cây trồng, và dĩ nhiên quá trình biến nạp gen vẫn còn bị hạn chế ở nhiều loài. Ở đây chỉ giới thiệu các kết quả biến nạp gen thành công ở các giống cây trồng quan trọng.

Bảng 5.1. Một số loại cây trồng chuyển gen quan trọng hiện nay

Sản phẩm	Đặc điểm
Cải dầu	Chống chịu chất diệt cỏ, hàm lượng laurate cao, hàm lượng oleic acid cao
Ngô	Chống chịu chất diệt cỏ, kháng côn trùng
Bông	Chống chịu chất diệt cỏ, kháng côn trùng
Khoai tây	Kháng côn trùng, kháng virus
Đậu tương	Chống chịu chất diệt cỏ, hàm lượng oleic acid cao
Bí	Kháng virus
Cà chua	Chín chậm
Lúa	Chống chịu chất diệt cỏ, sản xuất vitamin A
Đu đủ	Kháng virus

2.1. Các cây trồng quan trọng đã được phát triển

- Cây ngô

Hiện nay, cây ngô đã được biến đổi gen để mang các tính trạng như kháng côn trùng và chống chịu thuốc diệt cỏ.

Dùng phôi ngô trong nuôi cấy dịch huyền phù phát sinh phôi để tái sinh các cây hữu thụ mang gen *bar* biến nạp. Sử dụng phương pháp bắn gen và chọn lọc bằng thuốc diệt cỏ bialaphos đã cho kết quả là mô callus phát sinh các phôi được biến nạp gen. Các cây biến nạp gen hữu thụ đã được tái sinh, ổn định di truyền và biểu hiện gen

bar cùng với hoạt tính chúc năng của enzyme phosphinothricin acetyltransferase quan sát được trong những thế hệ sau.

Gần đây, các kết quả biến nạp gen gián tiếp ở ngô nhờ *Agrobacterium* cũng đã được thông báo. Các thế biến nạp gen của dòng ngô lai gần (inbredline) A188 đã được tái sinh sau khi đồng nuôi cây (cocultivation) giữa binary vector³ với phôi non. Tần số biến nạp được thông báo ở dòng A188 là khoảng 5-30%. Các thế lai thế hệ thứ nhất giữa dòng A188 và 5 dòng lai gần khác được biến nạp với tần số khoảng 0,4-5,3% (tính theo số cây biến nạp gen độc lập/phôi).

■ Cây lúa

Chuyển gen ở cây lúa đang được tập trung vào tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ và sản xuất vitamin A.

Kết quả tái sinh của cây lúa biến nạp gen bằng xung điện hoặc PEG thông qua nuôi cây protoplast được thông báo lần đầu tiên cách đây khoảng 10 năm. Các nghiên cứu sau đó cũng đã sử dụng hai kỹ thuật này để biến nạp gen vào protoplast và phục hồi các cây biến nạp gen hữu thu. Tuy nhiên, hạn chế của hai phương pháp này là phải xây dựng phương thức tái sinh cây từ tế bào đơn. Mặc dù các phương thức này đang dùng cho một số giống lúa thuộc loài phụ japonica (ví dụ: Taipei 309) nhưng hầu hết các giống japonica ưu tú cũng như phần lớn các giống indica đều khó tái sinh cây từ protoplast.

Phương pháp bắn gen cho phép thực hiện biến nạp gen hiệu quả ở lúa trong các kiểu gen độc lập, và hiện nay hơn 40 giống đã được biến nạp gen thành công. Mẫu vật sử dụng là phôi non và các callus có nguồn gốc từ hạt trưởng thành. Hygromycin B là marker chọn lọc thường được dùng cho lúa. Tần số biến nạp có thể cao tới 50% (tính theo số cây biến nạp gen có nguồn gốc độc lập/số mẫu được bắn gen). Gần đây, kỹ thuật biến nạp gen ở lúa thông qua

³ Binary vector: vector hai nguồn, là vector trước hết được lắp ghép vào trong tế bào *E. coli* sau đó chuyển toàn bộ vào tế bào *Agrobacterium* bằng phương thức giao phối bộ ba (triparental mating) để nó tự nhân lên và tồn tại trong *Agrobacterium*.

Agrobacterium cũng đã có những cải tiến quan trọng có hiệu quả tương đương với kỹ thuật bắn gen.

Cây lúa chỉ sản sinh ra hợp chất caroteoid được chuyển thành vitamin A trong những bộ phận có màu xanh của cây, tuy nhiên trong hạt gạo mà con người vẫn dùng lại không có hợp chất này. Chính vì thế sự thiếu hụt vitamin A thường xảy ra ở những nơi sử dụng gạo làm lương thực chính. Gạo vàng TM là một loại ngũ cốc chuyển gen có khả năng nâng cao hàm lượng vitamin A trong bữa ăn hàng ngày. Loại gạo này có khả năng sản sinh và lưu giữ chất β -carotene. Nó được đặt tên là gạo vàng TM bởi vì nội nhũ (chất bột bên trong của hạt gạo) của nó có màu vàng nhạt, do chất β -carotene tạo ra.

■ Cây đậu tương

Đậu tương là một loại cây trồng lâu đời đã được trồng tại Trung Quốc từ năm 3.000 trước công nguyên. Đây là loại cây chứa dầu đem lại lợi ích kinh tế to lớn nhất trên thế giới. Hạt đậu tương có chứa tỷ lệ amino acid không thay thế nhiều hơn ở cá thịt, do vậy đậu tương là một trong những loại cây trồng lương thực quan trọng nhất trên thế giới hiện nay.

Đậu tương được biến đổi gen để mang các tính trạng như khả năng chống chịu thuốc diệt cỏ và có hàm lượng oleic acid cao.

Những cố gắng đầu tiên ở cây đậu tương biến nạp gen tập trung ở việc tái sinh cây từ protoplast và nuôi cấy dịch huyền phù phát sinh phôi. Mặc dù có những thành công ban đầu, tiến triển của công việc này vẫn còn chậm và việc thu hồi các cây chuyển gen vẫn đang còn gặp nhiều khó khăn. Công nghệ chuyển gen ở đậu tương đã có triển vọng hơn nhờ sự phát triển và tối ưu hóa của kỹ thuật bắn gen (vi đạn). Thực tế, đậu tương đã được dùng như một cây mô hình để phát triển kỹ thuật cho nhiều loài cây trồng khó áp dụng công nghệ di truyền.

Kết quả đầu tiên ở đậu tương là thu hồi thành công cây chuyển gen nhờ *Agrobacterium*. Phương thức này dựa vào sự phát sinh chồi từ lá mầm của giống Peking chọn lọc cho tính mẫn cảm với *Agrobacterium*. Các mầm lá mầm được xâm nhập với

Agrobacterium mang plasmid kháng kanamycin và có hoạt tính *gusA*, hoặc kháng kanamycin và chống chịu glyphosate. Có thể biến nạp gen hiệu quả vào protoplast đậu tương bằng các phương thức thông dụng nhưng rất khó tái sinh được cây.

Để biến nạp gen vào các giống đậu tương khác nhau người ta đã phối hợp hai yếu tố: genotype đơn giản-phương thức tái sinh cây độc lập (dựa trên cơ sở sự tăng sinh của cụm chồi từ vùng chung quanh mô phân sinh của trụ phôi) với sự tăng gia tốc của vi đạn (particle) có phóng điện để phân phối DNA ngoại lai. Hàng trăm cây đậu tương có nguồn gốc độc lập đã thu được và kết quả biến nạp đã cho nhiều phenotype khác nhau.

Nói chung, các dòng đậu tương chuyên gen có nhiều bản sao của gen biến nạp (số bản sao khoảng từ 1-50 nhưng thường thay đổi từ 2-10). Phân tích Southern blot ở thế hệ sau của các bản sao gen phức cho thấy tất cả các bản sao cùng tách rời, như thế mỗi thế biến nạp sơ cấp chỉ hiện diện một kết quả biến nạp độc lập và có thể sự tái tổ hợp thông nhất đã không xuất hiện thường xuyên.

■ Cây bông

Cây bông là loại cây cung cấp sợi chủ yếu, chiếm tới một nửa số lượng vải sợi trên thế giới. Ngoài ra, một lượng nhỏ hạt bông được dùng như một nguồn thực phẩm, thức ăn gia súc và dầu ăn cho con người và vật nuôi. Dầu hạt bông được tinh chế trước khi dùng để loại bỏ chất gossypol độc hại cho người và tiêu hóa của động vật.

Phương thức biến nạp gián tiếp thông qua *Agrobacterium tumefaciens* là kỹ thuật đầu tiên được sử dụng để biến nạp gen vào cây bông giống Coker 312 (Umbeck 1987). Cây bông biến nạp gen cũng của giống trên đã được thu hồi sau khi bắn gen vào dịch huyền phù nuôi cấy phát sinh phôi (Finer và McMullen 1990). Hầu hết các giống bông có giá trị kinh tế khác không thể tái sinh cây từ giai đoạn callus. Một số ít các giống đó có thể tái sinh cây nhưng quá trình này thiên về biến dị dòng vô tính (somaclonal variation). Phương thức phân phối gen ngoại lai trực tiếp vào trong mô phân sinh của trụ

phôi dựa trên công nghệ “ACCELL”⁴ cũng được phát triển và người ta đã thu hồi thành công cây biến nạp gen.

■ Cây cải dầu

Cây cải dầu được biến đổi gen với mục đích cải thiện chất lượng dinh dưỡng, đặc biệt là hàm lượng chất béo hòa tan của loại cây này. Cây cải dầu được trồng chủ yếu ở các vùng phía tây Canada và một ít ở Ontario và tây bắc Thái Bình Dương, trung tâm phía bắc và vùng đông nam nước Mỹ. Ngoài ra, cây cải dầu cũng được trồng ở các nước khác của châu Âu và Australia. Cây cải dầu được biến đổi gen mang các tính trạng chống chịu thuốc diệt cỏ, có hàm lượng laurate và oleic acid cao.

■ Khoai tây

Khoai tây được xem là cây lương thực quan trọng thứ tư trên thế giới, với sản lượng hàng năm lên đến 300 triệu tấn và được trồng trên hơn 18 triệu hecta. Hiện nay, hơn một phần ba sản lượng khoai tây trên thế giới là của các nước đang phát triển. Sau khi Liên Xô tan rã thì Trung Quốc trở thành nước sản xuất khoai tây lớn nhất thế giới. Ấn Độ đứng thứ tư. Mặc dù sản lượng khoai tây tại châu Âu đã giảm xuống từ đầu những năm 1960, nhưng bù vào đó sản lượng khoai tây ở châu Á và nam Mỹ lại tăng lên vì thế sản lượng khoai tây trên thế giới vẫn càng ngày càng tăng. Khoai tây được biến đổi gen mang các tính trạng như khả năng kháng côn trùng và kháng virus.

■ Cà chua

Cà chua được coi là loại quả vườn phổ biến nhất hiện nay. Cà chua thường rất dễ trồng và một số giống đã cho những vụ mùa bội thu. Chất lượng quả cà chua chín cây vượt xa tất cả những loại quả khác có mặt trên thị trường thậm chí trong cả mùa vụ. Cây cà chua

⁴ ACCELL Technology: công nghệ phân phôi gen dựa trên cơ sở thay đổi cường độ phóng điện thông qua giọt nước nhỏ vì vậy đã tạo ra một sự thay đổi áp suất không khí rất lớn làm tăng giá tốc của các viên đạn vàng bọc DNA.

rất mềm và thích hợp với thời tiết ám áp thế nên nó thường được trồng vào vụ hè. Cà chua được biến đổi gen mang các tính trạng như khả năng chịu thuốc diệt cỏ, kháng vật ký sinh và làm chậm quá trình chín của quả.



Hình 5.1: Cà chua chuyên gen kháng vật ký sinh (bên phải) và cà chua đối chứng (bên trái)

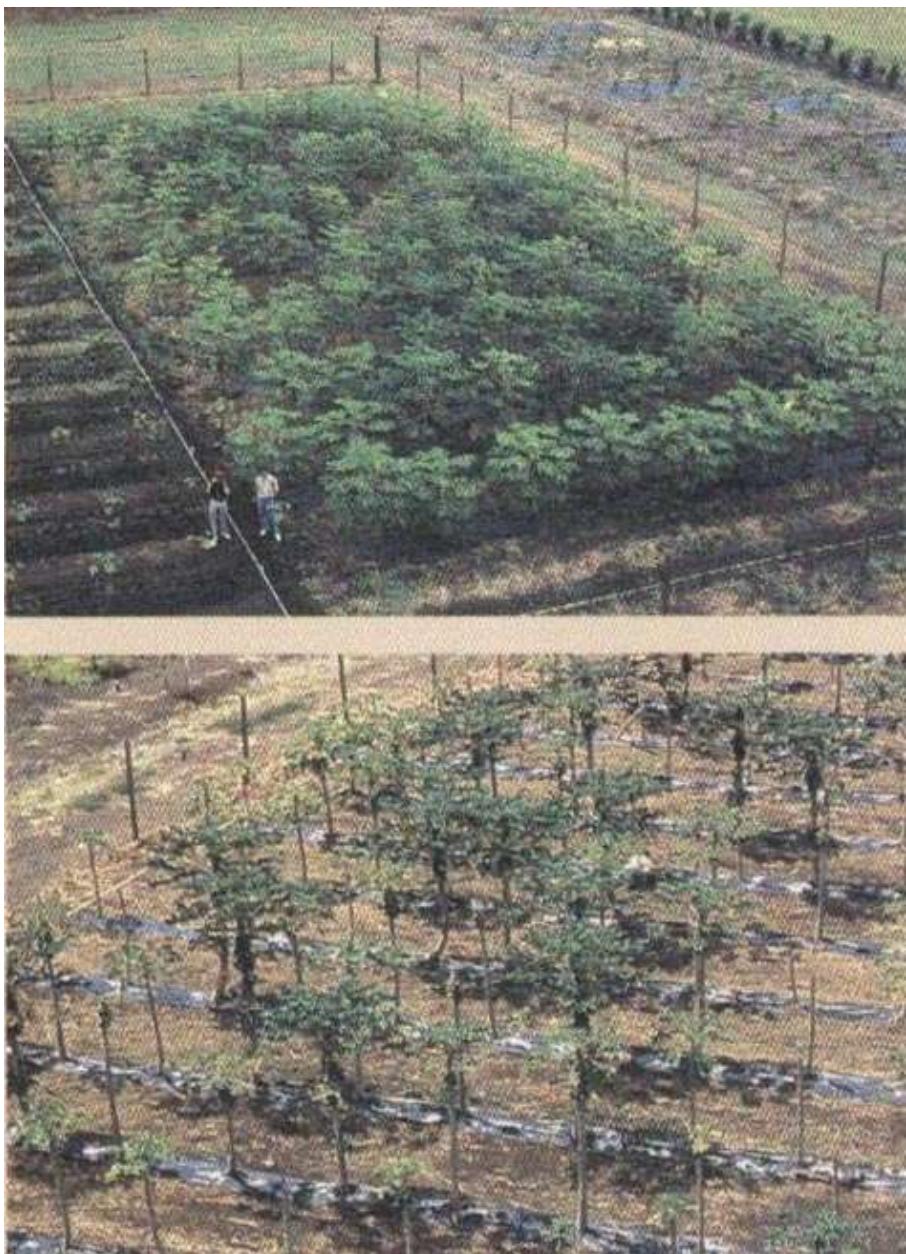
▪ Cây bí đỏ

Bí đỏ mùa hè là một loại quả mềm và hợp với khí hậu ám áp, được trồng ở nhiều nơi trên thế giới. Bí đỏ mùa hè khác bí đỏ mùa thu và mùa đông ở chỗ nó được chọn thu hoạch trước khi vỏ quả cứng và quả chín. Không mọc lan như bí đỏ và bí ngô mùa thu và mùa đông, bí đỏ mùa hè mọc thành bụi rậm. Một số cây khỏe và có sức đề kháng tốt cho sản lượng khá cao. Bí đỏ được biến đổi gen kháng virus đặc biệt là virus khâm dưa hấu (WMV) và virus khâm vàng zucchini (ZYMV).

▪ Đu đủ

Đu đủ là một loại cây trồng quan trọng ở khu vực Đông Nam Á, được dùng làm thức ăn phổi biến trong các hộ nông dân sản xuất

nhỏ và gia đình của họ. Hiện nay, giống đu đủ chuyển gen kháng virus đã được phát triển ở các nước thuộc khu vực Đông Nam Á.



**Hình 5.2 : Đu đủ chuyển gen kháng virus (trên)
và đu đủ đối chứng (dưới)**

2.2. Các loại cây trồng đang được phát triển

- Táo

Trên thế giới hiện có hơn 6.000 loại táo. Táo là một trong những loại trái cây được ưa thích nhất không chỉ bởi hương vị thơm ngọt mà nó còn rất tốt cho sức khỏe. Các cuộc nghiên cứu cho thấy ăn táo có thể giảm được nguy cơ mắc bệnh ung thư, các bệnh tim mạch và béo phì. Hiện nay, táo đang được nghiên cứu biến đổi gen để mang các tính trạng như làm chậm quá trình chín và kháng sâu bệnh.

- Chuối

Trong số các loại cây trồng nhiệt đới, chuối rất được ưa thích do hương vị hấp dẫn của nó. Ngoài ra, chuối còn là một loại trái cây đa dụng, vì người ta có thể chế biến thành nhiều sản phẩm khác nhau. Hiện nay có khoảng 1.000 loại chuối khác nhau, loại trái cây giàu dinh dưỡng và không có chất béo này có chứa hàm lượng kali và chất xơ rất cao, và là nguồn cung cấp vitamin C chống oxy hóa. Chuối đang được nghiên cứu biến đổi gen để mang các tính trạng như kháng virus, giun tròn và nấm và có khả năng làm chín chậm. Chuối cũng là loại cây dự kiến được dùng làm vaccine thực phẩm (edible vaccine) để phòng chống nhiều loại bệnh dịch khủng khiếp ở các nước đang phát triển.

- Dứa

Có nguồn gốc từ Trung Mỹ và Nam Mỹ và được xem như loại trái cây nhiệt đới được bán rộng rãi nhất, chiếm tới 44% tổng kim ngạch buôn bán trái cây nhiệt đới. Tính tới tháng 1/2001, toàn thế giới đã trồng được khoảng 12 triệu tấn dứa. Trong vòng 30 năm qua, sản lượng dứa hàng năm trên thế giới đã tăng lên gấp ba lần. Hiện nay, một số tổ chức nghiên cứu đang tiến hành nghiên cứu sự đa dạng di truyền của cây dứa. Bên cạnh đó, người ta đang biến đổi gen cây dứa để tăng khả năng kháng sâu bọ và virus, và bổ sung tính trạng làm chậm chín của cây.

- Khoai lang

Khoai lang là một loại cây lương thực dễ trồng nhưng có vai trò rất quan trọng ở các nước đang phát triển. Trong những điều kiện về khí hậu bất lợi và không cần đầu tư nhiều, sản lượng khoai lang trên một hecta có thể đem lại nguồn năng lượng và dinh dưỡng cao hơn bất cứ cây trồng nào khác. Cây trồng này có thể phát triển trong điều kiện khô hạn nhiều tháng liền. Khoai lang đang được nghiên cứu biến đổi gen để kháng các loại bệnh virus phá hoại cây (SPVD-sweetpotato viral diseases).

■ Dừa

Sản phẩm có giá trị nhất của cây chính là dầu dừa chiết xuất từ cùi dừa. Hai nước sản xuất ra nhiều dầu dừa nhất là Indonesia và Philippin với sản lượng cùi dừa khô thu được trong năm 1999 lần lượt là 2,91 triệu tấn và 1,37 triệu tấn. Ngoài ra, còn có nhiều nước trồng dừa ở châu Á, châu Phi, nam Thái Bình Dương, Ấn Độ Dương, nam Mỹ và vùng Caribê. Chất làm cho dầu dừa trở nên hấp dẫn như vậy chính là hàm lượng lauric acid cao. Nhu cầu về lượng acid lauric cao vì nó được sử dụng để làm mứt, dầu ăn, mỹ phẩm, chất tẩy, bơ thực vật, dầu gội dầu và xà bông. Do vậy, trên thế giới nhu cầu về dầu dừa luôn luôn cao. Ngành công nghiệp chế biến dừa hiện nay đang bị đe dọa do sự phát triển của một số loại cây trồng biến đổi gen cho nhiều dầu, như hạt cải dầu. Việc nghiên cứu thúc đẩy phát triển sản xuất dầu dừa có ý nghĩa vô cùng quan trọng đối với ngành công nghiệp chế biến dừa.

3. Tình hình cây trồng biến đổi gen được trồng thương mại trên toàn cầu

Cho đến nay, diện tích cây trồng biến đổi gen (GM) trên toàn cầu vẫn tiếp tục gia tăng ở mức 12-15%. Trong giai đoạn 8 năm kể từ năm 1996 tới năm 2003, diện tích trồng cây GM trên toàn cầu đã tăng gấp 40 lần (từ 1,7 triệu ha/1996 lên 67,7 triệu ha/2003), trong đó diện tích trồng ở các nước đang phát triển tăng đáng kể. Khoảng một phần ba diện tích trồng cây GM trên toàn cầu trong năm 2004 (tương đương 20 triệu ha) là diện tích trồng ở các nước đang phát triển, nơi có mức tăng lớn nhất.

Trong giai đoạn 1996-2003, đặc tính chống chịu thuốc diệt cỏ của cây trồng biến đổi gen vẫn liên tục giữ vị trí hàng đầu, tiếp theo là đặc tính kháng sâu bệnh.

Năm 2003, đặc tính chống chịu thuốc diệt cỏ được triển khai trên cây đậu tương, ngô, cải dầu (canola) và bông, chiếm 73% (49,7/67,7 triệu ha tổng diện tích trồng cây biến đổi gen trên toàn cầu), trong khi 12,2 triệu ha (18%) được dùng cho cây trồng Bt. Diện tích trồng bông và ngô có các gen chống chịu thuốc diệt cỏ và kháng sâu bệnh tiếp tục tăng, chiếm 8% (5,8 triệu ha) tăng so với 4,4 triệu ha của năm 2002. Hai cây trồng giữ vị trí hàng đầu trong năm 2003 là đậu tương chống chịu thuốc diệt cỏ, được trồng với diện tích 41,4 triệu ha chiếm 61% trong tổng diện tích toàn cầu và được trồng tại 7 nước; và ngô Bt với diện tích 9,1 triệu ha, tương đương với 13% diện tích trồng cây biến đổi gen trên thế giới và được trồng tại 9 nước.

Diện tích trồng ngô Bt tăng mạnh nhất là ở Mỹ. Đáng chú ý là trong năm 2004 Nam Phi đã trồng 84.000 ha ngô tráng Bt dùng làm thực phẩm, tăng 14 lần so với lần đầu tiên khi loại ngô này được giới thiệu ở Nam Phi vào năm 2001. Diện tích trồng ngô và bông Bt/chống chịu thuốc diệt cỏ cũng tăng mạnh, cho thấy xu hướng các gen biến đổi chiếm một tỷ lệ lớn trong diện tích trồng cây biến đổi gen trên phạm vi toàn cầu.

3.1. Tiềm năng đóng góp của cây trồng biến đổi gen

Lý do thuyết phục nhất đối với công nghệ sinh học mà cụ thể là cây trồng biến đổi gen đó là khả năng đóng góp của chúng trong các lĩnh vực sau:

- Nâng cao sản lượng cây trồng và do vậy góp phần đảm bảo an ninh lương thực, thức ăn gia súc và chất xơ trên toàn cầu.
- Bảo toàn sự đa dạng sinh học do đây là một công nghệ ít tiêu tốn đất có khả năng đem lại sản lượng cao hơn.
- Sử dụng một cách có hiệu quả hơn các yếu tố đầu vào đáp ứng yêu cầu phát triển bền vững nông nghiệp và môi trường
- Tăng khả năng ổn định sản xuất làm giảm những thiệt hại phải gánh chịu trong các điều kiện khó khăn.

- Cải thiện các lợi ích kinh tế và xã hội và loại bỏ tình trạng đói nghèo ở các nước đang phát triển.

Kinh nghiệm trong 8 năm đầu tiên từ 1996-2003, trong đó tổng diện tích trên 300 triệu ha cây trồng biến đổi gen đã được trồng tại 21 nước trên toàn cầu, đã đáp ứng sự mong mỏi của hàng triệu hộ nông dân lớn và nhỏ ở cả các nước công nghiệp và đang phát triển. Năm 2003, đã có bằng chứng cho thấy cây trồng GM được trồng thương mại hóa tiếp tục đem lại các lợi ích đáng kể về mặt kinh tế, môi trường và xã hội cho các hộ nông dân lớn và nhỏ ở các nước đang phát triển, diện tích trồng cây biến đổi gen trên toàn cầu tiếp tục tăng trên 10%, mức tăng hàng năm là hai con số. Số hộ nông dân thu lợi từ cây trồng GM ngày càng nhiều và đạt 7 triệu người năm 2003, tăng so với 6 triệu của năm 2002. Đáng chú ý là trong năm 2003, trên 85% trong tổng số 7 triệu người trồng này thu lợi từ cây trồng GM là các nông dân nghèo trồng bông Bt, chủ yếu ở 9 tỉnh của Trung Quốc và nông dân nghèo ở Makhathini Flats, thuộc tỉnh KwaZulu Natal của Nam Phi.

3.2. Trị giá cây trồng biến đổi gen trên toàn cầu

Năm 2003, trị giá thị trường cây trồng biến đổi gen trên toàn cầu ước tính đạt từ 4,5 tới 4,75 tỷ đôla, tăng so với con số 4 tỷ đôla năm 2002, chiếm 15% trong tổng trị giá 31 tỷ đôla thị trường bảo vệ cây trồng trên toàn cầu và chiếm 13% trong tổng trị giá 30 tỷ đôla thị trường hạt giống toàn cầu. Trị giá thị trường cây trồng GM trên toàn cầu dựa trên giá bán hạt giống biến đổi gen cộng với bất cứ khoản chi phí công nghệ áp dụng nào khác. Giá trị thị trường cây trồng GM trên toàn cầu dự kiến đạt 5 tỷ đôla hoặc hơn thế nữa vào năm 2005.

3.3. Nhận định về cây trồng GM và triển vọng của chúng trong tương lai

Mặc dù những tranh cãi về cây trồng biến đổi gen hiện đang tiếp tục diễn ra ở Liên minh châu Âu nhưng người ta vẫn lạc quan tin rằng diện tích và số người trồng cây biến đổi gen trên toàn cầu sẽ tiếp tục gia tăng trong những năm sau đó. Với tất cả những yếu tố hiện có thì diện tích trồng cây GM trên toàn cầu trong vòng 5 năm

tới dự kiến sẽ đạt khoảng 100 triệu ha, và số người trồng sẽ tăng lên 10 triệu người ở 25 nước hoặc hơn nữa. Số lượng và tỷ lệ các hộ gia đình nhỏ từ các nước đang phát triển trồng cây GM so với toàn cầu dự kiến sẽ tăng mạnh. Các nước đã trồng cây trồng GM sẽ tiếp tục tăng diện tích trồng và số lượng các sản phẩm cây trồng GM trên thị trường sẽ đa dạng hơn. Các nước mới trồng cây GM ở nam Bán cầu như Ấn Độ, Brazil đã tăng diện tích trồng bông Bt và đậu tương chống chịu thuốc diệt cỏ. Một số nước như Uruguay cũng đã chuẩn y các sản phẩm mới như ngô GM, loại ngô này cũng đã được triển khai trồng ở các nước khác.

Các sản phẩm chuyển gen mang đặc tính mới góp phần tạo ra sự tăng trưởng ổn định, bao gồm gen Bt (cry1Ac và cry1Ab) ở bông và hai đặc tính mới được đưa vào ngô ở Bắc Mỹ là gen cry3Bb1 dùng để kiểm soát sâu đục thân ngô và gen cry1Fa2 dùng để kiểm soát tốt hơn các sâu bọ cánh phấn đều được giới thiệu ở Mỹ trong năm 2003. Ngoài ra, các sản phẩm Bt mới và gen mới đối với ngô kháng côn trùng dự kiến sẽ được đưa ra trong vòng 3 năm tới. Do vậy, diện tích trồng ngô biến đổi gen trên toàn cầu với tình trạng kháng côn trùng và chống chịu thuốc diệt cỏ cũng như các đặc tính tổng hợp có thể sẽ tăng đáng kể trong thời gian ngắn tới đây. Với việc chuẩn y trồng đậu tương biến đổi gen ở Brazil trong vụ 2003/2004, diện tích trồng đậu tương biến đổi gen trên toàn cầu dự kiến sẽ có mức tăng trưởng cao mới trong thời gian tới.

Năm 2003, ba nước đông dân nhất ở châu Á là Trung Quốc, Ấn Độ và Indonesia (tổng dân số là 2,5 tỷ người và GDP của cả ba nước là trên 1,5 nghìn tỷ đôla), ba nền kinh tế lớn ở châu Mỹ La-tinh là Argentine, Brazil và Mexico (dân số là 300 triệu người và GDP là 1,5 nghìn tỷ đôla) và nền kinh tế lớn nhất châu Phi là Nam Phi (dân số 45 triệu người và GDP là 130 tỷ đôla) tất cả đã chính thức trồng cây trồng biến đổi gen. Tổng số dân của những nước trên là 2,85 tỷ người với GDP là trên 3.000 tỷ đôla, đây là những người nhận được các lợi ích đáng kể mà cây trồng biến đổi gen đem lại.

Mười nước trồng cây biến đổi gen đứng đầu thế giới, mỗi nước trồng ít nhất 50.000 ha trong năm 2003, có tổng dân số xấp xỉ 3 tỷ người, gần bằng một nửa dân số thế giới và GDP là 13 nghìn tỷ đôla, khoảng một nửa mức GDP của toàn cầu là 30 nghìn tỷ đôla. Trong

năm 2003, cây trồng biến đổi gen được trồng ở 18 nước với tổng số dân là 3,4 tỷ người, sống ở 6 châu lục ở miền Bắc và miền Nam Bán cầu là châu Á, châu Phi, Mỹ La-tinh, bắc Mỹ, châu Âu và châu Đại Dương. Do vậy, mặc dù vẫn còn những bất đồng về cây trồng biến đổi gen nhưng diện tích và số lượng người trồng loại cây này mỗi năm vẫn tiếp tục tăng hai con số hoặc hơn thế kể từ khi chúng được giới thiệu vào năm 1996, và năm 2003 có 7 triệu nông dân đã thu lợi từ công nghệ này.

Tài liệu tham khảo

Bains W. 2003. Biotechnology from A to Z. *Oxford University Press, Inc.* New York, USA.

Birch RG. 1997. Plant Transformation: Problems and strategies for practical applications. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* 48: 297-326.

Chrispeels MJ and Sadava DE. 2003. Plants, Genes, and Crop Biotechnology. 2nd Edition. Jones and Bartlett Publishers, Massachusetts, USA

Ratledge C and Kristiansen B. 2002. Basic Biotechnology. *Cambridge University Press*, UK.

Walker JM and Rapley R. 2002. Molecular Biology and Biotechnology. 4th Edition. *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, UK.

Website: <http://www.biotechvn.com>

Bảng 1.1: Một số các vector Ti-plasmid liên hợp

Vector tạo dòng (trung gian)	Plasmid vir vật chủ liên hợp	Vùng tương đồng	Ori	Plasmid hỗ trợ chuyển gen	Marker chọn lọc của vi khuẩn	Biên T-DNA	Marker chọn lọc của thực vật	Nos / ocs	Vị trí tạo dòng và chú thích
pMON200 (9,5 kb)	pTiB6S3-SE (GV3111)	LIH	pBR322 (Col E1)	pR64drdll pGJ23 (JM101) JM101	Sm/Sp	Rb(SEV) pTiT37	<i>nos-npt-II</i>	Nos	Các vị trí duy nhất đôi với EcoRI, HindIII, XbaI, XhoI
pMON273 (10 kb)	pTiB6S3-SE (GV3111)	LIH	pBR322	JM101	Sm/Sp	Rb(SEV) pTiT37	CaMV35S- <i>npt-II</i>	Nos	Các vị trí duy nhất đôi với HindIII
pMON316 (11 kb)	pTiB6S3-SE (GV3111)	LIH	pBR322	JM101	Sm/Sp	Rb(SEV) pTiT37	<i>nos-npt-II</i>	Nos	Các vị trí duy nhất đôi với BglIII, Clal, KpnI và EcoRI ở giữa promoter CaMV-35S và vị trí poly A Nos
pGV1103 (6,5 kb)	pGV3850-SE (C58C1)	gen Ap ^r	pBR322	Jm101	Km	Không có	<i>nos-npt-II</i>	-	EcoRI Các trình tự pR322 lắp ở giữa các biên T-DNA
pGV831 (8,9 kb)	pGV2260 (C58C1)	gen Ap ^r	pBR322	JM101	Sm/Sp	Rb/Lb pTiB6S3	<i>nos-npt-II</i>	Ocs	Bam HI Các trình tự pR322 lắp không ở giữa các biên T-DNA

Bảng 1.2: Một số vector nhị thể

Vector tạo dòng	Plasmid hỗ trợ gây đột biến	Nguồn gốc loại vật chủ mở rộng	Dòng vật chủ	Plasmid hỗ trợ chuyển gen	Marker chọn lọc của vi khuẩn	Biên T-DNA	Marker chọn lọc của thực vật	Nos /ocs	Vị trí tạo dòng và chú thích
pBin19 (10 kb)	pAL4404 (mất thè đột biến của pTiAch5)	pKB252 (có nguồn gốc từ pRK2)	HB101/ C58C1	pRK2013 (HB101)	Km	Rb/Lb pTiT37	<i>nos-npt-II</i>	-	Các vị trí duy nhất đôi với EcoRI, HindIII, Sst I, SmaI, XbaI và SalII Sàng lọc bằng IPTG+X-GAL
pAGS113 (16 kb)	pAL4404	pRK2	HB101/ C58C1	pRK2013 (HB101)	Km	Rb/Lb pTiA6/Ach5	<i>nos-npt-II</i>	-	ClaI, BamHI
pAGS125 (17,6 kb)	pAL4404	pRK2	HB101/ C58C1	pRK2013 (HB101)	Km, Tc	Rb/Lb pTiA6/Ach5	<i>nos-npt-II</i>	-	ClaI, BamHI
pARC8 (28 kb)	pRiA4	pRK2	HB101/ A4	pRK2013 (HB101)	Tc, Ap+	Rb/Lb pTiT37	<i>nos-npt-II</i>	-	EcoRI, Hind III
Binary (17 kb)	pAL4404	pKT240	LE392/ C5851	pRK2013 (mm294)	Sm, Gm	Rb/Lb pTiT37	<i>nos-npt-II</i>	Nos	EcoRI, KpnI, SmaI, XbaI, SalI
pGA469 (10,8 kb)	pGV2260 (C58C1)	pTJS75 (có nguồn gốc từ RK2)	K802/ AI36	pRK2073	Tc	Rb/Lb pTiT37	<i>nos-npt-II</i>	-	EcoRI, HindIII

Mục lục

Lời nói đầu	3
--------------------	---

Chương 1: Lịch sử và Phương pháp Nghiên cứu Nucleic Acid

	Đỗ Quý Hai	7
I. Lịch sử nghiên cứu		7
II. Các phương pháp nghiên cứu		11
1. Các phương pháp chung		12
2. Các phương pháp tách chiết nucleic acid		14
3. Các phương pháp phân tích định tính và định lượng tổng nucleic acid		17
4. Các phương pháp xác định trình tự nucleic acid		19

Chương 2: Cấu trúc của các Nucleotide và Polynucleotide

	Hoàng Trọng Phán - Đỗ Quý Hai	21
I. Thành phần hóa học của các nucleotide		21
1. Base nitrogen		21
2. Đường pentose		24
3. Phosphoric acid		25
II. Cấu trúc của các nucleotide		25
1. Cấu trúc của các nucleoside		25
2. Cấu trúc của các nucleotide		26
3. Cấu trúc của các di- và triphosphate nucleoside		27
III. Cấu trúc của các chuỗi polynucleotide		29

Chương 3: Cấu trúc và Đặc điểm của DNA

	Hoàng Trọng Phán	33
I. Thành phần hóa học của DNA		33
II. Cấu trúc chuỗi xoắn kép DNA		34
1. Mô hình Watson-Crick		35
2. Các dạng DNA xoắn phải và xoắn trái		38
3. Các DNA mạch vòng sợi kép và sợi đơn		40
III. Định khu, hàm lượng và kích thước của DNA		43
IV. Đặc tính hóa lý của DNA		49
V. Chức năng của DNA		56

Chương 4: Cấu trúc và Chức năng của các RNA

<i>Hoàng Trọng Phán</i>	61
I. Cấu trúc và chức năng của các mRNA	63
II. Cấu trúc và chức năng của các tRNA	69
III. Cấu trúc và chức năng của các rRNA	71

Chương 5: Sinh tổng hợp Nucleotide và DNA

<i>Hoàng Trọng Phán</i>	75
I. Sinh tổng hợp các nucleotide	75
1. Sinh tổng hợp các nucleotide purine	75
2. Sinh tổng hợp các nucleotide pyrimidine	77
II. Sinh tổng hợp DNA (Tái bản)	79
1. Những nguyên tắc và đặc điểm chung của tái bản DNA	80
2. Các enzyme tham gia tái bản DNA	82
3. Cơ chế tái bản DNA	84
4. Tái bản của các bộ gene RNA	91
5. Ứng dụng của enzyme tái bản trong kỹ thuật sinh học phân tử	93
III. Cơ sở phân tử của đột biến và tái tổ hợp DNA	97
1. Cơ sở phân tử của đột biến	97
2. Sửa chữa DNA	105
3. Tái tổ hợp và đại cương về công nghệ DNA tái tổ hợp	107

Chương 6: Sinh tổng hợp RNA và Protein

<i>Hoàng Trọng Phán</i>	117
I. Sinh tổng hợp RNA (Phiên mã)	117
1. Đặc điểm chung của phiên mã	117
2. Các RNA polymerase ở prokaryote và eukaryote	118
3. Cơ chế phiên mã ở prokaryote và eukaryote	119
II. Cấu trúc và chức năng của protein	128
1. Cấu trúc của protein	128
2. Chức năng của protein	130
III. Mã di truyền	132
IV. Cơ chế của quá trình sinh tổng hợp protein (Dịch mã)	136
1. Hoạt hóa amino acid	136
2. Mở đầu, kéo dài và kết thúc sự tổng hợp chuỗi polypeptide	137
V. Sự điều hòa sinh tổng hợp protein ở vi khuẩn	141
1. Mô hình operon ở <i>E. coli</i>	141
2. Operon lactose và cơ chế điều hòa cảm ứng - âm tính	143

3. Operon tryptophan và cơ chế điều hòa ức chế - âm tính 145