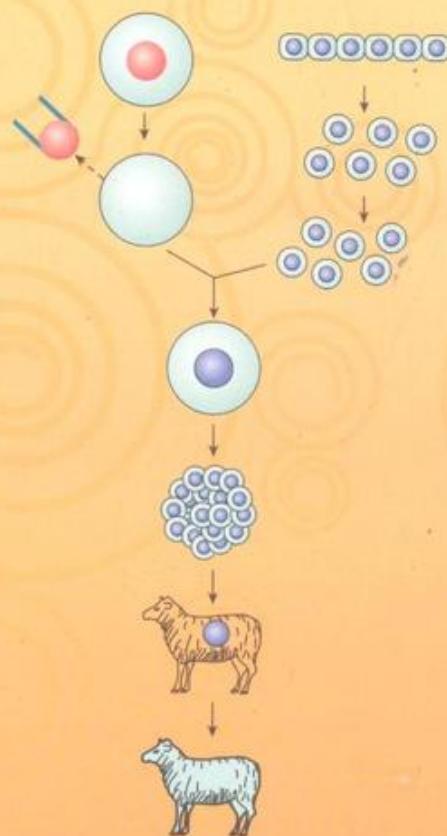


VŨ VĂN VŨ - NGUYỄN MỘNG HÙNG  
LÊ HỒNG ĐIỆP

# CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TẬP HAI  
CÔNG NGHỆ SINH HỌC TẾ BÀO



VŨ VĂN VỤ - NGUYỄN MỘNG HÙNG  
LÊ HỒNG ĐIỆP

# CÔNG NGHỆ SINH HỌC

TẬP HAI

## CÔNG NGHỆ SINH HỌC TẾ BÀO

(Dùng cho sinh viên ĐH, CĐ chuyên và không chuyên, ngành CNSH,  
giáo viên và học sinh THPT)

Tái bản lần thứ nhất

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

## Lời nói đầu

Công nghệ sinh học đang là một khoa học mũi nhọn trong các khoa học sự sống. Cùng với Công nghệ thông tin, Công nghệ vật liệu mới, Công nghệ sinh học đang góp phần tích cực trong sự phát triển mọi mặt của xã hội loài người.

Công nghệ sinh học được hiểu như là các quá trình sản xuất ở quy mô công nghiệp có sự tham gia của các tác nhân sinh học (ở mức độ cơ thể, tế bào hay dưới tế bào) dựa trên các thành tựu tổng hợp của nhiều bộ môn khoa học, phục vụ cho việc tăng của cải vật chất của xã hội và bảo vệ lợi ích con người.

Như vậy Công nghệ sinh học là một tập hợp các ngành khoa học (Sinh học phân tử, Di truyền học, Vi sinh vật học, Hoá sinh học và Công nghệ học) nhằm tạo ra các công nghệ khai thác ở quy mô công nghiệp các hoạt động sống của sinh vật, tế bào thực vật và tế bào động vật.

Có thể chia Công nghệ sinh học thành bốn loại công nghệ sau :

- Công nghệ gen
- Công nghệ enzym và protein
- Công nghệ vi sinh vật
- Công nghệ tế bào thực vật và tế bào động vật

Công nghệ sinh học đại cương hay gọi là Nhập môn công nghệ sinh học và các chuyên đề của nó hiện đang là các môn học cốt lõi trong các hệ đào tạo ở các bậc học Trung học phổ thông, Đại học và Sau đại học thuộc các ngành Khoa học sự sống. Ở nhiều trường Đại học ở nước ta Công nghệ sinh học được đào tạo như một ngành riêng, mặc dù là một ngành mới, nhưng là một ngành có rất nhiều triển vọng tốt đẹp.

Nhằm phục vụ kịp thời cho việc dạy và học môn học Công nghệ sinh học ở các bậc học, tập thể các tác giả : GS.TS. Nguyễn Mộng Hùng, GS.TS. Vũ Văn Vũ, Ths. Lê Hồng Diệp đã biên soạn giáo trình Công nghệ tế bào này.

Để đảm bảo tính logic của nhận thức, các tác giả đã trình bày phần 1 là các kiến thức về mối liên quan giữa cấu trúc và chức năng của tế bào, sau đó đến phần 2 là các kiến thức về công nghệ tế bào và những ứng dụng của công nghệ tế bào trong thực tiễn.

Các tác giả hy vọng cuốn sách sẽ là tài liệu học tập và tham khảo hữu ích cho các đối tượng là học sinh THPT, sinh viên đại học, cũng như các thầy giáo, cô giáo ở các trường phổ thông và đại học thuộc các ngành có liên quan đến khoa học sự sống.

Mặc dù đã hết sức cố gắng, nhưng trong quá trình biên soạn không khỏi có những thiếu sót, các tác giả xin chân thành cảm ơn các ý kiến đóng góp của người đọc.

CÁC TÁC GIẢ

# MỤC LỤC

<b>Lời nói đầu</b>	3	<i>Chương 7. CHUYỂN GEN VÀO THỰC VẬT</i>
<b>Phản I - CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT</b>		
<i>Chương 1. CẤU TRÚC VÀ CHỨC NĂNG CỦA TẾ BÀO THỰC VẬT</i>		
I - Cấu trúc của tế bào thực vật	5	I - Mở đầu
II - Sinh trưởng và phân hoá của tế bào thực vật	13	II - Các điều kiện cần cho chuyển gen ở thực vật
III - Sự trao đổi nước của tế bào	15	III - Các phương pháp chuyển gen ở thực vật
IV - Sự trao đổi khoáng và nitơ	17	IV - Phân tích thực vật chuyển gen
V - Hô hấp tế bào	19	Phụ lục : Thành phần của 6 môi trường nuôi cấy phổ biến
VI - Quang hợp ở tế bào	20	Các chữ viết tắt
<i>Chương 2. ĐIỀU KIỆN VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT</i>		
I - Sơ lược lịch sử nuôi cấy mô tế bào thực vật	22	<i>Chương 8. HỎI ĐÁP VỀ TẾ BÀO GỐC</i>
II - Các điều kiện nuôi cấy	23	<i>Chương 9. TẾ BÀO TRÚNG</i>
III - Môi trường nuôi cấy	27	I - Hình dạng, kích thước trứng
<i>Chương 3. NUÔI CẤY HUYỀN PHÙ TẾ BÀO</i>		II - Noãn hoàng
I - Mở đầu	35	III - Cơ cấu tổ chức của trứng
II - Các phương pháp nuôi cấy	36	IV - Các màng trứng
III - Xác định tốc độ sinh trưởng	37	V - Các kiểu cơ quan tạo trứng
IV - Đặc điểm của nuôi cấy huyền phù tế bào	38	VI - Giai đoạn sinh sản các noãn nguyễn bào
<i>Chương 4. NUÔI CẤY BAO PHẤN VÀ HẠT PHẦN</i>		VII - Giai đoạn tăng trưởng noãn bào
I - Mở đầu	42	VIII - Sự thành thục noãn bào
II - Đặc điểm của nuôi cấy bao phấn và hạt phấn	43	IX - Quá trình phân tử trong thành thục noãn bào
III - Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tạo cây đơn bội	45	X - Sự rụng trứng
IV - Nhị bội hoá cây đơn bội	51	<i>Chương 10. TẾ BÀO GỐC SINH DỤC</i>
V - Ứng dụng của đơn bội	54	I - Tế bào sinh dục nguyên thuỷ ở động vật không xương sống
<i>Chương 5. NUÔI CẤY VÀ VÀ DUNG HỢP TẾ BÀO TRẦN</i>		II - Tế bào sinh dục nguyên thuỷ ở động vật có xương sống
I - Mở đầu	56	<i>Chương 11. CÔNG NGHỆ TẾ BÀO VÀ ĐỘNG VẬT CHUYỂN GEN</i>
II - Nuôi cây tế bào trần	56	I - Phương pháp chuyển gen ở chuột nhắt
III - Dung hợp tế bào trần và lai tế bào xoma	68	II - Ứng dụng của chuột chuyển gen
<i>Chương 6. CÔNG NGHỆ NUÔI CẤY PHÔI</i>		III - Nhân bản gia súc bằng cây chuyển nhân
I - Mở đầu	74	IV - Bò, cừu, dê và lợn chuyển gen
II - Nuôi cây phôi hữu tính	74	V - Gia cầm chuyển gen
III - Nuôi cây phôi vô tính	80	VI - Cá chuyển gen
		Tóm lược
		Tài liệu tham khảo

# P hần một

## CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT

### Chương 1

#### CẤU TRÚC VÀ CHỨC NĂNG CỦA TẾ BÀO THỰC VẬT

Động vật và thực vật đều được xây dựng trên nền tảng tế bào, đơn vị cấu trúc và chức năng cơ bản nhất của mọi cơ thể sống. Ở các sinh vật đơn bào (động vật nguyên sinh, vi khuẩn...), mỗi tế bào chính là một cơ thể. Các sinh vật đa bào được cấu tạo từ hàng triệu tế bào với cấu trúc và chức năng chuyên hóa tạo nên các mô và các cơ quan khác nhau. Các tế bào được phân biệt ở hai mức độ tổ chức : tế bào có nhân ở cấu trúc nguyên thuỷ gọi là prokaryota và tế bào eukaryota là dạng có nhân thật. Hầu hết các thực vật đều được cấu tạo từ các tế bào eukaryota.

Thuật ngữ “tế bào” bắt nguồn từ chữ Latin “cella”, có nghĩa là ô chứa nhỏ và được sử dụng lần đầu tiên bởi Robert Hooke (1665), một nhà thực vật học người Anh. Robert Hooke đã dùng thuật ngữ tế bào để mô tả những đơn vị riêng lẻ mà ông quan sát được ở mô bân thực vật (cork tissue) dưới kính hiển vi quang học đơn giản. Từ những kết quả nghiên cứu của Robert Hooke, lý thuyết về tế bào đã phát triển nhanh chóng. Purkynje (1837) phát hiện thấy tế bào không phải là trống rỗng mà chứa chất nhầy, Schleiden và Schwan (1839) đưa ra kết luận là các cơ thể động vật và thực vật đều do các tế bào hợp thành. Đầu thế kỷ XX, nhờ sự phát triển của kỹ thuật kính hiển vi điện tử, các nghiên cứu về tế bào đã phát triển mạnh và đạt được những kết quả to lớn.

#### I - CẤU TRÚC CỦA TẾ BÀO THỰC VẬT

Các tế bào thực vật ở các cơ thể khác nhau, hoặc ở các mô, cơ quan khác nhau của cùng một cơ thể sẽ không giống nhau về hình dạng, kích thước và cấu trúc, nhưng về cơ bản các tế bào đều gồm có một số đặc điểm chung. Hình dạng tế bào thực vật nằm trong cấu trúc mô thường là đa giác, ở các vùng sinh trưởng giàn của thân, rễ, các tế bào có dạng hình hộp dài.

Tế bào thực vật được chia làm 2 phần chính : thành tế bào (cell wall) và phần nguyên sinh chất bên trong (protoplasm, tế bào trân), đây là phần quyết định những đặc tính sống chủ yếu của tế bào thực vật. Tế bào trân bao gồm nhân, các cơ quan tử như ty thể, lạp thể, không bào, các cấu trúc siêu hiển vi đa dạng như bộ máy Golgi, mạng lưới nội chất... Nhờ kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*, các tế bào trân thực vật có thể tạo lại được thành tế bào và tái sinh thành cây hoàn chỉnh.

## 1.1. Thành tế bào

Thành tế bào là cấu trúc thiết yếu đối với nhiều quá trình sinh lý và phát triển của thực vật. Là lớp vỏ bao bọc, thành tế bào có vai trò như bộ khung xương quy định hình dạng của tế bào và tham gia tạo áp suất trương cần thiết cho sự phát triển của tế bào thực vật. Thành tế bào có mối liên quan mật thiết đến thể tích và áp suất của tế bào, do đó thành tế bào rất cần thiết đối với trao đổi nước bình thường ở thực vật. Sự tăng trưởng về kích thước của tế bào thực vật bị giới hạn bởi khả năng giãn của thành tế bào, vì vậy phát sinh hình thái ở thực vật phụ thuộc lớn vào các đặc tính của thành tế bào. Thành tế bào cũng giúp gắn kết các tế bào lại với nhau, ngăn chặn chúng trượt lên nhau.

Thành tế bào thực vật tham gia vào xác định độ dài cơ học của cấu trúc thực vật, cho phép chúng sinh trưởng đến một độ cao khá lớn. Ngoài ra, sự chắc chắn về cơ học của thành tế bào còn giúp cho chúng khỏi bị sụp đổ khi áp lực âm xuất hiện bởi áp suất dòng chảy của nước trong xylem.

Nhiều cacbon được đồng hóa trong quang hợp tham gia tạo polisaccharit trong thành tế bào. Trong những pha phát triển đặc biệt, các polime này có thể bị thuỷ phân thành những sản phẩm đường, được tế bào sử dụng cho tạo những polime mới. Hiện tượng này đáng chú ý nhất ở nhiều loại hạt mà các polisaccharit của thành tế bào nội nhũ hoặc lá mầm có chức năng chính như nguồn thức ăn dự trữ. Hơn nữa, các hợp phần oligosaccharit của thành tế bào có vai trò như những phần tử tín hiệu quan trọng trong biệt hoá tế bào, trong nhận biết triệu chứng và tác nhân gây bệnh. Mặc dù cho các phân tử nhỏ thẩm qua, nhưng thành tế bào hoạt động như rào cản thẩm thấu, giới hạn kích thước của các đại phân tử có thể tiếp cận màng sinh chất từ bên ngoài, đồng thời cũng ngăn cản sự xâm nhập của tác nhân gây bệnh.

Sự đa dạng về chức năng của thành tế bào bắt nguồn từ sự đa dạng và phức tạp trong cấu trúc của chúng. Các nghiên cứu về tiêu bản mô thực vật cho thấy thành tế bào không phải là đồng nhất, mà thay đổi lớn về thành phần ở những kiểu tế bào khác nhau. Các tế bào mô mềm vỏ có thành mỏng và có một số đặc điểm rõ rệt. Một số tế bào chuyên hóa, như tế bào biểu bì, tế bào mô dày, sợi phloem, yếu tố mạch xylem và những dạng khác của mô cứng có thành dày và gồm nhiều lớp. Những thành này được chạm trổ phức tạp và thẩm đầy các chất đặc biệt như linhin, cutin, silic dioxit, hoặc protein cấu trúc. Thành tế bào có thể thay đổi về độ dày ở những vị trí khác nhau, thẩm các chất, thường chứa các lỗ và sợi liên bào. Ở tế bào biểu bì, thành ngoài thường dày hơn thành trong, hơn nữa loại thành này thiếu sợi liên bào và bị thẩm đầy cutin và sáp. Trong các tế bào bảo vệ, phần thành tế bào tiếp giáp với khí không là dày hơn thành tế bào ở những vị trí khác. Những thay đổi như vậy trong cấu trúc của thành tế bào phản ánh tính phân cực và chức năng chuyên hóa của tế bào.

Mặc dù có sự đa dạng trong hình thái của thành tế bào, nhìn chung các thành tế bào được phân loại thành hai nhóm chính : thành sơ cấp và thành thứ cấp. Thành sơ cấp

được hình thành bởi các tế bào đang tăng trưởng và thường được coi là tương đối chưa biệt hóa và tương tự về cấu trúc phân tử ở tất cả các kiểu cấu trúc tế bào. Tuy nhiên, siêu cấu trúc của thành sơ cấp cũng cho thấy có những thay đổi lớn. Ở tế bào mô mềm vảy hành, thành sơ cấp rất mỏng ( $\approx 100\text{nm}$ ) và có cấu trúc đơn giản. Những thành sơ cấp khác như ở tế bào mô cứng và tế bào biểu bì có thể khá dày và gồm nhiều lớp.

Thành thứ cấp được hình thành sau khi tế bào đã ngừng tăng trưởng, có mức độ chuyên hóa cao cả về thành phần và cấu trúc, phản ánh trạng thái biệt hóa của tế bào. Các tế bào xylem có thành thứ cấp rất dày, được cố bởi linhin làm cho tế bào trở lên rất cứng và chắc. Xuyên qua thành tế bào có nhiều ống nhỏ được gọi là sợi liên bào, chúng có vai trò như cầu nối giữa các tế bào, cho phép vận chuyển thụ động các phân tử nhỏ và vận chuyển tích cực các phân tử protein và axit nucleic qua lại giữa các tế bào lân cận.

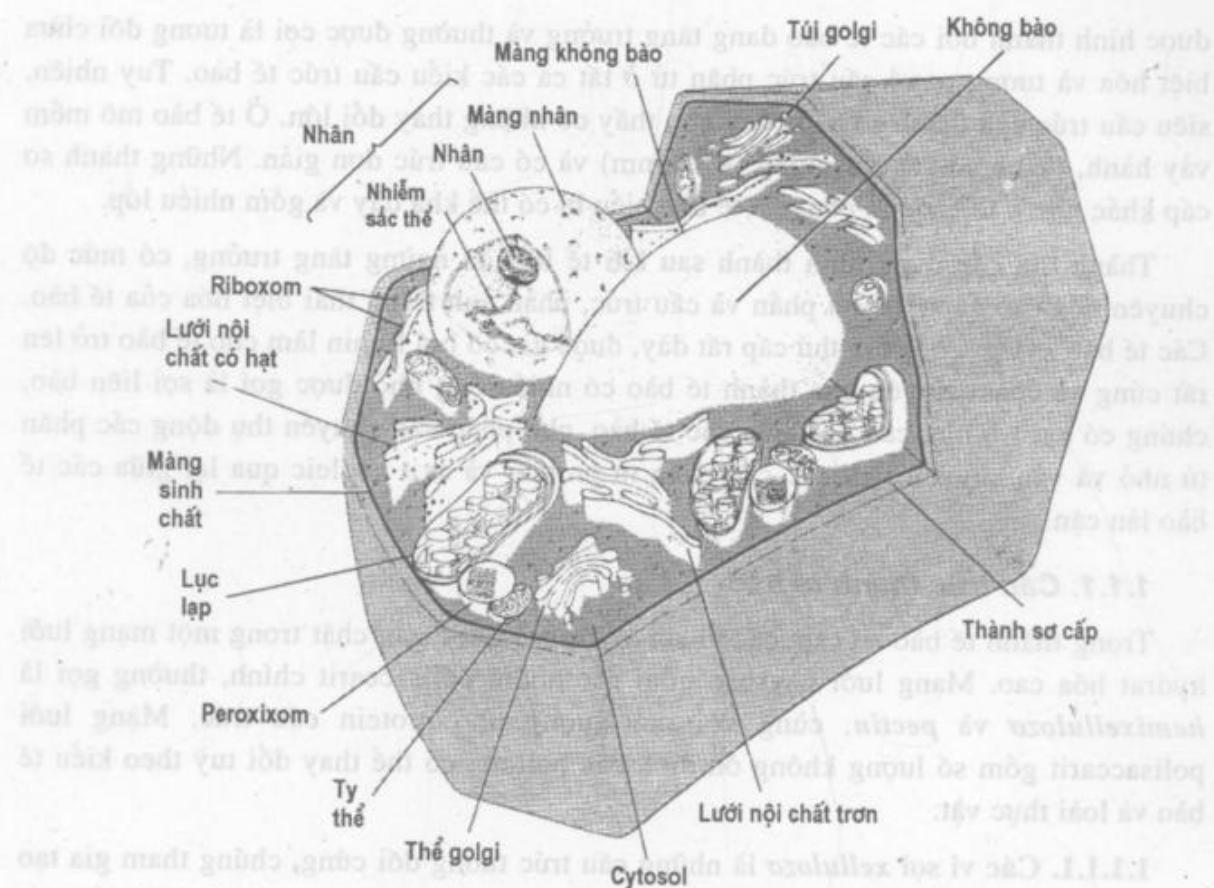
### 1.1.1. Cấu trúc thành tế bào

Trong thành tế bào sơ cấp, các vi sợi *xellulozơ* được gắn chặt trong một mạng lưới hydrat hóa cao. Mạng lưới này bao gồm các nhóm polisaccarit chính, thường gọi là *hemixellulozơ* và *pectin*, cùng với một lượng nhỏ protein cấu trúc. Mạng lưới polisaccarit gồm số lượng không ổn định các polime, có thể thay đổi tùy theo kiểu tế bào và loài thực vật.

1.1.1.1. Các vi sợi *xellulozơ* là những cấu trúc tương đối cứng, chúng tham gia tạo khung xương của thành tế bào. Các chuỗi polisaccarit tạo nên vi sợi xellulozơ sắp xếp gần nhau và gắn kết với nhau để hình thành những cấu trúc tương đối bền vững trước các hoạt tính của enzym. Bởi vậy, xellulozơ rất ổn định và thường chỉ bị phá vỡ tại những thời điểm đặc biệt trong quá trình phát triển như ở giai đoạn lão hóa của tế bào. Chuỗi polisaccarit là những mạch thẳng, được tạo thành từ các đơn phân D-glucozơ theo liên kết  $\beta(1 \rightarrow 4)$  glucozit.

Các vi sợi xellulozơ thường khó xác định về độ dài và thay đổi đáng kể về bề rộng tùy thuộc vào nguồn gốc của chúng. Dưới kính hiển vi điện tử, các vi sợi xellulozơ của thực vật trên cạn có bề rộng từ 4-10nm, trong khi những vi sợi của tảo có bề rộng tới 30nm. Sự khác nhau này liên quan đến số lượng các chuỗi polisaccarit tham gia hình thành vi sợi xellulozơ, những vi sợi mỏng có từ 20-40 chuỗi.

Các nghiên cứu dưới kính hiển vi điện tử đã cho thấy những vi sợi xellulozơ được tổng hợp bởi các phức hệ protein lớn gắn trên màng sinh chất. Những cấu trúc này có chứa rất nhiều đơn vị xellulozơ syntaza, loại enzym tổng hợp liên kết  $(1 \rightarrow 4)\beta$ -D-glucan để tạo nên vi sợi xellulozơ. Những bằng chứng nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng glucozơ được sử dụng cho tổng hợp xellulozơ có thể là từ saccarozơ (Amor et al, 1995). Sau khi được tổng hợp, các vi sợi xellulozơ được chuyển ra thành tế bào, tại đây chúng có thể tương tác với các polisaccarit khác và tạo nên các cấu trúc của thành tế bào.



Hình 1.1. Sơ đồ cấu trúc chung của một tế bào thực vật.

**1.1.1.2. Hemixellulozơ** là những polisaccharit mềm dẻo, bám trên bề mặt các vi sợi xellulozơ. Chúng tạo ra những dây xích ngang liên kết các vi sợi xellulozơ với nhau tạo thành mạng lưới kết dính.

Hemixellulozơ là nhóm polisaccharit không đồng nhất, liên kết rất chặt trong thành tế bào. Có một số loại hemixellulozơ thường được tìm thấy trong thành tế bào, tuy nhiên các tế bào lấy từ những loại mò hoặc từ những loài khác nhau sẽ có những thay đổi trong thành phần hemixellulozơ của chúng.

Ở thành sơ cấp của thực vật hai lá mầm, loại hemixellulozơ xuất hiện nhiều nhất là xyloglucan. Loại polisaccharit này có trực chính hình thành từ liên kết 1-4 giữa các phân tử  $\beta$ -D-glucosoz, giống như ở xellulozơ. Khác với xellulozơ, hemixellulozơ có những chuỗi bên ngắn có chứa xylozoz, galactozoz và thường có fucozoz nằm ở cuối chuỗi. Sự có mặt của L-fucozoz ở đầu mút của chuỗi bên sẽ làm tăng tính vững chắc của trực chính xyloglucan.

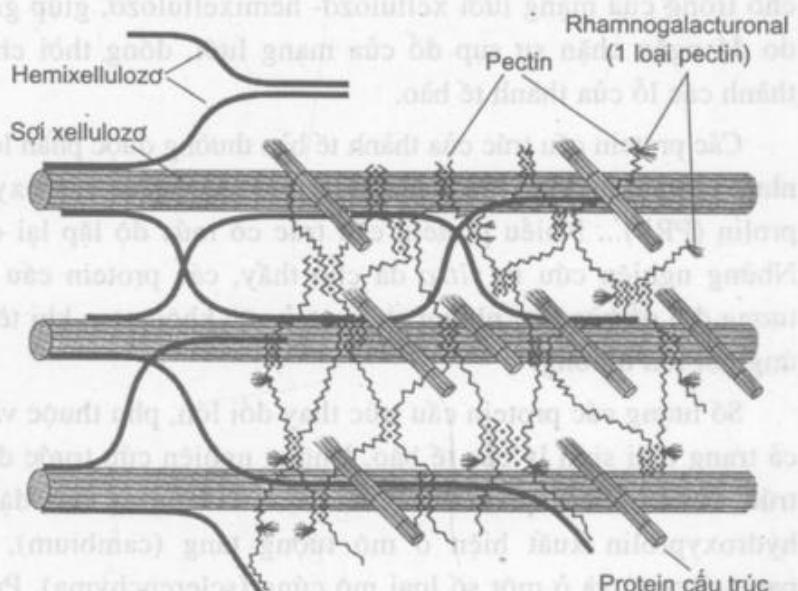
Tùy thuộc vào giai đoạn phát triển và loài thực vật, thành phần của hemixellulozơ ở thành tế bào cũng chứa những polisaccharit quan trọng khác như xylan (bao gồm các xylan rẽ nhánh như arabinoxylan và glucuronoxylan) và glucomanan. Các thành thứ cấp thường chứa ít xyloglucan nhưng chứa nhiều xylan và glucomanan.

Thành tế bào của các loài thuộc họ cỏ (những thực vật mọc một lá mầm như lúa, yến mạch, ngô...) có chứa một số xyloglucan. Các polime khác có nhiều hơn trong phần hemixellulozơ của họ cỏ, đặc biệt là phức hợp ( $1 \rightarrow 3$ ,  $1 \rightarrow 4$ )  $\beta$ -D-glucan và arabinoxylan, trong đó có trục chính ( $1 \rightarrow 4$ )  $\beta$ -D-xylan với những chuỗi bên ngắn của arabinozơ và axit glucuronic. Những hemixellulozơ này có vai trò tương tự như xyloglucan ở thực vật hai lá mầm.

**1.1.1.3.** Giống như hemixellulozơ, *pectin* tạo thành một nhóm các polisaccarit không đồng nhất, điểm đặc trưng của chúng là có chứa đường axit (axit galacturonic) và đường trung tính (ramnozơ, galactozơ và arabinozơ). Pectin là thành phần polisaccarit dễ hòa tan nhất của thành tế bào, chúng có thể được chiết rút bằng nước nóng hoặc bằng selat canxi.

Một số pectin có cấu trúc tương đối đơn giản như homogalacturonan, là polime dạng mạch thẳng tạo thành từ các đơn phân axit D-galacturonic theo liên kết ( $1 \rightarrow 4$ ) $\alpha$ , với một vài gốc rhamnosyl tạo nên các nút thắt trong chuỗi. Loại pectin phong phú nhất là rhamnogalacturonan I, pectin này có trục chính dài và thay đổi về các chuỗi bên. Trục chính chứa các đường kép, được tạo ra từ ramnozơ và axit galacturonic, trong khi các chuỗi bên là arabinan, galactan, arabinogalactan và có thể cả homogalacturonan. Rhamnogalacturonan II là pectin rất phức tạp, nó chứa ít nhất 10 đường khác nhau trong kiểu liên kết phức hợp. Sự phức tạp trong cấu trúc của rhamnogalacturonan II cho thấy có lẽ nó giữ vai trò trong tiếp nhận tín hiệu của thành tế bào.

Pectin hình thành các dạng gel hydrat hoá, trong đó các nhóm cacboxyl ( $\text{COO}^-$ ) của những phân tử pectin liền kề liên kết với nhau qua ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Ngoài ra, pectin cũng có thể liên kết với nhau bằng những liên kết cộng hóa trị như liên kết este. Pectin có thể thay đổi về hình dạng và liên kết của chúng trong thành tế bào. Nhiều gốc axit este hóa với methyl, axetyl và các nhóm không xác định khác trong quá trình sinh tổng hợp ở bộ máy Golgi. Sự este hóa như vậy sẽ ngăn chặn hình thành cầu canxi giữa các phân tử pectin và bởi vậy làm giảm đặc tính tạo gel của pectin. Các pectin lấp đầy vào những



Hình 1.2. Các thành phần cấu trúc căn bản của thành tế bào sơ cấp và sự sắp xếp của chúng

chỗ trống của mạng lưới xellulozơ- hemixellulozơ, giúp gia tăng mức độ chắc chắn và do đó ngăn chặn sự sụp đổ của mạng lưới, đồng thời chúng còn tham gia vào hình thành các lỗ của thành tế bào.

Các protein cấu trúc của thành tế bào thường được phân loại theo thành phần aminoaxit như : protein giàu glyxin (GRP), glycoprotein giàu hydroxyprolin (HRGP), protein giàu prolin (PRP)... Nhiều protein cấu trúc có mức độ lặp lại cao của các cấu trúc sơ cấp. Những nghiên cứu *in vitro* đã cho thấy, các protein cấu trúc mới được tạo thành là tương đối dễ hòa tan, nhưng chúng trở nên không tan khi tế bào trưởng thành hoặc phản ứng với tổn thương.

Số lượng các protein cấu trúc thay đổi lớn, phụ thuộc vào kiểu tế bào, tuổi tế bào và cả trạng thái sinh lý của tế bào. Những nghiên cứu trước đây cho thấy, các protein cấu trúc thường liên quan đến các kiểu tế bào và mô đặc trưng. Glycoprotein giàu hydroxyprolin xuất hiện ở mô tượng tầng (cambium), mô mềm phloem (phloem parenchyma) và ở một số loại mô cứng (sclerenchyma). Protein giàu glyxin và protein giàu prolin thường có ở các sợi và quản bào xylem, đó là đặc tính của thành tế bào đã biệt hóa.

Ngoài những lớp protein cấu trúc nói trên, thành tế bào còn chứa arabinogalactan protein (AGPs). AGPs là loại protein tan trong nước, trong thành phần có chứa tới hơn 90% các gốc đường, chủ yếu là galactozơ và arabinozơ. Nhiều dạng AGP đã được tìm thấy trong các mô thực vật, liên kết với thành tế bào hoặc với màng sinh chất. AGP chiếm khoảng 1% khối lượng khô của thành tế bào và giữ vai trò quan trọng liên kết các tế bào với nhau, đồng thời tham gia chuyển tín hiệu trong biệt hóa tế bào. Thực nghiệm ở các huyền phù tế bào nuôi cấy khi được xử lý với AGP hoặc với những tác nhân có gắn AGP, đã phân chia, tăng sinh và tạo phôi.

### **1.1.2. Phân loại thành tế bào**

Mặc dù có sự đa dạng về hình thái và kích thước nhưng theo trình tự phát triển, theo cấu trúc và những chức năng, thành tế bào có thể được phân chia làm hai loại : thành sơ cấp và thành thứ cấp.

#### **1.1.2.1. Thành sơ cấp**

Thành sơ cấp có ở tất cả các loại tế bào và thường khá mỏng, có thành phần cấu tạo tương tự nhau ở nhiều loại tế bào thực vật. Đây là đặc điểm chung của các tế bào thực vật còn non và đang trong giai đoạn tăng trưởng. Thành tế bào sơ cấp điển hình có chứa khoảng 25% xellulozơ, 25% hemixellulozơ, 35% pectin và từ 1 đến 8% protein cấu trúc, tính theo khối lượng khô. Tuy nhiên, tỷ lệ trên có thể thay đổi lớn và đã được tìm thấy ở một số loài thực vật. Thành sơ cấp của tế bào bao lá mầm ở họ cỏ có chứa từ 20-25% xellulozơ, 60-70% hemixellulozơ và chỉ có khoảng 10% pectin. Thành sơ cấp của tế bào nội nhũ cây ngũ cốc chứa rất nhiều hemixellulozơ, đến 85%.

Thành sơ cấp cũng chứa rất nhiều nước và lượng nước này được tích trữ chủ yếu trong mạng lưới, chiếm từ 75-80%. Trạng thái hydrat hóa của mạng lưới là yếu tố quan trọng về đặc tính vật lý của thành tế bào. Nếu bị loại bỏ nước, thành tế bào sẽ trở lên cứng và khó giãn nở. Đặc điểm này có thể liên quan đến ức chế sinh trưởng do sự thiếu nước gây ra.

#### 1.1.2.2. Thành thứ cấp

Thành thứ cấp điển hình có chứa thành phần cellulose cao hơn so với thành sơ cấp. Tỷ lệ các hợp phần của mạng lưới và protein cấu trúc trên thành thứ cấp có sự thay đổi lớn giữa các kiểu tế bào và giữa các loài thực vật. Thành thứ cấp được phân chia làm hai loại chính :

- Thành thứ cấp hóa gỗ (hóa linhin) : Loại thành thứ cấp này rất dày, cứng và chắc do thẩm đầy các hợp chất thuộc nhóm linhin. Sự hóa linhin của thành thứ cấp làm cho tế bào, mô có sức bền cơ học cao, đó là cơ sở tạo ra các mô gỗ của cây, làm cho cây có thể sinh trưởng và phát triển mạnh về chiều cao.

- Thành thứ cấp hóa bần (hóa liege) là loại thành có chứa hỗn hợp nhiều chất mang đặc tính giống như mỡ, không thẩm nước gọi là suberin. Do nước không thể đi qua tầng suberin, nên những tế bào có thành thứ cấp hóa bần đều là những tế bào chết, phần chất nguyên sinh đã bị phân huỷ, chỉ còn lại là tế bào rỗng với thành tế bào rất dày, đó là những tế bào bần có trong tầng chu bì của vỏ thân cây.

### 1.2. Không bào

Không bào là một khoang lớn nằm ở trung tâm chất nguyên sinh của tế bào thực vật (hình 1.1). Những tế bào thực vật trưởng thành thường có một không bào lớn chứa đầy nước và chiếm từ 80 -90% tổng thể tích của tế bào. Không bào được bao bọc trong một màng gọi là màng không bào (tonoplast). Trong các tế bào của mô phân sinh, không bào có thể tích rất nhỏ gọi là tiền không bào (provacuole), chúng được tạo ra bởi mạng lưới Golgi và thể tích chung của chúng chỉ chiếm vài phần trăm thể tích tế bào. Trong quá trình sinh trưởng của tế bào, các tiền không bào lớn dần và dung hợp với nhau tạo thành không bào trung tâm lớn, là điểm đặc trưng của hầu hết các tế bào thực vật trưởng thành. Ở những tế bào này, phần chất nguyên sinh bị dồn ép, tạo thành những lớp mỏng bao quanh không bào.

Trong không bào có chứa nước, các muối vô cơ, muối hữu cơ, đường, các enzym và nhiều chất trao đổi thứ cấp, những chất này thường giữ vai trò chống chịu ở thực vật. Do tích luỹ nhiều chất có tính thẩm thấu, các không bào đã tạo ra lực thẩm thấu đối với nước mà rất cần thiết cho sự tăng trưởng của tế bào thực vật. Áp suất thẩm thấu phát sinh bởi hấp thụ nước đã làm cho cấu trúc của tế bào và mô trong thân các thực vật thân thảo có đủ độ cứng cần thiết, giúp cây có thể đứng thẳng được khi mà chúng thiếu các cấu trúc linhin như của các tế bào thực vật thân gỗ. Không bào cũng rất giàu các

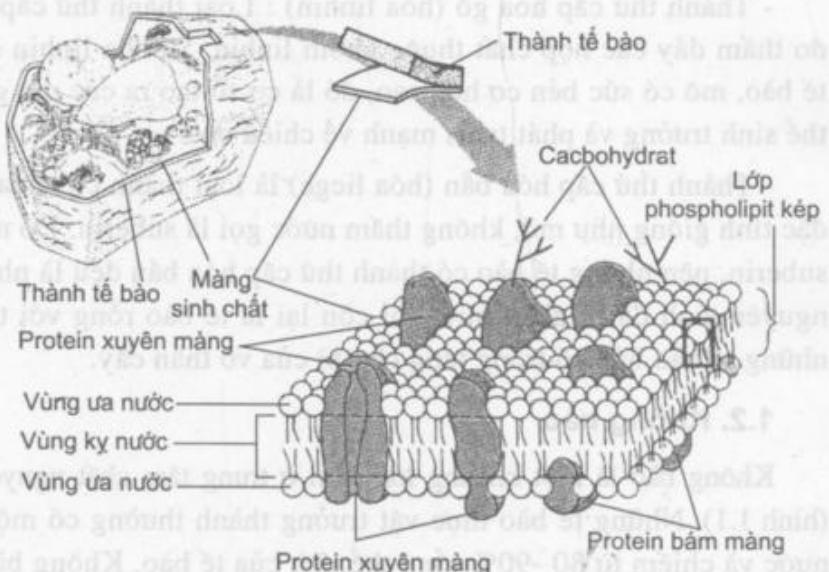
enzym thuỷ phân, bao gồm proteaza, ribonucleaza và glycosidaza, những enzym này sẽ được giải phóng ra tế bào chất trong quá trình lão hóa, tham gia vào sự thoái hóa của tế bào. Trong không bào còn có các protein đặc biệt, gọi là thể protein (protein bodies), rất phong phú trong các loại hạt. Khi hạt này mầm, các protein có trong thể protein sẽ bị thuỷ phân thành các aminoaxit và được chuyển ra tế bào chất dùng cho sinh tổng hợp protein mới.

### 1.3. Màng sinh chất

Ranh giới giữa thành tế bào với chất nguyên sinh cũng như giữa chất nguyên sinh với không bào được hình thành bởi các màng. Loại màng bao bọc phần chất nguyên sinh tách khỏi thành tế bào là màng sinh chất (plasma membrane, plasmalemma). Các cơ quan tử của tế bào như nhân, lạp thể, ty thể, không bào... đều được bao bọc bởi các màng riêng của chúng và có đặc tính rất khác nhau. Trong chất nguyên sinh còn có hệ thống các ống được hình thành từ các màng gọi là mạng lưới nội chất.

Màng sinh chất ngăn cách chất nguyên sinh với môi trường xung quanh nhưng cũng cho phép chất nguyên sinh có thể hấp thụ các chất dinh dưỡng hay đào thải các chất khác ra khỏi tế bào. Các protein vận chuyển gắn trên màng sinh chất có nhiệm vụ vận chuyển chọn lọc các chất đi qua màng. Sự hấp thụ các ion hoặc các phân tử khác vào tế bào chất qua các protein vận chuyển tích cực đòi hỏi phải tiêu tốn năng lượng. Màng sinh chất cũng giống như tổ chức cơ bản của các màng sinh học khác, gồm một lớp phospholipit kép, trong đó có các phân tử protein bám và gắn vào màng.

Phân tử phospholipit có chứa hai axit béo liên kết cộng hóa trị với glycerol qua hai gốc phosphat và tạo thành phần đuôi của nó. Một gốc phosphat khác cũng liên kết cộng hóa trị với glycerol đồng thời liên kết cộng hóa trị với các phân tử khác như serin, cholin hoặc inositol, tạo thành phần đầu của phân tử phospholipit. Đối lập với nhóm các axit béo có tính kỵ nước, phần đầu của phân tử phospholipit có tính phân cực cao.



Hình 1.3. Sơ đồ cấu tạo của một màng sinh chất  
diễn hình

Như vậy mỗi phân tử phospholipit mang cả hai đặc tính kỵ nước và không kỵ nước. Chuỗi hydrocacbon không phân cực của các axit béo hình thành nên vùng kỵ nước.

Khác với cấu tạo của màng sinh chất, thành phần lipit của màng lục lạp chủ yếu là glycoxylglycerit. Trong phân tử glycoxylglycerit, phân dầu phân cực gồm có galactozơ, digalactozơ, hoặc sulphat galactozơ (đường galactozơ có gốc muối sulphat), nhưng không có nhóm phosphat. Glycoxylglycerit có ba loại : monogalactoxyldiaxylglycerol (MGDG), digalactoxyldiaxylglycerol (DGDG) và sulfoquinovoxylidiaxylglycerol (SQDG). Theo Harwood (1997), hai loại galactolipit là MGDG và DGDG không tích điện nhưng phân cực, còn SQDG thì tích điện âm và phân cực.

Các chuỗi axit béo của phospholipit và glycoxylglycerit khá biến động về độ dài nhưng chúng thường nằm trong phạm vi từ 14 đến 24 cacbon. Một chuỗi axit béo bao hoà điển hình, còn chuỗi kia sẽ chứa một hoặc nhiều nối đôi (chưa bão hòa). Sự có mặt của các nối đôi đã tạo ra chỗ xoắn trong cấu trúc chuỗi axit béo, giúp ngăn chặn hiện tượng bao gói chặt các phân tử phospholipit trong lớp phospholipit kép, nhờ đó làm tăng tính linh động của màng. Đặc tính này có vai trò quan trọng trong nhiều chức năng của màng sinh chất và nó bị ảnh hưởng mạnh bởi nhiệt độ. Các cơ thể thực vật thường phải duy trì tính linh động của màng, đặc biệt trong điều kiện nhiệt độ thấp, vì ở nhiệt độ này đặc tính đó có xu hướng giảm. Vì vậy lớp phospholipit kép ở thực vật chứa tỷ lệ cao các axit béo chưa bão hòa như axit oleic (có một nối đôi), axit linoleic (có hai nối đôi) và axit α-linoleic (có ba nối đôi).

Các protein liên kết với lớp lipit kép được chia làm hai loại : protein xuyên màng và protein bám màng. Protein xuyên màng được gắn sâu vào trong lớp lipit kép và hầu hết chúng trải rộng cả độ dày của lớp phospholipit kép. Một phần của những protein này nhô phia ngoài tế bào, một phần khác tương tác với lối kỵ nước của màng, và phần còn lại tiếp xúc với tế bào chất của tế bào. Các protein bám màng gắn lên bề mặt của màng nhờ những liên kết không cộng hóa trị như liên kết ion hoặc liên kết hydro. Chúng có một số vai trò trong chức năng sinh học của màng. Một số liên quan đến tương tác giữa màng sinh chất với các thành phần khung xương của tế bào như với các vi ống và vi sợi.

## II - SINH TRƯỞNG VÀ PHÂN HÓA CỦA TẾ BÀO THỰC VẬT

Sinh trưởng và phát triển của cơ thể thực vật cũng như của các cơ quan, mô là kết quả sinh trưởng và phát triển của mỗi tế bào. Các tế bào thực vật được hình thành trong những cấu trúc mô chuyên hóa thường có ở chồi đỉnh, chồi bên, đầu rễ... gọi là mô phân sinh (meristem). Sau đó các tế bào tăng dần về kích thước, thể tích, sinh tổng hợp các cấu trúc mới trong các vùng giãn và cuộn cùng chúng được phân hóa thành các tế bào của những mô chức năng khác nhau. Sự phân hóa này liên quan chặt chẽ đến những thay đổi về cấu trúc của tế bào, đặc trưng riêng cho từng loại mô và cơ quan.

Mỗi tế bào thực vật ở trạng thái trưởng thành đều đã trải qua 3 giai đoạn :

- Giai đoạn phân bào (giai đoạn phôi sinh).
- Giai đoạn giãn (giai đoạn tăng sinh).
- Giai đoạn phân hóa (giai đoạn biệt hóa).

## 2.1. Giai đoạn phân bào

Giai đoạn phân bào của tế bào thực vật bao gồm một chu trình gọi là chu trình phân bào, nhờ đó tế bào thực vật tạo ra được vật liệu di truyền phục vụ cho tái sinh của bản thân chúng.

- Chu trình phân bào gồm có 4 pha : G1, S, G2 và M .

Pha G1 : ADN đuôi xoắn chuẩn bị cho sao chép.

Pha S : Xảy ra tổng hợp ADN (nhân đôi hay sao chép ADN).

Pha G2 : Chuẩn bị cho phân bào.

Pha M : Gồm có hai bước kế tiếp là phân chia nhân và phân chia tế bào chất. Sau khi phân chia nhân thì một màng mỏng bằng polisaccarit (do bộ máy Golgi tổng hợp) xuất hiện ở giữa tế bào và tiến về hai phía của thành tế bào, chia đôi tế bào mẹ thành hai tế bào con, đây là điểm khác biệt so với phân bào ở tế bào động vật.

- Tế bào thực vật ở giai đoạn này có đặc điểm :

- + Tế bào nhỏ, có kích thước xấp xỉ nhau.
- + Thành tế bào mỏng.
- + Chất nguyên sinh đậm đặc và nhân khá to.
- + Chưa xuất hiện khôn bào.

- Sau khi phân chia, một số tế bào con sẽ lớn dần lên về kích thước và thể tích và khi đạt thể tích gấp đôi, chúng lại tiến hành phân chia. Một số tế bào khác thì rời bỏ chu trình phân bào, chúng cũng tăng trưởng về kích thước và tiếp theo chuyển sang phân hóa về chức năng.

- Để thúc đẩy phân bào, cần có sự tham gia của một số chất :

+ Các enzym protein kinaza, đó là những protein được phosphoryl hóa nhờ sử dụng ATP. Các protein này thể hiện hoạt tính trong các pha khác nhau của chu trình phân bào. Chúng giúp chuyển các pha từ G1 sang S, từ S sang G2 và G2 sang M. Nếu ức chế các protein kinaza thì quá trình phân bào không thực hiện được.

+ Các chất điều hòa sinh trưởng, đặc biệt là những chất thuộc nhóm auxin, cytokinin. Ngoài ra còn cần đến các điều kiện ngoại cảnh thuận lợi về nhiệt độ, nước, nguồn chất dinh dưỡng...

## 2.2. Giai đoạn giãn

Đặc trưng của giai đoạn giãn là tế bào tăng rất nhanh về thể tích. Đầu tiên trong tế bào xuất hiện rất nhiều khôn bào nhỏ gọi là tiền khôn bào. Các tiền khôn bào cũng do bộ máy Golgi tổng hợp.

Trong quá trình sinh trưởng giàn, tiền không bào dung hợp với nhau tạo ra không bào lớn hơn và cuối cùng là một không bào trung tâm duy nhất, đánh dấu sự kết thúc của giai đoạn giàn. Không bào trung tâm này chiếm thể tích rất lớn trong tế bào, vì vậy nó đẩy các thành phần khác ra sát màng sinh chất và thành tế bào. Trong không bào trung tâm có chứa nhiều chất tan, nước, muối khoáng và các sản phẩm của quá trình trao đổi chất... hình thành áp suất thẩm thấu lớn, giúp tế bào hút nước, làm tăng sức trương trong quá trình sinh trưởng.

Sự tăng thể tích của tế bào trong giai đoạn giàn là kết quả của hai hiện tượng : giàn thành tế bào và tăng thể tích của không bào, của chất nguyên sinh, gắn liền với sinh tổng hợp các vật liệu mới cần thiết cho xây dựng thành tế bào và chất nguyên sinh.

Nhiều nghiên cứu cho thấy, quá trình giàn cần có sự tham gia của các chất điều hoà sinh trưởng, đặc biệt là các auxin vì chúng đã hoạt hóa các enzym của thành tế bào, như các enzym thuỷ phân hemixellulaza, pectinaza... cắt đứt các cầu nối giữa các vi sợi xellulozơ, làm cho chúng có thể trượt lên nhau và nhờ đó tế bào có thể giàn được. Cùng với quá trình giàn của tế bào, cần có quá trình tổng hợp các vật liệu mới để bù đắp vào các vị trí giàn của thành tế bào và các thành phần khác của chất nguyên sinh. Vì vậy trong giai đoạn giàn của tế bào thực vật phải có đủ nguồn chất dinh dưỡng làm nguyên liệu cho các quá trình sinh tổng hợp...

### 2.3. Giai đoạn phân hóa

Để chuyển sang giai đoạn phân hóa, các tế bào thực vật phải hoàn thành giai đoạn giàn, nghĩa là đã kết thúc sự tăng trưởng về kích thước. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy bản chất của phân hóa theo nhiều hướng khác nhau là do sự hoạt hóa các gen chức năng mà trước đây ở giai đoạn phôi sinh chúng không hoạt động. Các gen này sẽ chịu trách nhiệm tổng hợp các enzym, protein, polysaccharit... cần thiết cho sự phân hóa theo một hướng nào đó. Mỗi hướng phân hóa sẽ có những gen khác nhau hoạt động. Ngược lại, một số gen hoạt động ở giai đoạn giàn sẽ bị ức chế hay ngừng hoạt động. Như vậy, bản chất của phân hóa tế bào là hoạt hóa các gen chức năng nhất định có trong tế bào.

Ở cây *Arabidopsis thaliana*, sự phân hóa tế bào thành yếu tố mạch của hệ thống dẫn truyền xylem đã được Baima và cộng sự nghiên cứu kỹ (1996). Những tác giả này đã phát hiện thấy một trong những gen tham gia vào biệt hóa thành tế bào sang thành tế bào hóa linh là gen ATHB-8. Như vậy sự phân hóa tế bào thực vật đã được chương trình hóa trước ở vật liệu di truyền, chương trình có thể bị thay đổi do các nhân tố hữu sinh và môi trường.

## III - SỰ TRAO ĐỔI NƯỚC CỦA TẾ BÀO

### 3.1. Tế bào là một hệ thẩm thấu và khuếch tán

Phân tử của các loại vật chất đều có những động năng nhất định và chúng không ngừng vận động, từ nơi có nồng độ cao hơn đến nơi có nồng độ thấp hơn cho đến khi

đạt trạng thái cân bằng động trong hệ thống, đó là hiện tượng khuếch tán. Tốc độ khuếch tán của các phân tử tỷ lệ thuận với sự chênh lệch về nồng độ trên một đơn vị khoảng cách gọi là gradient. Tốc độ cũng tỷ lệ với nhiệt độ nhưng tỷ lệ nghịch với kích thước của phân tử và độ nhớt của môi trường. Cũng giống như sự khuếch tán của các chất khác, các phân tử nước luôn luôn dịch chuyển đến nơi có thể hóa học thấp hơn. Khi trong hệ thống có một dung dịch loãng hơn, nước sẽ di từ dung dịch này đến dung dịch có nồng độ chất tan cao hơn cho đến khi đạt tới cân bằng động của hệ thống. Nếu giữa hai dung dịch có nồng độ khác nhau được ngăn cách bởi một màng bán thấm (là màng chỉ cho dung môi đi qua), nước sẽ di chuyển từ nơi có nồng độ chất tan thấp hơn sang nơi có nồng độ chất tan cao hơn, đó là hiện tượng thẩm thấu. Áp lực gây ra sự di chuyển của nước (dung môi) đi qua màng gọi là áp suất thẩm thấu. Như vậy áp suất thẩm thấu của một dung dịch sẽ tỷ lệ với nhiệt độ và hàm lượng chất tan có trong dung dịch.

Trong tế bào thực vật, màng sinh chất chính là một màng bán thấm, do đó tế bào thực vật chính là một hệ thẩm thấu kín. Khi trao đổi nước, thể tích của tế bào có thể thay đổi dẫn đến sự xâm nhập của nước không chỉ phụ thuộc vào áp suất thẩm thấu mà còn phụ thuộc vào sự trương của thành tế bào. Khi áp suất thẩm thấu của dịch tế bào lớn hơn áp suất thẩm thấu của dung dịch bên ngoài tế bào, nước sẽ xâm nhập vào tế bào và ngược lại. Dung dịch trong tế bào được gọi là dung dịch ưu trương, còn dung dịch bên ngoài là dung dịch nhược trương. Nếu ở bên ngoài tế bào là dung dịch ưu trương, nước sẽ di ra khỏi tế bào, khỏi nguyên sinh chất giảm thể tích và gây ra hiện tượng co nguyên sinh, hiện tượng này có tính thuận nghịch ở tế bào thực vật. Sự thẩm thấu chỉ xảy ra khi tế bào còn sống, khi tế bào chết thì màng sinh chất và các thành phần khác của chất nguyên sinh bị phá huỷ, tế bào không còn là một hệ thẩm thấu nữa. Tuy nhiên màng sinh chất không phải là màng bán thấm đơn thuần, nó là màng sinh học có tính chọn lọc rất cao các vật chất cần thiết cho hoạt động sống của tế bào.

### **3.2. Sự hút nước vào tế bào**

Sự hút nước của tế bào phụ thuộc vào áp lực đưa nước vào tế bào (áp suất thẩm thấu) và còn phụ thuộc vào áp lực đẩy nước ra. Lực đẩy nước ra phát sinh sau khi tế bào hấp thụ nước và đạt đến thể tích bình thường. Lúc này nước trong tế bào sẽ hình thành một áp lực thuỷ tĩnh tác động vào thành tế bào, làm cho nó căng ra và được gọi là áp suất trương nước. Thành tế bào cũng sinh ra một lực chống lại sự giãn nở này để duy trì thể tích của tế bào và gọi là sức căng trương nước, và khi hai lực này bằng nhau thì sự thẩm thấu dừng lại. Tế bào ở trạng thái bão hòa nước sẽ có thể tích cực đại và khi đó sức căng trương nước cũng đạt giá trị lớn nhất và bằng với áp suất trương nước. Tế bào ở trạng thái bình thường luôn luôn duy trì sức hút nước và trong trường hợp này sức căng trương nước sẽ nhỏ hơn áp suất trương nước.

Như vậy hiệu số giữa áp suất thẩm thấu (P) với áp lực trương của thành tế bào (T) được gọi là sức hút nước của tế bào (S) :

$$S = P - T$$

Trong thực tế, cây rất ít khi ở trạng thái bão hòa nước, do chúng luôn có sự thoát hơi nước từ lá, vì thế cây thường ở trạng thái thiếu nước và sức hút nước của tế bào trong cây thường có giá trị dương.

## IV - SỰ TRAO ĐỔI KHOÁNG VÀ NITƠ

### 4.1. Sự trao đổi khoáng

#### 4.1.1. Vai trò của các nguyên tố khoáng

- Vai trò của các nguyên tố đa lượng :

Các nguyên tố đa lượng thường đóng vai trò cấu trúc trong tế bào, là thành phần của các đại phân tử trong tế bào (protein, lipit, axit nucleic,...). Các nguyên tố đa lượng còn ảnh hưởng đến tính chất của hệ thống keo trong chất nguyên sinh như : diện tích bề mặt, độ ngậm nước, độ nhớt và độ bền vững của hệ thống keo.

- Vai trò của các nguyên tố vi lượng :

Các nguyên tố vi lượng thường là thành phần không thể thiếu được của hầu hết các enzym. Chúng hoạt hoá cho các enzym này trong các quá trình trao đổi chất của cơ thể.

Bảng 1.1. Vai trò của các nguyên tố đa lượng, vi lượng

Nguyên tố	Dạng hấp thụ từ đất	Vai trò
P	$\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{H}_2\text{PO}_4^-$	Thành phần của axit nucleic, ATP, cần cho sự nở hoa, đậu quả, phát triển hệ rễ.
K	$\text{K}^+$	Hoạt hoá enzym, cân bằng nước, cân bằng ion.
S	$\text{SO}_4^{2-}$	Thành phần của một số protein, coenzym.
Ca	$\text{Ca}^{2+}$	Thành phần cấu trúc màng, hoạt hoá enzym.
Mg	$\text{Mg}^{2+}$	Thành phần chlorophin, hoạt hoá enzym.
Fe	$\text{Fe}^{3+}$	Hoạt hoá enzym khử, tham gia vận chuyển $e^-$ , xúc tác tổng hợp chlorophin.
Cl	$\text{Cl}^-$	Xúc tác quang phân ly nước, cân bằng ion.
Zn	$\text{Zn}^{2+}$	Hoạt hóa enzym, xúc tác tổng hợp auxin.
Cu	$\text{Cu}^{2+}$	Hoạt hóa enzym khử, tham gia vận chuyển $e^-$ .
Mo	$\text{MoO}_4^{3-}$	Xúc tác cố định nitơ, chuyển $\text{NO}_3^-$ .

#### 4.1.2. Phương thức trao đổi

Các chất khoáng ở trong đất thường tồn tại dưới dạng hoà tan và phân ly thành các ion mang điện tích dương (cation) và ion mang điện tích âm (anion). Các nguyên tố khoáng thường được hấp thụ vào tế bào dưới dạng ion qua hệ thống màng. Có hai cách hấp thụ các ion khoáng :

- Cách bị động : Các ion khoáng khuếch tán theo sự chênh lệch nồng độ từ cao đến thấp.

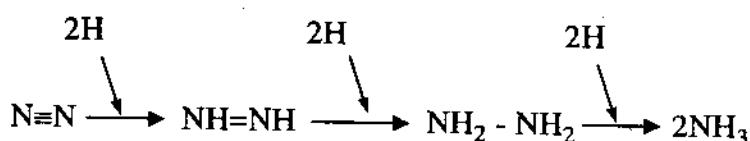
- Cách chủ động : Phần lớn các chất khoáng được hấp thụ vào tế bào theo cách chủ động này. Tính chủ động ở đây được thể hiện ở tính thẩm chọn lọc của màng sinh chất và các chất khoáng cần thiết cho cây đều được vận chuyển trái với quy luật khuếch tán, nghĩa là nó vận chuyển từ nơi có nồng độ thấp đến nơi có nồng độ cao, thậm chí rất cao (hàng chục, hàng trăm lần). Vì cách hấp thụ khoáng này mang tính chọn lọc và ngược với gradient nồng độ nên cần thiết phải có năng lượng, tức là sự tham gia của ATP và của một chất trung gian, thường gọi là chất mang. ATP và chất mang được cung cấp từ quá trình trao đổi chất, mà chủ yếu là quá trình hô hấp. Như vậy lại một lần nữa chúng ta thấy rằng : Quá trình hấp thụ nước và các chất khoáng đều liên quan chặt chẽ với quá trình hô hấp.

#### 4.2. Sự trao đổi nitơ ở tế bào

Nitơ có trong thành phần của hầu hết các chất trong cây : protein, axit nucleic, các sắc tố quang hợp, các hợp chất dự trữ năng lượng : ADP, ATP, các chất điều hòa sinh trưởng,... Như vậy nitơ vừa có vai trò cấu trúc, vừa tham gia trong các quá trình trao đổi chất và năng lượng.

##### 4.2.1. Quá trình cố định nitơ khí quyển

Nitơ phân tử ( $N_2$ ) có một lượng lớn trong khí quyển và mặc dù "tầm mình trong biển khí nitơ", phân tử thực vật vẫn hoàn toàn bất lực trong việc sử dụng khí nitơ này. May mắn thay nhờ có enzym nitrogenaza và lực khử mạnh (Fred-H<sub>2</sub>, FAD-H<sub>2</sub>, NADH<sub>2</sub>), một số vi khuẩn sống tự do và cộng sinh đã thực hiện được việc khử  $N_2$  thành dạng nitơ cây có thể sử dụng được như  $NH_4^+$ . Đó chính là quá trình cố định nitơ khí quyển, thực hiện bởi các nhóm vi khuẩn tự do (*Azotobacterium*, *Closterium*, *Anabaena*, *Nostoc*,...) và các vi khuẩn cộng sinh (*Rhizobium* trong nốt sần rễ cây Bô Đậu, *Anabaena azolleae* trong cây dương xỉ, *Azolla* trong cây bèo hoa dâu) theo cơ chế sau :



Các vi khuẩn tự do có thể cố định hàng chục kilogam  $NH_4^+$ , còn các vi khuẩn cộng sinh có thể cố định hàng trăm kilogam  $NH_4^+$ /ha/năm.

## 4.2.2. Quá trình biến đổi nitơ trong tế bào

### 4.2.2.1. Quá trình amon hóa : $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NH}_4^+$

Cây hút được từ đất cả hai dạng nitơ oxy hóa ( $\text{NO}_3^-$ ) và nitơ khử ( $\text{NH}_4^+$ ), nhưng cây chỉ cần dạng  $\text{NH}_4^+$  để hình thành các aminoaxit nên việc trước tiên mà cây phải làm là việc biến đổi dạng  $\text{NO}_3^-$  thành dạng  $\text{NH}_4^+$ .

Quá trình amon hóa xảy ra theo các bước sau đây :



### 4.2.2.2. Quá trình hình thành aminoaxit

Quá trình hô hấp của cây tạo ra các xêto axit (R-COOH), và nhờ quá trình trao đổi nitơ các xêto axit này có thêm gốc  $\text{NH}_2$  để thành các aminoaxit.

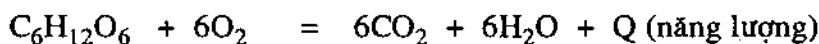
Có 4 phản ứng để hình thành các aminoaxit và sau đó có các phản ứng chuyển amin hóa để hình thành 20 aminoaxit và từ các aminoaxit này thực vật có thể tạo vô vàn các protein và các hợp chất thứ cấp khác của thực vật.

Sau đây là các phản ứng khử amin hóa để hình thành các aminoaxit :

- xetoglutaric +  $\text{NH}_2$  = glutamin
- axit pyruvic +  $\text{NH}_2$  = alanin
- axit fumaric +  $\text{NH}_2$  = aspartic
- axit oxaloaxetic +  $\text{NH}_2$  = aspartic

## V - HÔ HẤP TẾ BÀO

Hô hấp là quá trình oxy hóa các hợp chất hữu cơ thành  $\text{CO}_2$  và  $\text{H}_2\text{O}$ , đồng thời giải phóng năng lượng cần thiết cho các hoạt động sống của cơ thể. Phương trình tổng quát của quá trình hô hấp được viết như sau :



### 5.1. Vai trò của quá trình hô hấp

Hô hấp được xem là quá trình sinh lý trung tâm của cây xanh, có vai trò đặc biệt quan trọng trong các quá trình trao đổi chất và chuyển hóa năng lượng :

- Trước hết thông qua quá trình hô hấp, năng lượng hoá học tự do dưới dạng ATP được giải phóng từ các hợp chất hữu cơ và năng lượng dưới dạng ATP này được sử dụng cho các quá trình sống của cơ thể : quá trình trao đổi chất, quá trình hấp thụ và vận chuyển chủ động các chất, quá trình vận động sinh trưởng, quá trình phát quang sinh học,... Cụ thể là 1 phân tử glucozơ khi hô hấp hiếu khí giải phóng 36 ATP, tức là cơ thể thực vật đã thu được gần 50% năng lượng có trong 1 phân tử glucozơ (674 kcal/M).

- Trong các giai đoạn của quá trình hô hấp, nhiều sản phẩm trung gian đã được hình thành và các sản phẩm trung gian này lại là đầu mối (nguyên liệu) của các quá trình tổng hợp nhiều chất khác trong cơ thể. Với vai trò này hô hấp được xem như quá trình tổng hợp cả về mặt năng lượng lẫn mặt vật chất.

Cơ chế hô hấp với các giai đoạn hô hấp sau :

- Con đường đường phân.
- Chu trình Crep.
- Chuỗi truyền điện tử và quá trình photphorin hoá.

### **5.2. Các giai đoạn của quá trình hô hấp trong tế bào có thể tóm tắt như sau :**

1. Giai đoạn phân giải đường (đường phân) xảy ra ở chất tế bào trong điều kiện yếm khí :

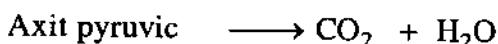


2. Hô hấp yếm khí (lên men) xảy ra ở chất tế bào chưa có sự tham gia của  $O_2$

- Axit pyruvic  $\longrightarrow$  Rượu etylic
- Axit pyruvic  $\longrightarrow$  Axit lactic

3. Hô hấp hiếu khí xảy ra ở ty thể với sự có mặt của  $O_2$  :

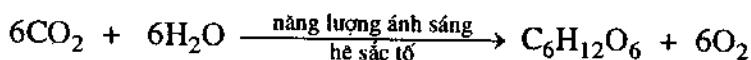
- Chu trình Crep :



- Chuỗi truyền điện tử và quá trình photphorin hoá tạo ra 30 ATP.

## **VI - QUANG HỢP Ở TẾ BÀO**

Phương trình quang hợp được viết như sau :



Người ta thường dựa vào phương trình quang hợp này để định nghĩa quá trình quang hợp : Quang hợp là quá trình lục lạp hấp thụ năng lượng ánh sáng bằng hệ sắc tố của mình và sử dụng năng lượng này để tổng hợp chất hữu cơ (đường glucoza) từ các chất vô cơ ( $CO_2$  và  $H_2O$ ).

### **6.1. Vai trò của quá trình quang hợp**

Chúng ta có thể khẳng định một cách chắc chắn rằng : Quang hợp là một quá trình mà tất cả sự sống trên trái đất này đều phụ thuộc vào nó và chứng minh điều khẳng định này bằng ba vai trò của quá trình quang hợp sau đây :

- Quang hợp tạo ra hầu như toàn bộ các chất hữu cơ trên trái đất. Ngoài quá trình quang hợp ở cây xanh và ở một số vi sinh vật quang hợp, nói chung không có một sinh vật nào có thể tự tạo được chất hữu cơ (trừ một số rất ít vi sinh vật hoá tự dưỡng). Vì vậy người ta gọi thực vật và một số vi sinh vật quang hợp là các sinh vật quang tự dưỡng và luôn đứng đầu chuỗi thức ăn trong các hệ sinh thái. Động vật lấy thức ăn trực tiếp từ thực vật. Nhu cầu ăn, mặc, ở của con người được cung cấp gián tiếp (qua động vật) và trực tiếp từ thực vật.

- Hầu hết các dạng năng lượng sử dụng cho các quá trình sống của các sinh vật trên trái đất (năng lượng hoá học tự do - ATP) đều được biến đổi từ năng lượng ánh sáng mặt trời (năng lượng lượng tử) do quá trình quang hợp.

- Quang hợp giữ trong sạch bầu khí quyển : Hàng năm quá trình quang hợp của các cây xanh trên trái đất đã hấp thụ 600 tỷ tấn khí CO<sub>2</sub> và giải phóng 400 tỷ tấn khí O<sub>2</sub> vào khí quyển. Nhờ đó tỷ lệ CO<sub>2</sub> và O<sub>2</sub> trong khí quyển luôn được giữ cân bằng (CO<sub>2</sub> : 0,03%, O<sub>2</sub> : 21%), đảm bảo cuộc sống bình thường trên trái đất.

## **6.2. Bản chất hoá học và khái niệm hai pha của quang hợp**

Như vậy quang hợp gồm quá trình oxy hoá H<sub>2</sub>O nhờ năng lượng ánh sáng. Đây là giai đoạn gồm các phản ứng cần ánh sáng, phụ thuộc vào cường độ ánh sáng, gọi là pha sáng của quang hợp. Pha sáng hình thành ATP, NADPH và giải phóng O<sub>2</sub>. Tiếp theo là quá trình khử CO<sub>2</sub> nhờ ATP và NADPH do pha sáng cung cấp. Đây là giai đoạn gồm các phản ứng không cần ánh sáng, nhưng phụ thuộc vào nhiệt độ, gọi là pha tối của quang hợp. Pha tối hình thành các hợp chất hữu cơ, bắt đầu là đường glucozơ.

## Chương 2

# ĐIỀU KIỆN VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

### I - SƠ LƯỢC LỊCH SỬ NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

Gottlieb Haberlandt (1902), nhà thực vật học người Đức, đã đặt nền móng đầu tiên cho nuôi cấy mô tế bào thực vật. Ông đưa ra giả thuyết về tính toàn năng của tế bào trong cuốn sách "Thực nghiệm về nuôi cấy tế bào tách rời". Theo ông, mỗi tế bào bất kỳ của cơ sinh vật nào đều mang toàn bộ lượng thông tin di truyền của cơ thể đó và có khả năng phát triển thành cơ thể hoàn chỉnh khi gặp điều kiện thuận lợi. Tuy nhiên những thí nghiệm của Haberlandt với các tế bào mô mềm, biểu bì đã bị thất bại, do chúng không thể phân chia được.

Năm 1922, Kotte là học trò của Haberlandt cùng với Robbins đã lặp lại các thí nghiệm của Haberlandt với dinh sinh trưởng tách từ đâu rễ một cây hòa thảo (cây ngô). Hai tác giả đã nuôi được trong một thời gian ngắn trên môi trường lỏng có chứa đường glucozơ, muối khoáng và thu được hệ rễ nhỏ.

Năm 1934, bắt đầu giai đoạn thứ 2 của lịch sử nuôi cấy mô tế bào thực vật, khi White (người Mỹ) đã duy trì được sinh trưởng của đầu rễ cà chua (*Lycopersicon esculentum*) trong một thời gian khá dài, trên môi trường lỏng có chứa đường, một số muối khoáng và dịch chiết nấm men. Theo hướng khác, Gautheret (Pháp) nghiên cứu nuôi cấy mô tượng tầng các cây gõ và đã tìm ra môi trường nuôi cấy thích hợp. Cũng trong giai đoạn này, vai trò thúc đẩy sinh trưởng trong nuôi cấy của hàng loạt vitamin nhóm B cũng được phát hiện như : thiamin (vitamin B<sub>1</sub>), pyridoxin (vitamin B<sub>6</sub>), nicotinic (vitamin B<sub>3</sub> hay PP)... Nuôi cấy mô thực vật có nhiều thuận lợi hơn khi Went và Thimann tìm ra được chất kích thích sinh trưởng đầu tiên, sau đó xác định là axit indole axetic (IAA) và được Kogl tách chiết, tinh chế thành công. Năm 1939, Gautheret và Nobecourt đã duy trì được sự sinh trưởng của mô sẹo cà rốt (*Daucus carota*) trong một thời gian dài.

Van Overbeck (1941) đã chứng minh tác dụng tốt của nước dừa trong nuôi cấy phôi cây họ cà. Sau đó Steward và Milles (1952) cũng xác nhận tầm quan trọng của nước dừa trong nuôi cấy mô sẹo và phát sinh phôi ở cà rốt. Trong thời gian này, nhiều chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm auxin được nghiên cứu và tổng hợp thành công : axit naphthalen axetic (NAA), axit 2,4-dichlorophenoxy axetic(2,4D)... Nhiều nhà nghiên cứu nhận thấy cùng với nước dừa, NAA và 2,4D đã giúp tạo mô sẹo thành công ở nhiều đối tượng mà trước đây rất khó nuôi cấy.

Năm 1954, Skoog phát hiện chế phẩm thuỷ phân của tinh dịch cá bẹ có tác dụng kích thích sinh trưởng rất rõ rệt trong nuôi cấy các mảnh mô thân cây thuốc lá. Ông

cho rằng chất có hoạt tính là sản phẩm phân giải và một năm sau, chất đó được tổng hợp thành công, được Skoog gọi là kinetin do có tác dụng kích thích sự phân bào. Việc phát hiện ra NAA, 2,4D, kinetin cùng với các loại vitamin và nước dừa là những bước tiến có ý nghĩa trong giai đoạn thứ 2 của nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Skoog và Miller (1957) đã chứng minh sự biệt hoá của rễ, chồi trong nghiên cứu nuôi cấy mô tuỷ thuốc lá phụ thuộc vào nồng độ tương đối của auxin/cytokinin và từ đó đưa ra quan niệm điều khiển hoocmon trong quá trình hình thành cơ quan ở thực vật. Thành công của Skoog và Miller dẫn đến nhiều phát hiện quan trọng, mở đầu cho giai đoạn thứ 3 của nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Trong khoảng thời gian từ 1954-1959, kỹ thuật nuôi cấy tế bào đơn đã được phát triển và hoàn thiện dần. Nickell (1956) đã duy trì được sự sinh trưởng liên tục huyền phù cây đậu trắng (*Phaseolus vulgaris*). Melcher và Beckman đã nuôi các tế bào đơn trong các bình dung tích lớn có sục khí và bổ sung chất dinh dưỡng định kỳ. Khả năng nuôi cấy các tế bào thực vật và tái tạo được cây hoàn chỉnh từ tế bào đã mở ra những triển vọng mới cho chọn dòng đột biến, sản xuất các chất trao đổi thứ cấp...

Nhờ nuôi cấy định sinh trưởng, Morel (1960) đã tạo ra được các protocorm từ địa lan. Khi để trong các điều kiện nhất định, các protocorm có thể phát triển thành cây lan con và hoàn toàn sạch bệnh.

Năm 1960, Cocking ở Trường Đại học Tổng hợp Nottingham đã thu được các tế bào trần (protoplast) dùng cho nuôi cấy từ mô thực vật được xử lý với enzym cellulaza. Năm 1966, Guha và cộng sự đã tạo được cây đơn bội từ nuôi cấy túi phấn của cây cà độc dược (*Datura inoxia*). Sau đó Bourgin và Nitsch (1967) cũng thành công với cây thuốc lá. Việc tạo cây đơn bội thành công ở nhiều loài thực vật thông qua nuôi cấy bao phấn và hạt phấn đã đóng góp rất lớn cho các nghiên cứu di truyền và lai tạo giống.

Từ những năm 1970 trở đi, các nhà khoa học đã chú ý vào triển vọng của kỹ thuật nuôi cấy protoplast, khi 2 tác giả người Nhật Bản là Nagata và Takebe đã thành công trong việc làm cho protoplast thuốc lá tái tạo được cellulozơ.

Melchers và cộng sự (1978) đã lai tạo thành công protoplast của cà chua với protoplast của khoai tây, mở ra một triển vọng mới trong lai xa ở thực vật. Ngoài ra, trong những điều kiện nhất định, các protoplast có khả năng hấp thụ các phân tử lớn, hoặc cả các cơ quan từ bên ngoài, do đó chúng là những đối tượng lý tưởng cho các nghiên cứu về di truyền thực vật.

Ngày nay, nuôi cấy mô - tế bào thực vật được ứng dụng rộng rãi trong nhân giống nhiều loại thực vật, chọn dòng chống chịu, lai xa, chuyển gen vào cây trồng...

## II - CÁC ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY

### 2.1. Điều kiện vô trùng

#### 2.1.1. Vô trùng dụng cụ và môi trường

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, các thao tác với mẫu cấy được tiến hành trong buồng cấy vô trùng. Thiết bị này sẽ loại trừ một cách hiệu quả nguồn vi sinh vật lây

nhiễm theo không khí và tạo điều kiện thoái mái cho người sử dụng. Không khí từ bên ngoài trước khi đi vào buồng cây sẽ được dẫn qua các màng lọc có kích thước lỗ siêu nhỏ, giúp ngăn chặn hoàn toàn các vi khuẩn và nấm. Vì vậy trước mỗi lần dùng, buồng cây cần được lau sạch bằng côn  $90^{\circ}$ . Đồng thời để đảm bảo mức độ vô trùng cao, phòng cây cần có đèn tử ngoại giúp loại bỏ các nguồn bệnh lây nhiễm trong không khí và trên bề mặt các dụng cụ, thiết bị nuôi cây.

Để vô trùng dụng cụ và môi trường nuôi cây, có thể sử dụng một trong các phương pháp sau :

### **2.1.1.1. Khử trùng khô**

Phương pháp này chỉ dùng cho các dụng cụ bằng kim loại, thuỷ tinh và những dụng cụ khác mà có tính chịu nhiệt (không bị cháy, nóng chảy...). Các dụng cụ trước khi đem sấy phải được gói kín bằng giấy nhôm và chỉ được mở trong tủ cây vô trùng. Thiết bị dùng để khử trùng khô là lò sấy.

Thời gian khử trùng khô với hầu hết các dụng cụ như sau (Willett, 1988) :

- Thời gian khởi động khoảng 60 phút, để cho tất cả các dụng cụ đều đạt được nhiệt độ  $180^{\circ}\text{C}$  ( $356^{\circ}\text{F}$ ).
- Thời gian duy trì ít nhất là 120 phút mới có thể loại bỏ hết các loại bào tử.
- Thời gian giảm dần nhiệt độ, đặc biệt với các dụng cụ thuỷ tinh, tránh làm giảm nhiệt độ quá đột ngột gây vỡ bình.

### **2.1.1.2. Khử trùng ướt**

Là phương pháp hiệu quả và phổ biến trong vô trùng môi trường và các dụng cụ nuôi cây. Thiết bị được sử dụng là nồi hấp vô trùng, nhiệt độ thường dùng ở  $121^{\circ}\text{C}$  ( $250^{\circ}\text{F}$ ,  $\approx 103,4\text{kPa}$ ).

Khử trùng ướt cần lưu ý :

- Không khử trùng môi trường nuôi cây với thời gian quá dài, một số thành phần của môi trường sẽ bị phân huỷ. Theo Hagel và cộng sự (1991), có khoảng 5% đường saccarozơ của môi trường lỏng bị phá huỷ khi khử trùng.
- Sau khi khử trùng phải giảm áp suất từ từ, giảm nhanh sẽ làm cho chất lỏng trong bình trào lên miệng bình.

### **2.1.1.3. Màng lọc**

Dùng để loại bỏ tác nhân gây nhiễm có kích thước  $0,025\text{-}10\mu\text{m}$  khỏi môi trường nuôi cây (môi trường lỏng), nước cất... Đây là phương pháp phù hợp đối với những môi trường mà thành phần của chúng bị phân huỷ bởi nhiệt độ cao. Những môi trường đó được lọc vô trùng ở nhiệt độ phòng thí nghiệm qua các màng có lỗ siêu nhỏ.

Có hai loại màng lọc phổ biến :

- Màng lọc bằng thép không gỉ : màng Swinney.
- Màng lọc bằng polipropylen : màng Swinex, đây là loại màng chỉ dùng một lần rồi bỏ.

Với các dung môi kỹ nước như dung dịch có chứa dimetyl sulfoxit, thì phải dùng màng lọc bằng xellulozơ axetat (có kích thước 0,1-0,2 $\mu$ m). Kích thước lỗ của màng lọc  $\leq 0,22\mu$ m, có thể loại bỏ hoàn toàn các sinh vật gây nhiễm : vi khuẩn, nấm men, nấm mốc... (Torres, 1989).

### 2.1.2. Vô trùng mẫu cây

#### 2.1.2.1. Lựa chọn mẫu cây

- Mẫu dùng cho nuôi cấy mô - tế bào thực vật có thể là hầu hết các cơ quan hay bộ phận của cây : chồi ngọn, chồi bên, phiến lá, cuống lá... các cấu trúc của phôi (lá mầm, trụ lá mầm...) ; các cơ quan dự trữ (củ, căn hành...). Tuỳ theo sự tiếp xúc với môi trường mà các mẫu thực vật có chứa ít hay nhiều mầm bệnh (vi khuẩn, nấm). Các cấu trúc thực vật được bao kín (lá mầm, phôi, mô thịt trong quả...) thường không chứa hoặc có ít vi sinh vật. Ngược lại, các mô và cơ quan thực vật tiếp xúc với nước, đất như rễ, củ, thân ngầm thường có lượng vi sinh vật rất cao và rất khó loại bỏ hoàn toàn chúng khỏi nguồn mẫu. Thường phải lấy mẫu ở thời điểm mà cây sinh trưởng và phát triển mạnh nhất : mùa xuân hay đầu mùa hè. Các mùa khác cây mẫu sinh trưởng kém hơn, đồng thời mang rất nhiều mầm bệnh.

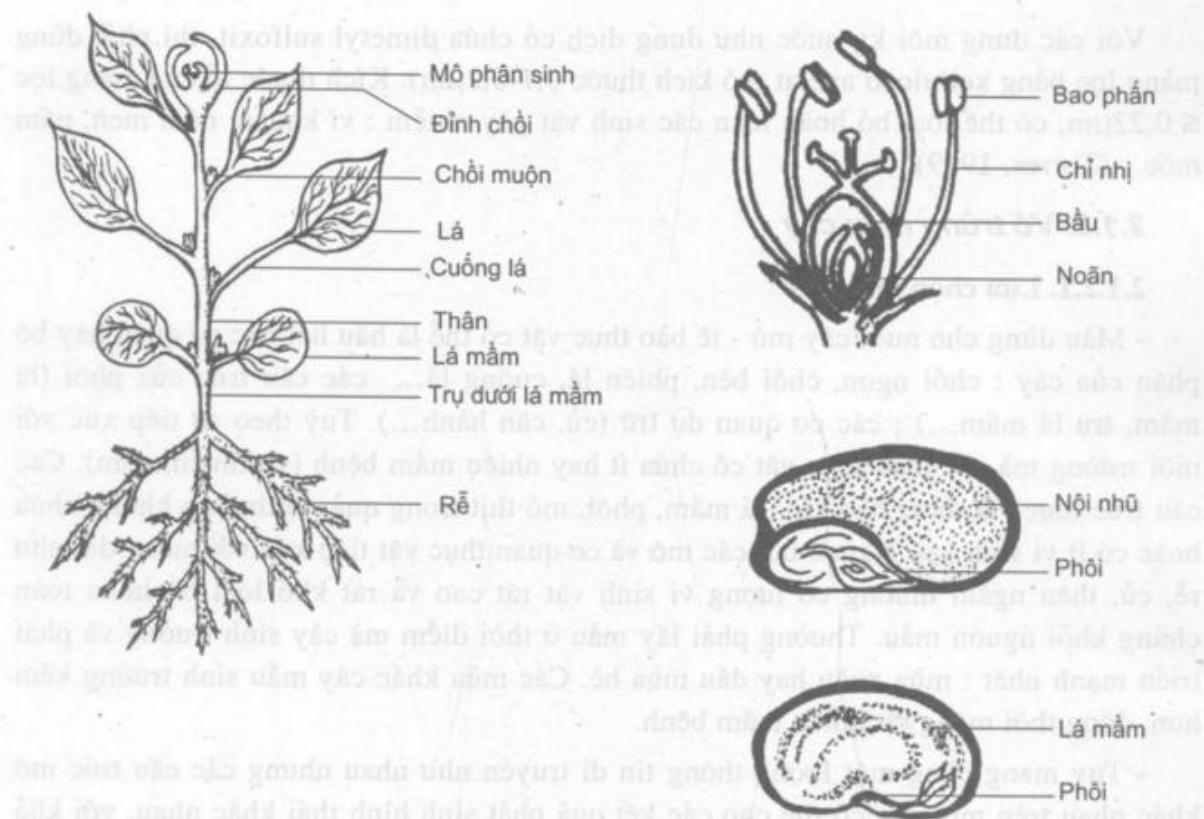
- Tuy mang cùng một lượng thông tin di truyền như nhau nhưng các cấu trúc mô khác nhau trên một cây có thể cho các kết quả phát sinh hình thái khác nhau, với khả năng tạo chồi, rễ hay mô sẹo... Vì vậy để chọn mẫu cây cho phù hợp, phải căn cứ vào : Trạng thái sinh lý hay tuổi của mẫu, mẫu non trẻ có sự phản ứng với các điều kiện và môi trường nuôi cấy nhanh, dễ tái sinh, đặc biệt là trong nuôi cấy mô sẹo, phôi. Ngoài ra mô non trẻ mới được hình thành, sinh trưởng mạnh, mức độ nhiễm mầm bệnh ít hơn. Đối với mẫu cây từ cây mía (*Saccharum officinarum* L.), các nghiên cứu đã cho thấy lá non còn bọc trong bẹ và dòng non là những loại mô cây phù hợp nhất cho việc tạo mô sẹo và tái sinh cây hoàn chỉnh.

Kích thước và vị trí của mẫu cây : Kích thước của mẫu ảnh hưởng trực tiếp đến phản ứng của mô với môi trường nuôi cấy. Nhìn chung, mẫu có kích thước càng nhỏ càng khó nuôi cấy. Thường trên cây, mẫu ở vị trí cao sẽ có ít mầm bệnh hơn.

Chất lượng cây cho mẫu : Lấy mẫu từ những cây có nhiều đặc điểm ưu việt mà ta quan tâm : sinh trưởng và phát triển mạnh, chống chịu tốt với các điều kiện bất lợi (hạn, lạnh, mặn) hoặc sâu bệnh, cho sản lượng và chất lượng ngon của quả, hạt...

Mục đích và khả năng nuôi cấy : Để phục vụ cho nhân giống vô tính, thường chọn chồi ngọn, chồi bên (chồi muộn). Nuôi cấy mô sẹo, nuôi cấy phôi : có thể sử dụng lá mầm, trụ lá mầm, thân, lá, phôi... Để thu cây đơn bội phục vụ cho lai tạo giống : dùng bao phấn và hạt phấn cho nuôi cấy.

- Phụ thuộc vào mẫu có nuôi cấy thành công hay không? Nếu nuôi cấy mô sẹo hay nuôi cấy phôi không thể thực hiện được với một đối tượng nào đó thì phải chuyển sang chọn đinh sinh trưởng để nuôi cấy.



Hình 2.1. Sơ đồ minh họa các mẫu của thực vật có hoa có thể dùng trong nuôi cấy mô

### 2.1.2.2. Phương pháp vô trùng mầm cấy

Phương pháp phổ biến trong vô trùng mầm cấy hiện nay là sử dụng hoá chất có khả năng tiêu diệt vi sinh vật. Hiệu quả diệt nấm khuẩn của các chất này phụ thuộc vào thời gian, nồng độ xử lý và khả năng xâm nhập của chúng vào các ngõ ngách trên bề mặt mầm cấy. Để tăng tính linh động của hóa chất diệt khuẩn, người ta thường sử dụng thêm các chất làm giảm sức căng bề mặt như tween 20, tween 80, fotoflo, teepol... hoặc có thể xử lý phổi hợp với cồn 70%. Một hoá chất được lựa chọn cho quá trình vô trùng mầm cấy phải đảm bảo 2 thuộc tính: Có khả năng diệt vi sinh vật tốt và không hoặc có mức độ độc thấp đối với mầm thực vật. Trong các loại hoá chất trên, NaOCl và Ca(OCl)<sub>2</sub> hay được dùng hơn cả vì chúng có mức độ độc tính thấp đối với mầm, không có biểu hiện ức chế sinh trưởng. Dung dịch NaOCl thương mại chứa 5% NaOCl hoạt tính. Khi sử dụng ở hàm lượng 10-20% (V/v) sẽ có 0,5-1,0% NaOCl. Ca(OCl)<sub>2</sub> thường ở dạng bột, pha xong cần phải lọc trước khi sử dụng.

Dung dịch NaOCl và Ca(OCl)<sub>2</sub> cần chứa trong những bình có nút thật kín. Theo thời gian, các dung dịch đó sẽ tách ra khí Cl<sub>2</sub> dẫn đến làm giảm hoạt tính của chúng.

Ngoài những hoá chất nói trên, có thể dùng thêm chất kháng sinh cho vô trùng mầm cấy. Hai chất kháng sinh hay được sử dụng là gentamixin và ampicillin (50-100mg/l). Sau khi xử lý với các hoá chất, mầm thực vật được ngâm vào các dung dịch có chứa

kháng sinh trong khoảng 30 phút sẽ tăng đáng kể hiệu quả của quá trình vô trùng mẫu cây.

**Bảng 2.1. Bảng tổng hợp sử dụng một số loại hóa chất vô trùng**

Hóa chất	Nồng độ sử dụng	Thời gian xử lý (phút)	Hiệu quả
Hypoclorit canxi	5-15% (W/v)	5-30	Rất tốt
Hypoclorit natri	10-20% (V/v)	5-30	Rất tốt
Oxy già	10-12% (V/v)	5-15	Tốt
Clorua thuỷ ngân	0,1-1% (W/w)	2-10	Trung bình
Nitrat bạc	1% (W/w)	5-10	Trung bình
Chất kháng sinh	50-100mg/l	30-60	Khá tốt

(Theo Street, 1974 ; Narayanaswamy S., 1994 ; Dodds J.H and Roberts L.W., 1999 ; Smilt R.H., 2000)

Một số trường hợp rất khó vô trùng mẫu : Có thể tồn tại vi sinh vật ngay trong mô hoặc vi sinh vật trên bề mặt mẫu có mức độ mẫn cảm với các hóa chất vô trùng gần như mẫu thực vật. Do đó xử lý vô trùng bề mặt sẽ không đạt được hiệu quả hoàn toàn. Trong trường hợp này, nhiều nhà nghiên cứu đã thêm các chất diệt vi khuẩn và nấm vào trong môi trường nuôi cấy (Thursten và cộng sự, 1979). Tuy nhiên chất diệt vi sinh vật có thể gây độc đối với mô nuôi cấy. Như nuôi cấy mô củ cây Atiso (ở vùng Jerusalem) sẽ bị ức chế mạnh khi môi trường nuôi cấy có  $10-100\mu\text{g}/\text{cm}^3$  gentamixin sulfat, trong khi đây là dải nồng độ được khuyến cáo có thể sử dụng.

Trong thời gian xử lý, mẫu cấy phải ngập hoàn toàn trong hóa chất diệt nấm, khuẩn. Đối với những mẫu quá bẩn, cần rửa kỹ mẫu dưới vòi nước chảy, sau đó có thể rửa lại bằng nước cất. Trước khi đưa mẫu vào môi trường nuôi cấy cần loại bỏ những phần mẫu bị giập, hỏng do quá trình thao tác gây ra.

## 2.2. Ánh sáng và nhiệt độ

Các mẫu nuôi cấy thường được đặt trong những phòng nuôi ổn định về ánh sáng và nhiệt độ. Tất cả các nuôi cấy đều cần ánh sáng, trừ một số trường hợp nuôi cấy tạo mô sẹo, nhưng quá trình tái sinh và nhân giống của chúng cũng yêu cầu có ánh sáng. Nhiệt độ của phòng nuôi cấy được duy trì từ  $25-28^\circ\text{C}$  nhờ các máy điều hoà nhiệt độ.

# III - MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY

## 3.1. Thành phần của môi trường

Thành phần của môi trường nuôi cấy mô tế bào thay đổi tùy theo loài thực vật, loại tế bào, mô và cơ quan được nuôi cấy. Đối với cùng một loại mô, cơ quan nhưng mục

dịch nuôi cây không giống nhau, môi trường sử dụng cũng khác nhau khá cơ bản. Môi trường nuôi cây còn thay đổi theo giai đoạn sinh trưởng và phát triển của mẫu cây.

Mặc dù có sự đa dạng về thành phần và nồng độ các chất, nhưng tất cả các loại môi trường nuôi cây đều gồm có các thành phần sau : Thành phần hữu cơ, thành phần vô cơ, các chất điều hòa sinh trưởng, nguồn cacbon, các thành phần khác.

### 3.1.1. Thành phần vô cơ

Thành phần vô cơ bao gồm các muối khoáng (cả đa lượng và vi lượng) được đưa vào môi trường nuôi cây. Nhu cầu về muối khoáng của tế bào và mô thực vật tách rời là không khác nhiều so với yêu cầu của cây trong điều kiện tự nhiên. Trong thành phần muối khoáng đa lượng, các nguyên tố cần phải cung cấp là nitơ, phospho, kali và sắt.

- Nitơ vô cơ được đưa vào môi trường ở hai dạng : nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) và amon ( $\text{NH}_4^+$ ). Đa số các môi trường có chứa dạng nitrat nhiều hơn dạng amon. Theo Narayanaswamy (1994), hàm lượng nitrat trong nhiều môi trường  $\approx 25\text{mM}$ , còn của amon từ  $2-20\text{mM}$ . Tuy nhiên cân bằng sinh lý của 2 dạng nitơ nói trên đối với sinh trưởng tối ưu của các loài thực vật là khác nhau. Trong môi trường MS, amon được cung cấp ở dạng muối  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , còn môi trường B<sub>5</sub> của Gamborg có amon ở dạng muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Các gốc nitrat được đưa vào môi trường dưới dạng muối nitrat canxi, nitrat kali, nitrat natri hoặc nitrat amon.

Khi môi trường chỉ chứa nitơ ở dạng nitrat dễ gây ra kiềm hoá môi trường, vì thế cần phải đưa vào môi trường một lượng nhỏ amon. Ngược lại, trong môi trường có thể chỉ dùng nitơ dạng amon. Trong trường hợp này, có thể sử dụng muối amon của các axit xitic, malic hoặc succinic (Gamborg & Shylux, 1970). Trong số các nguyên tố của môi trường, nitơ có hàm lượng lớn nhất.

- Phospho thường được đưa vào môi trường ở dạng muối phosphat và hai loại hợp chất hay được dùng nhất là  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  và  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Hàm lượng phospho trong môi trường nuôi cây dao động từ  $0,15$  đến  $0,40\text{mM}$ .

- Kali được cung cấp cho môi trường nuôi cây dưới dạng  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KCl}$  và  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Nồng độ kali trong môi trường nuôi cây thay đổi từ  $2$  đến  $25\text{mM}$ .

- Yêu cầu về muối khoáng vi lượng của mô thực vật trong nuôi cây khá phức tạp và ít được nghiên cứu. Tuy nhiên trong nhiều loại môi trường cơ bản đã được xây dựng, các tác giả đều cung cấp cho môi trường hầu hết các nguyên tố vi lượng cần thiết nhằm mục đích thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của mẫu nuôi cây.

Sắt là nguyên tố vi lượng được đưa vào môi trường ở dạng muối  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ... nhưng chúng sẽ bị kết tủa và mẫu nuôi cây rất khó hấp thụ các loại muối này. Do đó, phải cho thêm vào môi trường nuôi cây  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (Sodium ethylenediamine tetraacetate), để tạo ra muối phức  $\text{NaFeEDTA}$  (dạng selat) có chứa cả Na, Fe và được mô nuôi cây hấp thụ dễ dàng.

### **3.1.2. Thành phần hữu cơ**

#### **3.1.2.1. Vitamin, aminoaxit, amit, myo-inositol**

- Các vitamin là những chất hữu cơ tham gia vào cấu trúc enzym và cofactor của nhiều phản ứng sinh hoá. Quan trọng nhất là các vitamin nhóm B.

+ Thiamin (vitamin B<sub>1</sub>) cần cho trao đổi hydratcacbon và sinh tổng hợp một số aminoaxit, hàm lượng sử dụng 0,1-5,0mg/l.

+ Axit nicotinic (vitamin B<sub>3</sub>, PP, niacin) tham gia tạo coenzym của chuỗi hô hấp, sử dụng 0,1-5,0mg/l.

+ Pyridoxin (vitamin B<sub>6</sub>) là một coenzym quan trọng trong nhiều phản ứng trao đổi chất, sử dụng 0,1-1,0mg/l.

Cả 3 loại vitamin trên đều được cung cấp ở dạng có chứa nhóm HCl. Ngoài ra, môi trường nuôi cấy còn sử dụng một số vitamin khác :

\* Biotin (vitamin H) : 0,01 - 1,0mg/l

\* Axit folic (vitamin M) : 0,1 - 5,0mg/l

\* Riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) : 0,1 - 10,0mg/l

\* Axit ascobic (vitamin C) : 1,0 - 100mg/l

\* Axit pantothenic (vitamin B<sub>5</sub>) : 0,5 - 2,5mg/l

\* Tocopherol (vitamin E) : 1,0 - 50,0mg/l

- Myo-inositol : là một loại đường-rượu liên quan đến quá trình tổng hợp phospholipit, pectin của thành tế bào và các hệ thống màng trong tế bào, tham gia vào dinh dưỡng khoáng, vận chuyển đường và trao đổi hydratcacbon. Ngoài ra, myo-inositol còn tham gia vào tích trữ, vận chuyển và giải phóng auxin (Bonduski, 1984).

- Hàm lượng sử dụng của myo-inositol là ≈100mg/l môi trường. Myo-inositol có tác dụng thúc đẩy sinh trưởng và phát triển giống như các vitamin và trong nhiều trường hợp có vai trò như nguồn cacbon của môi trường nuôi cấy.

- Các aminoaxit và amit :

+ Đối với nhiều loại mẫu nuôi cấy, môi trường phải được bổ sung các aminoaxit, amit... vì chúng có thể giữ vai trò quan trọng trong phát sinh hình thái.

+ Tất cả các dạng tự nhiên của aminoaxit (dạng L) dễ dàng được mô nuôi cấy hấp thụ (Skoog and Milles, 1957).

\* L-arginin dùng cho nuôi cấy rễ.

\* L-tyrolin dùng cho nuôi cấy chồi.

\* L-serin dùng cho nuôi cấy hạt phấn.

Nồng độ sử dụng của mỗi loại : 10-100mg/l (Narayanaswamy, 1994).

+ Glyxin là aminoaxit đơn giản nhất, nhưng là nguồn tổng hợp ra purin, một thành phần cấu trúc của vòng porphyrin trong các phân tử clorophin.

+ Các dạng amit dùng trong nuôi cấy là L-glutamin, L-asparagin... một số trường hợp tham gia vào cảm ứng và duy trì trong quá trình phát sinh phôi vô tính. Ngoài ra aminoaxit và amit còn là nguồn cung cấp nitơ hữu cơ cho mô nuôi cấy.

**3.1.2.2. Các thành phần hữu cơ phức hợp :** Được dùng trong môi trường nuôi cấy để cung cấp thêm nitơ hữu cơ, aminoaxit, vitamin và các khoáng chất... Người ta thường sử dụng các thành phần hữu cơ phức hợp, khi môi trường khoáng xác định không đạt được kết quả mong muốn về sinh trưởng và phát triển của mẫu nghiên cứu.

- Cazein thuỷ phân (CH, casein hydrolysate) có chứa nhiều aminoaxit, thành phần và hàm lượng các aminoaxit không ổn định, phụ thuộc vào quá trình, chất lượng và loại enzym thuỷ phân. Theo Klein (1970), cazein thuỷ phân có chứa khoảng 18-20 aminoaxit. Hàm lượng sử dụng cazein thuỷ phân trong nuôi cấy là 0,05-0,10% (W/v).

- Dịch chiết nấm men (YE, yeast extract) có chứa hàm lượng khá cao của nhiều vitamin nhóm B, nồng độ sử dụng 0,025-0,20% (W/v).

- Dịch chiết malt (malt extract) : 0,05-0,10% (W/v).

- Các loại nước ép hoa quả, củ :

+ Nước ép quả cà chua : 30% (V/v).

+ Nước ép cam : 3-10% (V/v).

+ Nước ép chuối xanh : 150g/l.

+ Nước dừa (CM, coconut milk) : là nội nhũ lỏng cung cấp các chất dinh dưỡng nuôi phôi dừa. Trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật thường sử dụng nước từ quả bánh tẻ và quả dừa già. Thành phần của nước dừa khá phong phú nhưng có chứa inositol và các chất thuộc nhóm cytokinin như zeatin... Các thành phần này có hàm lượng thay đổi, khác nhau giữa quả non, quả già, thậm chí khác nhau giữa những quả cùng độ tuổi. Vì vậy nước dừa cũng là một thành phần phức hợp không xác định. Hàm lượng sử dụng của nước dừa : 10-20% (V/v).

### **3.1.3. Các chất điều hòa sinh trưởng**

Các chất điều hòa sinh trưởng là thành phần không thể thiếu trong môi trường nuôi cấy, có vai trò quan trọng trong quá trình phát sinh hình thái thực vật *in vitro*. Hiệu quả tác động của chất điều hòa sinh trưởng phụ thuộc vào : Nồng độ sử dụng, hoạt tính vốn có của chất điều hòa sinh trưởng, mẫu nuôi cấy.

**3.1.3.1. Nhóm auxin :** Được đưa vào môi trường nuôi cấy nhằm thúc đẩy sự sinh trưởng và giãn nở của tế bào, tăng cường các quá trình sinh tổng hợp và trao đổi chất, kích thích hình thành rễ và tham gia vào cảm ứng phát sinh phôi vô tính... (Epstein và cộng sự, 1989). Các loại auxin thường sử dụng cho nuôi cấy :

- IAA (Indole acetic acid).
- IBA (Indole butyric acid).
- NOA (Naphthoxy acetic acid).
- α-NAA (α-Naphthalene acetic acid).
- Picloram (4-amino- 3,5,6 trichloropicolinic acid).
- 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid).
- pCPA (P-chlorophenoxy acetic acid).
- Dicamba (3,6 -Dichloro-O-anisic acid).

IAA ít được sử dụng do kém bền với nhiệt và ánh sáng, những trường hợp có bổ sung IAA vào môi trường nghiên cứu thì phải dùng ở nồng độ khá cao : 1,0-30mg/l (Dodds and Roberts, 1999).

Các auxin khác có hàm lượng sử dụng từ 0,1-2,0mg/l. Chúng có hiệu quả sinh lý ở nồng độ thấp. Tuỳ theo loại auxin, hàm lượng sử dụng và đối tượng nuôi cấy... mà tác động sinh lý của auxin là kích thích sinh trưởng của mô, hoạt hoá sự hình thành rễ hay thúc đẩy sự phân chia mạnh mẽ của tế bào dẫn đến hình thành mô sẹo (callus).

**3.1.3.2. Nhóm cytokinin :** Kích thích sự phân chia tế bào, sự hình thành và sinh trưởng của chồi *in vitro* (Miller, 1961). Các cytokinin có biểu hiện ức chế sự tạo rễ và sự sinh trưởng của mô sẹo nhưng có ảnh hưởng dương tính rõ rệt đến phát sinh phôi vô tính của mẫu nuôi cấy. Các loại cytokinin thường được dùng trong nuôi cấy bao gồm :

- Zeatin (6-[4-hydroxy-3-metyl-but-2-enylamino]purine).
- Kinetin (6-furfurylaminopurine).
- BAP (Bezylaminopurine).
- TDZ (Thidiazuron).
- 2-ip (Isopentenyl adenine).

Hàm lượng sử dụng của các loại cytokinin dao động từ 0,1-2,0mg/l. Ở những nồng độ cao hơn, cytokinin có tác dụng kích thích rõ rệt đến sự hình thành chồi bất định, đồng thời ức chế mạnh sự tạo rễ của chồi nuôi cấy. Trong các loại cytokinin nói trên, kinetin và BAP là hai loại được sử dụng rộng rãi hơn cả.

Trong nuôi cấy có loại mẫu chỉ cần auxin hoặc cytokinin, hoặc không cần cả hai, còn đa số các trường hợp phải sử dụng phối hợp cả auxin và cytokinin ở những tỷ lệ khác nhau.

Như trong nuôi cấy mảnh lá cây củ cải đường (*Beta vulgaris L.*), mô sẹo được hình thành trên môi trường không có chất điều hoà sinh trưởng (sau khoảng 90 ngày), tiếp theo là quá trình phát sinh cơ quan của mẫu nuôi cấy vẫn trên môi trường không có phytohormone.

Ngoài 2 nhóm chính là auxin và cytokinin, trong nuôi cấy người ta còn sử dụng thêm *gibberillin* để kích thích kéo dài tế bào, qua đó làm tăng kích thước của chồi nuôi cấy... GA<sub>3</sub> (gibberellic acid) là loại gibberellin được sử dụng thường xuyên nhất.

Tuy nhiên GA<sub>3</sub> rất mẫn cảm với nhiệt độ, nó bị mất hoạt tính sinh lý tới 90% sau khi hấp vô trùng. Vì vậy muốn sử dụng GA<sub>3</sub> thường phải đem lọc qua màng lọc vô trùng, sau đó đưa vào môi trường nuôi cấy.

### **3.1.4. Nguồn cacbon**

Các mẫu nuôi cấy mô thực vật nói chung không thể quang hợp, hoặc nếu có quang hợp thì cường độ cũng rất thấp do thiếu clorophin, nồng độ CO<sub>2</sub> và nhiều điều kiện khác... Vì vậy phải đưa thêm những hợp chất hydratcacbon vào thành phần môi trường nuôi cấy.

Loại hydratcacbon được sử dụng phổ biến là đường saccharose với hàm lượng từ 2-6% (W/v). Những loại đường khác như : fructozơ, glucozơ, maltozơ, lactozơ, rafinozơ, sorbitol... chỉ dùng trong những trường hợp cá biệt. Trong nuôi cấy chồi cây dâu tằm (mulberry bud), môi trường có fructozơ cho kết quả tốt hơn những loại đường khác.

Hàm lượng đường thấp được sử dụng trong nuôi cấy tế bào trắn, ngược lại các hàm lượng đường cao hơn có thể dùng cho nuôi cấy hạt phấn, phôi...

### **3.1.5. Các thành phần khác**

**3.1.5.1. Tác nhân tạo gel (gelling agent) :** quyết định trạng thái vật lý của môi trường nuôi cấy. Các môi trường đặc có chứa đủ hàm lượng chất tạo gel làm cho chúng đông lại ở nhiệt độ bình thường (25-30<sup>0</sup>C).

- Chất tạo gel được sử dụng phổ biến là agar (thạch) gồm một số polisaccharit có khối lượng phân tử cao, được lấy từ rong biển. Các polisaccharit kết hợp với các phân tử H<sub>2</sub>O tạo thành polyme và đông lại thành gel ở nhiệt độ ≈45<sup>0</sup>C.

+ Trong thành phần của agar có chứa một số thành phần vô cơ : Cu, Fe, Mg, Mn, Cl, Zn... và một số thành phần hữu cơ : axit hữu cơ, axit béo chuỗi dài...

+ Hàm lượng sử dụng của agar 0,5-10% (W/v) tùy theo chất lượng của chúng và loại môi trường được sử dụng.

- Môi trường lỏng không có hoặc chứa ít chất tạo gel :

+ Dùng môi trường lỏng cho nuôi cấy thường phải lắc nhẹ, hoặc

+ Sử dụng các thành phần hỗ trợ như cầu giấy lọc, tấm polietilen.

Cầu giấy lọc có một đầu nhúng vào môi trường, đầu kia chứa mẫu. Tấm polietylen nổi trên môi trường lỏng và cho các chất dinh dưỡng thẩm qua.

### 3.1.5.2. Than hoạt tính (Activated charcoal, AC)

- Được dùng để hấp thụ các chất màu, các hợp chất phenol, các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp... trong trường hợp những chất đó có tác dụng gây ức chế sinh trưởng của mẫu nghiên cứu.

- Than hoạt tính cũng hút các chất hữu cơ như phytohormone, vitamin, sắt chelat, kẽm... (Nissen & Sutter, 1990). Hàm lượng sử dụng của than hoạt tính 0,2-0,3% (W/v).

+ Than hoạt tính làm giảm hiệu quả của các chất điều hòa sinh trưởng.

+ Làm thay đổi môi trường ánh sáng, do môi trường trở nên sẫm khi có than hoạt tính, có thể kích thích sự hình thành và sinh trưởng của rễ.

+ Một số trường hợp, thúc đẩy phát sinh phôi vô tính và kích thích sinh trưởng, phát sinh cơ quan ở các loài cây gỗ (Dodds & Roberts, 1999 ; Trigiano & Gray, 1999).

+ Chất chống oxy hoá :

Than hoạt tính là một trong những chất chống oxy hoá tốt, ngoài ra có thể đưa vào môi trường nuôi cấy một số chất chống oxy hoá khác như : axit xitic, thiourea, polivinyl pyrrolidon (PVP, 250-1000mg/l), axit ascobic.

## 3.2. pH của môi trường

- pH của đa số các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh trong phạm vi 5,5-6,0. pH dưới 5,5 làm cho agar khó chuyển sang trạng thái gel, còn pH lớn hơn 6,0 agar có thể rất cứng.

- Nếu trong thành phần của môi trường có GA<sub>3</sub> thì phải điều chỉnh giá trị pH của phạm vi nói trên. Vì ở pH kiềm hoặc quá axit, GA<sub>3</sub> sẽ chuyển sang dạng không có hoạt tính (Van Braft and Pierk, 1971).

- Trong quá trình nuôi cấy, pH của môi trường có thể giảm xuống, do một số mẫu thực vật sản sinh ra các axit hữu cơ.

## 3.3. Tính thẩm thấu của môi trường

- Hấp thụ nước của tế bào và mô thực vật trong nuôi cấy bị chi phối bởi thế năng của nước trong dịch bào và trong môi trường dinh dưỡng. Các thành phần chính có ảnh hưởng đến thế năng của nước trong môi trường bao gồm :

+ Hàm lượng đường.

+ Hàm lượng agar.

+ Một số thành phần muối khoáng.

Đường (hydratcacbon) vừa là nguồn cacbon cung cấp cho mâu nuôi cấy, đồng thời còn tham gia vào điều chỉnh khả năng thẩm thấu của môi trường.

Hàm lượng đường cao, mô nuôi cấy khó hút được nước. Hàm lượng đường quá thấp, là một trong những nguyên nhân gây ra hiện tượng mọng nước (thuỷ tinh thể, vitrification) ở mâu nuôi cấy, đây là trở ngại chính cho việc chuyển cây từ ống nghiệm ra vườn ươm (đồng ruộng).

Theo Trigiano & Gray (2000) : hydratcacbon đóng góp  $\approx 50-70\%$  vào khả năng thẩm thấu của môi trường, phần còn lại do các muối dinh dưỡng và các thành phần khác gây ra. Vì thế có thể thay đổi khả năng thẩm thấu của môi trường qua thành phần hydratcacbon.

- Tính thẩm thấu của môi trường đặc biệt quan trọng trong :
- + Nuôi cấy mô sẹo.
- + Nuôi cấy tế bào đơn và huyền phù tế bào.
- + Dung hợp và nuôi cấy tế bào trân.

## *Chương 3*

# NUÔI CẤY HUYỀN PHÙ TẾ BÀO

### I - MỞ ĐẦU

Mỗi tế bào thực vật là một đơn vị có chứa đựng tất cả những thông tin di truyền đặc trưng của cơ thể thực vật mà chúng được sinh ra. Cho nên từ mỗi tế bào có thể xây dựng lại toàn bộ cơ thể mới nhờ tính toàn năng của tế bào thực vật.

Caplin và Steward (1949) đã tiến hành nuôi cấy tế bào thực vật trên môi trường lỏng có khuấy, tiếp theo là các thí nghiệm của Muis và đồng nghiệp (1954), Nickell (1956), những tác giả này đã cho thấy các tế bào thực vật có thể sinh trưởng được như các cơ thể vi sinh vật. Melches và Beckman (1959) là những người đầu tiên tách và nuôi cấy thành công tế bào đơn và huyền phù tế bào thực vật.

Nuôi cấy huyền phù tế bào được khởi đầu bằng cách chuyển các khối mô sẹo vào môi trường lỏng có khuấy (môi trường B5 của Gamborg và cộng sự, 1968 ; môi trường của Murashige và Skoog, 1962). Các tế bào được tách ra khỏi khối mô sẹo và phân tán trong môi trường lỏng, nơi chúng sẽ phân chia để tạo thành các cụm tế bào nhỏ. Nuôi cấy được duy trì qua một loạt cấy truyền dưới những điều kiện về dinh dưỡng và thoáng khí thích hợp. Việc bổ sung thêm các dịch chiết có nguồn gốc tự nhiên như nước dừa, dịch chiết nấm men và các auxin, cytokinin ở nồng độ tối ưu sẽ thúc đẩy sự phân bào cũng như tốc độ sinh trưởng (Earle và Torrey, 1965 ; King và cộng sự, 1973 ; King và Street, 1977). Trong nuôi cấy huyền phù tế bào cây hoa mõm chó (*Antirrhinum*) gồm các cụm tế bào hình cầu, còn huyền phù tế bào của cây hoa hồng (*Rose sp.*) có chứa hầu hết là các tế bào đơn và chỉ có rất ít cụm tế bào nhỏ (Tulecke, 1966). Sự phân bố của các tế bào và cụm tế bào phụ thuộc vào thành phần của môi trường dinh dưỡng và sự thông khí của môi trường.

Với những nuôi cấy trong thời gian ngắn, có thể sử dụng máy khuấy từ và sục khí để thông khí cho môi trường. Trong trường hợp nuôi cấy huyền phù quy mô lớn, cần phải có những hệ thống thông khí hoàn chỉnh hơn như hệ thống nuôi cấy liên tục huyền phù tế bào của Street (1970). Nuôi cấy huyền phù tế bào của các thực vật có thể được tiến hành trên các môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962), môi trường B5 (Gamborg và cộng sự, 1968)... và bổ sung thêm các dịch chiết có nguồn gốc tự nhiên như nước dừa, dịch chiết nấm men, dịch chiết malt... Theo King (1980), nuôi cấy huyền phù tế bào rất gần với nuôi cấy tế bào đơn. Một huyền phù tế bào nuôi cấy bao

gồm các tế bào, các cụm tế bào phân tán trong môi trường dịch thể và sinh trưởng trong điều kiện thông khí và dinh dưỡng thích hợp.

## II - CÁC PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY

### 2.1. Nuôi cấy dịch thể tĩnh

Nuôi cấy dịch thể tĩnh được phát triển lần đầu tiên bởi Heller và Gautheret với mục đích nghiên cứu về dinh dưỡng khoáng. Trong phương pháp này, một cầu giấy lọc được gấp lại nhiều lần và được đặt một đầu vào môi trường dinh dưỡng khoáng theo phương thẳng đứng, đầu kia được uốn cong một góc  $90^{\circ}$  tạo thành nơi chứa mẫu nuôi cấy. Phần dưới của cầu giấy lọc hoạt động như một cái "bắc đèn" vận chuyển nước và các chất dinh dưỡng từ môi trường nuôi cấy cung cấp cho các tế bào sinh trưởng và phát triển. Hiện nay nuôi cấy dịch thể tĩnh chỉ được dùng trong một số trường hợp do khó triển khai trên quy mô lớn.

### 2.2. Nuôi cấy dịch thể động

#### 2.2.1. Nuôi cấy chìm liên tục

Trong nuôi cấy chìm liên tục, các tế bào luôn luôn được tiếp xúc với môi trường dinh dưỡng, do chúng được ngâm hẳn vào dung dịch môi trường. Quá trình thông khí được thực hiện nhờ một máy lắc chạy ở tốc độ 100-150 vòng/phút, hoặc có thể dùng các phương pháp và thiết bị thông khí khác. Ngoài sự thoáng khí, quá trình rung, lắc còn có tác dụng ngăn chặn và làm giảm sự kết dính của các tế bào với nhau.

Theo Thomas và Davey (1975), khi nuôi cấy huyền phù tế bào trong các bình có dung tích 25ml, tốc độ phù hợp nhất của máy lắc từ 100-120 vòng/phút. Thể tích của môi trường lỏng cũng phải phù hợp với kích thước của bình nuôi cấy để đảm bảo thông khí tốt, thường dịch lỏng chiếm 20% thể tích của bình.

Các nuôi cấy quy mô nhỏ và trong những thời gian ngắn, có thể sử dụng máy khuấy từ ở tốc độ 250 vòng/phút và thời gian cho quá trình nuôi cấy thường từ 10-15 ngày. Sau đó các mẫu nuôi cấy phải được cấy chuyển sang môi trường mới để đảm bảo sự sinh trưởng và phát triển của các tế bào. Sự thông khí của bình nuôi cấy phải được duy trì tốt qua nút đậy của bình nhưng đồng thời cũng cần đảm bảo yêu cầu vô trùng. Các nghiên cứu về nhu cầu dinh dưỡng, trao đổi chất và sự sinh trưởng thường được tiến hành trên môi trường lỏng vì có một số trở ngại khi sử dụng môi trường chứa agar. Khi agar kém chất lượng sẽ có ảnh hưởng xấu đến sinh trưởng của mô sẹo. Ngoài ra, chỉ có một phần của mô sẹo tiếp xúc với agar để hấp thụ chất dinh dưỡng, bởi vậy sự mất cân bằng trong phản ứng sinh trưởng là không tránh khỏi, do có gradient các chất dinh dưỡng xảy ra giữa các phần của khối mô sẹo.

#### 2.2.2. Nuôi cấy chìm tuần hoàn

Trong nuôi cấy chìm tuần hoàn, các tế bào được nhúng vào môi trường dịch thể xen kẽ với những khoảng thời gian được đưa ra khỏi môi trường. Quá trình này được thực

hiện nhờ sự chuyển động "bập bênh" của các bình nuôi cấy với sự trợ giúp của các thiết bị khác.

Khi chuyển động, khối tế bào ở đâu này của bình được đưa vào môi trường còn ở đâu kia lại được tiếp xúc với không khí. Steward và cộng sự (1952) cũng đã thiết kế những bình nuôi cấy đặc biệt theo phương pháp nuôi cấy chìm tuân hoàn. Các bình nuôi cấy chuyển động quay theo chiều kim đồng hồ ở tốc độ 1 vòng/phút. Hệ thống nuôi cấy này đã được cải tiến và mô tả kỹ hơn trong những thí nghiệm của các tác giả khác.

### **III - XÁC ĐỊNH TỐC ĐỘ SINH TRƯỞNG**

Sự sinh trưởng trong nuôi cấy huyền phù có thể được đo bằng cách xác định số lượng tế bào, thể tích tế bào, khối lượng tươi và khối lượng khô, xác định hàm lượng ADN và sức sống của tế bào.

#### **3.1. Số lượng tế bào**

Huyền phù tế bào nuôi cấy thường chứa các tế bào đơn và các cụm tế bào với những kích cỡ khác nhau. Trước khi tiến hành đếm tế bào, những cụm tế bào được tách thành những tế bào riêng rẽ qua xử lý với axit chromic (dùng dung dịch choromium trioxide 5-10% (W/v)), dun nóng ≈ 70<sup>0</sup>C trong 5-10 phút đủ để gây ra sự phân tách nhưng chưa làm phân hủy tế bào (Burcher and street, 1960), sau đó làm nguội và lắc mạnh trong vài phút. Một số trường hợp người ta dùng enzym pectinaza 1% (W/v) để phá vỡ các cụm tế bào ở các giá trị pH thấp. Các huyền phù được pha loãng đến nồng độ phù hợp, nhuộm và đếm trực tiếp trên buồng đếm tế bào. Với mỗi dung dịch huyền phù cần đếm 20 vòng ngẫu nhiên và lấy giá trị trung bình, kết quả được thể hiện bằng giá trị số lượng tế bào/ml dung dịch nuôi cấy.

#### **3.2. Thể tích tế bào**

Để xác định thể tích tế bào, một thể tích đã biết của huyền phù nuôi cấy được lấy ngẫu nhiên và đem ly tâm ở tốc độ 2000g trong thời gian 5 phút. Thu lấy tế bào và đem xác định thể tích, có thể được tính theo số ml tế bào/thể tích môi trường nuôi cấy hoặc tính theo tỷ lệ %.

#### **3.3. Xác định khối lượng tươi và khối lượng khô tế bào**

Khối lượng tươi được xác định bằng cách thu thập các tế bào trong một thể tích xác định của huyền phù tế bào, sau đó rửa chúng bằng nước cất vô trùng và đem làm khô trong chân không, cuối cùng cân để xác định khối lượng.

Để xác định khối lượng khô, cần lấy thể tích huyền phù tế bào nuôi cấy đem ly tâm. Loại bỏ phần nổi, rửa phần tế bào trên giấy lọc Whatman rồi đem sấy khô trong thời gian 12 giờ ở 80<sup>0</sup>C cho đến khi có khối lượng không đổi và đem xác định.

### 3.4. Xác định thành phần protein

Thu thập tế bào và chuyển lên lọc qua giấy Whatman, tiếp theo rửa các tế bào trong etanol 70% đang sôi. Làm khô với axeton rồi chuyển vào dung dịch NaOH 1M, sau đó đun nóng đến  $85^{\circ}\text{C}$  trong 1,5 giờ. Lọc và xác định protein thủy phân trong dịch theo phương pháp của Lowry và cộng sự (1951).

### 3.5. Xác định chỉ số nguyên phân

Chỉ số nguyên phân được coi là hữu ích trong đánh giá sự sinh trưởng của tế bào, cụm tế bào nuôi cấy dịch lỏng, hoặc để kiểm tra mức độ đồng đều về tuổi của các tế bào. Trước tiên huyền phù tế bào được cố định trong hỗn hợp dung môi etanol : axit axetic (tỷ lệ thể tích 3 : 1) sau đó chuyển sang lam kính. Nhỏ 1 giọt axeto-orcein lên mẫu trên lam kính rồi đem hơ trên ngọn lửa đèn cồn, tiếp theo để mẫu nguội trong khoảng 5 phút. Đậy mẫu bằng lamel, làm khô mẫu bằng giấy thấm và đem quan sát dưới kính hiển vi quang học ở vật kính dầu. Xác định các kỳ đầu, kỳ giữa và kỳ cuối có trong khoảng 1000 tế bào, từ đó tính được tỷ lệ % các tế bào có nhân đang xảy ra phân bào. Tổng số % của những tỷ lệ đó được gọi là chỉ số phân bào.

## IV - ĐẶC ĐIỂM CỦA NUÔI CẤY HUYỀN PHÙ TẾ BÀO

Nuôi cấy huyền phù tế bào thường được khởi đầu bằng cách chuyển 1 mảnh mô sẹo vào môi trường lỏng và được chuyển động trong suốt thời gian nuôi cấy. Có thể sử dụng những loại mô đã biệt hoá cho nuôi cấy huyền phù tế bào, nhưng chỉ dùng được một số loại như lá mầm, trụ dưới lá mầm. Trong quá trình nuôi cấy, các tế bào sẽ dần dần tách ra khỏi mẫu do những chuyển động xoáy của môi trường, nhưng không có dịch huyền phù nào chỉ chứa các tế bào đơn (Butcher và Inglam, 1976). Sau một thời gian ngắn nuôi cấy, trong dịch huyền phù là một hỗn hợp của các tế bào đơn, các cụm tế bào với kích thước khác nhau, các mảnh còn lại của mẫu cấy và các tế bào chết. Tuy nhiên cũng có những dịch huyền phù hoàn hảo, chứa tỷ lệ cao các tế bào đơn và tỷ lệ nhỏ các cụm tế bào. Mức độ tách rời các tế bào trong nuôi cấy phụ thuộc vào đặc tính của các khối tế bào xốp, được hình thành từ phân bào và có thể được điều chỉnh bởi thay đổi thành phần môi trường. Khi tăng tỷ lệ auxin/cytokinin thì trong một số trường hợp sẽ sản sinh nhiều khối tế bào xốp. Theo King và Street (1977), không có một quy trình chuẩn nào cho nuôi cấy huyền phù tế bào, vì vậy chọn lựa điều kiện và môi trường nuôi cấy thích hợp là những nghiên cứu đầu tiên trong nuôi cấy huyền phù tế bào.

Nuôi cấy huyền phù tế bào khởi đầu cần một lượng mô sẹo khá lớn, xấp xỉ 2-3g/100ml dung dịch môi trường (Helgeson, 1979). Trong nuôi cấy huyền phù tế bào cà rốt (*Daucus carota L.*), mỗi bình nuôi cấy với 25ml môi trường cần từ 0,5-0,75g mô sẹo. Khi mô sẹo được đưa vào môi trường, đó là thời điểm bắt đầu của pha lag, pha này kéo dài cho đến khi có dấu hiệu phân chia tế bào đầu tiên. Tiếp theo là pha hàm số mũ có số lượng phân bào tăng dần và tăng mạnh quần thể tế bào thuộc pha tuyến tính. Sau

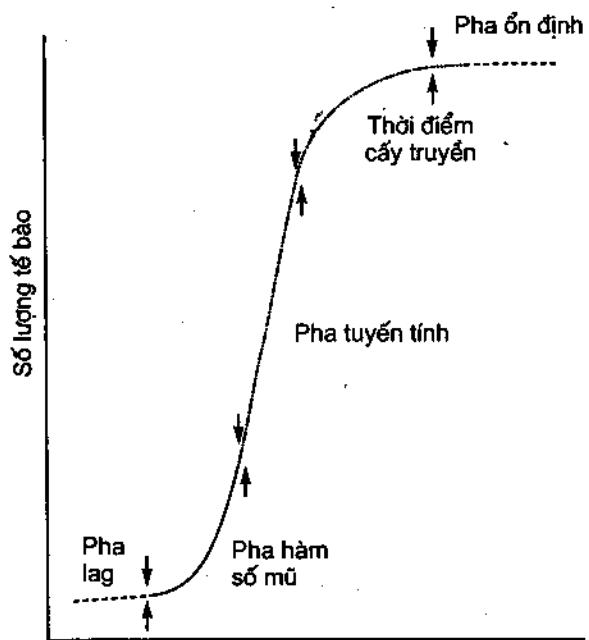
đó tỷ lệ phân bào giảm dần và cuối cùng các tế bào đi vào pha ổn định, chúng không phân chia, số lượng tế bào ở mức bão hòa. Để duy trì quá trình nuôi cấy, các tế bào cần được cấy truyền vào giai đoạn sớm của pha ổn định.

Do sức sống của các tế bào trong pha ổn định là không giống nhau khi dùng những vật liệu khác nhau cho nuôi cấy huyền phù, cho nên thường cấy truyền vào giai đoạn đầu của pha ổn định và thời điểm cụ thể là dựa vào kinh nghiệm, nhưng nói chung cấy truyền nên bắt đầu khi mật độ tế bào là cực đại. Đối với nhiều thí nghiệm nuôi cấy huyền phù, mật độ tế bào cực đại đạt được trong khoảng 18-25 ngày, tuy nhiên những huyền phù sinh trưởng mạnh thì thời gian này có thể ngắn hơn từ 6-9 ngày (Street, 1977). Ở lần cấy truyền đầu tiên, dịch nuôi cấy cần được lọc nhằm loại bỏ các cụm tế bào lớn, các mảnh từ mẫu cấy ban đầu, sau đó dùng pipet để lấy dịch cấy truyền. Lượng tế bào đem cấy truyền phải đủ lớn để đảm bảo mật độ tế bào, vì khi thấp quá, các tế bào sẽ không sinh trưởng được. Trong nuôi cấy các tế bào cây sung dâu (sycamore, *Acer pseudoplatanus*), mật độ tế bào thích hợp là từ  $9-15 \cdot 10^3$  tế bào/ml (Street, 1977).

Theo King (1980), những tế bào trải qua quá trình nuôi cấy, sinh trưởng và trao đổi chất trong dịch huyền phù gọi là dòng tế bào. Một số đặc điểm của dòng tế bào như sau :

- Khả năng tách tế bào cao.
- Phát sinh hình thái đồng nhất.
- Nhận rõ ràng và tế bào chất đậm đặc.
- Nhiều hạt tinh bột.
- Tương đối ít các yếu tố mạch.
- Có khả năng nhân đôi trong 24-72 giờ.
- Mất tính toàn năng.
- Quen với chất sinh trưởng.
- Tăng mức đa bội thể.

Nuôi cấy huyền phù tế bào có thể được phân biệt thành các kiểu : nuôi cấy kín và nuôi cấy mở. Trong hệ thống nuôi cấy kín, tất cả các tế bào được giữ lại, làm cho mật độ tế bào tăng lên cho đến khi đạt tới pha ổn định. Ở hệ thống nuôi cấy kín, cần có một dòng liên tục môi trường mới và thu hồi môi trường đã sử dụng. Hệ thống nuôi cấy mở tương tự như hệ thống nuôi cấy kín trong thay mới môi trường dinh dưỡng, nhưng khác ở chỗ các tế bào sẽ được lấy ra khỏi hệ thống. Có 2



Hình 3.1. Đường cong sinh trưởng của huyền phù tế bào nuôi cấy

kiểu chính trong hệ thống nuôi cấy mở : Chemostass và turbidostass. Trong chemostass dòng môi trường mới liên tục được đưa vào hệ thống và được thiết lập sẵn ở tốc độ nào đó, dòng môi trường sẽ quy định tốc độ sinh trưởng của nuôi cấy.

Đối với turbostass, mật độ tế bào được xác lập trước ở một số mức độ, còn môi trường mới được bổ sung tuần hoàn để duy trì mật độ đó. Mật độ tế bào được quyết định nhờ thiết bị điều khiển photocell.

Hiện nay có nhiều hệ thống nuôi cấy huyền phù tế bào hiện đại, cho phép nghiên cứu chi tiết về sinh trưởng của tế bào, sinh lý dinh dưỡng, sản xuất các chất trao đổi thứ cấp... Nhiều hệ thống đã được ứng dụng để sản xuất trên quy mô thương mại.



Hình 3.2. Thiết bị nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật

(Nguồn : Rhodes và Wilson)

## THÍ NGHIỆM NUÔI CẤY HUYỀN PHÙ TẾ BÀO

### *Nguồn liệu và thiết bị :*

- Mẫu cây Cỏ nón (*Dactylis glomerata L.*).
- Máy lắc.
- Pipet 25ml.
- Giấy nhôm và parafilm (parafilm).
- Dao, kéo, panh... dùng cho nuôi cấy.
- Môi trường SH :

SH-0 bao gồm muối khoáng SH và các hợp chất hữu cơ (bảng phân phụ lục), 30mg/l saccarozơ, điều chỉnh pH đến 5,4 trước khi khử trùng. Môi trường này dùng cho phôi nảy mầm.

SH-30 : giống SH-0 nhưng có thêm 6,6mg/l dicamba.

SH-30C : là môi trường SH-30 được bổ sung thêm 3,0g/l casein thuỷ phân.

- Bình tam giác 125ml :

Các bình A (4 bình) : Mỗi bình chứa 10ml môi trường lỏng SH-30.

Các bình B (12 bình) : Mỗi bình chứa 20ml môi trường lỏng SH-30.

Các bình C (4 bình) : Mỗi bình chứa 20ml môi trường lỏng SH-30C.

- Đĩa petri vô trùng và đĩa petri chứa môi trường đặc SH-0, SH-30.

**Tiến hành :**

1. Lấy khoảng 2,0g mô sẹo phôi hóa sinh trưởng nhanh và cho vào bình tam giác A đã chứa 10ml môi trường SH-30 (tổng số có 4 bình).
2. Bít kín các bình bằng giấy nhôm vô trùng và quấn kỹ với giấy parafin. Tiếp theo đặt các bình lên máy lắc, điều chỉnh tốc độ máy ở 75 vòng/phút và để vào trong tối.
3. Sau khoảng 2 tuần nuôi cấy, thêm vào mỗi bình tam giác A 20ml môi trường SH-30 và lắc ở tốc độ 100 vòng/phút trong 2 tuần kế tiếp.
4. Duy trì sự sinh trưởng qua cấy truyền bằng cách đổ một nửa bình nuôi cấy A vào bình tam giác B sau 2 tuần nuôi cấy (tổng số có 8 bình B).
5. Quan sát sự sinh trưởng của các tế bào trong nuôi cấy, những tế bào phôi hóa có tế bào chất nhỏ và đậm đặc.
6. Để cảm ứng phát sinh phôi, chuyển một nửa số bình nuôi cấy sang các bình tam giác C (4 bình), nửa còn lại đưa sang các bình tam giác B mới (4 bình). Duy trì các nuôi cấy như trước và quan sát hai lần một tuần.
7. Sau 4 tuần sinh trưởng trong các môi trường SH-30 và SH-30C, loại bỏ dung dịch môi trường và đưa các tế bào, khối tế bào sang đĩa petri vô trùng.
8. Chuyển các cụm tế bào nhỏ (có đường kính khoảng 3mm) vào các đĩa petri chứa môi trường SH-30, với mật độ 5 khối tế bào/đĩa và đưa ra nuôi có ánh sáng. Quan sát sự sinh trưởng của mẫu hàng tuần trong thời gian khoảng 4 tuần nuôi cấy sẽ thấy các khối mô sẹo được hình thành ở tất cả các đĩa petri. Nhưng chỉ có các mô sẹo có nguồn gốc từ nuôi cấy trên môi trường SH-30C mới có khả năng tạo ra phôi và nảy mầm thành cây con khi đưa sang môi trường SH-0.

Như vậy cả 2 môi trường SH-30 và SH-30C đều hỗ trợ sự tăng sinh của tế bào phôi hóa nhưng chỉ có môi trường chứa casein thuỷ phân mới thúc đẩy sự phát triển của tế bào thành phôi vô tính.

## Chương 4

# NUÔI CẤY BAO PHẦN VÀ HẠT PHẦN

### I - MỞ ĐẦU

Cây lúa mỳ đơn bội được phát hiện thấy lần đầu tiên là con lai khác loài giữa *Triticum compactum* và *Aegilops cylindrica* (Aase, 1926). Kể từ đó, hiện tượng đơn bội đã được ghi nhận ở nhiều loài khác thuộc nhóm lúa mỳ : *T. monococcum* (Kihara và Kytayama, 1933), *T. turgidum* (Nakajima, 1935), *T. vulgare* (Yamasaki, 1934). Hạt phấn ở thực vật bậc cao thể hiện giai đoạn đơn bội (thể giao tử đực) và có kiểu sinh trưởng xác định để thực hiện chức năng trong sinh sản hữu tính. Ở thực vật hạt kín, các hạt phấn là những cấu trúc chuyên hoá cao, bao gồm tế bào sinh dưỡng (vegetative cell) và tế bào sinh sản (generative cell). La Rue (1954) đã đưa ra ý tưởng nuôi cấy hạt phấn của thực vật bậc cao để kiểm tra tiềm năng sinh trưởng của chúng và khảo sát xem chúng có giữ được khả năng tăng sinh trong môi trường nuôi cấy hay không. Trong tự nhiên, sự phát triển khác thường của các hạt phấn thành những cấu trúc giống túi phôi đã xảy ra ở một số thực vật như *Hyacinthus* (Stow, 1934) và *Leptomeria* (Manasi Ram, 1959). Hiện tượng này đã cho thấy, các hạt phấn có khả năng phân chia để hình thành các tế bào mới hoặc các mô khi được sinh trưởng trong những điều kiện thích hợp.

Tulecke (1953) đã làm thí nghiệm với các hạt phấn trưởng thành của một loài thực vật hạt trần (cây bạch quả, *Ginkgo biloba*), chúng có thể cảm ứng và hình thành một khối mô seо đơn bội. Guha và Maheshwali (1964, 1966, 1967) đã thông báo về sự phát triển của phôi và cây con trong nuôi cấy bao phấn cây cà độc dược (*Datura innoxia*) và xác nhận nguồn gốc của chúng là từ hạt phấn chưa trưởng thành. Những thí nghiệm này đã khởi đầu cho nhiều nghiên cứu nuôi cấy hạt phấn của các loài thực vật hạt kín khác.

Nhiều loài cây trồng có mức độ dị hợp tử cao, phải cần nhiều năm nuôi trồng cẩn thận để tạo ra các dòng thuần qua tự thụ phấn. Bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn và hạt phấn, có thể tái tạo được cây trực tiếp qua sự phân chia và biệt hoá tế bào. Từ hạt phấn và bao phấn cũng có thể tái sinh cây qua con đường gián tiếp, thường xảy ra ở các loài họ hoa thảo. Những cây tái sinh có số lượng nhiễm sắc thể bằng với số lượng nhiễm sắc thể có trong giao tử của cây bố mẹ. Các hạt phấn tách rời từ những ô của bao phấn cũng đã được nuôi cấy thành công, hình thành các khối mô seо, các cấu trúc phôi và cuối cùng là cây con.

Với sự tiến bộ của kỹ thuật nuôi cấy tế bào đã tạo ra khả năng tái sinh cây trên phạm vi lớn các cơ quan thực vật. Việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy đã mở ra tiềm năng to lớn trong nuôi cấy cảm ứng đơn bội của cây trồng, đáng chú ý ở lúa, lúa mỳ, lúa mỳ

đen, đại mạch và các loài thuộc họ cà như thuốc lá, cà chua, khoai tây, *Capsicum*, *Asparagus*...

Nuôi cây bao phấn non chưa có nhiều kết quả, ngoại trừ nuôi cây bao phấn của cây *Trillium erectum* (Sparow và cộng sự, 1955). Vasil (1959) đã thành công trong nuôi cây bao phấn non của *Allium cepa* ở giai đoạn pachytene - diplotene và giai đoạn diakinesis, làm cho chúng sinh trưởng đến giai đoạn hạt phấn tách rời hoặc tiểu bào tử. Ở cây *Atropa belladonna*, các tế bào mẹ hạt phấn khi được nuôi cấy đã trải qua những phân chia lặp lại để hình thành 6-8 tiểu bào tử hoặc một cấu trúc đa bào (Bajaj, 1974)... Kể từ những thông báo thành công đầu tiên của Guha và Maheshwari, nuôi cấy đơn bộ đã được báo cáo ở hơn 170 loài, phân bố trong 70 giống của thực vật một lá mầm và hai lá mầm.

## II - ĐẶC ĐIỂM CỦA NUÔI CẤY BAO PHẤN VÀ HẠT PHẤN

Các thực vật đơn bộ là những đối tượng rất hữu ích trong các chương trình chọn giống thực vật để chọn những đặc điểm mong muốn, bởi vì kiểu hình của chúng là biểu hiện của các bản sao đơn, không bị các gen trội lấn át. Vấn đề cũng tương tự như đối với các dòng đa bộ đồng hợp hoàn toàn, kiểu hình sẽ phản ánh chính xác kiểu gen.

Nuôi cây bao phấn và hạt phấn là nhằm tạo ra những cây đơn bộ qua sự cảm ứng phát sinh phôi từ những phân chia lặp lại của các bào tử đơn bộ, các tiểu bào tử, các hạt phấn non. Các tiểu bào tử là đại diện cho sự bắt đầu của thế hệ thế giao tử đực. Các hạt phấn là những tiểu bào tử trưởng thành (chín), chúng được giải phóng ra từ thế tử bộ. Sự bổ sung nhiễm sắc thể của những dạng đơn bộ này có thể được gấp đôi nhờ conixin (cochicine) hoặc qua các kỹ thuật tái sinh để tạo ra thế lưỡng bộ đồng hợp tử hữu thụ (Vasil và Nitsch, 1975).

Giai đoạn phát triển đặc thù của bao phấn tại thời điểm nuôi cấy là nhân tố quan trọng nhất đối với sự thành công của phát sinh phôi. Ở thực vật hạt kín, mỗi chồi hoa có thể chứa các bao phấn ở những giai đoạn phát triển khác nhau. Vì vậy các chồi hoa phải được kiểm tra để xác định tất cả các giai đoạn phát triển giúp lựa chọn những bao phấn có độ tuổi phù hợp cho nuôi cấy.

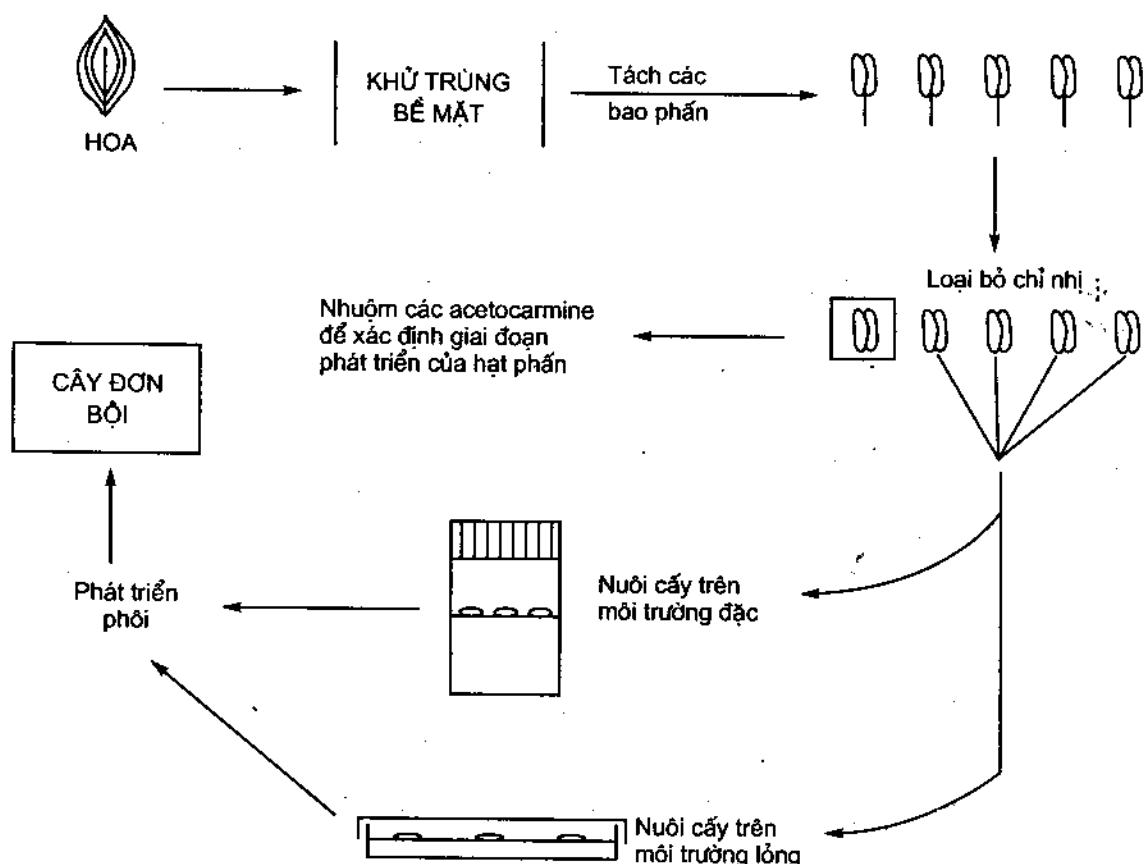
Có 2 phương pháp cơ bản được sử dụng trong nuôi cấy bao phấn và hạt phấn.

1. Các bao phấn được nuôi cấy trên môi trường có agar hoặc môi trường lỏng và sự phát sinh phôi xảy ra trong bao phấn.

2. Hạt phấn được tách rời khỏi bao phấn, hoặc bằng phương pháp cơ học, hoặc do sự nứt nẻ tự nhiên của bao phấn và được nuôi cấy trên môi trường lỏng.

Theo Reinert và Bajaj (1977), đối với nhiều loài thực vật phải cần từ 3-8 tuần nuôi cấy để cây con đơn bộ xuất hiện rõ từ các bao phấn. Sunderland (1979) cho rằng trong hoa của nhiều loài thực vật, sự phát triển tự nhiên của hạt phấn có thể chia làm 3 kiểu : tiền nguyên phân (premitotic), nguyên phân (mitotic) và hậu nguyên phân (postmitotic). Trong tiền nguyên phân, tốt nhất là dùng các bao phấn có chứa các tiểu

bào tử đã hoàn thành giảm phân nhưng chưa bắt đầu lần phân bào hạt phấn đầu tiên, như các loài *Hyoscyamus*, *Hordeum vulgare*. Đối với những thực vật mà hạt phấn thuộc nhóm nguyên phân thì thời điểm thích hợp để nuôi cấy hạt phấn là lần phân chia đầu tiên, chẳng hạn các loài thuốc lá (*Nicotiana tabacum*), cà độc dược (*Datura innoxia*), *Paconia*. Giai đoạn 2 tế bào sớm của sự phát triển hạt phấn là tốt nhất cho nuôi cấy những thực vật có hạt phấn thuộc kiểu hậu nguyên phân, bao gồm một số loài : *Atropa belladonna*, thuốc lá (*Nicotiana spp.*). Có thể dựa vào các đặc điểm hình thái của chồi hoa để xác định giai đoạn phát triển của bao phấn và hạt phấn. Ở loài thuốc lá *N. tabacum*, các chồi hoa với những cánh hoa chưa hình thành rõ có thể chứa những bao phấn ở giai đoạn thích hợp của sự phát triển đối với nuôi cấy, mặc dù có những sai khác giữa các giống khác nhau.



Hình 4.1. Sơ đồ tạo cây đơn bội từ nuôi cấy bao phấn

Trong nuôi cấy bao phấn và hạt phấn, vấn đề quan trọng là phải xác định số lượng nhiễm sắc thể của những cây con mới được hình thành, bởi vì nhiều khả năng có những thay đổi đáng kể, mức độ đa bội, phụ thuộc vào các sự kiện xảy ra trong quá trình hình thành phôi. Những cây dị hợp tử lưỡng bội có thể được tạo ra từ mô bao phấn hoặc từ sự sinh trưởng của tế bào mẹ tiểu bào tử. Sự phát triển của các thể 2 nhân hoặc 4 nhân chưa hoàn chỉnh thường tạo ra những cây dị hợp tử do lai chéo trước khi xảy ra phân

bào đầu tiên. Nhị bội hoá nhiễm sắc thể và dung hợp nhân có thể tạo ra dạng đồng hợp tử với những mức độ bội thể khác nhau. Những cây con đã hình thành từ mô seos được phát sinh từ tiểu bào tử đơn bội có thể bao gồm cả dạng đột biến và dạng khâm (Thomas và Davey, 1975). Mức bội thể của 2496 cây lúa có nguồn gốc từ nuôi cấy hạt phấn là 35,5% đơn bội, 53,3% lưỡng bội, 5,2% đa bội và 6% bội tạp (Hu Han và cộng sự, 1978).

Tiềm năng sử dụng của cây đơn bội và các dòng đồng hợp tử trong chương trình chọn giống thực vật đã được ghi nhận từ lâu. Việc dùng các phương pháp cổ điển để nhận cây đơn bội và chọn những phôi kép, những cây đa bội... đều rất tốn công sức và kém hiệu quả. Nuôi cấy bao phấn và hạt phấn ra đời đã làm giảm hẳn thời gian, đồng thời làm tăng vọt số lượng các thể đơn bội thu được. Một lĩnh vực quan trọng của nghiên cứu là liên quan đến sự phát triển của các dòng đồng hợp tử đối với việc tạo ra những con lai giữa các loài không tương hợp, chẳng hạn giữa lúa mỳ đen và cải dầu. Nuôi cấy tiểu bào tử có tầm quan trọng trong nghiên cứu đột biến, do các đột biến không bị lấn át trong các thể đơn bội bởi vì không có khái niệm gen trội. Để những nghiên cứu này thành công, một số lượng lớn các tiểu bào tử cần được sử dụng cho quá trình tạo phôi trên các môi trường dinh dưỡng. Các thể đơn bội phải giữ được tính di truyền ổn định và phải có khả năng tái sinh thành cây lưỡng bội từ những thể đơn bội.

### **III - CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG TẠO CÂY ĐƠN BỘI**

#### **3.1. Tuổi hạt phấn**

Nitsch (1967) nhận thấy cây đơn bội chỉ thu được khi cấy bao phấn chứa hạt phấn ở giai đoạn phát triển thích hợp, bắt đầu từ thế 4 nhân cho đến ngay sau nguyên phân đầu tiên. Ở thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) và cây kỳ nham đen (*Hyoscyamus niger*), lúa (*Oryza sativa*) hạt phấn ở giai đoạn đơn nhân muộn cho hiệu quả tạo phôi cao nhất. Ngược lại ở một số loài như đại mạch, giai đoạn tốt nhất cho nuôi cấy là hạt phấn đơn nhân sớm.

#### **3.2. Trạng thái sinh lý của cây cho bao phấn và hạt phấn**

Kết quả tạo cây đơn bội phụ thuộc nhiều vào trạng thái sinh lý của cây bố, mẹ cho bao phấn và hạt phấn. Tuy nhiên trạng thái sinh lý của cây lại liên quan đến điều kiện môi trường mà cây sinh trưởng như quang chu kỳ, cường độ ánh sáng, nhiệt độ và dinh dưỡng khoáng. Khả năng thành công của nuôi cấy là cao nhất với những bao phấn thu trong lần trổ hoa đầu tiên và giảm dần trong những lần trổ hoa tiếp theo. Sử dụng bao phấn từ những cây sinh trưởng dưới cường độ ánh sáng cao, ngày ngắn sẽ cho hiệu quả tạo phôi cao hơn (Dunwell, 1976).

#### **3.3. Tiền xử lý bao phấn và hạt phấn**

Để làm tăng hiệu quả của quá trình nuôi cấy bao phấn và hạt phấn, nhiều nhà nghiên cứu đã tiến hành xử lý mẫu trước khi cấy. Keller và Armstrong (1978, 1979,

1983) cho rằng xử lý trước chồi hoa cây cải bẹ (*Brassica campestris*) ở  $30-45^{\circ}\text{C}$  trong 1 giờ và chồi hoa cây cải dầu (*B. napus*) ở  $40^{\circ}\text{C}$  trong 3 giờ đã thúc đẩy khả năng tạo phôi từ bao phấn nuôi cấy. Các giống lúa *Indica* được xử lý trước ở  $35^{\circ}\text{C}$  trong 5 phút, tiếp theo là  $10^{\circ}\text{C}$  trong 7 phút đã kích thích phản ứng sinh trưởng tốt của hạt phấn nuôi cấy. Hạt phấn của cây hoa trà (*Camellia sinensis*) khi xử lý ở  $30^{\circ}\text{C}$  và  $35^{\circ}\text{C}$  trong thời gian 2 hoặc 5 giờ trước khi được nuôi cấy ở nhiệt độ  $25^{\circ}\text{C}$  đã cho tỷ lệ hình thành mô sẹo và thể phân sinh cao (Saha và Bhattacharya, 1988).

Nhiều ý kiến cho rằng, xử lý lạnh ( $1-10^{\circ}\text{C}$ ) trong thời gian 14-72 giờ, thậm chí tới 15 ngày trước khi cấy đã làm tăng tỷ lệ tạo mô sẹo từ bao phấn *Datura innoxia*, *D. metel*, *Hyoscyamus niger*, *Brassica napus* (Tyagi và cộng sự, 1979 ; Gupta và Babbar, 1980 ; Sunderland và Wildon, 1979 ; Dunnell và cộng sự, 1985).

Một số tác giả đã kết hợp xử lý lạnh với gây sốc ở nhiệt độ cao ( $31-37^{\circ}\text{C}$ ) để kích thích phát sinh phôi từ hạt phấn *Brassica juncea*. Xử lý chồi hoa của cây *Physalis ixocarpa* Brot. trong 2 ngày ở  $3^{\circ}\text{C}$  trong tối đã cho tỷ lệ tạo phôi cao hơn cây bình thường (Bapat và Wenzel, 1982). Phương pháp xử lý chồi hoa thuốc lá *Nicotiana tabacum* ở  $7-8^{\circ}\text{C}$  trong 12 ngày trước khi cấy đã cho kết quả tạo cây cao (Sunderland và Robert, 1977). Nhiệt độ thấp làm ngừng chu trình phân bào ở nhiều tiểu bào tử và giai đoạn đơn nhân muộn, làm thay đổi kết quả nguyên phân hoặc kéo dài thời gian để hạt phấn phát triển theo hướng sinh dưỡng (Ledoux, 1974). Xử lý nhiệt độ lạnh đã làm tăng khả năng tạo mô sẹo và cây từ bao phấn, đồng thời cũng cho phép bảo quản mâu lâu hơn.

Dunwell (1976) cho rằng ở nhiều loại thực vật, bao phấn thu từ những cây sinh trưởng dưới cường độ ánh sáng cao, trong điều kiện ngày ngắn sẽ cho hiệu quả tạo phôi cao hơn. Cường độ ánh sáng cao có biểu hiện kích thích phát sinh phôi ở một số giống thuốc lá (Phillips và Collin, 1977) trong khi lại có hiệu quả ức chế đối với cà đực dược và *Triticale* (Sopory và Maheshwari, 1976 ; Chu 1982). Cường độ ánh sáng thấp (1500 lux) và quang chu kỳ 16 giờ/ngày ở  $28^{\circ}\text{C}$  và 8 giờ ban đêm ở  $20^{\circ}\text{C}$  đã cho kết quả tạo cây đơn bội tốt nhất đối với *Hyoscyamus niger* (Corduan, 1975).

### 3.4. Kiểu gen

Tần số tạo cây đơn bội liên quan chặt chẽ đến kiểu gen và thay đổi theo các chi, các loài và giữa các loài phụ, giữa các giống. Kết quả nuôi cấy bao phấn thuốc lá *N. langsdorffii* thường thấp hơn khi so sánh với những loài khác thuộc cùng một chi (Durr và Fleck, 1980). Tỷ lệ hình thành phôi cũng khác nhau rõ rệt giữa các giống thuốc lá thuộc loài *Nicotiana tabacum* khi chúng được xử lý ở nhiệt độ  $14^{\circ}\text{C}$  trong 5 ngày. Ở lúa, nuôi cấy bao phấn và hạt phấn của những giống thuộc loài phụ *Indica* là dễ dàng hơn các giống của loài phụ *Japonica*. Sự khác nhau đó có thể do mỗi kiểu gen cần một tập hợp những điều kiện tối ưu cho quá trình tạo mô sẹo và phát sinh phôi. Picard và De Buyser (1977) kết luận rằng, bao phấn của cây lúa mỳ đơn bội kép cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao gấp 3-10 lần cây lúa mỳ bình thường.

### 3.5. Mật độ bao phấn/hạt phấn

Phản ứng sinh trưởng trong nuôi cấy đơn bội bị chi phối bởi mật độ bao phấn/hạt phấn nuôi cấy trên môi trường và thay đổi tùy theo loài thực vật. Mật độ nuôi cấy tối ưu đối với lúa mỳ là hơn 60 bao phấn/5ml môi trường (Xu và Sunderland, 1983). Đối với cây *Brassica napus*, mật độ nuôi cấy thấp hơn nhiều, khoảng 6 bao phấn/ml môi trường hoặc  $2-5 \cdot 10^4$  tiểu bào tử/ml môi trường (Cardy, 1986).

Sự cảm ứng tạo mô sẹo cũng phụ thuộc nhiều vào cách cấy bao phấn trên môi trường. Ở lúa mỳ, những ô của bao phấn tiếp xúc với agar sẽ cho kết quả tạo mô sẹo tốt hơn những vị trí khác của bao phấn. Các nghiên cứu tái sinh từ mô sẹo hạt phấn đã cho thấy nên dùng những mô sẹo sơ cấp cho quá trình tái sinh chồi nhằm làm giảm đến mức thấp nhất những kiểu biến dạng do những thay đổi về mặt tế bào có thể xảy ra trong quá trình nuôi cấy. Trong nuôi cấy bao phấn cây brocolli (*Brassica oleracea* var. Italia), sự hình thành phôi đạt kết quả tốt nhất ở giá trị pH 5,5-5,8 và nhiệt độ nuôi cấy là  $35^{\circ}\text{C}$  (Arnison và cộng sự, 1990).

### 3.6. Dinh dưỡng, hoocmon và các nhân tố khác

Trong nuôi cấy bao phấn và hạt phấn, dựa vào yêu cầu về thành phần môi trường, có thể chia các loài thực vật thành 2 nhóm :

- Nhóm 1 : Gồm các loài thực vật chỉ cần thành phần khoáng, đường và vitamin.
- Nhóm 2 : Ngoài những thành phần như trên, môi trường nuôi cấy cần được bổ sung thêm các chất kích thích sinh trưởng, aminoaxit và các chất khác.

Những môi trường thường được sử dụng trong nuôi cấy bao phấn và hạt phấn là môi trường của Murashige và Skoog (MS-1962), Linsmayer và Skoog (LS-1965), Bourgin và Nitsch (N-1967), Gamborg (B5-1968), Chu Chin Ching (N6-1976). Các môi trường có nồng độ khoáng thấp như môi trường của White (W-1963), môi trường của Guha và Maheswari (GM-1966) khi được bổ sung thêm cazein thuỷ phân, dịch chiết nấm men... đã cho kết quả khá tốt ở một số loài thực vật. Nitsch (1971) đã nuôi cấy hạt phấn cây cà độc dược (*Datura innoxia*) trên môi trường lỏng có 50% thành phần môi trường MS. Sunderland (1974) đã làm thí nghiệm tương tự với cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) nhưng dùng môi trường lỏng N có 100% thành phần. Sau 72-96 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ  $25-30^{\circ}\text{C}$ , các hạt phấn từ những loài trên đã hình thành những cấu trúc phôi đa bào.

Các cải tiến về thành phần môi trường bao gồm thay đổi nồng độ dinh dưỡng khoáng, đặc biệt là nitơ và bổ sung nguồn dinh dưỡng hữu cơ đã làm tăng rõ rệt kết quả tạo phôi từ nuôi cấy hạt phấn (Wenzel và Foroughi - Wehr, 1984). Trong nuôi cấy bao phấn và hạt phấn lúa mỳ (*Triticum*), *Triticale* và ngô (*Zea mays*), môi trường MS được cho là khá thích hợp. Miller (1963) đã thay đổi nồng độ các chất của môi trường MS, tăng nitrat và giảm hàm lượng amon trong nuôi cấy bao phấn lúa. Theo nhiều nghiên cứu đã công bố, đối với lúa và hầu hết các loài thuộc nhóm ngũ cốc, môi trường N6 rất

thích hợp trong cảm ứng mô sẹo đơn bội và tái sinh cây hơn bất cứ công thức môi trường nào khác. Nồng độ cao của amon có biểu hiện ức chế quá trình cảm ứng mô sẹo từ hạt phấn. Bởi vậy điều chỉnh tỷ lệ nitơ dạng nitrat và amon trong nhiều trường hợp có tính quyết định đối với sinh trưởng và phát sinh hình thái. Trong nuôi cấy bao phấn cây cải bẹ (*Brassica campestris*), chúng đã sinh trưởng tốt trên công thức cải tiến từ môi trường B5 của Gamborg.

Theo Sunderland (1977), các auxin và kinetin ngoại sinh có ảnh hưởng không rõ rệt đến phân chia hạt phấn của thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) và cà đực dược (*Datura innoxia*). Việc xác định mức độ của chất kích thích sinh trưởng và những chất khác trước khi nuôi cấy là những thông tin hữu ích trong điều chỉnh nồng độ auxin ngoại sinh và hàm lượng các chất dinh dưỡng, mặc dù có rất nhiều yếu tố tác động đến sinh trưởng và phát triển của mô sẹo, của phôi... Trong đa số nuôi cấy bao phấn, các auxin ngoại sinh (IAA, NAA, IBA) và cytokinin (zeatin, kinetin, BAP) cần được đưa vào môi trường để thúc đẩy quá trình phát sinh phôi hạt phấn (Maheshwari và cộng sự, 1982), nồng độ sử dụng tối ưu của chúng thay đổi từ loài thực vật này sang loài thực vật khác, nhiều khi là giữa các giống trong phạm vi một loài. Ngoài ra, tỷ lệ giữa các chất kích thích sinh trưởng cũng có vai trò quan trọng trong cảm ứng mô sẹo và tái sinh cây. Môi trường tạo mô sẹo có 2,4D ở nồng độ 2,0mg/l là phù hợp cho hầu hết các giống lúa. NAA cũng kích thích mạnh quá trình tạo mô sẹo từ bao phấn lúa nhưng chúng thường phân hoà rẽ khi đạt độ lớn thích hợp cho tái sinh cây. Theo Chu và cộng sự (1976), mô sẹo từ hạt phấn có thể tái sinh cây ngay trên môi trường có auxin ở nồng độ thấp, nhưng tốt hơn là ở môi trường không có auxin.

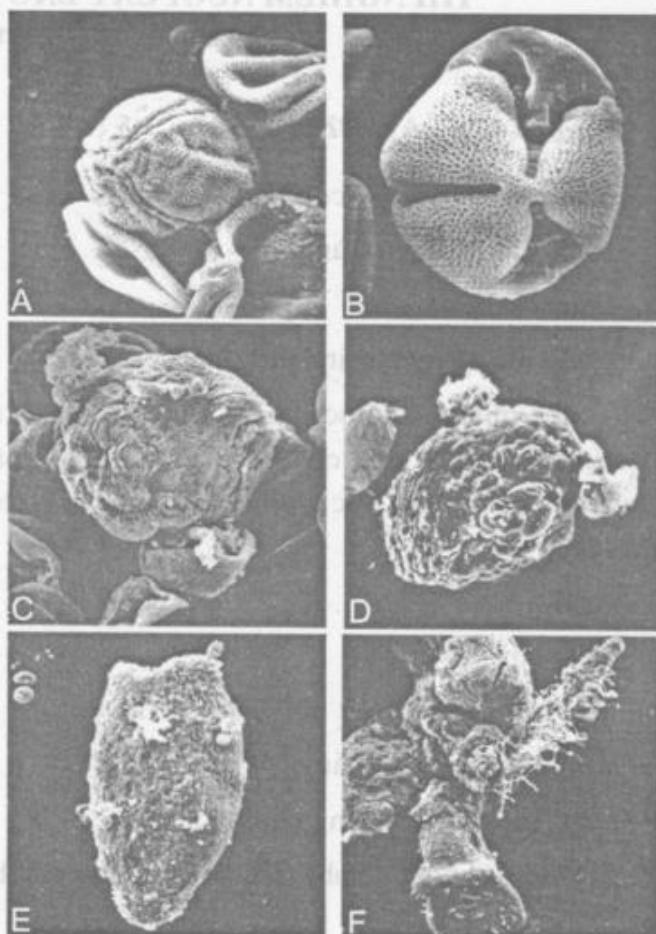
Cytokinin được coi là rất cần thiết cho phát triển phôi hạt phấn ở hầu hết các loài thuộc họ cà, trừ thuốc lá. Với những loài thực vật này, môi trường được bổ sung thêm IAA ; 2,4D ; NAA ; kinetin ; pCPA và nước dừa đã kích thích mạnh quá trình phát sinh phôi hạt phấn (Reynolds, 1984 ; Sopory và cộng sự, 1978).

Các nguồn chất hữu cơ không xác định như dịch chiết khoai tây, cà chua, dịch chiết nấm men... và các aminoaxit, glutamin có tác động tích cực đối với sinh trưởng trong nuôi cấy bao phấn của nhiều loài thực vật. Môi trường nuôi cấy được đưa vào 100g dịch chiết khoai tây đã cho kết quả khá tốt trong nuôi cấy bao phấn của thuốc lá, lúa và lúa mỳ (Anonymous, 1976, 1977). Myo-inositol (5g/l) có ảnh hưởng tích cực trong phát sinh phôi hạt phấn ở nhiều thành viên của họ cà.

Than hoạt tính có tác dụng kích thích phát sinh phôi vô tính cũng như thúc đẩy sự khởi đầu của phôi từ mô bao phấn đơn bội. Hiệu quả tích cực của than đã được chứng minh trong nuôi cấy bao phấn của thuốc lá (Anagnostakis, 1974 ; Bajaj, Reinert và Heberle, 1977), lúa mạch đen (Wenzel, Hoffmann và Thomas, 1977), khoai tây (Sopory, Jacobsen và Wenzel, 1978) và các thực vật khác. Than hoạt tính có khả năng hấp phụ chất 5 hydroxymethyl-2-furfural, một sản phẩm phân huỷ của đường saccarozơ

sau khi hấp vô trùng (Weatherhead, Bordon và Henshaw, 1978). Thí nghiệm nuôi cấy hạt phấn cây *Petunia* và *Nicotiana* đã chứng minh giả thuyết than hoạt tính hấp phụ các chất có trong môi trường, các sản phẩm sinh ra từ vỏ bao phấn, tế bào già... (Martineau Hanson và Ausubel, 1981). Mặc dù vai trò chính xác của than hoạt tính vẫn chưa được hiểu rõ nhưng việc sử dụng than đã tăng cường sản sinh cây con đơn bội từ bao phấn.

Trong nuôi cấy bao phấn, có thể dùng môi trường đặc hay môi trường lỏng. Khi môi trường đặc được sử dụng, cần lựa chọn agar có độ tinh khiết cao sẽ có hiệu quả hơn cho quá trình tạo mô sẹo và cây con (Kohlenbach và Wernickle, 1978). Hàm lượng đường saccarozơ được đưa vào môi trường thay đổi theo đối tượng nuôi cấy. Hạt phấn ngô sinh trưởng tốt nhất trên môi trường có 12-15% đường saccarozơ, trong khi hạt phấn của mía cần hàm lượng đường khá cao, tới 20% (Anonymous, 1975 ; Miao và cộng sự, 1978 ; Chen và cộng sự, 1980). Nồng độ saccarozơ được sử dụng phổ biến từ 2-3%, ở các cây hoa thảo dùng cao hơn, như đối với lúa là 5-6%. Ouyang và cộng sự (1973) cho rằng, trong nuôi cấy bao phấn lúa mỳ, tỷ lệ tạo mô sẹo tăng khi nồng độ saccarozơ tăng, đồng thời kìm hãm mô sẹo từ tế bào xoma, nhưng khi lượng saccarozơ quá cao sẽ có tác dụng ám tính đối với quá trình hình thành mô sẹo từ bao phấn.



Hình 4.2. Sự phát triển của phôi trong nuôi cấy bao phấn

cây kỳ nhâm đen (*Hyoscyamus niger*)  
A. Hạt phấn sau 20 giờ nuôi cấy.

B. Hạt phấn phồng lên bắt đầu mở rãnh sau 5 ngày nuôi cấy.

C, D. Giai đoạn hình cầu sau 7 ngày nuôi cấy.

E. Giai đoạn hình tim sau 9 ngày nuôi cấy.

F. Phôi phá vỡ thành bao phấn sau 14 ngày nuôi cấy.

(Dodds và Robert, 1999)

## THÍ NGHIỆM NUÔI CẤY BAO PHẤN THUỐC LÁ

(Theo Dodds và Roberts, 1999)

### ***Nguyên liệu và thiết bị :***

- Nụ hoa thuốc lá (*Nicotiana tabacum*)
- Nước cất 2 lần vô trùng.
- Etanol 90%.
- Dung dịch hypoclorit natri 10% (V/v).
- Thuốc nhuộm axetocacmin : Cho 45ml axit axetic, 55ml nước cất ; 0,5g cacmin vào cốc chịu nhiệt, đậy cốc bằng giấy nhôm hoặc đĩa petri và đun sôi nhẹ khoảng 5 phút trong tủ hốt. Lọc dung dịch qua giấy lọc và cất giữ trong lọ màu để sử dụng dần.
- Agar.
- Đĩa petri.
- Môi trường MS hoặc môi trường NN.
- Kính hiển vi giải phẫu.
- Dao, kéo, panh... dùng cho nuôi cấy.
- Một số hoá chất để pha môi trường lỏng như bảng dưới đây.

### ***Tiến hành :***

1. Thu hái các nụ hoa của cây thuốc lá khi chúng có tràng hoa dài 21-23mm. Ở thời điểm này các hạt phấn thuốc lá hoàn thành phân bào nguyên phân đầu tiên.
2. Các nụ hoa được xử lý lạnh khoảng 12 ngày ở 7-8°C trước khi tiến hành các thao tác nuôi cấy. Tiếp theo khử trùng sơ bộ bề mặt nụ hoa bằng etanol 90% trong 30 giây, sau đó chuyển chúng sang các đĩa petri chứa dung dịch hypoclorit natri 10% trong 10 phút.
3. Rửa các nụ hoa vài lần trong nước cất 2 lần vô trùng. Dùng dao, kim và panh giải phẫu cẩn thận nụ hoa và lấy ra các bao phấn. Có thể sử dụng kính hiển vi giải phẫu để hỗ trợ cho quá trình thao tác.
4. Lấy một bao phấn của mỗi nụ hoa và ép trong axetocacmin để xác định giai đoạn phát triển của hạt phấn. Khi hạt phấn ở giai đoạn phát triển thích hợp, thì các bao phấn còn lại của nụ hoa được dùng cho nuôi cấy.
5. Các bao phấn có thể được nuôi cấy trên môi trường MS đặc (có 0,6-1,0% (W/v) agar), hoặc nuôi cấy nổi trên môi trường lỏng có thành phần như sau :

Thành phần	Nồng độ (mg/l)
KNO <sub>3</sub>	950
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185
CaCl <sub>2</sub>	220
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
Saccarozơ	20000

6. Quá trình nuôi cấy được duy trì ở nhiệt độ 25°C trong tối hoặc ở ánh sáng yếu. Khoảng 4-6 tuần nuôi cấy, các cây con sẽ xuất hiện từ một số bao phấn. Ở giai đoạn này, ánh sáng là rất cần thiết cho sự sinh trưởng bình thường của cây con. Cường độ ánh sáng thích hợp của đèn huỳnh quang xấp xỉ 300 lux.

Tách các cây con khỏi mô bao phấn khi chúng đạt chiều cao khoảng 3mm và chuyển chúng sang môi trường tạo rễ. Có thể dùng môi trường MS với các thành phần khoáng giảm đi một nửa. Nuôi cấy được tiến hành ở cường độ ánh sáng cao hơn với thời gian chiếu sáng 10-12 giờ/ngày (Xem sơ đồ quy trình nuôi cấy ở hình 4.1).

#### IV - NHỊ BỘI HOÁ CÂY ĐƠN BỘI

Cây đơn bội có kích thước nhỏ so với cây lưỡng bội, chúng có thể trổ hoa nhưng tất cả đều bất thụ, do cây đơn bội chỉ chứa 1 trong 2 nhiễm sắc thể của cặp lưỡng bội làm cho giảm phân bị rối loạn, tạo ra những giao tử không có sức sống, cây chỉ toàn hạt lép. Để cây trở nên hữu thụ phải tiến hành nhị bội hoá số lượng nhiễm sắc thể của cây đơn bội bằng một trong các cách sau :

1. Tái sinh qua phương pháp nuôi cấy mô.
2. Cảm ứng nhị bội hoá với conxixin.

Mức độ bội thể của cây cần xác định với những quy trình tế bào học trước khi tiến hành các thí nghiệm nhị bội hoá. Một phương pháp tăng gấp đôi số lượng nhiễm sắc thể là sử dụng mô lá có tuổi từ cây đơn bội, bởi vì những lá già hơn dễ có tiềm năng làm phát sinh cả cây đơn bội và lưỡng bội. Những thể lưỡng bội được hình thành từ sự nhân đôi xảy ra thường xuyên trong nuôi cấy mô thực vật đơn bội. Một cách khác, để gấp đôi số lượng nhiễm sắc thể là sử dụng conxixin, 1 loại alkaloid được chiết từ cây ngô đồng tây (*Crocus*). Conxixin được dùng ở phạm vi nồng độ từ 0,05-0,5% tùy theo từng loài thực vật và loại mô cần được xử lý. Một quy trình đơn giản là ngâm các bao phấn chứa những cây con mới được hình thành trong dung dịch conxixin 0,5% (W/v) trong

24-48 giờ (Burk, Gwynn và Chaplin, 1972). Có thể chuẩn bị conxixin trong hỗn hợp mỡ lông cừu (lanolin paste) 0,4% (W/v) và gắn vào chồi phụ của cây đơn bội trưởng thành đã bị cắt ngọn (Tanaka và Nakata, 1969), hoặc ngâm cả cụm hoa vào dung dịch conxixin 0,1% trong 12-48 giờ (Nakamura và cộng sự, 1974). Đối với cây lúa, để thu cây đơn bội đồng hợp tử, cần xử lý cây lúa đơn bội theo 1 trong 3 cách :

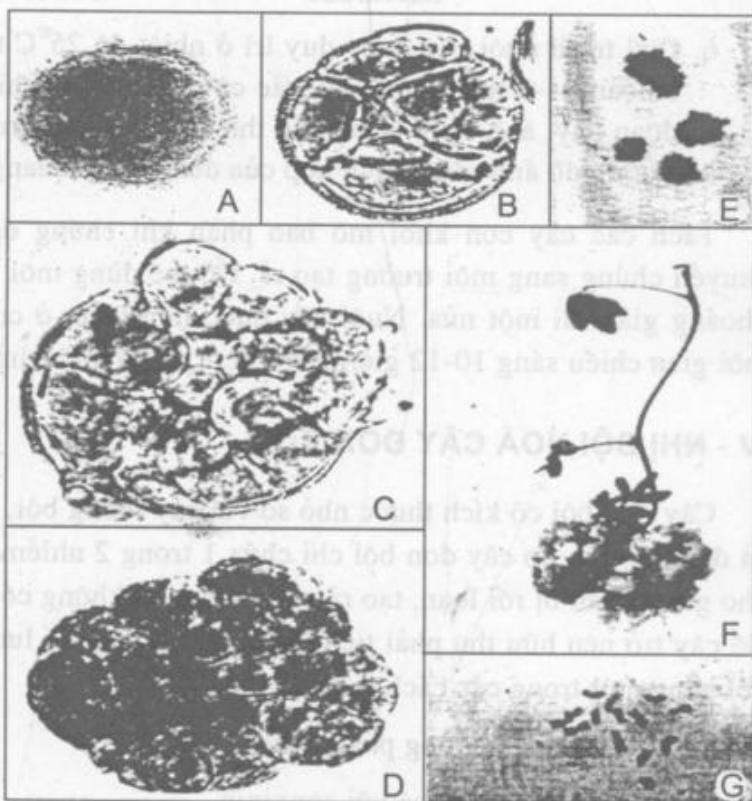
- Ngâm rễ cây lúa trong dung dịch conxixin khi cây bắt đầu đẻ nhánh mạnh, sau đó rửa sạch rễ và cấy lại.

- Cắt bỏ phần phía trên đồng non và bao chồi cắt bằng bông tẩm dung dịch conxixin.

- Tạo 1 khe nhỏ dọc thân ở phía trên ngọn bông lúa chưa trổ và đặt vào đó bông tẩm dung dịch conxixin.

Những cây lúa đã qua xử lý conxixin và một số cây không qua xử lý nhưng nhờ nhị bội hoá tự nhiên có khả năng cho bông với những hạt chắc như cây lúa bình thường. Ngoài ra cũng thu được những thể khám có đa số nhánh đơn bội và một số nhánh nhị bội.

Nhiều nhà nghiên cứu đã xử lý nhị bội hoá bằng cách đưa conxixin vào môi trường nuôi cấy mô đơn bội. Ở thuốc lá, các bao phấn được nuôi trên môi trường của White hoặc môi trường của Nitsch có 0,4% conxixin và 2% dimethylsulfoxit (DMSO). Sự tăng gấp đôi số lượng nhiễm sắc thể xảy ra ở giai đoạn phát

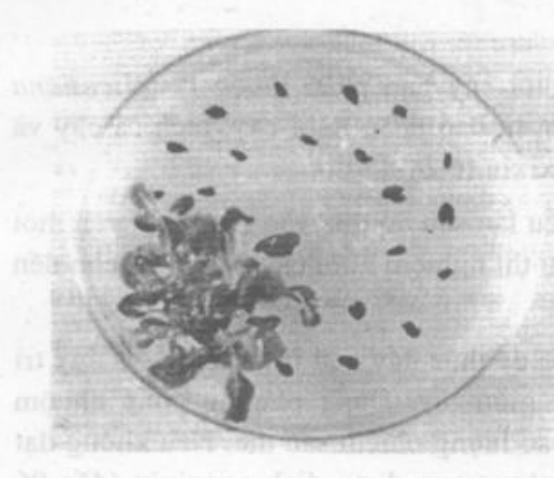


Hình 4.3. Phát sinh phôi trong nuôi cấy hạt phấn cây *Peltophorum*

(Lakshman Rao và D.N.De, 1987)

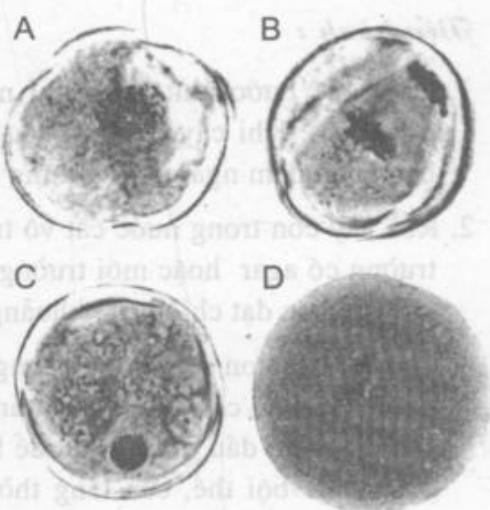
- A. Hạt phấn đơn nhân ở thời điểm nuôi cấy.
- B. Cấu trúc tiền phôi gồm 5 tế bào.
- C. Phôi hạt phấn có 15-20 tế bào.
- D. Phôi hạt phấn ở giai đoạn hình cầu sớm.
- E. Mô sẹo hình thành từ hạt phấn.
- F. Cây con đơn bội hình thành từ hạt phấn được 30 ngày tuổi.
- G. Các nhiễm sắc thể ở đầu rễ cây đơn bội.

triển sớm như ở các tiểu bào tử. Sau 24 giờ xử lý, mầm nuôi cấy được chuyển sang môi trường khác không có conixin. Nuôi cấy mô phân sinh cây *Solanum verrucosum* đơn bội trong môi trường có 0,5% conixin trong 48 giờ, tiếp theo chuyển các mầm sang môi trường mới. Những cây con được hình thành phần lớn là dạng lưỡng bội. Trong nuôi cấy các đối tượng như cây cà dược (*Atropa belladonna*), mía (*Saccharum officinarum*), thuốc lá (*Nicotiana tabacum*), huyền phù tế bào được xử lý với conixin ở những thời gian khác nhau, kết quả đã thu được những tế bào lưỡng bội hoá có khả năng tái sinh. Các tế bào xoma của cây đơn bội cũng có thể được dùng như một nguồn cho sản xuất những cây đồng hợp tử lưỡng bội (Nitsch và cộng sự, 1969). Bổ sung thêm 2-4% DMSO vào dung dịch conixin trong xử lý cây mạ lúa mì ở giai đoạn có 2-3 lá nhỏ đã làm tăng mạnh tần số lưỡng bội khi so sánh với việc sử dụng conixin riêng rẽ (Subramanyam và Kasha, 1975 ; Bai và cộng sự, 1979).



Hình 4.4. Những cây thuốc lá đơn bội tái sinh

từ bao phấn  
(Trigiano, R. N. và Gray, D. J., 1996)



Hình 4.5. Tiểu bào tử của thuốc lá

- A. Tiểu bào tử đơn nhân muộn.
- B. Kỳ sau của nguyên phân hạt phấn đầu tiên.
- C. Tiểu bào tử hai nhân giai đoạn sớm. Nhân sinh dưỡng to và nhân sinh sản nhỏ bắt màu thuốc nhuộm đậm.
- D. Tiểu bào tử hai nhân giai đoạn giữa.

(Trigiano R.N. và Gray, D. J., 1996)

## THÍ NGHIỆM TÁI SINH CÂY ĐƠN BỘI KÉP

### *Nguyên liệu và thiết bị :*

- Nụ hoa thuốc lá (*Nicotiana tabacum*).
- Etanol 90%,
- Nước cất 2 lần vô trùng.

- Dung dịch hypoclorit natri 10% (V/v).
- Thuốc nhuộm axetocacmin : Cho 45ml axit axetic, 55ml nước cất ; 0,5g cacmin vào cốc chịu nhiệt, đậy cốc bằng giấy nhôm hoặc đĩa petri và đun sôi nhẹ khoảng 5 phút trong tủ hở. Lọc dung dịch qua giấy lọc và cất giữ trong lọ màu để sử dụng dần.
- Agar.
- Đĩa petri.
- Môi trường MS hoặc môi trường NN.
- Kính hiển vi giải phẫu.
- Dao, kéo, panh... dùng cho nuôi cấy.
- Dung dịch conxixin 0,5% (W/v).

#### **Tiến hành :**

1. Làm các bước như trong thí nghiệm nuôi cấy bao phấn thuốc lá (*Nicotiana tabacum*). Khi cây con bắt đầu xuất hiện từ bao phấn nuôi cấy, tách cả cây và bao phấn đem ngâm trong dung dịch conxixin từ 24-48 giờ.
2. Rửa cây con trong nước cất vô trùng nhiều lần sau đó đưa vào nuôi cấy trên môi trường có agar hoặc môi trường lỏng như thí nghiệm nuôi cấy bao phấn cho đến khi cây con đạt chiều cao khoảng 3mm.
3. Chuyển cây con sang môi trường MS 50% để thúc đẩy quá trình tạo rễ và duy trì nuôi cấy với chu kỳ chiếu sáng 10-12 giờ/ngày. Dùng phương pháp nhuộm axetocacmin đầu rễ cây con để kiểm tra số lượng nhiễm sắc thể. Nếu không đạt được mức bội thể, cần tăng thời gian ngâm trong dung dịch conxixin (đến 96 giờ) hoặc ngâm nhiều lần lặp lại.
4. Khi đã nhị bội hóa thành công và cây con có thân, lá, rễ hoàn chỉnh có thể đưa ra trồng trong vườn thí nghiệm để tiếp tục theo dõi và tiến hành các thí nghiệm khác.

## **V - ỨNG DỤNG CỦA ĐƠN BỘI**

Việc tạo ra các thể đơn bội và ứng dụng của chúng trong chọn giống thực vật đã được nhiều nhà khoa học nghiên cứu. Các cây đơn bội có nguồn gốc hạt phấn đã được tạo ra ở 216 loài thuộc 78 giống, 31 họ và nhiều loài khác cũng được nghiên cứu thành công (Hu và Zhang, 1985).

### **5.1. Nghiên cứu quá trình hình thành phôi**

Các thể đơn bội là những đối tượng tiềm năng trong nghiên cứu phát sinh phôi thực nghiệm. Tuy nhiên chủ yếu nghiên cứu trên các loài mà phôi hình thành trực tiếp từ tiểu bào tử trong nuôi cấy bao phấn và hạt phấn qua quá trình sinh sản đơn tính đực.

## **5.2. Nghiên cứu tế bào học**

Cây đơn bội do chỉ chứa 1 trong 2 nhiễm sắc thể của mỗi cặp cho nên phân bào giảm nhiễm bị rối loạn. Cây vẫn sinh trưởng, phát triển và ra hoa nhưng bất thường, chỉ tạo ra toàn hạt lêp. Nghiên cứu quá trình phân bào giảm nhiễm đầu tiên của tế bào mẹ tiêu bào tử có thể giúp cho chúng ta tìm hiểu chi tiết hơn về quá trình phân bào của những thể đơn bội, cũng như quá trình sinh trưởng, phát triển của chúng.

## **5.3. Nghiên cứu về di truyền và đột biến**

Do chỉ chứa 1 bộ đơn bội các gen chức năng, nên cây đơn bội rất hữu ích trong nghiên cứu di truyền và đột biến. Trong hệ gen đơn bội, tính trạng lặn không có ý nghĩa mà chỉ có thể có quan hệ tương tác giữa các gen. Sự biểu hiện của các gen hoặc những đột biến lặn trong các thể đơn bội đều có thể phát hiện một cách dễ dàng.

## **5.4. Tạo dòng thuần**

Các dòng đơn bội kép có thể thu được trong một thời gian ngắn qua lưỡng bội hóa các cây đơn bội đã tạo ra những ưu việt rõ ràng cho chọn giống thực vật. Dòng đơn bội kép đã được ứng dụng để tạo ra các dòng lai hữu thu ổn định như con lai giữa 2 loài phụ *Indica* và *Japonica*. Những cây con hình thành từ hạt phấn lưỡng bội của con lai là những cây đồng hợp tử và có tới 50% là hữu thu hoàn toàn (Hsu và cộng sự, 1978).

Trong thực nghiệm, các dòng đơn bội kép có thể sớm đạt được mà không cần phải lai ngược hoặc lai gần qua 6-7 thế hệ để thu được dòng ổn định. Nhiều dòng đơn bội kép đã được sử dụng để chọn lọc các dòng có năng suất cao, trổ hoa sớm hay có khả năng kháng sâu bệnh...

## Chương 5

# NUÔI CẤY VÀ DUNG HỢP TẾ BÀO TRẦN

### I - MỞ ĐẦU

Các tế bào thực vật có thể phân chia và phát triển thành cây hoàn chỉnh trong những điều kiện nhất định. Ngoài ra những tế bào thực vật đều có thành bao quanh. Thành tế bào giữ vai trò quan trọng liên quan đến cấu trúc và chức năng của thực vật, là trở ngại chính đối với việc chuyển ADN vào tế bào cũng như các quá trình tạo thế lai xoma. Thành tế bào có thể bị tách tạm thời khỏi tế bào thực vật mà không làm mất sức sống của tế bào. Những tế bào thực vật có thành bị loại bỏ được gọi là tế bào trần (protoplast).

Klercker (1892) lần đầu tiên tách tế bào trần thực vật khi làm thí nghiệm với vảy cù hành bằng cách cắt nhỏ chúng trong dung dịch co nguyên sinh, kết quả giải phóng ra các tế bào trần khi cắt xuyên qua thành tế bào. Số lượng các tế bào trần thu được từ thí nghiệm trên rất thấp và bị hạn chế với những tế bào đã không bào hóa mạnh.

Việc thu nhận các tế bào trần đã dễ dàng hơn vào những năm đầu của thập kỷ 60 thế kỷ XX khi nhiều enzym có thể dùng cho phân huỷ thành tế bào được tách chiết và tinh sạch thành công. Cocking (1960) đã phát hiện ra có thể thu được các tế bào trần từ mô thực vật khi ngâm chúng trong dung dịch enzym cellulaza chiết từ nấm *Myrothecium verrucaria*. Vào năm 1968, các enzym dùng cho phá thành tế bào như macerozym và cellulaza đã được sản xuất, làm cho quá trình tách các tế bào trần trở nên thuận lợi hơn.

Năm 1970, hai tác giả là Nagata và Takebe tách được tế bào trần từ thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) và phát triển quy trình tái tạo thành tế bào, phân chia tế bào và thậm chí đã tái sinh cây. Carlson và đồng nghiệp (1972) lần đầu tiên đã thông báo về việc dung hợp và tạo con lai xoma khác loài. Kể từ đó đã có nhiều loài thực vật được ứng dụng thành công kỹ thuật dung hợp và nuôi cấy tế bào trần, trong đó có các loại cây trồng.

### II - NUÔI CẤY TẾ BÀO TRẦN

#### 2.1. Tách tế bào trần

Các phương pháp được sử dụng trong tách và nuôi cấy tế bào trần có mức độ thành công phụ thuộc vào bản chất của nguyên liệu ban đầu. Những quy trình cơ bản đều dựa

chủ yếu vào thực nghiệm và được thay đổi cho phù hợp với mỗi loại nguyên liệu. Ngoài ra phương pháp tách cũng ảnh hưởng lớn đến sức sống của tế bào trân và do đó có liên quan đến quá trình nuôi cấy sau này.

### **2.1.1. Chọn nguyên liệu**

Những nghiên cứu trước đây sử dụng mô thịt lá trưởng thành, có thể là mô đậu và mô xốp của *Nicotiana* và *Petunia*. Với những cải tiến của phương pháp, có thể tách tế bào trân từ một phạm vi rộng các loại mô của nhiều loài thực vật, như bao phấn cây *Pelargonium* (Abo El-Nil và Hilderbrant, 1971), từ mô lá của thực vật C<sub>3</sub> và C<sub>4</sub> (Kanai và Edwards, 1973), khoai tây (Upadhyaya, 1975), mô seо cây *Gossypium hirsutum* (Bhojwani, Cocking và Power, 1977) và nhiều thực vật CAM (Dodds, 1980)...

Trong thực nghiệm thường dùng nhu mô thịt lá cho quá trình tách tế bào trân. Những lá được tạo ra trong nuôi cấy *in vitro* là những vật liệu ban đầu lý tưởng cung cấp một lượng lớn các tế bào trân khỏe mạnh. Ngoài ra, các mẫu dùng cho tách tế bào trân phải thu từ những cây có trạng thái sinh lý tốt. Nếu lấy mẫu ngoài tự nhiên thì phải từ các cây không bị xử lý với thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ.

### **2.1.2. Phương pháp tách**

Chức năng chính của thành tế bào là duy trì áp suất vỏ lên khối chất nguyên sinh và bởi vậy ngăn chặn sự hấp thụ một lượng nước lớn dẫn đến làm vỡ tế bào. Trước khi thành tế bào bị loại bỏ, các tế bào cần được ngâm trong dung dịch làm ổn định áp suất thẩm thấu và được điều chỉnh cẩn thận liên quan đến khả năng thẩm thấu của tế bào. Trong số các nhân thẩm thấu, manitol hoặc sorbitol 12-14% (W/v) là những chất thẩm thấu được sử dụng phổ biến để duy trì tính ổn định của màng sinh chất. Theo Evans và Cocking (1977), cần kiểm tra nồng độ sử dụng manitol cho phù hợp với mỗi thí nghiệm. Một số tác giả đã dùng dung dịch thẩm thấu thấp có 0,2M đường saccarozơ và 2% (W/v) polivinyl pyrrolydon (Shepard và Tottori, 1975). Tuy nhiên không nên dùng các dung dịch thẩm thấu quá thấp có thể dẫn đến những tế bào trân da nhân do dung hợp tự phát của hai hay nhiều tế bào trân trong quá trình tách chiết. Việc sử dụng nguồn mẫu *in vitro* sẽ thuận lợi hơn khi các tế bào được nuôi trên môi trường tương tự như nuôi tế bào trân trước khi xử lý với enzym, giúp đảm bảo sự cân bằng về áp suất thẩm thấu và môi trường các ion trong quá trình tách chiết.

Giai đoạn sinh trưởng của các tế bào trong nuôi cấy cũng là một nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến sản lượng và chất lượng của tế bào trân. Đối với thuốc lá, huyền phù tế bào ở 4-5 ngày tuổi là phù hợp nhất cho xử lý enzym.

Các tế bào trân có thể được tách bằng phương pháp cơ học hoặc phương pháp enzym. Trong phương pháp cơ học, mẫu được cắt hoặc nghiền nhỏ và đưa vào dung dịch gây co nguyên sinh, làm cho phần nguyên sinh chất nhỏ lại. Sự phản co nguyên sinh tiếp theo sẽ làm giãn nở và đẩy phần nguyên sinh chất ra khỏi tế bào qua những

khe hở. Phương pháp cơ học nhìn chung khá phức tạp và số lượng các tế bào tràn có thể tồn tại độc lập là rất ít.

Phương pháp enzym dùng trong tách tế bào tràn đã được thực hiện từ đầu những năm 1960. Bằng xử lý enzym, có thể thu được một lượng lớn các tế bào tràn, trung bình từ  $2-5 \times 10^6$  tế bào tràn/gam mô lá (Evans và Cocking, 1977). Kỹ thuật cơ bản bao gồm các bước :

1. Vô trùng bề mặt mẫu lá.
2. Ngâm trong dung dịch thẩm thấu phù hợp.
3. Loại bỏ biểu bì mặt dưới hoặc cắt mẫu lá thành các lát mỏng, tạo thuận lợi cho sự xâm nhập của các enzym.
4. Xử lý với hỗn hợp enzym.
5. Tinh sạch các tế bào tràn.
6. Chuyển tế bào tràn vào các môi trường nuôi cấy thích hợp.

Thành tế bào bao gồm một hỗn hợp phức tạp của cellulozơ, hemicellulozơ, pectin và một lượng ít hơn là protein và lipit. Do có những liên kết hoá học của những thành phần này, một hỗn hợp các enzym là cần thiết để làm thoái hoá hiệu quả thành tế bào. Thường phải dùng cả ba loại enzym : cellulaza, hemicellulaza, pectinaza ở những tỷ lệ khác nhau phụ thuộc vào loại tế bào và nguồn gốc thực vật. Các mẫu enzym thương mại hầu hết đều được chiết từ các vi sinh vật và chúng thể hiện sự đa dạng trong hoạt tính enzym.

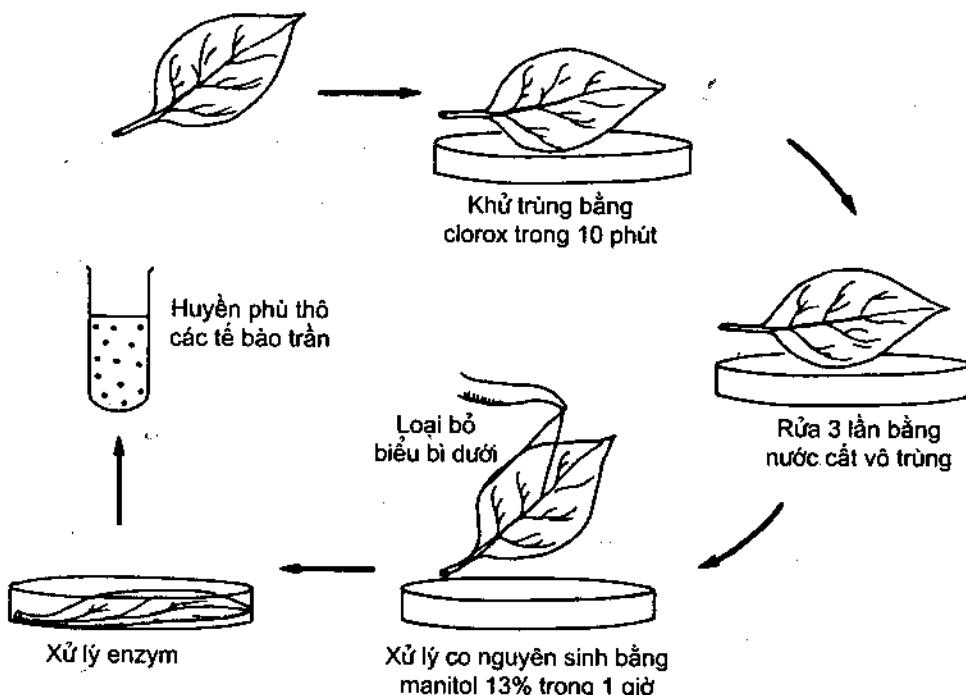
Có 2 phương pháp xử lý enzym : *phương pháp enzym hỗn hợp* dùng cả pectinaza, cellulaza và hemicellulaza đồng thời để loại bỏ thành tế bào. Trong *phương pháp enzym kế tiếp*, mẫu lá thực vật được xử lý với pectinaza để làm nới lỏng thành tế bào, tiếp theo cắt bằng enzym cellulaza và hemicellulaza. Cả hai phương pháp đều có một số ưu điểm và nhược điểm nhưng phương pháp enzym hỗn hợp được dùng nhiều hơn trong các thí nghiệm tách tế bào tràn (Bajaj, 1977 ; Evans và Cocking, 1977). Harada (1973) đã lựa chọn một kỹ thuật gồm có 2 bước kế tiếp : (1) thu một lượng lớn các tế bào tự do bằng biện pháp cơ học, (2) xử lý enzym đối với các tế bào tự do để giải phóng tế bào tràn. Kỹ thuật đã được ứng dụng với nhiều loài thực vật : *Ipomoea hederifolia*, *Calystegia sepium*, *Arachis spp.*, *Asparagus* và *Petunia spp.* Lá của chúng được vô trùng và được cắt thành nhiều mảnh, tiếp theo đem nghiền trong dung dịch manitol (0,09M). Dịch nghiền được lọc qua vải muslin để loại bỏ các mảnh vụn, các cụm tế bào, giữ lại các tế bào tự do cho quá trình xử lý enzym. Kỹ thuật từng bước của Hanaka trong thu nhận tế bào tràn từ mô thực vật là đơn giản hơn so với các kỹ thuật khác. Năm 1990, Batra và Dhingra đã đưa ra phương pháp tách nhanh tế bào tràn từ trụ dưới lá mầm của cây *Eruca sativa* và *Sesamum indicum*.

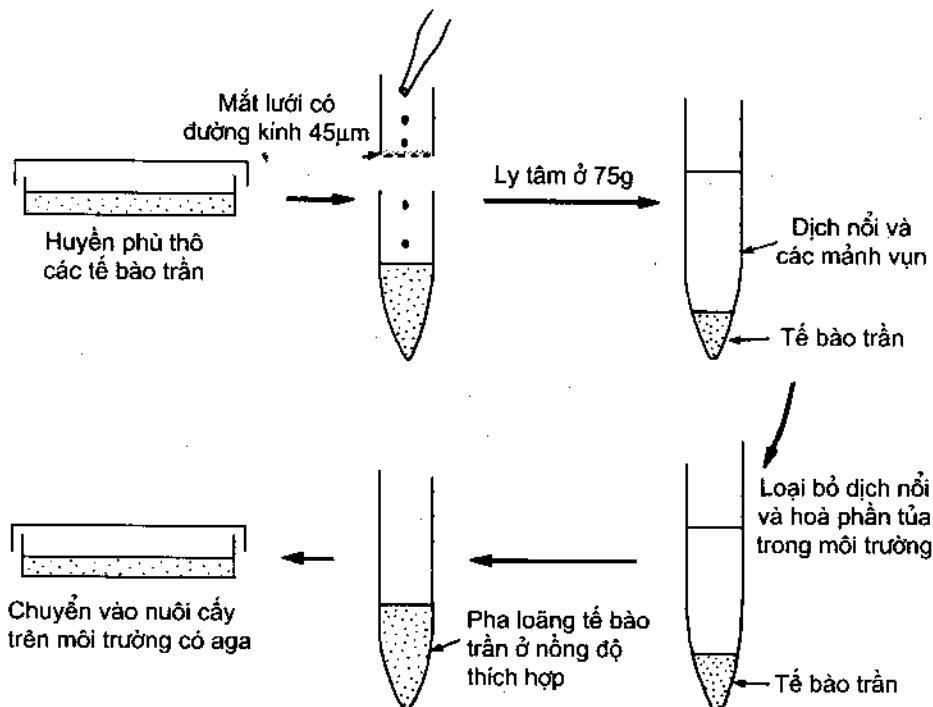
**Bảng 5.1. Một số loại enzym sử dụng trong phân huỷ thành tế bào thực vật**

Xellulaza	Hemixellulaza	Pectinaza
Onozuka (R-10, R9)	Rhozym HP-150	Maceraza
Xellulysin	Hemixellulaza (Sigma)	Macerozym R-10
Meicelaza (CESB, CMB)		Pectolyaza Y-23
Driselaza		

**Bảng 5.2. Các hỗn hợp enzym sử dụng thành công trong tách tế bào trân từ một số loài thực vật.**

Loài thực vật	Hỗn hợp enzym	Tác giả
Hemerocallis (huyền phù tế bào)	Xellulysin (1%), Rhozym (1%), Maceraza (0,5%).	Fitter & Kricorian (1983)
Pisum sativum (thịt lá)	Onozuka R-10 (2%), Driselaza (2%), Rhozym (2%), Pectinaza (1%).	Constabel (1982)
Solanum sp. (thịt lá)	Onozuka R-10 (1%), Macerozym R-10 (0,5%), Pectolyaza Y-23 (0,013%).	O'Hara & Henshaw (1982)
Medicago sativa (rễ, lá mầm)	Meicelaza (4%), Rhozym (2%), Macerozym R-10 (0,3%).	Lu và cộng sự (1982)

**Hình 5.1. Các bước cơ bản trong quy trình tách tế bào trân từ thịt lá tạo huyền phù thô các tế bào trân**



Hình 5.2. Các bước cơ bản trong quy trình thu nhận tế bào tròn dùng cho nuôi cấy

### 2.1.3. Xác định chất lượng của tế bào tròn

Khi quan sát dưới kính hiển vi, các tế bào tròn đều có dạng hình cầu, điều này cho thấy thành tế bào đã bị loại bỏ bởi sự phân cắt của các enzym. Tuy nhiên vẫn có những mảnh thành tế bào còn sót lại làm ảnh hưởng đến các nghiên cứu sau này.

Cách tốt nhất để phát hiện thành tế bào là dùng calcofluor, một hóa chất sẽ bám vào các phân tử cellulose, vật liệu chính của thành tế bào. Cho 1ml dung dịch calcofluor (dung dịch 1% pha trong nước cất) vào 20ml môi trường chứa tế bào tròn. Calcofluor sẽ bám vào các phân tử cellulose và gây ra phát ánh sáng huỳnh quang với màu xanh rực rỡ khi soi dưới tia cực tím. Nếu các tế bào tròn đã bị loại bỏ hoàn toàn thành tế bào, hiển vi thường có màu tối thâm, các tế bào tròn sẽ không nhìn thấy được ngoại trừ sự tự phát ánh sáng huỳnh quang đỏ của các lạp thể.

Quy trình tách tế bào tròn thường làm tổn thương hoặc làm hỏng một tỷ lệ các tế bào, bởi vậy cần phải xác định khả năng sống sót của tế bào tròn. Có thể quan sát trực tiếp huyền phù tế bào tròn dưới kính hiển vi ở vật kính 20x và 40x. Tế bào chất của những tế bào xuất hiện ở dạng dòng chảy hoặc chuyển động tròn, trông như các hạt nhỏ trong nguyên sinh chất là những tế bào sống. Ngược lại là những tế bào giàn như bị chết do màng sinh chất bị phá huỷ.

Có một số phương pháp kiểm tra sức sống của tế bào, có thể xác định đặc tính lý học và sinh lý học liên quan đến các tế bào sống. Phần lớn những phương pháp này dựa

trên hoạt tính enzym hoặc tính thấm của màng sinh chất đối với các hoá chất chỉ thị như chất màu thuốc nhuộm. Một trong những phương pháp là sử dụng fluorescein diacetat (FDA) để kiểm tra tỷ lệ % tế bào trân còn sống sau khi tách chiết. Fluorescein diacetat được dùng ở thể tích 0,8ml dung dịch (dung dịch 0,05%) với 20ml môi trường chứa tế bào trân. Khi soi dưới ánh sáng tử ngoại, các tế bào trân còn sống sẽ phát ánh sáng huỳnh quang màu xanh, những tế bào trân có màng sinh chất bị phá huỷ sẽ có màu sẫm hoặc màu tối.

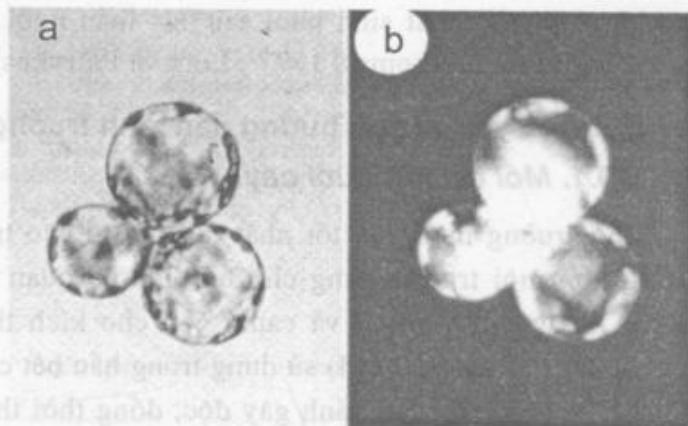
Quan sát ít nhất 50 tế bào trân và xác định tỷ lệ % các tế bào trân còn sống sau khi tách từ mẫu thực vật. Một kỹ thuật tốt sẽ thu được từ 90-95% tế bào trân khoẻ mạnh.

Một phương pháp khác là dùng kính hiển vi huỳnh quang kết hợp với nhuộm xanh Evan để xác định sức sống của tế bào trân (Graff và Okong’O-Ogola, 1971). Trộn 2ml dung dịch thuốc nhuộm 1% với 10ml môi trường tách tế bào trân. Lấy 0,25ml huyền phù tế bào trân và đưa vào 1,0ml hỗn hợp dịch nhuộm trên, để trong 15 phút, sau đó quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Những tế bào còn nguyên vẹn sẽ ngăn không cho thuốc nhuộm xâm nhập vào nguyên sinh chất, ngược lại những tế bào có màng sinh chất bị mất chức năng sẽ bắt màu xanh và chúng không thể sinh trưởng được.

## 2.2. Nuôi cấy tế bào trân

Các tế bào trân sau khi được tách từ mẫu thực vật sẽ được làm loãng trong môi trường lỏng trước khi xác định mật độ tế bào trong buồng đếm hồng cầu. Mật độ nuôi cấy tế bào trân phù hợp dao động từ  $10^4$ - $10^6$  tế bào/ml môi trường. Các tế bào trân có thể được nuôi ở dạng lớp mỏng của môi trường dịch thể có agar, nuôi cấy trên bề mặt môi trường lỏng hoặc nuôi cấy giọt treo... Lựa chọn cách nuôi cấy nào là dựa vào loài và mục đích thí nghiệm. Nuôi cấy trong môi trường lỏng được sử dụng nhiều do có thể điều chỉnh được mật độ tế bào và áp suất thẩm thấu. Ngoài ra, tế bào của một số loài thực vật không thể phân chia trong môi trường đặc. Ở điều kiện nuôi cấy thích hợp, các tế bào trân sẽ tái tạo thành tế bào mới trong khoảng 48-96 giờ nuôi cấy. Sau đó các tế bào sẽ bắt đầu phân chia và hình thành mô sẹo. Khi được chuyển sang môi trường mới, các tế bào mô sẹo sẽ phát sinh phôi và cuối cùng phát triển thành cây con hoàn chỉnh. Với mô sẹo của một số loài thực vật, khi được nuôi trên môi trường thiếu cả manitol và



Hình 5.3. Xác định sức sống của tế bào trân bằng thuốc nhuộm fluorescein diacetat (FDA)

- a) Tế bào trân quan sát với ánh sáng truyền qua.
- b) Quan sát tế bào trân nhuộm với FDA dưới ánh sáng tử ngoại  
(Trigiano R.N. và Gray, D. J., 1996)

auxin, chúng sẽ phát sinh phôi sau 3-4 tuần nuôi cấy (Kameya và Uchimiya, 1972 ; Lorz, Potrykus và Thomas, 1977 ; Lorz và Potrykus, 1979).

### 2.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của tế bào trân

#### 2.3.1. Môi trường nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy tốt nhất đối với tế bào trân là tương tự hoặc có thành phần loãng hơn môi trường dùng cho tái sinh cơ quan và phôi từ các mẫu thực vật. Điều chỉnh lượng nitrat amon và canxi cần cho kích thích sự phân bào. Tuy là cần thiết nhưng nitrat amon (20mM) sử dụng trong hầu hết các môi trường có biểu hiện độc tính đối với tế bào trân. Để tránh gây độc, đồng thời thúc đẩy sự phân bào, nồng độ nitrat amon được dùng thấp hơn, ở 1/4 đến 1/2 nồng độ bình thường. Ngược lại, hàm lượng canxi có xu hướng tăng trong nhiều môi trường nuôi tế bào trân. Các môi trường nuôi mô và cơ quan bình thường có nồng độ canxi từ 0,5 đến 3,0mM và ở những nồng độ thấp này, các tế bào trân bị ngưng kết và hoá nâu nhanh chóng. Khi tăng nồng độ canxi lên 14-40mM, sẽ thúc đẩy phân bào sớm, tăng tính đồng bộ giữa các tế bào, làm giảm sự ngưng kết và hoá nâu của tế bào trân trong giai đoạn sớm của nuôi cấy. Theo Constabel (1982), thành phần canxi cung cấp trong môi trường MS có thể chỉ ở dạng  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  hoặc phối hợp  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Các tế bào trân tách từ thịt lá cây *Petunia* sinh trưởng tốt hơn với môi trường có sự kết hợp của 5mM  $\text{CaCl}_2$  và 4mM  $\text{MgSO}_4$  (Binding, 1974).

Các thành phần hữu cơ như inositol, axit nicotinic, pyridoxin, thiamin, glyxin, axit folic và biotin được tìm thấy trong nhiều môi trường. Thêm nữa, casein thuỷ phân, D-Ca-pantothenat, cholin chlorit, xystein, axit malic, axit ascobic, adenin sulfat, riboflavin và glutamin thường được đưa vào môi trường nuôi tế bào trân với số lượng nhỏ (0,01-10mg/l) để đẩy nhanh sự sinh tổng hợp thành tế bào và thúc đẩy sự phân bào. Đa số các thành phần này không được sử dụng sau khi tế bào trân đã tái tạo thành tế bào mới và phân chia.

Đường được dùng trong môi trường nuôi cấy tế bào trân như một nguồn cacbon và chất ổn định thẩm thấu. Bởi vì các môi trường phải được điều chỉnh khả năng thẩm thấu để ngăn chặn sự phá huỷ tế bào trân trong quá trình tách và nuôi cấy ở giai đoạn sớm. Các loại đường được sử dụng làm chất thẩm thấu bao gồm manitol, sorbitol ở nồng độ từ 0,3-0,7M. Trong khi saccarozơ và glucozơ làm nguồn cacbon ở hàm lượng từ 0,2-0,6M. Nồng độ đường được giảm dần sau khi các tế bào bắt đầu phân chia.

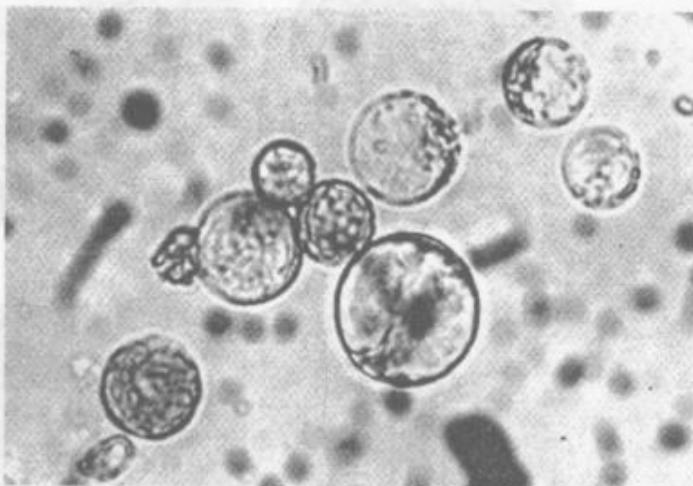
Các chất kích thích sinh trưởng là rất cần thiết trong nuôi cấy tế bào trân. Loại và nồng độ sử dụng là khác nhau giữa các loài và kiểu tái sinh. Axit naphthalen axetic và axit 2,4-dichlorophenoxy axetic có phạm vi nồng độ từ 0,45-10,7 $\mu\text{M}$ . Trong khi các cytokinin như zeatin và benzyl amino purin được dùng từ 2-5 $\mu\text{M}$ .

### 2.3.2. Điều kiện nuôi cấy

Các tế bào trân dễ nhạy cảm với ánh sáng, vì vậy chúng được nuôi trong tối hoặc ở ánh sáng rất nhạt (từ  $5-30\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) cho đến khi chúng tổng hợp thành tế bào mới và phân chia. Ở thời điểm này, có thể đưa các tế bào ra nuôi ở những mức ánh sáng cao hơn ( $30$  đến  $300\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Ánh sáng trắng và xanh da trời có biểu hiện tốt trong khi chỉ có ánh sáng đỏ ức chế sự hình thành chồi. Quá trình nuôi tế bào trân được duy trì ở dải nhiệt độ từ  $20$  đến  $25^{\circ}\text{C}$ .

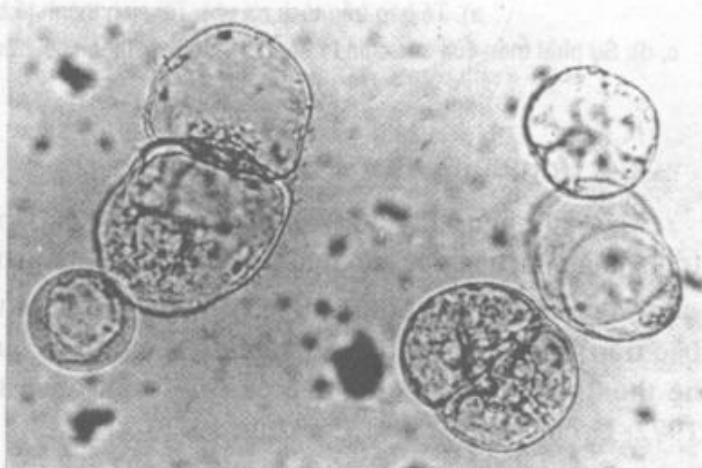
### 2.3.3. Mật độ nuôi cấy

Mật độ nuôi cấy có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của tế bào trân. Ở thuốc lá, hiệu quả tối ưu đạt được khi cấy  $5 \times 10^4$  tế bào trân/ml môi trường, nếu mật độ tế bào trân giảm xuống còn  $0,5 \times 10^4$  tế bào/ml thì chúng không thể phân chia được (Evans và Cocking, 1977). Với cây Petunia, mật độ cấy các tế bào trân tối ưu là  $2,5 \times 10^4$  tế bào/ml môi trường (Power và cộng sự, 1976). Có thể dùng buồng đếm hồng cầu Fuchs-Rosenthal với độ sâu của hiển vi trường là  $0,2\text{mm}$  để xác định mật độ tế bào trân và điều chỉnh đến mức độ thích hợp.

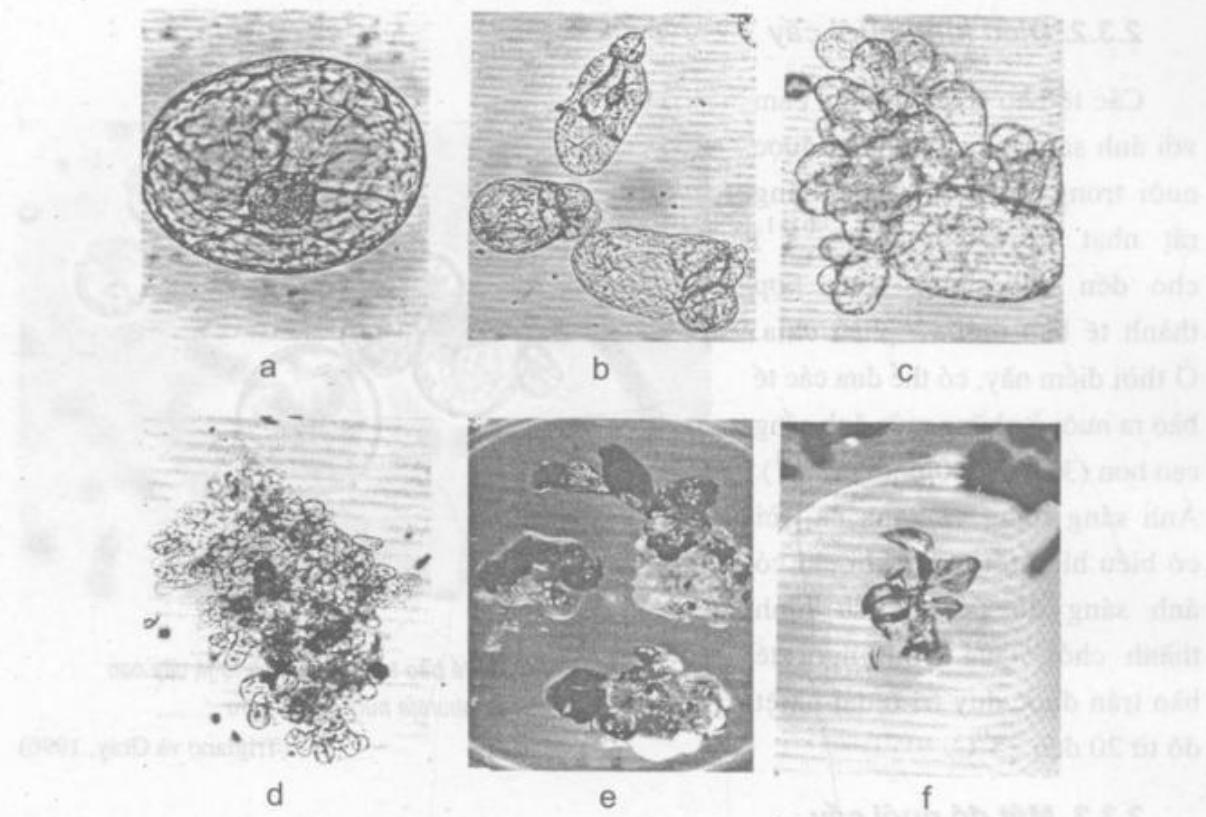


Hình 5.4. Các tế bào trân được tách từ lá cây con  
*S. phureja* nuôi cấy *in vitro*

(Trigiano và Gray, 1996)



Hình 5.5. Phân bào nguyên phân đầu tiên của các tế bào có nguồn gốc từ những tế bào trân tách từ lá cây con *S. phureja*  
(Cheng và Veilleux, 1991)



Hình 5.6. Trình tự phát triển của cây con *Atropa belladonna* từ tế bào trân nuôi cấy

a). Tế bào trân tách rời ; b). Tái sinh thành tế bào và bắt đầu phân bào ;  
c, d). Sự phát triển của các cụm tế bào ; e). Sự xuất hiện phôi trên bề mặt mõ seọ ; f). Sự hình thành cây con.

(Nguồn từ H. Lörz)

#### 2.4. Ứng dụng của tế bào trân

Mặc dù những khó khăn về mặt kỹ thuật đã làm hạn chế tiềm năng sử dụng tế bào trân, nhưng hiện nay tế bào trân đang được ứng dụng trong một số lĩnh vực nghiên cứu :

- Sau khi bị loại bỏ thành tế bào và được nuôi trên môi trường thích hợp, những tế bào trân tái tạo nhanh chóng thành tế bào mới và quá trình phát triển này đã đưa ra một hệ thống lý tưởng cho nghiên cứu sinh tổng hợp thành tế bào (Willison và Cocking, 1972, Grout, Willison và Cocking, 1973).

- Các tế bào trân có khả năng tiếp nhận các vật liệu từ bên ngoài đưa vào trong tế bào. Do đó tế bào trân là đối tượng thích hợp cho các nghiên cứu đưa nhân, lạp thể, ty thể, ADN, plasmid... vào tế bào (Lurquin và Sheehy, 1982 ; Dodds và Bengochea, 1983).

- Hai hoặc nhiều tế bào trân có thể được cảm ứng dung hợp để tạo ra sản phẩm lai, mặc dù hiện tượng này vẫn chưa thành công ở nhiều loài thực vật. Trong một vài trường hợp, cây lai không thể được tạo ra qua phương pháp thông thường do sự bất tương hợp về sinh sản hoặc sinh lý, có thể được hình thành qua dung hợp tế bào xoma (Dudils và cộng sự, 1979, Galem và Aviv, 1986).

- Quần thể tế bào tràn có thể được xem như một hệ thống tế bào đơn và bởi vậy các thao tác tương tự như đối với các vi sinh vật, qua đó có thể lựa chọn dòng đột biến và tách dòng quần thể tế bào thực vật (Evans và Cocking, 1977).

## THÍ NGHIỆM TÁCH VÀ NUÔI CẤY TẾ BÀO TRẦN THUỐC LÁ

(Theo Dodds và Roberts, 1999 ; Trigiano và Gray, 2000)

### *Nguyên liệu và thiết bị :*

- Lá cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*).

- Etanol 70%.

- Pha các môi trường :

+ Môi trường MS :

Ký hiệu	Thành phần	Khối lượng
MS1	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	165,0 g
	$\text{KNO}_3$	190,0 g
MS2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37,0 g
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,7 g
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,86 g
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5 mg
MS3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44,0 g
	KI	83,0 mg
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5,0 mg
MS4	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	17,0 g
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	620,0 g
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4$	25,0 mg
MS5	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,78 g
	NaEDTA	3,74 g

Mỗi dung dịch mẹ (MS1, MS2,...) pha trong 1000ml, khi sử dụng lấy 10ml để pha cho 1 lít môi trường.

+ Môi trường rửa :

Thành phần	Số lượng *
KCl	2,2 g
MS2	3,0 ml
pH 5,8	

\* Lấy cho 100 ml môi trường

+ Môi trường có nguyên sinh :

Thành phần	Số lượng*
MS2	6,7 ml
MS5	1,0 ml
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,3 mg
$\text{KNO}_3$	10,1 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	600 mg
Mannitol	13 g
pH 5,8	

\* Lượng cần lấy để pha 100 ml môi trường

+ Môi trường nổi :

Thành phần	Số lượng *
Saccarozơ	17,1 g
MS2	3 ml
pH 5,8	

\* Lấy cho 100 ml môi trường

+ Môi trường chứa enzym :

Thành phần	Tỷ lệ %
Xeliulaza Onozuka R10	0,5
Macerozym Onozuka	0,1
R10	13
Mannitol	
pH 5,8	

+ Môi trường nuôi cấy tế bào trần thuốc lá :

Thành phần	Nồng độ (mg/l)	Thành phần	Nồng độ (mg/l)
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100,0	Saccarozơ	10000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	450,0	Glucozơ	18000
$\text{KNO}_3$	2500,0	Mannitol	100000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250,0	Myo-inositol	100
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	170,0	Axit nicotinic	1,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134,0	Pyridoxin HCl	1,0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	Thiamin HCl	10,0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	2,4D	0,1
$\text{H}_3\text{BO}_3$	3,0	NAA	1,0
KI	0,75	BAP	1,0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	13,2	pH	5,8
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25		
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0		

- Dung dịch hypoclortit natri 10% (V/v).
- Màng lọc vô trùng có kích thước lỗ khoảng  $63\mu\text{m}$ .
- Nước cất 2 lần vô trùng.
- Giấy parafin.
- Pipet Pastơ.
- Đĩa petri.
- Máy ly tâm.
- Dung dịch fluoresain diacetat (FDA) 0,05% (pha trong axeton).
- Dung dịch calcoflour 1% (pha trong nước cất).
- Kính hiển vi huỳnh quang.

#### Tiến hành :

##### Ngày thứ nhất

1. Khử trùng bề mặt lá cây thuốc lá bằng etanol 70% trong 30 giây, sau đó chuyển mẫu sang dung dịch hypoclortit natri 10% trong 15 phút. Lấy mẫu ra và rửa 3 lần bằng nước cất 2 lần vô trùng.

2. Trong tủ cấy vô trùng, bóc lớp biểu bì dưới của lá thuốc lá, tiếp theo cắt chúng thành các mảnh 1mm và đưa vào các đĩa petri (mỗi đĩa chứa 1,0g lá). Thêm 20 ml môi trường gây co nguyên sinh và giữ trong khoảng 1 giờ.
3. Loại bỏ môi trường gây co nguyên sinh và thay thế bằng 10 ml dung dịch enzym. Dùng giấy paraffin bọc các đĩa petri, đánh dấu và ủ qua đêm (12-18 giờ, 25°C).

### *Ngày thứ hai*

4. Lắc nhẹ các đĩa chứa dung dịch enzym và tế bào trần nhằm giúp tăng cường sự giải phóng các protoplast. Sau đó dùng pipet Pastor chuyển toàn bộ huyền phù tế bào trần qua màng lọc vô trùng để loại bỏ các mô chưa bị phân cắt. Dùng 3ml môi trường rửa để rửa đĩa petri và cho qua màng lọc.
5. Chuyển hỗn hợp enzym/tế bào trần vào ống ly tâm vô trùng thể tích 15ml và ly tâm ở tốc độ 50-75g trong 10 phút.
6. Loại bỏ phần nổi, hòa phần kết tủa trong 10ml môi trường nổi và thêm 1ml môi trường rửa vào phía trên của các tế bào trần trong môi trường nổi (không lắc trộn 2 môi trường, để 2 lớp riêng biệt). Ly tâm 10 phút ở tốc độ 50-75g.
7. Hút dải tế bào trần màu xanh bằng pipet Pastor và chuyển sang ống ly tâm mới, thêm 10 ml môi trường rửa và ly tâm như bước trên. Các tế bào trần chìm xuống đáy ống và tạo thành khối nhỏ.
8. Rửa các tế bào trần một lần nữa với 10ml môi trường rửa, loại bỏ phần dịch nổi và đem pha trong 1ml môi trường.
9. Lấy một giọt dung dịch môi trường chứa các tế bào trần và đưa lên buồng đếm hồng cầu để xác định mật độ. Để nuôi cấy cần phải pha loãng dịch tế bào trần thành 50000 tế bào/ml môi trường nuôi cấy.
10. Xác định sức sống của tế bào trần bằng cách pha loãng 1ml thuốc nhuộm FDA với 25ml dung dịch môi trường nuôi cấy đã chứa các tế bào trần. Lấy 1 giọt hỗn hợp đưa lên lam kính và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Những tế bào trần có khả năng sống sẽ bắt màu xanh, ngược lại có màu đỏ. Xác định tỷ lệ các tế bào trần khoẻ mạnh trong khoảng 100-200 tế bào. Nuôi các tế bào trần trong tối ở nhiệt độ 25°C.

### *Ngày thứ ba*

11. Đưa các mẫu tế bào trần ra nuôi ở cường độ ánh sáng yếu ( $10-20\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ) với quang chu kỳ 16 giờ/ngày trong 2 ngày.

### *Ngày thứ năm*

12. Chuyển các mẫu sang nuôi ở cường độ ánh sáng cao hơn ( $50-75\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ).

## *Ngày thứ bảy*

13. Kiểm tra sự tái tạo thành tế bào của các tế bào trân bằng cách nhuộm mẫu với dung dịch calcoflour và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Những tế bào sống tổng hợp thành tế bào và phát sáng huỳnh quang. Khi có thành tế bào, chúng sẽ phân chia và tạo ra quần thể tế bào.

Khi quan sát rõ các khối tế bào, cân pha loãng chúng bằng môi trường mới có chứa hàm lượng mannitol thấp hơn để các tế bào phát triển và hình thành mô sẹo. Sau khoảng 8-10 tuần, chuyển các mô sẹo sang môi trường tái sinh.

## **III - DUNG HỢP TẾ BÀO TRÂN VÀ LAI TẾ BÀO XOMA**

Dung hợp tế bào trân không phải là một hiện tượng mới, ngay từ năm 1909, Kuster đã mô tả quá trình dung hợp ngẫu nhiên trong các tế bào trân tách rời. Khi hai hoặc nhiều tế bào trân dung hợp sẽ tạo ra một khối tế bào trân, trong đó nhân của chúng có thể kết hợp hoặc tồn tại riêng rẽ. Nếu hai nhân khác nhau sẽ tạo ra thể lai dị nhân (heterokaryons hoặc heterokaryocytes), ngược lại sẽ có thể lai đồng nhân (homokaryons). Sự kết hợp nhân trong thể dị nhân hình thành tế bào trân lai thực sự gọi là thể hợp nhân (synkaryocyte) (Constabel, 1978). Nếu một trong hai nhân bị đào thải, nguyên sinh chất của hai tế bào trân sẽ dung hợp tạo ra thể lai tế bào chất cybrid (cytoplasmic hybrid).

### **3.1. Các phương pháp dung hợp**

#### **3.1.1. Dung hợp tự phát (spontaneous fusion)**

Trong quá trình phân cắt thành tế bào bằng enzym, các tế bào trân được hình thành từ những tế bào tiếp giáp nhau có thể dung hợp qua cầu nối sinh chất. Việc loại bỏ thành tế bào đã làm cho các cầu nối sinh chất giữa các tế bào giãn nở to lên, nguyên sinh chất và các cơ quan từ 2 hoặc nhiều tế bào có thể lưu thông sang nhau.

Dung hợp tự phát chỉ xảy ra trong phạm vi một loài và hiện tượng này hiếm gặp do sự tích điện âm trên bề mặt tế bào trân là nguyên nhân ngăn cản chúng kết hợp với nhau (Grout và Coutts, 1974 ; Nagata và Melchers, 1978).

#### **3.1.2. Dung hợp cảm ứng (induced fusion)**

Có nhiều hợp chất hóa học được sử dụng để kích thích dung hợp tế bào trân thực vật bao gồm NaCl, KCl, NaNO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>, dextran sulfat, polivinyl alcohol, lysolethicin và poliethylen glycol... Ngoài ra có thể tiến hành dung hợp bằng dòng điện, huyết thanh miễn dịch.

##### **3.1.2.1. Xử lý với NaNO<sub>3</sub>**

Đây là phương pháp ra đời sớm nhất và ngay từ năm 1970, hai tác giả Cummins và Cocking đã dung hợp thành công tế bào trân tách từ đầu rễ của ngô (*Zea mays*) và yến mạch (*Avena satium*). Để cảm ứng dung hợp, các tế bào trân được xử lý với hỗn hợp

dung dịch có 5,5% NaNO<sub>3</sub> và 10% saccarozơ, trong 30 phút, ở nhiệt độ 35<sup>0</sup>C. Tần số dung hợp theo phương pháp này rất thấp, đặc biệt đối với những tế bào trân đã bị không bào hoá mạnh.

### 3.1.2.2. Xử lý với nồng độ ion Ca<sup>+2</sup> cao và pH cao

Hỗn hợp tế bào trân tách từ thịt lá được ủ trong môi trường kiềm mạnh có 0,05M CaCl<sub>2</sub>, 0,4M 9% (W/v) manitol, pH cao (8-10) và ly tâm nhẹ ở 50g trong 3 phút, tiếp theo đem ủ trong nước ở nhiệt độ 37<sup>0</sup>C trong 45 phút. Bằng phương pháp này, Keller và Melcher (1973) đã dung hợp thành công tế bào trân tách từ mô đậu của 2 dòng thuốc lá. Tuy nhiên giá trị pH cao có thể gây độc cho tế bào trân của một số loài thực vật (Kao và Wetter, 1977).

### 3.1.2.3. Xử lý với poliethylen glycol (PEG)

PEG là một polime, do đó khôi lượng phân tử phụ thuộc vào các điều kiện của phản ứng trùng hợp : PEG 1540 (MW 1300-1600), PEG 4000 (MW 3000-5000), PEG 6000 (MW 6000-8000). Thường dùng dung dịch PEG 6000 có nồng độ 20-30% (W/v) để xử lý các tế bào trân trong 10-30 phút. Theo Wallin và cộng sự (1974), PEG được ứng dụng rộng rãi trong dung hợp tế bào trân thực vật do có độc tính thấp, đồng thời có tác dụng với hầu hết các kiểu tế bào.

Kao và Michayluk (1974) là những tác giả đầu tiên dùng PEG để dung hợp tế bào trân giữa đồ tương - thuốc lá, đồ tương - ngô, nhưng tần số dung hợp thấp. Khi sử dụng PEG với nồng độ ion Ca<sup>2+</sup> cao (0,05M CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) và giá trị pH cao sẽ cho kết quả tốt hơn dùng PEG riêng rẽ, có thể đạt tới 10-15%. Phương pháp này là sự kết hợp giữa phương pháp dùng PEG nguyên thuỷ của Kao và Michayluk (1974) với phương pháp sử dụng ion Ca<sup>2+</sup> và pH cao của Keller và Melcher (1973). Theo nhiều tác giả, phương pháp kết hợp được cho là khá hiệu quả trong dung hợp tế bào trân thực vật (Melcher và cộng sự, 1978 ; Hoffmann, 1978, 1979).

### 3.1.2.4. Dung hợp bằng dòng điện

Trong phương pháp dung hợp bằng dòng điện, các tế bào trân phải tiếp xúc với nhau trước khi được xử lý gây sốc để kích thích dung hợp. Có thể dùng một điện trường nhỏ (50-100V/cm khoảng cách điện cực) cho chạy qua huyền phù tế bào trân để làm đảo lộn điện thế và gây phân cực tế bào. Kết quả mỗi tế bào sẽ có một đầu tích điện dương và một đầu tích điện âm. Những đầu mang điện tích trái dấu của các tế bào trân sẽ hút và tiếp xúc với nhau tạo thành các chuỗi hạt. Sự dung hợp được thực hiện với một điện thế tương đối cao (0,5-1,5kV/cm khoảng cách điện cực) làm mất tính ổn định của màng sinh chất tại những vị trí tiếp xúc và gây ra dung hợp. Tần số dung hợp bằng dòng điện có thể đạt tới 20% hoặc cao hơn khi so sánh với dung hợp bằng PEG (< 1%). Nhiều tác giả đã thu được các sản phẩm qua dung hợp bằng dòng điện như cây khoai tây lai giữa khoai tây trồng *Solanum tuberosum* và khoai tây dại *S. chacoense* (Cheng và cộng sự, 1995).

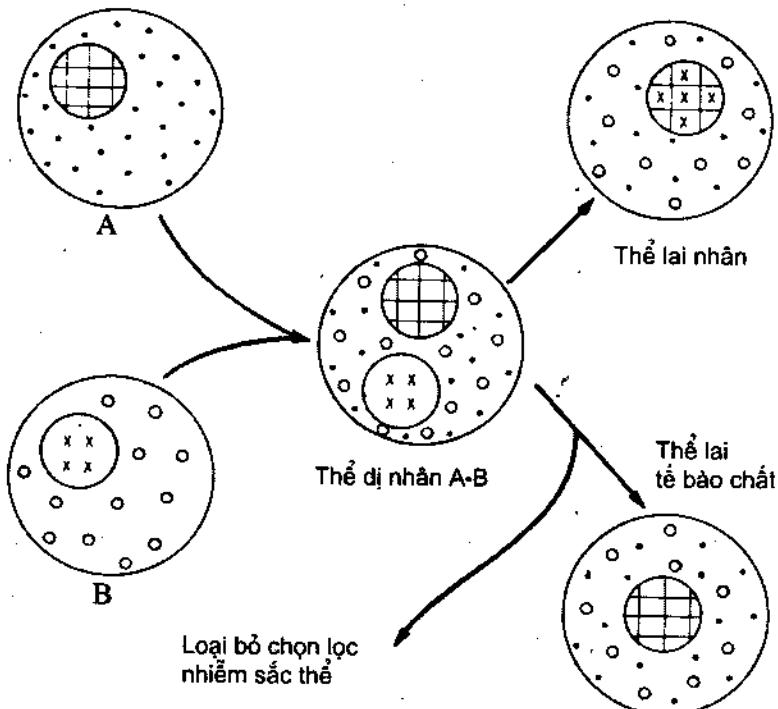
### 3.2. Cơ sở tế bào học của dung hợp

Dung hợp tế bào trân bao gồm ba pha :

- Pha kết dính : Màng sinh chất của hai hay nhiều tế bào trân tiến sát nhau.
- Dung hợp màng tại những vùng nhỏ liên kết chất dẫn đến hình thành tế bào chất liên tục hoặc cầu giữa các tế bào trân.
- Giãn nở của các cầu nguyên sinh chất và hình thành thể đồng nhân hoặc dị nhân hình cầu.

Sau khi dung hợp màng, tế bào chất của 2 loại tế bào trân sẽ kết hợp với nhau trong khoảng vài giờ (Kao và đồng nghiệp, 1974). Trong thể dị nhân (heterokaryons), hai nhân có thể phân bào đồng thời trên sợi thoi chung nhưng các nhiễm sắc thể không đi cùng với nhau, kết quả tạo ra mô khám (Kao và cộng sự, 1974 ; Gosch và Reinert, 1978). Thể dị nhân cũng có khả năng duy trì ở một vài thế hệ tế bào (Binding và Nehls, 1978), sau đó xảy ra dung hợp nhân ở gian kỳ (Constabel và cộng sự, 1975 ; Dudits và cộng sự, 1976) hoặc ở lần nguyên phân đồng bộ đầu tiên. Chỉ có những tế bào lai được tạo ra qua dung hợp nhân trong nguyên phân mới có khả năng tiếp tục phát triển.

Những nghiên cứu tế bào học chi tiết của các dòng tế bào lai xoma và những phân tích kiểu nhân thực vật lai xoma đã cho thấy, trong các tế bào lai, sự hợp nhất hoàn toàn genôm từ 2 nguồn thường không xảy ra (Kao và cộng sự, 1974 ; Constabel và cộng sự, 1975 ; Gleba và Hoffman, 1978). Sự đào thải dần dần nhiễm sắc thể của một trong các dạng cha mẹ đã được biết đến ở tế bào lai xoma động vật (Weiss và



Hình 5.7. Sơ đồ hình thành thể lai nhân và thể lai tế bào chất

Green, 1967). Đặc điểm này đã quan sát thấy ở thực vật, chẳng hạn các phân bào không bình thường xuất hiện trong các dòng tế bào lai giữa loài đỗ tương (*Glycine max*) với loài thuốc lá (*Nicotiana glauca*) được ghi nhận xảy ra ngay ở lần phân chia nhân đầu tiên. Những dòng tế bào này cũng biểu hiện sự đào thải chọn lọc nhiễm sắc thể của thuốc lá. Sau 1 tháng, các nhiễm sắc thể lớn của thuốc lá đã hiếm gặp và sau 7 tháng có thể chỉ một số nhiễm sắc thể của thuốc lá còn tồn tại. Đồng thời các dòng tế bào lai có

các đặc điểm giống với các dòng đỗ tương về sự phân bố của các isoenzym : alcohol dehydrogenaza và aspartat aminotransferaza (Wetter, 1977). Trong các tế bào lai khác loài được hình thành từ tổ hợp *Arabidopsis thaliana* × *Brassica campestris*, sự phân bào không bình thường là khá phổ biến, nhưng sau 4-5 tháng, các tế bào lai vẫn giữ được toàn bộ các nhiễm sắc thể của cha mẹ. Sau 7 tháng, một số nhiễm sắc thể của *Brassica campestris* đã bị loại bỏ, đặc biệt các tế bào của cây tái sinh từ tế bào lai đã thể hiện sự vắng mặt hoàn toàn nhiễm sắc thể của *Brassica* (Gleba và Hoffmann, 1979). Sự loại bỏ ưu tiên nhiễm sắc thể của 1 trong các dạng cha mẹ đã được thông báo xảy ra ở các mô lai xoma giữa *Pastinocissus* × *Petunia* (Power và cộng sự, 1975), *Vicia* × *Petunia* (Binding và Nehls, 1978). Trong đa số các tổ hợp này, một trong các loại tế bào trân đem lai có nguồn gốc từ huyền phù tế bào sinh trưởng mạnh và loại tế bào trân kia có nguồn gốc từ tế bào thịt lá. Trong những trường hợp như vậy, nhiễm sắc thể của tế bào trân thịt lá sẽ bị loại bỏ ưu tiên.

### 3.3. Lựa chọn sản phẩm dung hợp

Sau khi dung hợp, quần thể tế bào trân sẽ gồm có các tế bào trân cha mẹ, thể đồng nhân, dị nhân và các sản phẩm dung hợp đa nhân. Nếu hỗn hợp này được đưa vào môi trường nuôi cấy, một số kiểu tế bào khác nhau sẽ phân chia và phát triển mô sẹo, vì vậy cần phải phân biệt và tách thể lai. Có thể nhận biết sản phẩm dung hợp dựa vào các đặc điểm hình thái, gen đánh dấu, môi trường chọn lọc, dùng tế bào trân từ các loại mô khác nhau hoặc dùng phương pháp nhuộm bằng các chất phát huỳnh quang. Con lai xoma có thể được phân biệt nhờ những sự khác biệt tự nhiên giữa các dạng cha mẹ. Như trường hợp của khoai tây lai, cây khoai tây dại *Solanum chaocoense* có các tế bào chứa sắc tố anthocyanin màu tím đỏ nhưng sinh trưởng rất kém trong môi trường nuôi cấy và không thể tái sinh được chồi. Khoai tây trồng *Solanum tuberosum* mang các đặc điểm trái ngược, có khả năng tạo chồi nhanh. Mô sẹo hình thành từ sản phẩm dung hợp sinh trưởng mạnh hơn mô sẹo từ các dạng cha mẹ và tạo ra các chồi màu tím đỏ.

Các con lai xoma cũng có thể được phát hiện qua môi trường sinh trưởng chọn lọc. Đây là một phương pháp được phát triển cho chọn lựa thể lai từ dung hợp tế bào trân của 2 loài thuộc lá *Nicotiana glauca* và *N. langsdorffii* (Callson, Smith và Dearing, 1972). Không có dạng cha mẹ nào có khả năng sinh trưởng trên môi trường thiếu auxin. Nhưng sản phẩm dung hợp tế bào trân của hai loài lại có khả năng tự dưỡng về auxin và sinh trưởng được trên môi trường không có auxin. Các mô sẹo hình thành sau đó được cấy truyền và cảm ứng tái sinh thành cây lai.

Một phương pháp khác là sử dụng các đột biến sinh hoá và lựa chọn thể lai xoma dựa trên sự hình thành các đặc điểm bổ sung. Kháng sinh actinomycin D được dùng để phát hiện sản phẩm dung hợp giữa 2 loài thuộc chi *Petunia* (Power và cộng sự, 1976). Các tế bào nuôi cấy của loài *Petunia hybrida* không thể sinh trưởng được khi có actinomycin D. Ngược lại, những tế bào của loài *P. parodii* sinh trưởng trên môi trường có actinomycin D nhưng không thể tái sinh được cây từ mô sẹo nuôi cấy. Những tế bào vừa có thể sinh trưởng khi có kháng sinh vừa có khả năng tái sinh thành công là sản

phẩm dung hợp của hai dòng tế bào trân cha mẹ. Tương tự, hai đặc điểm đột biến của thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) là những đặc tính mẫn cảm với ánh sáng và thiếu hụt clorophin cũng đã được sử dụng trong quy trình chọn lọc bổ sung (Melchers và Labib, 1974 ; Bottches, Aviv và Galun, 1989).

Khi không có các đặc điểm bổ sung hoặc các đột biến rõ rệt, có thể dùng phương pháp nhuộm hoá chất và nhận biết qua phát hiện huỳnh quang. Có 2 loại thuốc nhuộm được sử dụng thành công là fluorescein isothiocyanate (FITC) và rhodamine isothiocyanate (RITC). Các tế bào nhuộm với FITC có màu xanh, còn các tế bào nhuộm với RITC có màu đỏ khi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Sản phẩm dung hợp có cả FITC và RITC sẽ cho màu vàng và có thể được tách ra để nuôi cấy trên môi trường thích hợp cho quá trình tạo mô sẹo và tái sinh.

## THÍ NGHIỆM DUNG HỢP TẾ BÀO TRÂN Ở KHOAI TÂY (Theo Trigiano và Gray, 2000)

### *Nguyên liệu và thiết bị :*

- Các nguyên liệu, hóa chất và dụng cụ dùng cho tách tế bào trân (tương tự như thí nghiệm tách tế bào trân từ thuốc lá).

- Lá khoai tây (*Solanum tuberosum*).
- Dầu khoáng.
- Pipet Pasto.
- Đĩa petri.
- Lamen.
- Thuốc nhuộm FITC, RITC (nồng độ 3,0mg/ml, pha trong etanol).
- Agar.
- Các môi trường :

+ Môi trường PEG 22,5 :

Thành phần	Khối lượng và tỷ lệ*	
	(gam)	(%)
PEG 8000	22,5	22,5
Saccarozơ	1,8	1,8
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,15	0,15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,01	0,01
pH 5,8		

+ Môi trường rửa có Ca<sup>2+</sup> :

Thành phần	Khối lượng và tỷ lệ*	
	(gam)	(%)
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0,74	0,74
Glyxin	0,38	0,38
Saccarozơ	11,0	11,0
pH 5,8		

\* Lấy cho 100 ml môi trường

\* Lấy cho 100 ml môi trường

+ Môi trường nuôi cấy tế bào trân và sản phẩm dung hợp của khoai tây

Thành phần	Khối lượng *	Thành phần	Khối lượng *
MS1-A	1,0 ml	Serin	1,0 mg
MS3, MS4	0,5 ml (mỗi loại)	Myo-inositol	10 mg
MS2	3,0 ml	Thiamin	1,0mg
Glucozơ	3,0 g	NAA	0,125 mg
Saccarozơ	1,0 g	2,4D	0,125 mg
Sorbitol	5,0 g	Zeatin	0,1 mg
Cazein thuỷ phân	50 mg	pH 5,8	
Glutamin	10 mg		

\* Lấy cho 100ml môi trường

MS1-A : 9,5g KNO<sub>3</sub> : 0,85g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> và 0,903g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O pha trong 100ml.

#### Tiến hành :

1. Tiến hành tách tế bào trân từ 2 giống khoai tây khác nhau tương tự như quy trình tách từ lá thuốc lá. Để phục vụ cho dung hợp, quần thể tế bào trân thứ nhất được nhuộm với FITC, quần thể tế bào trân kia nhuộm bằng RITC (xem mục 3.3. Lựa chọn sản phẩm dung hợp).
2. Lấy một giọt nhỏ dầu khoáng vô trùng và cho vào giữa đĩa petri, tiếp theo đặt một lamen vô trùng lên trên giọt dầu khoáng.
3. Lấy từ mỗi quần thể tế bào trân 3 giọt nhỏ và cho lên lamen. Giữ yên mẫu trong 10 phút để các tế bào trân lắng xuống và dính vào lamen.
4. Nhỏ từng giọt môi trường PEG vào xung quanh các tế bào trân (5 giọt) và thêm một giọt nữa cho vào giữa quần thể tế bào trân. Giữ ở nhiệt độ phòng trong khoảng 20-25 phút.
5. Thêm môi trường rửa chứa Ca<sup>2+</sup> vào một phía của hỗn hợp tế bào trân : Cứ 5 phút lại thêm từ từ 3 giọt và lặp lại thao tác này trong 20 phút. Trong khi ở phía đối diện dùng pipet loại bỏ 3 giọt môi trường chứa PEG và sự kết dính các tế bào trân xảy ra trong quá trình rửa này.
6. Cho 3 giọt môi trường nuôi cấy vào một phía của hỗn hợp tế bào trân và ở phía đối diện loại bỏ một phần môi trường rửa, lặp lại thao tác thêm 2 lần nữa. Tiếp tục lấy một số giọt môi trường cho vào phần đĩa xung quanh lamen để duy trì độ ẩm, sau đó nuôi cấy trong ánh sáng yếu ở nhiệt độ 25°C.
7. Sau 2-7 ngày nuôi cấy, các tế bào cần được kiểm tra về sự tái tạo thành tế bào, sự phân bào và tần số dung hợp. Khi các tế bào phân chia và hình thành khối mô sẹo đang tăng trưởng, quần thể tế bào nuôi cấy cần được làm loãng bằng môi trường mới với hàm lượng khoáng cao hơn và có 0,6% agar (sau khoảng 2 tuần nuôi cấy).

Khi thời gian nuôi cấy được hơn 2 tuần, có thể quan sát thấy các cụm mô sẹo. Chúng có thể khác nhau về hình thái, màu sắc và kích thước. Những khối mô sẹo sinh trưởng nhanh hoặc có khác biệt rõ rệt có thể là dấu hiệu của con lai xoma.

## Chương 6

# CÔNG NGHỆ NUÔI CẤY PHÔI

### I - MỞ ĐẦU

Trong thực vật có hoa, phôi là những thực thể có hình thái rõ rệt và đảm nhiệm chức năng như giai đoạn trung gian trong thời kỳ chuyển tiếp giữa pha giao tử thế và bào tử thế. Ở thực vật bậc cao, các phôi trong hạt phát triển từ sản phẩm kết hợp giữa các loại giao tử khác nhau và được gọi là phôi hữu tính. Thực vật cũng là những sinh vật duy nhất trong đó các phôi vô tính có thể phát sinh từ các kiểu tế bào và mô ở nhiều thời điểm khác nhau của pha giao tử thế và bào tử thế trong chu trình sống.

Nuôi cấy phôi hữu tính là một hướng nghiên cứu *in vitro* được sử dụng trong nhân giống và chọn giống thực vật. Hanning (1904) là người đầu tiên đã thí nghiệm nuôi cấy phôi trưởng thành của cây *Cochleria* và *Raphanus*. Sau đó là nhiều công trình của các nhà nghiên cứu khác nuôi phôi tách rời từ hạt chín. Dieterich (1924) cho rằng môi trường khoáng Knop bán lỏng có chứa 2,5-5,0% saccarozơ có thể duy trì phôi phát triển bình thường.

Laibach (1925, 1929), đã thực nghiệm với tổ hợp lai khác loài giữa *Linum perenne* và *L. austriacum* và nhận thấy hạt của chúng không có khả năng nảy mầm. Bằng cách tách phôi từ hạt và nuôi cấy *in vitro*, ông đã thu được cây lai. Kể từ đó nuôi cấy phôi hữu tính tách rời đã được sử dụng rộng rãi trong việc tạo các cá thể lai mà phương pháp lai truyền thống khó thực hiện được.

Khả năng tạo ra các phôi vô tính trong điều kiện *in vitro* được thông báo lần đầu tiên bởi Steward và cộng sự (1958). Reinert (1959) đã quan sát thấy phôi lưỡng cực biệt hoá trong nuôi cấy rễ cà rốt khi chuyển từ môi trường này sang môi trường khác. Sự hình thành phôi vô tính là khá phổ biến ở thực vật bậc cao và phát sinh phôi thực nghiệm đã được thông báo trong nuôi cấy mô của hơn 30 họ thực vật (Raghavan, 1975 ; Narayanaswamy, 1977 ; Ammirato, 1983).

### II - NUÔI CẤY PHÔI HỮU TÍNH

#### 2.1. Tách phôi

Có hai vấn đề quan trọng nhất về mặt kỹ thuật liên quan chặt chẽ đến nuôi cấy phôi hữu tính là kỹ thuật tách phôi và thành phần của môi trường nuôi cấy.

Nuôi cấy phôi hữu tính được khởi đầu bằng quá trình tách phôi từ vật liệu thực vật. Ở những loài cây họ đậu, phôi thường có kích thước lớn, rất thuận tiện cho quá trình thu nhận phôi. Tuy nhiên trong một số trường hợp nuôi cấy, cần phải có một số lượng đủ các phôi và ở cùng giai đoạn phát triển. Ở những thực vật có hoa dạng chùm, phôi được hình thành ở các độ tuổi khác nhau và những phôi non hơn thường được sắp xếp ở đỉnh của chùm hoa.

Các phôi hữu tính được hình thành trong môi trường vô trùng của mô noãn và mô bầu hoa. Do đó, trong nhiều trường hợp có thể tách phôi ngay và đưa vào nuôi cấy ở điều kiện vô trùng. Ở các loài hoa lan thường hạt có kích thước nhỏ, vỏ hạt tiêu giảm nhiều và thiếu mô nội nhũ. Vì vậy cần phải tiến hành vô trùng hạt trước khi tách phôi cho nuôi cấy (Raghavan, 1977).

Trong quá trình thu nhận phôi, cần hạn chế đến mức thấp nhất sự tổn thương của dây treo phôi. Dây treo phôi sẽ phát triển đến kích cỡ lớn nhất của nó khi phôi hoàn thành giai đoạn phát triển hình cầu và bắt đầu chuyển sang giai đoạn hình tim. Do có kích thước nhỏ và cấu trúc mỏng manh, cho nên khó tách được dây treo phôi còn nguyên vẹn cùng với phôi để đưa vào nuôi cấy. Một số nghiên cứu gần đây đã cho thấy dây treo phôi có vai trò rất quan trọng đối với sự sinh trưởng và phát triển của phôi non. Khi loại bỏ dây treo phôi đã làm giảm đáng kể tỷ lệ hình thành cây con từ phôi non nuôi cấy. Điều này đã được xác nhận trong nuôi cấy phôi non của các loài *Capsella bursa-pastoris* (Monnier, 1978), *Phaseolus coccineus* (Yeung và Sussex, 1979)...

## **2.2. Thành phần môi trường**

### **2.2.1. Muối khoáng**

Nhiều tổ hợp muối khoáng khác nhau đã được sử dụng cho nuôi cấy phôi, trong đó môi trường của Murashige và Skoog (1962) có biểu hiện kích thích sinh trưởng phôi mạnh nhất đối với nhiều loài thực vật, tuy nhiên tỷ lệ sống sót của phôi thấp. Trên cơ sở của môi trường MS, Monnier đã đưa ra môi trường mới đảm bảo tỷ lệ sống cao của phôi và khả năng thúc đẩy sinh trưởng tốt đối với phôi của một số loài thực vật. Thành phần của môi trường này có hàm lượng cao các ion  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  nhưng giảm hàm lượng  $NH_4^+$ . Theo nhiều nghiên cứu,  $NH_4^+$  rất cần thiết cho sinh trưởng tối ưu của phôi non như trong nuôi cấy phôi lúa mì (Umbeck và Norstog, 1979), phôi cây *Datura tatula* (Matsubara, 1964) (bảng 6.1).

**Bảng 6.1. Thành phần của 2 vùng môi trường khác nhau trong môi trường nuôi cấy phôi non của loài *Capsella bursa-pastoris***

Thành phần	Môi trường	
	Vùng ngoại vi ( $\text{mg.l}^{-1}$ )	Vùng trung tâm ( $\text{mg.l}^{-1}$ )
$\text{KNO}_3$	1900	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	484	1320
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	990	825
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	407	370
KCl	420	350
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	187	170
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37,3	-
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	-
$\text{H}_3\text{BO}_3$	12,4	12,4
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	33,6	33,6
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	21	21
KI	1,66	1,66
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5	0,5
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,05	0,05
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,05	0,05
Glutamin	-	600
Thiamin	0,1	0,1
Saccarozơ	-	180000
Agar	7000	7000

## 2.2.2. Chất điều hòa sinh trưởng

Đối với tạo mô sẹo từ phôi và các phần của phôi, cần phải đưa vào môi trường cả auxin, cytokinin hoặc từng loại riêng rẽ. Nhưng theo ý kiến của một số tác giả, các phôi có khả năng tự tổng hợp được hầu hết các chất điều hòa sinh trưởng, vì vậy trong quá trình phát triển của phôi, sự bổ sung phytohormon là không cần thiết (Monnier, 1978). Tuy nhiên trong một số trường hợp có thể dùng GA<sub>3</sub> để thúc đẩy sự nảy mầm sớm của phôi như quá trình nuôi cấy phôi lúa mì.

## 2.2.3. Nguồn cacbon

Nguồn cacbon được sử dụng trong nuôi cấy cả phôi non và phôi trưởng thành là đường. Qua nghiên cứu, nhiều tác giả cho rằng saccarozơ là nguồn cacbon tốt nhất và được sử dụng phổ biến cho nuôi cấy phôi. Ngoài vai trò cung cấp năng lượng,

saccarozơ còn tham gia vào duy trì áp suất thẩm thấu mà rất quan trọng đối với sự sinh trưởng của phôi, đặc biệt là phôi non. Đối với chức năng thứ hai, nồng độ tối ưu của saccarozơ thay đổi tùy theo giai đoạn phát triển của phôi. Những phôi trưởng thành sinh trưởng khá tốt với khoảng 2% saccarozơ, nhưng các phôi non yêu cầu hàm lượng saccarozơ cao hơn.

#### **2.2.4. Aminoaxit và thành phần hữu cơ phức hợp**

Các aminoaxit có thể được sử dụng riêng rẽ hay phối hợp trong môi trường nuôi cấy phôi. Trong đó, glutamin được chứng minh là aminoaxit hiệu quả nhất đối với nuôi cấy phôi của nhiều loài thực vật.

Cazein thuỷ phân (CH) là một hỗn hợp các aminoaxit được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy phôi. Khi bổ sung CH vào môi trường nuôi cấy phôi *Datura innoxia*, đã làm tăng kích thước và tỷ lệ phân hóa phôi. Phôi cây *Citrus microcarpa* ở giai đoạn hình cầu sớm được nuôi cấy trên môi trường White có 400mg/l CH đã sinh trưởng và phát triển tốt, trong khi đó chúng không phát triển bình thường được trên môi trường không có CH.

#### **2.2.5. Nội nhũ**

Các phôi non thường khó nuôi cấy trên môi trường nhân tạo, đặc biệt là các phôi hình thành từ phép lai xa. Trong nuôi cấy phôi non đại mạch (*Hordeum*), sự sinh trưởng của phôi được gia tăng đáng kể khi môi trường nuôi cấy có chứa nội nhũ tách rời từ các hạt cùng loài. Kruse (1974) cũng phát hiện thấy tỷ lệ sống sót của phôi lai khác loài giữa *Hordeum × Secale* đã tăng từ 30-40% so với 1% khi đưa vào môi trường nuôi cấy nội nhũ lúa mỳ. Theo Kruse, nội nhũ già hơn phôi 5 ngày tuổi là phù hợp với sự sinh trưởng của phôi. William và De Lautour (1980) đã thí nghiệm cấy phôi vào nội nhũ phát triển bình thường của một trong hai dạng cha mẹ ban đầu hoặc của loài thứ ba. Với phương pháp này, các nhà nghiên cứu đã tạo ra được nhiều con lai xa trong chi *Trifolium* mà không thể nuôi được qua sinh trưởng trực tiếp trên môi trường.

### **2.3. Ứng dụng của nuôi cấy phôi hữu tính**

#### **2.3.1. Thu nhận thể đơn bội**

Một ứng dụng lý tưởng của nuôi cấy phôi hữu tính là sử dụng để thu nhận các thể đơn bội thông qua quá trình loại bỏ trực tiếp nhiễm sắc thể sau khi lai xa. Trong tổ hợp lai *Hordeum vulgare × H. bulbosum* sự thụ tinh đã xảy ra nhưng nhiễm sắc thể của *H. bulbosum* bị đào thải ưu tiên trong những lần phân bào sớm của quá trình phát sinh phôi. Tiếp theo là sự phân huỷ nội nhũ khoảng 2-5 ngày sau thụ tinh và chỉ còn lại cấu trúc phôi đơn bội. Cấu trúc này khi được nuôi cấy sẽ phát triển thành cây đơn bội *H. vulgare*. Tổ hợp lai giữa hai loài càng xa nhau thì sự đào thải hoàn toàn bộ nhiễm sắc thể đơn bội của một loài càng dễ xảy ra.

### **2.3.2. Kiểm tra nhanh sức nảy mầm của hạt**

Nuôi cấy phôi hữu tính được dùng để kiểm tra nhanh khả năng nảy mầm của hạt, đặc biệt là các hạt giống có sức sống kém và hạt sau thời gian bảo quản. Đánh giá sự nảy mầm của các phôi hữu tính tách rời được xem như một phương pháp kiểm tra chính xác và tin cậy hơn các phương pháp nhuộm phôi hạt truyền thống.

### **2.3.3. Nhân giống các cây hiếm**

Hạt của một số loài thực vật rất khó nảy mầm trong điều kiện tự nhiên đã làm giảm khả năng sinh sản hữu tính của chúng. Giống dừa quả Makapuno ở Philipin có giá trị kinh tế cao nhưng rất khó nhân giống từ hạt. Bằng kỹ thuật nuôi cấy phôi tách rời, người ta đã thu được các cây dừa con với tỷ lệ thành công tới 85% (De Guzman và cộng sự, 1976).

### **2.3.4. Thụ phấn trong ống nghiệm**

Trong tự nhiên, nùm nhuy có thể nhận nhiều hạt phấn nhưng không phải tất cả chúng đều thành công trong quá trình thụ phấn. Nùm nhuy và vòi nhuy chỉ cho phép một hạt phấn thực hiện chức năng của nó, các hạt phấn khác sẽ bị loại bỏ. Bởi vậy khi hạt phấn của một loài nào đó rơi vào nùm nhuy của một loài khác sẽ không thể tiếp tục phát triển được do có một rào cản đối với quá trình thụ tinh :

- Hạt phấn không có khả năng nảy mầm trên nùm nhuy khác loài.
- Ống phấn không tiếp cận được noãn do độ dài quá mức của vòi nhuy hoặc ống phấn sinh trưởng chậm không tiếp cận đến đáy của vòi nhuy vào thời điểm thích hợp.
- Vỡ ống phấn trong vòi nhuy.

Các trường hợp khác, sự thụ tinh vẫn xảy ra bình thường nhưng phôi lai không phát triển được đến dạng trưởng thành do bất tương hợp giữa phôi và nội nhũ hoặc do nội nhũ sinh trưởng kém. Những rào cản đó có thể vượt qua được bằng kỹ thuật thụ phấn trong ống nghiệm. Nhưng trước tiên phải nuôi cấy được noãn hoặc bầu hoa trong điều kiện vô trùng. Thụ phấn trong ống nghiệm là tiến hành toàn bộ quá trình nảy mầm của hạt phấn, sinh trưởng của ống phấn, thụ tinh và phát triển của phôi hạt, của quả trong điều kiện *in vitro*, không phụ thuộc vào cây mẹ. Năm 1962, Kanta là tác giả đầu tiên thông báo thụ phấn trong ống nghiệm ở cây thuốc phiện (*Papaver somniferum*). Sau đó Maheshwari và cộng sự (1963) đã tiến hành các thí nghiệm tương tự với cây mỳ nhân thảo (*Papaver rhoeas*) và cây *Eschscholtzia californica*... Sử dụng kỹ thuật thụ phấn trong ống nghiệm, Kanta và Maheshwari (1963) đã phát triển con lai khác loài giữa *Argemone mexicana* x *A. ochroleuca*. Inomata (1977, 1979) cũng thành công với con lai giữa hai loài bất tương hợp về sinh sản hữu tính là *Brassica campestris* x *B. oleracea*. Kể từ đó nhiều nhà nghiên cứu đã thụ phấn thành công trong ống nghiệm đối với các loài thuộc họ *Solanaceae*, *Papaveraceae*, là những loài có bầu hoa chứa nhiều noãn và dễ nuôi cấy *in vitro*. Tuy vậy kỹ thuật này vẫn chưa thu được nhiều kết quả với các loài thực vật thuộc họ *Gramineae* và các tổ hợp lai khác loài, vì khó nuôi cấy noãn, bầu hoa và khó xác định điều kiện phù hợp cho sự phát triển của hạt phấn và ống phấn.

## THÍ NGHIỆM CỨU PHÔI HỮU TÍNH KHOAI TÂY

(Theo Dodds và Roberts, 1999)

**Nguyên liệu và thiết bị :**

- Etanol 90%.
- Dung dịch hypoclorit canxi 5% (W/v).
- Nước cất 2 lần vô trùng.
- Kính lúp 2 mắt.
- Dao, kéo, panh... dùng cho nuôi cấy.
- Pha môi trường trên các đĩa petri và có thành phần như sau.

Môi trường MS	Nồng độ
Saccarozơ	4% (W/v)
Agar	0,6-1,0% (W/v)
Cazein thuỷ phân	1,0g/l
Thiamin HCl	1mg/l
Axit nicotinic	1mg/l
Pyridoxin	1mg/l
Axit malic	100mg/l
Myo-inositol	100mg/l

**Tiến hành :**

1. Thu hái các quả khoai tây trưởng thành, khi quả còn màu xanh, khoảng 21-28 ngày sau khi thụ phấn.
2. Khử trùng bề mặt quả bằng etanol 90% trong 30 giây.
3. Ngâm quả trong hỗn hợp dung dịch hypoclorit canxi 5% và nước cất vô trùng (tỷ lệ thể tích 1 :1) trong 15 phút. Tiếp theo rửa quả 3 lần với nước cất 2 lần vô trùng.
4. Trong tủ cấy vô trùng, tiến hành tách hạt từ quả và chuyển sang đĩa petri.
5. Sử dụng kính lúp 2 mắt để bóc vỏ hạt và tách rời phôi.
6. Cấy phôi vào đĩa petri đã chứa sẵn môi trường dinh dưỡng và đưa vào nuôi ở nhiệt độ từ 18-22°C với quang chu kỳ 16 giờ/ngày, ánh sáng yếu.
7. Các phôi được tách tốt từ hạt sẽ phát triển dần thành cây khoai tây con và sau thời gian nuôi cấy, những cây với bộ rễ đầy đủ có thể được chuyển ra trồng trong vườn ươm...

### III - NUÔI CẤY PHÔI VÔ TÍNH

#### 3.1. Đặc điểm của nuôi cấy phôi vô tính

- Theo Kohlenbach (1978), phôi vô tính có thể xuất hiện trong điều kiện *in vitro* từ 3 nguồn tế bào lưỡng bội nuôi cấy :

+ Các tế bào sinh dưỡng của cây trưởng thành.

+ Các mô tái sinh không phải là hợp tử.

+ Các lá mầm và trụ dưới lá mầm của phôi và cây con, không có bất cứ sự phát triển nào của mô sẹo.

Về bản chất các phôi ngẫu nhiên trên phát triển như thế nào vẫn còn là chủ đề của nhiều nghiên cứu. Theo Sharp và đồng nghiệp (1980), phát sinh phôi vô tính có thể được khởi đầu theo 2 con đường : Trong một số nuôi cấy, phát sinh phôi xảy ra trực tiếp không có giai đoạn tạo mô sẹo. Phôi được hình thành từ những tế bào được xác định là tiền phôi. Kiểu thứ 2 của phát triển yêu cầu sự tăng sinh của mô sẹo và các phôi được tạo ra từ các tế bào phôi hoá cảm ứng trong mô sẹo. Các phôi được khởi đầu trong mô sẹo từ các cụm tế bào bể ngoài liên kết với những tế bào không bào hoá mạnh mà không tham gia trong phát sinh phôi. Những quan sát đã được thực hiện trên siêu cấu trúc của những cụm tế bào phôi trong mô sẹo cà rốt (Mc. William và cộng sự, 1974 ; Street và Withers, 1974) và mô sẹo cây *Ranunculus* (Thomas, Konar và Street, 1972). Các tế bào hình thành phôi có đặc điểm : thành phần nguyên sinh chất đậm đặc, các hạt tinh bột to và nhân tương đối lớn có màu sẫm. Những phân tích với các thuốc nhuộm đã cho thấy các tế bào phát triển phôi có những hàm lượng cao của protein và ARN, chúng cũng biểu hiện hoạt tính dehydrogenaza cao, với thuốc thử tetrazolium (Mc. William và cộng sự, 1974 ; Street và Withers, 1974).

- Các phôi phát triển qua các giai đoạn liên tiếp của hình thành phôi bao gồm : giai đoạn hình tim, hình cầu, hình cá đuối. Có 2 sự kiện quyết định liên quan đến chương trình sớm của quá trình phát triển (Hohlenbach, 1978) :

+ Cảm ứng biệt hoá tế bào của những tế bào tiền phôi.

+ Biểu hiện trình tự phát triển ở các tế bào tiền phôi.

- Mặc dù các tế bào tiền phôi có khả năng biệt hoá nhưng sự phát triển của chúng có thể bị ngăn cản do sự mất cân bằng của các chất trong môi trường nuôi cấy. Sự hình thành các cụm phát triển phôi và sự kết dính phôi có thể xảy ra nếu môi trường có những nồng độ cao của auxin sau khi các tế bào phát triển phôi đã biệt hoá (Kolenbach, 1978). Hai loại môi trường khác nhau có thể được sử dụng : một môi trường dùng cho tạo các tế bào có khả năng phát sinh phôi và loại môi trường kia cần để những tế bào đó phát triển thành phôi. Môi trường thứ nhất thường phải có auxin, còn môi trường thứ hai không hoặc chứa auxin ở nồng độ thấp. Đối với một số thực vật, các giai đoạn trên

có thể xảy ra ở môi trường thứ nhất, môi trường thứ hai được dùng cho sự phát triển của cây con (Ammirato, 1983).

+ Những thành phần hóa học quan trọng nhất trong môi trường cảm ứng là auxin và nitơ dạng khử. Theo Ammirato (1983), lượng nitơ khử được cân đến trong cả môi trường thứ nhất và môi trường thứ hai. Trong nuôi cấy cà rốt dài, việc bổ sung 10mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  vào môi trường phát triển phôi có chứa 12-40mM  $\text{KNO}_3$  đã hình thành số lượng gần như cực đại các phôi. Glutamin, axit glutamic, urê và alanin có thể thay thế từng phần  $\text{NH}_4\text{Cl}$  làm nguồn nitơ bổ sung cho  $\text{KNO}_3$  (Wetherell và Dougall, 1976). Các nguồn nitơ khác là không đặc hiệu cho cảm ứng phát sinh phôi mặc dù ở những nồng độ thấp các dạng nitơ hữu cơ có hiệu quả hơn nitơ vô cơ.

+ Vai trò của cytokinin trong phát sinh phôi ở một mức nào đó là không rõ ràng do những kết quả trái ngược. Ở huyền phù tế bào cà rốt, khi cây truyền sang môi trường không có auxin nhưng có zeatin ở nồng độ  $0,1\mu\text{M}$  đã kích thích phát sinh phôi, quá trình này bị úc chế khi bổ sung thêm hoặc kinetin, hoặc BAP vào môi trường nuôi cấy (Furimura và Komamine, 1975). Hiệu quả úc chế của các cytokinin ngoại sinh có thể là do tăng các cytokinin nội sinh trong quá trình phát triển của phôi (Al-Abta và Collin, 1979).

+ Các môi trường có chứa than hoạt tính đã làm thuận lợi cho phát sinh phôi trong một số nuôi cấy. Cảm ứng phát sinh phôi đã thành công đối với *Daucus carota* trên môi trường có than hoạt tính (Fridborg và Eriksson, 1975 ; Drew, 1979). Than hoạt tính cũng cần thiết cho phát sinh phôi ở cây thường xuân Anh (*Hedera helix*) nuôi cấy (Banks, 1979). Các bằng chứng cho thấy rằng, than hoạt tính hấp thụ nhiều chất úc chế cũng như các chất kích thích sinh trưởng.

- Phát sinh phôi xảy ra trong một thời gian ngắn và khả năng này giảm dần khi tăng thời gian nuôi cấy (Reinert, Bajaj và Zbell, 1977). Tuy nhiên cũng có những ngoại lệ, phát sinh phôi được thông báo có thể duy trì vài năm trong nuôi cấy. Ở cà rốt, khi nuôi cấy được 4-6 tuần, sự hình thành phôi sẽ bắt đầu và đạt đến mức độ tối ưu sau 15 tuần (Reinert, Backs-Hüsemann và Zerman, 1971). Khả năng phát sinh phôi bị mất sau 36 tuần nuôi cấy *in vitro*, nhưng khả năng này có thể được cảm ứng lại một lần nữa khi chuyển các tế bào vào môi trường thích hợp (Reinert, 1971). Việc mất tạm thời khả năng phát sinh phôi có lẽ do thiếu sinh tổng hợp các chất phôi hóa. Ngoài ra những thay đổi trong mức độ bội của tế bào nuôi cấy có thể dẫn đến mất khả năng phát sinh hình thái (Smith và Street, 1974).

- Một kỹ thuật đã được phát triển để thúc đẩy các giai đoạn phát sinh phôi hình cầu, hình tim và hình cá đuối (Warren và Fowler, 1977). Quy trình này được chứng minh là hữu ích đối với các nghiên cứu sinh hóa của quá trình phát triển. Ở nuôi cấy huyền phù tế bào cà rốt, mức độ cao trong phát sinh phôi đồng thời đã đạt được theo phương pháp sau :

- + Sàng lọc quần thể tế bào ban đầu.
- + Ly tâm gradient mật độ trong dung dịch Ficoll.
- + Ly tâm tốc độ thấp nhiều lần, mỗi lần trong 5 giây.

Kết quả các cụm tế bào nuôi cấy trên môi trường không có auxin nhưng có zeatin đã cho tỷ lệ hơn 90% các tế bào hình thành phôi (Fujimura và Komamine, 1979). Mặc dù việc tái sinh toàn bộ cây qua phát sinh phôi là tương đối hiếm ở *Gramineae*, nhưng phôi vô tính đã được tạo ra trực tiếp từ các tế bào thịt lá cây *Dactylis glomerata*. Các mẫu cấy được chuẩn bị từ những phần cơ bản của lá nuôi cấy trên môi trường Schenk và Hildebrandt có chứa 30 $\mu$ M axit 3,6-dichloro-O-anisic (dicamba) và 0,8% (W/v) agar. Sự hình thành cây con xảy ra khi cấy chuyển các phôi lên cùng loại môi trường nhưng không có dicamba (Conger và cộng sự, 1983). Nhiều nghiên cứu đã cho thấy các poliamin là cần thiết cho cảm ứng phát sinh phôi trong nuôi cấy cà rốt đại (Feirer, Mignon và Litvay, 1984). Các nuôi cấy phát sinh phôi ở *Daucus carota* được xử lý với chất ức chế đặc hiệu của arginin decacboxylaza đã cảm ứng mạnh sự sản sinh phôi khi so sánh với trường hợp không xử lý. Những nuôi cấy có chứa chất ức chế cũng biểu hiện các mức tương đối thấp của các poliamin như putrescin và spermidin. Khi bổ sung vào môi trường một trong các chất putrescin, spermidin và spermin đã phục hồi phát sinh phôi đối với các nuôi cấy bị ức chế (Feirer và cộng sự, 1984).

### **3.2. Các nhân tố ảnh hưởng đến phát sinh phôi**

#### **3.2.1. Các chất điều hòa sinh trưởng**

Các chất điều hòa sinh trưởng được sử dụng trong hầu hết các hệ thống nuôi cấy phôi vô tính. Trong thực nghiệm, nuôi cấy khởi đầu thường dùng những phạm vi rất hẹp chất điều hòa sinh trưởng được đưa vào môi trường.

- Loại auxin tổng hợp như 2,4D được dùng phổ biến trong những nuôi cấy ban đầu. Những auxin khác cũng được sử dụng và bao gồm IBA, NOA, picloram, các auxin yếu là NAA và IAA được dùng trong một vài hệ thống nuôi cấy. Auxin dùng cho cảm ứng hình thành tế bào phát triển phôi, có lẽ do hoạt hóa gen phân hóa khởi đầu và cũng thúc đẩy tăng quần thể tế bào qua phân bào liên tiếp, đồng thời ngăn cản sinh trưởng và biệt hóa tế bào thành các phôi. Trong trường hợp mẫu cấy có chứa các tế bào phát triển phôi thì môi trường nuôi cấy có thể không cần đến các auxin.

- Ngoài auxin, các cytokinin cũng được dùng cho cảm ứng phát sinh phôi ở các loài thực vật hai lá mầm. Loại cytokinin được sử dụng nhiều trong môi trường nuôi cấy là BAP, nhưng các cytokinin khác như kinetin, zeatin và TDZ cũng cho kết quả tốt tuy thuộc vào loài thực vật. Trong nuôi cấy phôi, nồng độ của chất điều hòa sinh trưởng là rất quan trọng đối với phản ứng sinh trưởng tối ưu của mẫu cấy. Khi nồng độ quá thấp sẽ không kích thích sinh trưởng, ngược lại hàm lượng quá cao có thể gây độc cho mẫu...

- Sự phát triển của phôi vô tính cà rốt trong nuôi cấy trải qua một quá trình gồm hai giai đoạn, mỗi giai đoạn cần có môi trường riêng. Các mô sẹo được nuôi cấy khởi đầu và nhân sinh khối trên môi trường giàu auxin và thường sử dụng 2,4D ở phạm vi nồng độ 0,5-1,0 mg/l. Trên môi trường này, sự phân hoá mô sẹo xảy ra tại các nhóm tế bào phân sinh được gọi là “các cụm phát triển phôi” (EC). Khi cấy truyền sang môi trường tăng sinh, các EC tiếp tục lớn dần mà không tạo các phôi trưởng thành. Nếu các EC được chuyển sang môi trường có nồng độ auxin rất thấp (0,01-0,1mg/l) hoặc không có auxin, chúng sẽ phát triển thành phôi trưởng thành. Sự có mặt của auxin trong môi trường tăng sinh là cần thiết cho mầm có thể phát triển thành phôi khi chuyển sang môi trường phù hợp. Các môi trường tăng sinh có thể coi là môi trường cảm ứng đối với hình thành phôi vô tính (Sung và Okimoto, 1981). Những mầm duy trì liên tục trong môi trường không có auxin sẽ không hình thành phôi.

Ở cây cà phê *Coffea arabica* các phôi vô tính chỉ phát triển khi mô sẹo hình thành trên môi trường chứa 2,4D được chuyển sang môi trường không có loại hoocmon này. Đối với một số loài thực vật, những auxin khác lại sử dụng có hiệu quả hơn 2,4D, như trường hợp của cây bí ngô, NAA và IBA được dùng cho phát sinh phôi (Jelaska, 1974). Trong nuôi cấy phôi tâm cây *Vitis*, sự hình thành phôi xảy ra khi có mặt của NAA và BAP (Mullins và Sirinivasan, 1976). Các mô sẹo phôi tâm cây *Citrus sinensis* yêu cầu có IAA và kinetin cho sinh trưởng của chúng và biệt hóa phôi. Sự cấy truyền lặp lại của mô sẹo đã làm giảm dần khả năng phát sinh phôi và sau khoảng hai năm các dòng mô có biểu hiện tự dưỡng hoocmon. Ở những dòng mô này, sự có mặt của IAA nồng độ thấp (0,001mg/l) trong môi trường đã ức chế hình thành phôi. Khi xử lý mô với những hóa chất ức chế sinh tổng hợp auxin như 2-hydroxy-5-nitro-benzyl bromide, hoặc 7-aza-indole và chiếu xạ, sự phân hóa phôi đã có cải thiện rõ rệt (Kochba và Spiegel-Roy, 1977). Như vậy, các mức cao của auxin nội sinh đã làm giảm khả năng phát sinh phôi của mô sẹo *Citrus*.

Một số ý kiến cho rằng sự ức chế phôi trưởng thành của 2,4D là qua trung gian hình thành etylen nội sinh. Trong mô nuôi cấy, hợp chất giải phóng ra etylen là axit 2-chlorophosphonic (ethephon) cũng có biểu hiện ngăn cản sự phát triển của phôi vô tính trưởng thành, đồng thời không có cảm ứng đáng kể nào trong sinh trưởng và tăng sinh của các EC trong nuôi cấy huyền phù cà rốt (Wochok và Wetherell, 1971). Theo Huang (1971), các mô cà rốt nuôi cấy trên môi trường có auxin sản sinh nhiều etylen hơn ở môi trường không có auxin. Thành phần etylen cao có thể tăng cường hoạt tính của enzym xellulaza, pectinaza hoặc cả hai, làm phá vỡ các cụm tế bào trước khi sự phân cực được thiết lập trong cấu trúc tiền phôi cần cho sự phát triển có tổ chức tiếp theo. Do đó, 2,4D trong môi trường nuôi cấy có tác dụng hình thành và làm tăng sinh khói các cấu trúc mô, nhưng không làm xuất hiện phôi trưởng thành.

**Bảng 6.2. Danh sách một số loài thực vật hình thành phôi vô tính trong nuôi cấy**

Loài thực vật	Tác giả
<i>Daucus carota</i> L.	Steward và cộng sự, 1958 Reinert, 1959 Halperin & Wetherell, 1964 Homes, 1967
<i>Solanum melongena</i> L.	Yamada, Nakagawa & Sinoto, 1967
<i>Ranunculus sceleratus</i> L.	Nataraja & Konar, 1970
<i>Bromus inermis</i> Leyss. Var. Machar	Gamborg, Constabel & Miller, 1970 Constabel, Miller & Gamborg, 1971
<i>Atropa belladonna</i> L.	Konar, Thomas & Street, 1972
<i>Citrus sinensis</i> var. "Shamouti" orange	Kochba & Button, 1974
<i>Pinus ponderosa</i> Dougl.	Moore, 1976
<i>Coffea arabica</i> L.	Sondahl & Sharp, 1977
<i>Nicotiana tabacum</i> var. Samsun	Lörz, Potrykus & Thomas, 1977
<i>Brassica oleracea</i> var. Borytis	Pareek & Chandra, 1978
<i>Hordeum vulgare</i>	Bayliss & Dunn, 1979
<i>Manihot esculentum</i>	Stamp & Henshaw, 1982
<i>Carica papaya</i>	Litz & Conover, 1983
<i>Saccharum officinarum</i>	Jane Ho & Vasil, 1983

Các môi trường tăng sinh chứa BAP có thể thúc đẩy sự phân bào nhưng kìm hãm khả năng phát sinh phôi trong trường hợp ở cây cà rốt. Điều này có lẽ do những kích thích tăng sinh khối chọn lọc ở những thành phần của các tế bào không phát sinh phôi. Tuy nhiên hiệu quả tích cực của cytokinin đối với sự hình thành phôi đã được xác nhận trong nuôi cấy nhiều loài thực vật. Theo Fujimura và Komamine (1980), zeatin có tác dụng kích thích tốt nhất đối với sự hình thành phôi khi được đưa vào môi trường phôi hóa đã chứa mẫu nuôi cấy được 3-4 ngày tuổi. Nhìn chung vai trò của cytokinin trong phát sinh phôi vô tính là khác nhau từ loài thực vật này sang loài thực vật khác phụ thuộc vào kiểu gen, điều kiện môi trường và thời điểm chúng được sử dụng.

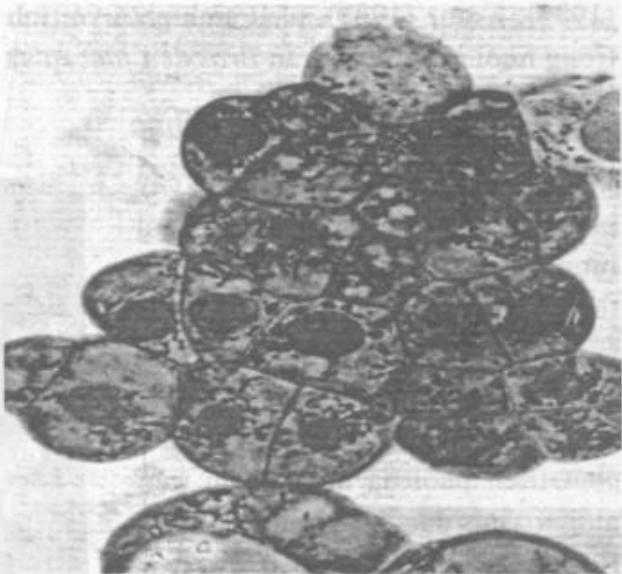
Các chất điều hòa sinh trưởng khác như GA<sub>3</sub>, ABA ở nồng độ thấp cũng có tác dụng kích thích trong phát sinh phôi của cà rốt, *Citrus medica*, *Phaseolus...* GA<sub>3</sub> có thể thúc đẩy sự phát triển của phôi đến giai đoạn chín và hình thành cây con (Kavathekar và cộng sự, 1978 ; Lu và cộng sự, 1982).

### 3.2.2. Nguồn nitơ

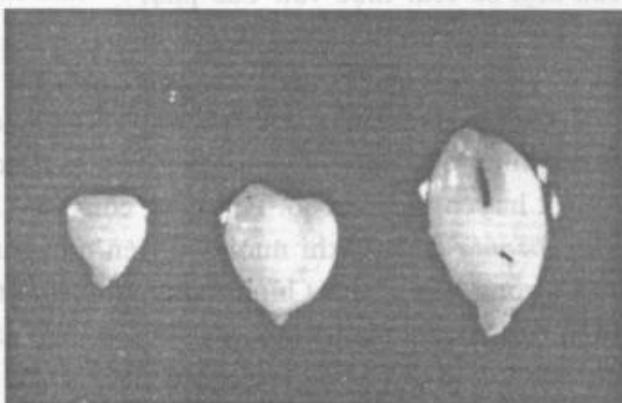
Các dạng nitơ dùng cho nuôi cấy có ảnh hưởng quan trọng đến sự hình thành phôi và mỗi loại thực vật thích hợp với những dạng nitơ khác nhau trong nuôi cấy phôi cũng như trưởng thành của phôi. Trong nuôi cấy các mẫu có nguồn gốc từ cuống cây cà rốt dại, sự phát triển của phôi chỉ xảy ra ở môi trường có nitơ dạng khử. Nuôi cấy khởi đầu mờ sẹo trên môi trường chứa  $\text{KNO}_3$  làm nguồn nitơ duy nhất đã không hình thành được phôi. Khi bổ sung thêm một lượng nhỏ nitơ dạng amon ( $5\text{mmol/l NH}_4\text{Cl}$ ) vào môi trường có  $55\text{mmol/l KNO}_3$  đã thúc đẩy sự phát triển của phôi (Haperin và Wethrell, 1965).

Amon dùng trong môi trường nuôi cấy thường phối hợp với các axit hữu cơ, đặc biệt là các hợp chất của axit malic và xitic. Phôi của lúa mỳ đã sinh trưởng tốt khi môi trường có chứa amon malat, glutamin và saccaroz ở nồng độ thấp. Nhưng nếu chỉ có amon ( $\text{NH}_4^+$ ) làm nguồn nitơ vô cơ sẽ gây ra hiện tượng axit hóa môi trường, vì vậy thường sử dụng kết hợp với nitơ dạng nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ). Theo Dougall và Verma (1978), pH của môi trường chỉ chứa  $\text{NH}_4\text{Cl}$  là nguồn nitơ độc nhất đã giảm từ 5,4 xuống 4-3,5 sau 4 ngày nuôi cấy và có biểu hiện ức chế sự hình thành phôi.

Các nitơ hữu cơ bao gồm các aminoaxit và các amit được dùng nhiều trong nuôi cấy phôi. Glutamin và asparagin có tác dụng kích thích phát triển phôi *Datura* và nhiều loài thực vật khác, nhưng glutamin có hiệu quả rõ rệt hơn. Những hỗn hợp hữu cơ không xác định như casein thuỷ phân (CH), nước dừa (CM) cũng có ảnh hưởng tốt đối với hình thành và phát triển phôi, do chúng chứa nhiều thành phần khoáng, các aminoaxit... Sự phát sinh phôi đã xảy ra trong nuôi cấy tế bào trân trụ dưới lá mầm cây *Brassica napus* và *Brassica nigra*. Các mờ sẹo hình thành từ trụ dưới lá mầm sau hai tuần nuôi trên môi trường MS có 2,4D và 10% CM được chuyển sang môi trường không chứa chất kích thích sinh trưởng đã hình thành phôi. Theo Chatterjee và cộng sự



Hình 6.1. Các tế bào phát triển phôi điển hình ở nho  
(Gray D. J., 1995)



Hình 6.2. Phôi vô tính của nho ở các giai đoạn phát triển  
(Trigiano R. N. và Gray D. J., 1996)

(1985), Kranz (1988), phát sinh phôi vô tính trực tiếp và tái sinh cây con có thể xảy ra trong nuôi cấy tế bào trân *Brassica juncea* và *B. napus*.

### 3.2.3. Agar và các chất khác

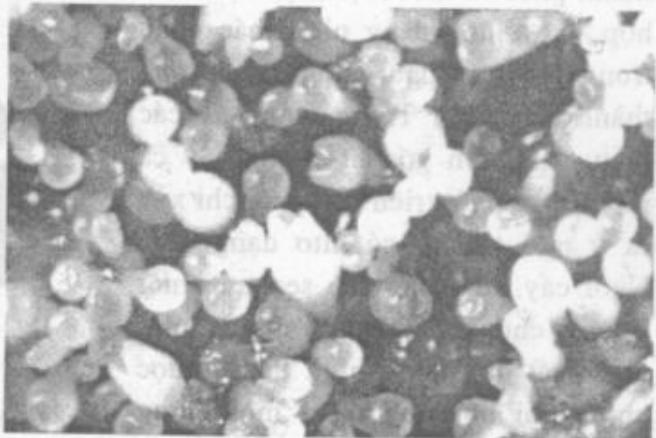
Đa số các hệ thống nuôi cấy phôi đều sử dụng agar và hàm lượng trong môi trường dao động từ 0,5 đến 1,5%, nồng độ cao hơn sẽ ức chế hình thành phôi do trao đổi nước kém. Trong nuôi cấy phôi cây *Dactylis glomerata*, các tế bào phát triển phôi đã hình thành trên môi trường đặc SH có 0,7% agar. Hu (1975) thường dùng 0,7% agar trong các thí nghiệm nuôi cấy phôi của một số loài thực vật. Các phôi vô tính cũng đã thu được từ mò lá và đế hoa cây *Cineraria* nuôi trên môi trường đặc MS với 0,8% agar (Trigiano và đồng nghiệp, 1996). Tuy nhiên có những nuôi cấy dùng môi trường lỏng phù hợp hơn, đặc biệt đối với các nuôi cấy bắt đầu từ huyền phù tế bào. Pence và cộng sự (1980) nhận thấy các phôi của cây ca cao (*Theobroma cacao*) khi nuôi cấy trên môi trường lỏng có kích thước gấp đôi so với môi trường bán rắn. Sự hình thành phôi trực tiếp có thể đạt được từ các tế bào biểu bì và tế bào vỏ của rễ cây con *Cichorium* nuôi cấy trên môi trường lỏng có bổ sung NAA (0,1 $\mu$ M), 2-ip (2,5 $\mu$ M), saccarozơ (0,03M) và glutamin (1,7mM).

Nguồn cacbon cung cấp năng lượng chủ yếu trong nuôi cấy phôi vô tính ở nhiều loài thực vật là các loại đường, trong đó đường saccarozơ được sử dụng phổ biến.

### 3.2.4. Các điều kiện nuôi cấy phôi vô tính

#### 3.2.4.1. Ánh sáng

Ánh sáng kích thích sự mầm của phôi, do đó ở giai đoạn phôi còn non được nuôi cấy trong tối để cho phôi phát triển và khi cần tái sinh các phôi sẽ được chuyển ra nơi có ánh sáng. Nuôi cấy phôi hợp tử cây vân sam trắng (*Picea glauca*) trong tối, sau 3-6 tuần đã xuất hiện các mô phát triển phôi màu trắng nhạt có chứa các phôi vô tính non trên bề mặt của chúng (Attree và cộng sự, 2000). Tương tự, các hạt non cây dương vàng (yellow poplar, *Liriodendron tulipifera*) khi được nuôi cấy trong tối sẽ hình thành các mô phát triển phôi, sau khoảng 1 tháng nuôi cấy (Merkle, 2000). Tuy nhiên có những phôi cần ánh sáng để hình thành và phát triển, nhu cầu về cường độ, thời gian chiếu sáng cũng không giống nhau cho sinh trưởng tối ưu.



Hình 6.3. Các phôi vô tính của cây dương vàng (*Liriodendron tulipifera*) ở thời điểm 6 tuần tuổi

(Trigiano R. N. và Gray D. J., 1996)



**Hình 6.4. Các giai đoạn phát triển của phôi cây cà rốt (*Daucus carota*)**

- Giai đoạn hình cầu ;
- Giai đoạn trái tim ;
- Giai đoạn cá đuối ;
- Cây cà rốt con trên cầu giấy lọc ;
- Cây cà rốt trưởng thành có nguồn gốc từ nuôi cấy phôi.

(Dodds và Robert, 1999)

### 3.2.4.2. Nhiệt độ

Mặc dù các loài thực vật trong tự nhiên có biên độ sinh thái khác nhau về nhiệt độ tối ưu, nhưng để thuận tiện thì nhiệt độ thường được duy trì ổn định trong suốt thời gian nuôi cấy ở  $\approx 25^{\circ}\text{C}$ . Đối với cây lạc (*Arachis hypogaea*), các thí nghiệm cảm ứng và hình thành phôi vô tính xảy ra tốt nhất ở  $26^{\circ}\text{C}$  trong tối, còn để cho phôi này mầm thì cần nuôi ở nhiệt độ  $28^{\circ}\text{C}$  với quang chu kỳ 16h chiếu sáng/ngày (Hazel Y. Wetzstein và Charleen Baker, 2000). Các nuôi cấy mô sẹo phát triển phôi trên môi trường có agar và áp suất thẩm thấu cao ở nhiệt độ  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  đã tạo ra được các phôi bình thường ở cà rốt và củ cải vàng (Ammirato và Steward, 1971).

### 3.3. Hạt nhân tạo

Các phôi vô tính hình thành trong nuôi cấy được bao bọc bằng một vỏ chứa chất dinh dưỡng và những chất bổ sung khác tạo ra các hạt nhân tạo (Demarly, 1986 ; Redenbaugh và cộng sự, 1986). Trạng thái phát triển của phôi vô tính được ngăn lại và duy trì ở nhiệt độ lạnh hoặc dùng chất ức chế nguyên phân trước khi bao hạt bằng chất tạo gel có môi trường dinh dưỡng. Cần phải duy trì phôi ở trạng thái bất động và bảo vệ chống lại sự khô涸 và tác nhân gây bệnh nhằm giữ sức sống của phôi cho đến khi sử dụng hạt nhân tạo.

Vỏ dùng cho bao phôi phổ biến hiện nay là dùng hợp chất Na-alginat ở nồng độ 2-4% trong nước. Khi nhỏ dung dịch Na-alginat vào dung dịch  $\text{CaCl}_2$  (2,5%) sẽ xảy ra phản ứng trao đổi ion và tạo ra lớp vỏ bao phôi bằng Ca-alginat. Hợp chất này có thể giữ ẩm cho phôi, chống mất nước và nhờ đó phôi này mầm được khi cần thiết. Hạt giống nhân tạo của cây cà rốt được bảo quản trong lạnh ở  $4^{\circ}\text{C}$ , sau 2 tháng đưa ra điều kiện bình thường, hạt này mầm  $\approx 100\%$ . Tuy nhiên hạt nhân tạo của nhiều loài thực vật đều bị mất khả năng nảy mầm sau một khoảng thời gian ngắn. Có thể do tế bào phôi được nuôi cấy thời gian dài trong môi trường lỏng, qua nhiều lần cấy truyền, hoặc các tế bào phát triển không bình thường; Có thể vật liệu tạo vỏ hạt có mức độ trao đổi khí kém, phôi khô lấy được các chất dinh dưỡng và nước... Việc ứng dụng phương pháp này vào nông, lâm nghiệp là khá tốn kém, ít nhất là cho đến thời điểm này khi so sánh với sản xuất và sử dụng hạt theo phương pháp tự nhiên.

## THÍ NGHIỆM BAO GÓI PHÔI VÔ TÍNH ĐỂ THU HẠT NHÂN TẠO

### *Nguyên liệu và thiết bị :*

- Các phôi vô tính của cây Cỏ nón (*Dactylis glomerata L.*).
- Dung dịch  $\text{CaCl}_2$  25mM vô trùng.
- Máy khuấy từ.
- Màng nilon vô trùng có kích thước lỗ  $1000\mu\text{m}$ .
- Cốc thuỷ tinh 150ml vô trùng.
- Dung dịch muối alginat natri 2% vô trùng.
- Môi trường SH-O : bao gồm muối khoáng SH và các hợp chất hữu cơ (bảng phân phụ lục), 30mg/l saccarozơ, điều chỉnh pH đến 5,4 trước khi khử trùng.
- Đĩa petri đường kính 100mm chứa 25ml môi trường SH-O.
- Kính lúp.

*Tiến hành :*

1. Thu các phôi vô tính từ thí nghiệm nuôi cấy huyền phù hoặc nuôi cấy mô sẹo và cho vào cốc thuỷ tinh 150ml qua màng nilon có kích thước lỗ 1000 $\mu$ m. Các phôi riêng rẽ, cụm tế bào phôi, tế bào và cả những tế bào dính với nhau có thể đi qua màng lọc.
2. Sử dụng kính lúp để lựa chọn các tế bào phôi trưởng thành và cho vào dung dịch muối alginat natri đang khuấy nhẹ.
3. Ở thí nghiệm đối chứng, các tế bào phôi được đưa vào nuôi cấy trên môi trường đặc SH-O không qua xử lý với dung dịch alginat natri.
4. Dùng pipet lấy ra một phôi từ dung dịch alginat natri, đâm bảo phôi lấy ra và dung dịch tạo thành một giọt nhỏ ở đầu pipet.
5. Cho nhẹ nhàng giọt nhỏ chứa một phôi vào dung dịch  $\text{CaCl}_2$  25mM đang khuấy nhẹ. Lặp lại bước này nhiều lần để thu được một số lượng phôi cần thiết.
6. Chuyển hỗn hợp dung dịch alginat canxi và các phôi vào môi trường lỏng SH-O đang khuấy nhẹ trong 15 phút. Sau đó đưa các hạt phôi ra đĩa petri với mật độ 5 hạt/đĩa và giữ ở nhiệt độ 25°C qua đêm để cho môi trường đông lại.
7. So sánh khả năng này mầm của các phôi trong hạt nhân tạo thu được với các phôi đối chứng 2 lần/tuần trong 2 tuần kế tiếp. Ghi lại số lượng rễ và chồi được hình thành từ các xử lý và có điều chỉnh phù hợp cho các lần thí nghiệm khác.

## Chương 7

# CHUYỂN GEN VÀO THỰC VẬT

### I - MỞ ĐẦU

Chuyển gen có thể được hiểu chung là một quá trình đưa ADN vào tế bào. Mặc dù tế bào thực vật chứa 3 bộ genôm khác nhau, tồn tại trong nhân, ty thể và lạp thể, nhưng đa số các nghiên cứu chuyển gen đều được thực hiện với bộ gen của nhân, một số ít nghiên cứu tiến hành với bộ gen của ty thể và lạp thể. Phân tử ADN của các sinh vật có thể bị cắt, ghép và nhiều thay đổi khác trong điều kiện *in vitro*. Những kỹ thuật thao tác cho phép các nhà khoa học tách một trình tự ADN đơn từ một sinh vật và ghép nó với ADN của một cơ thể sinh vật khác, tạo ra cấu trúc gọi là ADN tái tổ hợp.

Các phân tử ADN tái tổ hợp đầu tiên được tạo ra ở Trường Đại học Stanford vào năm 1972, nhờ sử dụng đặc tính của enzym giới hạn và khả năng của ADN ligaza để nối các đoạn ADN với nhau. Việc tách chiết thành công hai loại enzym này vào cuối thập kỷ 60 thế kỷ XX là một cột mốc lịch sử quan trọng trong sự phát triển của kỹ thuật di truyền. Năm 1973, các đoạn ADN đã được ghép nối thành plasmid pSC101 và hoạt động như một đơn vị sao chép, có thể tái bản được khi đưa vào các tế bào *Escherichia coli*.

### II - CÁC ĐIỀU KIỆN CẦN CHO CHUYỂN GEN Ở THỰC VẬT

Muốn đưa một gen vào tế bào thực vật, trước tiên nó phải được gắn vào một vectơ, đây là nhân tố giúp mang gen, nhân bản và đôi khi biểu hiện một trình tự ADN trong tế bào đích. Một số đặc tính mà một vectơ cần có :

- Kích thước của vectơ càng nhỏ càng tốt, vì dễ xâm nhập vào tế bào đồng thời thuận lợi trong quá trình sao chép.
- Vectơ phải có khả năng tái bản, nhờ đó ADN trên vectơ có thể sao chép và được duy trì trong quần thể tế bào.
- Mang những đặc tính cho phép phát hiện dễ dàng, được mã hóa bởi các gen chỉ thị chọn lọc, như chứa gen chỉ thị để thao tác trong *E.coli* và gen chỉ thị khác để tiến hành chọn lọc ở thực vật. Thông thường là các gen kháng với kháng sinh, nhờ đó có thể lựa chọn được vectơ từ một quần thể lớn các tế bào.
- Chứa ít nhất một vị trí nhận biết của enzym giới hạn để dùng làm vị trí ghép ADN trong tạo thể tái tổ hợp.

Vì khuẩn và một số vi sinh vật khác có chứa các phân tử ADN dạng vòng và tương đối nhỏ, tách biệt với nhiễm sắc thể vi khuẩn và sao chép độc lập. Những phân tử này

được gọi là plasmid và nói chung không thiết yếu đối với sự sinh trưởng của vi sinh vật. Chúng thường cung cấp lợi thế chọn lọc đối với sinh vật chủ như tính kháng sinh. Vì những đặc tính này, các plasmid được sử dụng rộng rãi làm vectơ, đặc biệt trong xây dựng các phân tử tái tổ hợp phức tạp.

Ngoài vi khuẩn, các virus cũng được sử dụng làm vectơ và chúng có thể hoạt động như các phân tử vận chuyển đối với các đoạn ADN tương đối lớn.

### III - CÁC PHƯƠNG PHÁP CHUYỂN GEN Ở THỰC VẬT

Có nhiều phương pháp chuyển gen vào thực vật nhưng có thể phân thành hai nhóm phương pháp chính : phương pháp chuyển gen gián tiếp và phương pháp chuyển gen trực tiếp. Trong phương pháp chuyển gen gián tiếp, gen được chuyển vào tế bào thực vật qua một sinh vật trung gian thường là vi khuẩn hoặc virus. Ở phương pháp chuyển gen trực tiếp, gen được chuyển trực tiếp vào tế bào thực vật thông qua những thiết bị hoặc thao tác nhất định mà không cần phải nhờ các sinh vật trung gian.

#### 3.1. Phương pháp chuyển gen gián tiếp

##### 3.1.1. Chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium*

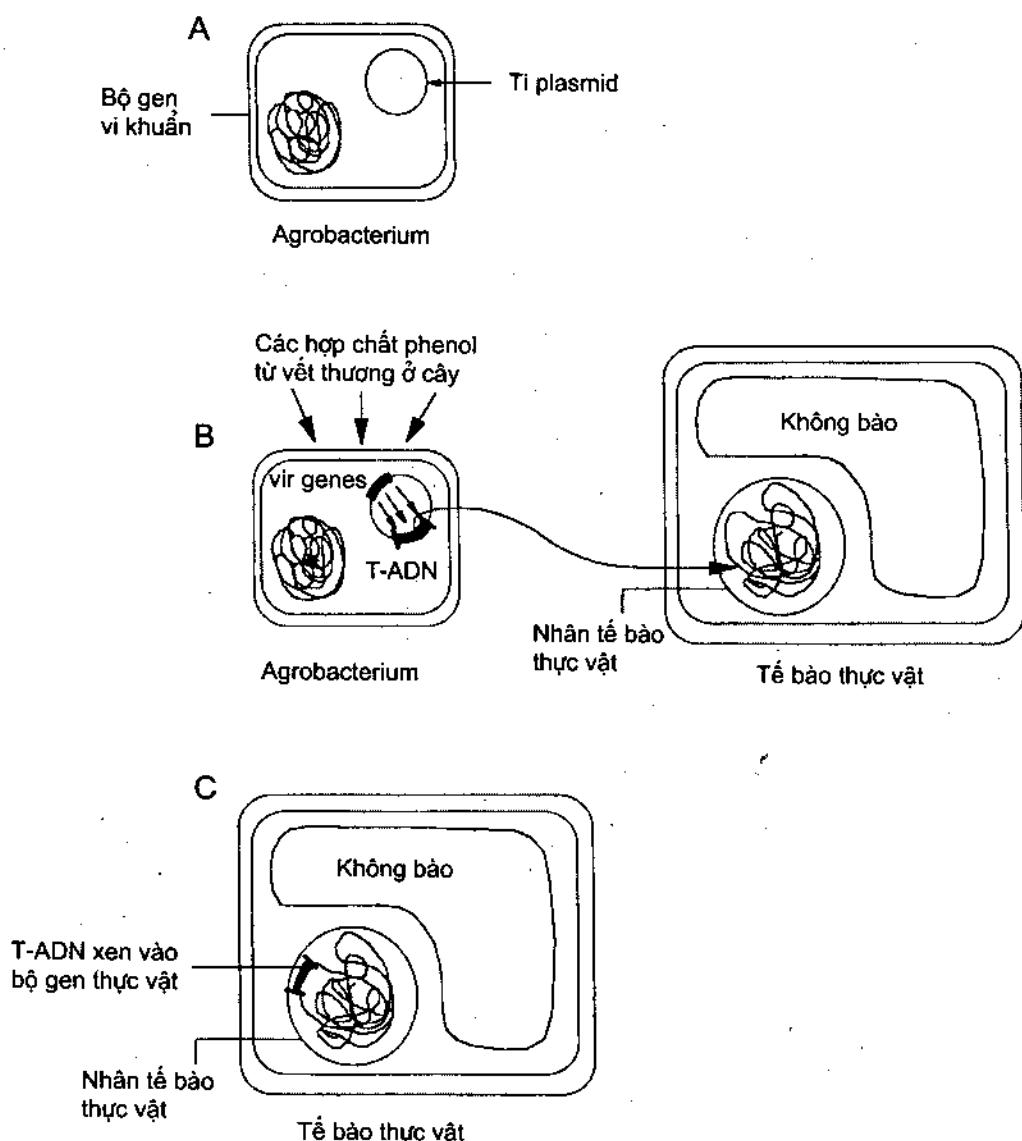
*Agrobacterium* là nhóm các vi khuẩn đất Gram âm gây ra các triệu chứng bệnh ở cây. *Agrobacterium* gồm có các loài : *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi*, *A. radiobacter*. Trong đó *A. tumefaciens* được sử dụng phổ biến cho chuyển gen vào thực vật.

Trong tự nhiên người ta thường phát hiện thấy các khối u hình thành ở cổ rễ (chỗ tiếp giáp giữa rễ và thân) khi cây bị nhiễm vi khuẩn đất *A. tumefaciens*. Sự lây nhiễm xảy ra khi có mô thực vật tổn thương, bởi vì các vi khuẩn *A. tumefaciens* bị hấp dẫn bởi các hợp chất phenol được giải phóng ra từ những tế bào tổn thương của các mô đó. Vi khuẩn không xâm nhập vào tế bào thực vật mà chuyển vào một plasmid đặc hiệu gây ra hình thành khối u và được gọi là Ti plasmid (Tumor inducing plasmid). Đây là plasmid lớn, có kích thước từ 140-235kb và đã được xác định trình tự. Trong quá trình lây nhiễm của vi khuẩn, một phần nhỏ của Ti plasmid (15-30kb) gọi là T-ADN được chuyển vào và gắn với ADN của nhân tế bào thực vật (chủ yếu là thực vật hai lá mầm). Theo cách này T-ADN được duy trì ổn định trong bộ gen của tế bào mà nó chuyển vào.

Trên Ti plasmid, T-ADN được giới hạn bằng bờ phải và bờ trái, nó mang các gen chịu trách nhiệm hình thành khối u và tổng hợp các aminoaxit hiếm như octopin, nopalatin và được gọi chung là opin. Ngoài T-ADN, Ti plasmid còn có các vùng mã hóa cho việc tái sinh plasmid, khả năng lây nhiễm (các vir gen), chuyển nạp và chuyển hóa opin. Cùng với T-ADN, các vir gen (còn gọi là vùng vir) chịu trách nhiệm lây nhiễm là những cấu trúc được nghiên cứu kỹ.

Kích thước của các Ti plasmid là quá lớn khi sử dụng làm vectơ, vì vậy các gen hình thành khói u đã bị cắt bỏ, chỉ còn lại vùng vir và T-ADN nhỏ có điểm ghép gen. Các tế bào thực vật nhận những vectơ này sẽ không phát triển thành khói u và do đó dễ dàng hơn để tái sinh thành cây con bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào.

Các plasmid của *Agrobacterium* được sử dụng trong công nghệ gen thực vật gồm có hai loại : vectơ liên hợp và vectơ nhị thể.



Hình 7.1. Sơ đồ đưa gen vào tế bào thực vật của vi khuẩn *Agrobacterium*

- Agrobacterium tumefaciens* là vi khuẩn đất Gram âm.
- Mô thực vật tổn thương giải phóng ra các hợp chất phenol đã cảm ứng các gen vir của vi khuẩn, làm cho chúng chuyển T-ADN vào tế bào thực vật.
- T-ADN được ghép vào ADN của tế bào thực vật.

### 3.1.1.1. Vectơ liên hợp (Cointegrated vector)

Vectơ liên hợp dựa trên sự tái tổ hợp của hai plasmid. Một vectơ liên hợp gồm có : Vị trí để ghép các gen quan tâm, thường vị trí này có nguồn gốc từ plasmid vi khuẩn *E.coli*. Gen chỉ thị kháng sinh giúp cho chọn lọc trong vi khuẩn *E.coli*, *Agrobacterium* và gen chọn lọc hoạt động được ở tế bào thực vật. Như vậy vectơ liên hợp được hình thành từ : một plasmid mang trình tự ADN mong muốn và plasmid kia có chứa vùng vir gen và vùng bờ lặp lại của T-ADN. Sau tái tổ hợp, một vectơ liên hợp được tạo ra và dùng cho chuyển gen vào thực vật.

### 3.1.1.2. Vectơ nhị thể (Binary vector)

Vectơ nhị thể là hệ thống dùng hai plasmid riêng biệt : một cung cấp T-ADN đã mất độc tính gây khói u, plasmid kia là Ti plasmid có khả năng thâm nhập vào tế bào thực vật (mang các gen vir). Plasmid thứ nhất mang gen chọn lọc ở thực vật và gen sẽ được ghép vào bộ gen thực vật. Khi plasmid này được đưa vào chủng *Agrobacterium* có chứa Ti plasmid, những sản phẩm mang gen vir có thể đưa T-ADN vào tế bào thực vật, mặc dù T-ADN nằm trên phân tử ADN khác.

### 3.1.2. Chuyển gen nhờ virus

Bên cạnh vi khuẩn *Agrobacterium*, còn có các hệ thống dùng virus làm vectơ chuyển gen vào thực vật. Việc sử dụng virus có một số ưu điểm như : Chúng dễ xâm nhập và lây lan nhanh trong cơ thể thực vật. Đồng thời có thể mang đoạn ADN lớn hơn so với khả năng của các plasmid.

Ngoài những ưu điểm trên, chuyển gen trên cơ sở virus có một số hạn chế :

- Các axit nucleic của virus không ghép nối với bộ gen của thực vật, bởi vậy ADN tái tổ hợp không di truyền được cho các thế hệ sau thông qua hạt. Do đó nhân giống các cây chuyển gen phải qua con đường vô tính.
- Sự lây nhiễm virus thường làm yếu tế bào thực vật ở các mức độ khác nhau... Vì thế chuyển gen nhờ virus nhìn chung ít được sử dụng.

### 3.2. Phương pháp chuyển gen trực tiếp

Ngoài các hệ thống chuyển gen dựa vào *Agrobacterium* và virus, còn có các phương pháp đưa ADN trực tiếp vào tế bào thực vật. Vì thành tế bào khá vững chắc, là rào cản ngăn chặn sự hấp thụ ADN vào tế bào thực vật, do đó tất cả các phương pháp chuyển ADN trực tiếp đều phải giải quyết được rào cản này.

#### 3.2.1. Chuyển gen trực tiếp bằng hóa chất

Trước tiên tế bào thực vật bị loại bỏ thành tế bào bằng phương pháp enzym tạo ra cấu trúc tế bào trần (protoplast). Tế bào trần có thể hấp thụ ADN, tổng hợp thành tế bào và sau đó tái sinh cây hoàn chỉnh.

Việc hấp thụ ADN trực tiếp vào tế bào trần được thực hiện nhờ tác động của một số hóa chất như canxi phosphat hoặc polyethylene glycol (PEG). Tần số chuyển gen là rất thấp, tuy nhiên các tế bào trần có thể tạo ra với số lượng lớn đã khắc phục được hạn chế của phương pháp này. Chuyển gen bằng hóa chất là phương pháp có thể áp dụng đối với nhiều loài thực vật.

### 3.2.2. Chuyển gen bằng xung điện

Phương pháp này dựa trên cơ sở xung điện cao tạo ra các lỗ tạm thời trên màng tế bào, qua đó các phân tử lớn bao gồm cả ADN có thể đi vào tế bào. Chuyển gen bằng xung điện có một số trở ngại như :

- Tỷ lệ các tế bào được chuyển gen còn thấp.
- Sức sống của tế bào giảm đột ngột khi bị sốc điện.
- Việc tái sinh ở một số loài rất khó khăn.

Mặc dù còn có các hạn chế như trên nhưng phương pháp chuyển gen bằng xung điện đã được sử dụng trong chuyển gen ở một số loài thực vật một lá mầm bao gồm ngô, lúa...

### 3.2.3. Chuyển gen bằng vi tiêm

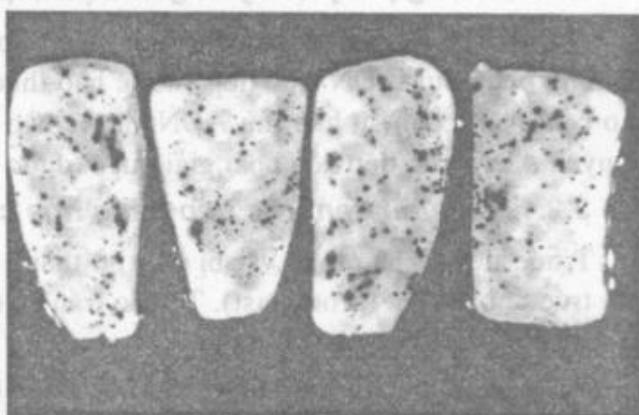
Phương pháp vi tiêm thường dùng tế bào trân làm đối tượng thao tác cho chuyển gen vào tế bào thực vật. Theo phương pháp này tế bào được giữ trong ống thuỷ tinh bằng một lực hút yếu và ADN được tiêm trực tiếp vào nhân tế bào qua pipet thuỷ tinh rất nhỏ. Quá trình vi tiêm cần sự hỗ trợ của kính hiển vi và thiết bị vi thao tác. Hạn chế của phương pháp là cần dùng các thiết bị có độ chính xác cao và cần kỹ năng phức tạp của người sử dụng...

### 3.2.4. Chuyển gen qua ống phun

Phương pháp chuyển gen qua ống phun do Ray Wu và đồng nghiệp đưa ra năm 1988 trên cơ sở các kết quả nghiên cứu ở lúa. Trong phương pháp này, ADN cần chuyển có thể theo đường ống phun chui vào bầu nhuy cái. Quá trình chuyển gen xảy ra ngay sau khi ống phun mọc qua vòi nhuỵ và đưa tinh tử vào thụ tinh cho tế bào trứng. Chuyển gen qua ống phun đạt kết quả tốt nhất ngay sau quá trình thụ tinh nhưng hợp tử chưa phân chia. Do đó chuyển gen chỉ xảy ra đối với một tế bào trứng và khi tái sinh sẽ không tạo thành thế khâm.

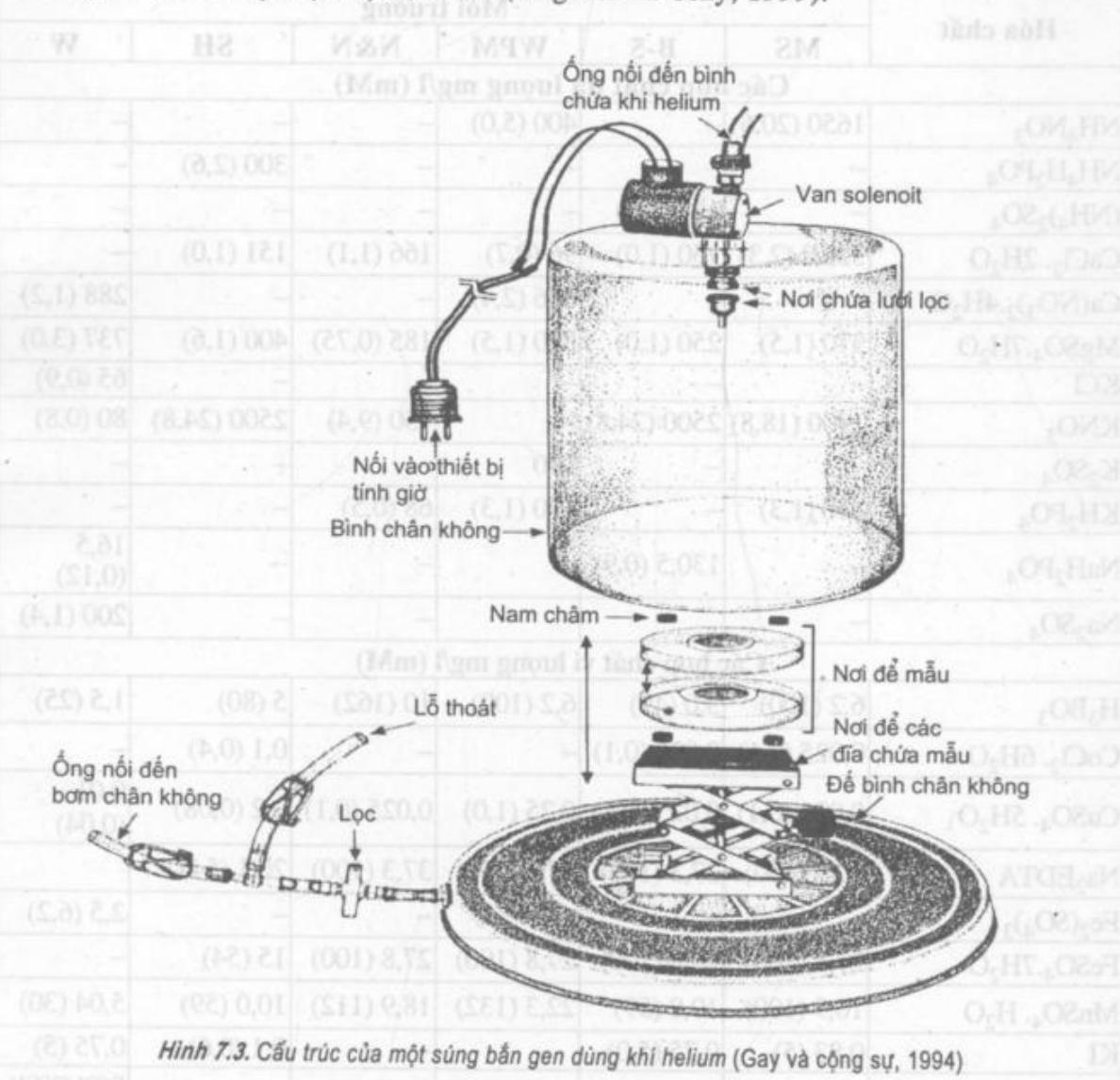
### 3.2.5. Chuyển gen bằng súng bắn gen

Chuyển gen dùng súng bắn gen là phương pháp do Sanford đưa ra năm 1987 và đã được chứng minh khá hiệu quả đối với các tế bào thực vật. Nguyên tắc chung của phương pháp là dùng các viên đạn có kích thước nhỏ mang ADN để bắn vào tế bào thực vật. Đạn là các hạt vàng (hoặc tungsten) rất nhỏ, được bọc plasmid tái tổ hợp mang gen cần chuyển. Viên đạn này sẽ được bắn vào khối mô nhờ áp lực cao của luồng khí helium do một thiết bị cung cấp. Nhờ tiếp xúc với tế bào,



Hình 7.2. Biểu hiện tạm thời của  $\beta$ -glucuronidase (GUS) trong các mảnh lá mầm dưa, sau khi dùng súng bắn gen ở 830kPa. Các điểm GUS có màu xanh thẫm

trong một số trường hợp, quá trình chuyển gen đã xảy ra. Phương pháp dùng súng bắn gen đã được sử dụng phổ biến trong chuyển gen vào thực vật một lá mầm, bao gồm các loài ngô, lúa, lúa mỳ, đại mạch, mía... (Trigiano và Gray, 1999).



Hình 7.3. Cấu trúc của một súng bắn gen dùng khí helium (Gay và cộng sự, 1994)

#### IV - PHÂN TÍCH THỰC VẬT CHUYỂN GEN

Việc quan trọng và cần thiết nhất sau chuyển gen là xác định xem gen chuyển vào tế bào được tiếp nhận như thế nào. Sau khi tiến hành lựa chọn sơ bộ trên môi trường chọn lọc, thường chứa kháng sinh, các mẫu chuyển gen phải được đánh giá số phận của gen đã chuyển bằng một số kỹ thuật như : PCR, lai southern, phân tích biểu hiện của gen...

Số 36

## PHỤ LỤC

### THÀNH PHẦN CỦA 6 MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY PHỔ BIẾN

Hóa chất	Môi trường					
	MS	B-5	WPM	N&N	SH	W
<b>Các hợp chất đa lượng mg/l (mM)</b>						
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650 (20,6)	—	400 (5,0)	—	—	—
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	—	—	—	—	300 (2,6)	—
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	134 (1,0)	—	—	—	—
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	332,2 (2,3)	150 (1,0)	96 (0,7)	166 (1,1)	151 (1,0)	—
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	—	—	556 (2,4)	—	—	288 (1,2)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370 (1,5)	250 (1,0)	370 (1,5)	185 (0,75)	400 (1,6)	737 (3,0)
KCl	—	—	—	—	—	65 (0,9)
$\text{KNO}_3$	1900 (18,8)	2500 (24,8)	—	950 (9,4)	2500 (24,8)	80 (0,8)
$\text{K}_2\text{SO}_4$	—	—	990	—	—	—
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170 (1,3)	—	170 (1,3)	68 (0,5)	—	—
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	—	130,5 (0,9)	—	—	—	16,5 (0,12)
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	—	—	—	—	—	200 (1,4)
<b>Các hợp chất vi lượng mg/l (mM)</b>						
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2 (100)	3,0 (49)	6,2 (100)	10 (162)	5 (80)	1,5 (25)
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025 (0,1)	0,025 (0,1)	—	—	0,1 (0,4)	—
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025 (0,1)	0,025 (0,1)	0,25 (1,0)	0,025 (0,1)	0,2 (0,08)	0,01 (0,04)
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37,3 (100)	37,3 (100)	37,3 (100)	37,3 (100)	20,1 (54)	—
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	—	—	—	—	—	2,5 (6,2)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8 (100)	27,8 (100)	27,8 (100)	27,8 (100)	15 (54)	—
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,9 (100)	10,0 (59)	22,3 (132)	18,9 (112)	10,0 (59)	5,04 (30)
KI	0,83 (5)	0,75 (5,0)	—	—	0,1 (0,6)	0,75 (5)
$\text{NaMoO}_3$	—	—	—	—	—	0,001 (0,001)
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25 (1,0)	0,25 (1,0)	0,25 (1,0)	0,25 (1,0)	0,1 (0,4)	—
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6 (30)	2,0 (7,0)	8,6 (30)	10 (35)	1,0 (3,0)	2,67 (9)
<b>Các hợp chất hữu cơ mg/l (mM)</b>						
Myo-inositol	100 (550)	100 (550)	100 (550)	100 (550)	1000 (5500)	—
Glycin	2,0 (26,6)	—	2,0 (26,6)	2,0 (26,6)	—	3,0 (40)
Axit nicotinic	0,5 (4,1)	1,0 (8,2)	0,5 (4,1)	5 (40,6)	5,0 (41)	0,5 (4,1)
Pyridoxin HCl	0,5 (2,4)	0,1 (0,45)	0,5 (2,4)	0,5 (2,4)	0,5 (2,4)	0,1 (0,45)
Thiamin HCl	0,1 (0,3)	10,0 (30)	1,0 (3,0)	0,5 (1,5)	5,0 (14,8)	0,1 (0,3)
Biotin	—	—	—	0,2 (0,05)	—	—

## CÁC CHỮ VIẾT TẮT

W/v : Khối lượng/thể tích.

W/w : Khối lượng/khối lượng.

V/v : Thể tích/thể tích.

FITC : Fluorescein isothiocyanate.

RITC : Rhodamine isothiocyanate.

YE : Dịch chiết nấm men (Yeast extract).

CH : Cazein thuỷ phân (Casein hydrolysate).

CM : Nước dừa (Coconut milk).

IAA : Axit indol axetic (Indole acetic acid).

IBA : Axit indol butyric (Indole butyric acid).

NOA : Naphthoxy axetic axit (Naphthoxyacetic acid)

α-NAA : Axit α-Naphthalen axetic (α-Naphthalene acetic acid).

2,4-D : Axit 2,4-dichlorophenoxy axetic (2,4-dichlorophenoxyacetic acid).

pCPA : Axit P-chlorophenoxy axetic (P-chlorophenoxy acetic acid).

BAP : Benzylamino purin (Bezylamino purine).

TDZ : Thidiazuron.

2-ip : Izopentenyl adenin (Isopentenyl adenine).

GA<sub>3</sub> : Axit gibberelic (Gibberellic acid).

AC : Than hoạt tính (Activated charcoal).

DMSO : dimethylsulfoxit (dimethylsulfoxide).

B5 : Môi trường Gamborg (Gamborg et al, 1968).

GM : Môi trường Guha và Maheswari (Guha and Maheswari, 1966).

LS : Môi trường Linsmayer và Skoog (Linsmayer and Skoog, 1965).

MS : Môi trường Murashig và Skoog (Murashige and Skoog, 1962).

N : Môi trường Bourgin và Nitsch (Bourgin and Nitsch, 1967).

N6 : Môi trường Chu Chin Ching (Chu Chin Ching, 1976).

SH : Môi trường Schenk và Hildebrandt (Schenk and Hildebrandt, 1972).

W : Môi trường White (White, 1963).

WPM : Môi trường dùng cho cây gô (Lloyd and McCow, 1980).

N & N : Môi trường Nitsch và Nitsch (Nitsch and Nitsch, 1969).

**P**hần hai

## CÔNG NGHỆ TẾ BÀO ĐỘNG VẬT

### *Chương 8* HỎI ĐÁP VỀ TẾ BÀO GỐC

#### CÁC CÂU HỎI.

1. Tế bào gốc là gì ?
2. Tế bào gốc bắt nguồn từ đâu ?
3. Khả năng ứng dụng của tế bào gốc người ?
4. Những trở ngại nào cần phải vượt qua trước khi khả năng ứng dụng của tế bào gốc trở nên hiện thực ?
5. Thế nào là dòng tế bào gốc ?
6. Tế bào gốc phôi là gì ?
7. Thế nào là tế bào gốc trưởng thành ?
8. Có gì đặc biệt, độc đáo ở tế bào gốc từ răng và cuống rốn của trẻ mới sinh ?
9. Có loại tế bào gốc này tốt hơn những loại tế bào gốc khác không ?
10. Có tế bào gốc bắt nguồn từ thai bị nạo không ?
11. Những bệnh nào có thể được chữa trị bằng cách sử dụng tế bào gốc ?
12. Gần đây, tế bào gốc được sử dụng để chữa bệnh có phải không ?
13. Có gì khác nhau giữa nhân bản với mục đích chữa bệnh và nhân bản với mục đích sinh sản ?
14. Tại sao người ta lại nhầm việc nghiên cứu tế bào gốc với nhân bản ?
15. Cấy truyền nhân tế bào xô ma là gì ?
16. Tế bào gốc được nuôi trong phòng thí nghiệm như thế nào ?
17. Những loại thí nghiệm nào đã được tiến hành với tế bào gốc và loại nào vẫn cần phải được nghiên cứu tiếp ?
18. Tế bào máu cuống rốn hoặc tế bào gốc có thể được cất giữ trong ngân hàng không ?
19. Y học tái sinh là gì ?
20. Có bao nhiêu dòng tế bào gốc phôi người ?
21. Tại sao Quỹ liên bang Mỹ lại có vai trò quan trọng cho nghiên cứu tế bào gốc ?

22. Đạo đức sinh học là gì ?

23. Tìm thông tin về tế bào gốc ở đâu ?

## I - TẾ BÀO GỐC LÀ GÌ ?

Tế bào gốc là những tế bào cơ sở cho tất cả các cơ quan, mô và tế bào trong cơ thể. Chúng giống như một con chíp vi tính còn trắng, có thể được đặt chương trình để thực hiện một số nhiệm vụ chuyên hoá nào đó. Tế bào gốc là các tế bào chưa biệt hoá, là những tế bào còn “trống” về mặt chức năng tức là không có một chức năng chuyên hoá nào. Trong điều kiện thích hợp, tế bào gốc bắt đầu phát triển thành các mô và cơ quan chuyên hoá. Bên cạnh đó, tế bào gốc là những tế bào có khả năng tự duy trì và có thể tự nhân lên trong một thời gian dài. Những đặc tính duy nhất này giúp cho tế bào gốc trở thành một lĩnh vực đầy hứa hẹn (triển vọng) trong việc cung cấp các tế bào cho điều trị những bệnh suy giảm chức năng giống như bệnh Alzheimer, ung thư, Parkinson, tiểu đường typ-1, tổn thương tuỷ sống, đột quy, bong, các bệnh về tim mạch, chứng viêm khớp xương (osteoarthritis) và chứng viêm khớp dạng thấp (rheumatoid arthritis). Ngày nay, các cơ quan và mô từ người cho thường được sử dụng để thay thế cho các cơ quan và mô đã bị bệnh hay bị phá huỷ ở người bệnh. Thật không may mắn, số lượng người cần cấy ghép vượt quá xa so với số lượng cơ quan có được để cấy ghép. Chính vì vậy, người ta hy vọng về khả năng của tế bào gốc cung cấp các tế bào và mô để điều trị cho các bệnh khác nhau như đã kể trên.

## II - TẾ BÀO GỐC BẮT NGUỒN TỪ ĐÂU ?

Tất cả mọi người đều bắt đầu cuộc sống của mình từ một tế bào, được gọi là hợp tử mà được hình thành sau khi thụ tinh. Hợp tử phân cắt lần 1 và hình thành hai tế bào, mỗi tế bào lại phân cắt và cứ tiếp tục như vậy. Khoảng 5 ngày sau thụ tinh, hình thành nên một quả cầu rỗng với khoảng 150 tế bào, cấu trúc này được gọi là túi phôi (Blastocyst). Túi phôi nhỏ hơn hạt cát và chứa hai kiểu tế bào : Lớp dưỡng bào (lớp tế bào bên ngoài) và nút phôi (inner cell mass). Tế bào gốc phôi là các tế bào tạo nên nút phôi. Do tế bào gốc phôi có thể hình thành nên tất cả các kiểu tế bào trong cơ thể trưởng thành, chúng được hiểu như là các tế bào gốc *đa tiềm năng* (Pluripotent stem cells).

Tế bào gốc cũng có thể được tìm thấy với số lượng rất nhỏ ở các mô khác nhau trong cơ thể trưởng thành. Ví dụ, tế bào gốc tuỷ xương được tìm thấy trong tuỷ của xương và chúng cho ra tất cả các kiểu tế bào máu chuyên hoá. Tế bào gốc trưởng thành thông thường được đặt chương trình để hình thành nên các loại tế bào khác nhau của chính mô của chúng. Vì vậy, chúng được gọi là các tế bào gốc *đa tiềm năng đơn hướng* (*multipotent stem cells*). Hiện nay, người ta còn chưa xác định được là có tế bào gốc trưởng thành trong tất cả các cơ quan quan trọng trong cơ thể. Trong một số mô, chẳng hạn như não, mặc dù có tế bào gốc tồn tại, tuy nhiên chúng vẫn ở trạng thái chưa hoạt

động và như vậy chúng chưa sẵn sàng đáp ứng thay thế cho các tế bào bị tổn thương hay bị phá huỷ trong não. Ngày nay, các nhà khoa học có được các cách kích thích các tế bào gốc tăng sinh và hình thành nên các kiểu tế bào thích hợp để thay thế các tế bào bị tổn thương.

Tế bào gốc có thể cũng nhận được từ các nguồn khác, chẳng hạn như cuống rốn của đứa trẻ mới sinh. Đây là một nguồn tế bào gốc dễ kiểm hơn so với các mô trưởng thành khác như não và tuỷ xương. Mặc dù các nhà khoa học có thể nuôi chúng trong các đĩa nuôi cấy, nhưng họ cũng chỉ làm được điều này trong khoảng thời gian giới hạn. Gần đây, các nhà khoa học đã phát hiện ra sự tồn tại của các tế bào gốc trong răng của trẻ em và trong dịch ối - là bể nước bao quanh thai nhi đang nằm trong tử cung của mẹ- và các tế bào này cũng có tiềm năng hình thành nhiều kiểu tế bào chuyên hoá khác nhau. Tuy nhiên, tất cả những nghiên cứu này mới chỉ là bước đầu.

### III - KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG CỦA TẾ BÀO GỐC NGƯỜI ?

Hầu hết các tế bào chuyên hoá của cơ thể không thể được thay thế bởi quá trình tự nhiên nếu như chúng bị tổn thương nghiêm trọng hoặc bị bệnh. Tuy vậy, tế bào gốc có thể được sử dụng để tạo ra các tế bào khoẻ mạnh và thực hiện chức năng chuyên hoá, các tế bào này sau đó có thể thay thế cho các tế bào bị bệnh hay giảm chức năng.

Tế bào trị liệu là liệu pháp nhằm thay thế các tế bào bị bệnh bằng các tế bào khoẻ mạnh, liệu pháp này tương tự như quá trình cấy ghép cơ quan, chỉ khác ở chỗ việc điều trị này sử dụng cấy ghép tế bào chứ không phải là cơ quan. Một số tổn thương có thể chữa được qua cấy ghép toàn bộ cơ quan khoẻ mạnh, tuy nhiên nguồn cơ quan từ người cho lại thiếu nghiêm trọng. Vì vậy, tế bào gốc có thể được dùng như là nguồn tự đổi mới và thay thế cho các tế bào chuyên hoá. Gần đây, các nhà khoa học đang nghiên cứu để sử dụng các tế bào gốc trưởng thành, thai và phôi như là một nguồn tạo ra các kiểu tế bào chuyên hoá khác nhau, chẳng hạn như các tế bào thần kinh, các tế bào cơ, các tế bào máu và các tế bào da, sử dụng cho trị liệu các bệnh khác nhau.

Ví dụ, trong bệnh Parkinson, các tế bào gốc có thể được sử dụng để tạo nên một loại tế bào thần kinh đặc biệt tiết ra dopamin. Các tế bào thần kinh này về mặt lý thuyết có thể được cấy ghép vào bệnh nhân, chúng sẽ hội nhập vào não và khôi phục lại chức năng, như vậy sẽ điều trị được cho bệnh nhân mắc bệnh Parkinson.

### IV - NHỮNG TRỞ NGẠI NÀO CẦN PHẢI VƯỢT QUA TRƯỚC KHI KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG CỦA TẾ BÀO GỐC TRỞ NÊN HIỆN THỰC ?

- Một trong những trở ngại đầu tiên mà phải vượt qua đó là khó khăn trong việc xác định các tế bào gốc từ các mô trưởng thành, vì các mô này bao gồm hỗn hợp các tế bào khác nhau. Quá trình xác định và tăng sinh loại tế bào gốc phù hợp (thường cực hiếm gặp trong mô trưởng thành) đòi hỏi các nghiên cứu hết sức tinh tế và cẩn thận.

- Trở ngại thứ hai, một khi tế bào gốc đã được xác định và phân tách, thì các điều kiện thích hợp phải được thiết lập để giúp cho các tế bào gốc biệt hóa thành các tế bào chuyên hoá. Điều này cũng đòi hỏi rất nhiều những kinh nghiệm thực tế.

- Nhìn chung, mọi người tin rằng tế bào gốc tách ra từ phôi - thai là linh hoạt hơn các tế bào gốc từ cơ thể trưởng thành. Tuy nhiên, các nhà khoa học cũng đang nỗ lực nghiên cứu để tạo ra các điều kiện thích hợp cho sự biệt hoá tế bào gốc phôi thành các tế bào chuyên hoá. Khi mà các tế bào gốc phôi tăng sinh nhanh, thì các nhà nghiên cứu cũng phải rất cẩn thận trong quá trình biệt hoá hoàn toàn chúng thành các tế bào chuyên hoá. Ngược lại, bất kỳ tế bào gốc phôi còn lại nào cũng có thể tăng trưởng không được kiểm soát và có thể hình thành khối u.

- Giả thiết rằng tất cả những trở ngại trên có thể vượt qua, thì một vấn đề mới đặt ra, khi nào thì các tế bào chuyên hoá (bắt nguồn từ các tế bào gốc) được cấy ghép vào người bệnh. Sau khi cấy ghép, các tế bào phải được hợp nhất vào mô và các cơ quan của người bệnh, sau đó chúng phải thực hiện chức năng giống như tế bào của cơ thể nhận. Ví dụ, các tế bào cơ tim có thể đập trong môi trường nuôi cấy, nhưng chúng cũng có thể không đập theo nhịp cùng với các tế bào cơ tim của bệnh nhân. Và tế bào thần kinh được tiêm vào não bị tổn thương phải có khả năng hội nhập vào mạng lưới phức tạp của các tế bào trong não và mối liên hệ của chúng phải thực hiện chức năng một cách chính xác.

- Tuy nhiên, có một trở ngại khác đó là hiện tượng đào thải mô. Ngay sau khi cấy ghép cơ quan, các tế bào miễn dịch của cơ thể nhận sẽ nhận biết các tế bào được cấy ghép như là những kháng nguyên lạ, chúng nhanh chóng hình thành một đáp ứng miễn dịch đào thải mảnh ghép và có thể gây nguy hiểm cho người bệnh. Ngoài ra, người nhận trong cấy ghép thường phải uống hoặc tiêm thuốc làm ức chế tạm thời hệ thống miễn dịch của mình, rõ ràng điều này là rất nguy hiểm.

Như vậy, nghiên cứu về tế bào gốc và ứng dụng chúng trong điều trị các bệnh khác nhau mới chỉ ở giai đoạn bắt đầu. Tuy nhiên, kết quả thu được từ các mô hình động vật là đầy hứa hẹn và rất nhiều nhà nghiên cứu tin rằng, chỉ còn là vấn đề thời gian trước khi các kết quả tương tự có thể đạt được đối với tế bào gốc ở người.

## V - THẾ NÀO LÀ DÒNG TẾ BÀO GỐC ?

Một dòng tế bào gốc bao gồm một quần thể tế bào có thể tự nhân lên *in vitro* trong thời gian dài. Các dòng tế bào này được nuôi với môi trường chứa các yếu tố tăng trưởng đặc hiệu trong tủ nuôi cấy, ở nhiệt độ thích hợp và hỗn hợp khí O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> tương tự như trong cơ thể động vật có vú.

Các dòng tế bào gốc phôi, cả ở người và chuột, có thể được nuôi cấy mãi mãi *in vitro* nếu có các điều kiện thích hợp. Các tế bào này vẫn tiếp tục duy trì khả năng của chúng để hình thành nên các kiểu tế bào chuyên hoá khác nhau, khi mà chúng bị lấy ra khỏi môi trường đặc biệt giữ chúng ở trạng thái không biệt hoá.

Một số lượng ít các dòng tế bào gốc phôi ở người đã được các nhà khoa học sử dụng với tài trợ của các quỹ liên bang Mỹ. Tháng 8 năm 2001, Tổng thống Mỹ Bush đã chỉ thị rằng, nếu các nhà khoa học đang sử dụng các quỹ hỗ trợ liên bang thì các nghiên cứu chỉ có thể được tiến hành trên các dòng tế bào đã tồn tại, các dòng này bắt nguồn từ trứng đã được thụ tinh bị loại bỏ từ các bệnh viện thụ tinh nhân tạo vì vấn đề đạo đức.

Theo quy định này, không được tạo thêm các dòng tế bào gốc ở người từ các túi phôi mới có. Về lâu dài, điều này sẽ đặt những giới hạn nghiêm trọng cho khoa học trong lĩnh vực tế bào gốc, và sẽ giới hạn khả năng của các nhà khoa học so sánh tiềm năng của các dòng tế bào phôi ở người để sửa chữa mô với các dòng tế bào được lấy từ các nguồn khác, chẳng hạn như tế bào gốc trưởng thành.

## **VI - TẾ BÀO GỐC PHÔI LÀ GÌ ?**

Tế bào gốc phôi được bắt nguồn từ các tế bào tạo nên nút phôi của túi phôi. Hiện nay, người ta có cả dòng tế bào gốc phôi người và chuột. Trong điều kiện thích hợp, tế bào gốc phôi chuột có khả năng tạo ra tất cả các loại tế bào có trong cơ thể. Do đó, chúng được gọi là đa tiềm năng và có tiềm năng không bị giới hạn cũng như khả năng tăng sinh lâu dài và không biệt hoá. Có nghĩa là chúng có thể tăng sinh liên tục trong các chai nuôi cấy *in vitro*, nhưng đồng thời vẫn duy trì khả năng tạo ra bất kỳ kiểu tế bào mong muốn nào nếu như chúng được đặt vào môi trường thích hợp làm cho chúng biệt hoá.

Gần đây, các dòng tế bào gốc phôi ở người đang được nghiên cứu và các nhóm nghiên cứu đang tiến hành xác định xem chúng có sở hữu các đặc tính giống như các tế bào gốc phôi chuột không ? Bởi vì tương đối gần đây tế bào gốc phôi người mới được phân tách, và do đó, chúng ta hiểu biết về chúng còn rất ít, làm việc với các hệ thống ở người là khó khăn hơn so với chuột. Tuy nhiên, các nhà khoa học đang cố gắng tạo ra những tiến bộ đáng kể và cuối cùng có thể dẫn tới liệu pháp thay thế hoặc khôi phục lại các mô bị tổn thương bằng cách sử dụng các tế bào gốc ở người.

## **VII - THẾ NÀO LÀ TẾ BÀO GỐC TRƯỞNG THÀNH ?**

Tế bào gốc trưởng thành khác biệt với các tế bào gốc được phân lập từ phôi hoặc từ thai và được tìm thấy trong các mô trưởng thành ở động vật hoặc ở người sau khi sinh. Các tế bào này có thể được tách ra từ nhiều mô khác nhau kể cả não. Tuy nhiên, vị trí phổ biến nhất để nhận được loại tế bào này là tuyỷ xương nằm trong lõi của một số xương. Tuỷ thường được lấy ra từ mào xương chậu từ người cho.

Trong tuỷ xương thấy có các kiểu tế bào gốc khác nhau, bao gồm các tế bào gốc tạo máu, các tế bào gốc nội mạc và các tế bào gốc trung mô. Từ lâu người ta đã biết rằng các tế bào gốc tạo máu hình thành nền máu, các tế bào gốc nội mạc hình thành nền hệ thống mạch (động mạch và tĩnh mạch), và các tế bào gốc trung mô hình thành nền xương, sụn, cơ, mỡ và các nguyên bào sợi.

Gần đây người ta đưa ra một giả thuyết về tính linh hoạt (stem cell plasticity) của tế bào gốc, giả thuyết này cho rằng một số tế bào gốc trưởng thành có thể có tiềm năng rộng hơn trong việc hình thành các kiểu tế bào khác nhau so với những giả thuyết trước đó. Điều này có nghĩa là các tế bào từ tuỷ xương, trước đây người ta cho rằng chúng chỉ tạo máu, có thể tham gia vào quá trình tái sinh gan, thận, tim, phổi và các cơ quan khác nếu như các cơ quan này bị tổn thương.

Mặc dù lĩnh vực tế bào gốc là vô cùng hấp dẫn, tuy nhiên vẫn còn rất nhiều tranh cãi trong cộng đồng khoa học và cần thêm những nghiên cứu thật chi tiết giúp cho sự hiểu biết của chúng ta về toàn bộ tiềm năng của các tế bào gốc trưởng thành, và đặc biệt là chúng khác gì với tế bào gốc phôi.

### **VIII - CÓ GÌ ĐẶC BIỆT, ĐỘC ĐÁO Ở TẾ BÀO GỐC TỪ RĂNG VÀ CUỐNG RỐN CỦA TRẺ MỚI SINH ?**

Các tế bào gốc từ máu cuống rốn hay từ phần tuỷ dưới răng ở trẻ em là các tế bào gốc trẻ hơn so với các tế bào gốc lấy từ cơ thể trưởng thành. Chúng có khả năng phân chia trong khoảng thời gian dài hơn trong điều kiện nuôi cấy so với hầu hết các tế bào gốc trưởng thành, và chúng có thể cho ra các mô khác nhau. Tiềm năng của chúng trong việc hình thành các kiểu tế bào khác nhau gần đây đang được khám phá.

Tế bào gốc máu cuống rốn (umbilical cord blood stem cells) được sử dụng cho cấy ghép tế bào gốc, nhằm tái tạo lại quá trình hình thành tế bào máu (hệ thống tạo máu) ở bệnh nhân bị chiếu xạ hay được xử lý với các thuốc đặc hiệu chống ung thư hay bệnh máu trắng (leukemia). Cũng như vậy, ở một số bệnh di truyền, bệnh nhân có vấn đề về việc hình thành các tế bào máu bình thường, thì việc cấy ghép tế bào máu cuống rốn thích hợp có thể tạo cho họ một hệ thống tạo máu mới.

Các tế bào gốc này được tiêm vào tĩnh mạch của bệnh nhân và sau đó chúng có thể tìm thấy con đường của chúng đi vào tuỷ xương theo một quá trình được gọi là tìm về nhà của tế bào gốc (stem cell homing).

### **IX - CÓ LOẠI TẾ BÀO GỐC NÀY TỐT HƠN NHỮNG LOẠI TẾ BÀO GỐC KHÁC KHÔNG ?**

Lĩnh vực về tế bào gốc nghiên cứu các loại tế bào này vì nhiều lý do. Một số nhà khoa học nghiên cứu tế bào gốc để có thể hiểu biết sâu sắc hơn về quá trình phát triển, qua đó hiểu được là các tế bào, các mô và các cơ quan chuyên hoá được hình thành như thế nào. Bên cạnh đó các nhà khoa học cũng nghiên cứu tế bào gốc để có thể hiểu được những sai hỏng gì trong tế bào là nguyên nhân gây ra các bệnh khác nhau. Chính vì lý do này mà người ta có thể tiếp nhận được những thông tin có giá trị từ việc nghiên cứu bất kỳ loại tế bào gốc nào mà ngày nay có thể nhận được.

Lợi ích phổ biến nhất của tế bào gốc là khả năng của chúng trong việc hình thành các kiểu tế bào khác nhau, và có thể sử dụng chúng để hồi phục hoặc thay thế cho các mô bị phá huỷ ở những người bệnh. Từ các nghiên cứu trên chuột, người ta đã thấy

rằng, tế bào gốc phôi chuột có thể tạo nên tất cả các mô trong cơ thể trưởng thành. Điều này cho thấy rằng, tế bào gốc người cũng có những đặc tính này và được gọi là *tế bào gốc da tiềm năng*. Ngày nay, các nhà khoa học cần phải so sánh các dòng tế bào gốc phôi người về tiềm năng của chúng với tiềm năng của tế bào gốc trưởng thành trong việc sửa chữa mô.

Hiện nay, còn chưa rõ là các tế bào gốc bắt nguồn từ các mô trưởng thành hoặc tế bào máu cuống rốn có đa tiềm năng hay không? Việc so sánh giữa tế bào gốc phôi và tế bào gốc trưởng thành ở người là một khía cạnh rất hấp dẫn trong lĩnh vực nghiên cứu tế bào gốc, người ta hy vọng sẽ đưa những cách điều trị cho bệnh thoái hóa mô trong tương lai.

## X - CÓ TẾ BÀO GỐC BẮT NGUỒN TỪ THAI BỊ NẠO KHÔNG?

Một nguồn chính của tế bào gốc bắt nguồn từ mô ở thai sớm, các mô này được lấy ra vào một thời điểm nhất định trong quá trình phát triển. Trong quá trình phát triển, phôi được gọi là thai khi được 7-8 tuần sau khi thụ tinh. Khoảng 4 - 5 tuần trong quá trình phát triển phôi, các tế bào mầm phôi (hoặc tế bào sinh dục phôi - embryonic germ cells), tiền thân của tế bào trứng và tinh trùng, được tìm thấy trong buồng trứng hoặc tinh hoàn phôi, có cấu trúc dài khoảng 2mm.

Năm 1998, sự phân lập, nuôi cấy và đặc điểm riêng biệt của tế bào sinh dục nguyên thuỷ đã được công bố. Các tế bào này được bắt nguồn từ mô của thai nạo. Qua phân lập và nuôi cấy, người ta đã chỉ ra các tế bào mầm này có các đặc tính tương tự như tế bào gốc được phân lập từ nút phôi của túi phôi.

Tuy nhiên, một số bằng chứng đã chỉ ra rằng, các tế bào sinh dục phôi có thể bị giới hạn nhiều hơn về khả năng của chúng biến hoá thành nhiều loại tế bào khác nhau. Bởi vì, chúng được phân lập từ các mô trong sự phát triển muộn của phôi (một vài tuần chứ không phải 4-5 ngày). Còn cần nhiều nghiên cứu để hiểu được các đặc tính và tập tính của các tế bào này, nhằm xác định lợi ích của chúng cho liệu pháp tế bào trong tương lai. Vì rằng sự không thống nhất trong các quy định của liên bang dẫn đến quan niệm cho rằng, các tế bào gốc bắt nguồn từ thai khác với các tế bào gốc lấy ra từ phôi.

## XI - NHỮNG BỆNH NÀO CÓ THỂ ĐƯỢC CHỮA TRỊ BẰNG CÁCH SỬ DỤNG TẾ BÀO GỐC?

Triển vọng nhất của việc sử dụng tế bào gốc là do khả năng của chúng có thể biến đổi thành các tế bào trưởng thành thực hiện chức năng và được sử dụng như một nguồn tế bào thay thế cho việc điều trị nhiều bệnh. Do đó, bất kỳ một bệnh nào mà trong đó các tế bào bị thoái hoá có thể điều trị bằng liệu pháp tế bào gốc, bao gồm các bệnh suy giảm về chức năng như : bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, chấn thương tuỷ sống, đột quy, bong, bệnh tim, bệnh đái đường loại một, viêm khớp mãn tính, thấp khớp, teo cơ và bệnh gan.

Ngoài ra, sự tái sinh vĩnh mạc mắt bằng tế bào gốc từ mắt có thể dẫn tới việc chữa trị cho mắt bị bệnh hoặc bị tổn thương và một ngày nào đó có thể chữa được bệnh mù. Tế bào gốc lông cũng được phân lập và có thể chữa bệnh rụng tóc.

Tế bào gốc phôi có thể hình thành tất cả các loại tế bào trưởng thành thực hiện đầy đủ chức năng, mở ra hy vọng rằng, một ngày nào đó, những tế bào này có thể tạo ra các tế bào hoặc các mô có thể phát triển thành tim, gan, thận hoàn chỉnh, do đó, sẽ giải quyết được vấn đề thiếu cơ quan cho trong việc cấy ghép.

Sự thay thế tế bào gốc trưởng thành, thông qua việc cấy ghép tuỷ xương với thể cho phù hợp, đã trở thành một cách trị liệu phổ biến cho bệnh ung thư máu và một số bệnh rối loạn về máu khác. Tuy nhiên, tính độc lập và tính phù hợp của thể cho với thể nhận về mặt miễn dịch đã giới hạn phương pháp này chỉ áp dụng được cho một số lượng ít bệnh nhân. Người ta hy vọng rằng, sự biến đổi di truyền ở các tế bào gốc tuỷ xương của chính bệnh nhân và sự cấy ghép sau đó sẽ tạo ra cơ hội sống cao hơn. Tuy nhiên, kỹ thuật thao tác di truyền phải được hoàn thiện trước khi áp dụng lên điều trị cho bệnh nhân.

Gần đây, những khả năng mới về việc sử dụng các tế bào gốc trưởng thành được đưa ra, khi các nhà nghiên cứu chỉ ra rằng các tế bào bắt nguồn từ tuỷ xương có thể biến hoá thành các tế bào chuyên hoá ở nhiều loại mô khác biệt như : biến hoá thành tế bào máu, tế bào não, tế bào cơ, tế bào thận, tụy và gan. Người ta có thể dự đoán một ngày nào đó, chúng ta có thể phân lập tế bào tuỷ xương của chính chúng ta để xử lý chúng và cấy ngược trở lại vào trong cơ thể, nhằm đổi mới hoặc sửa chữa cho các tế bào ở một số các cơ quan khác nhau.

## XII - GẦN ĐÂY TẾ BÀO GỐC ĐƯỢC SỬ DỤNG ĐỂ CHỮA BỆNH CÓ PHẢI KHÔNG ?

Tế bào gốc tạo máu (Hematopoietic stem cells - HSCs) có trong tuỷ xương là tiền thân của tất cả các tế bào máu hiện nay và là một loại tế bào gốc duy nhất được sử dụng rộng rãi để chữa bệnh. Các nhà y học đã sử dụng các HSCs trong ghép tuỷ từ hơn 40 năm nay. Ngày nay, các kỹ thuật tiến bộ cho việc thu nhận HSCs được sử dụng để điều trị các bệnh ung thư máu, ung thư limphô và một số bệnh rối loạn về máu khác.

Tiềm năng y học của tế bào gốc cũng đã được chứng minh trong việc chữa trị một số bệnh khác ở người bao gồm : bệnh đái đường và bệnh ung thư thận. Tuy nhiên, các liệu pháp mới này mới chỉ được áp dụng cho một số ít bệnh nhân khi sử dụng tế bào gốc trưởng thành.

Những ứng dụng y học mới đối với tế bào gốc gần đây đang được kiểm tra qua trị liệu các bệnh như : bệnh gan, bệnh xơ vữa động mạch, rối loạn tự miễn và trao đổi chất, viêm mãn tính và một số loại ung thư.

## XIII - CÓ GÌ KHÁC NHAU GIỮA NHÂN BẢN VỚI MỤC ĐÍCH CHỮA BỆNH VÀ NHÂN BẢN VỚI MỤC ĐÍCH SINH SẢN ?

- Nhân bản với mục đích sinh sản là sự tạo một phôi qua cấy truyền nhân và được cấy vào tử cung con mẹ cho tới khi sinh. Nhân bản với mục đích chữa bệnh là quá trình

qua đó một phôi được tạo ra thông qua cấy truyền nhân với mục đích thu nhận tế bào gốc và từ đấy sử dụng cho mục đích chữa bệnh.

- Nhân bản với mục đích sinh sản có nghĩa tạo một cơ thể mới từ một tế bào bằng cách thay thế nhân của tế bào trứng bằng nhân (chứa vật chất di truyền) từ một tế bào khác trong cơ thể. Tế bào trứng với nhân mới sẽ sinh trưởng và phát triển thành phôi. Phôi này được cấy vào trong tử cung cơ thể mẹ - nuôi để phát triển thành thai và con non. Sau khi sinh, theo lý thuyết, cơ thể nhân bản sẽ có vật chất di truyền giống hệt với cơ thể trưởng thành đã cho nhân trong quá trình nhân bản. Tập hợp các cơ thể xuất xứ từ các nhân của một cơ thể gọi là dòng vô tính (clon) và là các bản sao của cơ thể cho nhân. Nhân bản với mục đích sinh sản được thực hiện ở động vật với vô vàn khó khăn về kỹ thuật và sinh học. Chỉ khoảng 1% trong các trứng được nhận nhân mới là có thể phát triển thành các cơ thể sống bình thường. Thực tế đã chứng tỏ rằng, các cơ thể nhân bản thường có nhiều vấn đề về sức khoẻ.

Nhân bản với mục đích chữa bệnh : Sử dụng công nghệ nhân bản để tạo ra tế bào gốc phục vụ cho mục đích nghiên cứu và sau cùng là cho trị liệu. Nhân của tế bào trứng được thay thế bằng nhân của tế bào khác từ cơ thể và tế bào trứng này được phép phát triển trong khoảng 4 - 5 ngày cho tới giai đoạn túi phôi. Sau đó, nút phôi của túi phôi được lấy ra và sử dụng cho việc tạo ra một dòng tế bào gốc phôi. Dòng tế bào này có cấu trúc di truyền của nhân tế bào cho. Mục đích của nhân bản với mục đích chữa bệnh là tạo ra tế bào gốc người và tiếp theo là mô và cơ quan mà chúng có thể được sử dụng để thay thế các mô bị phá huỷ. Đó là một ứng dụng của công nghệ nhân bản nhưng không vì mục đích tạo ra các cá thể giống hệt nhau về vật chất di truyền. Một trong những vấn đề chính chúng ta phải đối mặt khi sử dụng rộng rãi liệu pháp tế bào gốc là : các tế bào hay mô được cấy truyền dễ dàng bị đào thải bởi hệ thống miễn dịch của bệnh nhân. Nhân bản với mục đích chữa bệnh sẽ cho phép tạo ra các tế bào và mô thích hợp với từng bệnh nhân, bởi vì nhân cho sẽ bắt nguồn từ cơ thể bệnh nhân. Do đó các tế bào này sẽ phù hợp về mặt di truyền với bệnh nhân và nó sẽ không bị đào thải khi chúng ta cấy truyền chúng vào trong cơ thể bệnh nhân.

Sẽ tiếp tục có sự khác biệt lớn giữa các nước trên thế giới trong quan niệm về nhân bản ở người và công nghệ có liên quan. Ví dụ, đa số chấp nhận một sự khác biệt rõ rệt giữa ứng dụng kỹ thuật nhân bản để tạo các bản sao của người với ứng dụng kỹ thuật nhân bản tạo ra các mô và các dòng tế bào nhằm mục đích trị liệu. Việc sử dụng kỹ thuật nhân bản vào mục đích sinh sản đã bị thế giới lên án và chống lại.

#### XIV - TẠI SAO NGƯỜI TA LẠI NHẦM VIỆC NGHIÊN CỨU TẾ BÀO GỐC VỚI NHÂN BẢN ?

Nghiên cứu tế bào gốc hay bị nhầm lẫn với nhân bản, bởi vì cả hai lĩnh vực này đều liên quan tới việc sử dụng tế bào phôi. Dư luận thường cho rằng : "nhân bản" đồng nghĩa với việc thao tác tế bào phôi để tạo ra một cơ thể, và nghiên cứu tế bào gốc lần đầu tiên được trở thành điểm nóng khi các tế bào gốc người được phân lập từ mô của phôi người. Hai lĩnh vực này bị nhầm lẫn khi khái niệm nhân bản với mục đích chữa bệnh được xem như một phương thức để tạo ra các tế bào gốc phôi. Nhưng chúng ta

phải hiểu rằng, những nghiên cứu tế bào gốc không luôn luôn liên quan đến tế bào phôi.

Trong khi đó, nhân bản với mục đích sinh sản (sản sinh ra một cơ thể mới từ một tế bào ban đầu bằng công nghệ nhân bản) và nhân bản với mục đích trị liệu (sử dụng kỹ thuật nhân bản để phân lập tế bào gốc), cả hai đều sử dụng các kỹ thuật liên quan đến phôi. Nghiên cứu tế bào gốc có thể sử dụng một vài kiểu tế bào khác ngoài tế bào gốc phôi như : tế bào gốc trưởng thành từ người, động vật, tế bào gốc từ thai, cuống rốn hay dịch ối. Như vậy, một ranh giới rõ ràng nên được đưa ra giữa nhân bản cho mục đích sinh sản và nghiên cứu tế bào gốc trên cơ sở phân lập các tế bào gốc trưởng thành và gốc phôi với mục đích tìm ra các cách điều trị cho nhiều bệnh thoái hoá.

## XV - CẤY TRUYỀN NHÂN TẾ BÀO XOMA LÀ GÌ ?

Cấy truyền nhân tế bào xoma (SCNT - somatic cell nuclear transfer), là một kỹ thuật mà trong đó nhân của tế bào xoma (bất kỳ một loại tế bào nào của cơ thể ngoại trừ dòng tinh trùng và trứng) được tiêm vào trứng đã bị mất nhân. Nếu như trứng này, sau đó được cấy truyền vào trong tử cung của con mẹ mang thai hộ, một cơ thể mới sẽ được sinh ra và được gọi là con vật nhân bản. Con vật nhân bản có cấu trúc di truyền giống với tế bào xoma của cơ thể cho nhân, vì nhân là vật mang nguyên liệu di truyền.

Quy trình này rất kém hiệu quả và lần đầu tiên được tiến hành cho mục đích nông nghiệp. Tuy nhiên, trong y học người, kỹ thuật này được sử dụng để phân lập tế bào gốc phôi từ trứng đã trải qua cấy nhân. Khi tế bào xoma được lấy từ một người, tế bào gốc được phân lập từ phôi (do cấy nhân từ tế bào xoma trên) có thể được sử dụng để tạo ra một mô mà sẽ không bị đào thải bởi người đó bởi vì chúng có vật chất di truyền giống nhau. Theo cách này, tế bào gốc phôi theo nhu cầu của khách hàng có thể được tạo ra đối với người mà cần chúng.

## XVI - TẾ BÀO GỐC ĐƯỢC NUÔI TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM NHƯ THẾ NÀO ?

Thông thường các tế bào gốc được sinh trưởng ở trong các đĩa nuôi cấy trong tủ nuôi ở nhiệt độ cơ thể ( $37^{\circ}\text{C}$ ) với độ ẩm cao. Bởi vì, có nhiều loại tế bào gốc khác nhau, cho nên các thành phần của dung dịch nuôi cấy cho mỗi tế bào gốc là khác nhau. Điều thách thức đối với các nhà khoa học là phải tăng sinh tế bào gốc ở trạng thái không biệt hoá, có nghĩa là chúng không biệt hoá thành các kiểu tế bào chuyên hoá trong *in vitro*, và hơn nữa khi cần phải biết cách làm cho các tế bào này biệt hoá thành các tế bào chuyên hoá.

Các tế bào gốc phôi người có thể sinh trưởng như các tập đoàn (các bào lạc) nhỏ trên các lớp của tế bào da trong môi trường có huyết thanh được thu nhận từ máu. Các tế bào da này được hiểu như là các “tế bào nuôi” và cùng với huyết thanh cung cấp nhiều nhân tố chưa biết được, các nhân tố này nuôi dưỡng và trợ giúp các tế bào gốc phôi ở trạng thái không biệt hoá. Khi các bào lạc của các tế bào gốc phôi sinh trưởng quá lớn đối với đĩa nuôi cấy, thì chúng phải được chia ra thành các bào lạc nhỏ hơn hoặc thành các tế bào đơn lẻ, và được cấy chuyển sang những đĩa nuôi cấy mới. Sau đó

các tế bào tiếp tục sinh trưởng. Quá trình cấy chuyển, về lý thuyết, có thể lặp lại nhiều lần không giới hạn.

Các tế bào gốc máu có thể thu nhận hoặc từ tuỷ xương, nhau thai ; hoặc là từ máu cuống rốn. Thật là khó khăn trong việc nuôi cấy các tế bào gốc máu *in vitro*, bởi vì các tế bào gốc máu nhanh chóng có khuynh hướng biệt hoá thành nhiều loại tế bào chuyên hoá. Do đó, nhìn chung người ta chưa nuôi cấy được các tế bào gốc máu.

Các tế bào gốc trung mô ở người, hoặc các tế bào gốc nền tuỷ xương được phân lập từ tuỷ xương và nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy có bổ sung huyết thanh. Các tế bào gốc trung mô bám lên bề mặt nhựa của đáy đĩa nuôi cấy và có thể tăng trưởng một vài tuần trước khi chúng biến hoá thành các dạng tế bào khác.

Tế bào gốc thần kinh có thể bắt nguồn từ thai hoặc từ mô não trưởng thành và có thể sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy. Chúng tồn tại ở dạng lơ lửng, nghĩa là chúng không bám dính vào đáy đĩa nuôi cấy, và chúng không cần huyết thanh cho quá trình sinh trưởng. Trong nuôi cấy, một tế bào gốc thần kinh có thể phân chia tạo ra nhiều tế bào, các tế bào này hợp lại tạo thành một cấu trúc quả cầu rỗng được hiểu như là khối thần kinh (neurosphere). Khối thần kinh này tiếp tục sinh trưởng và khi chúng trở nên quá lớn thì chúng lại phân ra thành các tế bào đơn lẻ.

Những tế bào đơn lẻ này là một quần thể hỗn hợp của các tế bào gốc thần kinh với nhiều các tế bào trưởng thành khác. Các tế bào gốc thần kinh có thể được sàng lọc từ chính quần thể này và một lần nữa chúng lại hình thành dạng khối thần kinh hình cầu rỗng. Quá trình phân rã và sự hình thành khối thần kinh có thể lặp lại nhiều lần. Cuối cùng, tất cả các tế bào gốc thần kinh biến hoá thành các tế bào thần kinh trưởng thành.

## XVII - NHỮNG LOẠI THÍ NGHIỆM NÀO ĐÃ ĐƯỢC TIẾN HÀNH VỚI TẾ BÀO GỐC VÀ LOẠI NÀO VẪN CẦN PHẢI ĐƯỢC THỰC HIỆN TIẾP ?

Các tế bào gốc phôi chuột được mô tả đầu tiên vào năm 1981. Các thí nghiệm phổ biến nhất đã tiến hành thao tác về mặt di truyền đối với ADN trong các tế bào gốc phôi chuột. Những thí nghiệm này đã cung cấp một lượng thông tin lớn về vai trò của các gen khác nhau trong suốt sự phát triển của chuột, sự hình thành các mô khác nhau và chức năng của chúng trong chuột trưởng thành.

Ngoài ra, người ta cũng biết rằng trong điều kiện thích hợp, các tế bào gốc phôi chuột có thể tạo tất cả các mô trong cơ thể trưởng thành của chuột. Những thí nghiệm kiểm chứng hiện tượng này được thực hiện bằng cách tiêm các tế bào gốc phôi chuột vào trong trứng chuột đã được thụ tinh ở giai đoạn túi phôi và kiểm tra những con chuột được sinh ra về sau.

Tuy nhiên những dạng thí nghiệm này không được tiến hành trên mô của người, như vậy tiềm năng của các tế bào gốc phôi người phải được nghiên cứu bằng những cách khác. Các tế bào gốc phôi người có thể được nghiên cứu *in vitro* (trong điều kiện nuôi cấy tế bào) hoặc trên những con chuột đặc biệt, chuột thiểu hụt miễn dịch, nghĩa là chúng sẽ không thải hồi các tế bào mà bắt nguồn từ loài khác.

Các tế bào gốc phôi người được miêu tả lần đầu tiên vào năm 1998. Những kinh nghiệm có được từ sự thực nghiệm trên các tế bào gốc phôi chuột nhanh chóng được đưa vào trong các hệ thống thực nghiệm tế bào gốc phôi người. Các nhà khoa học đang nỗ lực làm việc để tìm hiểu các đặc tính của các tế bào này và tìm hiểu các cơ chế điều khiển sự biệt hoá của các tế bào gốc phôi người thành các tế bào trưởng thành. Bên cạnh đó nhiều nhà nghiên cứu đang sử dụng những tế bào gốc phôi người để xây dựng các mô hình nhằm nghiên cứu sự phát triển phôi sớm của người, đồng thời cũng tạo ra các liệu pháp di truyền và liệu pháp tế bào cho điều trị bệnh.

Cuối cùng người ta hy vọng có thể hiểu biết rõ hơn về nguyên nhân bệnh quái thai và có thể điều trị được bệnh. Đồng thời người ta cũng hy vọng rằng một ngày gần đây chúng ta sẽ có khả năng tạo ra được các tế bào trong đĩa nuôi cấy, chẳng hạn như tế bào tim, tế bào tuy hoặc các tế bào não, nhằm thay thế các mô bị hỏng về mặt di truyền hoặc các mô bị tổn thương như là kết quả của các bệnh đột quy tim, bệnh tiểu đường, các rối loạn tuỷ sống và bệnh Parkinson.

Những thí nghiệm cấy ghép tế bào bằng cách sử dụng các mô hình trên chuột cho mỗi bệnh trên đã được tiến hành với các tế bào gốc phôi chuột và trong một vài trường hợp là tế bào gốc phôi người. Mặc dù mới chỉ là những bước đầu, nhưng đang hứa hẹn những kết quả khả quan.

Đã trở nên thông thường khi các tế bào gốc máu được cấy ghép sau điều trị bằng phỏng xạ cho bệnh nhân mắc bệnh ung thư. Chiếu phỏng xạ có thể phá huỷ các tế bào ung thư, nhưng nó cũng phá huỷ các tế bào gốc tạo máu tuỷ xương của chính cơ thể đó, dẫn đến bệnh nhân bị mất sự bảo vệ của hệ thống miễn dịch.

Trong những trường hợp này, sau khi liệu pháp chiếu xạ hoàn tất, các tế bào gốc tạo máu từ cơ thể cho được cấy ghép trở lại tuỷ xương nhằm phục hồi hệ thống miễn dịch của bệnh nhân. Những thí nghiệm liên quan đến cấy ghép các tế bào gốc tạo máu cho các thai nhi yếu trong suốt quá trình mang thai cũng đã được tiến hành. Thông thường những thai này được phát hiện có những sai hỏng về mặt di truyền của các tế bào gốc tạo máu của cơ thể đó. Những thí nghiệm này đã thu được một vài thành công trong việc điều trị những trẻ em bị những rối loạn về hệ miễn dịch, như bệnh thalassemia và những sai hỏng bẩm sinh trong trao đổi chất.

Tế bào gốc thần kinh thai được cấy ghép nhằm thay thế các tế bào bị hư hại trong các thí nghiệm hướng tới nhằm điều khiển các hội chứng của bệnh Parkinson. Những thí nghiệm này cũng đã có được một vài thành công. Các thí nghiệm tiêm tế bào gốc mà được tìm thấy trong thành mạch máu của chuột vào mạch máu của cơ đã thu được thành công trong việc thay thế các sợi cơ, giúp cho những con chuột bị rối loạn về cơ trở nên có thể vận động bình thường. Các tế bào gốc trung mô đã chứng minh tính hiệu quả trong việc điều trị bệnh di truyền ở gan của chuột.

Một số thí nghiệm sơ khởi hiện nay vẫn còn được tiếp tục nghiên cứu, đó là những thí nghiệm tìm hiểu các yếu tố cần thiết giúp cho các tế bào gốc phôi biệt hoá thành các tế bào mong muốn khác, các thí nghiệm nhằm hiểu sự gia tăng số lượng các tế bào gốc được chấp nhận ở người bệnh ở vị trí chính xác trong cơ thể ; những thí nghiệm

giảm khả năng chống lại các tế gốc mới ; và những thí nghiệm đảm bảo rằng, các tế bào gốc mới này hội nhập vào vị trí chính xác nhằm hồi phục chức năng bình thường của mô bị phá huỷ trong cơ thể.

### XVIII - TẾ BÀO MÁU CUỐNG RỐN HOẶC TẾ BÀO GỐC CÓ THỂ ĐƯỢC CẤT GIỮ TRONG NGÂN HÀNG KHÔNG ?

Các ngân hàng máu cuống rốn người, tế bào gốc thần kinh và tế bào gốc phôi người đã được thiết lập ở một vài nước trên thế giới và đang được mở rộng. Máu cuống rốn, giống như tuỷ xương được cất giữ như là nguồn các tế bào gốc tạo máu cho việc điều trị các bệnh di truyền đặc biệt và bệnh mắc phải trong liệu pháp cấy ghép các tế bào gốc dị gen (khác cơ thể).

Tế bào gốc thần kinh bắt nguồn từ các thai nạo, được bảo quản trong ngân hàng, hứa hẹn cho việc điều trị các bệnh đặc hiệu về não. Những ngân hàng tế bào gốc phôi cũng đã được thiết lập hứa hẹn cho việc trị liệu cho nhiều bệnh di truyền và các bệnh mắc phải từ thần kinh, tới máu, tới tuy, tới tim cho tới da.

Trước khi đưa vào ngân hàng, các quy trình kiểm soát chất lượng nhằm kiểm tra : sự bất thường về nhiễm sắc thể, khả năng của các tế bào trải qua quá trình đông và tan lạnh, sự thích hợp miễn dịch của tế bào gốc với bệnh nhân cần các tế bào, sự có mặt các virus gây bệnh trong tế bào gốc, khả năng tế bào gốc tạo ra các tế bào trưởng thành khi cần thiết và khả năng tăng sinh về số lượng của tế bào gốc tới số lượng thích hợp.

### XIX - Y SINH HỌC TÁI SINH LÀ GÌ ?

Mục đích của y sinh học tái sinh là sửa chữa các cơ quan, hoặc các mô mà các mô này bị hư hại do bị bệnh hoặc tuổi già, hoặc chấn thương, vì vậy chức năng có thể được hồi phục hoặc ít nhất cũng được cải thiện. Với định nghĩa này hầu hết các hoạt động của y học có thể được quan tâm "như là sự tái sinh", ngoại trừ hoạt động y tế với những mục đích ngăn cản bệnh như sự tiêm chủng.

Ngày nay thuật ngữ y sinh tái sinh được sử dụng để miêu tả các hoạt động, trị liệu và nghiên cứu về y học mà có sử dụng tế bào gốc để hồi phục chức năng của các cơ quan hoặc mô. Điều này có thể đạt được bằng nhiều cách khác nhau, đầu tiên là : sự quản lý các tế bào gốc hoặc các tế bào chuyên hoá được bắt nguồn từ tế bào gốc trong phòng thí nghiệm ; thứ hai là : sự quản lý dược phẩm mà có vai trò trợ giúp các tế bào gốc đã có ở trong mô nhằm sửa chữa hiệu quả hơn đối với các mô liên quan.

Gần đây, một phương pháp y học được ứng dụng phổ biến bằng cách sử dụng các tế bào gốc trong cấy ghép tuỷ xương. Việc sử dụng các tế bào gốc phôi người cho trị liệu vẫn đang trong giai đoạn phát triển, nhưng cũng đã chỉ ra những kết quả thí nghiệm có triển vọng.

### XX - CÓ BAO NHIÊU DÒNG TẾ BÀO GỐC PHÔI NGƯỜI ?

Số lượng các dòng tế bào gốc phôi người là một vấn đề mang nhiều tranh cãi. Đầu tiên, người ta tuyên bố rằng, tế bào gốc phôi người có ít nhất 60 dòng. Tuy nhiên hầu

988.9  
hết chúng chưa được mô tả đầy đủ các đặc điểm và chỉ có một số ít (8-10 dòng) thực sự được chấp nhận rộng rãi là đúng với các tế bào gốc phôi người. Chi tiết thông tin về các dòng tế bào mà đã được đăng ký qua Viện Sức khoẻ Quốc gia có thể tìm thấy ở trên trang Web : <http://stemcells.nih.gov>

## **XXI - TẠI SAO QUỸ LIÊN BANG MỸ LẠI CÓ VAI TRÒ QUAN TRỌNG CHO NGHIÊN CỨU TẾ BÀO GỐC ?**

Quỹ Liên bang cho phép nghiên cứu các tế bào gốc phôi chuột và các dòng tế bào gốc trưởng thành (cả chuột và người) hiện có. Tuy nhiên, Quỹ Liên bang giới hạn nghiên cứu các tế bào gốc phôi người chỉ ở một vài dòng tế bào đã được chính phủ Bush chấp nhận vào tháng 8 năm 2001. Ngược lại, không có sự cấm đoán trong nghiên cứu tiến hành từ quỹ tư nhân. Ở đây có nhiều lý do để người ta tranh cãi về những giới hạn này.

Ở Mỹ, Viện Sức khoẻ Quốc gia (NIH) cấp một khoản lớn nhất từ các Quỹ Liên bang cho các nhà khoa học dựa trên cơ sở cạnh tranh và triển vọng lâu dài cho nghiên cứu y sinh. Ở đây những lợi nhuận là không được chú trọng và các tiến bộ khoa học cho lợi ích sức khoẻ cộng đồng được quan tâm hơn. Một khoản giới hạn từ các quỹ tư nhân sẽ không thể theo kịp với những sự yêu cầu trong cộng đồng nghiên cứu tế bào gốc. Nếu bớt đi các hạn chế từ Quỹ Liên bang thì việc nghiên cứu tế bào gốc phôi người sẽ phát triển nhanh hơn để cải thiện sức khoẻ của người Mỹ trong thời gian tương lai.

Với các quy tắc đã thiết lập, bất kỳ nhà khoa học nào đang nhận quỹ của Liên bang đều bị ngăn cấm tạo thêm ra các dòng mới tế bào gốc phôi người. Đến tận bây giờ cũng chưa rõ là, các thông tin thu nhận được với tập hợp một số ít dòng tế bào như thế, áp dụng được đến mức nào cho toàn bộ quần thể người, nhất là người ta đã biết về sự đa dạng của các dòng tế bào gốc phôi chuột. Bên cạnh đó, việc phát triển các phương cách có hiệu quả để tạo ra những dòng tế bào mới sẽ là cần thiết nếu các tế bào gốc phôi người được sử dụng để chữa bệnh.

Tuy lĩnh vực tư nhân có thể tiến hành nghiên cứu để tạo ra những dòng tế bào mới, nhưng điều này dẫn đến một số vấn đề. Một trong số đó là, do sự sở hữu trí tuệ, sự phổ biến kiến thức có thể là chậm hơn khi hầu hết các nghiên cứu là được làm bởi các công ty tư nhân. Những kết quả của bất kỳ nghiên cứu nào được hình thành bởi quỹ tư nhân có thể vượt ra ngoài sự kiểm soát cộng đồng, và khi các kiến thức không được phổ biến thì sự tiến bộ có thể bị chậm lại.

Vấn đề thứ hai là các công ty tư nhân cần có những lợi nhuận từ những sự đầu tư của họ. Theo truyền thống, nếu không có lợi nhuận, việc nghiên cứu có thể bị dừng lại cho dù việc đó là quan trọng đối với sức khoẻ của cộng đồng hoặc đối với sự tiến bộ của khoa học.

Chính điều này chỉ ra rằng, nghiên cứu các tế bào phôi người có thể không chỉ dẫn đến các triển vọng trị liệu đối với các bệnh nan y, mà còn là sự hiểu biết sâu sắc về sự phát triển con người, về bản chất loài người chúng ta mà không thể thu được qua nghiên cứu trên động vật thí nghiệm. Các nghiên cứu khoa học cơ bản loại này cần phải có kinh phí từ quỹ của Chính phủ Liên bang.

## XXII - ĐẠO ĐỨC SINH HỌC LÀ GÌ ?

Đạo đức sinh học hoặc y đức là sự nghiên cứu về đạo đức và đạo lý trong nghiên cứu khoa học, sự điều trị y học hoặc nói chung là trong khoa học sự sống. Với sự phát triển công nghệ và những cải tiến hiện đại, người ta thu được nhiều điều mới lạ và sâu sắc về các quá trình khoa học và các bệnh, nhưng đồng thời cũng xuất hiện những vấn đề mới về y đức.

Trong trường hợp y học sinh sản, các vấn đề đạo đức tập trung vào quyền của cá nhân kiểm soát cơ thể của họ hoặc kiểm soát việc sử dụng các phôi được tạo ra từ những tế bào của họ. Việc sử dụng các phôi người để phân lập các tế bào gốc cho việc nghiên cứu và các kỹ thuật trị liệu tế bào đã gây ra sự tranh cãi về trạng thái tinh thần của các phôi người và các lợi ích tương ứng.

Sự cấy ghép và sự nghiên cứu tiến hành đối với cơ quan, hoặc mô từ các thai bị nạo đã dẫn đến sự tranh cãi về việc chấp nhận hay không cho phép sử dụng các mô lấy từ thai bị nạo.

Nhân bản các động vật để tạo ra con cháu có cùng đặc điểm di truyền, ví dụ như là cừu Dolly, đưa tới ý nghĩ là việc nhân bản người sẽ được tiến hành tiếp theo, dẫn đến sự tranh luận về đạo đức trong việc nhân bản người với khả năng thao tác các tính trạng đặc biệt ở thế hệ con cháu.

Đạo đức với những khía cạnh trên của nghiên cứu và y học đến tận bây giờ vẫn đang gây tranh cãi và chưa có hướng giải quyết.

Điều này vẫn là những thách thức đối với cộng đồng khoa học, y học và đạo đức sinh học trong nhiều năm tới.

## XXIII - TÌM THÔNG TIN VỀ TẾ BÀO GỐC Ở ĐÂU ?

Internet cung cấp một nguồn thông tin tuyệt vời về tế bào gốc cũng như các nghiên cứu cơ bản và lâm sàng đang tiến hành. Dưới đây là danh sách của một vài Website có giá trị.

Website ISSCR, <http://www.isscr.org> có những thông tin giá trị, các bản tin nhanh với những thông tin quan trọng cho các nhà khoa học đang nghiên cứu về vấn đề này.

Website của Viện Sức khỏe quốc gia có những thông tin về tế bào gốc, cho quần chúng và các nhà khoa học, về các chính sách của Chính phủ.

Stem cell Network của Canada cũng cung cấp một vài thông tin tốt.

Stem cell Research News cung cấp thông tin bao gồm danh mục hay về tế bào gốc lấy từ những bài báo mới.

Website của The Coalition for the Advancement of Medicine Research (CAMR) có những thông tin về sự biện hộ cho các nghiên cứu tế bào gốc và nhân bản với mục đích chữa bệnh.

Một Website mà cung cấp những tư liệu lâm sàng có liên quan đến tế bào gốc theo địa chỉ <http://www.clinicaltrials.gov>.

Xem trang tổng hợp với giới thiệu các Website của Website ISSCR.

## Chương 9

# TẾ BÀO TRỨNG

Tế bào trứng có một tầm quan trọng đặc biệt trong công nghệ tế bào trong giai đoạn hiện nay. Trong phần này tác giả xin cung cấp những thông tin có được về tế bào trứng, đặc biệt là trứng động vật có vú.

Danh từ “trứng” trong tiếng Việt dùng để chỉ vật do con mẹ đẻ ra và phát triển thành con non. Trong bụng những con cái như cá cái, gà mái v.v... cũng có nhiều trứng. Trứng gà đang ấp cũng vẫn là trứng, ổ trứng cá hay ếch sắp nở cũng vẫn là trứng. Về mặt chính xác khoa học, nên gọi trứng là tế bào giao tử cái chín muồi và sẵn sàng thụ tinh.

Trứng là vật kỳ diệu nhất trên thế giới chúng ta. Đó là một tế bào khổng lồ, là tế bào duy nhất có khả năng phát triển thành một cơ thể mới. Trong trứng đã có đủ thông tin cần thiết cho toàn bộ quá trình phát triển (trong trường hợp trình sản). Trứng là một tế bào toàn năng, có nghĩa là từ nó tạo nên tất cả các loại tế bào khác nhau của cơ thể. Tuy thế, nó lại là một tế bào cực kỳ chuyên hoá với một chức năng duy nhất là cho cơ thể mới.

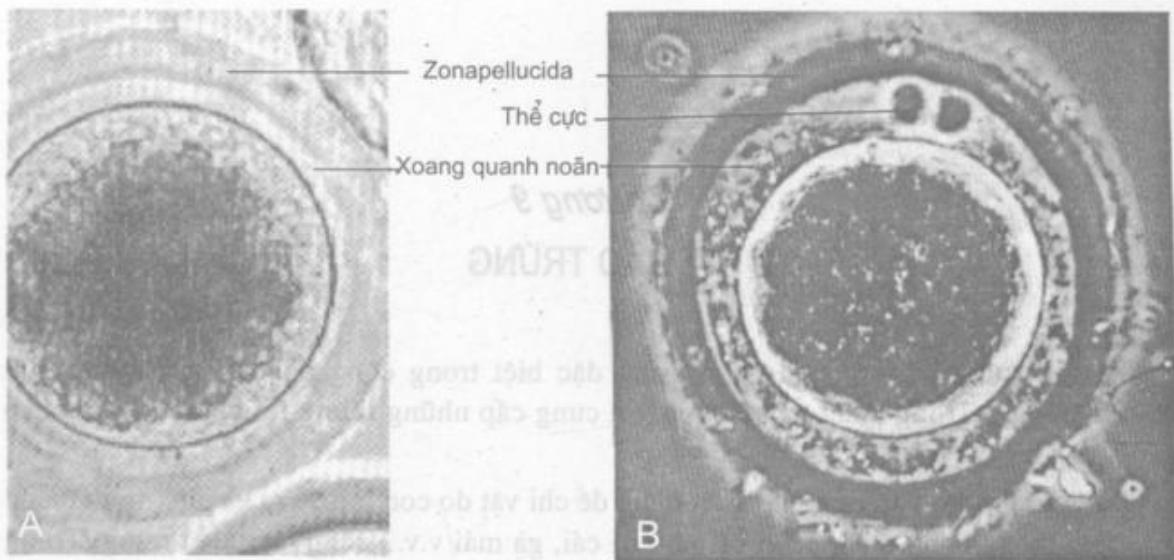
Do phải phát triển gần như độc lập nên trứng có lớp vỏ dày bảo vệ, có chứa rất nhiều các chất dự trữ dưới dạng noãn hoàng và do đó có kích thước lớn. Đồng thời trứng cũng có cơ cấu phức tạp làm tiền đề cho quá trình phát triển sau này.

### I - HÌNH DẠNG, KÍCH THƯỚC TRỨNG

Trứng thường có hình cầu hoặc hình trứng, có đường kính từ 60 tới 200 $\mu\text{m}$  ở động vật có vú và cầu gai ; từ 1mm đến 2mm ở cá và ếch ; ở bò sát và chim, trứng có thể có đường kính tới hàng chục xentimet và cân nặng tới hàng kilogam. Đường kính trứng người là 135 $\mu\text{m}$ , nếu kể cả màng sáng là khoảng 170 $\mu\text{m}$ . Hình 9.1 cho thấy hình ảnh trứng lợn và trứng người sau ít phút sau thụ tinh. Bảng dưới đây cho biết đường kính trứng của một số gia súc (Bảng 9.1).

**Bảng 9.1. Kích thước trứng và bao Graaf ở một số gia súc (theo Hafez, 1968)**

Kích thước	Bò	Cừu	Lợn	Ngựa
Đường kính bao Graaf trước khi vỡ (mm)	12 - 19	5 - 8	8 - 12	25 - 65
Đường kính trứng chín không có màng sáng ( $\mu\text{m}$ )	120 - 160	140 - 185	120 - 170	120 - 180



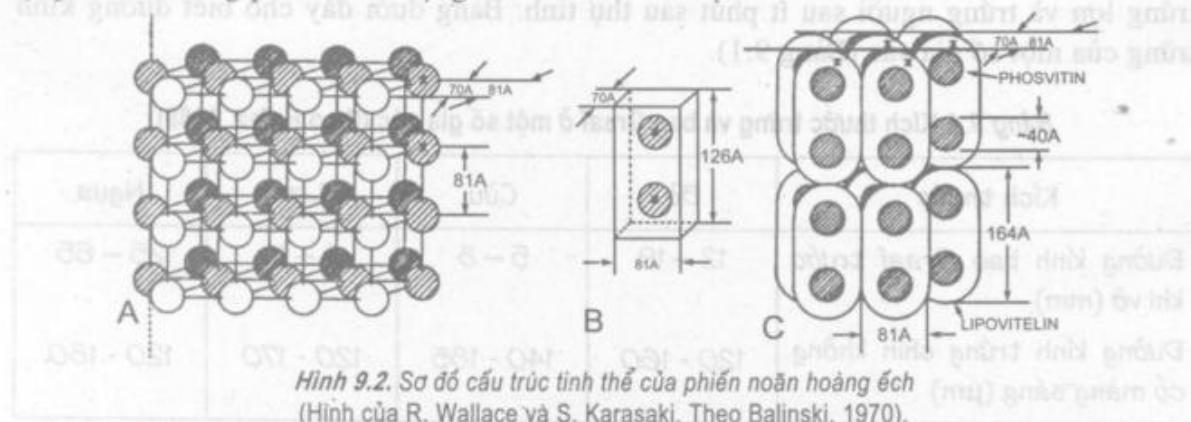
Hình 9.1. Ảnh chụp hiển vi trứng lợn (A) và trứng người (B)

Các trứng đều đã mới được thụ tinh, thấy rõ các thể cực nằm trong xoang thụ tinh và trứng được bao bọc bằng một màng bảo vệ khá dày – màng sáng (zona pellucida)

## II - NOÃN HOÀNG

Các chất dự trữ có trong trứng gọi chung là noãn hoàng. Người ta phân biệt ba loại noãn hoàng : noãn hoàng hydratcacbon, noãn hoàng mỡ và noãn hoàng protein. Noãn hoàng hydratcacbon ở dạng các hạt hoặc mảnh glycogen hoặc các polisaccarit khác. Noãn hoàng mỡ gồm các mảnh hoặc các giọt mỡ. Trứng một số loài cá có thể có một giọt mỡ rất lớn ở trung tâm, nó làm cho trứng có thể phát triển trôi nổi trên mặt nước. Noãn hoàng protein có thể là những tinh thể protein tự do hoặc trong các cấu trúc tinh thể của phiến noãn hoàng.

Phiến noãn hoàng ở luồng胎 chứa hai loại protein chính là phosvitin và lipovitelin. Phosvitin là loại protein có độ phosphorin hoá rất cao (có tới 8,4% phospho) với phân tử lượng là 35.000. Lipovitelin là loại protein có phân tử lượng rất lớn 400.000 và chứa một số lượng lớn các lipit liên kết (17,5%). Trong phiến noãn hoàng, hai phân tử phosvitin liên kết với một phân tử lipovitelin thành một đơn vị cấu trúc. Các đơn vị này lại phân bố trong phiến dưới dạng các tinh thể sáu cạnh.



Hình 9.2. Sơ đồ cấu trúc tinh thể của phiến noãn hoàng ếch  
(Hình của R. Wallace và S. Karasaki. Theo Balinski, 1970).

Theo số lượng noãn hoàng có trong trứng người ta phân biệt bốn loại trứng :

- Trứng giàu noãn hoàng (pololecithal), thuộc loại này là đa số trứng tiết tủy, cá xương, bò sát, chim và các động vật có vú đẻ trứng.
- Trứng trung noãn hoàng (mesolecithal), ví dụ như ở cá sụn - xương và lưỡng thể.
- Trứng ít noãn hoàng (oligolecithal), ví dụ như trứng nhuyễn thể, da gai và da sói giun.
- Trứng không có noãn hoàng hay trứng vô noãn hoàng (alecithal), chỉ chứa một số rất ít, không đáng kể các hạt noãn hoàng riêng rẽ. Ví dụ như trứng động vật có vú đẻ con và một số côn trùng cánh màng ký sinh.

### **III - CƠ CẤU TỔ CHỨC CỦA TRỨNG**

#### **3.1. Sự phân cực**

Cơ cấu đơn giản và quan trọng trước tiên là sự phân cực theo lực trọng trường. Noãn hoàng thường tập trung ở phía dưới và cực dưới được gọi là cực thực vật. Noãn bào chất nghèo noãn hoàng thường tập trung ở phía trên và cực trên gọi là cực động vật. Người ta còn một cách nữa để phân loại các trứng, đó là theo sự phân bố noãn hoàng trong trứng (xem phân phân cắt trứng). Ngoài ra trong quá trình phát triển còn xảy ra sự phân vùng tế bào chất và xuất hiện các loại cơ cấu khác quy định các trục đối xứng của phôi sau này.

#### **3.2. Lớp tế bào chất dưới vỏ**

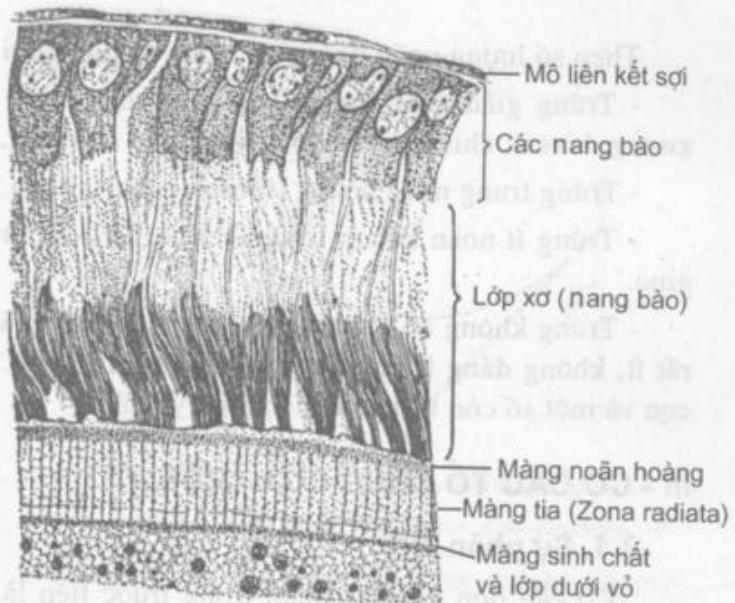
Một lớp mỏng tế bào chất ngoại vi, ngay dưới màng sinh chất của trứng, có cấu tạo đặc biệt. Lớp này có chứa nhiều hạt mucopolisaccharit (gọi là hạt dưới vỏ), có khả năng hấp thụ nước và trương nở rất mạnh, chúng tham gia tích cực vào quá trình thụ tinh. Các hạt vỏ có bản chất giốngлизоком và xuất xứ từ thể Golgi. Lớp tế bào chất dưới vỏ có độ nhớt cao, có thể duy trì cấu trúc một cách ổn định, có ý nghĩa quan trọng cho quá trình phát triển sau này.

### **IV - CÁC MÀNG TRỨNG**

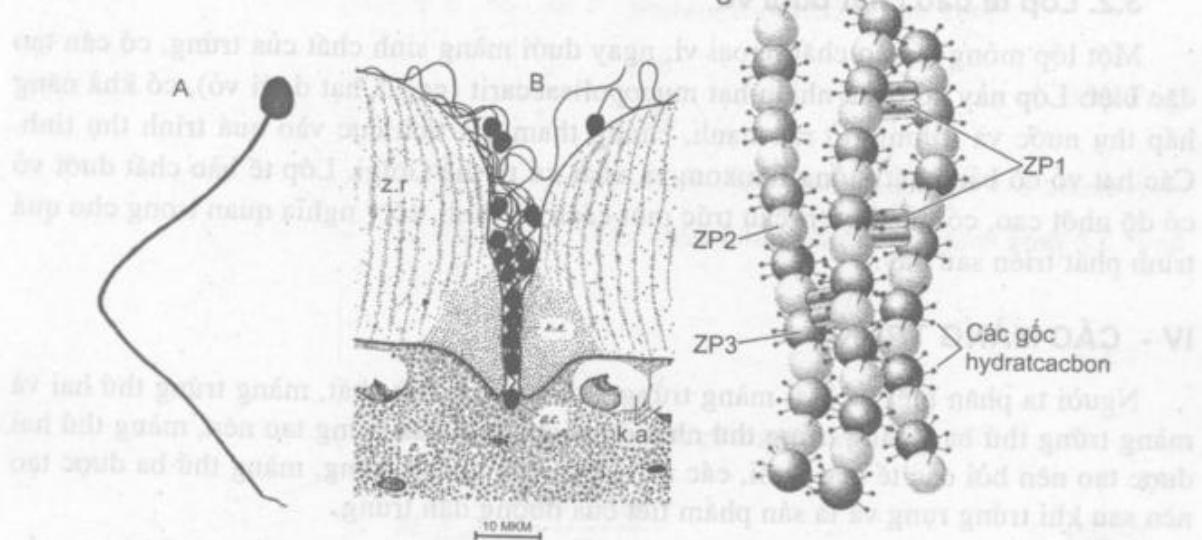
Người ta phân biệt ba loại màng trứng, màng trứng thứ nhất, màng trứng thứ hai và màng trứng thứ ba. Màng trứng thứ nhất được chính tế bào trứng tạo nên, màng thứ hai được tạo nên bởi các tế bào nuôi, các nang bào bao quanh trứng, màng thứ ba được tạo nên sau khi trứng rụng và là sản phẩm tiết của đường dẫn trứng.

Màng trứng thứ nhất còn gọi là màng noãn hoàng. Đó là dạng chuyên hoá cao của khuôn ngoại bào (glycocalix) của tế bào trứng. Nó được tiết ra bởi chính tế bào trứng và cấu tạo chủ yếu từ glycoprotein. Nó bao trực tiếp quanh noãn bào tương. Lớp này có thể khá dày, nó bảo vệ trứng khỏi các tác động cơ học có hại. Nó còn có tính đặc hiệu loài và ngăn cản không cho các tinh trùng khác loài xâm nhập. Trong trường hợp này nó có thể có một số lớp và ở đây thường thấy hình sọc kẻ các tia phóng xạ nằm dưới màng noãn hoàng. Vùng sọc kẻ này gọi là vùng tia hoặc màng tia (hình 9.3).

Màng tia thấy rõ ở trứng giun, nhuyễn thể, da gai, trứng cá, bồ sát và chim. Bằng kính hiển vi điện tử, Kemp (1956) xác lập rằng màng tia của trứng ếch được tạo nên bởi các vi nhung trên bề mặt trứng và các chồi nguyên sinh chất của các nang bào xuyên sâu vào lớp vi nhung này. Về nguyên tắc, màng sáng hay màng kính (zona pellucida) ở trứng động vật có vú cũng có cấu tạo tương tự. Màng trứng thứ nhất thường có những vi lỗ xuyên qua gọi là noãn khồng (micropile) (xem hình 9.4). Trên màng trứng, noãn khồng có vị trí khác nhau tùy loài, ở cực trên, cực dưới hoặc ở nơi trứng dính vào buồng trứng. Ở cá, noãn khồng được tạo nên bởi một vài tế bào nang, chúng phong các chồi tế bào chất xuyên qua màng tia vào trứng, noãn khồng nằm ở cực động vật và là nơi xâm nhập của tinh trùng.



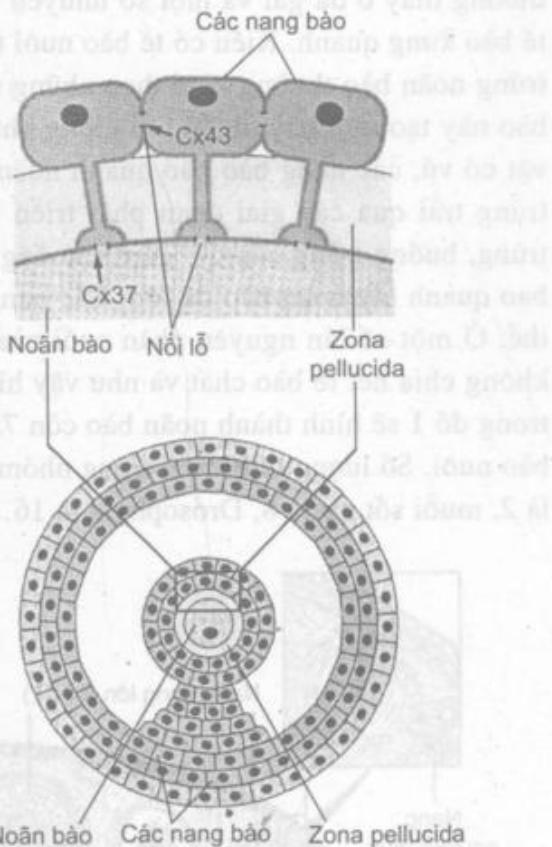
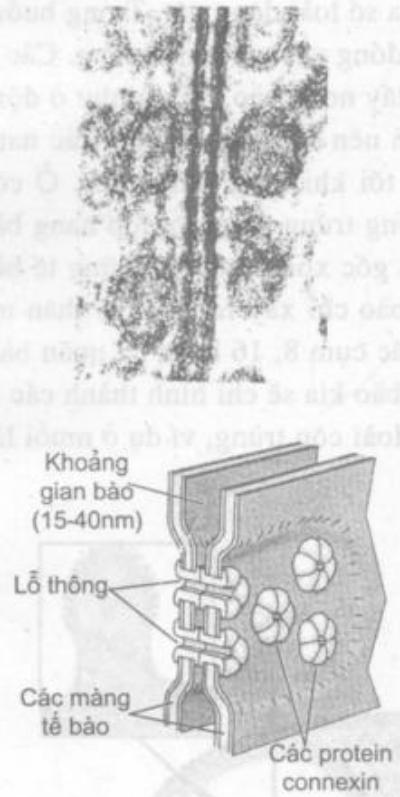
Hình 9.3. Hình vẽ một phần biểu mô nang và màng tia ở trứng cá *Salarias flavo-umbrinus* (Theo Raven, 1961)



Hình 9.4. A. Tinh trùng cá hồi. B. Noãn khồng cá hồi, z.r = màng tia, k.a = túi vỏ (hạt vỏ). C. Cấu trúc phân tử màng sáng trứng động vật có vú. Thấy các glycoprotein ZP1, ZP2, ZP3 cùng các gốc đường

Màng trứng thứ hai điển hình thấy ở cầu gai, ở cá và côn trùng. Nó được tạo nên từ các nang bào và phủ lên trên màng noãn hoàng. Nhiều tác giả cho rằng màng sáng ở động vật có vú là màng trứng thứ hai. Nó được tạo nên ở khoảng không gian giữa màng bào tương của trứng và các tế bào nang. Các chồi xuất phát từ các nang bào dài hơn các

vì nhung xuất phát từ trứng và đóng góp nhiều hơn vào sự hình thành màng sáng này. Màng trứng thứ hai ở côn trùng gọi là màng đệm (chorione). Đó là một cái vỏ bọc rất dai và chắc gồm hai lớp, lớp màng đệm trong (endochorion) thưa và lớp màng đệm ngoài (exochorion) rất dày. Màng đệm do các nang bào tiết chế. Chất tiết mang tính chất keratin nhiều hơn là kitin. Màng hình thành từ chồi các nang bào và chất tiết.

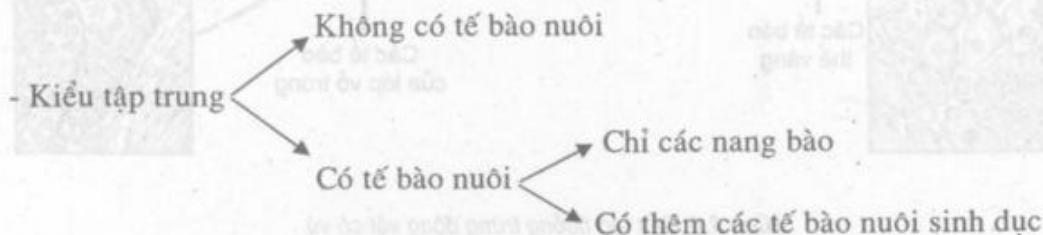


*Hình 9.5. Noãn bào được bao quanh bởi một lớp khuôn ngoại bào dày gọi là màng sáng. Các nang bào nối với nhau và với noãn bào qua các nồi lõ tạo nên bởi các phân tử protein connexin 43 (Cx43) và 37 (Cx37). Các nang bào phát chồi dài xuyên qua màng sáng để tạo nồi lõ với màng sinh chất noãn bào. Sự đột biến Connexin có thể gây bất thụ*

## V - CÁC KIỂU CƠ QUAN TẠO TRỨNG

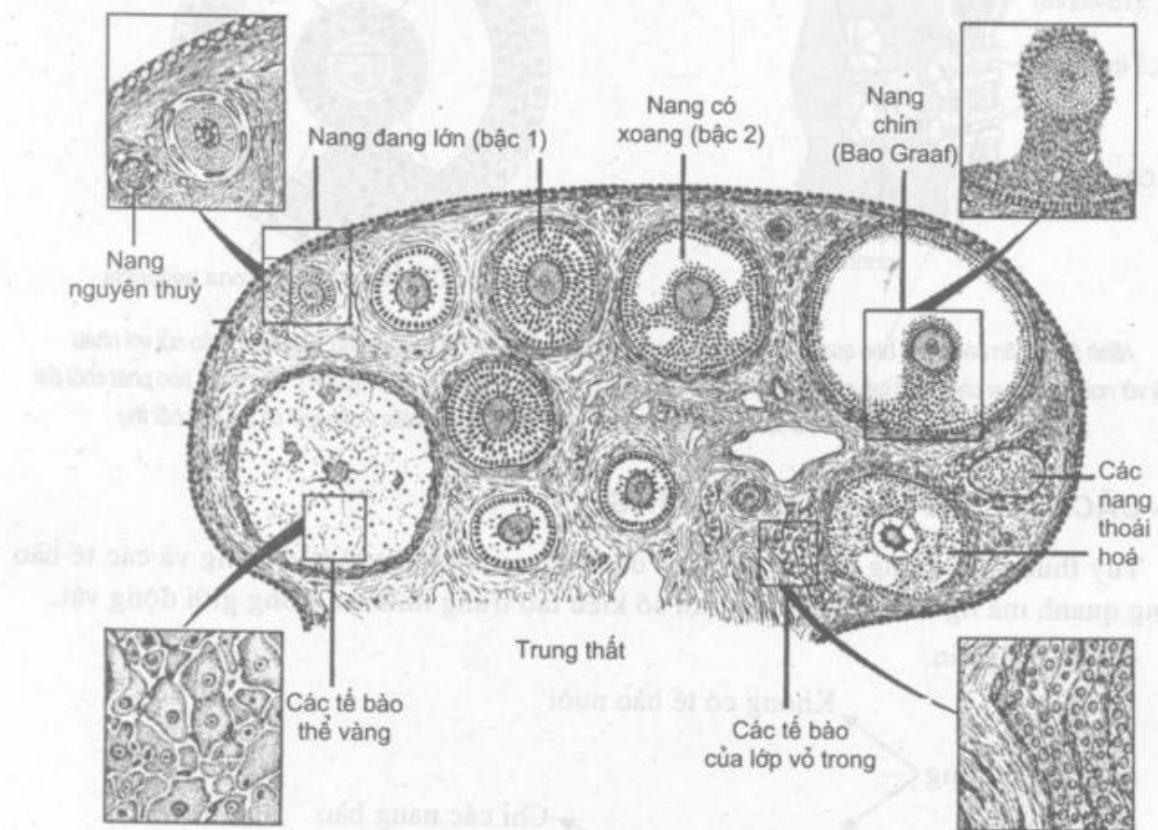
Tuỳ thuộc vào trạng thái tuyến sinh dục và quan hệ giữa tế bào trứng và các tế bào xung quanh mà người ta phân biệt một số kiểu tạo trứng như sau trong giới động vật.

- Kiểu phân tán.

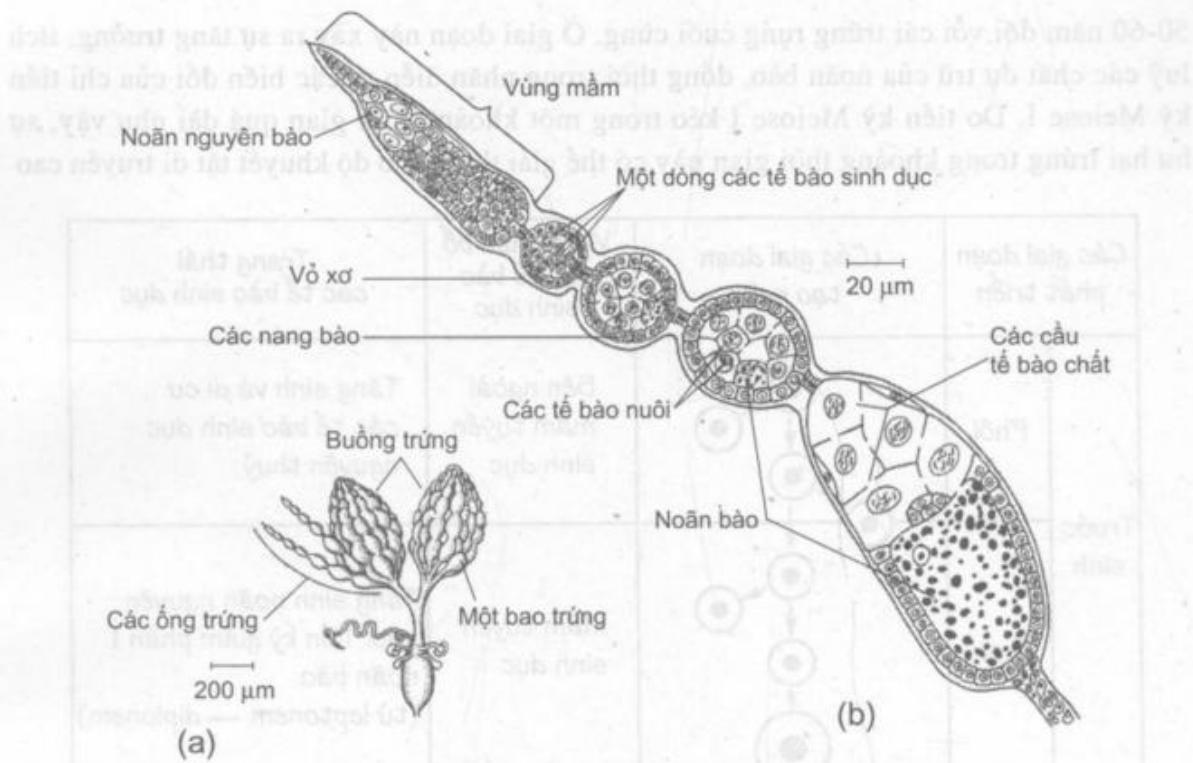


**Kiểu phân tán :** Chỉ thấy ở một số loài bọ biển, ruột túi và giun dẹp. Noãn nguyên bào và noãn bào xuất hiện phân tán trong tầng chất keo, nội bì hoặc ngoại bì.

**Kiểu tập trung :** Thấy ở đa số các loài động vật, quá trình tạo trứng xảy ra trong các tuyến sinh dục chuyên hoá, thường gọi là *buồng trứng*. Kiểu không có tế bào nuôi thường thấy ở da gai và một số nhuyễn thể. Các tế bào trứng phát triển không dựa vào tế bào xung quanh. Kiểu có tế bào nuôi thường thấy ở đa số loài động vật. Trong buồng trứng noãn bào thường kèm theo những tế bào đặc biệt đóng vai trò dinh dưỡng. Các tế bào này tạo một hay nhiều lớp giống như biểu mô bao lấy noãn bào. Ví dụ như ở động vật có vú, các nang bào bao quanh noãn bào hình thành nên các nang trứng. Các nang trứng trải qua các giai đoạn phát triển khác nhau cho tới khi rụng (hình 9.6). Ở côn trùng, buồng trứng cấu tạo gồm các ống trứng. Thành ống trứng như một lớp nang bào bao quanh lấy noãn bào đã lớn. Các nang bào có nguồn gốc xoma, tức là những tế bào thể. Ở một số lân nguyên phân cuối của noãn nguyên bào chỉ xảy ra sự chia nhân mà không chia hết tế bào chất và như vậy hình thành nên các cụm 8, 16 hoặc 32 noãn bào, trong đó 1 sẽ hình thành noãn bào còn 7, 15 hoặc 31 tế bào kia sẽ chỉ hình thành các tế bào nuôi. Số lượng tế bào có trong nhóm tùy thuộc vào loài côn trùng, ví dụ ở muỗi lắc là 2, muỗi sét là 8, Drosophila là 16... (hình 9.7).



Hình 9.6. Cấu tạo buồng trứng động vật có vú



Hình 9.7. Hệ sinh dục (a) và ống trứng (b) ở ong mật

## VI - GIAI ĐOẠN SINH SẢN CÁC NOĀN NGUYĒN BÀO

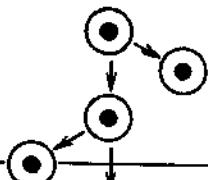
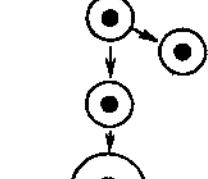
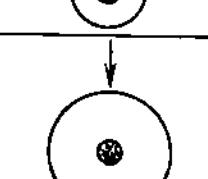
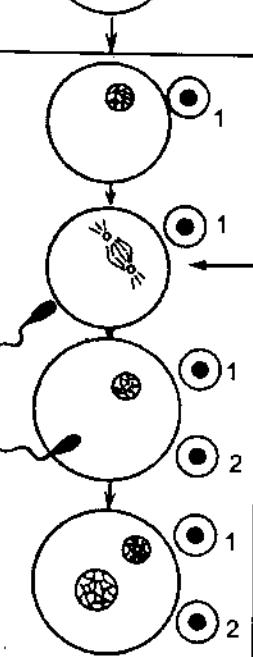
Ở phôi nữ tính (với kiểu nhân có hai nhiễm sắc thể X), sau khi di cư vào tuyến sinh dục, các tế bào sinh dục nguyên thuỷ trở thành các noãn nguyên bào và bước vào giai đoạn sinh sản. Giai đoạn này bắt đầu và kết thúc rất sớm ngay trong giai đoạn phát triển phôi. Ví dụ như ở chuột nhắt, các noãn nguyên bào kết thúc tăng sinh vào ngày phát triển phôi thứ 14. Ở người, giai đoạn sinh sản noãn nguyên bào bắt đầu từ tháng phát triển thứ hai và kéo dài khoảng 2-3 tháng. Sau nhiều lần phân chia nguyên nhiễm, số lượng noãn nguyên bào tăng lên rất lớn, ở người có thể đạt tới 7 triệu noãn nguyên bào. Sau giai đoạn sinh sản, các noãn nguyên bào chuyển sang giai đoạn tăng trưởng hay giai đoạn lớn và được gọi là noãn bào I. Như vậy ở động vật có vú, sau khi sinh thường đã không còn có các noãn nguyên bào và buồng trứng chỉ chứa các noãn bào I.

Giai đoạn sinh sản các noãn nguyên bào ở các động vật có xương sống bậc thấp cũng xảy ra vào giai đoạn ấu thê. Tuy nhiên do cá thường có sức sinh sản cao, mỗi lần đẻ có thể tới hàng triệu trứng, nên một số tác giả cho rằng phải có tăng sinh noãn nguyên bào cho mỗi lần sinh đẻ ở cơ thể trưởng thành.

## VII - GIAI ĐOẠN TĂNG TRƯỞNG NOĀN BÀO

Đây là giai đoạn chiếm một khoảng thời gian rất dài. Ví dụ như cá thể nữ ở người, giai đoạn này bắt đầu từ tháng phát triển thứ 5-6 trong bụng mẹ cho tới gần lúc rụng trứng. Như vậy nó kéo dài khoảng 13 năm đối với cái trứng rụng đầu tiên và khoảng

50-60 năm đối với cái trứng rụng cuối cùng. Ở giai đoạn này xảy ra sự tăng trưởng, tích lũy các chất dự trữ của noãn bào, đồng thời trong nhân diễn ra các biến đổi của chỉ tiền kỳ Meiose I. Do tiền kỳ Meiose I kéo trong một khoảng thời gian quá dài như vậy, sự hư hại trứng trong khoảng thời gian này có thể giải thích cho độ khuyết tật di truyền cao

Các giai đoạn phát triển	Các giai đoạn tạo noãn	Vị trí phân bố các tế bào sinh dục	Trạng thái các tế bào sinh dục
Trước sinh	Phôi		Bên ngoài mầm tuyến sinh dục Tăng sinh và di cư các tế bào sinh dục nguyên thuỷ
	Thai		Mầm tuyến sinh dục Tăng sinh noãn nguyên bào. Tiền kỳ giảm phân I noãn bào (từ leptonem → diplonem)
Sau sinh	Con non		Buồng trứng Giai đoạn diplohem. Giai đoạn tăng trưởng chậm noãn bào
	Trưởng thành		Giai đoạn tăng trưởng nhanh noãn bào. Thành thực noãn bào (hoàn thành chia giảm phân I) <b>RỤNG TRÚNG</b> (bắt đầu chia thành thực lần II) Phân thân của ống dẫn trứng Thụ tinh (hoàn thành chia thành thực lần II) Phân chia phân cắt hợp tử lần thứ nhất

Hình 9.8. Lịch trình quá trình tạo noãn, thành thực và thụ tinh ở động vật có vú

trong số các trẻ em sinh ra từ những người đàn bà luống tuổi. Ví dụ như trong số trẻ em sinh ra từ những người đàn bà trên 40 tuổi có tới 1% bị mắc chứng bệnh Đao (Down). Giai đoạn tăng trưởng noãn bào đặc biệt rõ rệt đối với các trứng giàu noãn hoàng. Trong trường hợp này thấy rõ hai phụ giai đoạn: giai đoạn lớn ít hay lớn tế bào chất và giai đoạn lớn nhiều hay giai đoạn tích luỹ các chất dự trữ. Ở giai đoạn lớn ít, kích thước noãn bào chỉ tăng lên đôi chút, trong giai đoạn này chủ yếu xảy ra hầu hết các diễn biến của tiền kỳ Meiose I. Đây là giai đoạn tương đối ngắn, ví dụ như ở chuột nhắt nó kéo dài 5 ngày, chuột cổng 10 ngày và ở thỏ là 20 ngày. Trong giai đoạn lớn nhiều kích thước noãn bào ở đa số động vật tăng lên một cách ghê gớm. Sự kéo dài của giai đoạn tăng trưởng chủ yếu là ở giai đoạn này. Nhân noãn bào nằm ở một giai đoạn gần cuối của tiền kỳ Meiose I là giai đoạn diplonem. Dưới đây ta quan sát chi tiết hơn hai loại diễn biến quan trọng trong giai đoạn tăng trưởng là các diễn biến trong nhân và sự tích luỹ các chất dự trữ.

**Bảng 9.2. Thời gian khác nhau về diễn biến các giai đoạn tạo noãn  
ở các động vật có vú khác nhau**

Loài	Sinh sản noãn nguyên bào	Tăng trưởng noãn bào		Thành thục noãn bào (giờ)
		Tiền kỳ giảm phân I	Dừng ở Diplonem	
Người	Thai 2-5 tháng	Thai 2,5-8 tháng	Từ thai 8-9 tháng đến thiếu niên 13,5- 14 tuổi	54-60
Khỉ	Thai 2-5 tháng	Thai 2-6 tháng	Từ thai 5 tháng đến khỉ con 2-3 tuổi	54-60
Khỉ bậc thấp	Suốt đời			
Chuột nhắt	Thai 10-14 ngày	Thai 14-20 ngày	Từ 2-3 ngày sau sinh tới 45 ngày sau sinh	16-20
Chuột cổng	Thai 14 -17 ngày	Thai 17,5 ngày, con non 4 ngày tuổi	5 ngày tuổi đến 45 ngày tuổi	16-20
Thỏ	Thai 14 ngày, con non 2 ngày tuổi	Con non 2 - 20 ngày tuổi	20 ngày tuổi đến 4-5 tháng tuổi	15-18

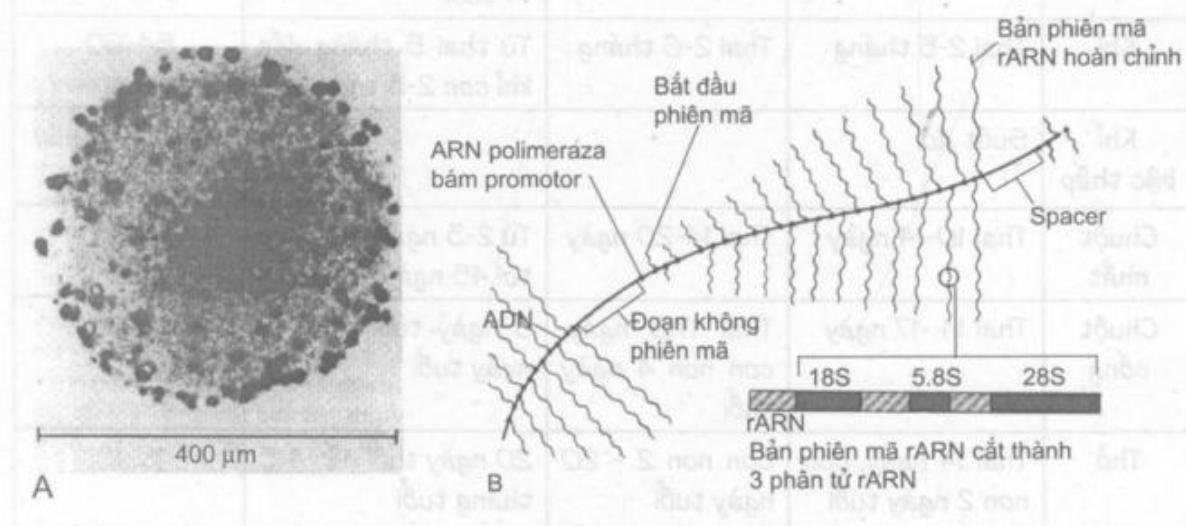
### 7.1. Những biến đổi của nhân noãn bào trong giai đoạn tăng trưởng

Như ở tinh bào I, nhân của noãn bào I cũng trải qua các giai đoạn đầu của tiền kỳ Meiose I một cách tương tự. Tức là qua các giai đoạn leptinem, zigonem, pakinem và diplonem. Điểm rất đặc biệt của quá trình tạo noãn là, khi bước sang giai đoạn lớn

nhiều; các nhiễm sắc thể trong lưỡng trì của diplonem chuyển sang giai đoạn mở xoắn và hoạt động tổng hợp. Chỉ riêng có trường hợp này nhiễm sắc thể đang phân chia mà có thể hoạt động tổng hợp. Có hai biểu hiện rõ rệt của hoạt động tổng hợp này, đó là sự nhân gen riboxom và sự xuất hiện các nhiễm sắc thể dạng đặc biệt, là nhiễm sắc thể kiểu chổi đèn.

### 7.1.1. Sự nhân các gen riboxom

Ở nhiều động vật, trong noãn bào với một thời gian ngắn tích luỹ được một số lượng khổng lồ riboxom. Hiện tượng đó gọi là sự nhân gen, sự khuếch bội hoặc sự xuất bản các gen. Sự nhân này được nghiên cứu kỹ ở lưỡng thê không đuôi và côn trùng. Trong miền tổ chức tiểu hạch, các gen riboxom nằm trong một phức hệ gồm các bộ gen nối tiếp nhau. Mỗi bộ gồm một gen ghi mã cho phân tử rARN 18S, tiếp là một đoạn intron, sau tới một gen cho rARN 5,8S, lại một đoạn intron và cuối cùng là một gen 28S. Có hàng vài trăm bộ lặp đi lặp lại nối tiếp nhau như vậy. Khi nhân gen, toàn bộ rADN được tái bản và bản sao tách khỏi nhiễm sắc thể, đi vào dịch nhân và hình thành các tiểu hạch tự do trong nhân. Ở noãn bào ếch *Xenopus laevis*, sự nhân gen riboxom bắt đầu rất sớm, ngay từ giai đoạn leptotene-zigotene và đặc biệt ở giai đoạn pakinom. Kết quả là hình thành thêm tới 1000 - 1500 tiểu hạch phụ. Cuối tạo noãn, các bản sao rADN bị phân huỷ và loại bỏ (cùng với sự tiêu biến tiểu hạch khi tế bào bước sang trung kỳ của phân chia).



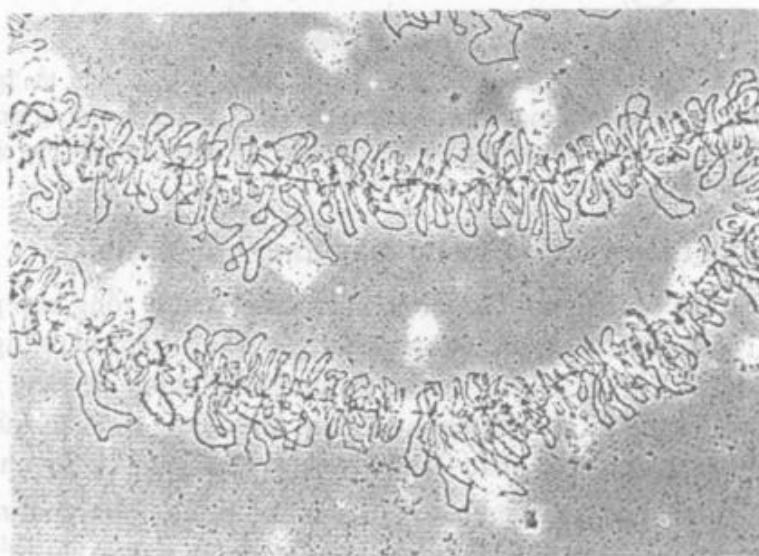
Hình 9.9 Sự nhân gen riboxom trong noãn bào ếch *Xenopus*

(A). Ảnh hiển vi quang học một nhân noãn bào ếch tách riêng. Mỗi chấm đen là một tiểu hạch, ở đây có tới 3000 tiểu hạch. (B) Hình vẽ giải thích hình các "cây thông Noel" thấy dưới kính hiển vi điện tử. Bản phiên mã của vô số các gen riboxom sẽ cắt ra để hình thành 3 loại phân tử rARN là 5,8S, 18S và 28S.

### 7.1.2. Các nhiễm sắc thể kiểu chổi đèn

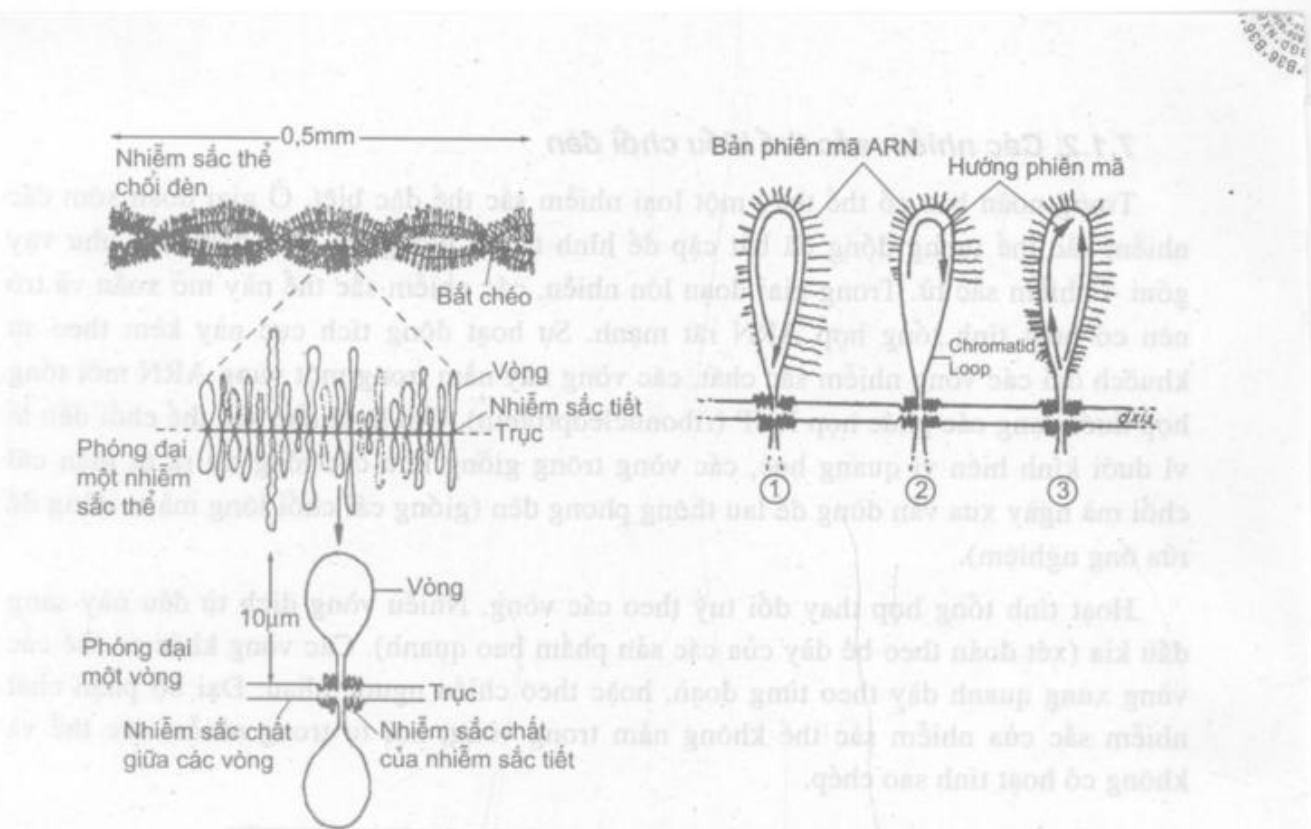
Trong noãn bào có thể thấy một loại nhiễm sắc thể đặc biệt. Ở giai đoạn sớm các nhiễm sắc thể tương đồng đã bắt cặp để hình thành lưỡng trị, mỗi lưỡng trị như vậy gồm 4 nhiễm sắc tử. Trong giai đoạn lớn nhiều, các nhiễm sắc thể này mở xoắn và trở nên có hoạt tính tổng hợp ARN rất mạnh. Sự hoạt động tích cực này kèm theo sự khuếch đại các vòng nhiễm sắc chất, các vòng này nằm trong một vùng ARN mới tổng hợp dưới dạng các phức hợp RNP (ribonucleoprotein). Gọi là nhiễm sắc thể chổi đèn là vì dưới kính hiển vi quang học, các vòng trông giống như các lông xù ra từ thân cái chổi mà ngày xưa vẫn dùng để lau thông phong đèn (giống cái chổi lông mà ta dùng để rửa ống nghiệm).

Hoạt tính tổng hợp thay đổi tùy theo các vòng. Nhiều vòng dịch từ đầu này sang đầu kia (xét đoán theo bề dày của các sản phẩm bao quanh). Các vòng khác có thể các vùng xung quanh dày theo từng đoạn, hoặc theo chiều ngược nhau. Đại bộ phận chất nhiễm sắc của nhiễm sắc thể không nằm trong vòng, hội tụ trong nhiễm sắc thể và không có hoạt tính sao chép.



Hình 9.10A. Nghiên cứu kiểu chổi đèn trong nhân noãn bào lưỡng thể

Sự phiên mã (transcription) ở các vòng của nhiễm sắc thể chổi đèn khác với ở các tế bào xoma. Thứ nhất là tất cả các vòng đều tổng hợp quá mạnh một cách không bình thường, và đa số cho ra các phiên bản quá dài. Hai là một số thứ tự ADN lặp cao độ không có hoạt động phiên mã ở các tế bào xoma thì lại được phiên mã ở một số vòng của nhiễm sắc thể chổi đèn. Những nghiên cứu gần đây cho biết là các nhiễm sắc thể chổi đèn có liên quan đến sự tăng cường hoạt động của các gen histon. Như ta biết trong quá trình phân cát sẽ phải hình thành rất nhiều nhiễm sắc thể, mà histon là thành phần không thể thiếu của nhiễm sắc thể.



Hình 9.10B. Sơ đồ cấu trúc nhiễm sắc thể chồi đèn

Ở lưỡng thể, nhiễm sắc thể chồi đèn có tất cả khoảng 10.000 vòng khác nhau, tồn tại song song với nhiều phần ADN hội tụ. Mỗi vòng có một thứ tự đặc biệt ADN. Mỗi nhiễm sắc tử tạo một bản và mỗi tế bào có 4 bản như vậy. Trạng thái 4 sợi đặc trưng cho giai đoạn phát triển này của noãn bào (Pha diplonem của kỳ trước)

## 7.2. Dự trữ các thành phần của bộ máy tổng hợp protein

Trong noãn bào đã lớn hết cỡ, các thành phần của bộ máy tổng hợp protein như các loại rARN, tARN và mARN có số lượng nhiều gấp hàng trăm nghìn lần so với xoma lưỡng bội. Khác với các tế bào xoma, chúng không được sử dụng ngay mà dự trữ cho phát triển phôi. Do để dự trữ nên chúng tồn tại dưới dạng các cấu trúc khác và được tổng hợp với một tương quan với nhau về số lượng và thời gian không chặt chẽ.

Như ở tế bào xoma, các riboxom hoạt động chỉ có trong polixom dưới dạng các hạt 80S, các riboxom không hoạt động bao giờ cũng phân ly thành hai tiểu đơn vị 40 và 60S. Các riboxom dự trữ có dạng hạt tự do 80S. Dạng dự trữ của 5S ARN và tARN là các nucleoprotein, trong khi đó các dạng hoạt động không có liên hệ chặt với protein.

90% toàn bộ 5S ARN và tARN được tổng hợp trong giai đoạn lớn ít. Sự tổng hợp mạnh rARN chỉ xảy ra trong giai đoạn lớn nhiều.

Trong thời gian tạo noãn mARN được tổng hợp với một số lượng lớn, một phần được sử dụng ngay, một phần được dự trữ lại. Việc nghiên cứu loại ARN này là rất cần thiết. Ngày nay người ta đã thu được nhiều kết quả trong nghiên cứu loại ARN này.

Trong tạo noãn còn được tổng hợp và dự trữ một số lượng lớn histon, điều mà không bao giờ xảy ra đối với tế bào xoma. Dự trữ nhiều protein riboxom, protein màng, tubulin và các protein noãn hoàng.

### 7.3. Sự tạo noãn hoàng

Một bộ phận nhỏ noãn hoàng được tạo nên từ những chất tổng hợp bên trong noãn bào, noãn hoàng đó gọi là noãn hoàng nội sinh. Noãn hoàng lắp ghép từ các bán thành phẩm từ ngoài vào gọi là noãn hoàng ngoại sinh.

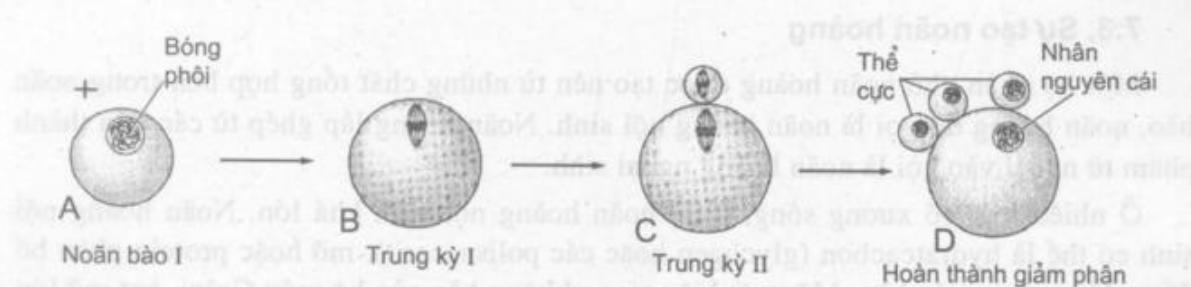
Ở nhiều loài có xương sống, tỷ lệ noãn hoàng nội sinh khá lớn. Noãn hoàng nội sinh có thể là hydratcacbon (glycogen hoặc các polisaccharit), mỡ hoặc protein phân bố đồng đều trong noãn bào. Mỡ xuất hiện trong không bào của bộ máy Golgi, hạt mỡ lớn dần, phình to thành giọt mỡ. Noãn hoàng protein xuất hiện trong liên hệ mật thiết với ty thể.

Noãn hoàng ngoại sinh thường được tổng hợp trong cơ thể con mẹ. Ở côn trùng, noãn hoàng được tổng hợp trong thể mỡ; ở tôm có trong tuỷ huyết, ở cá xương sống có trong gan. Các bán thành phẩm noãn hoàng theo máu đi qua các nang bào để vào noãn. Từ nang bào sang noãn bào, các chất được vận chuyển theo cơ chế tiết và ảm bào. Các nang bào phát sinh vô số các chồi tế bào chất về phía noãn bào, các chồi này cài rãng lược với các vi nhung phát ra từ noãn bào. Tuy nhiên giữa màng nang bào và màng noãn bào vẫn luôn tồn tại một khoảng không gian hẹp. Các chất từ nang bào được tiết vào xoang trung gian. Trên bề mặt noãn bào xuất hiện các hố lõm chứa các chất tiết từ nang bào, các hố lõm sẽ hình thành các bóng ảm bào (có kích thước 20-30nm). Các bóng này chìm sâu vào bào tương noãn bào, phối hợp với ty thể và bộ máy Golgi để tạo noãn hoàng. Sự tạo phiến noãn hoàng có thể xảy ra như sau: Phosvitin ở trạng thái hoà tan nếu chưa đủ độ phosphat hoá. Ở dạng này nó được tổng hợp trong gan cùng với lipovitelin. Khi vào noãn bào nhờ hệ enzym của ty thể, phosvitin được tiếp tục phosphat hoá, nó trở nên không tan nữa, dính với lipovitelin để tạo nên cấu trúc tinh thể lục giác của phiến noãn hoàng.

## VIII - SỰ THÀNH THỰC NOÃN BÀO

- Sau khi đạt tới kích thước cực đại, noãn bào chuyển sang một giai đoạn mới, đó là giai đoạn thành thực. Sự kiện này xảy ra dưới ảnh hưởng của các cơ chế điều chỉnh, có vai trò quan trọng là cơ chế thần kinh - hoocmon trong tương tác noãn bào với các tế bào xung quanh. Sự chuyển sang thời kỳ thành thực được thực hiện dưới ảnh hưởng của các hoocmon kích dục tố của thuỷ trước tuyến yên. Vào cuối giai đoạn lớn, noãn bào có khả năng phản ứng với các ảnh hưởng đó. Dưới tác động của kích dục tố, biểu mô nang sản sinh ra progesteron, chất này đi vào noãn bào và kích thích quá trình thành thực (hay quá trình chín). Quá trình thành thực được nghiên cứu kỹ ở lưỡng thê, cá và có vú, do đó ngày nay, người ta có thể gây chín noãn bào *in vitro* ngoài cơ thể.

Trong điều kiện tự nhiên, các hoocmon kích dục chỉ tiết vào máu vào những thời kỳ xác định của chu kỳ sinh sản. Vấn đề ở chỗ là con non phải được sinh ra vào thời điểm thuận lợi nhất về mọi mặt, nhiệt độ, oxy, thức ăn. Ở động vật sinh sản theo mùa, nó diễn ra vào trước thời đẻ trứng. Số nang chịu phản ứng phụ thuộc vào nồng độ hoocmon vào cơ thể và gây chín đồng loạt nhiều trứng.



Hình 9.11. Các loại ngừng giảm phân trước thụ tinh

(Không vỡ) : Meiosis ngừng ở giai đoạn noãn bào I non. Thuộc nhóm này có giun đốt *Histiobdella*, *Dinophilus* và *Saccocirus*, giun dẹp *Otomesostoma* và giun móc *Peripatopsis*.

A. Meiosis ngừng ở diakines của tiền kỳ I, trong noãn bào I đã lớn cực đại. Thuộc nhóm này chủ yếu là các động vật không xương sống như bọt biển *Grantia*, giun tròn *Ascaris*, giun đốt *Myzostoma*, *Nereis*, thân mềm *Spisula*, giun vòi *Thalassema*. Đặc biệt, thuộc nhóm này có ba loài động vật có vú là ngựa, chó và cáo.

B. Meiosis ngừng ở trung kỳ I. Loại này đặc trưng cho côn trùng, ngoài ra còn thấy ở một số giun nemertine *Cerebratulus*, giun đốt *Chetopterus*, thân mềm *Dentalium*, sao biển và *Ascidian*.

C. Ngừng ở trung kỳ II. Loại này đặc trưng cho tuyệt đại đa số động vật có xương sống.

D. Meiosis không bị phong tỏa. Trứng ngừng phát triển để chờ thụ tinh sau khi hoàn thành cả hai lần phân chia Meiosis. Thuộc loại này đại biểu là cầu gai, ngoài ra còn một số ruột túi (Hải quỳ) và da gai khác.

Trong noãn bào chuẩn bị thành thực, nhân có kích thước rất lớn và thường được gọi là bóng phôi (germinal vesicle). Nó có vị trí khác nhau trong noãn bào ở các loài khác nhau : ở trung tâm, lệch về cực động vật, lệch hẳn tới giữa bìa tế bào chất sát bề mặt trứng trên cực động vật. Sau khi tiếp nhận kích thích bởi các kích dục tố, nhân lại nhanh chóng tiếp tục các kỳ Meiosis. Các lưỡng trì hội tụ trở lại và qua giai đoạn cuối cùng của tiền kỳ là diakines. Đồng thời nhân di chuyển tới bề mặt trứng trên cực động vật, màng nhân vỡ ra, dịch nhân hoà vào tế bào chất, các lưỡng trì sắp xếp thành tấm trung kỳ của thoái phân chia. Thoái phân chia trực giao với bề mặt trứng. Sự phân ly các lưỡng trì xảy ra ở hậu kỳ. Sau mạt kỳ (Meiosis I) hình thành nên hai tế bào. Một gồm có nhân và một chút tế bào chất tách khỏi noãn bào và nằm ngoài màng sinh chất, nhưng ở trong màng noãn hoàng. Đó là thể cực thứ nhất. Tế bào thứ hai là noãn bào bậc hai. Các nhiễm sắc thể trong nhân noãn bào ngay lập tức phân bố thành tấm trung kỳ của lần phân chia thứ hai. Sự phân chia có thể diễn biến tiếp tục và ở hậu kỳ này xảy ra sự phân ly các nhiễm sắc thể ở bộ đơn bội (giống như phân bào nguyên nhiễm nhưng với số nhiễm sắc thể đơn bội). Sau mạt kỳ, thể cực thứ hai được hình thành và trứng thành thục.

Đồng thời với các diễn biến của nhân, trong tế bào chất cũng diễn ra những biến đổi. Trứng trở nên mọng nước, các phiến noãn hoàng trương nước và dần hòa tan vào nhau. Trứng trở nên trong hơn. Trong trứng xảy ra sự tăng áp suất nội bào, giảm tính thấm, lớp tế bào chất bì mặt trở nên có tính co giãn và xuất hiện khả năng phân chia.

Ở nhiều động vật, trong noãn bào vào giai đoạn cuối của tăng trưởng còn có tác nhân ức chế Meiosis, làm cho Meiosis ngừng lại ở các giai đoạn khác nhau trước khi thụ tinh. Như vậy, thụ tinh sẽ phải xảy ra vào các giai đoạn khác nhau của Meiosis và

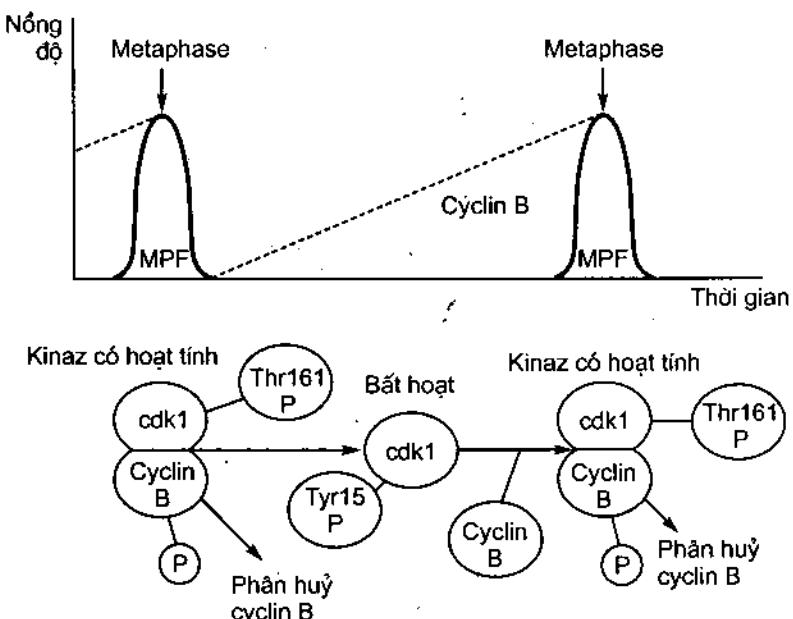
chỉ có thụ tinh mới giải toả được ức chế này. Người ta phân biệt 5 loại ngừng Meiosis ở các loài động vật khác nhau (hình 9.11).

## IX - QUÁ TRÌNH PHÂN TỬ TRONG THÀNH THỰC NOĂN BÀO

Trong quá trình thành thực noãn bào xảy ra các quá trình phân tử như sau (hình 9.12, 9.13). Dưới tác động của các kích dục tố, nang bào sinh progesteron tác động lên bề mặt noãn bào, có lẽ qua liên kết với các protein thụ thể trên màng (Blondeau and Baulieu, 1984). Đây là điều đặc biệt vì các steroid thường có các thụ thể trong tế bào chất. Sự thành thực diễn ra vài giờ sau tác động hoocmon.

Để phân tích tác động của progesteron lên sự thành thực noãn bào, Y. Matsui và C. Markert, 1971 đã lấy tế bào chất của noãn bào đã xử lý progesteron tiêm vào noãn bào lớn hết cỡ nhưng chưa thành thực. Họ thấy tế bào chất này có thể kích thích được thành thực. Họ cho rằng chúng chứa một chất gọi là *tác nhân kích thích thành thực* (Mature Promoting Factor). Sau này thấy đó chính cũng là tác nhân kích thích pha M (Mitosis Promoting Factor - MPF), một tác nhân có vai trò trung tâm trong kiểm soát chu trình tế bào xoma. Như vậy giải thoát noãn bào khỏi sự ngừng trong kỳ trước meiose-I cũng tương đồng với sự chuyển tế bào từ G2 vào M.

Ta hãy xem lại những nét chính trong việc điều chỉnh chu trình tế bào. Các tế bào khác nhau chia theo tốc độ khác nhau. Các tế bào đi qua chu kỳ được điều chỉnh bằng các enzym mà gọi là các *kinaz phụ thuộc cyclin*. Các enzym này có hoạt tính kinaz, có nghĩa là nó giúp gắn nhóm phosphat vào protein (phosphorin hoá). Chức năng này có vai trò tối quan trọng trong tế bào vì gắn phosphat sẽ làm thay đổi cấu hình lập thể của protein và do đó làm thay đổi hoạt tính của nó. Có nhiều loại kinaz với các tính chất khác nhau. Kinaz phụ thuộc cyclin



Hình 9.12. Sơ đồ minh họa chu kỳ tạo ra và phân huỷ tác nhân thúc đẩy pha M (cũng là tác nhân kích chin - MPF) trong chu kỳ tế bào

Vào lúc bắt đầu trung kỳ (pha M), protein cdk1 bị biến đổi và liên kết với một protein khác là cyclinB. Một cách đặc hiệu, cdk1 bị phosphorin hoá ở gốc threonine 161 và khử phosphoryl ở gốc tyroxin 15. Cyclin B được tổng hợp trong suốt chu kỳ bào và nhanh chóng phân huỷ bởi proteaza đặc hiệu ngay sau mỗi pha M. Khi liên kết với cdk1, cyclin B cũng được phosphorin hoá. Sau liên kết và biến đổi phức hệ cdk1-cyclin B (MPF) trở thành một kinaz hoạt động.

chỉ có hoạt tính khi liên kết với cyclin. *Cyclin* là một họ các protein, có tên như vậy vì số lượng chúng thay đổi theo các giai đoạn của chu kỳ tế bào. Ví dụ như cyclin B có nhiều trong gian kỳ nhưng lại bị phân huỷ và còn lại rất ít sau trung kỳ. Nấm men chỉ có 1 kinaz phụ thuộc cyclin và 1 cyclin ; động vật có vú có khoảng 5 kinaz phụ thuộc cyclin (cdk1-cdk5) và nhiều loại cyclin (Cyclin A → E). Các tổ hợp khác nhau điều khiển diễn tiến của tế bào đi qua các pha khác nhau của chu kỳ tế bào (Sherr, 1993).

Bước chuyển từ gian kỳ sang mitosis được kích hoạt bởi phức hệ protein mà được biết như MPF, bao gồm cdk1 và cyclinB (Hình 9.12). Để tạo một MPF có hoạt tính, cdk1 phải cùng một lúc được phosphorin hoá ở Threonin 161, dephosphorin hoá ở Tyrosin 15 và liên kết với cyclin B đã phosphorin hoá. Hoạt tính kinaz của MPF hoặc gián tiếp, hoặc trực tiếp gây nên các sự kiện dẫn đến tiền kỳ, kể cả sự hội tụ nhiễm sắc thể, vỡ màng nhân, tập hợp thoái. Ngay sau khi hoạt tính MPF đạt tới đỉnh điểm ở trung kỳ, cyclin B bị proteaza nhanh chóng phân huỷ, các giai đoạn diễn biến ngược chiều. MPF mất hoạt tính và tế bào chuyển sang gian kỳ tiếp theo.

Những tổ hợp khác của kinaz phụ thuộc cyclin với các cyclin sẽ điều chỉnh các bước khác trong chu kỳ tế bào. Ví dụ trong các tế bào động vật có vú, đỉnh cyclin E ở chỗ chuyển từ G1 sang S, và có lẽ phức hợp cdk2 với cyclin E kiểm soát khả năng tế bào động vật có vú đi vào pha S.

Sự kích hoạt có chu kỳ MPF bởi cdk1 trong liên kết với cyclin B là cơ chế cơ sở trong kiểm soát chu kỳ tế bào, cơ chế này cũng rất bảo thủ trong tiến hoá. Cdk1 của nấm men và người là rất giống nhau tới mức có thể hoạt động thay cho nhau và cyclin của trai và cầu gai hoạt động cả trong noãn bào ếch (Draetta et al., 1987). Tuy nhiên sự kiểm soát chu kỳ tế bào khá đa dạng ở các giai đoạn phát triển khác nhau cũng như ở các động vật khác nhau. (Whitaker and Patel, 1990 ; Muray, 1992). Ví dụ như sự bước vào pha M của các tế bào phôi được điều chỉnh bằng enzym khử phosphorin Tyr-15 trong cdk1. Tế bào trưởng thành lại có điểm kiểm soát khác : ADN chưa tái bản ức chế chu kỳ tế bào trước M, và sự vắng thoái vô sắc ức chế sự bước vào trung kỳ.

Trong noãn bào, MPF kích thích thành thực như thế nào ? Sự bám progesteron vào thụ thể màng kích thích lô trình chất truyền tin thứ hai (AMP vòng), chỉ đối với các noãn bào đã lớn hết cỡ (Taylor and Smith, 1987 ; L.D. Smith, 1989). Lô trình này có lẽ khởi sự một số phản ứng phối hợp để kích thích thành thực trứng. Lô trình bắt đầu bằng tổng hợp protein vì cycloheximide ức chế thành thực nếu tác động liên ngay sau xử lý progesteron.

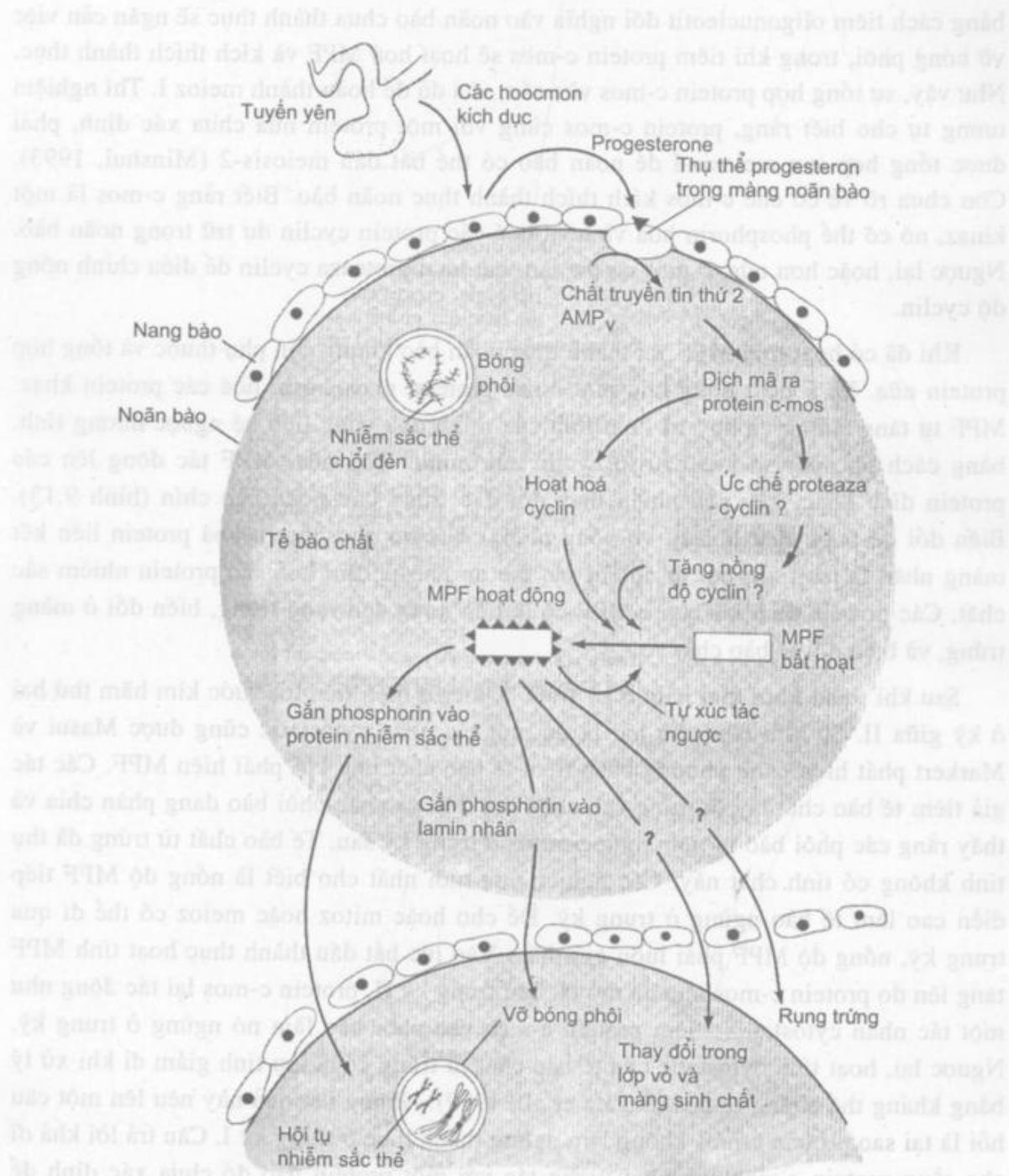
Một trong các protein này là c-mos, do gen *c-mos* proto-oncogen, là một gen mà nếu bị điều chỉnh sai sẽ gây ung thư. mRNA của *c-mos* luôn tồn tại trong suốt quá trình tạo noãn và phát triển phôi sớm, nhưng protein c-mos chỉ thấy trong trứng đang thành thực và bị phân huỷ sau thụ tinh. Với sự có mặt ngắn ngủi như vậy nhưng protein này có vai trò quan trọng trong việc giải phóng noãn bào khỏi trạng thái ngủ (Sagata et al., 1988, 1989 ; Watanabe et al., 1989 Yew et al., 1992). Ức chế dịch mã từ mRNA c-mos

bằng cách tiêm oligonucleotit đổi nghĩa vào noãn bào chưa thành thục sẽ ngăn cản việc vỡ bóng phôi, trong khi tiêm protein c-mos sẽ hoạt hoá MPF và kích thích thành thục. Như vậy, sự tổng hợp protein c-mos vừa cần, vừa đủ để hoàn thành meioz I. Thí nghiệm tương tự cho biết rằng, protein c-mos cùng với một protein nữa chưa xác định, phải được tổng hợp sau meiosis-I để noãn bào có thể bắt đầu meiosis-2 (Minshull, 1993). Còn chưa rõ về cơ chế c-mos kích thích thành thục noãn bào. Biết rằng c-mos là một kinaz, nó có thể phosphorin hoá và hoạt hoá các protein cyclin dự trữ trong noãn bào. Ngược lại, hoặc hơn nữa, c-mos có thể làm bất hoạt proteaza cyclin để điều chỉnh nồng độ cyclin.

Khi đã có hoạt tính MPF, sự thành thục noãn bào không còn phụ thuộc và tổng hợp protein nữa. MPF hoạt động như một kinaz protein, phosphorin hoá các protein khác. MPF tự tăng cường và duy trì hoạt tính của mình qua vòng liên hệ ngược dương tính, bằng cách phosphorin hoá cấu tử cyclin của mình. Hơn nữa, MPF tác động lên các protein đích khác, gây nên nhiều thay đổi đặc trưng cho noãn bào chín (hình 9.13). Biến đổi dễ thấy nhất là : sự vỡ bóng phôi, có lẽ do phosphorin hoá protein liên kết màng nhân là *laminin*, hội tụ nhiễm sắc thể do phosphorin hoá các protein nhiễm sắc chất. Các protein đích khác của MPF có lẽ liên quan đến rụng trứng, biến đổi ở màng trứng, và biến đổi tế bào chất vỏ.

Sau khi thoát khỏi kìm hãm ở kỳ trước I, meioz diễn tiến tới bước kìm hãm thứ hai ở kỳ giữa II. Sự kìm hãm thứ hai là do một tác nhân cytostatic cũng được Masui và Markert phát hiện bằng phương pháp tiêm tế bào chất như khi phát hiện MPF. Các tác giả tiêm tế bào chất lấy từ trứng ếch chưa thụ tinh vào các phôi bào đang phân chia và thấy rằng các phôi bào bị tiêm ngừng mitoz ở trung kỳ sau. Tế bào chất từ trứng đã thụ tinh không có tính chất này. Các nghiên cứu mới nhất cho biết là nồng độ MPF tiếp diễn cao làm tế bào ngừng ở trung kỳ. Để cho hoạc mitoz hoặc meioz có thể đi qua trung kỳ, nồng độ MPF phải luôn giữ thấp. Vào lúc bắt đầu thành thục hoạt tính MPF tăng lên do protein c-mos như đã mô tả. Sau trung kỳ II, protein c-mos lại tác động như một tác nhân cytostatic : tiêm protein c-mos vào phôi bào làm nó ngừng ở trung kỳ. Ngược lại, hoạt tính cytostatic của tế bào chất từ trứng chưa thụ tinh giảm đi khi xử lý bằng kháng thể chống c-mos (Sagata et al., 1989). Những kết quả này nêu lên một câu hỏi là tại sao protein c-mos không làm ngừng thành thục ở trung kỳ I. Câu trả lời khả dĩ cho rằng protein c-mos cần phải tương tác với một protein nào đó chưa xác định để sinh ra hoạt tính cytostatic (Minshull, 1993).

Thường thụ tinh giải tỏa sự ức chế trứng khỏi trung kỳ II. Một trong các phản ứng với sự xâm nhập của tinh trùng là sự tăng nồng độ ion canxi tự do trong noãn bào chất. Người ta cho rằng hoạt tính protein phụ thuộc  $Ca^{2+}$  sẽ phá huỷ cả MPF lẫn protein c-mos và như thế cho phép trứng thoát khỏi trung kỳ II để bắt đầu các chu kỳ mitosis của phân cát.



Hình 9.13. Mô hình thành thục noãn bào ở lưỡng thê

Sự bám progesteron vào thụ thể màng kích thích lộ trình chất truyền tin thứ hai (AMP vòng), gây dịch mã mRNA c-mos (dự trữ trong tế bào chất) thành protein c-mos. Do c-mos là một kinaz protein, nó gắn phosphorin vào cyclin và hoạt hóa cyclin. Protein c-mos còn có thể làm bất hoạt các proteaza cyclin, làm tăng nồng độ cyclin và làm tăng hoạt tính MPF. MPF gây gắn phosphorin vào protein màng nhân gây võ màng nhân, vào protein nhiễm sắc thể gây hội tụ nhiễm sắc thể.

## X - SỰ RỤNG TRỨNG

Sự thoát khỏi buồng trứng gọi là "sự rụng trứng". Nó được điều khiển bằng cơ chế thần kinh - thể dịch và kèm theo các biến đổi về hành vi con mẹ để đảm bảo cho sự thụ tinh và phát triển trứng sau đó. Sự rụng trứng xảy ra do có thay đổi trong tương quan FSH và LH (Follicle Stimulating Hormone và Luteinizing Hormone) trong máu con vật. Có lẽ chủ yếu là do tăng lượng LH, vì tiêm LH có thể gây rụng trứng trước thời hạn.

Do sự thay đổi cơ chế hoocmon, phần nang lồi ra ngoài buồng trứng bị biến đổi. Sự teo của các mạch máu, sự căng mỏng thành nang tạo nên một khu vực có dạng dải hẹp gọi là stigma. Ở đây xảy ra sự thoái hoá tế bào dẫn tới sự vỡ nang và giải thoát trứng vào xoang bụng.

Trứng rụng và chờ thụ tinh khi đã tăng trưởng cực đại và đã có các biểu hiện chín muồi. Khi rụng, nhân của trứng nằm ở giai đoạn bị ức chế đặc trưng cho từng loài như đã mô tả bên trên.

Mặc dù người ta chưa biết chi tiết về cơ chế rụng trứng, sự đẩy cơ học noãn bào chín ra khỏi nang trứng có lẽ do sự tăng LH làm tăng hoạt tính collagenaza, hoạt hoá plasminogen (profibrinolysin) và prostaglandin bên trong nang trứng (Lemaire et al. 1987). mRNA của chất hoạt hoá plasminogen nằm ngủ trong tế bào chất noãn bào. LH làm cho mRNA này gắn thêm đuôi poliadenin và dịch mã thành một proteaza mạnh (Huarte et al. 1987). Prostaglandin có thể gây co cơ trơn cục bộ làm nước từ mao mạch đi vào xoang nang gây tăng áp lực (Diaz-Infante et al. 1974 ; Kooş & Klark 1982). Nếu ức chế tổng hợp prostaglandin trong buồng trứng, rụng trứng không thể xảy ra được. Hơn nữa, collagenaza và proteaza hoạt hoá plasminogen làm thưa và tiêu huỷ khuôn ngoại bào của nang (Beers et al. 1975 ; Downs & Longgo 1983). Sự tác động đó làm phá huỷ thành nang cộng với sự tăng áp lực xoang nang làm cho trứng bật ra ngoài.

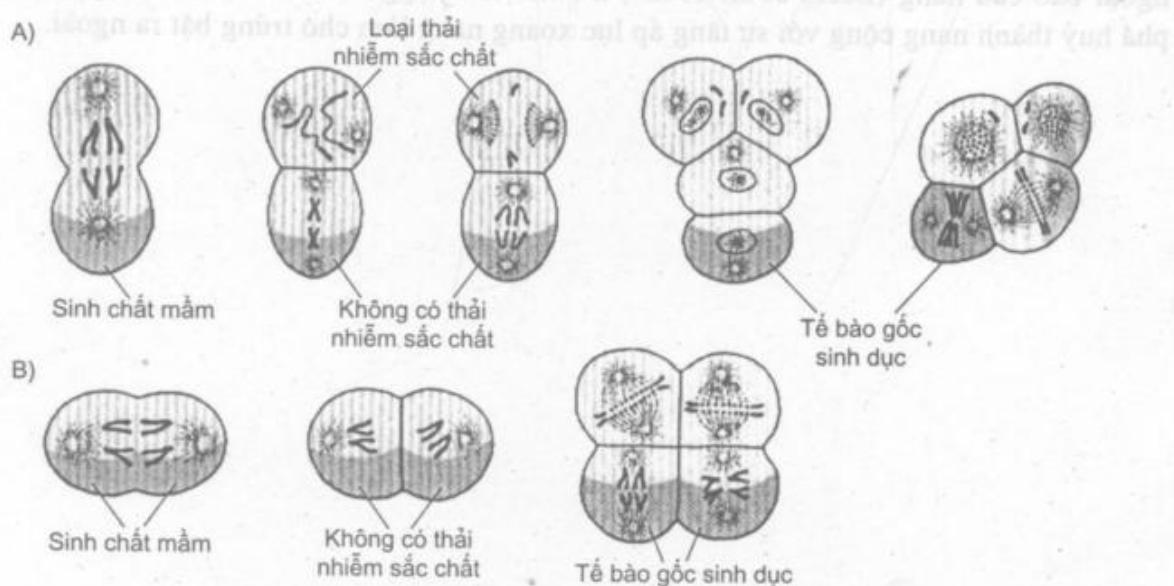
## Chương 10

### TẾ BÀO GỐC SINH DỤC

Như ta đã biết, có 3 nguồn tế bào gốc : Từ nút phôi, từ tuyến sinh dục phôi và từ u quái. Các tế bào gốc từ tuyến sinh dục phôi chính là những tế bào sinh dục nguyên thuỷ. Có được công nghệ này là nhờ vào tri thức đã tích luỹ từ hàng trăm năm trước về tế bào sinh dục nguyên thuỷ. Người ta có thể nhận biết các tế bào sinh dục nguyên thuỷ từ rất sớm, ngay từ giai đoạn phân cát.

#### I - TẾ BÀO SINH DỤC NGUYÊN THUỶ Ở ĐỘNG VẬT KHÔNG XƯƠNG SỐNG

Boveri, trong các nghiên cứu của mình (1899-1910) đã theo dõi được sự hình thành các tế bào sinh dục ngay từ hợp tử ascarid nhờ nó chứa những hạt đặc biệt gọi là những *hạt nâu*. Trong phân chia thứ nhất, do mặt phẳng phân chia đi theo xích đạo nên chỉ tế bào phía cực thực vật là chứa các *hạt nâu*. Ở phôi bào này không có biến đổi về nhiễm sắc thể, còn ở phôi bào kia xảy ra hiện tượng gọi là *sự thải nhiễm sắc chất*. Trong lần phân chia tiếp theo, hai đoạn đầu mút nhiễm sắc thể bị đứt ra, bị đẩy ra ngoài tế bào chất và rồi tiêu biến, còn đoạn giữa thì phân ra thành các đoạn nhỏ. Hiện tượng thải nhiễm sắc chất tiếp diễn ở các lần phân chia sau trong các tế bào không chứa hạt nâu.

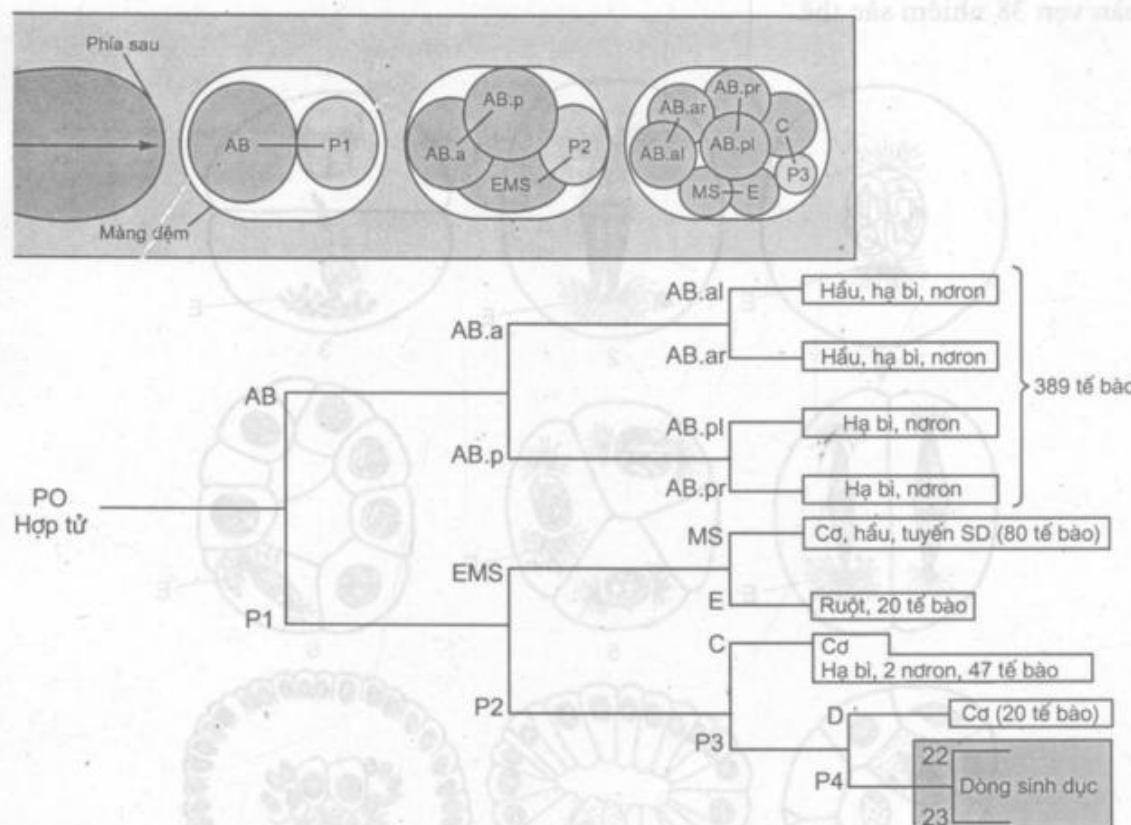


Hình 10.1. Sự loại thải nhiễm sắc chất ở giun tròn *Ascaris melanogaster*

Những tế bào chứa sinh chất mầm sẽ không bị loại thải nhiễm sắc chất và ở lần phân chia thứ 5 khi có 32 tế bào sẽ có 2 tế bào thuỷ tổ của tất cả các tế bào sinh dục của cơ thể. (Theo Gilbert, 2000)

Sau lần phân chia thứ tư khi phôi bào có 16 phôi bào, trong một tế bào sự phân bố hạt nâu có lẽ là đồng đều (hình 10.1A). Do đó ở giai đoạn 32 phôi bào, có hai phôi bào không có thai nhiễm sắc chất và ở các lần phân chia sau, con cháu hai phôi bào này cũng không có thai nhiễm sắc chất nữa (hình 11.1B). Qua theo dõi người ta biết chúng là thuỷ tổ của tất cả các tế bào sinh dục có trong cơ thể. Chúng có kích thước lớn hơn các tế bào khác và người ta gọi chúng là các tế bào sinh dục nguyên thuỷ. Trong quá trình phát triển, chúng di chuyển tới thành ruột, và sau đó vào các tuyến sinh dục để rồi phát triển thành các giao tử.

Ở *Caenorhabditis elegans*, trong trứng chưa thụ tinh có các hạt gọi là hạt P phân đều trong tế bào chất. Ngay trước phân cát tất cả chúng di chuyển về một phía và sau phân cát chỉ có trong một phôi bào. Trong một số lần chia sau cũng xảy ra hiện tượng tương tự. Chỉ khi tế bào chứa chúng đủ nhỏ và các hạt phân bố đồng đều thì các tế bào chứa chúng trở nên các tế bào sinh dục nguyên thuỷ, và là thuỷ tổ của tất cả các tế bào sinh dục.

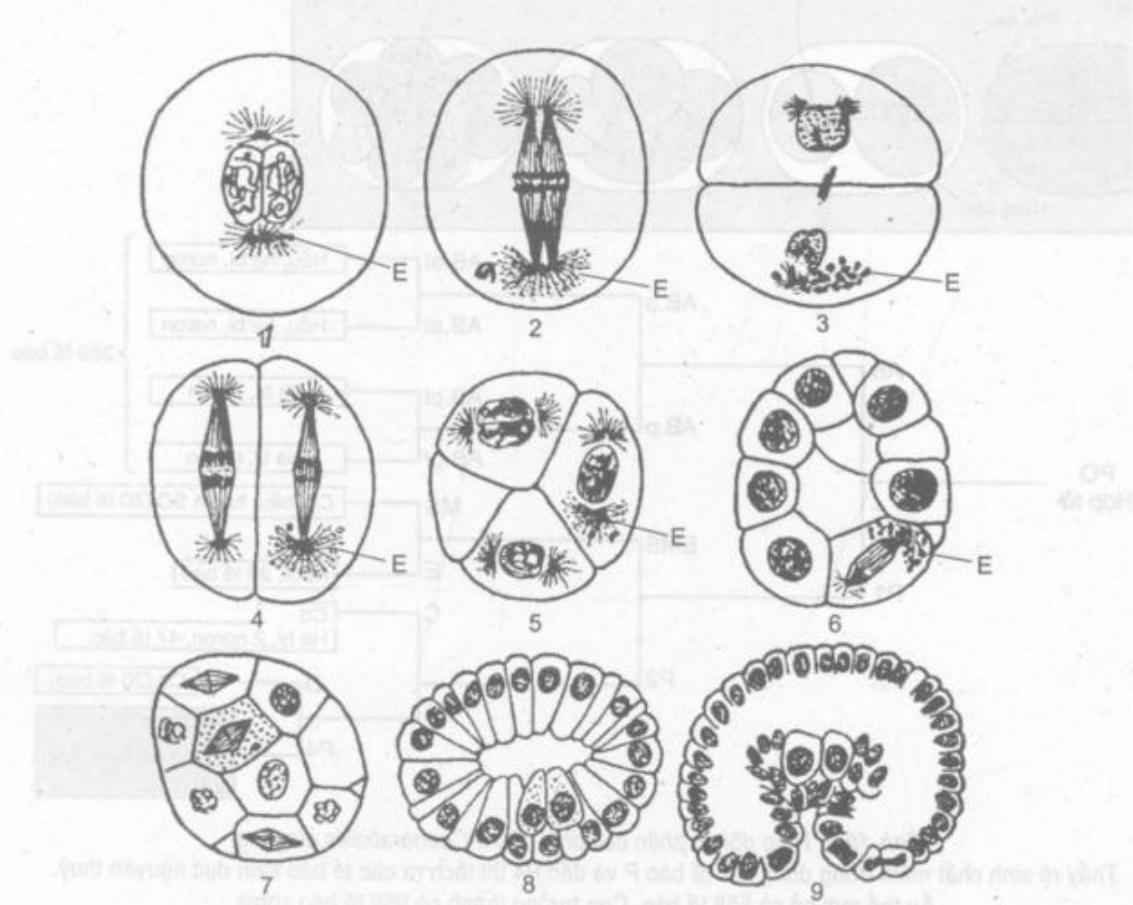


**Hình 10.2. Theo dõi số phận các phôi bào ở *Caenorhabditis elegans***  
Thấy rõ sinh chất mầm trong dòng các tế bào P và đến P4 thì tách ra các tế bào sinh dục nguyên thuỷ.  
Ấu thể mới nở có 558 tế bào. Con trưởng thành có 959 tế bào xoma

Ở loài giáp xác Cyclops, các tế bào sinh dục nguyên thuỷ cũng có thể được phát hiện và theo dõi từ giai đoạn rất sớm theo một loại hạt đặc biệt có trong các tế bào này. Các hạt này gọi là các ectoxom. Và cũng như hạt nâu, hoặc các hạt nói chung có liên

quan tới sự biệt hoá các tế bào sinh dục nguyên thuỷ, người ta gọi là các quyết định tố sinh dục. Ở Cyclops, trong các phân chia đầu tiên, các hạt ectoxom chỉ đi vào một tế bào, và chỉ ở lần phân chia thứ sáu mới phân bố ở hai tế bào, đó chính là hai tế bào thuỷ tổ của tất cả các tế bào sinh dục của cơ thể. Chúng có kích thước và hình thái khác với các tế bào khác và như ở hình 5 chúng nằm ở phần lõm vào đầu tiên của nội bì (hình 10.3).

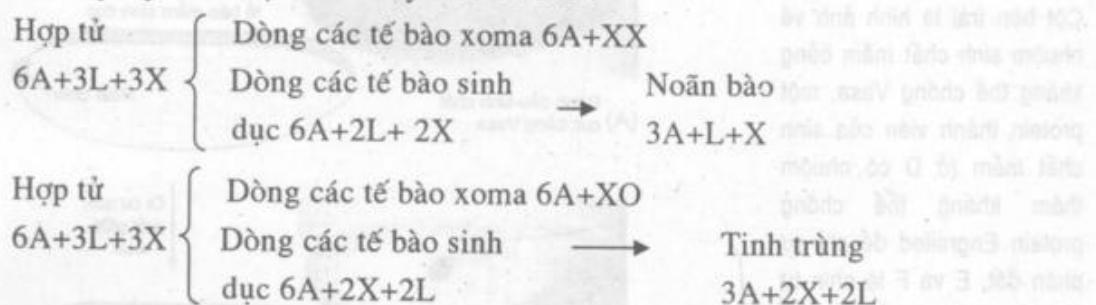
Sự phân ly sớm hai dòng tế bào xoma và sinh dục thấy rõ ở nhiều loài côn trùng. Sự sai khác ở đây còn biểu hiện ở chỗ dòng sinh dục thì giữ nguyên số nhiễm sắc thể, còn dòng xoma thì trong các tế bào xảy ra sự loại thải nhiều nhiễm sắc thể ra khỏi bộ gen. Geyer-Duszynska (1959) khi nghiên cứu loài nhặng *Wachtiellia persicariae* đã nhận thấy ở vùng cực thực vật, đối lập với vị trí các thể cực, có vùng tế bào chất có cấu tạo dạng lưới, trong ô lưới có các hạt bắt màu hematoxylin. Ở thời kỳ phân chia thứ tư, trong số 8 nhân, ở 7 nhân xoma xảy ra sự thải loại 30 nhiễm sắc thể ra khỏi nhân. Chỉ ở một nhân mà rơi vào vùng cực (sẽ hình thành tế bào sinh dục) là còn toàn vẹn 38 nhiễm sắc thể.



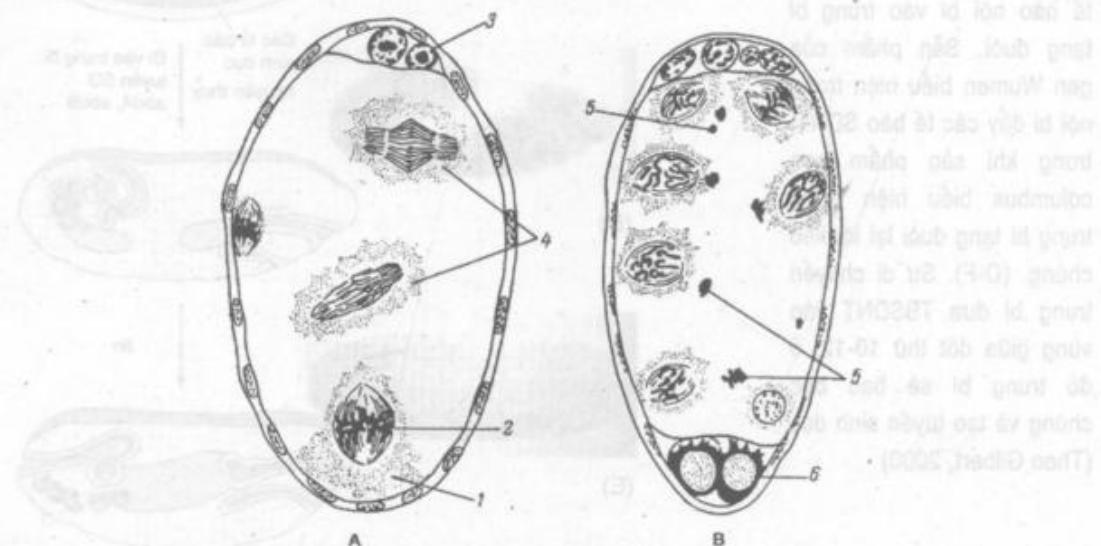
Hình 10.3. Quyết định tố sinh dục ở Copepoda cyclops

1. Dung hợp hai nhân nguyên đực và cái ; 2-6. Phân cát hợp tử (ectoxom- E chỉ có trong 1 tế bào)
7. Ectoxom phân cho 2 tế bào ; 8-9. Tạo phôi vị, thấy rõ các tế bào sinh dục nguyên thuỷ.

Theo Du Bois (1932, 1933) loài muỗi nấm *Sciara coprophila* ở tất cả hợp tử đực và cái đều có kiểu nhân  $6A+3X+3L$ , tức 6 otoxom, 3 nhiễm sắc thể giới tính và 3 nhiễm sắc thể chuyên bị loại thải (ký hiệu L từ chữ limited là bị loại bỏ). Chu kỳ nhiễm sắc thể ở *S. coprophila* được trình bày ở sơ đồ sau :



Đây là ví dụ điển hình về sự tách nhau sớm của hai dòng thể (xoma) và dòng sinh (sinh dục), chúng tách nhau ở lần phân chia thứ tư của hợp tử, tức là giai đoạn 8 nhân. Ở đây thấy sự khác biệt rất rõ rệt giữa hai dòng này. Nếu như theo Weismann, bào tương mầm nằm trong nhiễm sắc thể thì ở đây rõ ràng là có sự phân chia không đều bào tương mầm, và chắc chắn là các tế bào xoma dù ở cơ thể đực hay cơ thể cái đều chứa không đủ thông tin cần thiết cho sự hình thành giao tử và giai đoạn phát triển đầu tiên của hợp tử.



Hình 10.4. Thải nhiễm sắc thể ở *Myastor metraloas*

A. Giai đoạn nguyên phân lần thứ nhất dòng nhân sinh dục ;

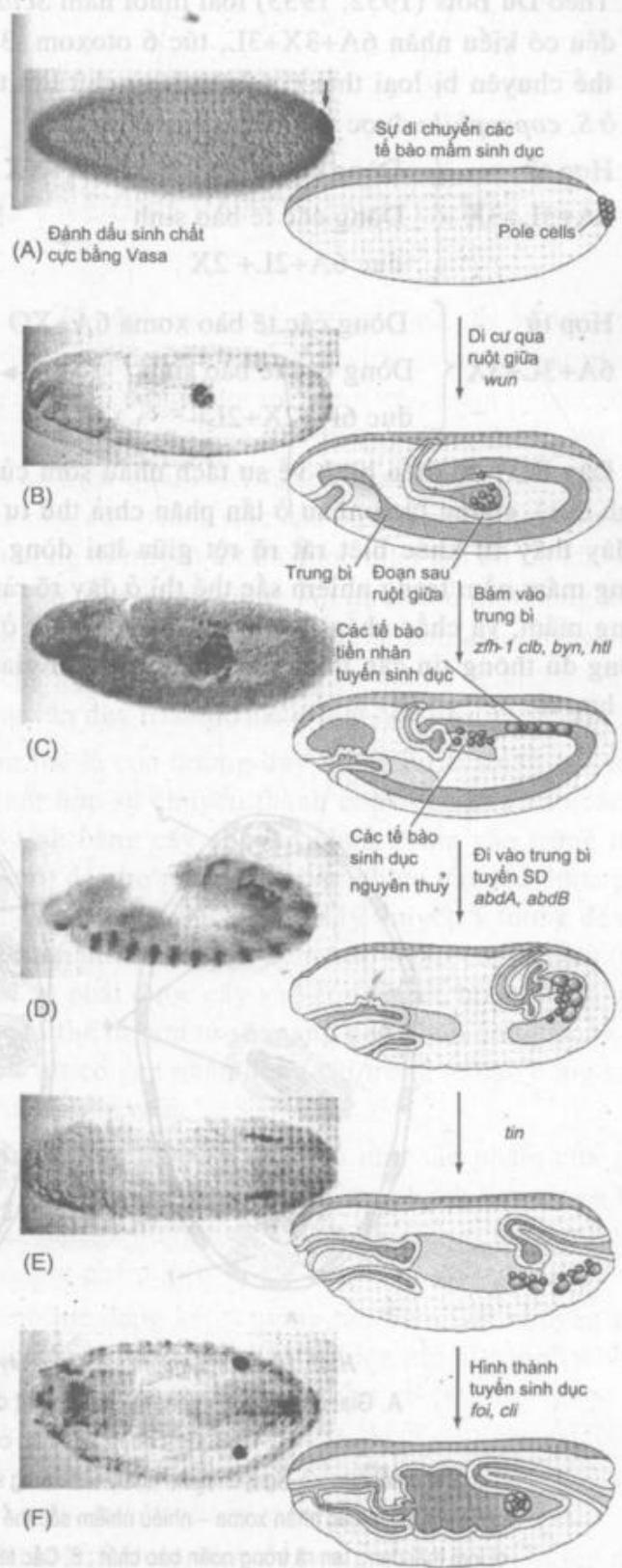
B. Giai đoạn 2 tế bào cực.

1. Sinh chất cực ; 2. Nguyên phân nhân nằm trong sinh chất cực ; 3. Các thể cực ;
4. Nguyên phân các nhân xoma – nhiều nhiễm sắc thể bị loại thải ; 5. Các nhiễm sắc thể bị loại thải đang tan rã trong noãn bào chất ; 6. Các tế bào cực (sinh dục nguyên thuỷ)

(Theo Kahle, 1908)

Hình 10.5. Di cư các tế bào mầm ở phôi Ruồi giấm

Cột bên trái là hình ảnh về nhuộm sinh chất mầm bằng kháng thể chống Vasa, một protein thành viên của sinh chất mầm (ở D có nhuộm thêm kháng thể chống protein Engrailed để chỉ sự phân đốt, E và F là nhìn từ phía lưng). Bên phải là sơ đồ về sự di chuyển các tế bào sinh dục nguyên thuỷ. (A) Các tế bào mầm xuất xứ từ sinh chất cực ở đầu sau của trứng. (B). Sự di chuyển thụ động mang các tế bào sinh dục nguyên thuỷ (TBSDNT) vào phần sau của ruột giữa. (C). TBSDNT lách qua các tế bào nội bì vào trung bì tạng đuôi. Sản phẩm của gen Wumen biểu hiện trong nội bì đẩy các tế bào SDNT, trong khi sản phẩm gen columbus biểu hiện trong trung bì tạng đuôi lại lôi kéo chúng. (D-F). Sự di chuyển trung bì đưa TBSDNT vào vùng giữa đốt thứ 10-12, ở đó trung bì sẽ bao bọc chúng và tạo tuyến sinh dục (Theo Gilbert, 2000)

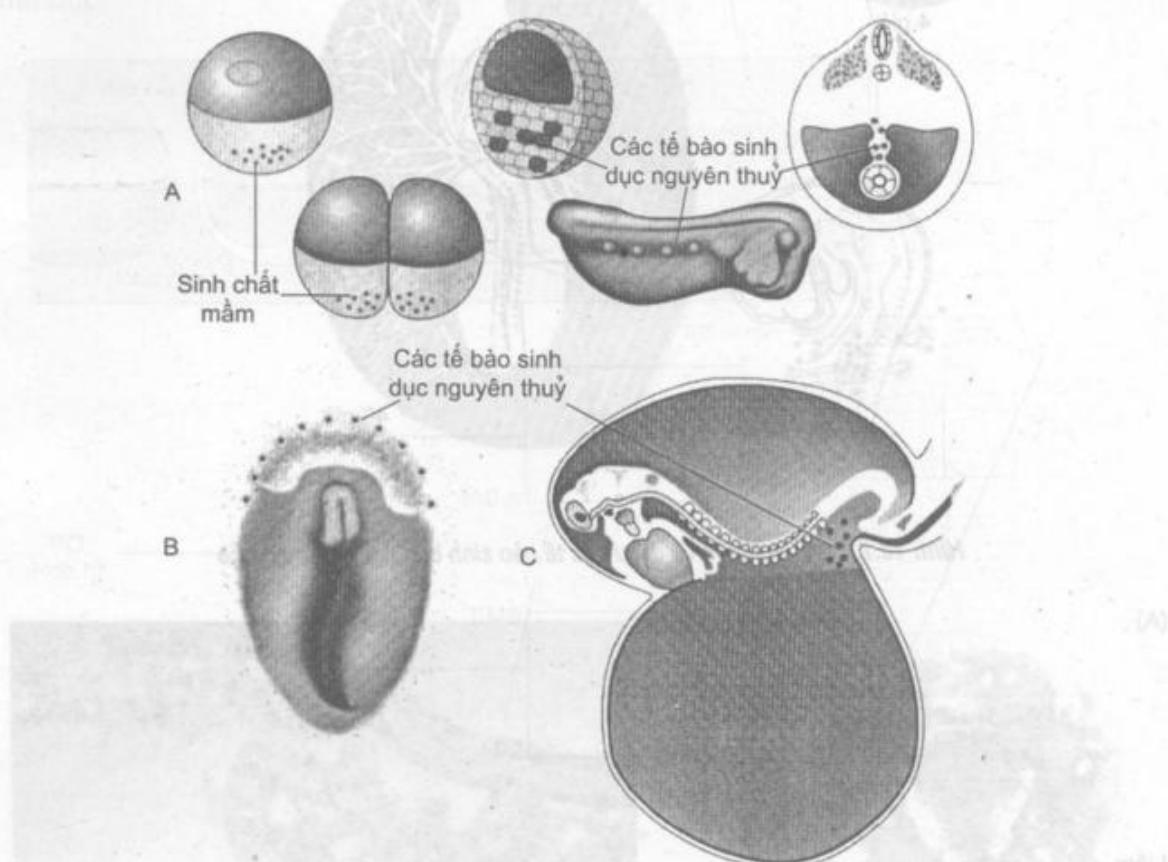


## II - TẾ BÀO SINH DỤC NGUYÊN THUỶ Ở ĐỘNG VẬT CÓ XƯƠNG SỐNG

Ở các động vật bậc cao, như lưỡng thê, chim và có vú người ta cũng theo dõi được các tế bào sinh dục nguyên thuỷ từ các giai đoạn phát triển sớm.

Ở lưỡng thê, tế bào chất sinh dục (còn gọi là các quyết định tố sinh dục) phân bố ở vùng cực thực vật. Sau phân cắt, các tế bào nào chứa tế bào chất này sẽ là các tế bào sinh dục nguyên thuỷ, các tế bào này luôn nằm ở những khu vực ít hoạt tính, chủ yếu là ở nội bì đáy ruột. Sau này chúng di cư vào tuyến sinh dục và phát triển thành các giao tử.

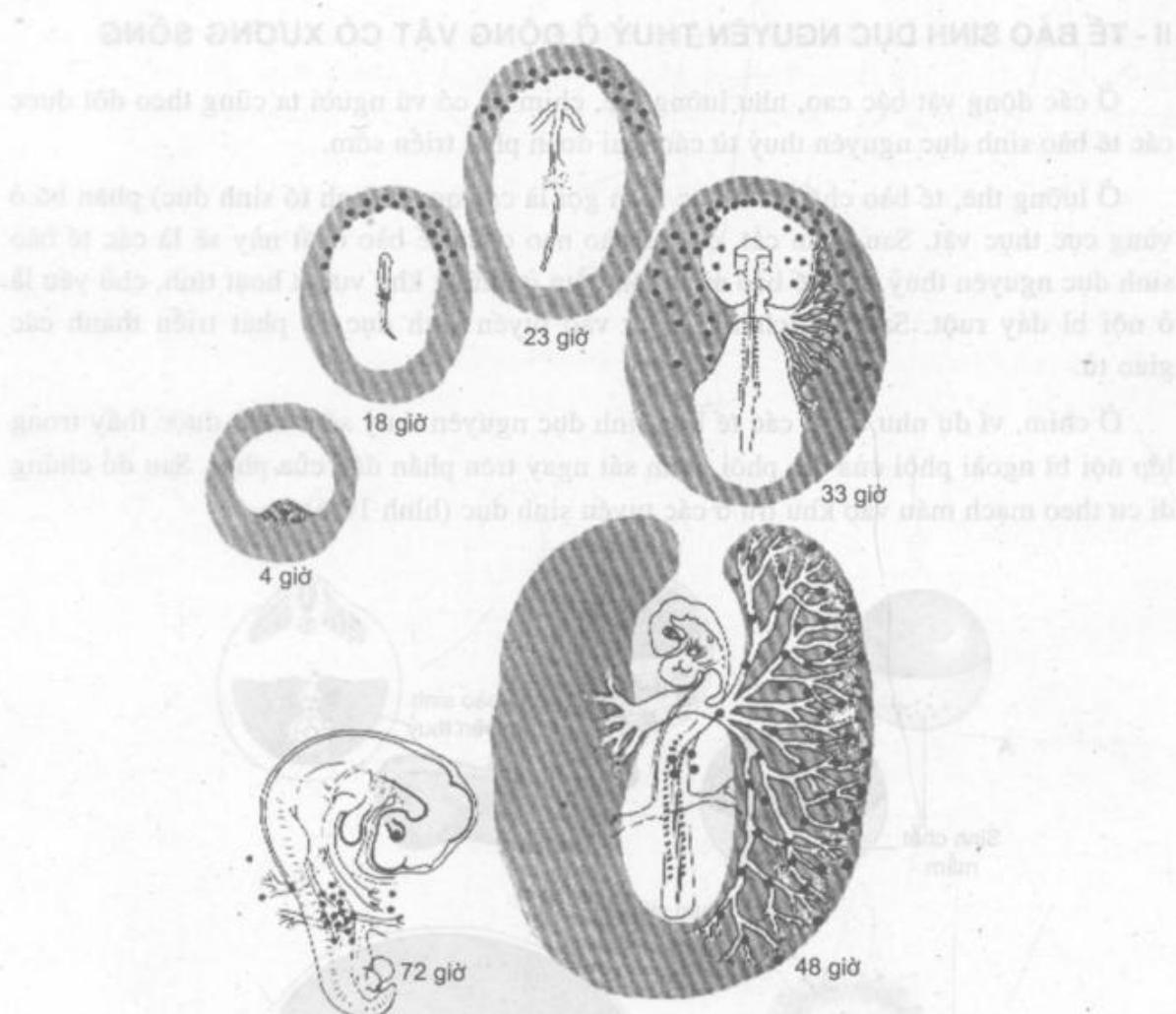
Ở chim, ví dụ như ở gà, các tế bào sinh dục nguyên thuỷ sớm nhất được thấy trong lớp nội bì ngoài phôi của đĩa phôi, nằm sát ngay trên phần đầu của phôi. Sau đó chúng di cư theo mạch máu vào khu trú ở các tuyến sinh dục (hình 10.6).



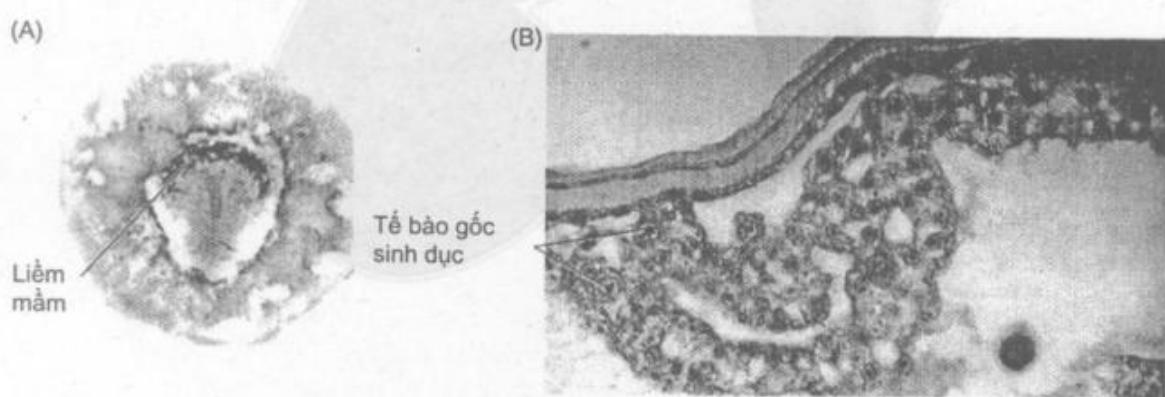
Hình 10.6. Các tế bào sinh dục nguyên thuỷ ở cá cóc, gà và người

Các tế bào sinh dục nguyên thuỷ trong lưỡng thê có đuôi (A), trong liêm mầm phôi gà (B),

trong thành sau túi noãn hoàng phôi 16 thể tiết người (C).



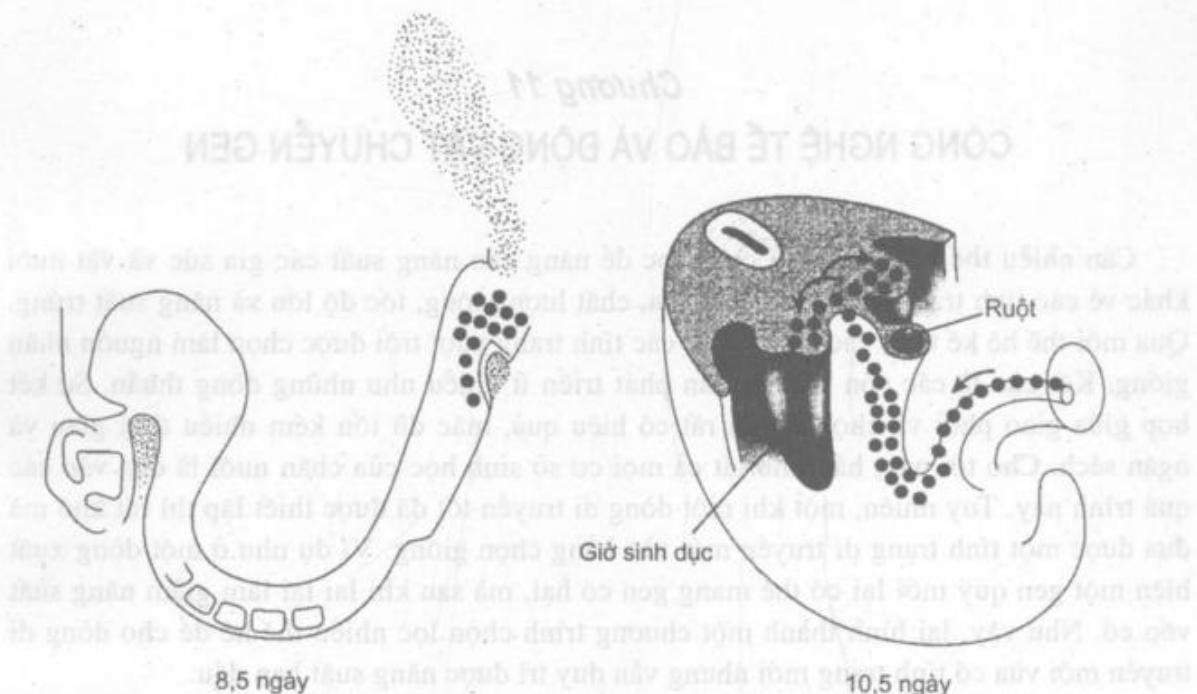
Hình 10.7. Sự hình thành và di cư các tế bào sinh dục nguyên thuỷ ở gà



Hình 10.8. Các tế bào sinh dục nguyên thuỷ ở gà

Ở động vật có vú người ta cũng phát hiện được các tế bào sinh dục nguyên thuỷ, với kích cỡ lớn và giàu phosphataza kiềm, trong nội bì phía đuôi của phôi. Chúng di cư

từ nội bì túi noãn hoàng, qua nội bì ruột sau, qua mạc treo ruột vào mầm các tuyến sinh dục (hình 10.9).



Hình 10.9. Sự xuất hiện và di cư các tế bào sinh dục nguyên thuỷ ở chuột nhắt (Theo A. Nagy và CS, 2003)

Có rất nhiều nghiên cứu về các tế bào sinh dục nguyên thuỷ. Từ các nghiên cứu hình thái tới các nghiên cứu thực nghiệm. Các thí nghiệm phá huỷ tế bào này, thí nghiệm thay thế các tế bào này bằng các tế bào có cơ cấu di truyền khác. Các thí nghiệm chứng tỏ có sự lôi kéo những tế bào này tới tuyến sinh dục theo khuynh hướng các chất do mầm tuyến sinh dục tiết ra.

Công nghệ các tế bào ES hay các tế bào gốc phôi (Embryonic Stem Cell) là một công nghệ hết sức quan trọng cho sinh học hiện đại, cũng chính là dựa vào các tế bào sinh dục nguyên thuỷ. Những tế bào tách từ nút phôi động vật có vú hay đĩa phôi gà, qua nuôi cấy mà vẫn giữ được trạng thái gốc có lẽ là các tế bào sinh dục nguyên thuỷ. Trong giai đoạn phát triển thai sớm ở động vật có vú hay chim, người ta cũng có thể trực tiếp lấy ra các tế bào sinh dục nguyên thuỷ (tế bào EGS), đem nuôi cấy, làm các loại thao tác về gen, sau đó cấy lại vào một phôi khác. Các tế bào này có thể cư trú trong tuyến sinh dục cơ thể mới và tạo giao tử bình thường. Tất nhiên các giao tử này là của các cơ thể cho ra tế bào EGS (hình 10.9 và chương tiếp theo).

## Chương 11

### CÔNG NGHỆ TẾ BÀO VÀ ĐỘNG VẬT CHUYỂN GEN

Cần nhiều thế hệ giao phối chọn lọc để nâng cao năng suất các gia súc và vật nuôi khác về các tính trạng như năng suất sữa, chất lượng lông, tốc độ lớn và năng suất trứng. Qua mỗi thế hệ kế tiếp, các con vật có các tính trạng vượt trội được chọn làm nguồn nhân giống. Kết cục là các con vật cao sản phát triển ít nhiều như những dòng thuần. Sự kết hợp giữa giao phối và chọn lọc là rất có hiệu quả, mặc dù tốn kém nhiều thời gian và ngân sách. Cho tới nay, hầu như tất cả mọi cơ sở sinh học của chăn nuôi là dựa vào các quá trình này. Tuy nhiên, một khi một dòng di truyền tốt đã được thiết lập thì rất khó mà đưa được một tính trạng di truyền mới vào bằng chọn giống. Ví dụ như ở một dòng xuất hiện một gen quý mới lại có thể mang gen có hại, mà sau khi lai lại làm giảm năng suất vốn có. Như vậy, lại hình thành một chương trình chọn lọc nhiều thế hệ để cho dòng di truyền mới vừa có tính trạng mới nhưng vẫn duy trì được năng suất ban đầu.

Cho tới gần đây, nhân giống chọn lọc là con đường duy nhất để cải thiện các tính trạng di truyền vật nuôi. Tuy nhiên, kết hợp sự chuyển thành công các gen vào các tế bào có vú với khả năng tạo dòng vô tính bằng cây chuyển nhân xoma vào trứng mất nhân (cây chuyển nhân, nhân dòng nhân) đã cho phép các nhà nghiên cứu cài được gen đơn, chùm gen vào ADN nhiễm sắc thể của cơ thể bậc cao. Về lý thuyết, ý tưởng để đạt được mục tiêu đó là đơn giản. (1) Gen nhân dòng được tiêm vào nhân của hợp tử. (2) Hợp tử không thể phát triển bên ngoài và phải được cấy vào con cái để hoàn thành quá trình phát triển phôi thai. (3) Một số hậu thế từ hợp tử sẽ mang gen nhân dòng trong tất cả các tế bào của mình. (4) Những con vật có gen nhân dòng cài trong tế bào dòng sinh dục sẽ được nhân lên thành các dòng di truyền mới.

Phương pháp này có nhiều ứng dụng thực tiễn. Ví dụ, nếu như sản phẩm của gen tiêm có tác dụng kích thích tăng trưởng, con vật mang gen sẽ lớn nhanh hơn trong khi đòi hỏi ít thức ăn hơn. Tăng thêm hiệu suất sử dụng thức ăn chỉ cần lên ít phần trăm sẽ tác động mạnh lên việc giảm giá thành sản phẩm thịt.

Trong những năm 1980, với một nỗ lực đáng kể, ý tưởng tạo động vật chuyển gen bằng tiêm gen vào hợp tử đã trở thành hiện thực. Với sự xuất hiện nhiều công ty khoa học, hàng loạt những thuật ngữ mới được sử dụng để giúp cho sự trao đổi được dễ dàng. Ví dụ, con vật mà bộ gen bị biến đổi bằng cách đưa thêm vào các ADN lạ, ADN ngoại lai, thì gọi là *con vật chuyển gen*. ADN dùng để đưa vào thì gọi là *gen chuyển*, và toàn bộ quá trình thì gọi là *công nghệ chuyển gen*.

Sự cải thiện di truyền các sinh vật đa bào bằng cách đưa các gen chuyển tương ứng đã trở thành hiện thực một cách chậm chạp. Tuy nhiên, tới nay, công nghệ chuyển gen

đã trở thành một phương pháp đầy tiềm năng để nghiên cứu các vấn đề cơ bản của sự biểu hiện gen và phát triển ở động vật có vú, để thiết lập hệ thống mô hình động vật các bệnh ở người, để sử dụng tuyến vú cho sản xuất các protein dược phẩm quý trong sữa. Có liên quan đến áp dụng này, thuật ngữ “nuôi con thuốc – pharming” được dùng để chỉ ý tưởng là sữa từ các vật nuôi chuyển gen từ các trang trại (farm) chăn nuôi có thể được dùng làm nguồn các protein dược liệu. Có vô số lý do để sử dụng tuyến vú cho mục tiêu này. Sữa được liên tục tái tạo, tiết ra ngoài cơ thể với một số lượng lớn mà không gây hại gì tới con vật. Các protein dược liệu lấy từ tuyến vú qua sữa sẽ không có hiệu ứng phụ gì tới quá trình sinh lý con vật chuyển gen và trải qua quá trình biến đổi hậu dịch mã gần giống với ở người. Cuối cùng, tinh chế các protein từ sữa là một quá trình tương đối đơn giản vì trong sữa chỉ có một số không nhiều các protein khác nhau.

**Bảng 11.1. Thành phần protein từ sữa đại gia súc và cừu**

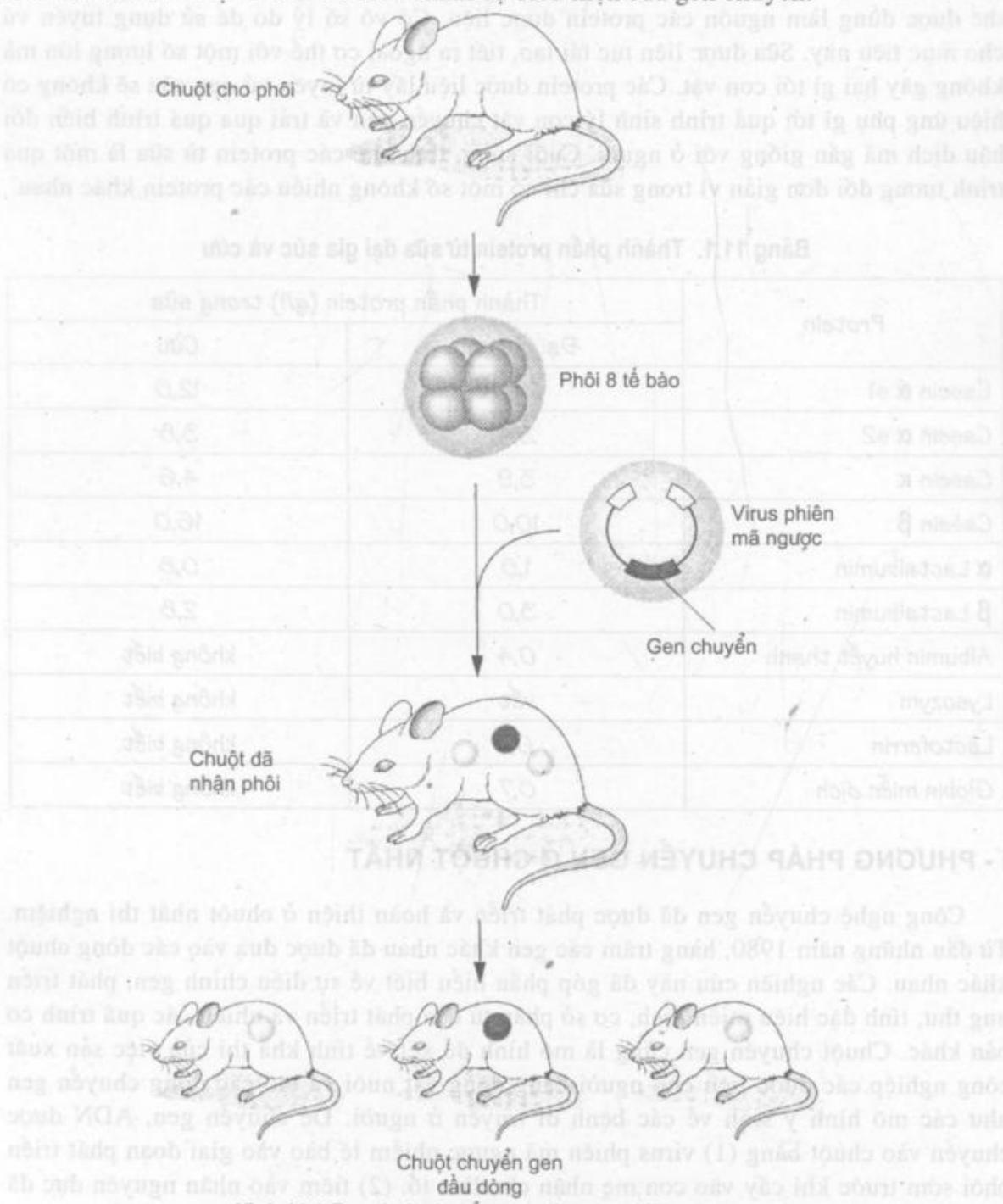
Protein	Thành phần protein (g/l) trong sữa	
	Đại gia súc	Cừu
Casein α s1	10,0	12,0
Casein α s2	3,4	3,8
Casein K	3,9	4,6
Casein β	10,0	16,0
α Lactalbumin	1,0	0,8
β Lactalbumin	3,0	2,8
Albumin huyết thanh	0,4	không biết
Lysozym	vết	không biết
Lactoferrin	0,1	không biết
Globin miễn dịch	0,7	không biết

## I - PHƯƠNG PHÁP CHUYỂN GEN Ở CHUỘT NHẮT

Công nghệ chuyển gen đã được phát triển và hoàn thiện ở chuột nhắt thí nghiệm. Từ đầu những năm 1980, hàng trăm các gen khác nhau đã được đưa vào các dòng chuột khác nhau. Các nghiên cứu này đã góp phần hiểu biết về sự điều chỉnh gen, phát triển ung thư, tính đặc hiệu miễn dịch, cơ sở pháp lý của phát triển và nhiều các quá trình cơ bản khác. Chuột chuyển gen cũng là mô hình để xét về tính khả thi của việc sản xuất công nghiệp các dược liệu cho người bằng động vật nuôi và tạo các dòng chuyển gen như các mô hình y sinh về các bệnh di truyền ở người. Để chuyển gen, ADN được chuyển vào chuột bằng (1) virus phiền mã ngược nhiễm tế bào vào giai đoạn phát triển phôi sớm trước khi cấy vào con mẹ nhân cho làm tổ. (2) tiêm vào nhân nguyên đúc đã trương to của trứng thụ tinh, hoặc (3) ghép với các tế bào gốc phôi đã biến đổi gen vào phôi giai đoạn sớm trước làm tổ.

### 1.1. Phương pháp vector phiên mã ngược

Trong các phương pháp chuyển gen, sử dụng vector phiên mã ngược (hình 11.1) có ưu thế là rất có hiệu quả trong việc cài gen chuyển vào genôm tế bào nhận. Tuy nhiên, các vector này chỉ chuyển được một đoạn nhỏ ADN (khoảng 8 kilô baz), và như thế có thể thiếu các trình tự kẽ bên để điều chỉnh sự biểu hiện của gen chuyển.



Hình 11.1. Tạo chuột chuyển gen với vector phiên mã ngược

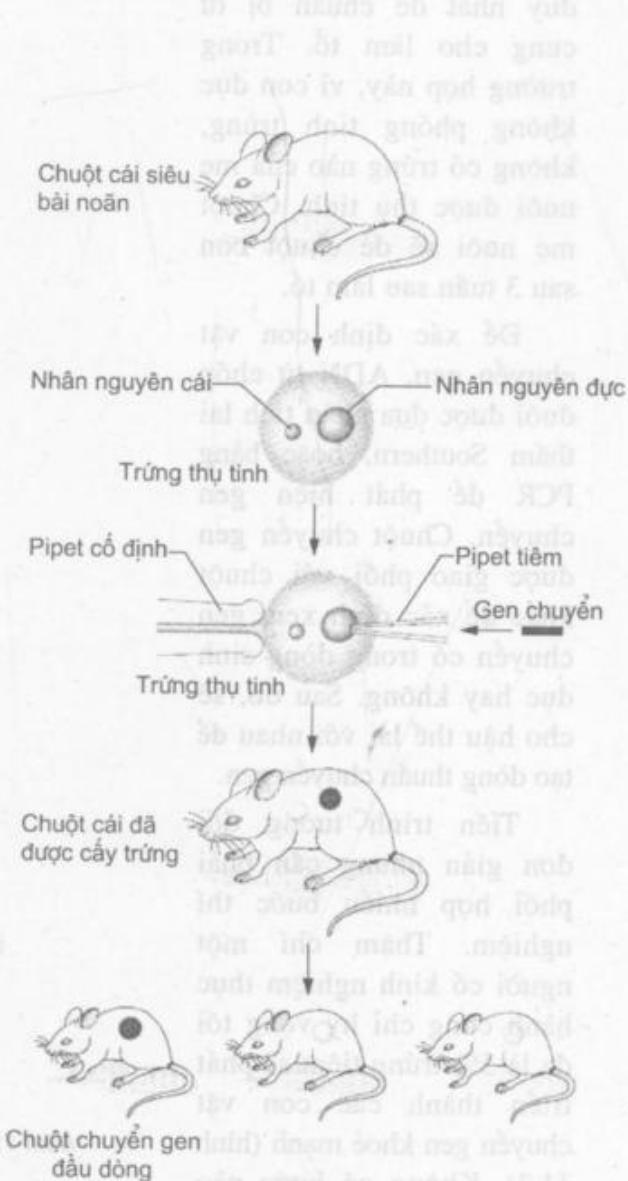
Phôi giai đoạn phân cắt, thường là giai đoạn 8 tế bào, được cho nhiễm virus phiên mã ngược khuyết mang gen chuyển. Các con mẹ nuôi đẻ ra chuột còn chuyển gen. Chuột chuyển gen được cho giao phối để xác định gen chuyển trong dòng sinh. Chuột có gen chuyển trong dòng sinh được dùng làm gốc để tạo dòng chuyển gen.

Có khó khăn lớn trong sử dụng vector phiên mã ngược. Mặc dù các vector được thiết kế là tái bản thiếu, genôm của các dòng virus phiên mã ngược (virus trợ giúp), cần cho việc tạo một lượng lớn vật mang ADN, cũng có thể cài vào cùng một nhân giống như các gen chuyển. Dù người ta đã hết sức cẩn trọng, các con vật chuyển gen cũng là nguồn nhân bội các virus này. Như vậy, trong áp dụng cho ra một sản phẩm nào bằng vật chuyển gen làm thực phẩm, cần phải tuyệt đối không có nhiễm virus. Do đó, vì có các phương pháp khác, vector phiên mã ngược ít được dùng để tạo các con vật chuyển gen mà có ý nghĩa thương mại.

## 1.2. Phương pháp vi tiêm ADN

Do yếu điểm của phương pháp dùng vector phiên mã ngược, phương pháp vi tiêm ADN hiện nay được ưa chuộng hơn để tạo chuột chuyển gen. Quy trình được thực hiện như sau (hình 11.2). (1) Siêu bài noãn để thu nhận một lượng lớn trứng thụ tinh (hợp tử). Chuột cái đầu tiên được tiêm huyết thanh ngựa chưa, và sau 48 giờ tiêm kích dục tố nhau thai người. Chuột siêu bài noãn cho tới 35 trứng thay vì bình thường là 5 - 10 trứng. (2) Chuột siêu bài noãn được cho giao phối. Các trứng thụ tinh được thụt rửa khỏi ống dẫn trứng. (3) Vi tiêm trứng thụ tinh được tiến hành ngay sau thu trứng. Gen chuyển dùng để tiêm thường là ADN dạng mạch thẳng và không có các trình tự ADN của vector.

Ở động vật có vú, sau khi tinh trùng đi vào trứng, nhân tinh và nhân trứng là những thực thể riêng nhau. Sau khi nhân trứng hoàn thành giảm phân và trở thành nhân nguyên cái, sự kết hợp nhân xảy ra. Nhân nguyên đực thường lớn hơn nhân nguyên cái, có thể phân biệt được nhờ kính hiển vi. Có thể dùng vi thao tác để thay đổi vị trí trứng, cố định trứng và sau đó tiêm. Vào những ngày đẹp, có thể tiêm được tới vài trăm nhân nguyên đực.



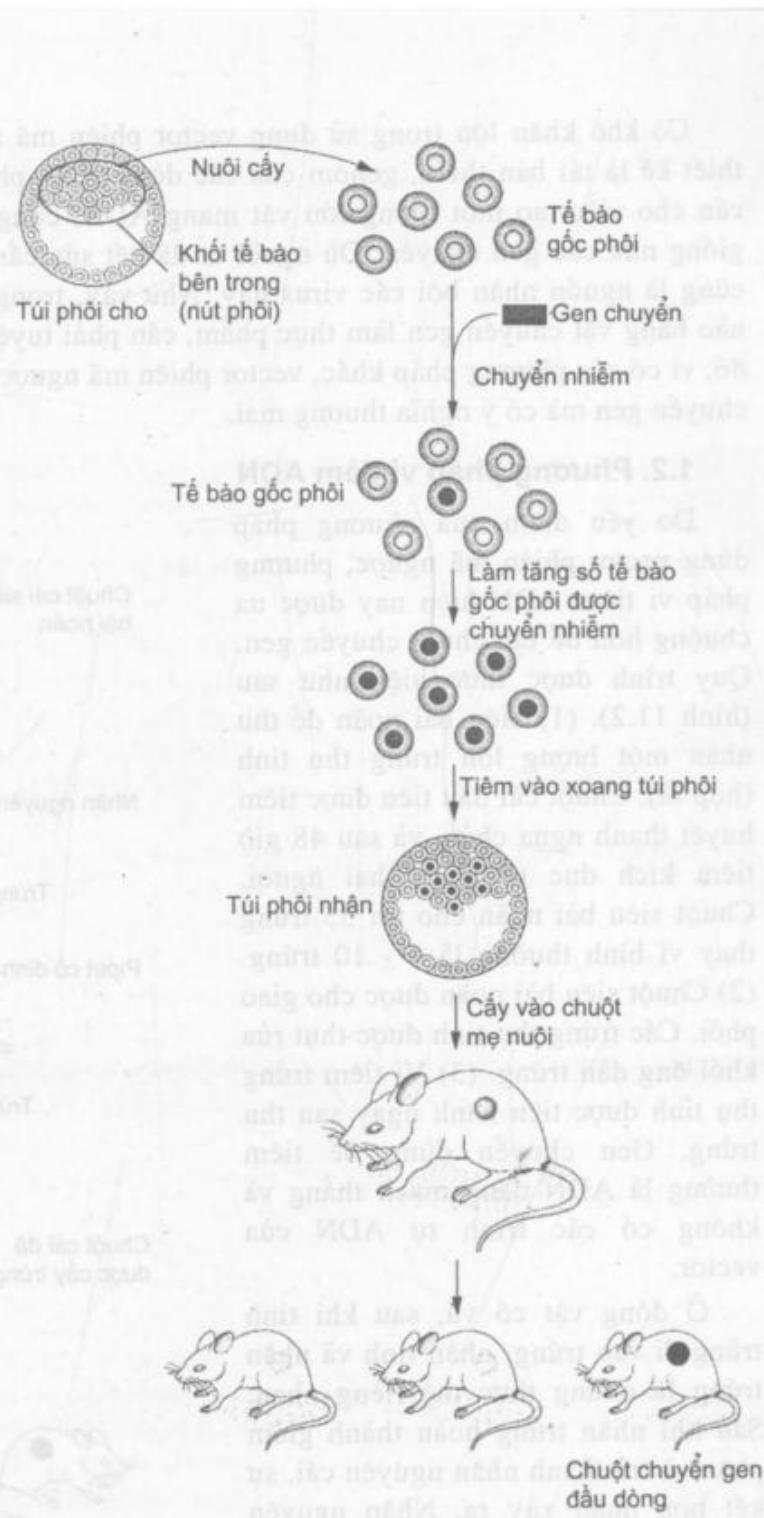
Hình 11.2. Tạo chuột chuyển gen bằng vi tiêm ADN

Trứng thu từ các con cái đã kích thích siêu bài noãn và cho phối với con đực. Mẫu tinh sạch thiết kế gen chuyển được vi tiêm vào nhân nguyên đực của trứng đã thụ tinh. Chuột mẹ nuôi đẻ ra chuột chuyển gen và cho ra dòng chuyển gen.

Sau khi tiêm, 25 - 40 trứng được cấy bằng phẫu thuật vào chuột mẹ nuôi, chuột cái chưa già vì đã giao phối với chuột đực bị cắt ống dẫn tinh. Ở chuột, giao phối là phương pháp duy nhất để chuẩn bị tử cung cho làm tổ. Trong trường hợp này, vì con đực không phóng tinh trùng, không có trứng nào của mẹ nuôi được thụ tinh. Chuột mẹ nuôi sẽ đẻ chuột con sau 3 tuần sau làm tổ.

Để xác định con vật chuyển gen, ADN từ chóp đuôi được đưa phân tích lai thám Southern, hoặc bằng PCR để phát hiện gen chuyển. Chuột chuyển gen được giao phối với chuột khác để xác định xem gen chuyển có trong dòng sinh dục hay không. Sau đó, sẽ cho hậu thế lai với nhau để tạo dòng thuần chuyển gen.

Tiến trình tương đối đơn giản nhưng cần phải phối hợp nhiều bước thí nghiệm. Thậm chí một người có kinh nghiệm thực hành cũng chỉ hy vọng tối đa là 5% trứng tiêm sẽ phát triển thành các con vật chuyển gen khỏe mạnh (hình 11.3). Không có bước nào trong tiến trình là có hiệu quả 100%; do vậy phải dùng một lượng lớn trứng. Với hệ thống chuột thí nghiệm, khoảng 66% hợp



Hình 11.3. Tạo chuột chuyển gen bằng các tế bào gốc phổi đã biến đổi di truyền

Các tế bào gốc phổi bắt đầu từ nút phổi của túi phổi chuột. Các tế bào gốc phổi được chuyển nhiễm bằng gen chuyển. Sau nuôi cấy, các tế bào đã chuyển nhiễm được xác định bằng chọn lọc dương tính - âm tính hoặc phân tích PCR. Quần thể tế bào đã nhiễm có thể nuôi và tiêm vào túi phổi, sau cấy vào tử cung mẹ nuôi. Các dòng chuyển gen có thể tạo nên qua cho phôi chuột gốc mang gen chuyển trong dòng sinh.

tử là sống sót sau thủ tục tiêm ; khoảng 25% trứng làm tổ phát triển thành chuột con ; và khoảng 25% chuột là chuột chuyển gen. Như vậy, từ 1000 trứng thụ tinh được tiêm, sẽ tạo được khoảng 30 - 35 chuột con chuyển gen. Hơn nữa, bằng phương pháp này, ADN tiêm đã cài vào các vị trí ngẫu nhiên trong genôm, và thường thì nhiều bản gen của ADN tiêm được cài vào 1 chỗ. Không phải tất cả các chuột chuyển gen đều có các tính trạng phù hợp. Trong một số cá thể, gen chuyển có thể không biểu hiện do vị trí cài, mặt khác, số bản sao là quá nhiều và gây biểu hiện quá mức làm rối loạn sinh lý bình thường của con vật. Bất kể sự kém hiệu quả, đây là phương pháp phổ biến dùng tiêm ADN vào nhân nguyên để tạo các dòng chuột mang các gen chuyển hoạt động.

### 1.3. Phương pháp thao tác gen tế bào gốc

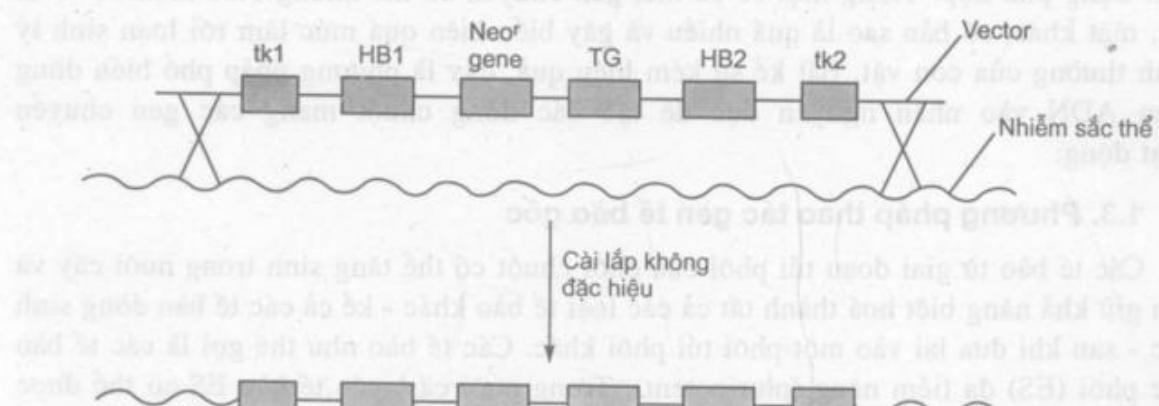
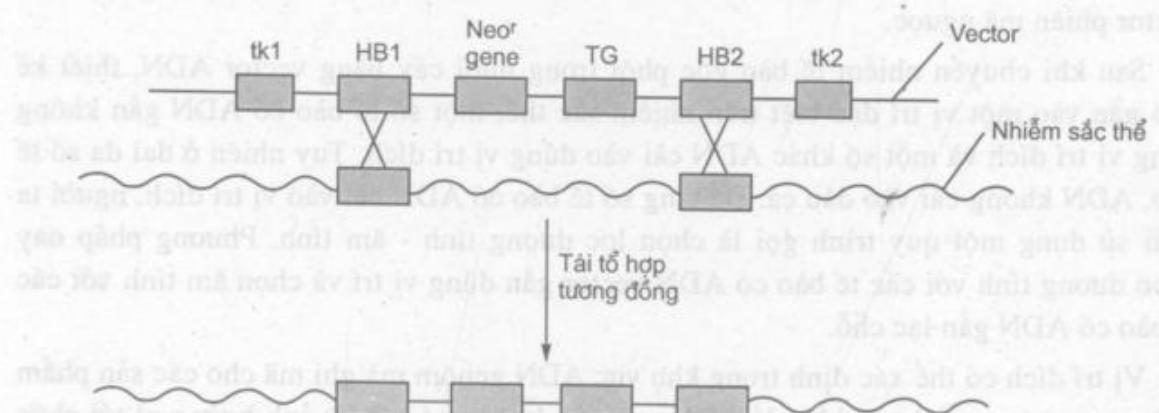
Các tế bào từ giai đoạn túi phôi của phôi chuột có thể tăng sinh trong nuôi cấy và vẫn giữ khả năng biệt hoá thành tất cả các loại tế bào khác - kể cả các tế bào dòng sinh dục - sau khi đưa lại vào một phôi túi phôi khác. Các tế bào như thế gọi là các tế bào gốc phôi (ES) đa tiềm năng (pluripotent). Trong nuôi cấy, các tế bào ES có thể được thao tác gen mà không thay đổi tính đa tiềm năng của chúng. Với hệ thống này, ví dụ, gen chuyển có thể được cài vào vị trí đặc biệt giữa các gen chấp nhận được trong hệ gen của tế bào gốc phôi. Các tế bào gốc đã thao tác gen có thể được chọn lọc, cho tăng sinh, và dùng để tạo con vật chuyển gen (hình 11.4). Bằng phương pháp này, người ta tránh được tính cài ngẫu nhiên mà đặc thù cho phương pháp tiêm và phương pháp dùng vector phiên mã ngược.

Sau khi chuyển nhiễm tế bào gốc phôi trong nuôi cấy bằng vector ADN, thiết kế cho gắn vào một vị trí đặc biệt trên nhiễm sắc thể, một số tế bào có ADN gắn không đúng vị trí đích và một số khác ADN cài vào đúng vị trí đích. Tuy nhiên ở đại đa số tế bào, ADN không cài vào đâu cả. Để tăng số tế bào có ADN cài vào vị trí đích, người ta phải sử dụng một quy trình gọi là chọn lọc dương tính - âm tính. Phương pháp này chọn dương tính với các tế bào có ADN vector gắn đúng vị trí và chọn âm tính với các tế bào có ADN gắn lạc chỗ.

Vị trí đích có thể xác định trong khu vực ADN genôm mà ghi mã cho các sản phẩm không quan trọng, và sau khi cài ADN mới vào không có bất kỳ ảnh hưởng gì tới chức năng của tế bào. Hơn nữa, cần thiết là gen chuyển phải được cài vào phần của genôm mà không干涉 nó phiên mã. Các nhà nghiên cứu đang tiếp tục tìm kiếm các vị trí như vậy.

ADN vector đích dùng cho chọn lọc dương tính thường chứa : (1) hai khối trình tự ADN (HB1 và HB2) mà là tương đồng với các khu vực riêng biệt của vị trí đích ; (2) gen chuyển mà sẽ cho đặc tính mới ở thể nhận ; (3) trình tự ADN ghi mã cho tính chống chịu hợp chất G-418 ( $\text{Neo}^r$ ) ; và (4) 2 gen khác nhau cho timidinkinaza (tk1 và tk2) từ virus herpes simplex kiểu 1 và 2 (HSV-tk1 và HSV-tk2) (hình 11.5A) . Sự phân bố các trình tự này là quyết định cho quy trình chọn lọc dương tính. Giữa hai khối ADN mà tương đồng với vị trí đích là các gen để chuyển và chống chịu G-418 (gen

$\text{Neo}^r$ ). Phía ngoài mỗi khối tương đồng là các gen cho HVS-tk1 và HVS-tk2. Nếu sự cài xảy ra lạc chỗ, tức là không vào HB1 và HB2, 1 hoặc cả 2 HVS-tk có nhiều khả năng cài vào các vị trí khác (hình 11.5A). Ngược lại, nếu sự cài xảy ra do tái tổ hợp tương đồng qua trao đổi chéo kép ở vị trí đích, các gen HSV-tk sẽ bị loại bỏ và chỉ gen

**A****B**

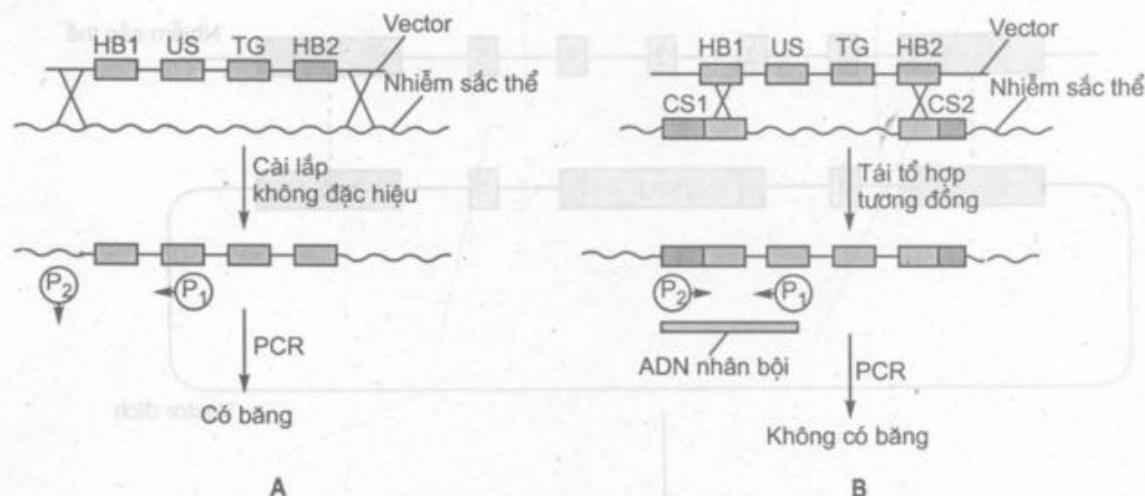
Hình 11.4. Chọn lọc dương tính - âm tính

A. Kết quả cài lấp không đặc hiệu. Cả hai gen cho timidinkinaza (tk1 và tk2), hai khối trình tự ADN mà là tương đồng với các khu vực riêng biệt trong tế bào nhận (HB1 và HB2); gen ( $\text{Neo}^r$ ) giúp chống chịu hợp chất độc G-418 và gen chuyển được cài lấp vào nhiễm sắc thể. Sau chuyển nhiễm, các tế bào được chọn lọc về tính chống chịu với cả G-418 và gancyclovir, gancyclovir trở thành độc nếu tế bào tổng hợp timidinkinaza. Cũng có thể xảy ra sự cài lấp không tương đồng mà chỉ có một gen timidinkinaza. Sau xử lý G-418 và gancyclovir, các tế bào có cài lấp này cũng chết hết.

B. Kết quả cài lấp tương đồng. Sản phẩm của trao đổi chéo kép giữa hai khối tương đồng (HB1 và HB2), của ADN trên ADN vector và ADN nhiễm sắc thể, sẽ không chứa bất kỳ gen tk nào. Sau xử lý G-418 và gancyclovir, chỉ các tế bào có tái tổ hợp tương đồng là sống sót.

chuyển cùng gen Neo<sup>r</sup> sẽ cài vào genôm (hình 11.5B). Khi các tế bào đã chuyển nhiễm được nuôi với sự có mặt của G-418, tất cả các tế bào không có gen Neo<sup>r</sup> sẽ chết hết. Như vậy, chỉ các tế bào có gen chuyển là sống sót, có nghĩa là nó được chọn lọc dương tính. Nếu cho đồng thời vào môi trường nuôi hợp chất ganciclovir cũng như G-418, tế bào mà biểu hiện timidinkinaza sẽ bị chết vì timidinkinaza biến đổi ganciclovir thành chất độc giết chết tế bào, có nghĩa là nó được chọn lọc âm tính. Các tế bào mà sống qua được hai sơ đồ chọn lọc sẽ là các tế bào có ADN cài đúng vị trí. Mặc dù được chứng minh không thật chắc chắn, chọn lọc dương tính làm tăng số lượng tế bào mang gen cài vào vị trí nhiễm sắc thể đặc hiệu.

Dùng PCR là phương pháp phát hiện trực tiếp các tế bào gốc mang gen chuyển ở đúng vị trí đích. Trong trường hợp này, ADN đích chứa 2 khối ADN là tương đồng với vị trí đích, hai khối đó nằm hai bên gen chuyển cùng một trình tự vi khuẩn mà không có ở chuột (hình 11.5). Sau khi chuyển nhiễm tế bào ES, các tế bào được lấy ra và xử lý cho PCR. Một trong các mồi (P1) PCR là bổ trợ cho trình tự bên trong đoạn ADN vi khuẩn của vector cài. Đoạn mồi khác (P2) bổ trợ với trình tự ADN là một phần của nhiễm sắc thể kề với vùng của một khối ADN tương đồng. Nếu gen cài vào vị trí ngẫu nhiên, dự đoán sẽ không có sản phẩm nhân bội ADN (hình 11.5A). Tuy nhiên, nếu xảy ra sự cài vào vị trí đặc hiệu, PCR sẽ nhân bội đoạn ADN với kích thước đã biết (hình 11.5B). Như vậy, có thể xác định được các tế bào gốc phôi có chứa gen mong muốn ở đúng vị trí đích. Bằng cách cấy truyền từ nhóm tế bào này, có thể thiết lập được dòng các tế bào có gen cài đúng vị trí đặc hiệu.



Hình 11.5. Xét nghiệm sự cài đặt không đặc hiệu hay tái tổ hợp tương đồng trong các tế bào đã chuyển nhiễm bằng PCR

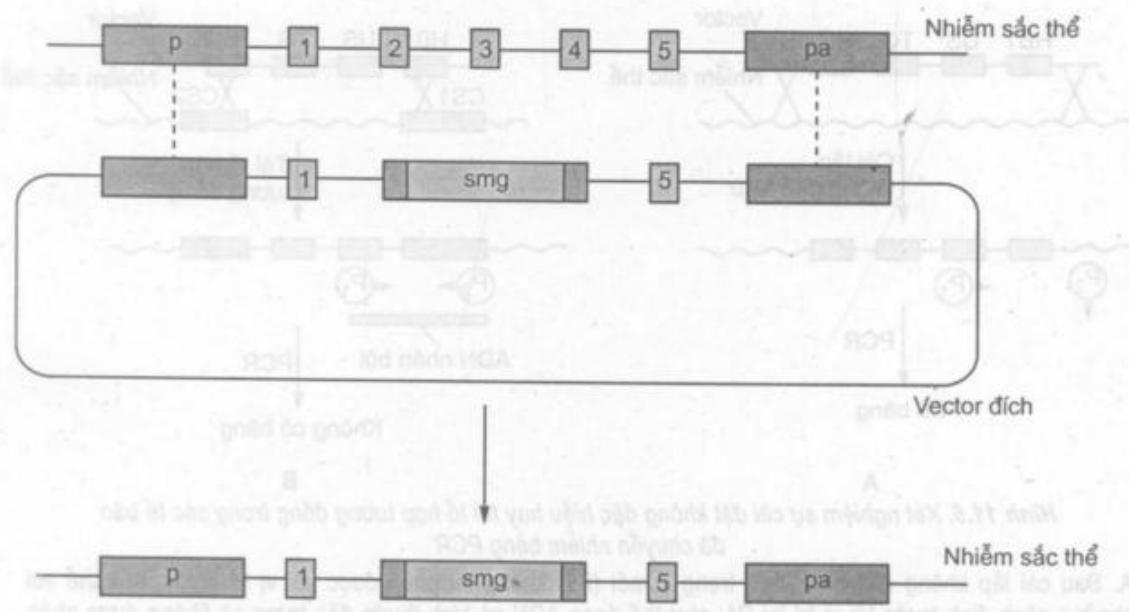
- A. Sau cài lấp không đặc hiệu, một trong 2 mồi (P2) không lai ghép được với vị trí nhiễm sắc thể với khoảng cách định trước tới vị trí lai P1, như thế đoạn ADN có kích thước đặc trưng sẽ không được nhân lên. Mỗi P1 mà lai với đoạn đơn nhất (US) của ADN dùng để cài sẽ không xảy ra trên ADN nhiễm sắc thể của tế bào nhân.
- B. Sự tái tổ hợp tương đồng giữa các trình tự ADN (HB1 và HB2) của ADN cài bổ trợ với các vị trí nhiễm sắc thể (CS1 và CS2) tạo vùng ghép cho cả P1 và P2 mà cách nhau một khoảng định trước. PCR sẽ nhân

bộ phận ADN có kích thước xác định và dễ nhận thấy trên băng điện di. Trong trường hợp này, gen chuyển (TG) mà nằm giữa các khối tương đồng đã cài vào vị trí đặc hiệu trên nhiễm sắc thể.

Các tế bào gốc phôi mang gen chuyển có thể nuôi cấy và rồi đưa vào phôi giai đoạn túi phôi, các túi phôi này lại cấy vào chuột mẹ nuôi. Các dòng chuyển gen được thiết lập bằng cách cho phôi hậu thế mang gen chuyển trong dòng sinh. Sau đó, nếu cần, lại cho con cái chúng giao phối với nhau để tạo chuột đồng hợp tử về gen chuyển.

Gen chuyển có thể cài vào vị trí đặc hiệu bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng trong tế bào gốc phôi không chỉ cho chức năng mới, mà gen đích đặc hiệu của chuột có thể bị phá hỏng bằng cách chèn vào một đoạn ADN, đoạn này thường là các gen có dấu (marker) chọn lọc, vào vùng ghi mã của nó (hình 11.6). Một trong các mục đích của việc phá hỏng (dánh bật) gen là để xác định hậu quả sinh lý và phát triển của việc bất hoạt một gen đặc biệt. Mục đích khác nữa là dùng dòng chuyển gen có gen hỏng như một mô hình để nghiên cứu bệnh học một bệnh của người.

Ví dụ, bất hoạt gen rhodopsin chuột bằng phá hoại gen đích làm phá huỷ tế bào que của võng mạc trong chuột chuyển gen gây nên bệnh rất giống với bệnh viêm màng sắc tố võng mạc ở người. Như vậy, sự tiến triển của quá trình thoái hoá võng mạc và hiệu quả của các thuốc chữa để làm chậm hoặc ức chế bệnh võng mạc do di truyền, có thể được nghiên cứu trên chuột chuyển gen rhodopsin. Tới nay, có hơn 250 kiểu gen đánh bật khác nhau được tạo ra như các mô hình động vật để nghiên cứu các dị tật khác nhau ở người.



Hình 11.6. Đánh bật gen bằng tái tổ hợp tương đồng có chủ đích

Vector đích có mang gen có dấu đã chọn (smg) với các trình tự hai bên là các vùng tương đồng với các khu vực của gen đích. Trong ví dụ này, gen đích có 5 exon (1-5). Tái tổ hợp tương đồng (đường chấm chấm) cắt bỏ (tức đánh bật) gen đích.

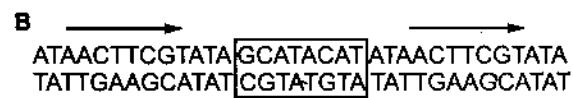
### 1.3.1. Biến đổi gen bằng hệ tái tổ hợp Cre-loxP

Chuột chuyển gen thường chứa gen chuyển hoặc gen bị biến đổi trong tất cả các tế bào của nó. Tuy nhiên, sẽ rất hữu ích nếu ta có được quá trình điều chỉnh một cách chọn lọc sự biểu hiện của gen trong mô hoặc loại tế bào xoma đặc trưng. Hệ tái tổ hợp Cre-loxP, xuất xứ từ yếu tố di truyền của thực khuẩn P1, đã được sử dụng cho mục đích này.

Về hình thái, thực khuẩn thể P1 giống với thực khuẩn thể λ. Cả hai đều có đầu, đuôi và tơ đuôi. Genôm P1 dài khoảng 100kb. Sau khi đưa vào *E.coli*, genôm P1 thẳng tạo vòng. Vòng ADN P1 hoạt động như khuôn để tái bản. Và, phụ thuộc vào bộ gen được hoạt hoá, dạng vòng hoặc được duy trì như plasmid hoặc được dùng làm khuôn để sản xuất genôm virus trong pha phân giải. Trong trường hợp hiếm gặp, genôm vòng P1 nhập vào nhiễm sắc thể *E.coli*. Tạo vòng và cài nhập của genôm P1 tuỳ thuộc vào sản phẩm của gen cre (protein circulation recombinase), nó cắt một cách đặc hiệu và tái tổ hợp ADN của loxP (locus of crossing over [x] in P1).

Điểm loxP có 2 đoạn lặp đảo ngược 13bp, cách nhau bởi một trình tự 8bp (hình 11.7). Tóm lại, tái tổ hợp Cre-loxP là kéo gần lại nhau 2 điểm loxP ở xa nhau, mỗi điểm có hai phân tử Cre recombinase, cắt bằng Cre recombinase vùng spacer giữa các trình tự lặp, trao đổi và kết nối các sợi ADN để tạo phân tử ADN tái tổ hợp. Sản phẩm kết cục của tái tổ hợp phụ thuộc vào hướng của các trình tự lặp của điểm loxP. Nếu các trình tự lặp là ngược hướng, sẽ có sự trao đổi các đoạn đảo giữa 2 điểm loxP. Nếu các trình tự lặp là cùng hướng thì trình tự giữa sẽ bị mất. Các trình tự lặp của thực khuẩn thể lambda luôn ngược nhau trong tự nhiên. Sự tái tổ hợp Cre-loxP có thể thực hiện khi các điểm loxP ở cách xa nhau. Ví dụ, hai loxP cách xa nhau 100kb là cần thiết để tạo vòng cho P1 genôm. Tính đặc hiệu của hệ thống Cre-loxP1 là tuyệt đối vì sự tái tổ hợp Cre chỉ xảy ra ở vị trí loxP.

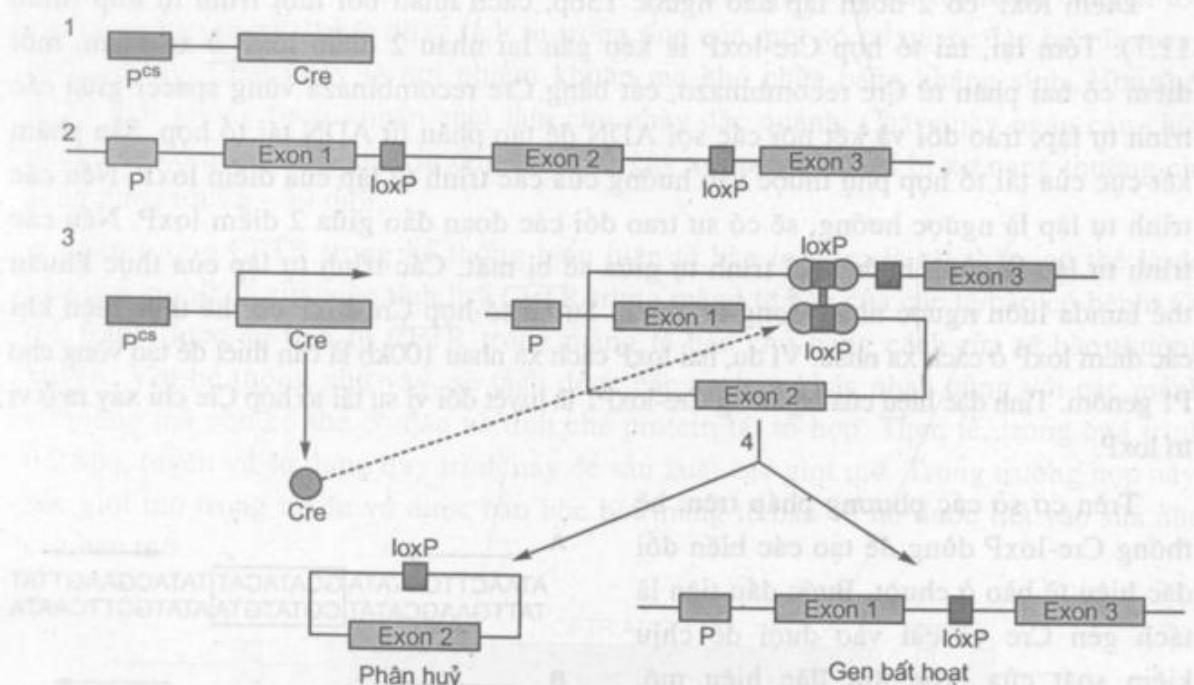
Trên cơ sở các phương pháp trên, hệ thống Cre-loxP dùng để tạo các biến đổi đặc hiệu tế bào ở chuột. Bước đầu tiên là tách gen Cre và cài vào dưới để chịu kiểm soát của promotor đặc hiệu mô. Người ta đã tạo chuột chuyển gen với thiết kế gen cre, và tính đặc hiệu mô đã được khẳng định. Tiếp theo đoạn loxP với các trình tự lặp cùng chiều được cài vào bên này hoặc bên kia của đoạn ADN nhân bản. Đoạn ADN mà giới hạn bởi 2 loxP được gọi là bị chặn lox (floxed). Thiết kế chặn lox chứa gen có dấu được chọn được cài vào một điểm nhiễm sắc thể của tế bào



- Hình 11.7. Vị trí loxP với các đoạn lặp ngược hướng (A) và cùng hướng (B). Mũi tên chỉ hướng của các đoạn lặp.

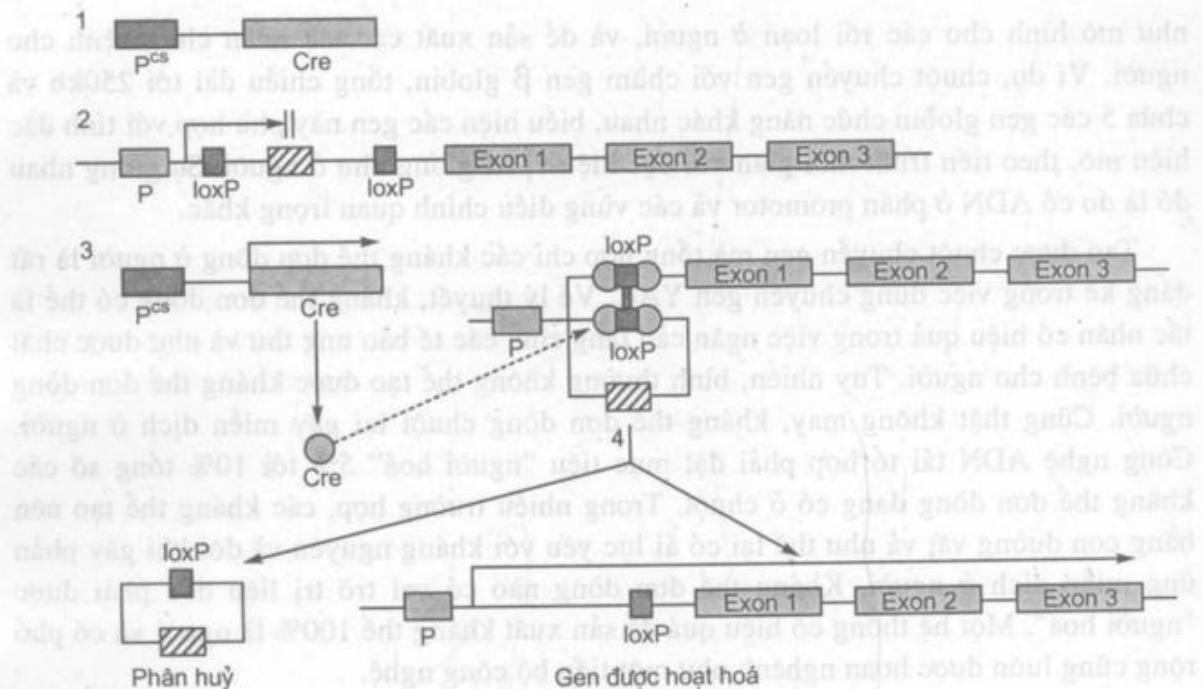
gốc bằng tái tổ hợp tương đồng. Các tế bào này được chọn lọc, nuôi cấy và sử dụng để thiết lập các dòng chuyển gen. Sau đó, chuột chuyển gen với gen chuyển cre đặc hiệu mô được cho phôi với chuột có thiết kế chặn lox. ADN giữa 2 lox bị cắt bỏ sau khi gen chuyển biểu hiện ở chuột chuyển gen 2 lần (hình 11.8). Bằng cách này có thể nghiên cứu hậu quả sinh học của việc mất hoạt tính gen ở một mô đặc hiệu. Hệ tái tổ hợp Cre-loxP cũng có thể được dùng để hoạt hóa gen cài vào các mô đặc hiệu. Ví dụ, thiết kế bị chặn lox chứa trình tự ngăn cản phiên mã. Thiết kế được chèn vào giữa promotor và trình tự ghi mã của một gen nào đó. Khi gen chuyển cre biểu hiện trong chuột có thiết kế chặn lox, trình tự ADN ức chế phiên mã bị cắt bỏ, và làm cho gen biểu hiện.

Công nghệ Cre-loxP được sử dụng nhiều để nghiên cứu hậu quả của sự bất hoạt gen đặc hiệu mô với mục tiêu lập các mô hình các bệnh người. Ví dụ, loại bỏ một cách chọn lọc gen kinesin II, gen này chỉ biểu hiện ở các tế bào cảm quang võng mạc, gây tích luỹ opsin và arrestin và làm chết tế bào. Kết quả này giống với bệnh viêm màng sắc tố võng mạc ở người và có thể dùng để nghiên cứu chi tiết các vấn đề sinh lý bệnh của võng mạc.



Hình 11.8. Hệ thống tái tổ hợp Cre-loxP để bắt hoạt gen trong tế bào chuyên hoá

- (1) Gen Cre đặt dưới sự kiểm soát của promoter đặc hiệu tế bào ( $P^{cs}$ ) và cài như một gen chuyển vào một dòng chuột.
- (2) Đoạn loxP được cài vào hai bên exon. Thiết kế với các đoạn loxP được cài vào vị trí nhiễm sắc thể của tế bào gốc phôi bằng tái tổ hợp tương đồng, và tạo dòng chuột chuyển gen bằng các tế bào này. Cả hai dòng chuyển gen được lai với nhau.
- (3) Trong các tế bào mà cả hai thiết kế này có mặt, recombinase Cre (hình tròn) được tổng hợp, và hai phân tử Cre bám vào mỗi đoạn loxP (mũi tên chấm chấm).
- (4) Xảy ra tái tổ hợp các đoạn loxP (thanh nối), xảy ra sự tạo vòng và cắt các đoạn loxP và exon (Exon 2), vòng cùng exon 2 sẽ phân huỷ, tạo nên một gen bất hoạt trên nhiễm sắc thể. Mũi tên gãy sang phải chỉ sự phiên mã.



Hình 11.9. Hệ thống tái tổ hợp Cre-loxP để hoạt hóa gen trong tế bào chuyển hóa

(1) Gen Cre đặt dưới sự kiểm soát của promotor đặc hiệu tế bào ( $p^{CS}$ ) và cài như một gen chuyển vào một dòng chuột. (2) Một đoạn ADN với các đoạn loxP ở hai bên trình tự kết thúc phiên mã (hình chữ nhật gạch gạch) được cài vào giữa promotor (p) và exon thứ nhất (Exon 1) của gen. (3) Thiết kế với các đoạn loxP được cài vào vị trí nhiễm sắc thể của tế bào gốc phôi bằng tái tổ hợp tương đồng, và tạo dòng chuột chuyển gen bằng các tế bào này. Cả hai dòng chuyển gen được lai với nhau. Trong các tế bào mà cả hai thiết kế này có mặt, Cre recombinase (hình tròn) được tổng hợp, và hai phân tử Cre bám vào mỗi đoạn loxP (mũi tên chấm chấm). (4) Xảy ra tái tổ hợp các đoạn loxP (thanh nối), xảy ra sự tạo vòng và cắt các đoạn loxP và trình tự kết thúc phiên mã cuối cùng phân huỷ và hình thành nên gen chuyển tích cực hoạt động phiên mã vẫn nằm trên nhiễm sắc thể. Mũi tên gãy sang phải chỉ sự phiên mã, và hai thanh song song thẳng đứng chỉ sự kết thúc phiên mã.

### 1.3.2. Chuyển gen với các vector dung lượng lớn

Nói chung, gen chuyển là ADN bổ trợ (cADN), các gen nhỏ ( $\leq 20\text{kb}$ ) hoặc một phần của gen. Thường thì cADN biểu hiện tồi trong tế bào động vật có vú. Cũng thế, khi ADN genôm dùng để chuyển gen, các trình tự điều khiển gen quan trọng nằm ở phía trước hay phía sau gen thường ít khi còn lại trong đoạn chuyển. Hơn thế, các gen hoàn chỉnh, hay các phức hợp đa gen ( $\leq 100\text{kb}$ ) là quá lớn cho các vector thông thường. Vì lý do đó, người ta dùng các vector dung lượng lớn cho chuyển gen như: vi khuẩn (BAC), từ P1 thực khuẩn thể (PAC), từ động vật có vú (MAC), từ nấm men (YAC), có thể mang ADN genôm từ 100 tới hơn 1000kb.

Người ta đã tạo nhiều chuột chuyển gen bằng vi tiêm nhân nguyên của trứng thụ tinh hoặc chuyển nhiễm các tế bào gốc phôi với YAC, mang một chuỗi các gen liên quan hay một gen lớn. Các con vật này được sử dụng để nghiên cứu quá trình phát triển

như mô hình cho các rối loạn ở người, và để sản xuất các tác nhân chữa bệnh cho người. Ví dụ, chuột chuyển gen với chùm gen  $\beta$  globin, tổng chiều dài tới 250kb và chứa 5 các gen globin chức năng khác nhau, biểu hiện các gen này phù hợp với tính đặc hiệu mô, theo tiến trình thời gian với đặc hiệu vị trí giống như ở người. Sự giống nhau đó là do có ADN ở phần promotor và các vùng điều chỉnh quan trọng khác.

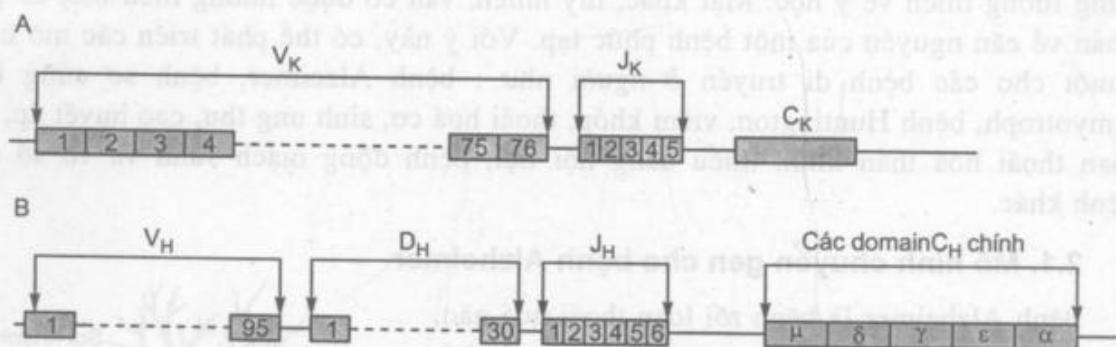
Tạo được chuột chuyển gen mà tổng hợp chỉ các kháng thể đơn dòng ở người là rất đáng kể trong việc dùng chuyển gen YAC. Về lý thuyết, kháng thể đơn dòng có thể là tác nhân có hiệu quả trong việc ngăn cản tăng sinh các tế bào ung thư và như được chất chữa bệnh cho người. Tuy nhiên, bình thường không thể tạo được kháng thể đơn dòng người. Cũng thật không may, kháng thể đơn dòng chuột lại gây miễn dịch ở người. Công nghệ ADN tái tổ hợp phải đặt mục tiêu "người hoá" 5% tới 10% tổng số các kháng thể đơn dòng đang có ở chuột. Trong nhiều trường hợp, các kháng thể tạo nên bằng con đường vất và như thế lại có ái lực yếu với kháng nguyên và đôi khi gây phản ứng miễn dịch ở người. Kháng thể đơn dòng nào có vai trò trị liệu đều phải được "người hoá". Một hệ thống có hiệu quả để sản xuất kháng thể 100% là người và có phổ rộng cũng luôn được hoan nghênh như một tiến bộ công nghệ.

Sự tạo các kháng thể tự nhiên là một kỳ diệu sinh học. Kháng thể là một protein từ phân với hai cặp mạch giống nhau. Một mạch gọi là mạch nặng (H) và mạch kia là mạch nhẹ (L). Chữ nặng và nhẹ là do khối lượng phân tử của các tiểu đơn vị kháng thể. Thông tin di truyền cho mạch nặng hình thành do sự tái sắp xếp ADN xoma các đoạn biến đổi ( $V_H$ ), các đoạn sai khác ( $D_H$ ), đoạn nối ( $J_H$ ) và đoạn cố định ( $C_H$ ) trong tế bào B. Có hai loại mạch nhẹ L khác nhau là lamda và kappa ( $\lambda$  và  $\kappa$ ) sau khi tái sắp xếp các đoạn biến đổi, đoạn nối và đoạn cố định của riêng chúng. Một tế bào B tổng hợp một loại phân tử kháng thể với một tổ hợp duy nhất các đoạn ghi mã cho mạch nặng với tổ hợp các đoạn hoặc lamda, hoặc kappa.

Để hình thành một số lượng lớn các kháng thể, mạch H có khoảng 95 đoạn  $V_H$ , 30 $D_H$ , 6 $J_H$ , và 5 cố định ( $C\alpha$ ,  $C\gamma$ ,  $C\delta$ ,  $C\epsilon$ , và  $C\mu$ ). Locus gen K có khoảng 76 đoạn  $V_K$ , 5 $J_K$ , và 1 $C_K$  (hình 11.10). Các locus H và K dài 1 tới 1,5Mb. Để tạo chuột chuyển gen có khả năng tổng hợp một chuỗi các kháng thể người khác nhau, các gen H và K của chính chuột phải được bất hoạt, và YAC với một số lớn các yếu tố H và L gen globin miễn dịch người phải được cài vào ADN nhiễm sắc thể của chuột này.

Để đạt được mục tiêu này, một nhóm các nhà nghiên cứu cắt bỏ các đoạn nối trong các trình tự H và  $C_K$  chuột, sau đó, sau khi nhận giống các chuột đánh bạt này, xác định trong số hậu thế những chuột không có khả năng tổng hợp bất kỳ một kháng thể nào. Tiếp theo, hai YAC được xác định: một mang một bộ phận nhỏ của chùm gen H người gồm 4 $V_H$ , 16 $D_H$ , 6 $J_H$ ,  $C\alpha$  và  $C\mu$ , còn một khác mang chùm gen K người với 4 $V_K$ , 5 $J_K$  và  $C_K$ . Mỗi YAC có gen marker dùng để chọn lọc tế bào ES sau nhiễm bằng cách dung hợp spheroplast nấm men với tế bào ES. Tính tích hợp của mỗi chùm gen cài nhập được kiểm tra bằng PCR. Túi phôi được tiêm riêng nhau với các tế bào mang hoặc đoạn cài H hoặc đoạn cài K, và con vật đầu dòng được xác định bằng

PCR. Những con chuột chuyển gen này được cho phôi với các chuột đã bị bất hoạt các gen H và K, và cho con cháu chúng giao phôi với nhau để xác định các chuột có 2 lần đánh bạt và chuột có 2 lần chuyển gen, có nghĩa là các chuột mất gen chuột nhưng lại được cài gen người. Sau khi tiêm gây miễn dịch cho các chuột chuyển gen này với các kháng nguyên khác nhau, tạo các tế bào lai (hybridoma) từ chúng và kiểm định các kháng thể đơn dòng. Mặc dù các kháng thể tạo ra là chống lại các kháng nguyên, nhưng chuột không thể tạo tất cả các kháng thể có ở người do chỉ có một số ít đoạn gen được cài. Nhược điểm này có thể khắc phục được bằng cách thiết kế YAC lớn hơn với nhiều các đoạn H và K hơn.



Hình 11.10. Sơ đồ trình bày các gen globulin miễn dịch người K và H

A. Kiểu gen dòng sinh của gen immunoglobulin mạch K. Đường chấm chấm chỉ các domain tiếp theo không vẽ. Gen mạch K hoạt động, như V<sub>K</sub>8-J<sub>K</sub>4-C<sub>K</sub> hình thành trong tế bào B sau sự sắp xếp tổ hợp các domain ADN. Tổ hợp cuối cùng là một trong 380 tổ hợp có thể có.

B. Kiểu gen dòng sinh của gen immunoglobulin mạch H. Đường chấm chấm chỉ các domain tiếp theo không vẽ. Gen mạch H hoạt động, như V<sub>H</sub>33-D<sub>H</sub>26-J<sub>H</sub>4-C<sub>H</sub> hình thành trong tế bào B sau sự sắp xếp tổ hợp các domain ADN. Tổ hợp cuối cùng là một trong 85.500 tổ hợp có thể có. Chỉ vẽ một domain Cy ở đây, nhưng có 4 loại domain Cy1, Cy2a, Cy2b và Cy3.

YAC 1000kb có thể mang 66 V<sub>H</sub>, 30 D<sub>H</sub>, 6 J<sub>H</sub>, C<sub>μ</sub>, C<sub>δ</sub> và C<sub>γ</sub> được tạo từ 4 YAC với mạch H người. Tương tự, YAC 800kb với 32 V<sub>K</sub>, 5 J<sub>K</sub> và C<sub>K</sub> có thể tạo từ 3 YAC mang các V<sub>K</sub> khác nhau. Các thiết kế này được đưa vào tế bào gốc phôi, và chuột chuyển gen chỉ tạo kháng thể người đã được tạo nên. Các chuột chuyển gen này sản xuất tất cả các kháng thể người, chống mọi kháng nguyên. Để khẳng định, chuột chuyển gen “sản xuất kháng thể người” được tiêm 3 loại kháng nguyên khác nhau, và cả 3 trường hợp các tế bào lai đều tiết kháng thể đơn dòng người có ái lực cao với kháng nguyên tiêm. Trong các nghiên cứu trên động vật, kháng thể đơn dòng người từ chuột chuyển gen bám vào thụ thể tác nhân tăng trưởng biểu bì và ức chế một cách có hiệu quả sự tăng sinh khối u biểu hiện quá mức protein này. Hơn nữa, trong thực tiễn lâm sàng người, kháng thể đơn dòng người từ chuột chuyển gen không gây phản ứng miễn dịch ở người. Rất hy vọng rằng, hệ thống chuyển gen này sẽ được dùng phổ biến để sản xuất kháng thể đơn dòng dùng trong trị liệu ở người. Tên thương mại của chuột sản xuất kháng thể người được gọi là Xeno Mouse.

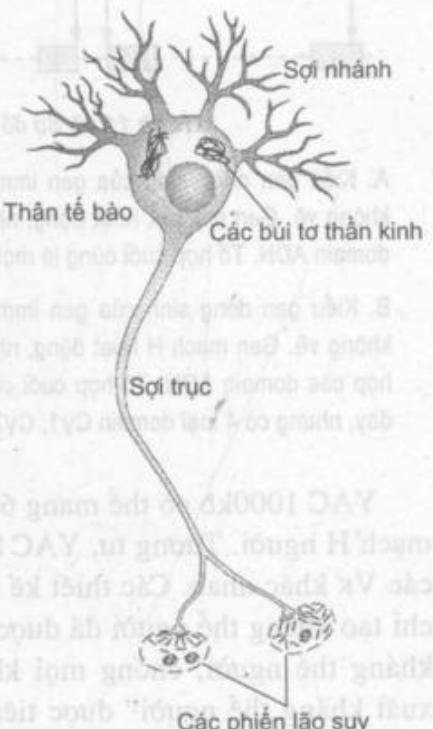
## II - ỨNG DỤNG CỦA CHUỘT CHUYỂN GEN

Chuột chuyển gen có thể được sử dụng như các hệ thống mô hình để xác định cơ sở sinh học của các bệnh ở người và phác đồ điều trị trong các hoàn cảnh khác nhau. Hơn nữa, sự chuyển gen ở chuột là một hệ thống thử nghiệm về tính khả thi của việc sản xuất các tác nhân trị liệu. Với nghĩa này, chuột thí nghiệm có thể gọi một cách khá đúng là “ống nghiệm có lông”. Mô hình nguyên con bắt chước cả sự bắt đầu cũng như tiến triển của các bệnh người. Tuy nhiên, chuột vẫn không phải là người, dù đó là động vật có vú, và thông tin thu được từ một vài mô hình chuyển gen không phải khi nào cũng tương thích về y học. Mặt khác, tuy nhiên, vẫn có được những hiểu biết có phê phán về căn nguyên của một bệnh phức tạp. Với ý này, có thể phát triển các mô hình chuột cho các bệnh di truyền ở người như : bệnh Alzheimer, bệnh sọ cứng bên Amyotroph, bệnh Huntington, viêm khớp, thoái hoá cơ, sinh ung thư, cao huyết áp, rối loạn thoái hoá thần kinh, thiểu năng nội tiết, bệnh động mạch vành và vô số các bệnh khác.

### 2.1. Mô hình chuyển gen cho bệnh Alzheimer

Bệnh Alzheimer là bệnh rối loạn thoái hoá não, đặc trưng là mất dần tư duy trừu tượng và trí nhớ, kèm theo các biến đổi cá tính, rối loạn ngôn ngữ, và thể lực sút kém. Khó chẩn đoán lâm sàng bệnh, mặc dù có tới 1% số người ở độ tuổi 60-65 và 30% số người trên 80 tuổi là có bệnh. Ở bệnh nhân Alzheimer thấy các búi tơ thần kinh tích luỹ trong thân nơron, các lồng đọng đặc ngoại bào, gọi là các phiến lão suy phát triển ở tận cùng các nhánh thần kinh, giảm số lượng các tế bào thần kinh trong bán cầu đại não và hippocamp (hình 11.11). Lõi của các phiến lão suy gồm các cấu trúc sợi dây mà theo truyền thống vẫn gọi là thể bột. Đầu tiên người ta tưởng rằng thể bột là cacbonhydrat, nhưng các phân tích mới cho thấy đó là các lồng đọng protein, mặc dù là sai, nhưng thuật ngữ “bột” vẫn được sử dụng.

Protein chính của thể bột của bệnh Alzheimer là protein 4 kilodalton gọi là A $\beta$  (amyloid beta, protein beta, protein bột beta hoặc beta/A4). Protein A $\beta$  dài từ 39-42 gốc axit amin. A $\beta$ 40 và A $\beta$ 42 là hai dạng chính. Tất cả các A $\beta$  protein xuất phát từ protein beta amyloid tiền thân (APP). Sự phân huỷ không chính xác APP dẫn đến tích luỹ A $\beta$ 40 và A $\beta$ 42 và sự phân huỷ không hết dẫn tới tích luỹ. Một số ít gia đình hay mắc bệnh Alzheimer có đột



Hình 11.11. Sơ đồ trình bày nơron vỏ đại não người, cho thấy các đặc điểm mô-bệnh học bệnh Alzheimer.

Các phiến lão suy (senile) chứa các lồng bột amyloid và các búi tơ ở vùng xináp. Trong thân tế bào nơron các búi tơ thần kinh chứa các lồng tụ bộ khung tế bào và các protein khác. Các biến đổi khác không được trình bày ở đây.

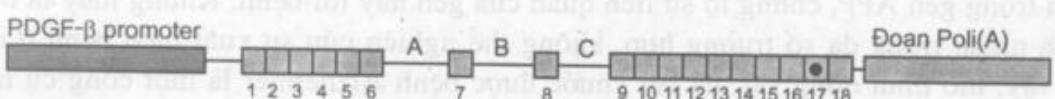
biến trong gen APP, chứng tỏ sự liên quan của gen này tới bệnh. Không may là ở đa số bệnh nhân, trong đa số trường hợp, không thể nghiên cứu sự xuất hiện bệnh ở người. Do vậy, mô hình động vật mà bắt chước được bệnh Alzheimer là một công cụ nghiên cứu rất quý giá.

Người ta đã tạo nhiều chuột chuyển gen với dạng đầy đủ hoặc bộ phận của gen APP bình thường có điều khiển bằng promoter đặc hiệu nơron. Trong đa số trường hợp, không thấy có các phiến bột, các búi tơ thần kinh, chết tế bào nơron, hoặc rối loạn hành vi. Tuy nhiên, sự thoái hoá thần kinh và các biểu hiện khác, ở một mức độ nào đó là giống với bệnh Alzheimer. Ví dụ, gen chuyển gồm đoạn ghi mã cho 100 axit amin cuối của APP và chứa trình tự cho protein A $\beta$  gây tạo các biểu hiện mô học đặc trưng cho bệnh Alzheimer.

Mô hình động vật khá thuyết phục về bệnh Alzheimer được tạo ra với các gen chuyển có chứa đột biến gen APP mà gặp trong một số gia đình có tỷ lệ cao về biểu hiện sớm ( $\leq 50$  tuổi) bệnh Alzheimer. Trong một nhóm các gia đình này, điểm 717 của APP (APP 717) chứa phenylalanin thay cho valin. Trong nhóm khác với bệnh Alzheimer, các điểm 670 và 671 (APP - 670/671) chứa asparagin và loxin thay cho lizin và methionin.

Gen chuyển với đột biến APP717 được thiết kế từ cADN APP. Intron có biến đổi được lắp vào giữa exon 6 và 7, 7 và 8, 8 và 9 của cADN APP. Các intron được lắp vào cADN APP vì thực nghiệm cho thấy là các gen chuyển có intron có phiên mã mạnh hơn so với các thiết kế không có intron. Thiết kế “intron cADN APP” được điều khiển bởi promoter, tác nhân tăng trưởng xuất xứ tiểu cầu bêta mà biểu hiện ở mô não (hình 11.12). Thiết kế hoàn chỉnh được gọi là minigen PDAPP. Chuột chuyển gen với 40 bản minigen PDAPP, khi già hơn 6 tháng có biểu hiện các phiến bột, thoái hoá tế bào thần kinh và giảm trí nhớ. Thiết kế gen APP-670/671 có điều khiển bởi promoter đặc hiệu thần kinh cũng tạo chuột chuyển gen có biểu hiện bệnh như bệnh Alzheimer, kể cả đư thừa A $\beta$ 42. Khá lạ là, cả chuột minigen PDAPP và APP- 670/671 đều không có các búi tơ thần kinh. Có thể là các cấu trúc đó là phản ứng thứ cấp khi biểu hiện quá mức A $\beta$ 42 ở người.

Có 3 gen khác cũng tham gia vào bệnh Alzheimer ở người : ApoE4, gen presinilin 1 (PS1), gen presinilin 2 (PS2). Sự có mặt của ApoE4 trong lô cút ApoE có vai trò trong vận chuyển lipit, làm cho ở những cá thể trên 60 tuổi có biểu hiện giống bệnh Alzheimer. Đột biến ở các gen presinilin thấy ở các gia đình biểu hiện rất sớm bệnh Alzheimer. Nhiều nghiên cứu cho biết là các gen presinilin đột biến gây tích luỹ A $\beta$ 42. Ví dụ, chuột chuyển gen 2 lần (kép), tạo nên qua cho phôi chuột chuyển gen mang đột biến suốt độ dài gen APP với các chuột có đột biến presinilin 1, sẽ sản xuất quá mức A $\beta$ 42 trong một số phần của não như xảy ra đối với các cá thể có bệnh Alzheimer. Qua bài học lớn về bệnh Alzheimer, các mô hình động vật giúp trả lời một số câu hỏi nhạy cảm về cơ sở phân tử của các rối loạn ảnh hưởng tới 4 triệu người ở Mỹ và tiêu tốn hàng năm tới 100 tỷ đô la.



Hình 11.12. Thiết kế ADN để lập mô hình bệnh Alzheimer trong chuột chuyển gen

Các exon của ADN APP được đánh số 1-18, và các intron cài vào được ký hiệu chữ A-C.

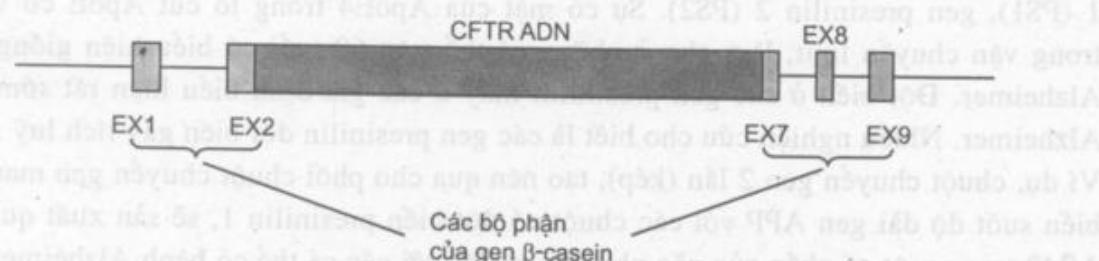
Các trình tự điều chỉnh là promotor tác nhân tăng trưởng xuất xứ tiểu cầu β (PDGF β) và các trình tự poli A của virus simian. Điểm chấm chỉ exon có đột biến APP-717.

Thiết kế được gọi là minigen PDAPP.

## 2.2. Sử dụng chuột chuyển gen như các hệ thống thử nghiệm

Chuột chuyển gen được sử dụng để thử nghiệm xem các protein đặc hiệu có tiết vào sữa hay không. Ví dụ, một lượng lớn các protein xơ nang điều chỉnh sự vận chuyển qua màng (CFTR) là rất cần để nghiên cứu chức năng và xác định khả năng trị liệu bệnh xơ nang (CF – cystic fibrosis). Đây là bệnh di truyền rất phổ biến, thấy ở 1 trong 2500 người có nguồn gốc châu Âu. Tác động sơ cấp của gen CFTR hỏng là biến đổi protein mà bình thường hoạt động như kênh clorit. Như hậu quả của rối loạn vận chuyển ion clo ra và vào tế bào, chất nhày tích tụ trong ống của một số cơ quan, đặc biệt là trong phổi và tuy. Chất nhày là nơi nhiễm khuẩn mà khó chữa bằng kháng sinh. Hơn thế, ADN giải phóng từ vi khuẩn chết làm cho nhày đặc quánh. Chất nhày ngăn cản chức năng của cơ quan do đóng kín ống thoát và gây xơ nang. Người bị xơ nang thường chỉ sống được tới 25 - 30 tuổi.

Sản lượng CFTR trong hệ thống biểu hiện tế bào *in vitro* là rất thấp, có thể là do hậu quả sinh học của việc tích luỹ CFTR trong màng tế bào của các tế bào có bệnh. Có thể tránh được sự tích tụ CFTR trong màng tế bào chủ bằng cách rửa tế bào thường xuyên. Với hệ thống như vậy, sẽ tách được các protein khác nhau cùng với các mảnh vỡ màng mà còn có thể cô đặc và tinh chế protein tái tổ hợp. Thực tế, trong quá trình tiết sữa, tuyến vú sử dụng quy trình này để sản xuất các giọt mỡ. Trong trường hợp này, các giọt mỡ trong tuyến vú được bao bọc bởi màng tế bào và nó được tiết vào sữa như các bao mỡ.



Hình 11.13. Thiết kế biểu hiện cADN gen casein β dê-CFTR

cADN toàn bộ cho CFTR được cài giữa exon 2 (Ex2) và exon 7 (Ex-7) của gen β casein dê. Promotor, trình tự kết thúc, các exon 1, 8, 9 và gen β casein vẫn được giữ lại.

Để thử nghiệm về tính đúng đắn của giả thuyết, trình tự đầy đủ cADN của CFTR được nhân bản trong vùng giữa của gen khuyết  $\beta$  casein dê, gen này mất đoạn từ exon 2 tới đầu exon 7 (hình 11.13). Thiết kế giữ lại promotor và trình tự cuối của gen  $\beta$  casein dê. cADN CFTR được cài vào một gen cấu trúc với mục đích dùng intron để tăng cường phiên mã gen chuyển. Gen  $\beta$  casein biểu hiện mạnh trong tuyến vú trong kỳ tiết sữa và  $\beta$  casein là protein chính của sữa.

Đã thiết lập được các dòng chuột chuyển gen mang các trình tự CFTR dưới sự điều khiển của trình tự điều chỉnh của gen  $\beta$  casein. Như dự đoán, sữa của chuột cái chuyển gen có chứa protein CFTR bám vào màng của giọt mỡ. Không có bất kỳ ảnh hưởng xấu nào cho con mẹ tiết sữa cũng như cho các con con bú sữa có chứa CFTR. Protein CFTR đã glycosyl hoá và tách được dễ dàng từ tiểu phần giàu mỡ của sữa. Nhiệm vụ tiếp là xác định xem CFTR có chuẩn xác hay không. Người ta cũng đã chứng minh khả năng sản xuất các protein bám màng khác trong sữa. Nhiều protein khác mà có tiềm năng trị liệu cũng đã được tổng hợp trong tuyến vú của chuột chuyển gen tiết sữa. Cuối cùng, để thu nhận một lượng lớn CFTR, và các protein bám màng quan trọng, các protein khác trị liệu cho người, thiết kế chuyển gen phải được cài vào genôm các con vật lớn hơn, như bò, cừu hoặc dê.

Chuột chuyển gen cũng được dùng để thử nghiệm nhiều ý tưởng khác. Ví dụ, vi khuẩn *Staphylococcus aureus* chịu trách nhiệm về 25% trường hợp viêm tuyến vú ở bò. Sự nhiễm khuẩn này lây và lan ra toàn đàn. Sản lượng sữa từ bò bệnh sút giảm nhiều. Hiện nay, chi phí hàng năm để kiểm soát dịch bệnh viêm tuyến vú do *S. aureus* lên tới 1,7 tỷ đô la ở nước Mỹ. Có thể là, nếu như bò tiết vào sữa chất phân giải vi khuẩn thì sẽ ngăn chặn được nhiễm khuẩn. Dự khuyết vào chất này là protein lysostaphin do *Staphylococcus simulans*. Lysostaphin là một enzym thuỷ phân tấn công đặc hiệu lên thành tế bào của *S. aureus*. Tuy nhiên tế bào nhân chuẩn nhiễm gen nguyên chất chỉ sản xuất được lysostaphin bất hoạt, vì hai gốc asparagin bị glycosyl hoá. Cần để được giải quyết bằng cách gây đột biến *in vitro* để thay thế codon cho 2 gốc asparagin bằng glutamin. Lysostaphin có biến đổi không bị glycosyl hoá sau khi tổng hợp bởi các tế bào nhân chuẩn và có hoạt tính đầy đủ chống lại *S. aureus*.

Gen lysostaphin đã biến đổi được cài đặt dưới sự kiểm soát của promotor  $\beta$ -lactoglobulin cừu và thiết kế được dùng để tạo chuột chuyển gen. Chuột tiết mạnh lysostaphin vào sữa là không bị viêm vú dù có tiêm *S. aureus*. Để so với đối chứng, chuột chuyển gen có độ tiết thấp lysostaphin cũng không bị bệnh khi bị nhiễm một số lượng khuẩn bình thường là gây dịch. Các con chuyển gen là khoẻ mạnh và không khác gì về sinh lý cũng như mô học so với các con vật đối chứng. Như vậy, về nguyên tắc, hệ thống vừa nêu là có hiệu quả để kiểm soát dịch viêm vú bởi *S. aureus*. Tuy nhiên, vì có khả năng chọn lọc các *S. aureus* kháng lysostaphin, để an toàn phải có con vật chuyển 2, 3 liều gen với các tính chất chống *Staphylococcus* khác nhau.

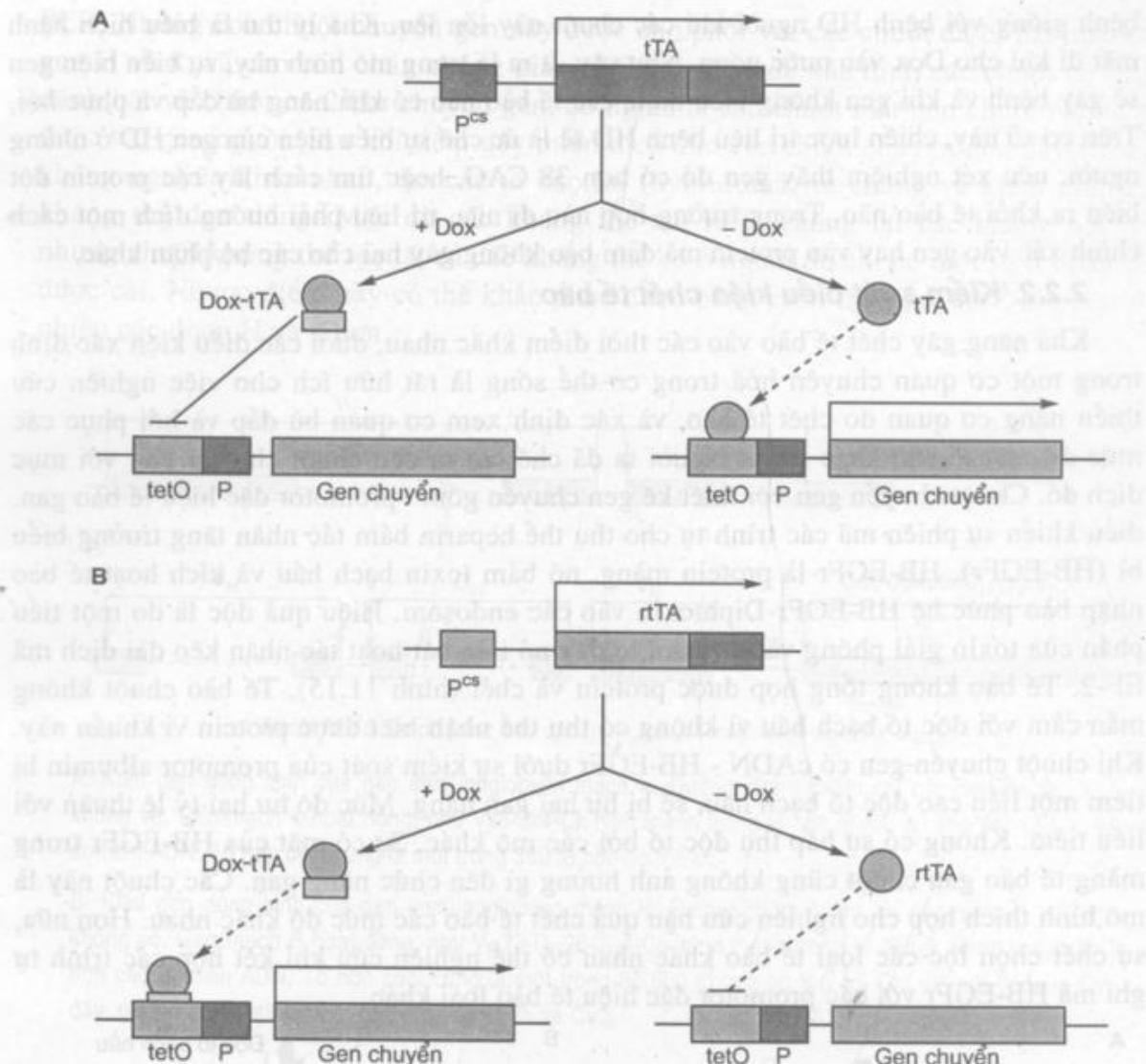
### 2.2.1. Điều khiển điều kiện biểu hiện gen

Nhiều quy trình được đưa ra để mở, hoặc đóng theo ý muốn sự biểu hiện một gen chuyển trong một loại mô chuyên hoá. Trong số các phương pháp này, hệ gây cảm ứng bằng tetracyclin (tet) là được nghiên cứu nhiều nhất. Hệ thống này dựa trên hai đơn vị phiên mã trong cùng một tế bào, khi sản phẩm của đơn vị này xác định sự biểu hiện gen (các gen) của đơn vị kia. Trong một dạng của hệ kích thích bằng tet, bổ sung doxycyclin (Dox), một sản phẩm tương tự tet, gây đóng sự biểu hiện của gen chuyển. Không có Dox, gen chuyển tiếp tục biểu hiện trong tế bào chuyên hoá. Hệ "tet tắt" phụ thuộc vào sự sản xuất một protein khảm (lai) gồm chất ức chế tet và các trình tự axit amin mà hoạt hoá quá trình phiên mã. Protein lai đó gọi là chất kích hoạt gen chuyển qua tetracyclin (tetracycline transactivator – tTA). Gen tTA được kiểm soát bởi promotor đặc hiệu tế bào chuyên hoá. Promotor điều khiển gen chuyển gồm có operator tet (tetO) – các trình tự phía trên một promotor nhân chuẩn mạnh. Protein tTA bám vào vùng tetO và điều khiển sự phiên mã của gen chuyển. Sự bám protein tTA vào vào vùng promotor là tuyệt đối cần thiết để bắt đầu phiên mã. Promotor tetO tự mình không khai mào được phiên mã. Một khác, khi có mặt Dox, nó bám vào protein tAT, và phức hệ Dox-tTA không thể bám vào trình tự promotor – tetO và phiên mã gen chuyển không xảy ra. Như vậy, sự có mặt, hoặc vắng mặt Dox có tác dụng như công tắc mở khi promotor đặc hiệu tế bào của gen tTA hoạt động (hình 11.14A).

Người ta cũng tạo ra một hệ thống ngược lại gọi là "tet bật", trong đó Dox phải có mặt để phiên mã gen chuyển xảy ra. Trong hệ thống này, trình tự nucleotit cho chất ức chế tetracyclin mang đột biến và ngăn cản không cho phức hệ protein ức chế – transactivator bám vào trình tự tetO-promotor. Protein ức chế/hoạt hoá gen chuyển qua tetracyclin gọi là rtTA (hệ thống đảo ngược hoạt hoá gen chuyển kiểm soát bằng tetracyclin). Tuy nhiên Dox bám vào rtTA, biến đổi cấu hình của nó, làm cho phức hệ bám vào trình tự tetO-promotor và khai mào phiên mã gen chuyển (hình 11.14B).

Cả hai đơn vị phiên mã của hệ điều chỉnh bằng tetracyclin có thể cài vào một plasmid ; như thế làm giảm các bước cần để tạo chuột chuyển gen. Dùng Dox một cách rất đơn giản là cho vào nước uống của chuột. Các hệ tet tắt - và tet bật có vô vàn ứng dụng. Ví dụ như có thể xem xét chi tiết hậu quả sinh học của sản xuất protein sai lệch hay sản xuất quá thừa một protein bình thường nào đó, bắt chước các điều kiện gây bệnh cho loại tế bào đặc biệt, từ đó thử nghiệm trị liệu gen cho các bệnh mà ảnh hưởng đến loại tế bào chuyên hoá đó.

Một ví dụ rất lý thú về sử dụng "hệ điều hành tet" trong phát triển mô hình chuột cho bệnh Huntington (HD). Đó là bệnh rối loạn thần kinh không chữa được có ở một trong 10.000 người trên toàn thế giới. Triệu chứng biểu hiện khi bệnh nhân khoảng 45 tuổi. Đầu tiên là rối loạn điều phối cơ. Rối loạn tiến triển nhanh và liên tục. Cuối cùng, cả vận động có ý thức và vô ý thức đều không điều khiển được, kèm theo co giật và đau ; nói ngọng, tu duy lộn xộn, xuất hiện trạng thái tâm thần nghiêm trọng, chán nản, ảo giác và điên giận. Ở giai đoạn HD muộn, bệnh nhân câm, cứng khớp và co quắp. Bệnh thường kéo dài 15 năm trước khi chết. Bệnh là do hư hỏng thần kinh ở một vùng đặc trưng của não. Ở mức độ di truyền, bệnh là do có thêm các đơn vị 3 nu CAG vào với dãy CAG có sẵn trong exon 1 của gen HD. Bộ ba CAG mã cho glutamin và khi dịch mã sẽ cho một đoạn dài poliglutamin trong protein HD. Bệnh xuất hiện khi dãy đó dài hơn 38 bộ 3 CAG.



Hình 11.14. Sơ đồ sự điều chỉnh biểu hiện gen bằng tetracyclin

A. Hệ tet-tát. Gen tTA được điều khiển bằng promoter đặc hiệu tế bào ( $p^{cs}$ ), gen tTA ghi mã cho trình tự chất ức chế bởi tetracyclin (bên phải) và chất kích hoạt phiên mã (bên trái). Sản phẩm của tTA là protein tTA (hình tròn), protein này bám vào phức hệ operator (tetO-promotor nhân chuẩn) và khi không có doxycyclin (-Dox) hoạt hoá phiên mã gen chuyển. Khi có doxycyclin (+Dox), nó (hình chữ nhật bé) bám vào tTA và phức hệ Dox-tTA không thể bám vào vùng tetO-promotor và gen chuyển không phiên mã được.

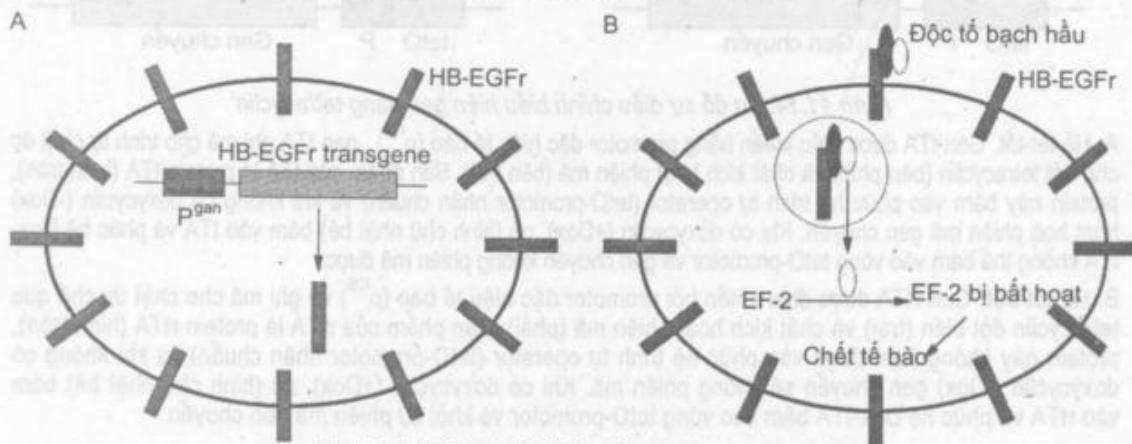
B. Hệ tet-bát. Gen rtTA được điều khiển bởi promoter đặc hiệu tế bào ( $p^{cs}$ ) và ghi mã cho chất ức chế qua tetracyclin đột biến (trái) và chất kích hoạt phiên mã (phải). Sản phẩm của rtTA là protein rtTA (hình tròn), protein này không bám được vào phức hệ operator (tetO-promotor nhân chuẩn) và khi không có doxycyclin (-Dox) gen chuyển sẽ không phiên mã. Khi có doxycyclin (+Dox), nó (hình chữ nhật bé) bám vào rtTA và phức hệ Dox-rtTA bám vào vùng tetO-promotor và khởi sự phiên mã gen chuyển.

Để tạo mô hình chuột cho bệnh HD, hệ tet-tát được dùng với gen chuyển là gen HD có dãy 94 bộ CAG. Gen tTA được đặt dưới sự kiểm soát của promoter hoạt động trong tế bào não trước. Để bảo vệ phôi, trong thời gian có mang, chuột được uống cỏ Dox, Dox tắt biểu hiện của gen chuyển. Khi sinh, không cho Dox vào nước uống nữa để gen chuyển (đột biến) được biểu hiện và cho ra protein có một dãy dài poliglutamin. Các biểu hiện

bệnh giống với bệnh HD người khi các chuột này lớn lên. Khả lý thú là biểu hiện bệnh mất đi khi cho Dox vào nước uống. Như vậy, ít ra là trong mô hình này, sự biểu hiện gen sẽ gây bệnh và khi gen không biểu hiện, các tế bào não có khả năng bù đắp và phục hồi. Trên cơ sở này, chiến lược trị liệu bệnh HD sẽ là ức chế sự biểu hiện của gen HD ở những người, nếu xét nghiệm thấy gen đó có hơn 38 CAG, hoặc tìm cách lấy các protein đột biến ra khỏi tế bào não. Trong trường hợp nào đi nữa, trị liệu phải hướng đích một cách chính xác vào gen hay vào protein mà đảm bảo không gây hại cho các bộ phận khác.

### 2.2.2. Kiểm soát điều kiện chết tế bào

Khả năng gây chết tế bào vào các thời điểm khác nhau, dưới các điều kiện xác định trong một cơ quan chuyên hoá trong cơ thể sống là rất hữu ích cho việc nghiên cứu thiểu năng cơ quan do chết tế bào, và xác định xem cơ quan bù đắp và hồi phục các mức độ mất tế bào khác nhau. Người ta đã chế tạo ra con chuột chuyển gen với mục đích đó. Chuột chuyển gen với thiết kế gen chuyển gồm: promotor đặc hiệu tế bào gan, điều khiển sự phiên mã các trình tự cho thụ thể heparin bám tác nhân tăng trưởng biểu bì (HB-EGFr). HB-EGFr là protein màng, nó bám toxin bạch hầu và kích hoạt tế bào nhập bào phức hệ HB-EGFr-Diphoxin vào các endosom. Hiệu quả độc là do một tiểu phần của toxin giải phóng vào cytosol, ở đây nó làm bất hoạt tác nhân kéo dài dịch mã EF-2. Tế bào không tổng hợp được protein và chết (hình 11.15). Tế bào chuột không mẫn cảm với độc tố bạch hầu vì không có thụ thể nhận biết được protein vi khuẩn này. Khi chuột chuyển gen có cADN - HB-EGFr dưới sự kiểm soát của promotor albumin bị tiêm một liều cao độc tố bạch hầu, sẽ bị hư hại gan nặng. Mức độ hư hại tỷ lệ thuận với liều tiêm. Không có sự hấp thụ độc tố bởi các mô khác. Sự có mặt của HB-EGFr trong màng tế bào gan chuột cũng không ảnh hưởng gì đến chức năng gan. Các chuột này là mô hình thích hợp cho nghiên cứu hậu quả chết tế bào các mức độ khác nhau. Hơn nữa, sự chết chọn lọc các loại tế bào khác nhau có thể nghiên cứu khi kết hợp các trình tự ghi mã HB-EGFr với các promotor đặc hiệu tế bào loại khác.

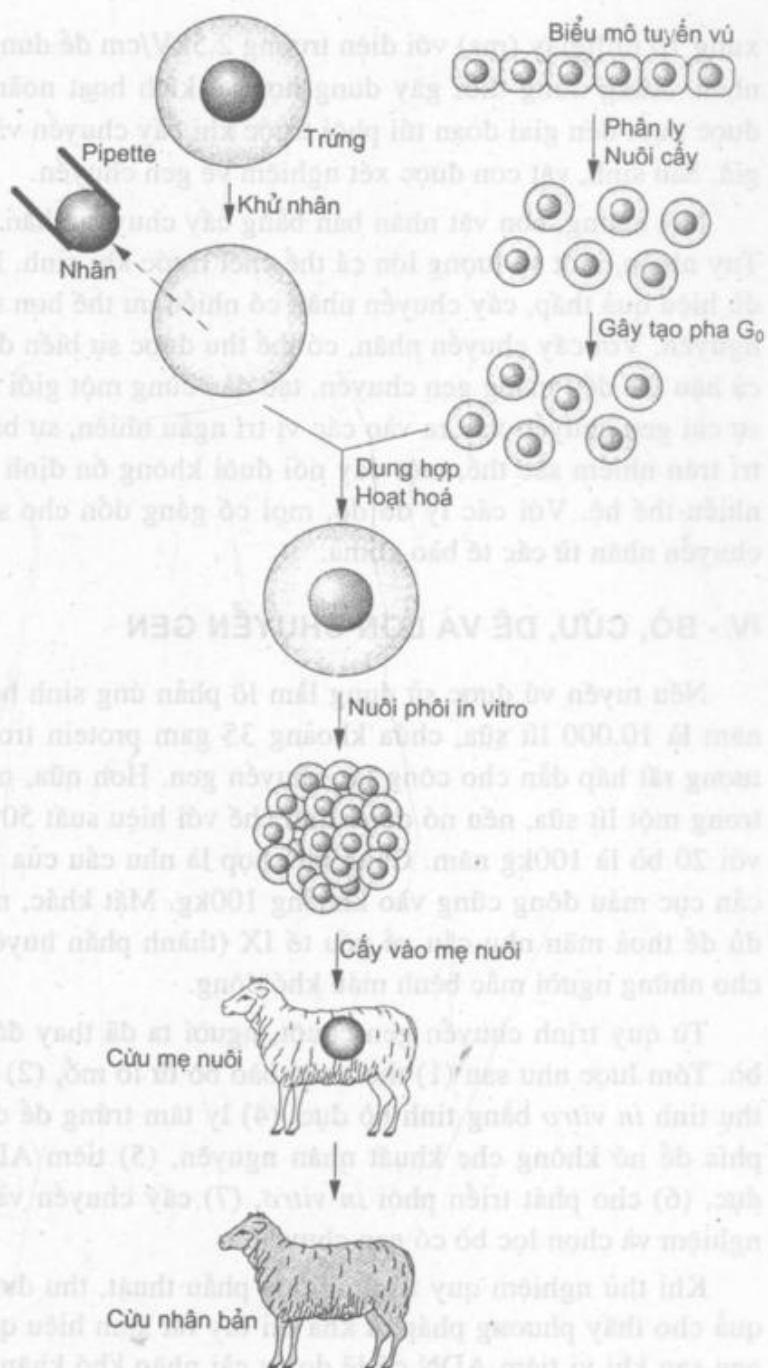


Hình 11.15. Sự chết tế bào bằng kỹ thuật di truyền

- A. Các phân tử HB-EGFr (các que hình chữ nhật trên màng) định vị màng được tổng hợp trong tế bào gan từ cADN HB-EGFr gen chuyển dưới sự kiểm soát của  $P_{gan}$  - promotor đặc hiệu tế bào gan.
- B. Độc tố bạch hầu (Hình oval lớn và nhỏ) bám vào HB-EGFr và được nhập bào vào trong tế bào. Tiểu phần của độc tố (hình oval nhỏ) được giải phóng vào sol tế bào và gây bất hoạt EF-2. Tế bào chết do ngừng tổng hợp protein.

### III - NHÂN BẢN GIA SÚC BẰNG CẤY CHUYỂN NHÂN

Trong trường hợp được quảng cáo rầm rộ, con cừu có tên Dolly được nhân bản bằng cách cấy chuyển nhân từ tế bào vú của con vật trưởng thành. Đây là chứng minh đầu tiên về tính đa tiềm năng (toute n'gâng) của nhân một tế bào chuyên hoá. Từ khi nhân bản Dolly, nhân tế bào xoma được dùng để nhân bản đại gia súc, dê và lợn. Trong các trường hợp này, các quy trình cấy chuyển nhân là giống nhau (hình 11.16). Tóm lược như sau, các tế bào cho của phôi, thai hay trưởng thành được tách riêng, nuôi cấy và biến đổi di truyền. Mặc dù không phải khi nào cũng dễ dàng đối với các tế bào trưởng thành, nên nuôi cấy lâu dài vì các nhà thực nghiệm còn cần thời gian để thực hiện những biến đổi di truyền, như hoạt hoá cả hai alen của một locus hoặc gây biến đổi đa gen. Sau khi đã thiết lập các dòng tế bào với các biến đổi di truyền đặc hiệu, từng tế bào riêng biệt được cho dung hợp với noãn bào măt nhân bằng xung điện ngắn. Ví dụ như dùng



Hình 11.16. Nhân bản cừu bằng cấy chuyển nhân

Hút bỗ nhân trứng (mũi tên chấm chấm). Các tế bào từ biểu mô tuyển vú con trưởng thành được nuôi cấy, và kích tạo giai đoạn G<sub>0</sub> bằng ức chế tăng trưởng. Dung hợp tế bào G<sub>0</sub> và trứng măt nhân và nuôi trứng với nhân mới hoặc in vitro hoặc trong ống dẫn trứng tới giai đoạn phôi sớm, sau cấy phôi vào mẹ nuôi chờ phát triển tới khi sinh. Trong thí nghiệm của Wilmut và cs (1997), 277 trứng măt nhân được dung hợp với các tế bào G<sub>0</sub> tuyển vú, trong 29 phôi cấy truyền, 1 phôi phát triển thành cừu con sống.

xung 10 mili giây (ms) với điện trường 2,5kV/cm để dung hợp sợi bào với noãn bào mất nhân. Xung đồng thời gây dung hợp và kích hoạt noãn bào. Các noãn bào dung hợp được nuôi đến giai đoạn túi phôi trước khi cấy chuyển vào tử cung con mẹ nuôi có chửa giả. Sau sinh, vật con được xét nghiệm về gen chuyển.

Nói chung, con vật nhân bản bằng cấy chuyển nhân sống sót thường là khoẻ mạnh. Tuy nhiên, một số lượng lớn cá thể chết trước khi sinh. Nguyên nhân còn chưa rõ. Mặc dù hiệu quả thấp, cấy chuyển nhân có nhiều ưu thế hơn so với việc tiêm ADN vào nhân nguyên. Với cấy chuyển nhân, có thể thu được sự biến đổi di truyền đặc hiệu vị trí ; tất cả hâu thế đều mang gen chuyển, tạo đòn cùng một giới tính. Ngược lại, khi tiêm ADN, sự cài gen chuyển xảy ra vào các vị trí ngẫu nhiên, sự biểu hiện thường khó khăn do vị trí trên nhiễm sắc thể, một dãy nối đuôi không ổn định và để có dòng chuyển gen cần nhiều thế hệ. Với các lý do đó, mọi cố gắng dần cho sự hoàn thiện phương pháp cấy chuyển nhân từ các tế bào xoma.

#### **IV - BÒ, CỪU, DÊ VÀ LỢN CHUYỂN GEN**

Nếu tuyến vú được sử dụng làm lò phản ứng sinh học (bò sữa, với sản lượng hàng năm là 10.000 lít sữa, chứa khoảng 35 gam protein trong một lít sữa), bò là một đối tượng rất hấp dẫn cho công tác chuyển gen. Hơn nữa, nếu protein tái tổ hợp có 1 gam trong một lít sữa, nếu nó được tinh chế với hiệu suất 50%, sản lượng protein tái tổ hợp với 20 bò là 100kg/năm. Cũng phù hợp là nhu cầu của nhân loại về protein C để ngăn cản cục máu đông cũng vào khoảng 100kg. Mặt khác, một bò chuyển gen cũng là quá đủ để thoả mãn nhu cầu về yếu tố IX (thành phần huyết tương thromboplastin), dùng cho những người mắc bệnh máu khó đông.

Từ quy trình chuyển gen chuột, người ta đã thay đổi và hoạch định quy trình cho bò. Tóm lược như sau (1) thu noãn bào bò từ lò mổ, (2) cho chín *in vitro* noãn bào, (3) thụ tinh *in vitro* bằng tinh bò đực, (4) ly tâm trứng để dồn các hạt noãn hoàng về một phía để nó không che khuất nhân nguyên, (5) tiêm ADN cần thiết vào nhân nguyên đực, (6) cho phát triển phôi *in vitro*, (7) cấy chuyển vào tử cung bò mẹ nuôi, (8) xét nghiệm và chọn lọc bò có gen chuyển.

Khi thử nghiệm quy trình không phẫu thuật, thu được 2 bò từ 2470 noãn bào. Kết quả cho thấy phương pháp là khả thi tuy rất kém hiệu quả. Số lượng ít các con chuyển gen sau khi vi tiêm ADN có lẽ do sự cài nhập khó khăn. Hơn nữa, thời gian và sức lực tiêu tốn nhiều cho việc nuôi dưỡng những con nghi là có gen chuyển. Để tiết kiệm thời gian và sức lực, từ phôi đang phát triển, trước túi phôi, người ta lấy một ít tế bào đem xét nghiệm gen chuyển bằng PCR. Việc lấy này không ảnh hưởng gì đến phát triển bình thường. Xét nghiệm đảm bảo chỉ những phôi mang gen chuyển là được cấy truyền.

Một trong các mục tiêu của chuyển gen ở bò là biến đổi thành phần của sữa. Sản lượng pho mát làm từ sữa tỷ lệ thuận với hàm lượng K casein. Thật đáng giá nếu tăng được hàm lượng casein bằng gen chuyển casein biểu hiện quá mức. Với một ứng dụng

khác, nếu tăng được hàm lượng lactaza thì sẽ giảm được lactozơ trong sữa, mặc dù một ít lactozơ là cần thiết cho tiết sữa. Sữa loại này được nhiều người hoan nghênh vì họ không tiêu hoá được sữa hoặc sản phẩm sữa có lactozơ. Thêm nữa, kỹ thuật di truyền có thể làm tuyến vú trở thành cơ quan sản xuất các kháng nguyên virus và các kháng nguyên khác mà không bị bất hoạt khi dùng qua đường miệng với tính chất vacxin, hoặc kháng thể cho miễn dịch thụ động cho người và gia súc. Mặc dù chuyển gen ở bò có nhiều hứa hẹn, song tiến bộ rất chậm trong việc sản xuất một số lớn con chuyển gen, do từ lúc thụ tinh cho tới khi cho sữa cần tới hơn 2 năm.

Hiện nay, các bệnh truyền nhiễm của gia súc được kiểm soát bằng tiêm vacxin, thuốc, cách ly. Chi phí cho việc phòng và chống bệnh chiếm tới 20% giá trị của sản phẩm. Với đại gia súc, người ta đã thử tạo những con vật có tính di truyền chống bệnh vi khuẩn, bệnh virus và ký sinh. Ví dụ như di truyền tính chống bệnh vi khuẩn như viêm vú (áp xe tuyến vú) ở bò sữa, dịch tả lợn sữa, dịch tả gà. Nếu cơ sở của tính kháng bệnh là do đơn gen, thì có khả năng tạo con vật chuyển gen với sự bảo vệ đặc hiệu chống lại bệnh nhiễm khuẩn sau khi các gen này được tách ra và xác định.

Một cách tiếp cận khác để tạo các dòng động vật chuyển gen chống chịu với các bệnh truyền nhiễm là tạo tính miễn dịch di truyền qua chuyển gen. Có nhiều gen đóng góp cho hệ miễn dịch (như các gen tương hợp mô chính, các gen thụ thể tế bào T, các gen lymphokine) được nghiên cứu và cho là có triển vọng. Tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu sơ bộ được ưa thích khi các gen ghi mã cho mạch năng (H) và nhẹ (L) của kháng thể đơn dòng được chuyển cho chuột, thỏ, dê và lợn. Tính hợp lý của chiến lược này là tạo một cơ chế bảo vệ sinh học di truyền cho các con chuyển gen để loại trừ việc tiêm vacxin.

Phương pháp đưa vào cơ thể nhận các gen chuyển mã cho các kháng thể đặc hiệu gọi là gây miễn dịch *in vivo*. Để thử nghiệm ý đồ này, các gen mã các mạch globulin miễn dịch của kháng thể đơn dòng chuột chống lại kháng thể bám vào 4-hydroxy-3-nitrophenylaxetat được nhân dòng nối đuôi nhau và tiêm vào trứng thụ tinh của chuột, thỏ và lợn. Trong mỗi trường hợp, hoạt tính kháng thể đơn dòng thấy trong huyết thanh các con chuyển gen. Tuy nhiên, lượng kháng thể đơn dòng chứa cả mạch H và mạch L là rất thấp. Các thiết kế khác nhau đang được xem xét nhằm khắc phục vấn đề này.

Sự chuyển gen ở cừu và dê nhằm vào phát triển tuyến vú thành một lò phản ứng sinh học để sản xuất các protein dược liệu. Mặc dù sản lượng sữa là thấp hơn bò, nhưng cũng có thể đạt vài trăm lít/năm (bảng 11.2). Với phương pháp khá giống với phương pháp tạo chuột chuyển gen, với thiết kế có promotor đặc hiệu tuyến vú điều khiển các trình tự gen người, các nhà nghiên cứu phải tạo con chuyển gen cừu, dê, thỏ, lợn cho hơn 100 các protein người khác nhau tiết vào sữa (bảng 11.3). Các protein này cũng được glycosyl hoá và có các biến đổi hậu dịch mã. Trong nhiều trường hợp, các protein tái tổ hợp (TH) có hoạt tính sinh học giống hệt với các protein tách từ người. Tuy nhiên cần tiến hành các nghiên cứu thật chi tiết, thật tỷ mỷ để khẳng định tuyệt đối là các protein tái tổ hợp hoàn toàn giống với protein tự nhiên (TN).

Nói chung, sự biểu hiện gen chuyển trong tuyến sữa của cừu, bò, lợn và thỏ không ảnh hưởng gì tới con tiết sữa cũng như các con bú sữa. Tuy nhiên, không phải khi nào cũng đúng như thế. Ví dụ, khi gen chuyển là cho hoocmon tăng trưởng bò - dưới sự điều khiển của promotor metallothionein - đưa vào lợn, kết quả lại trái ngược. Mặc dù mức hoocmon khá đa dạng trong các lợn khác nhau, tuy nhiên về toàn cục chung cho nhóm thì thấy có tăng hiệu quả sử dụng thức ăn để tăng trọng. Tuy thế, phản ứng dương tính không bù lại được các rối loạn xảy ra như viêm dạ dày, suy thận, viêm màng lót tim, cứng khớp, hay viêm phổi. Nguyên nhân của các triệu chứng này không rõ. Có thể là các mô trên bị tác động kéo dài của hoocmon tăng trưởng, do gen chuyển hoạt động liên tục. Các nghiên cứu này chỉ rõ là ý tưởng dù có hấp dẫn đến đâu, không thể tránh được thử nghiệm. Tuy nhiên trường hợp trên có thể là ngoại lệ và đã có nhiều thành công trong việc tạo lợn chuyển gen khỏe mạnh.

**Bảng 11.2. Sản lượng sữa và sản lượng protein tái tổ hợp từ con vật dùng để biểu hiện gen chuyển trong tuyến vú**

Con vật	Sản lượng sữa (lít/năm)	Sản lượng protein TTH (kg/con cái/năm)
Thỏ	5	0,02
Lợn	300	1,5
Cừu	500	2,5
Dê	900	4
Bò	10.000	60

**Bảng 11.3. Một số protein ngoại lai biểu hiện trong tuyến vú của các con vật chuyển gen**

STT	Protein	STT	Antithrombin III
1	Yếu tố VIII	13	Peptide giống glucagon
2	TNTT	14	Albumin
3	TNTT giống insulin	15	Lactoferrin
4	Kháng thể đơn dòng	16	Protein C
5	Chất hoạt hoá plasminogen mô	17	$\alpha$ -Glucosidase
6	Calcitonin	18	Yếu tố IX
7	Fibrinogen	19	TN kích tạo tập đoàn bạch cầu hạt
8	Hemoglobin	20	Insulin
9	Interleukin 2	21	Lysozyme
10	TNTT thần kinh $\beta$	22	Superoxide mutase
11	$\alpha$ 1-Antitrypsin	23	$\alpha$ -Lactalbumin
12	Erythropoietin	24	Antithrombin III

TNTT : Tác nhân tăng trưởng

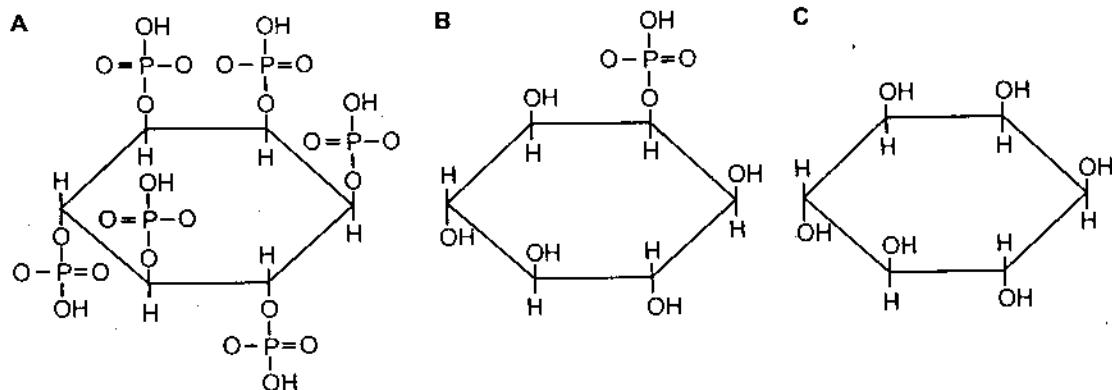
TN : Tác nhân

Hiện nay, máu người từ những người cho tình nguyện là nguồn duy nhất cung cấp cho những người mất máu. Một chương trình tích cực động viên những người cho và xét nghiệm các máu cho về virus HIV và các virus khác. Gánh nặng đó sẽ nhẹ bớt nếu như có nguồn cung cấp máu người an toàn hoặc dịch vô bào thay thế máu có nguồn gốc không phải từ người. Đây là một vấn đề vô cùng phức tạp và không phải dễ gì giải quyết được. Tuy nhiên, như bước sơ khởi, có một số ứng dụng y tế nếu như có được protein mang oxy hemoglobin. Như vậy, với thiết kế gồm vùng điều chỉnh từ gen  $\beta$ -globin người kết hợp với 2 gen  $\alpha_1$ -globin và một  $\beta^A$ -globin người, người ta đã tạo được lợn khoẻ mạnh biểu hiện hemoglobin người trong tế bào máu của chúng. Sau khi promotor  $\beta$ -globin người thay thế promotor  $\beta$ -globin lợn, lượng hemoglobin người được sản xuất nhiều hơn. Theo các tiêu chuẩn hóa học, hemoglobin người do lợn sản xuất là không khác gì với hemoglobin tự nhiên. Hemoglobin chuyển gen người có thể tách ra dễ dàng khỏi hemoglobin lợn bằng sắc ký.

Mặc dù bước đầu các kết quả này đã chỉ ra rằng, hemoglobin người có thể tinh chế từ máu con vật chuyển gen. Tuy nhiên hemoglobin tự do không thể thay cho máu nguyên được vì nó không thể trao đổi oxy có hiệu quả như hemoglobin trong hồng cầu. Hơn thế, sản phẩm phân giải hemoglobin tự do trong máu, khi sử dụng cho động vật, gây hư thận. Như vậy, việc tạo máu nhân tạo để thay cho máu nguyên ở người là còn xa vời.

Chuyển gen cũng hướng tới giải quyết các vấn đề khác liên quan đến môi trường. Ví dụ, vấn đề sinh thái lớn nổi lên khi nuôi công nghiệp lợn và gà, tức là các động vật dạ dày đơn và chúng có rất nhiều phospho trong phân. Phân lợn, gà khi dùng để bón có thể đi vào hệ thống dẫn nước, gây phát triển quá mạnh tảo lam, làm cạn kiệt nguồn oxy, gây chết cá và các động vật thuỷ sinh khác. Hơn nữa, lượng phospho lớn trong môi trường có thể làm tăng lượng khí gaz, tăng hiệu ứng nhà kính, làm nóng trái đất.

Lợn và gà thải một lượng lớn phospho vì, không như bọn nhai lại, chúng không tiêu hóa được phylat (myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisdihydrogen orthophosphat, hay axit phytic) (hình 11.17A), dạng phospho chủ yếu trong thức ăn có nguồn gốc thực vật. Ví dụ, nguồn thức ăn chính của lợn là đậu nành, chứa tới 50% phosphat là phylat. Không chuyển hoá được phylat do không có enzym phylaza có trong thực vật và vi sinh vật. Đa số phylaza cắt phosphat từ phylat để tạo inositol 2-monophosphat (hình 4.17B) hay inositol (hình 4.17C). Người ta cho phylaza vào thức ăn để tăng cường hấp thu phospho và giảm hàm lượng phospho trong phân. Tuy nhiên sự bổ sung đó là tối kén và ít hiệu quả vì đa phần enzym là bị hỏng khi chế biến và bảo quản thức ăn.



Hình 11.17. Cấu trúc phân tử của axit phytic (A), inositol 2 momophosphat (B) và inositol (C)

Như một chiến lược khác, hợp lý hơn nếu lợn chuyển gen biểu hiện gen phylaza trong tuyến nước bọt thì sẽ khắc phục được các hậu quả ô nhiễm và dinh dưỡng của phylat trong thức ăn. Để thực hiện ý đồ này, người ta đã dùng phương pháp tiêm vào nhân nguyên để đưa vào lợn thiết kế gen chuyển gồm gen phylaza appA của *E.coli* dưới sự kiểm soát của promotor protein tiết của tuyến mang tai, điều khiển sự phiên mã protein đặc hiệu tuyến nước bọt ở chuột. Các dòng chuyển gen được xét nghiệm về tăng trưởng và thải phospho khi thức ăn đậu nành có 53% phospho dưới dạng phylat. Trong các điều kiện này, phylat đậu nành được tiêu hoá hoàn toàn và hàm lượng phospho trong phân giảm đi 75% so với các con không chuyển gen. Không có ảnh hưởng gì có hại trong các con chuyển gen phylaza. Cần các nghiên cứu tiếp tục để khẳng định là phylaza không tổng hợp ngoài tuyến nước bọt và chất lượng thịt là không đổi, và phylaza không gây dị ứng. Phương pháp này đã làm giảm giá thành sản phẩm từ lợn và gà và giảm hậu quả của phân lên môi trường. Một cách rất thích hợp, lợn có gen phylaza chuyển gen được gọi là “lợn môi trường”.

Động vật là nguồn cơ quan tiềm năng để cấy ghép cho người. Cấy ghép cơ quan người cho người (cấy ghép trong loài - allotransplantation) như tim, gan, thận và phổi là có hiệu quả 70-80% cho năm thứ nhất và 50-70% trong 5 năm. Tuy nhiên, trên toàn thế giới, nhu cầu cơ quan vượt quá khả năng cung cấp. Ví dụ ở Canada, năm 1997 cần 22.000 tim, gan, thận và phổi, thế nhưng chỉ thực hiện được 1500 ca. Do đó người ta nghĩ đến việc cấy ghép từ động vật cho người (cấy khác loài – xenotransplantation) để giải quyết sự thiếu hụt đó. Lợn được chọn như nguồn cơ quan cấy ghép vì lợn được nuôi làm thực phẩm, và như thế có thể được chấp nhận để cung cấp cơ quan. Hơn nữa, cơ quan của chúng cũng có kích thước và chức năng sinh lý giống của người và không có bệnh truyền nhiễm nào của lợn gây bệnh cho người.

Cản trở lớn nhất cho việc cấy ghép cơ quan giữa các loài là sự tróc thải cơ quan ghép. Bong tróc là kết quả bám các kháng thể có sẵn của cơ thể chủ vào các epitop đường ( $\alpha$ -Gal) trên bề mặt tế bào cơ quan ghép. Các kháng thể bám gây phản ứng viêm (hệ bô thể) phá huỷ các tế bào bám kháng thể và làm tróc cơ quan ghép trong vòng vài giờ.

Trong điều kiện tự nhiên, protein trên bề mặt các tế bào lót mạch máu bảo vệ tế bào khỏi phản ứng viêm. Các protein úc chế bô thể là đặc hiệu loài. Do đó, có lý do để cho rằng, nếu con vật cho mà mang một hoặc hơn các gen úc chế bô thể người, cơ quan ghép sẽ được bảo vệ khỏi phản ứng viêm đầu tiên. Với mục đích đó, người ta đã tạo được lợn chuyển gen với các gen úc chế bô thể người.

Các tế bào của các lợn chuyển gen này không bị tác động bởi các thành viên của hệ bô thể. Hơn thế, các tế bào khứu giác bọc từ lợn chuyển gen, mà biểu hiện các protein úc chế bô thể người, có khả năng tái sinh và bọc myelin cho tuỷ sống của chuột bị trấn áp miễn dịch ; điều đó nói lên rằng, cấy khác loài có thể chữa các tổn thương thần kinh mà không có sự bong tróc miếng ghép. Trong một số thí nghiệm sơ bộ khác, không xảy ra bong tróc khi thận lợn chuyển gen với biểu hiện 2 protein úc chế bô thể người được ghép cho khỉ. Tuy nhiên lại xuất hiện vấn đề lớn khác. Các con vật chủ bị chết vài ngày

sau ghép do bị đông máu quá mạnh dù đã chữa bằng heparin. Còn chưa rõ là liệu có thể đánh bật các gen mã enzym tạo α-Gal epitop và/hoặc đưa các gen mã enzym cắt α-Gal khỏi bề mặt tế bào, như thế sẽ tránh được bong tróc nhanh, đông máu nhanh và phản ứng bong tróc chậm.

Người ta cũng nghĩ đến khả năng là các yếu tố gây bệnh ẩn ở lợn, như nội virus phiên mã ngược lợn (PERV) có thể hoạt hoá sau cấy ghép cho người và gây bệnh cho người. Các thông tin sơ khởi cho biết là PERV có tái bản trong một số dòng tế bào người đã nuôi cấy lâu dài mà không tái bản trong các dòng mới nuôi cấy hoặc *in vivo*. Hơn nữa chưa thấy có triệu chứng gì do virus này ở người. Tất nhiên là mọi phức tạp về y tế cũng như về đạo đức phải được giải quyết trước khi cấy ghép khác loài có thể áp dụng được trong lâm sàng.

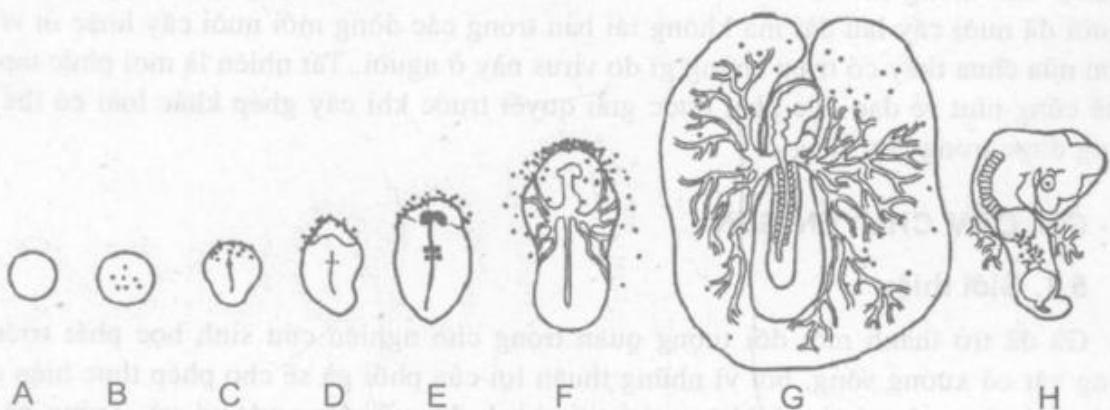
## V - GIA CẦM CHUYỂN GEN

### 5.1. Giới thiệu

Gà đã trở thành một đối tượng quan trọng cho nghiên cứu sinh học phát triển ở động vật có xương sống, bởi vì những thuận lợi của phôi gà sẽ cho phép thực hiện các quá trình thao tác phôi mà không thể tiến hành đối với động vật có vú. Trứng gà đã được thụ tinh có thể dễ dàng duy trì trong các buồng đã được làm ấm, phôi gà phát triển trôi nổi trên khối noãn hoàng dinh dưỡng, tất cả những điều kể trên đã làm cho phôi gà rất thuận tiện cho thao tác. Chính vì thuận tiện và thoải mái trong quá trình thao tác phôi gà mà đã đưa đến rất nhiều kiến thức thực nghiệm sâu sắc về quá trình phát triển. Người ta phát hiện thấy rằng, các tế bào chim cút có hình thái nhân khác biệt so với các tế bào gà, và các nhà khoa học đã lợi dụng sự khác biệt này thông qua cấy ghép các tế bào chim cút vào phôi gà, sau đó theo dõi số phận của các tế bào được cấy ghép trong suốt quá trình phát triển (Le Dourain, 1973). Mô hình khám chim cút - gà cũng đã dẫn tới rất nhiều phát hiện về quá trình phát triển thần kinh (Kinutani và Le Dourain, 1985 ; Kinutani và cs, 1986).

Mặc dù, chuột chuyển gen đã được tạo ra phục vụ cho lĩnh vực nghiên cứu cách đây hơn 20 năm, công nghệ chuyển gen ở gà lại chậm hơn so với công nghệ chuyển gen thực hiện trên động vật có vú. Bởi vì công nghiệp gia cầm ở nước Mỹ là một ngành công nghiệp nhiều tỷ đô la, và cuối cùng về mặt thương mại người ta đã quan tâm tới việc sử dụng công nghệ chuyển gen nhằm tăng sản lượng thịt và trứng. Hướng quan trọng nhất của công nghệ chuyển gen gia cầm là tăng khả năng kháng bệnh mà đã trở thành một phương pháp phổ biến trong thực vật chuyển gen. Bên cạnh đó, gà mái nuôi là đối tượng có tiềm năng cao trong sản xuất có hiệu quả các protein trị liệu cho công nghiệp dược phẩm do giá cả chăn nuôi thấp, môi trường vô trùng tự nhiên của trứng, lượng lớn protein được tạo ra trên một quả trứng, và lượng lớn trứng được tạo ra trên một con gà mái trên năm (Ivarie, 2003). Do đó, một vài nhà nghiên cứu đã cố gắng để tạo ra gà chuyển gen như là mô hình cho lĩnh vực nghiên cứu sinh học phát triển. Gần đây, các dòng gà chuyển gen biểu hiện beta-galactosidaza của vi khuẩn đã được tạo ra từ trường Đại học Tổng hợp Quốc gia Bắc Carolina thông qua sử dụng retroviral vector

(virus phiên mã ngược) SNIZ, vector này được thiết kế bởi Takashi Mikawa (Mikawa và cs 1991, 1992). Việc tạo ra gà chuyển gen là một sự nỗ lực vô cùng phức tạp và khó khăn, nhưng nhờ có các cơ hội trong tương lai thông qua việc sử dụng hệ thống Cre/Lox hoặc các protein phát huỳnh quang màu xanh để tạo ra các mô hình gia cầm chuyển gen mới phục vụ cho cộng đồng khoa học. Mục đích của mục này là cung cấp một tổng quan về các phương pháp, sự cố gắng và tình trạng hiện tại của các công nghệ nhằm tạo ra gia cầm chuyển gen.



*Hình 11.18. Sơ đồ phát triển của tế bào sinh dục nguyên thuỷ ở gia cầm bắt đầu từ khi đẻ trứng cho tới khi chúng cư trú trong tuyến sinh dục nguyên thuỷ*

Sự chuyển hoá về tế bào mầm có lẽ bắt đầu vào giai đoạn X (A) cho tới giai đoạn XIII (B), các tế bào sinh dục nguyên thuỷ đã được xác định trong quá trình hình thành liềm mầm (C-E).

F-H : trong suốt sự hình thành đảo máu và hệ thống mạch (F), các tế bào mầm đi vào vòng tuần hoàn của phôi và di cư chủ động vào gò mầm sinh dục (H). Để thành công trong việc tạo chim chuyển gen, đòi hỏi các tế bào sinh dục nguyên thuỷ trở thành mục tiêu có hiệu quả cho gen chuyển. Trong hầu hết các trường hợp, vector virus thường được ứng dụng cho chuyển gen vào phôi vào thời điểm đẻ trứng (A, B, đĩa phôi ở giai đoạn X) nhưng các gia cầm chuyển gen thành công đã được tạo ra lại bằng cách lây nhiễm các tế bào sinh dục nguyên thuỷ nằm trong liềm mầm (C, E).

#### *Sự thụ tinh và phát triển phôi sớm :*

Hình thành cấu trúc trứng gia cầm bắt đầu khi trứng chín và rụng từ buồng trứng. Tinh trùng được dự trữ trong tuyến chứa tinh của con cái, và sự thụ tinh xảy ra khi trứng di vào phễu trứng của ống dẫn trứng. Trứng thụ tinh di vào đoạn tạo lòng trắng (magnum), trứng di tiếp tới đoạn ống kế cận để hình thành màng vỏ trong và ngoài, và chuẩn bị cho lắng đọng canxi để hình thành vỏ trứng trong tuyến vỏ. Mất khoảng 3,5 tới 4 giờ để trứng di chuyển từ phễu ống dẫn trứng tới tuyến vỏ, và mất khoảng 20 giờ để hình thành vỏ trứng. Các phân cắt đầu tiên xảy ra trên đường đi của trứng xuống tuyến vỏ. Qua 20 giờ hình thành vỏ trứng, sự phân chia tế bào tiếp tục diễn ra, và khi đẻ, phôi có khoảng 50.000 - 60.000 tế bào trên bề mặt của khối noãn hoàng (Spratt và Haas, 1960). Có khó khăn lớn về mặt kỹ thuật trong công nghệ chuyển gen trong thao tác phôi gần thời điểm thụ tinh, bởi vì có rất nhiều hiện tượng sinh lý phức tạp xảy ra

khi nuôi dưỡng và bảo vệ phôi từ môi trường bên ngoài. Khi thu một phôi ở giai đoạn một tế bào ta lại phải giết chết một gà mái trưởng thành, và điều này gây ra những khó khăn trong việc thu nhận một số lượng đáng kể trứng, phục vụ cho bất kỳ phương thức nào hướng tới mục đích tạo ra gia cầm chuyển gen.

### 5.2. Tổng quan về tế bào sinh dục

Tất cả phương pháp tạo ra gia cầm chuyển gen dựa trên các kỹ thuật được thiết kế để cài nguyên liệu di truyền mong muốn vào trong tế bào, mà tế bào này sẽ cho ra các tế bào sinh dục (mầm). Nhìn chung, hầu hết các kỹ thuật sẽ tạo ra được những con gà (mái và trống) khảm các gen chuyển trong dòng sinh (chỉ một nhóm tế bào trong tuyến sinh dục sẽ mang gen chuyển). Khi tinh trùng hoặc trứng mang gen chuyển kết hợp với tế bào trứng hoặc tinh trùng không mang gen chuyển, kết quả tạo ra thế hệ sau mang gen chuyển trong tất cả các tế bào của cơ thể. Do đó, dòng sinh trở thành mục tiêu có hiệu quả và cần thiết trong việc tạo ra gia cầm chuyển gen.

Quá trình phát triển dòng sinh dục bắt đầu với việc hình thành các tế bào sinh dục nguyên thuỷ (Primordial germ cells - PGCs) trong phôi (được tóm tắt từ Wentworth và Wentworth, 2000 ; D'Costa và cs., 2001). Người ta cho rằng dòng sinh ở gà đã được quyết định trước bởi tế bào chất sinh dục từ cơ thể mẹ, vì một protein gà, giống với Vasa (là một protein bám ARN) đã được phát hiện ở phân cắt đầu tiên của trứng được thụ tinh và trong PGCs chuẩn (TsuneKawa và cs., 2000), tuy nhiên mô hình quyết định sớm của sự phát triển tế bào sinh dục ở gia cầm cần phải được chứng minh thêm. PGCs chuẩn đã được tìm thấy trong vùng ngoài phôi được gọi là liềm mầm. Kết quả là, sự di cư của PGCs từ liềm mầm tới gờ mầm sinh dục xảy ra theo hai pha : (1) bị động thông qua vòng tuần hoàn trong và ngoài phôi (Fujimoto và cs., 1976) và (2) chủ động khi PGCs từ máu di cư vào biểu mô sinh dục qua mạc treo ruột phía lưng.

Các tế bào sinh dục là mục tiêu quan trọng cho bất kỳ biến đổi nào về genôm gia cầm, bởi vì các tế bào này cuối cùng cũng sẽ di truyền các gen chuyển tới các thế hệ tiếp theo. Hiện nay, những mục tiêu phổ biến cho sự biến đổi dòng sinh bao gồm trứng trưởng thành, tinh trùng trưởng thành, trứng mới thụ tinh và tế bào sinh dục nguyên thuỷ trong suốt quá trình hình thành, di cư và tập trung trong tuyến sinh dục của chúng.

### 5.3. Thao tác phôi

Khó khăn chính mà phải đối mặt trong việc sử dụng bất kỳ phương pháp nào để tạo gia cầm chuyển gen thông qua thao tác phôi từ trứng mới để nhằm đưa các gen lạ vào trong dòng sinh, là làm thế nào để có thể đạt được một tỷ lệ nở có ý nghĩa để sinh ra một lượng đáng kể thế hệ con G0 nhằm sàng lọc sự tích hợp gen chuyển vào trong genôm của cơ thể nhận. Trước kia, một cửa sổ đã được cắt trên vỏ quả trứng và được gắn trở lại bằng màng vỏ sau khi thao tác phôi. Tuy nhiên, khả năng nở là rất thấp khi sử dụng kỹ thuật kinh điển và thô sơ (Kinutani và Le Dourain, 1985 ; Petitte và cs, 1990). Khả năng nở của trứng mờ cửa sổ là vô cùng quan trọng đối với việc sản sinh ra gia cầm chuyển gen một cách có hiệu quả.

Người ta nâng được khá cao tỷ lệ nở của trứng thông qua cách khoan cắt vỏ trứng tạo cửa sổ, nhô lên cửa sổ dung dịch đậm đặc PBS, tiêm các tế bào vào phôi sau đó gắn trứng với màng vỏ và xi măng Duco (Speksnijder và Ivarie, 2000). Quy trình tạo cửa sổ đã cải thiện tỷ lệ nở từ khoảng 6% tới 30%. Quy trình mở cửa sổ này cũng làm tăng tỷ lệ nở từ 23% đến 35% trong trường hợp tiêm có sử dụng retrovirus (Harvey và cs., 2002). Khả năng nâng cao tỷ lệ nở cũng đã được công bố bằng cách cất giữ trứng theo chiều dọc trong vòng 5-7 ngày trước khi tiêm các tế bào chuyển gen qua đầu tùng của trứng (BeADNrczyk và cs., 2000).

Một giải pháp khác bên cạnh kỹ thuật mở cửa sổ là sử dụng hệ thống nuôi cấy bên ngoài vỏ trứng (ex ovo) đối với trứng mới đẻ (Rowlett và Simkiss, 1987, Perry, 1988). Có nghĩa là, thành phần của trứng mới đẻ được đặt vào một vỏ trứng mới thay thế cho vỏ trứng cũ và phôi sẽ được tiêm với vector thích hợp mang gen mong muốn. Sau đó vỏ trứng mới này được phủ bằng giấy bóng Saran-Wrap (Dow chemical, Midland, MI) trong 3 ngày. Tiếp theo sau đó, phôi gà được chuyển tới vỏ trứng của con gà tây và được phủ với giấy bóng Handi-Wrap (Dow chemical – bán trong các siêu thị để bảo quản thức ăn) cho tới khi nở (Petitte và Mozdziak, 2002). Phương pháp của Borwornpinyo trên cơ sở biến đổi từ phương pháp của Perry (1988) và Rowlett và Simkiss (1987) đã nâng cao tỷ lệ nở từ 20% đến 35% khi tiêm cùng với retrovirus. Tỷ lệ nở là rất có ý nghĩa nhằm tạo ra những con gà G0 (thế hệ đầu tiên mang gen chuyển) mang gen LacZ trong tinh dịch của chúng (Mozdziak và cs, 2003). Gần đây, kỹ thuật mở cửa sổ và nuôi phôi ngoài trứng chỉ là những cách đưa ADN lật vào phôi gà và cho ra con cháu sống sót.

#### 5.4. Tổng quan về Retrovirus

Các vector retrovirus đã trở thành vector chuyển gen phổ biến và chúng có thể được sử dụng để đưa các gen lật vào dòng sinh của gia cầm. Các kỹ thuật chuyển gen nhờ retrovirus đã được sử dụng thường xuyên trong việc tạo ra gia cầm chuyển gen (Boselman và cs, 1989, 1990 ; Harvey và cs. 2002 ; Harvey và Ivarie, 2003). Bởi vì số lượng retrovirus lớn giúp cho chúng có thể chuyển gen quan trọng vào nhiều tế bào. Tóm lại retrovirus có genoma là ARN được bao bọc trong một lõi protein chứa các enzym integrase, reverse transcriptaza, và proteaza. Các protein vỏ của virus liên kết với các receptor đặc hiệu trên bề mặt của tế bào chủ, và như vậy các hạt virus được vận chuyển vào tế bào bằng hiện tượng nhập bào qua trung gian receptor. Sau đó ARN phiên mã ngược thành cADN, cADN được vận chuyển vào nhân và tích hợp (cài) vào ADN của vật chủ thông qua hoạt động của enzym integrase lặp lại tận cùng đầu dài (long-terminal repeat). ADN đã cài của tiền virus được nhân lên trong tế bào và được di truyền theo định luật Mendel. ADN đã cài của tiền virus có thể được phiên mã thành ARN của virus và tổng hợp nên các protein bao gồm polimeraza (pol), các kháng nguyên nhóm liên kết (gag) và các protein vỏ (env). Cả 3 lớp protein này kết hợp với nhau hình thành nên một lõi virus mới và đóng gói genoma ARN virus. Phức hợp mới này được vận chuyển tới màng tế bào vật chủ và sau đó được vận chuyển ra ngoài tế

bào. Trong trường hợp đối với vector còn khả năng tái bản (replication-competent vectors), các gen cấu trúc của virus và các bước tiến hành đóng gói tạo virus mới là còn nguyên vẹn, cho phép tiếp tục tạo ra các hạt lây nhiễm có khả năng nhiễm vào các tế bào khác. Do đó, vector retrovirus còn khả năng tái bản, rất dễ dàng lây nhiễm tới một số lượng đáng kể các tế bào sinh dục nhằm chuyển những gen quan tâm tới các thế hệ tiếp theo.

Tuy nhiên, gia cầm chuyển gen được tạo ra bằng cách sử dụng retrovirus còn khả năng tái bản sẽ vẫn tiếp tục giải phóng virus vào môi trường, điều này là không thể chấp nhận được. Do đó, các vector retrovirus tái bản thiếu (mất khả năng tái bản) không chứa các gen pol, gag, env cần thiết cho việc tạo ra các hạt lây nhiễm mới là rất cần thiết cho công nghệ chuyển gen và các vấn đề môi trường. Vector tái bản vẫn còn khả năng lây nhiễm vào tế bào chủ, nhưng tiền virus sẽ không tạo ra các hạt virus mới. Vector tái bản thiếu cho phép mang đoạn gen đủ lớn (tới 10kb), bởi vì chúng thiếu các gen cần thiết cho tái bản. Các vector retrovirus đang được phát triển dựa trên các phương thức mới bao gồm cả kiểu giả bắt chước cấu trúc của một retrovirus nhưng có khả năng lây nhiễm tốt hơn. Một vấn đề thường gặp với một số vector retrovirus mà được sử dụng trong công nghệ chuyển gen đó là hiện tượng im lặng của gen, chúng không hoạt động. Một phương pháp mới không bị ảnh hưởng bởi hiện tượng im lặng gen, đó là sử dụng vector lentivirus, kiểu retrovirus này có thể lây nhiễm cả tế bào không phân chia và tế bào đang phân chia. Phức hợp chưa tích hợp của các vector lentivirus có thể xâm nhập qua màng nhân còn nguyên vẹn của nhân ở các tế bào đích, và vector lentivirus đã được sử dụng nhằm phát triển chuột chuyển gen. Bên cạnh đó các vector lentivirus đã được sử dụng để tạo ra các dòng gà chuyển gen, nhưng biểu hiện đặc hiệu ở mô của gen chuyển, vector này có thể được điều khiển bởi CMV promoter.

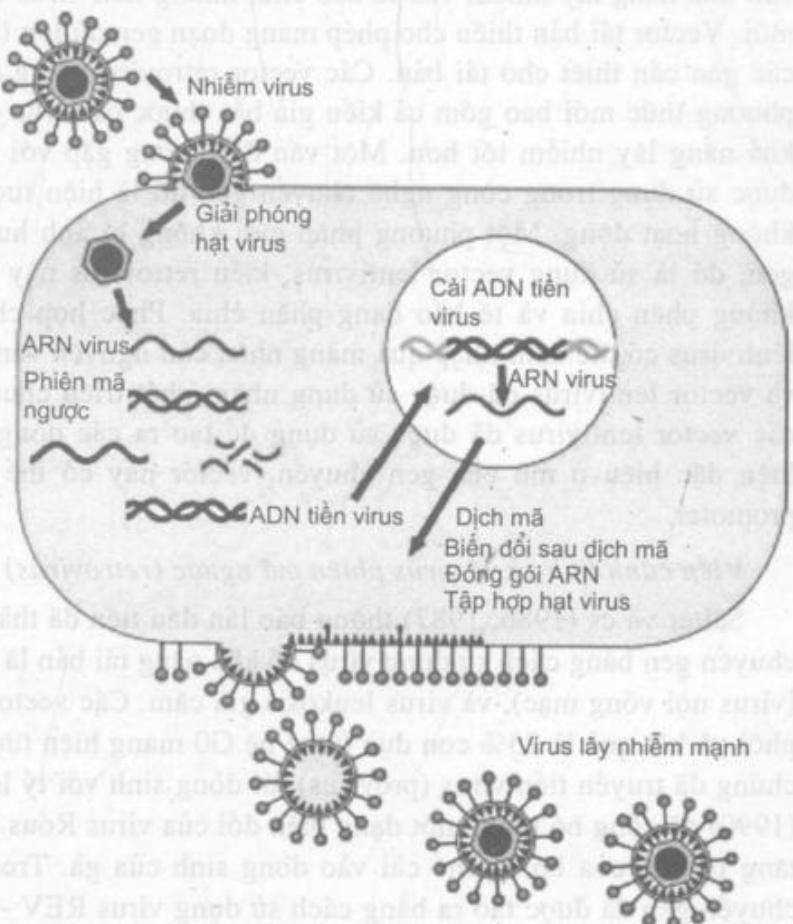
#### *Viễn cảnh lịch sử về virus phiên mã ngược (retrovirus) :*

Salter và cs (1986, 1987) thông báo lần đầu tiên đã thành công trong việc tạo ra gà chuyển gen bằng cách sử dụng virus có khả năng tái bản là reticuloendotheliosis (REV) (virus nội vũng mạc), và virus leukosis gia cầm. Các vector này được tiêm vào gân đĩa phôi và kết quả là 25% con đực ở thế hệ G0 mang hiện tượng khám về gen chuyển, và chúng đã truyền tiền virus (provirus) tới dòng sinh với tỷ lệ từ 1% tới 11%. Chen và cs (1990) đã công bố rằng, một dạng biến đổi của virus Rous sacorma mang gen hoocmon tăng trưởng của bò có thể cài vào dòng sinh của gà. Trong các nghiên cứu khác, gà chuyển gen đã được tạo ra bằng cách sử dụng virus REV - tái bản thiếu mang một gen hoocmon tăng trưởng (Bosselman và cs., 1989, 1990). Bên cạnh đó, các nhà nghiên cứu đã tiêm khoảng 2.599 phôi để tạo ra 33 con đực mang vector mong muốn trong tinh dịch của chúng. Các cá thể gia cầm ở thế hệ G0 đã truyền vector này tới thế hệ G1 với tỷ lệ từ 2% tới 8% (Bosselman và cs., 1989).

Gia cầm chuyển gen mang gen LacZ đã được tạo ra bằng cách cho nhiễm các tế bào sinh dục nguyên thuỷ với vector retrovirus gây ra ung thư hoại tử lách - tái bản thiếu, trong đó vector này mang gen LacZ, sau đó các tế bào sinh dục nguyên thuỷ bị

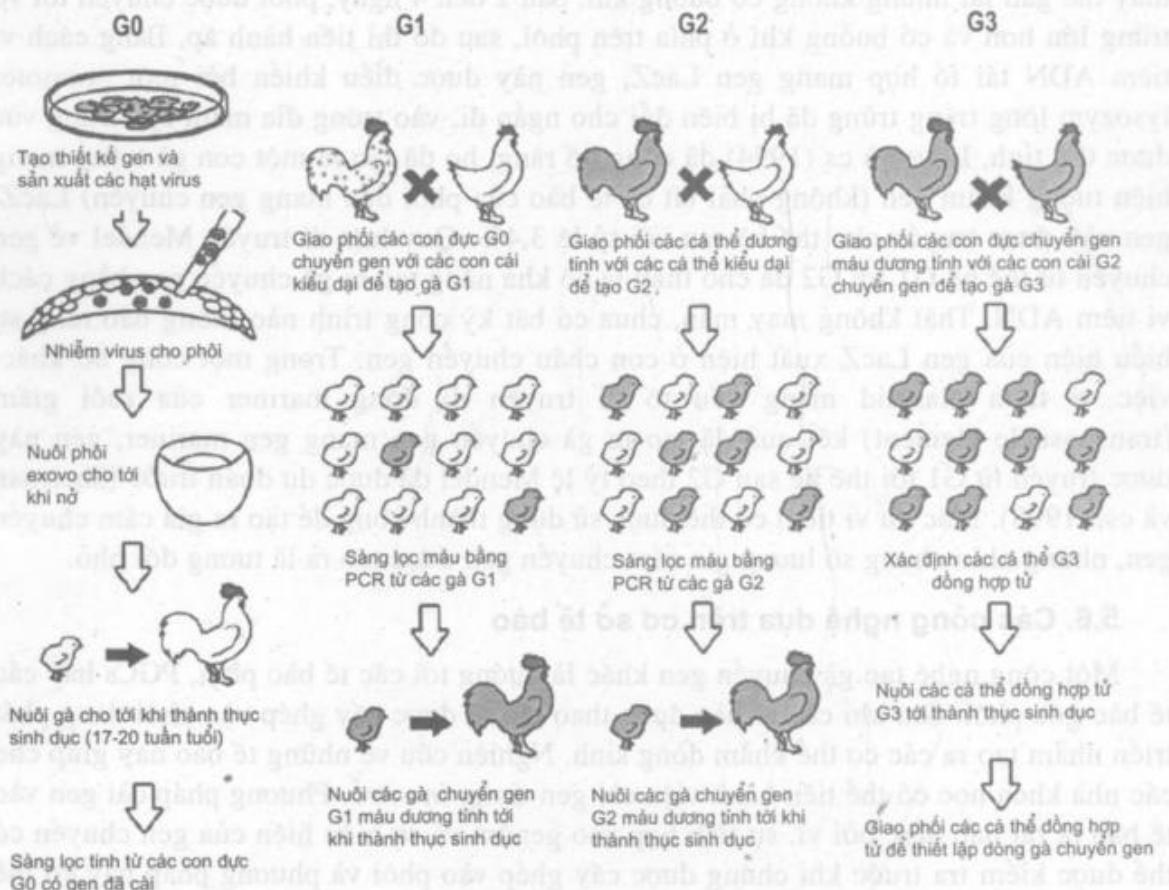
nhiễm được cấy ghép vào phôi nhện, vào giai đoạn sớm (Vick và cs, 1993). Tuy nhiên trước đó, các nhà nghiên cứu chưa chứng minh được sự biểu hiện của beta-galactosidaza ở thế hệ sau. Gà chuyển gen mang gen LacZ cũng được tạo ra bằng cách sử dụng vector - tái bản thiếu trên cơ sở cấu trúc di truyền của retrovirus leukemia ở gia cầm (Thoraval và cs., 1995). Thật không may mắn, sự biểu hiện beta-galactosidaza cũng chỉ thấy trong các nguyên bào sợi của phôi ở thế hệ G2 được nuôi cấy và sự biểu hiện này trong toàn bộ phôi là chưa được công bố. Gần đây, Mizuarai và cs (2001) đã tạo ra chim cút chuyển gen bằng cách sử dụng một vector VSV-G giả (glicoprotein của virus gây bệnh không bào hoá ở dạ dày (vesicular stomatitis virus-glycoprotein)), nhưng những con chim cút chuyển gen không biểu hiện rõ ràng các gen chỉ thị. Mới gần đây, các nhóm nghiên cứu khác cũng đã thành công trong việc tạo ra gà chuyển gen bằng cách sử dụng hệ thống retrovirus. Đầu tiên, Harvey và cs (2002) đã chứng minh rằng, họ đã tạo ra gà chuyển gen biểu hiện beta-lactamaza trong lòng tráng trứng và rằng khi mà dòng chuyển gen này được giao phối với dòng đồng hợp tử thì sự biểu hiện ở cơ thể đồng hợp tử là lớn hơn cơ thể dị hợp tử (Harvey và Ivarie, 2003). Những công trình của Harvey và cs (2002) đã chứng minh cho thấy, gà có thể qua kỹ thuật di truyền (mang gen chuyển) biểu hiện một protein lạ trong trứng, chính điều này đã chỉ ra tính khả thi của gà mái đóng vai trò như là lò phản ứng sinh học (bioreactor) trong việc tạo ra các protein trị liệu.

Tiếp đến gần đây, một mô hình mới ở gà cho nghiên cứu sinh học phát triển đã được thiết kế bằng cách sử dụng hệ thống vector retrovirus mà trước đó đã được chỉ



Hình 11.19. Sự hấp dẫn của vector retrovirus đối với công nghệ chuyển gen nằm trong chu kỳ sống của một retrovirus điển hình. Sự lây nhiễm virus dẫn tới hiện tượng phiên mã ngược của ARN virus thành ADN tiền virus, ADN tích hợp vào genôm của vật chủ. Các hệ thống còn khả năng tái bản chứa một genome virus còn nguyên vẹn vẫn cho phép biểu hiện, dịch mã và đóng gói các hạt virus mới. Các hệ thống tái bản thiếu, một phần lớn genôm virus bị mất, cho phép biểu hiện gen chuyển và không tạo ra các virus mới.

ra có biểu hiện mạnh trong gà (Mikawa và cs, 1991, 1992). Những con gà chuyển gen này là một hệ thống mô hình mới cho nghiên cứu sinh học phát triển, mô hình này ưu điểm hơn so với mô hình khám chim cút - gà, bởi vì gà mang gen LacZ và biểu hiện beta-galactosidaza giúp cho việc đánh dấu tế bào dễ dàng hơn khi gen LacZ được đưa vào phôi gà nhận kiểu đại (không được chuyển nhiễm vector).



Hình 11.20. Các bước chủ yếu nhằm thiết lập một dòng gà chuyển gen

Ví dụ này minh họa cho việc sử dụng vector của virus, tuy nhiên quá trình này là tương tự như việc sử dụng các phương pháp khác. Thế hệ 0 (G0) liên quan tới việc xây dựng và sản xuất virus và cho phép lây nhiễm vào phôi theo sau đó là nuôi cấy ex ovo, gà nở ra, nuôi chung lớn và sàng lọc các thể khám giả định cho giao phối. Thế hệ 1-3 (G1-3) đòi hỏi cần phải có thời gian, tiền bạc và các điều kiện thuận lợi cho việc thiết lập và mô tả đặc điểm của dòng gà cầm chuyển gen.

## 5.5. Vi tiêm

Phương pháp phổ biến đưa các gen vào trong động vật có vú là vi tiêm ADN vào nhân nguyên của trứng vừa mới được thụ tinh (Gordon và cs., 1980 ; Brinster và cs., 1981). Tuy nhiên, về mặt kỹ thuật tiêm trực tiếp ADN vào trứng gà vừa mới đẻ khó hơn nhiều so với động vật có vú, bởi vì trứng gà vừa mới đẻ dã có khoảng 50.000 - 60.000 tế bào (Spratt và Haas, 1960). Do đó, việc vi tiêm ADN vào trứng gà sau khi đẻ khó có thể thực hiện được, nhưng có thể tiêm lên phôi mới thụ tinh lấy từ ống dẫn trứng của gà

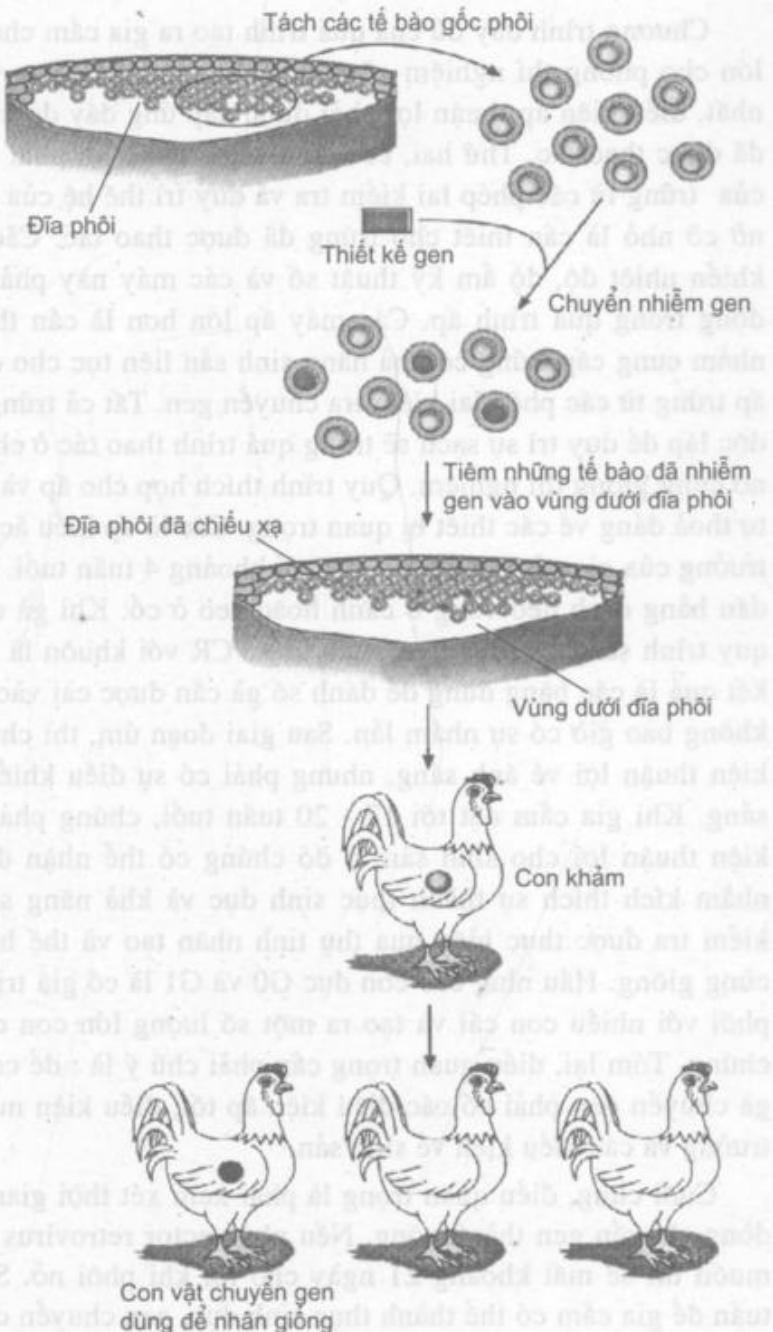
mái (Love và cs., 1998). Hợp tử được vi tiêm có thể cho nở bằng cách sử dụng hệ thống nuôi cấy ex ovo gồm ba bước (Love và cs., 1994 ; Sherman và cs., 1998). Đầu tiên, trứng vừa mới được thụ tinh di chuyển trong ống dẫn trứng, trứng này được lấy ra khỏi cơ thể mẹ ở phần ống dẫn trứng tạo lòng trắng, sau đó được nuôi cấy khoảng 18 đến 24 giờ với dịch tổng hợp của ống dẫn trứng. Tiếp theo trứng được chuyển tới một vỏ trứng thay thế gần lại nhưng không có buồng khí. Sau 2 đến 4 ngày, phôi được chuyển tới vỏ trứng lớn hơn và có buồng khí ở phía trên phôi, sau đó thì tiến hành ấp, Bằng cách vi tiêm ADN tái tổ hợp mang gen LacZ, gen này được điều khiển bởi một promoter lysozym lòng trắng trứng đã bị biến đổi cho ngắn đi, vào trong đĩa mầm của trứng vừa được thụ tinh, Love và cs (1994) đã công bố rằng, họ đã tạo ra một con gà trống mang hiện tượng khảm gen (không phải tất cả tế bào của phôi đều mang gen chuyển) LacZ, gen này được truyền cho thế hệ sau với tỷ lệ 3,4%. Quy luật di truyền Mendel về gen chuyển từ thế hệ G1 tới G2 đã cho thấy là có khả năng tạo ra gà chuyển gen bằng cách vi tiêm ADN. Thật không may mắn, chưa có bất kỳ công trình nào thông báo rằng sự biểu hiện của gen LacZ xuất hiện ở con cháu chuyển gen. Trong một công bố khác, việc vi tiêm plasmid mang yếu tố di truyền di động mariner của ruồi giấm (transposable element) kết quả đã tạo ra gà chuyển gen mang gen mariner, gen này được truyền từ G1 tới thế hệ sau G2 theo tỷ lệ Mendel đã được dự đoán trước (Sherman và cs., 1998). Mặc dù vi tiêm có thể được sử dụng thành công để tạo ra gia cầm chuyển gen, nhưng nhìn chung số lượng gia cầm chuyển gen được tạo ra là tương đối nhỏ.

### **5.6. Các công nghệ dựa trên cơ sở tế bào**

Một công nghệ tạo gà chuyển gen khác là hướng tới các tế bào phôi, PGCs hay các tế bào gốc phôi. Sau khi các tế bào được thao tác sẽ được cấy ghép vào phôi đang phát triển nhằm tạo ra các cơ thể khảm dòng sinh. Nghiên cứu về những tế bào này giúp cho các nhà khoa học có thể tiến hành việc cài gen trong *in vitro*. Phương pháp cài gen vào tế bào là rất hấp dẫn, bởi vì, sự tích hợp vào genôm và sự biểu hiện của gen chuyển có thể được kiểm tra trước khi chúng được cấy ghép vào phôi và phương pháp này có thể cho phép tạo ra các cơ thể chuyển gen với những thay đổi có mục đích đối với genôm. Bước đầu tiên trong quá trình tạo ra cơ thể chuyển gen dựa trên cơ sở tế bào là thu nhận được những tế bào có khả năng nuôi cấy *in vitro*, các tế bào này phải có khả năng chuyển thành dòng sinh (chẳng hạn như PGCs), sau đó nuôi cấy chúng, chuyển nhiễm chúng với ADN tái tổ hợp và cấy ghép các tế bào bị chuyển nhiễm này vào trong phôi. Sau đó, các cá thể G0 được giao phối để tạo ra thế hệ G1 mang gen chuyển trong toàn bộ cơ thể. Như vậy trật tự sắp xếp các bước trong kỹ thuật là sự kết hợp của 3 công nghệ khác nhau : Khả năng nuôi cấy các tế bào tham gia vào dòng sinh, tạo ra các ADN tái tổ hợp thích hợp, và khả năng tạo ra cơ thể khảm dòng sinh. Petitte và cs (1990) đã tạo ra cơ thể gà khảm dòng sinh đầu tiên. Tiếp theo đó, việc tạo ra các cơ thể gia cầm khảm dòng sinh đã trở thành một phương pháp phổ biến (Petitte và cs., 1990 ; Kagami và cs., 1997). Các phương pháp nuôi cấy tế bào gốc phôi và các tế bào sinh dục của gà đã được phát triển (Pain và cs., 1996 ; Acloque và cs., 2001), và việc xây dựng các vector ADN cũng đã trở thành một phương pháp phổ biến. Do đó, tất cả các công

cụ là có thể nhận được cho việc sử dụng những biến đổi dòng sinh trong *in vitro* để tạo ra gia cầm chuyển gen, tuy nhiên, vẫn chưa hoàn toàn thành công trong phương pháp tạo gà chuyển gen thông qua thao tác dòng sinh trong *in vitro*.

Cuối cùng, phương pháp chuyển gen thông qua tinh trùng gần đây có một vài tiến bộ. Vấn tắt, một ADN tái tổ hợp được mang bởi tinh trùng và tinh dịch/ tinh trùng được sử dụng thụ tinh cho trứng hữu thụ. Tinh trùng thành công trong quá trình thụ tinh sẽ mang gen chuyển vào trong trứng, gen chuyển hợp nhất vào phôi và cơ thể gà trưởng thành. Gần đây, chuyển gen thông qua tinh trùng đã được công bố như là một cách sinh sản nhằm tạo ra động vật có vú chuyển gen (Lavitrano và cs., 2002, 2003). Tuy nhiên, chuyển gen thông qua tinh trùng chưa được cung cấp bởi bất kỳ một dữ liệu đáng tin cậy nào để có thể chỉ ra gen chuyển mong muốn có thể hợp nhất thành công vào dòng sinh ở gia cầm. Gần đây, công nghệ vi tiêm và retrovirus vẫn là những phương pháp duy nhất được sử dụng để tạo ra gia cầm chuyển gen.



Hình 11.21. Tạo gà chuyển gen bằng chuyển nhiễm

các tế bào đĩa phôi tách riêng

Lấy các tế bào từ đĩa phôi, chuyển nhiễm với gen chuyển và tiêm vào xoang dưới đĩa phôi của đĩa phôi nhận đã chiểu xạ. Thu được một số gà khâm. Con khâm mà có gen chuyển trong dòng sinh sẽ được dùng để thiết lập dòng chuyển gen.

## 5.7. Vấn đề quản lý

Chương trình đầy đủ của quá trình tạo ra gia cầm chuyển gen đòi hỏi một sự đầu tư lớn cho phòng thí nghiệm cũng như để nuôi các động vật thí nghiệm. Và quan trọng nhất, điều kiện áp thuận lợi phải được đáp ứng đầy đủ cho quá trình ấp và nở của phôi đã được thao tác. Thứ hai, các điều kiện thuận lợi phải đầy đủ cho quá trình ấp và nở của trứng từ các phép lai kiểm tra và duy trì thế hệ của giống thay thế. Các máy ấp và nở cỡ nhỏ là cần thiết cho trứng đã được thao tác. Các máy ấp này phải có bộ điều khiển nhiệt độ, độ ẩm kỹ thuật số và các máy này phải có khả năng đảo trứng ấp tự động trong quá trình ấp. Các máy ấp lớn hơn là cần thiết cho việc ấp trứng liên tục nhằm cung cấp trứng có khả năng sinh sản liên tục cho dự án chuyển gen cũng như để ấp trứng từ các phép lai kiểm tra chuyển gen. Tất cả trứng phải được chuyển tới máy nở độc lập để duy trì sự sạch sẽ trong quá trình thao tác ở chim và cho phép đảm bảo trứng nở cùng giống thí nghiệm. Quy trình thích hợp cho ấp và nuôi gà đòi hỏi phải có sự đầu tư thỏa đáng về các thiết bị quan trọng. Các lò ấp kiểu ác quy là thích hợp cho việc sinh trưởng của gia cầm từ khi nở cho tới khoảng 4 tuần tuổi. Tất cả gia cầm phải được đánh dấu bằng cách đeo vòng ở cánh hoặc đeo ở cổ. Khi gà chuyển gen được xác định qua quy trình sàng lọc dựa trên phản ứng PCR với khuôn là ADN từ tinh dịch hay từ máu, kết quả là các băng dùng để đánh số gà cần được cài vào mỗi cánh để đảm bảo rằng sẽ không bao giờ có sự nhầm lẫn. Sau giai đoạn úm, thì chúng phải được nuôi trong điều kiện thuận lợi về ánh sáng, nhưng phải có sự điều khiển, thường khoảng 8 giờ chiếu sáng. Khi gia cầm đạt tới 17 - 20 tuần tuổi, chúng phải được chuyển tới những điều kiện thuận lợi cho sinh sản, ở đó chúng có thể nhận được 14 tới 18 giờ chiếu sáng nhằm kích thích sự thành thực sinh dục và khả năng sinh sản có hiệu quả. Phép lai kiểm tra được thực hiện qua thụ tinh nhân tạo và thế hệ con phải được duy trì trong cùng giống. Hầu như, các con đực G0 và G1 là có giá trị nhất bởi vì chúng có thể giao phối với nhiều con cái và tạo ra một số lượng lớn con cháu và cần phải nỗ lực tạo ra chúng. Tóm lại, điều quan trọng cần phải chú ý là : để có được điều kiện thuận lợi cho gà chuyển gen phải có các điều kiện ấp tốt, điều kiện nuôi khi mới nở, điều kiện tăng trưởng và các điều kiện về sinh sản.

Cuối cùng, điều quan trọng là phải xem xét thời gian liên quan tới việc tạo ra một dòng chuyển gen thành công. Nếu như vector retrovirus được tiêm vào phôi G0 mong muốn thì sẽ mất khoảng 21 ngày cho tới khi phôi nở. Sau khi nở, mất khoảng 17-20 tuần để gia cầm có thể thành thực sinh dục, gen chuyển có thể được sàng lọc trong tinh dịch (khoảng 5-6 tháng kể từ khi bắt đầu dự án). Một trở ngại không thể lường trước được trong thế hệ của các dòng gà chuyển gen đang tạo ra con cái G1 mang gen chuyển, bởi vì gà ở thế hệ G0 thể hiện sự biểu hiện gen chuyển ở dạng khám trong tuyến sinh dục. Nhìn chung, sẽ có hiệu quả hơn khi chỉ cần giao phối kiểm tra các cơ thể đực G0. Bởi vì một con đực có thể thụ tinh cho rất nhiều con cái để tạo ra rất nhiều con cháu ở cùng một thời điểm sàng lọc. Kết quả là, sẽ phải mất thêm 21 tuần nữa cho tới khi thế hệ sau của thế hệ G1 trưởng thành sinh dục, và phải mất thêm ít nhất 3-4 tuần cho tới khi có thể chứng minh quy luật di truyền Mendel từ G1 tới G2. Do đó,

phải mất ít nhất 12 tháng để tạo ra được giống gốc ban đầu cho dòng chuyển gen, đồng thời các bằng chứng cho thấy rằng, gia cầm chuyển gen thực sự đã được gây dựng thành công.

Nói chung, việc tạo ra gà chuyển gen cho nghiên cứu sinh học phát triển đưa ra những triển vọng có ý nghĩa trong tương lai, bởi vì các mô hình chuyển gen mới có thể cung cấp những kiến thức sâu sắc về các sự kiện phát triển sớm. Tuy nhiên, việc tạo ra một mô hình chuyển gen có thành công hay không còn phụ thuộc vào sự lựa chọn vector hay phương pháp, nhằm đưa các gen chuyển vào phôi có hiệu quả nhất. Sự thật, cho dù đơn giản chỉ đưa gen chuyển vào phôi gia cầm thì cũng phức tạp hơn nhiều so với hệ thống động vật có vú. Đây cũng là thách thức để có thể đạt được tỷ lệ nở cao nhằm tạo ra một số lượng có ý nghĩa các cá thể chuyển gen ở thế hệ G0. Theo sau đó, các nhà nghiên cứu phải có khoảng thời gian thích hợp để duy trì các đàn gia cầm phục vụ cho giao phối kiểm tra. Mặc dù có những trở ngại như vậy, nhưng những thành công liên tiếp gần đây của Harvey và cs (2002 ; 2003), McGrew và cs (2003), Mozdziak và cs (2003) đã chỉ ra rằng, công nghệ gà chuyển gen có thể được sử dụng để tạo ra những công cụ tốt cho nghiên cứu sinh học.

## VI - CÁ CHUYỂN GEN

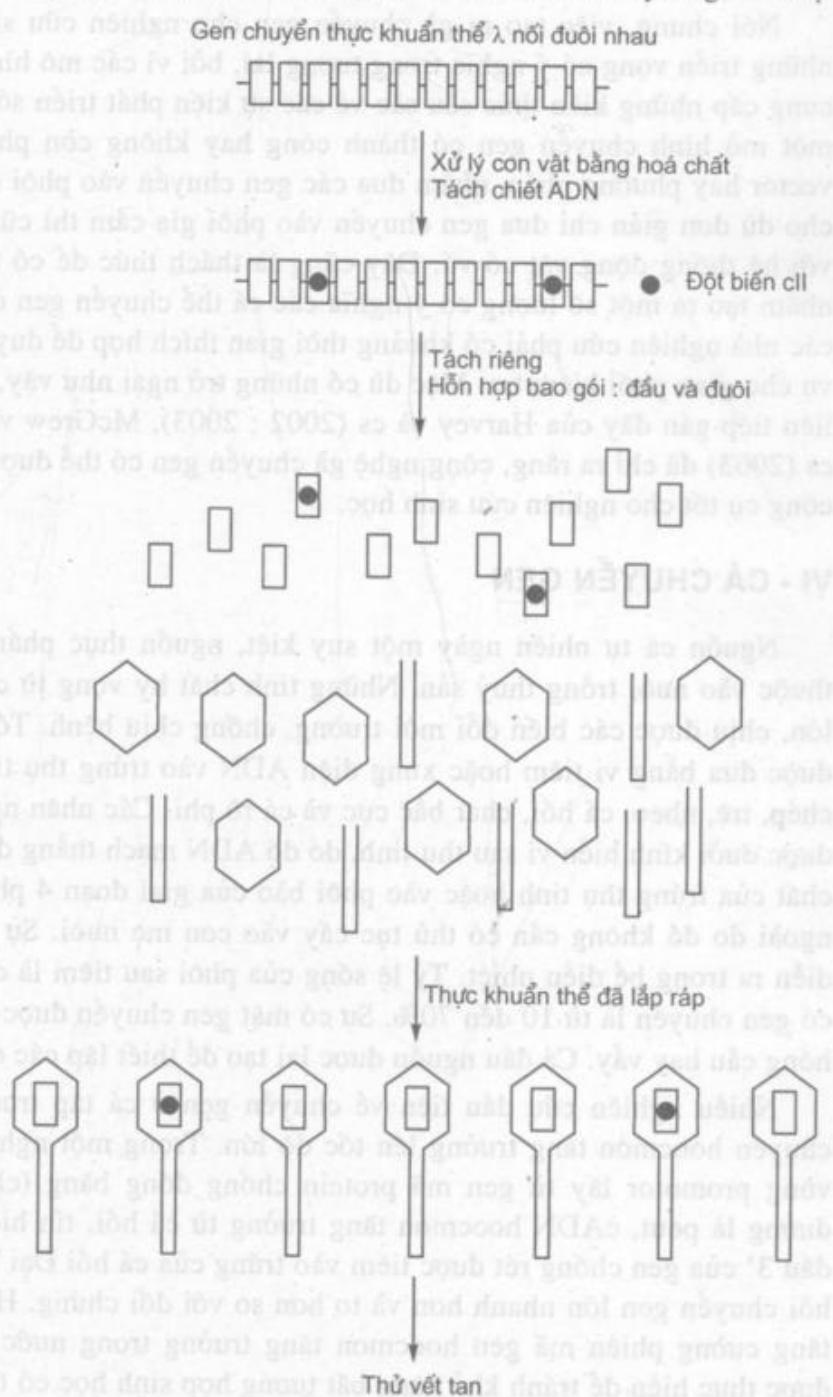
Nguồn cá tự nhiên ngày một suy kiệt, nguồn thực phẩm thế giới ngày một phụ thuộc vào nuôi trồng thủy sản. Những tính chất hy vọng từ chuyển gen là tăng tốc độ lớn, chịu được các biến đổi môi trường, chống chịu bệnh. Tới nay, các gen chuyển đã được đưa bằng vi tiêm hoặc xung điện ADN vào trứng thụ tinh của nhiều loài cá như chép, trê, nheo, cá hồi, char bắc cực và cá rô phi. Các nhân nguyên cá không nhìn thấy được dưới kính hiển vi sau thụ tinh, do đó ADN mạch thẳng được tiêm vào, hoặc tế bào chất của trứng thụ tinh hoặc vào phôi bào của giai đoạn 4 phôi bào. Cá phát triển bên ngoài do đó không cần có thủ tục cấy vào con mẹ nuôi. Sự phát triển cá chuyển gen diễn ra trong bể điều nhiệt. Tỷ lệ sống của phôi sau tiêm là cao (35 - 80%) và tỷ lệ cá có gen chuyển là từ 10 đến 70%. Sự có mặt gen chuyển được xác định bằng PCR ADN hồng cầu hay vẩy. Cá đực nguồn được lai tạo để thiết lập các dòng chuyển gen.

Nhiều nghiên cứu đầu tiên về chuyển gen ở cá tập trung vào hiệu quả của gen chuyển hoocmon tăng trưởng lên tốc độ lớn. Trong một nghiên cứu, gen chuyển gồm vùng promotor lấy từ gen mã protein chống đóng băng (chống rét) của một cá đại dương là pout, cADN hoocmon tăng trưởng từ cá hồi, tín hiệu poliadenyl hoá cuối từ đầu 3' của gen chống rét được tiêm vào trứng của cá hồi Đại Tây Dương. Nói chung, cá hồi chuyển gen lớn nhanh hơn và to hơn so với đối chứng. Hệ biểu hiện được chọn để tăng cường phiên mã gen hoocmon tăng trưởng trong nước lạnh. Thiết kế "toàn cá" được thực hiện để tránh khả năng bất tương hợp sinh học có thể xảy ra khi sử dụng gen hoocmon tăng trưởng có nguồn gốc không cá. Với tính đặc hiệu cao, thiết kế hoocmon tăng trưởng "toàn cá hồi" được tiêm vào trứng cá hồi đỏ. Sau 1 năm, cá hồi chuyển gen nặng hơn cá không chuyển gen tới 11 lần. Tuy nhiên, không có sai khác về kích cỡ giữa các con trưởng thành. Về lý thuyết, tốc độ tăng trưởng nhanh các cá non sẽ làm

giảm chi phí thức ăn và giảm ô nhiễm quanh các khu vực nuôi. Trong tương lai, nuôi trồng thuỷ sản với cá chuyển gen phải được nuôi trong những trại nuôi khép kín. Cho tới nay, phải tính đến ảnh hưởng của sự phát tán ngẫu nhiên các cá chuyển gen ra tự nhiên khi cá đó được nuôi ngoài biển.

Cùng với việc tăng cường các tính trạng về năng suất thực phẩm cá, chuyển gen cũng được sử dụng để tạo các hệ thống mô hình để kiểm soát các nguy cơ cho sức khoẻ và sàng lọc các hoá chất để xét nghiệm về khả năng gây đột biến của chúng. Nhiều các hệ thống sinh học được thiết lập để phát hiện các đột biến trong vi khuẩn và gặm nhấm. Trong số các đòn hồi chính của phép thử đột biến *in vivo*, đột biến gây cho gen đích phải không ảnh hưởng đến sức sống trừ phi có hiệu ứng gây chết, gen đích phải được tái phát hiện, và đột biến mới phải được xác định dễ dàng bằng PCR.

Phương pháp xác định chắc chắn sự gây đột biến trong các cơ thể đa bào là đưa một dãy nối đuôi nhau genôm thực khuẩn  $\lambda$  vào vật chủ. Sau đó, với thời gian khác nhau sau khi con vật chuyển gen tiếp xúc với các hoá chất thử nghiệm, tách



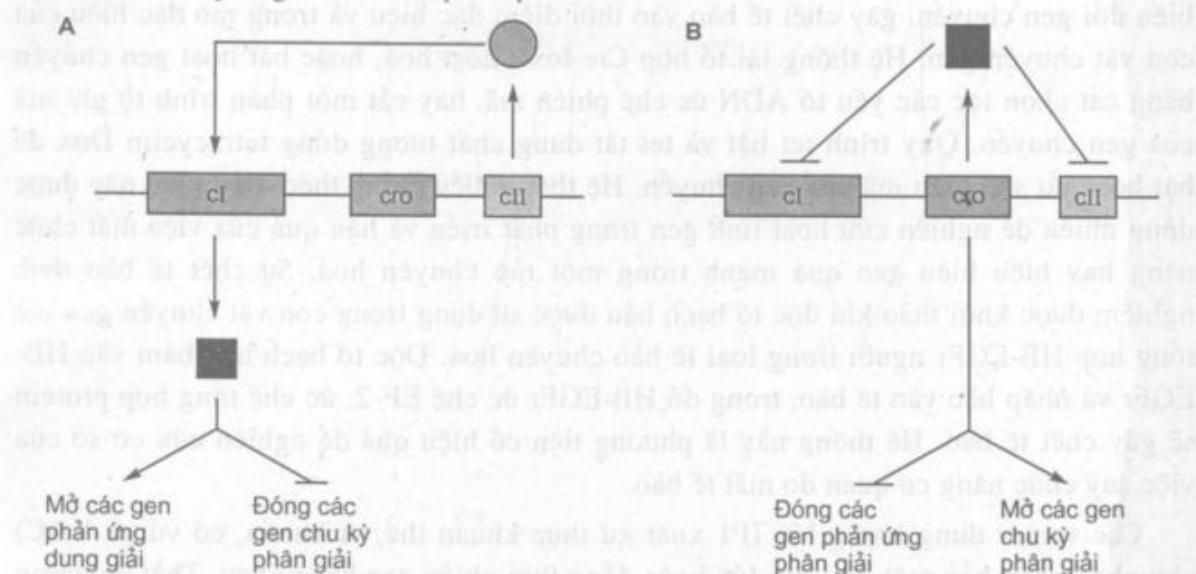
Hình 11.22. Sơ đồ trình bày phép thử đột biến *in vivo* nhờ gen cll thực khuẩn  $\lambda$

Đột biến gây nên được đánh dấu bằng chấm đen.

Thực khuẩn  $\lambda$  với gen cll đột biến sẽ đi vào chu kỳ phân giải.

chiết ADN, từng genôm thực khuẩn  $\lambda$  được tách ra và tập hợp thành hạt virus bất hoạt, và thử nghiệm để xác định đột biến ở gen cII của thực khuẩn (hình 11.22).

Cơ sở của xét nghiệm đột biến gen cII phụ thuộc vào vai trò của gen này trong chu trình sống của thực khuẩn  $\lambda$ . Tóm lại, thực khuẩn  $\lambda$  có 2 lựa chọn sau khi nhiễm *E. coli*. Hoặc trạng thái dung giải (ẩn) khi nó cài vào vị trí đặc hiệu của nhiễm sắc thể vật chủ, hoặc phân giải khi nó hoạt động phá vỡ tế bào vật chủ. Có thể duy trì thực khuẩn  $\lambda$  trạng thái ẩn qua một số thế hệ phân chia tế bào chủ. Pha phân giải thường bắt đầu khi tế bào bị stress sinh lý. Trong 20 phút phân giải, khoảng 200 hậu thế được sinh ra và giải phóng vào môi trường xung quanh khi tế bào chủ vỡ ra. Sự lựa chọn pha nào được kiểm soát bằng các gen của thực khuẩn  $\lambda$ . Pha dung giải, có lẽ ít thấy trong tự nhiên, được thiết lập qua sản xuất chất ức chế (protein cl) các gen của chu kỳ phân giải (hình 11.23A). Các tế bào phân giải bắt đầu bằng hoạt động của gen Cro (hình 11.23B). Một cách đặc hiệu, protein cII hoạt hoá phiên mã gen cl, hoặc khác thế, protein Cro điều chỉnh hoạt động phiên mã của cả hai gen cl và cII. Đột biến cII làm giảm khả năng pha dung giải. Số lượng hạt thực khuẩn đi vào pha phân giải được xác định bằng cách dùng mẫu pha loãng thực khuẩn trên phiến thạch có phủ một lớp *E.coli* và sau đếm các vết tan (plaque). Dưới các điều kiện như vậy, mẫu mà có đột biến cII nhiều sẽ gây tan nhiều hơn so với các mẫu ít có đột biến. Nói một cách khác, nếu thực khuẩn tách từ cá chuyển gen bị tác động hoá chất cho nhiều vết tan hơn là từ cá đối chứng thì điều đó chứng tỏ rằng hoá chất đó là gây đột biến. Hơn thế, qua giải trình tự ADN, có thể xác định bản chất của đột biến vì cII chỉ dài có 300bp. Người ta đã chứng minh tính khả thi của phương pháp này với một nhóm nhỏ cá, dễ nuôi, với ít hơn 10 con chuyển gen để xác định đột biến cII.



Hình 11.23. Các hệ thống phản ứng dung giải (A) và phân giải (B) sau khi cho nhiễm *E.coli* bằng thực khuẩn  $\lambda$

A. Protein cII (hình tròn) hoạt hoá gen cl. Protein cl (hình vuông dọc) tắt các gen khởi đầu chu kỳ phân giải và bật các gen cần cho dung giải.

B. Protein Cro (hình vuông trên) ngăn cản phiên mã các gen cl và cII; ngăn cản phiên mã các gen dung giải và tạo thuận lợi cho biểu hiện gen phân giải. Mũi tên gãy chặn ngang là bị ức chế

Với các cá chuyền gen khác nhau, người ta đã phát triển phép thử đột biến qua sử dụng chuyền plasmid chứa các gen mãn cảm với kháng sinh như các gen đột biến đích. Trong trường hợp này, *E.coli* được biến nạp với plasmid ADN lấy từ cá chuyền gen. Sự tăng tần số các khuẩn lạc kháng sinh từ các mẫu được xử lý so với các mẫu đối chứng không xử lý sẽ nói lên là có đột biến. Nói chung, cá chuyền gen sẽ cung cấp các phương pháp giá thấp để xác định các hoá chất gây đột biến trong nước từ các nguồn ô nhiễm.

## TÓM LUỢC

Sự biến đổi di truyền động vật bằng công nghệ ADN là sự đưa các gen nhân bản vào bộ gen tế bào và tế bào này sau khi tăng sinh và phát triển phôi, sẽ có mặt trong dòng sinh dục một số hậu thế và từ đó có thể thiết lập các dòng chuyền gen đích thực. Phần lớn các nghiên cứu trong lĩnh vực này tập trung vào sự phát triển chuột chuyền gen. Quy trình được dùng phổ biến hơn cả là tiêm gen nhân bản vào nhân nguyên đực của trứng mới thụ tinh, cấy trứng đó vào mẹ nuôi và xét nghiệm sự có mặt gen chuyền trong tế bào chuột sinh ra. Cũng có thể đưa gen chuyền vào trứng chuột mới thụ tinh bằng vector phiên mã ngược. Một cách khác, cho chuyền nhiễm các tế bào gốc phôi với các gen nhân bản. Trong phương pháp này, thiết kế ADN phải được cài vào genôm tế bào nhận. Tiếp theo, tế bào có gen chuyền được nuôi cấy, được chọn lọc và đưa vào phôi sớm chuột để tạo chuột chuyền gen.

Có nhiều phương pháp được đề nghị để điều khiển sự biểu hiện của gen chuyền, biến đổi gen chuyền, gây chết tế bào vào thời điểm đặc hiệu và trong mô đặc hiệu của con vật chuyền gen. Hệ thống tái tổ hợp Cre-loxP hoạt hoá, hoặc bất hoạt gen chuyền bằng cắt chọn lọc các yếu tố ADN ức chế phiên mã, hay cắt một phần trình tự ghi mã của gen chuyền. Quy trình tet bật và tet tắt dùng chất tương đồng tetracyclin Dox để bật hoặc tắt sự phiên mã của gen chuyền. Hệ thống điều chỉnh theo điều kiện này được dùng nhiều để nghiên cứu hoạt tính gen trong phát triển và hậu quả của việc mất chức năng hay biểu hiện gen quá mạnh trong một mô chuyên hoá. Sự chết tế bào thực nghiệm được khởi thảo khi độc tố bạch hầu được sử dụng trong con vật chuyền gen mà tổng hợp HB-EGFr người trong loại tế bào chuyên hoá. Độc tố bạch hầu bám vào HB-EGFr và nhập bào vào tế bào, trong đó HB-EGFr ức chế EF-2, ức chế tổng hợp protein sẽ gây chết tế bào. Hệ thống này là phương tiện có hiệu quả để nghiên cứu cơ sở của việc suy chức năng cơ quan do mất tế bào.

Các vector dung lượng lớn (P1 xuất xứ thực khuẩn thể, vi khuẩn, có vú và YAC) cho phép nhân bản một dãy gen lớn hoặc đồng thời nhiều gen khác nhau. Thật ấn tượng khi người ta tạo được chuột chuyền gen sản xuất các kháng thể hoàn chỉnh của người bằng cách chuyền gen dùng YAC mang các gen các mạch kháng thể H và K người. Những chuột tạo nên nhờ kỹ thuật di truyền như thế có thể là nguồn cung cấp các kháng thể đơn dòng người. Các chuột chuyền gen cũng được dùng như mô hình cho

nhiều bệnh ở người, như bệnh Alzheimer. Cách tiếp cận này cho những thông tin quan trọng về hậu quả của các sản phẩm gen hỏng, tiến triển bệnh và hiệu quả của các cách trị liệu khác nhau.

Thao tác di truyền gia súc có thể tạo nên các dòng vật nuôi có hiệu suất sử dụng thức ăn tốt hơn, tốc độ lớn nhanh hơn và chống chịu bệnh tốt hơn. Tỷ lệ chuyển gen theo quy trình này là thấp. Tuy thế, các con vật chuyển gen được tạo nên bằng vi tiêm và nhân bản nhân. Phương pháp nhân bản nhân là chuyển nhân từ tế bào đã được thao tác gen trong nuôi cấy vào noãn bào mất nhân và chọn trong hậu thế các con vật mang gen chuyển trong tất cả các tế bào của cơ thể. Áp dụng lớn nhất cho chăn nuôi là dùng tuyến vú như lò phản ứng sinh học để sản xuất protein dược liệu trong sữa. Về nguyên tắc, một số lượng nhỏ đầu con chuyển gen bò, cừu và dê có thể là nguồn cung cấp liên tục các protein dược liệu quan trọng cho người. “Lợn môi trường” là một ví dụ lý thú về chuyển gen như là con đường để khắc phục hậu quả chất thải giàu phosphat của lợn. Trong trường hợp này, gen chuyển phylaza, biểu hiện trong nước bọt, đã sử dụng được phosphat trong phylat có trong nguồn thức ăn chính của lợn. Kết quả là phospho trong phylat trở nên đồng hoá được, giúp tăng trưởng và đồng thời giảm thải phosphat ra môi trường.

Chuyển gen ở gia cầm, đặc biệt là gà, được sử dụng để cải thiện các giống nuôi. Hơn nữa, trứng gà có thể là kho chứa các dược chất tái tổ hợp do gà chuyển gen tổng hợp nên.

Sự biến đổi di truyền cá hướng tới tăng tốc độ tăng trưởng và tăng sức chống chịu bệnh.Thêm vào đó, cá chuyển gen được xem như hệ thống xét nghiệm sinh học rẻ tiền và có hiệu quả. Trong trường hợp này, gen cII thực khuẩn λ phát hiện đột biến được cài vào cá để xác định sự có mặt chất gây ô nhiễm gây đột biến trong môi trường nước hoặc xét nghiệm một hoá chất mới.

## Tài liệu tham khảo

### I - Phần Công nghệ tế bào thực vật

1. Nguyễn Văn Uyển và các tác giả, 1984. Nuôi cấy mô thực vật phục vụ công tác giống cây trồng. Nhà xuất bản Thành phố Hồ Chí Minh.
2. Vũ Văn Vụ, Vũ Thanh Tâm, Hoàng Minh Tấn, 1998. Sinh lý thực vật. Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội.
3. Bhojwani S. S. và Razdan M. K., 1983. Plant tissue culture : Theory and practise. Elsevier science publishers company inc., Amsterdam, The Netherlands.
4. Dodds J. H. và Roberts L. W., 1999. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press.
5. Taiz L. và Zeiger E., 1998. Plant physiology. Sinauer Associates, Inc., publishers, Massachusetts, America.
6. Trigiano, R. N. và Gray D. J., 1999. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. CRC Press. Florida, America.

### II - Phần Công nghệ tế bào động vật

1. Nguyễn Mộng Hùng, 1993. Bài giảng Sinh học Phát triển. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 1993.
2. Nguyễn Mộng Hùng, 2004. Công nghệ tế bào phôi động vật. NXB Đại học Quốc gia, Hà Nội, 2004.
3. L.A. Babiuk, J. P. Phillips, M. Moo-Young, 1989. Animal Biotechnology. Pergamon Press, 1989.
4. Bruce Albert, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D. Watson., 1994. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., New York - London , 1994.
5. Bruce Albert, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter.  
Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc. New York - London, 2002.
6. Bruce M. Carlson. 1996. Patten's Foundation of Embryology  
McGraw-Hill, Inc. 1996.
7. Charniaux – Cotton H, 1962.  
L'origine de la Lignée Germinale chez les vertébrés et chez quelques groupes d'invertébrés.  
Editeur Scientifique, Etienne Wolff. Paris, 1962.

8. Duban A.P., Baranov B.C. The mammalian oogeneis. Nauka Publishing, Moscow, 1977.
9. K.G. Gasaryan, Nguyen Mong Hung, A.A. Neyfakh, v.v. Ivanenkov. Nuclear transplantation in teleost *Misgurnus fossilis* L. Nature Vol. 280 16 August, p. 585-587.
10. Glick B.R.& Pasternak J.J. 2003. Molecular Biotechnology. ASM Press, Washington D.C. 2003.
11. Gilbert S.F. 2000. Developmental Biology. Sinauer Associates, Inc., Publishers. 2000.
12. Klaus Kalthoff (1996). Analysis of Biological Development. McGraw-Hill Inc. pp. 232-235, 686-712.
13. Andras Nagy, Marina Gertsenstein, Kristina Vintersten, Richard Behringer (2003), *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
14. Nguyen Mong Hung, K.G. Gasaryan. 1978. Transplantation of somatic cell nuclei in the activated teleostean (*Misgurnus fossilis* L.) eggs. The Soviet Journal of Developmental Biology, V. 9, N<sup>0</sup> 1- 1978.
15. Paul E. Mozdziak & James N. Petitte. 2004. Status of transgenic Chicken Models for Developmental Biology Developmental Dynamics 229 :414-421, 2004.
16. Stem Cell, Frequently Asked Questions, 2004 : <http://www.isscr.com>
17. Stem cell : a Primer. National Institute of Health, May 2000.

*Chịu trách nhiệm xuất bản :*

Chủ tịch HDQT kiêm Tổng Giám đốc NGÔ TRẦN ÁI  
Phó Tổng Giám đốc kiêm Tổng biên tập NGUYỄN QUÝ THAO

*Biên tập nội dung :*

NGUYỄN HỒNG ÁNH

*Trình bày bìa :*

BÙI QUANG TUẤN

*Sửa bản in :*

NGUYỄN THU HUYỀN

*Ché bản :*

PHÒNG CHÉ BẢN (NXB GIÁO DỤC)

---

**CÔNG NGHỆ SINH HỌC**  
**TẬP HAI : CÔNG NGHỆ SINH HỌC TẾ BÀO**

**Mã số : 7K627T6-DAI**

In 1.000 cuốn, khổ 19 x 27 cm, tại Nhà in Đại học Quốc gia Hà Nội.

Số xuất bản : 04 - 2006/CXB/173-1860/GD.

In xong và nộp lưu chiểu Quý II năm 2006.



CÔNG TY CỔ PHẦN SÁCH ĐẠI HỌC - DẠY NGHỀ  
HEVOCO

Địa chỉ : 25 Hàn Thuyên, Hà Nội

## TÌM ĐỌC SÁCH THAM KHẢO KỸ THUẬT CỦA NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

<b>1</b>	<b>Dát ngập nước</b>	GS. TS. Lê Văn Khoa
<b>2</b>	<b>Động vật học có xương sống</b>	GS. TS. Lê Vũ Khôi
<b>3</b>	<b>Sinh thái học côn trùng</b>	PGS. TS. Phạm Bình Quyết
<b>5</b>	<b>Cơ sở hoá sinh</b>	PGS. TS. Trịnh Lê Hùng
<b>6</b>	<b>Tài nguyên nước Việt Nam</b>	Nguyễn Thành Sơn
<b>7</b>	<b>Virut học</b>	PGS. TS. Phạm Văn Ty
<b>8</b>	<b>Vật lý kỹ thuật</b>	Đặng Hùng
<b>9</b>	<b>Vật lý siêu dẫn và ứng dụng</b>	TS. Nguyễn Huy Sinh
<b>10</b>	<b>Dụng cụ bán dẫn và vi mạch</b>	Lê Xuân Thế
<b>11</b>	<b>Mạng máy tính</b>	Ngạc Văn An
<b>12</b>	<b>Vô tuyến điện tử</b>	Ngạc Văn An
<b>13</b>	<b>Giáo trình cơ học</b>	Bach Thành Công
<b>13</b>	<b>Kinh tế môi trường</b>	PGS. TS. Hoàng Xuân Cơ
<b>14</b>	<b>Tiếng Anh cơ bản cho sinh viên khoa học tự nhiên</b>	Trần Thị Nga
<b>15</b>	<b>Bộ sách về công nghệ sinh học</b>	
	<i>Tập một : Sinh học phân tử và tế bào</i>	PGS. TS. Nguyễn Như Hiển
	<i>- Cơ sở khoa học của công nghệ sinh học</i>	
	<i>Tập hai : Công nghệ sinh học tế bào</i>	GS. TS. Vũ Văn Vũ
	<i>Tập ba : Công nghệ sinh học enzym và protein (XB - 2006)</i>	GS. TS. Nguyễn Mộng Hùng
	<i>Tập bốn : Công nghệ sinh học di truyền (XB - 2006)</i>	TS. Phan Tuấn Nghĩa
	<i>Tập năm : Công nghệ sinh học vi sinh và công nghệ môi trường (XB - 2006)</i>	PGS. TS. Trịnh Đình Dat
		PGS. TS. Phạm Văn Ty

Bạn đọc có thể mua tại các Công ty Sách - Thiết bị trường học ở địa phương  
hoặc các Cửa hàng của Nhà xuất bản Giáo dục :

- \* 25 Hàn Thuyên, 187 Giảng Võ, 23 Tràng Tiền - Hà Nội.
- \* 15 Nguyễn Chí Thanh - TP Đà Nẵng
- \* 240 Trần Bình Trọng - Quận 5 - TP. Hồ Chí Minh.

EDITION VIETNAM

công nghệ sinh học t2



1 006040 300086



8934980686096



Giá: 24.500 đ