



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

**Vietnam Journal of
Science and Technology - MOST**

B

Tập 63 - Số 7 - Tháng 7 năm 2021

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Nguyễn Văn Hiệu - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Nguyễn Việt Anh - Trường Đại học Xây dựng
Bùi Chí Bửu - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam
Vũ Dũng - Hội Tâm lý học Việt Nam
Trần Thọ Đạt - Trường Đại học Kinh tế Quốc dân
Nguyễn Đình Đức - Trường Đại học Công nghệ - Đại học Quốc gia Hà Nội
Vũ Minh Giang - Đại học Quốc gia Hà Nội
Trương Nam Hải - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
Từ Quang Hiến - Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên
Phạm Huy Khang - Trường Đại học Giao thông Vận tải
Phạm Gia Khánh - Chủ tịch Hội Ghép tạng Việt Nam
Hồ Đắc Lộc - Trường Đại học Kỹ thuật Công nghệ TP Hồ Chí Minh
Nguyễn Thị Mỹ Lộc - Trường Đại học Giáo dục - Đại học Quốc gia Hà Nội
Bành Tiến Long - Trường Đại học Bách khoa Hà Nội
Lê Quan Nghiệm - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh
Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội
Nguyễn Thanh Phương - Trường Đại học Cần Thơ
Nguyễn Thanh Thủy - Trường Đại học Công nghệ - Đại học Quốc gia Hà Nội
Phạm Hùng Việt - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội

TỔNG BIÊN TẬP

Đặng Ngọc Bảo

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP

Nguyễn Thị Hải Hằng
Nguyễn Thị Hương Giang

TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP

Phạm Thị Minh Nguyệt

TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ

Lương Ngọc Quang Hưng

TRÌNH BÀY

Đinh Thị Luận

EDITORIAL COUNCIL

Nguyen Van Hieu - Vietnam Academy of Science and Technology
Nguyen Viet Anh - National University of Civil Engineering
Bui Chi Buu - Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam
Vu Dung - Vietnam Association of Social Psychology
Tran Tho Dat - National Economics University
Nguyen Dinh Duc - University of Engineering and Technology - Vietnam National University, Hanoi
Vu Minh Giang - Vietnam National University, Hanoi
Truong Nam Hai - Vietnam Academy of Science and Technology
Tu Quang Hien - Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry
Pham Huy Khang - University of Transport and Communications
Pham Gia Khanh - President of Vietnam Society of Organ Transplantation
Ho Duc Loc - Ho Chi Minh City University of Technology
Nguyen Thi My Loc - University of Education, Vietnam National University, Hanoi
Banh Tien Long - Hanoi University of Science and Technology
Le Quan Nghiem - University of Medicine and Pharmacy of Ho Chi Minh City
Mai Trong Nhuan - Vietnam National University, Hanoi
Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University
Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology - Vietnam National University, Hanoi
Pham Hung Viet - VNU University of Science

EDITOR-IN-CHIEF

Dang Ngoc Bao

DEPUTY EDITORS

Nguyen Thi Hai Hang
Nguyen Thi Huong Giang

HEAD OF EDITORIAL BOARD

Pham Thi Minh Nguyet

HEAD OF ADMINISTRATION

Luong Ngoc Quang Hung

ART DIRECTOR

Đinh Thị Luận

TÒA SOẠN

113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khcnvn@most.gov.vn
Tạp chí điện tử: b.vjst.vn

EDITORIAL OFFICE

113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khcnvn@most.gov.vn
E-journal: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 1153/GP-BTTTT ngày 26/7/2011
Số 2528/GP-BTTTT ngày 26/12/2012
Số 592/GP-BTTTT ngày 28/12/2016

Giá: 18000^d

PUBLICATION LICENCE

No.1153/GP-BTTTT 26th July 2011
No.2528/GP-BTTTT 26th December 2012
No.592/GP-BTTTT 28th December 2016

Phát hiện đột biến mới D252N trên gen SCN5A ở bệnh nhân hội chứng Brugada

Đặng Duy Phương¹, Nguyễn Minh Hà², Đỗ Doãn Lợi^{1,3}, Trần Văn Khánh¹, Trần Huy Thịnh^{1*}

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch

³Viện Tim mạch Việt Nam

Ngày nhận bài 10/5/2021; ngày chuyển phản biện 12/5/2021; ngày nhận phản biện 15/6/2021; ngày chấp nhận đăng 21/6/2021

Tóm tắt:

Hội chứng Brugada là tình trạng rối loạn nhịp tim di truyền, mang tính trội trên nhiễm sắc thể thường, gây đột tử do tim. Nghiên cứu này báo cáo một trường hợp hội chứng Brugada ở bệnh nhân nam 43 tuổi không triệu chứng, được phát hiện tình cờ qua đo điện tâm đồ. Điện tâm đồ biểu hiện đặc điểm của hội chứng Brugada típ 2, nghiệm pháp flecainide dương tính. Phân tích gen cho thấy người bệnh có một đột biến thay thế acid amin D252N trên gen SCN5A. Đây là đột biến chưa được báo cáo trên các cơ sở dữ liệu di truyền liên quan đến hội chứng Brugada. Phân tích chức năng protein bằng phần mềm cho thấy đột biến xảy ra ở vùng gen được bảo tồn cao và có khả năng gây bệnh cao. Đây là trường hợp hội chứng Brugada đầu tiên được báo cáo có đột biến trên gen SCN5A tại Việt Nam.

Từ khóa: đột biến thay thế mới, gen SCN5A, hội chứng Brugada, phần mềm Polyphen-2.

Chỉ số phân loại: 3.1

Brugada syndrome with a novel missense mutation D252N in SCN5A gene: a case report

Duy Phuong Dang¹, Minh Ha Nguyen², Doan Loi Do^{1,3}, Van Khanh Tran¹, Huy Thinh Tran^{1*}

¹Hanoi Medical University

²University of Medicine Pham Ngoc Thach

³Vietnam National Heart Institute

Received 10 May 2021; accepted 21 June 2021

Abstract:

Brugada syndrome is an inherited cardiac arrhythmia that follows autosomal dominant transmission and can cause sudden death. This paper reported a case of Brugada syndrome in a 43-year-old male patient with no clinical symptoms. Brugada-type 2-ECG changes were accidentally detected. Flecainide test was done and proved positive. Gene analysis revealed a novel missense mutation in the SCN5A gene with a genetic variation of D252N. This novel mutation has not been reported on any genetic databases related to Brugada syndrome. Functional protein analysis software suggested that the mutation occurs in the highly conserved gene and probably has a damaging effect. This is the first Brugada syndrome case reported with a mutation in the SCN5A gene in Vietnam.

Keywords: Brugada syndrome, novel missense mutation, Polyphen-2 software, SCN5A gene.

Classification number: 3.1

Tổng quan

Được tìm ra vào năm 1992, hội chứng Brugada là một tình trạng rối loạn dẫn truyền điện tim, làm tăng mạnh nguy cơ rung thất và đột tử. Hội chứng này chiếm khoảng 4-12%

các trường hợp đột tử do tim nói chung và ít nhất 20% các trường hợp đột tử không do bất thường cấu trúc tim [1]. Bệnh nhân có triệu chứng và tử vong ở độ tuổi 40, xảy ra ở nam nhiều gấp 9 lần nữ, gây gánh nặng về kinh tế cho gia đình người bệnh [2]. Tần suất của bệnh khó xác định chính

*Tác giả liên hệ: Email: tranhuythinh@hmu.edu.vn

xác, khoảng 5/10.000 trên toàn thế giới, nhưng tập trung cao hơn ở vùng Đông Nam Á (1-14/1.000) [2]. Bệnh không có triệu chứng đặc hiệu nên khó chẩn đoán, chủ yếu dựa vào các hậu quả đã xuất hiện như nhịp nhanh thất, ngất, ngưng tim và biến đổi đoạn ST-T ở các chuyển đạo trước ngực phải (V1-V3) trên điện tâm đồ (ECG). Bệnh được chia làm ba típ, trong đó ECG Brugada típ 1 (ST-T cong vòm) được xem là thể điển hình (có thể là típ 1 tự phát hoặc do thuốc). Các ECG típ 2 (ST-T hình yên ngựa có độ chênh ≥ 1 mm) và típ 3 (ST-T hình yên ngựa có độ chênh < 1 mm) được chẩn đoán xác định khi thử nghiệm tiêm flecainide dương tính [3].

Nguyên nhân của hội chứng Brugada đã được xác định là do đột biến gây mất hoặc giảm chức năng của ít nhất một trong hai mươi gen liên quan đến hoạt động của các kênh ion dẫn truyền điện thế ở màng tế bào cơ tim [2]. Trong đó, đột biến trên gen SCN5A mã hóa cho bán đơn vị alpha của kênh natri phụ thuộc điện thế trên màng tế bào cơ tim chiếm tần suất cao nhất, khoảng 25-30% trong nhóm bệnh nhân được chẩn đoán hội chứng Brugada. Y văn đã ghi nhận hơn 200 loại đột biến gây hội chứng Brugada khác nhau, phân bố trên khắp 28 exon của gen SCN5A. Khoảng 95% là các đột biến điểm, loại thay thế một nucleotid dẫn đến thay thế một acid amin, còn lại là các loại đột biến xóa đoạn hoặc chèn đoạn ngắn [4]. Nếu được xác định tình trạng đột biến, người bệnh và người mang gen bệnh có thể được áp dụng các liệu pháp điều trị dự phòng như cấy máy phá rung tự động (ICD), dùng thuốc và theo dõi sát [2].

Trên toàn thế giới, các nghiên cứu lâm sàng và di truyền về nhóm bệnh rối loạn nhịp tim nói chung và hội chứng Brugada nói riêng tăng lên rất nhanh trong những năm gần

đây. Tại Việt Nam, lĩnh vực này còn hạn chế và hầu như chưa có nghiên cứu nào xác định dạng rối loạn di truyền ở bệnh nhân Brugada và người mang gen bệnh. Chúng tôi báo cáo một trường hợp bệnh nhân nam, tình cờ phát hiện mắc hội chứng Brugada khi đo ECG. Nghiệm pháp flecainide được tiến hành tại Viện Tim TP Hồ Chí Minh cho kết quả dương tính. Xét nghiệm gen được tiến hành tại Trung tâm Nghiên cứu Gen - Protein, Trường Đại học Y Hà Nội. Phân tích hai mươi gen liên quan [2] bằng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới và kỹ thuật giải trình tự Sanger, phát hiện một đột biến thay thế trên exon 5 gen SCN5A chưa được công bố trước đây. Đột biến được phân tích dự đoán khả năng gây bệnh bằng phần mềm Polyphen-2 [5, 6].

Giới thiệu ca lâm sàng

Bệnh nhân nam 43 tuổi là nhân viên kinh doanh, không có tiền căn bệnh lý gì trước đây, không ngất, không thờ kiểu hấp hối về đêm, không có tiền căn đột tử trong gia đình. Bệnh nhân đi khám ở phòng khám tư nhân vì hồi hộp, thường xuyên cảm giác hụt hơi. ECG lúc nghỉ ngơi tại phòng khám tư ghi nhận hình ảnh của hội chứng Brugada típ 2 gồm sóng T hai pha, đoạn ST-T dạng yên ngựa ở V1 (hình 1A). Bệnh nhân được chỉ định thực hiện nghiệm pháp tiêm flecainide để khẳng định chẩn đoán. Ngày 23/4/2018, bệnh nhân đến khám tại Viện Tim TP Hồ Chí Minh.

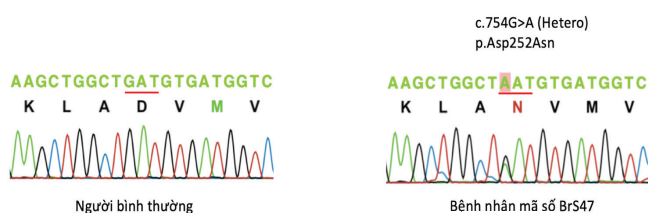
Hồ sơ khám không ghi nhận triệu chứng bất thường. ECG vẫn cho thấy hình ảnh sóng T hai pha và ST-T dạng yên ngựa ở V1. Các xét nghiệm huyết học, hóa sinh miễn dịch (ion đồ, troponin tim, công thức máu, độ lọc cầu thận ước tính...) và X-quang tim phổi thẳng của người bệnh đều



Hình 1. Hình ảnh điện tâm đồ của bệnh nhân. (A) ECG lúc nghỉ ngơi 11/4/2018 cho thấy sóng T hai pha, đoạn ST-T dạng yên ngựa ở V1; (B) ECG khi đang làm thử nghiệm flecainide 23/4/2018 cho thấy điểm J cao, T âm, ST-T dạng vòm.

trong giới hạn bình thường. Siêu âm tim cho thấy chức năng tâm thu thất trái tốt (FE 70%), hồ van hai lá 1/4 típ IIA2, không tăng áp động mạch phổi. Phim chụp MSCT 640 lát cắt cho thấy hệ động mạch vành bị hẹp 30% đoạn giữa nhánh trái trước (LAD) và đoạn giữa nhánh phải (RCA). Bệnh nhân được tiến hành nghiệm pháp tiêm flecanide. Trong lúc tiến hành, không thấy xuất hiện hiện tượng rối loạn nhịp thất. Nghiệm pháp được kết luận dương tính với sự xuất hiện điểm J cao, sóng T âm sâu, đoạn ST-T cong vòm ở V1 và V2 (hình 1B). Bệnh nhân được chẩn đoán xác định hội chứng Brugada típ 1 do thuốc.

Bệnh nhân được lấy máu tĩnh mạch và thực hiện xét nghiệm phân tích tìm đột biến trên 20 gen được báo cáo là có liên quan đến bệnh sinh của hội chứng Brugada, gồm: SCN5A, ABCC9, CACNA1C, CACNA2D1, CACNB2, GPD1L, HCN4, KCND3, KCNE3, KCNE5, KCNH2, KCNJ8, PKP2, RANGRF, SCN10A, SCN1B, SCN2B, SCN3B, SLMAP, TRPM4. Kết quả giải trình tự thế hệ mới (NGS) và giải trình tự Sanger cho thấy có biến đổi thay thế acid amin D252N tại exon 5 trên gen SCN5A. Biến đổi này ở trạng thái dị hợp tử (hình 2).



Hình 2. Kết quả phát hiện đột biến bằng giải trình tự Sanger. Biểu đồ tín hiệu cho thấy biến đổi thay thế một nucleotide tại vị trí c.754G>A, tạo ra đột biến D252N ở exon 5 trên gen SCN5A (vị trí bộ ba có gạch chân).

Chúng tôi sử dụng phần mềm phân tích cấu trúc và dự đoán biến đổi chức năng protein từ đột biến. Phần mềm Polyphen-2 [5, 6] là một công cụ được phát triển bởi các nhà khoa học ở Đại học Harvard (Hoa Kỳ), giúp tiên đoán ảnh hưởng của một biến đổi loại thay thế acid amin lên cấu trúc và chức năng protein người. Phần mềm sử dụng nhiều cơ sở dữ liệu di truyền, chủ yếu là UniProtKB và SwissProt làm nguồn tham khảo cho tất cả các trình tự và chú giải về đặc tính của protein. Để dự đoán một sự thay thế acid amin nhất định trong protein, Polyphen-2 trích xuất các tính năng dựa trên cấu trúc và trình tự khác nhau của vị trí thay thế và đưa chúng vào phân loại xác suất theo hai mô hình HumDiv và HumVar. Điểm số của hai mô hình này được cho từ 0 (không có khả năng gây bệnh) đến 1 (khả năng gây bệnh lớn nhất). Cả hai mô hình khi đánh giá đột biến D252N đều cho điểm số cao: HumDiv là 1,000 và HumVar là 0,999, cho thấy phần mềm dự đoán khả năng đột biến D252N gây ảnh hưởng đến chức năng của protein $Na_v1.5$ và dẫn đến tình trạng bệnh là cao. Công cụ có bổ sung dữ liệu

về mức độ bảo tồn của vị trí acid amin giữa các loài khác nhau (multiple sequence alignment, MSA), cho thấy mức độ bảo tồn của vị trí đột biến cũng như của vùng lân cận rất cao, chứng tỏ mức độ quan trọng của vị trí này (hình 3).

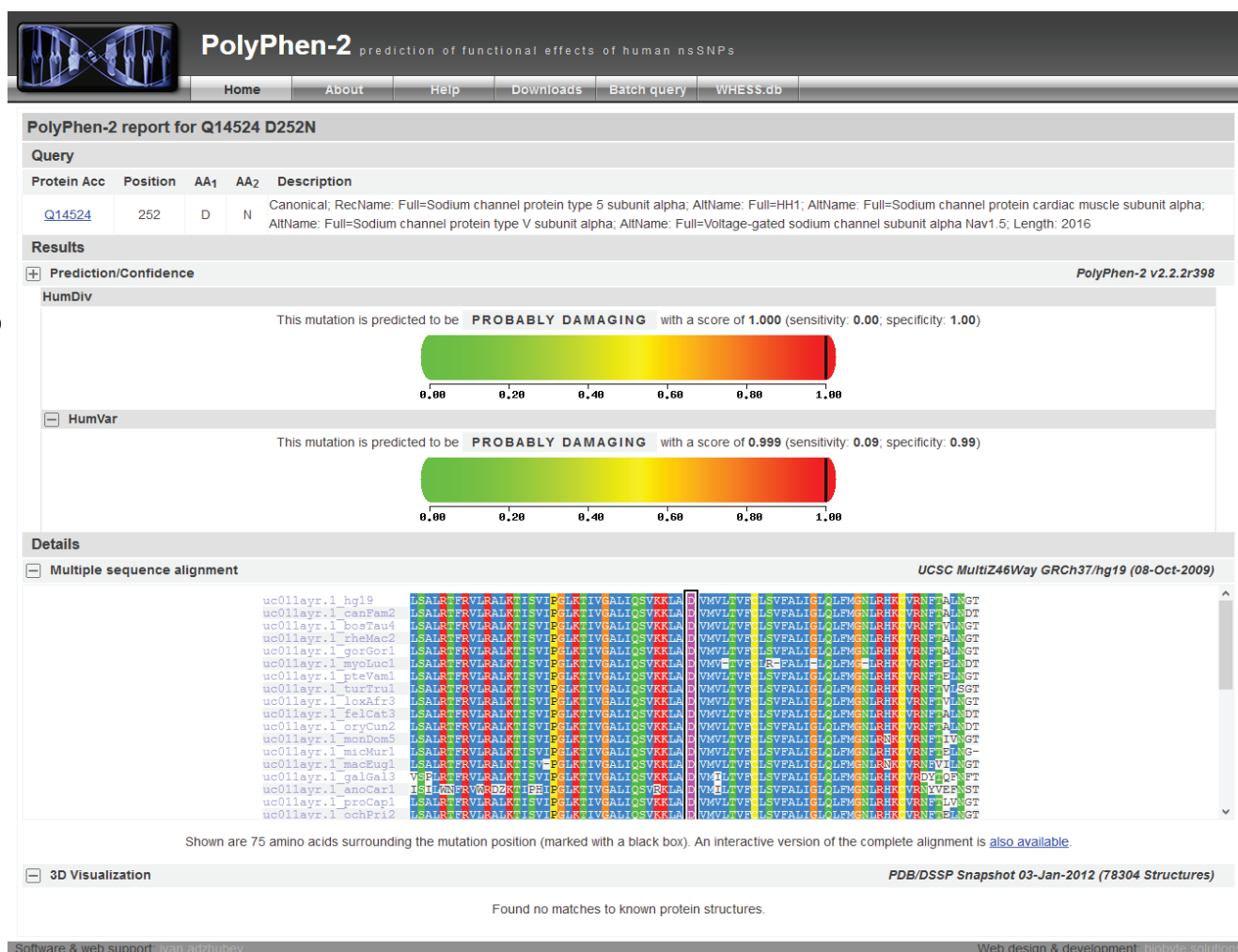
Hiện tại, bệnh nhân đang được theo dõi định kỳ tại Viện Tim TP Hồ Chí Minh, được hướng dẫn tránh tiếp xúc với các yếu tố gây khởi phát triệu chứng của hội chứng Brugada như môi trường nóng bức, kích thích tâm lý, sốt cao và dùng các thuốc chống loạn nhịp hoặc các thuốc trầm cảm có tác dụng trên kênh natri. Dù có chỉ định nhưng bệnh nhân chưa đặt máy phá rung tự động do chi phí cao.

Đạo đức trong nghiên cứu: nghiên cứu đảm bảo tuân thủ các quy định đạo đức trong nghiên cứu y sinh học. Đề tài đã được thông qua bởi Hội đồng Đạo đức của Trường Đại học Y Hà Nội và Viện Tim TP Hồ Chí Minh.

Bàn luận

Hội chứng Brugada thuộc nhóm bệnh bất thường kênh ion ở tế bào cơ tim, thường gây ra những cơn nhịp nhanh thất đa dạng và rung thất dẫn đến đột tử [2, 3]. Bệnh được chú ý nhiều ở vùng Đông Nam Á, bao gồm cả Việt Nam, với rất ít biểu hiện lâm sàng. Đây là một bệnh di truyền phối hợp đa gen, đột biến trên một số gen mã hoá cho các thành phần cấu trúc hoặc điều hoà của các kênh ion trên màng tế bào cơ tim, làm biến đổi chức năng sinh lý của các protein này; tạo ra các thay đổi về dẫn truyền điện học của cơ tim, biểu hiện trên điện tâm đồ và trên lâm sàng hội chứng Brugada. Trong các gen chịu trách nhiệm đã được công bố, gen SCN5A mã hoá cho bán đơn vị alpha của kênh natri $Na_v1.5$ trên màng tế bào cơ tim và các đột biến của nó, đóng vai trò quan trọng nhất gây ra hội chứng Brugada, với tần suất lưu hành từ 11 đến 28% trong nhóm đã được chẩn đoán hội chứng Brugada và khoảng 50% trong nhóm hội chứng Brugada có đột biến gen được xác định [7, 8].

Tuy đã có nhiều báo cáo tổng kết và một vài báo cáo ca lâm sàng về hội chứng Brugada tại Việt Nam trong những năm gần đây, nhưng đây là trường hợp đầu tiên được ghi nhận về cả đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và đặc điểm gen tại nước ta. Bệnh nhân này được chẩn đoán hội chứng Brugada típ 1 do thuốc. Khi sàng lọc các biến đổi trên 20 gen liên quan đến bệnh (như đã nêu ở trên, gồm các gen mã hóa cho các bán đơn vị các kênh natri, kali, calci và các protein điều hòa hoạt động các kênh này) bằng kỹ thuật giải trình tự NGS và Sanger, chỉ có một biến đổi gen tại exon 5 trên gen SCN5A được ghi nhận (hình 2). Đây là một biến đổi di truyền loại thay đổi đơn nucleotid (guanine thành adenine) tại vị trí 754 (exon 5) của cDNA gen SCN5A. Tại vị trí biến đổi, có sự hiện diện của hai quần thể nucleotid guanine và adenine, cho thấy biến đổi ở trạng thái dị hợp tử. Biến đổi gen này làm cho trên phân tử protein $Na_v1.5$,



Hình 3. Dữ liệu phân tích dự đoán khả năng gây hội chứng Brugada của đột biến D252N trên gen SCN5A bằng phần mềm Polyphen-2. (A) Độ tin cậy dự đoán khả năng sẽ gây bệnh: điểm tin cậy gần như tuyệt đối HumDiv 1,000 và HumVar 0,999; (B) Phân tích MSA: vùng 75 acid amin quanh vị trí đột biến (được đóng khung màu đen) ở nhiều biến thể loài gần hầu như rất hiếm có sự thay đổi acid amin, thể hiện tính bảo tồn rất cao của vùng đột biến.

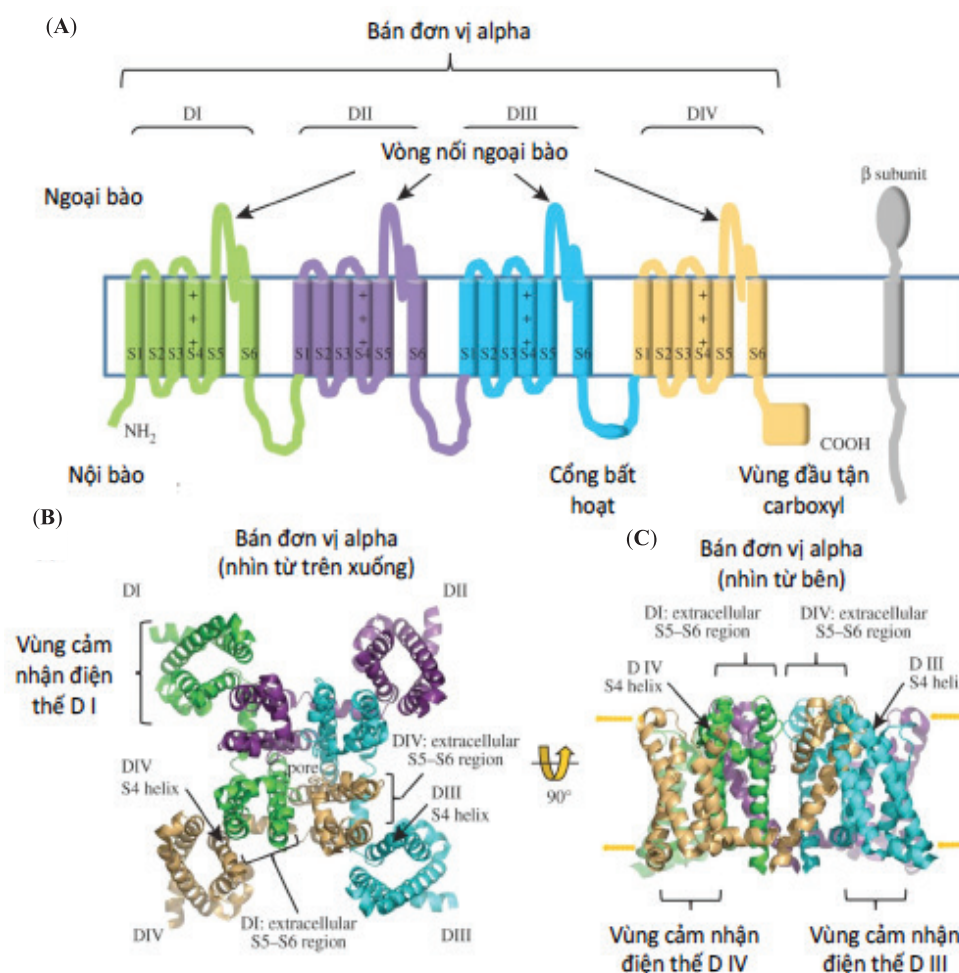
tại vị trí codon 252, acid amin aspartate (acid amin tích điện âm) bị thay thế bởi asparagine (acid amin tích điện dương), tạo ra biến đổi D252N. Vị trí đột biến xảy ra tại đoạn xoắn S1-S4/S5 của vùng xuyên màng D₁ của protein bán đơn vị alpha kênh natri. Đây là một trong bốn vùng cảm nhận điện thế của kênh, có nhiệm vụ khởi động cho quá trình mở lỗ trung tâm của kênh (cho dòng natri đi ra, đi vào tế bào cơ tim) (hình 4). Do đó, đột biến thay thế acid amin khác biệt về tính tích điện có thể gây ra biến đổi cấu trúc protein, gây ảnh hưởng đến chức năng.

Khi tìm hiểu về biến đổi D252N trên gen SCN5A trên một số cơ sở dữ liệu di truyền sinh học như ClinVar của NCBI hoặc Ensembl, đều chưa ghi nhận được thông tin về biến đổi này ở bệnh nhân hội chứng Brugada, cho thấy đây có thể là một đột biến mới trên gen SCN5A.

Theo kết quả dự đoán từ phần mềm Polyphen-2, tính

gây tổn hại hoặc lành tính của đột biến được thể hiện thông qua một “điểm số” (score), điểm số càng cao chứng tỏ càng có khả năng gây bệnh (cao nhất là 1,000). Độ tin cậy của điểm số này thể hiện qua độ nhạy và độ đặc hiệu dự đoán. Hiệu ứng gây hại dự đoán cũng được trực quan hóa bằng một điểm đánh dấu màu đen dọc bên trong thanh chuyển màu, trong đó màu xanh lá cây là lành tính và màu đỏ là gây hại (hình 3A). Đột biến D252N này có điểm số HumDiv và HumVar lần lượt là 1,000 và 0,999, chứng tỏ khả năng gây bệnh rất cao. Ngoài ra, khi xét tính bảo tồn của loại biến đổi này, kết quả phân tích MSA cho thấy biến đổi D252N này được bảo tồn cao so với các biến thể loài gần (hình 3B) cũng góp phần thể hiện tính quan trọng của vùng gen này.

Khi xét từ khía cạnh lâm sàng, các triệu chứng và bối cảnh giúp phát hiện bệnh không mang tính đặc hiệu cao. Vì là bệnh di truyền theo kiểu trội [2] nên đa phần các trường



Hình 4. Cấu trúc bán đơn vị alpha của protein Na_v1.5 [9]. (A) Sơ đồ các vùng xuyên màng D_I-D_{IV}; (B) Mô hình (dạng ribbon band) bán đơn vị alpha của kênh nhìn từ trên xuống; (C) Mô hình (dạng ribbon band) bán đơn vị alpha của kênh nhìn từ bên.

hợp hội chứng Brugada có tính chất gia đình rõ ràng. Bệnh nhân này ở trạng thái dị hợp tử, điều này có thể lý giải việc tuy chưa có các biểu hiện lâm sàng nhưng đã xuất hiện ngoại tâm thu thất trong thử nghiệm tiêm flecanide. Chưa có bằng chứng cho thấy mối liên quan giữa trạng thái dị hợp hoặc đồng hợp tử với mức độ nặng hoặc triệu chứng bệnh trên lâm sàng.

Mối liên hệ giữa kiểu gen và kiểu hình của hội chứng Brugada khó phân tích do đây là một bệnh có phối hợp đa gen, đa đột biến. Các biến đổi trên gen gây thay đổi cấu trúc protein, đều là các kênh ion trên tế bào cơ tim, hoặc là các phân tử tác động lên sự hoạt động của các kênh này. Sự biến đổi cấu trúc protein làm thay đổi luồng ion đi ra hoặc đi vào tế bào, gây ra các hiện tượng khử cực muộn hoặc tái cực sớm. Đây chính là các sinh lý bệnh, làm người bệnh dễ rơi vào các rối loạn nhịp, nhất là rối loạn nhịp thất gây nguy hiểm tính mạng. Việc khảo sát cùng lúc nhiều gen giúp làm

rõ và giới hạn cơ chế này. Mặt khác, khi dùng kỹ thuật tiếp cận ở mức độ DNA, chưa thể khảo sát được quá trình điều hòa biểu hiện từ biến đổi gen ra protein. Quá trình này cũng góp phần gây ra các biểu hiện lâm sàng (kiểu hình) khác nhau cho các bệnh nhân hội chứng Brugada.

Khi xét tác động trên một gen cụ thể, sự phân bố các đột biến thường rộng khắp, rải rác nhiều exon. Mỗi exon mã hoá cho một vùng cấu trúc đặc hiệu của kênh ion, gồm: các bán đơn vị alpha, beta (được tạo thành từ các đoạn xuyên màng), lỗ trung tâm (được tạo thành từ các vòng nối nội bào) và các vùng cảm nhận điện thế. Trạng thái cấu hình của các bán đơn vị thay đổi theo thời gian và tình trạng điện thế, cho phép kênh mở hoặc đóng đối với dòng ion. Các đột biến xuất hiện trên nhiều exon, gây ảnh hưởng tăng hoặc giảm hoạt động của vùng chức năng mà chúng mã hoá, tạo kết quả là kiểu hình trên lâm sàng hết sức đa dạng. Vì vậy, việc sử dụng các bằng chứng phân tích cấu trúc và chức năng của

đột biến dựa trên mô hình *in silico* để đưa ra các tiên đoán về mức độ nguy hại của các đột biến gen mới là rất cần thiết trong hoàn cảnh hạn chế các nghiên cứu trên mô hình tế bào hoặc động vật. Tuy nhiên, các phân tích về chức năng trên thực nghiệm là không thể thay thế được. Trong khuôn khổ trường hợp này, kiểu gen liên quan đến đột biến D252N exon 5 gen SCN5A ở bố mẹ bệnh nhân chưa được khảo sát do tình hình dịch bệnh Covid-19. Đây cũng là một phần hạn chế của đề tài. Nhóm nghiên cứu đã có kế hoạch lấy mẫu làm phá hệ các trường hợp đột biến nghi ngờ gây bệnh trong một nghiên cứu tiếp theo.

Việc bệnh nhân được chẩn đoán là hội chứng Brugada típ 1, cùng với sự hiện diện của đột biến thay thế acid amin mới D252N trên exon 5 gen SCN5A, đi kèm dự đoán khả năng gây bệnh cao của đột biến cho thấy, bệnh nhân này có nguy cơ bộc lộ các biểu hiện lâm sàng của hội chứng Brugada (như loạn nhịp thất hoặc đột tử) [8, 10] và khả năng di truyền cho thế hệ sau. Việc đặt ICD dự phòng và xét nghiệm gen cho thế hệ sau là cần thiết và đúng chỉ định [11].

Đây là một trường hợp hội chứng Brugada được xem xét ở cả góc độ lâm sàng, cận lâm sàng và phân tích biến đổi gen. Việc xác định được đột biến trên gen SCN5A góp phần xác định nguyên nhân của bệnh, cũng như khả năng có thể di truyền cho thế hệ sau của người bệnh. Việc người bệnh có mang đột biến gây bệnh hay không tồn tại độc lập với các biểu hiện lâm sàng, đặc biệt ở giai đoạn chưa có hậu quả của bệnh. Do đó, việc xét nghiệm di truyền cho các bệnh nhân thể Brugada không điển hình là cần thiết.

Kết luận

Đã phát hiện một trường hợp đột biến D252N trên gen SCN5A ở bệnh nhân hội chứng Brugada. Đây là đột biến mới chưa được công bố trên y văn thế giới. Đột biến này được xếp vào nhóm đột biến gây bệnh, dựa trên các phân tích cấu trúc và chức năng trên mô hình *in silico*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P. Brugada, J. Brugada (1992), "Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report", *J. Amer. Coll. Cardiol.*, **20**, pp.1391-1396.
- [2] C. Antzelevitch, B. Patocskai (2016), "Brugada syndrome: clinical, genetic, molecular, cellular, and ionic aspects", *Curr. Probl. Cardiol.*, **41**, pp.7-57.
- [3] C. Antzelevitch, G.X. Yan, M.J. Ackerman, et al. (2016), "J-wave syndromes expert consensus conference report: emerging concepts and gaps in knowledge", *Heart Rhythm*, **13**, pp.e295-e324.
- [4] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q14524>.
- [5] I.A. Adzhubei, S. Schmidt, L. Peshkin, et al. (2010), "A method and server for predicting damaging missense mutations", *Nat. Methods*, **7**(4), pp.248-249.
- [6] I.A. Adzhubei, D.M. Jordan, S.R. Sunyaev (2013), "Predicting functional effect of human missense mutations using Polyphen-2", *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, Chapter 7, DOI: 10.1002/0471142905.hg0720s76.
- [7] Q. Chen, G.E. Kirsch, D. Zhang, et al. (1998), "Genetic basis and molecular mechanisms for idiopathic ventricular fibrillation", *Nature*, **392**(6673), pp.293-296.
- [8] J.D. Kapplinger, D.J. Tester, M. Alders, et al. (2010), "An international compendium of mutations in the SCN5A encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing", *Heart Rhythm*, **7**(1), pp.33-46.
- [9] S. Namadurai, N.R. Yereddi, F.S. Cusdin, et al. (2015), "A new look at sodium channel β subunits", *Open Biol.*, **5**(1), DOI: 10.1098/rsob.140192.
- [10] S.G. Priori, M. Gasparini, C. Napolitano, et al. (2012), "Risk stratification in Brugada syndrome: result of the PRELUDE (Programmed electrical stimulation predictive value) registry", *J. Am. Coll. Cardiol.*, **59**(1), pp.37-45, DOI: 10.1016/j.jacc.2011.08.064.
- [11] S.G. Priori, A.A. Wilde, M. Horie, et al. (2013), "HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: document endorsed by HRS, EHRA, and APHRS in May 2013 and by ACCF, AHA, PACES, and AEPC in June 2013", *Heart Rhythm*, **10**(12), pp.1932-1963.

Báo cáo ca bệnh khảm trisomy một phần nhiễm sắc thể số 9

Hoàng Thị Hải¹, Hoàng Thị Ngọc Lan^{1,2}, Vũ Thị Hà^{1,2},
Nguyễn Thị Sim³, Hồ Khánh Dung³, Đoàn Thị Kim Phụng^{1,2*}

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

³Bệnh viện Phụ sản Hà Nội

Ngày nhận bài 24/5/2021; ngày chuyển phản biện 28/5/2021; ngày nhận phản biện 25/6/2021; ngày chấp nhận đăng 2/7/2021

Tóm tắt:

Hội chứng trisomy nhiễm sắc thể (NST) số 9 (trisomy 9) và dạng bất thường khác liên quan như khảm trisomy 9 toàn phần hoặc một phần là các chứng rối loạn NST ở người rất hiếm gặp, thường chết ngay ở giai đoạn phôi thai hoặc có đời sống rất ngắn, chỉ 20 ngày sau khi sinh kèm theo nhiều dị tật hệ cơ quan. Ca bệnh được báo cáo ở đây là nữ 26 tuổi, được xác định khảm trisomy một phần NST 9 bằng xét nghiệm nuôi cấy phân tích NST bạch cầu lympho và lai so sánh hệ gen (Array comparative genomic hybridization - aCGH), nhưng có đời sống dài hơn so với ghi nhận của y văn và có khả năng sinh sản. Bệnh nhân không có bất thường về trí tuệ, vận động; không có bất thường cấu trúc cơ quan qua siêu âm hình thái; ở bàn tay trái có cong vẹo ngón cái và mụn thịt rải rác ở lòng bàn tay; đã sinh một con trai khỏe mạnh sau 3 lần thai chết lưu liên tiếp. Báo cáo cho thấy các biểu hiện lâm sàng đa dạng của bất thường trisomy 9 dạng khảm ở người, đóng góp vào nguồn dữ liệu hiếm các trường hợp mắc bệnh này. Từ đó bổ sung vào kiến thức tư vấn di truyền đối với các ca bệnh hiếm của trisomy một phần NST 9 thể khảm, đặc biệt là tư vấn di truyền chẩn đoán trước sinh để tiên lượng tình trạng của thai nhi.

Từ khóa: array CGH, khảm, nhiễm sắc thể đồ, trisomy 9 một phần.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

Trisomy 9 là một dạng bất thường NST hiếm gặp ở người, và càng hiếm gặp ở người trưởng thành. Dạng bất thường này chiếm 2,4% trong tổng số các ca sảy thai và thai chết lưu [1]. Trisomy 9 thường gây ra khuyết tật vận động và trí tuệ nghiêm trọng, chậm phát triển tâm thần và thể chất, bất thường hình thái như đầu nhỏ, bất đối xứng sọ mặt, bất thường về hệ xương. Chỉ khoảng 1/3 các trường hợp trisomy 9 có bất thường cấu trúc hệ thần kinh trung ương [2].

Với những dị tật nặng nề của trisomy 9, bệnh nhân thường tử vong sớm trong vòng 20 ngày sau sinh. Tỷ lệ sống sót của bệnh nhân thể khảm và thể thuần trisomy 9 có thể khác nhau nhưng hầu hết đều có tỷ lệ dị tật ở nhiều cơ quan trong cơ thể [3]. Chúng tôi báo cáo ca bệnh nhân nữ 26 tuổi, được xác định có khảm trisomy một phần NST 9 bằng xét nghiệm NST đồ và lai so sánh hệ gen (aCGH), nhưng có đời sống dài hơn so với y văn đã báo cáo. Bệnh nhân không có bất thường về trí tuệ, vận động; qua siêu âm hình thái

không phát hiện thấy bất thường cấu trúc cơ quan; đã sinh con trai khỏe mạnh sau 3 lần hỏng thai liên tiếp. Báo cáo này cho thấy các biểu hiện lâm sàng đa dạng của bất thường trisomy 9 dạng khảm, đóng góp vào nguồn dữ liệu hiếm các trường hợp mắc bệnh này.

Báo cáo ca bệnh

Bệnh nhân nữ 26 tuổi, là con thứ 3 trong gia đình có 3 anh chị em, được sinh thường ở tuổi thai 38 tuần với cân nặng lúc sinh là 3,0 kg. Người mẹ 30 tuổi, không có tiền sử bệnh mạn tính hoặc phơi nhiễm với các tác nhân gây ra đột biến. Các thành viên trong gia đình đều khỏe mạnh và phát triển bình thường. Bệnh nhân được ghi nhận các mốc phát triển tâm thần vận động bình thường, biết đi lúc 9 tháng tuổi. Bệnh nhân có kinh nguyệt lần đầu năm 14 tuổi, chu kỳ đều 30 ngày; kết hôn năm 22 tuổi, học hết lớp 9, làm công nhân may.

Bệnh nhân đến khám lúc 24 tuổi vì bị hỏng thai 3 lần: 1 lần thai chết lưu; 2 lần cận ối, bong màng nuôi lúc thai 12

*Tác giả liên hệ: Email: doankimphuong@hmu.edu.vn

Report of a case with partial trisomy 9 mosaicism

Thi Hai Hoang¹, Thi Ngoc Lan Hoang^{1,2}, Thi Ha Vu^{1,2},
Thi Sim Nguyen³, Khanh Dung Ho³,
Thi Kim Phuong Doan^{1,2*}

¹Hanoi Medical University

²Hanoi Medical University Hospital

³Hanoi Obstetrics and Gynecology Hospital

Received 24 May 2021; accepted 2 July 2021

Abstract:

Trisomy 9 syndrome and other related abnormalities such as full or mosaic trisomy 9 are very rare human chromosomal disorders. The disorders cause early pregnancy loss or death within 20 days after the birth which is accompanied by complex birth defects. The case reported here is a 26-year-old female, identified with partial trisomy of chromosome 9 by Array comparative genomic hybridization - aCGH, but has a longer life than reported in the medical literature and can give birth. The patient did not have abnormal mental or motor problems; no morphological ultrasound abnormalities; curved thumb and scattered warts on the left hand; gave birth to a healthy son after three consecutive stillbirths. The report has shown diverse clinical manifestations of trisomy 9 mosaic abnormalities in humans, contributing to a rare data source of trisomy 9 mosaic cases. Since then, improve knowledge of genetic counseling for rare cases of trisomy 9 mosaicism, especially in genetic counseling of prenatal diagnosis.

Keywords: array CGH, karyotyping, mosaicism, partial trisomy of chromosome 9.

Classification number: 3.1

tuần và 7 tuần. Bệnh nhân có thể trạng thấp gầy: cao 149 cm, nặng 38 kg. Bàn tay trái bị cong vẹo ngón cái, các nốt mụn thịt rải rác ở lòng bàn tay (hình 1). Siêu âm tim mạch, ổ bụng, tử cung, buồng trứng không phát hiện bất thường. Các xét nghiệm sinh hóa và huyết học cơ bản trong ngưỡng bình thường.



Hình 1. Cong vẹo ngón cái trái và các mụn thịt rải rác ở lòng bàn tay.

Xét nghiệm nuôi cấy và phân tích nhiễm sắc thể bạch cầu lympho máu ngoại vi phát hiện tình trạng khảm 2 dòng tế bào: 1 dòng bình thường 46,XX chiếm 29,4% và 1 dòng thêm một NST marker nghi ngờ có nguồn gốc từ NST 9, chiếm 70,6%. Công thức NST đồ là: 47,XX,+mar[24]/46,XX[10] (hình 2).

Để xác định chính xác vật chất di truyền tăng thêm có phải nguồn gốc từ NST số 9 hay không, mẫu máu ngoại vi của bệnh nhân được tách DNA để xét nghiệm lai so sánh hệ gen (aCGH) đã xác định được chính xác phần vật chất di truyền tăng lên có nguồn gốc từ NST số 9 (hình 3). Ba vùng thêm đoạn NST 9 được ghi nhận gồm:

arr[GRCh37]9p13.1p12(40771173_42965378)x3;

arr[GRCh37]9q12q21.11(65632517_70489031)x3;

arr[GRCh37] 9p24.3p11.2(123950_442860239)x3.

Như vậy, điểm xa nhất bị đột biến trên nhánh ngắn NST 9 là 9p24.3 và điểm xa nhất bị đột biến trên nhánh dài NST 9 là 9q21.11 (hình 4). Kết hợp với kết quả NST đồ, có thể xác định bệnh nhân ở trạng thái khảm trisomy một phần NST 9; đoạn NST thừa ít nhất từ 9p24.3 đến 9q21.11.

Hai năm sau thời điểm đến khám và phát hiện ra tình trạng khảm trisomy một phần NST 9, bệnh nhân đã thụ thai tự nhiên, sinh thường được một bé trai khỏe mạnh.

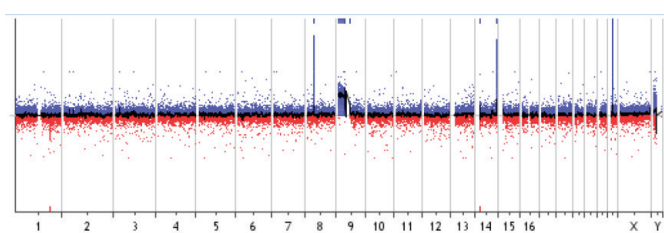


(A)

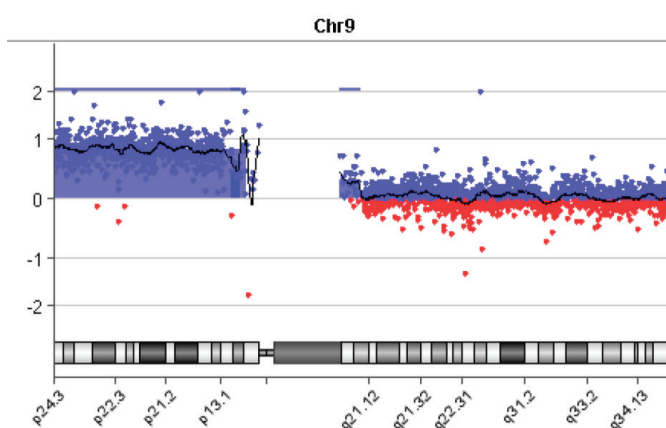


(B)

Hình 2. NST đồ. (A) Dòng tế bào thừa một NST marker chiếm 70,6%: 47,XX,+mar. (B) Dòng tế bào bình thường, chiếm 29,4%: 46,XX.



Hình 3. Vùng tăng vật chất di truyền thuộc NST số 9.



Hình 4. Trên NST 9, vùng tăng vật chất di truyền được ghi nhận từ 9p24.3 đến 9q21.11

Bàn luận

Tình trạng trisomy 9 và dạng bất thường khác liên quan như khảm trisomy 9 toàn phần hoặc một phần là các chứng rối loạn NST ở người rất hiếm gặp. Trẻ em sinh ra với

trisomy 9 thuần thường chết ngay sau khi sinh hoặc trong vòng một năm sau khi sinh, trong khi những trẻ sinh ra với khảm trisomy 9 có thể sống sót đến tuổi trưởng thành sẽ có các bất thường về hình thái và chức năng. Tình trạng khảm trisomy 9 thường liên quan đến trọng lượng sơ sinh thấp và cơ thể chậm phát triển, khó khăn trong học tập, giao tiếp và nói chậm. Các đặc điểm cơ thể đặc trưng bao gồm tật đầu nhỏ, khớp lỏng lẻo, bất thường sọ não như tai thấp, hở hàm ếch cũng như bất thường về xương sọ, bàn tay và bàn chân. Các bệnh lý nhiều mô rất phổ biến và có thể liên quan đến các hệ cơ quan khác nhau như tim, thận, não và thần kinh trung ương, đường sinh dục và tiết niệu, cơ (tăng trương lực) và đường tiêu hóa. Đối với thai trisomy một phần nhánh ngắn NST 9 được báo cáo với khe hở vòm hàm, tiểu não bất thường, thận tăng âm vang và bàn chân khoèo hai bên [4-6]. Trường hợp khảm trisomy một phần NST 9 được mô tả trong báo cáo này không biểu hiện các đặc điểm bệnh chính như các báo cáo đã thống kê, không có đặc điểm nổi bật nào khác trên khuôn mặt được nhìn thấy như mô tả, mà chỉ có biểu hiện cong vẹo ngón cái và rải rác mụn thịt ở lòng bàn tay trái. Bệnh nhân đang sống ở tuổi trưởng thành và thụ thai tự nhiên, sinh thường được một bé trai khỏe mạnh sau 3 lần sảy thai và thai chết lưu liên tiếp [1, 7].

Nghiên cứu của D. Bruns năm 2011 [6] cho thấy, các ca bệnh khảm trisomy 9 dường như không có mối tương quan rõ ràng về mức độ khảm với mức độ nghiêm trọng của kiểu hình bệnh. Sự biểu hiện thiếu tương quan giữa kiểu hình với kiểu gen như thế này có thể do mức độ khảm trisomy

9 thường chỉ được đánh giá ở tế bào bạch cầu lympho máu ngoại vi mà chưa thống kê được mức độ khảm NST 9 ở các mô khác, đặc biệt là mô sinh dục. Cũng có thể là trong quá trình phát triển trước và sau khi sinh, tỷ lệ tế bào trisomy 9 trong các mô khác nhau đã thay đổi đáng kể do sự khác biệt về tốc độ phát triển nội tại và quá trình chết của tế bào bình thường và tế bào bệnh lý mang trisomy 9 trong cá thể. Ngoài ra, ngay cả trong một mô hoặc cơ quan, khảm trisomy 9 cũng có thể phát sinh khác biệt ở từng vùng. Trong trường hợp ca bệnh ở đây, chúng tôi đã quan sát thấy tỷ lệ khá cao khảm trisomy một phần NST 9 (70,6%) từ mô máu ngoại vi nhưng biểu hiện lâm sàng ít nặng nề như các báo cáo trong y văn cũng có thể do tỷ lệ khảm này chưa được đánh giá ở các mô khác trong cơ thể. Một điều đáng quan tâm nữa là với kết quả xét nghiệm aCGH đã xác định được chính xác phần NST 9 tăng lên ít nhất ở vùng từ 9p24.3 đến 9q21.11. Vùng này chứa rất nhiều gen OMIM (trên 50 gen) với các ảnh hưởng chủ yếu đến chuyển hóa, thần kinh và phát triển tâm thần, vận động. Tuy nhiên, những ảnh hưởng đó không xuất hiện ở ca bệnh trong báo cáo này, có thể do tình trạng khảm trisomy 9 chỉ được đánh giá trong máu ngoại vi mà chưa đánh giá ở các mô khác của cơ thể. Tình trạng khảm một phần trisomy 9 có thể phát sinh trong mô sinh dưỡng của một cá thể ở giai đoạn sớm của quá trình phát triển phôi thai. Một số cơ chế đã được đề xuất cho sự hình thành trisomy khảm do lỗi NST không phân chia đồng đều trong giảm phân I hoặc giảm phân II. Phôi khảm có thể tiếp tục phát triển trong suốt giai đoạn trước và sau khi làm tổ, dẫn đến hình thành các bào thai khảm lưỡng bội - lệch bội. Trong báo cáo này, khảm trisomy một phần NST 9 từ 9p24.3 đến 9q21.11 còn có thể là hậu quả từ chuyển đoạn NST khác với NST 9 tại các điểm đứt 9q21.11 và 9p24.3 xảy ra ở bố hoặc mẹ. Nghiên cứu chưa xác định được karyotype của bố mẹ nhưng với bố mẹ có kiểu hình bình thường và không có tiền sử sảy thai, thai chết lưu cũng định hướng tình trạng khảm trisomy một phần NST 9 ở bệnh nhân có thể do đột biến mới phát sinh.

Kết luận

Ca bệnh này đã đóng góp một minh chứng trisomy một phần NST 9 (ít nhất từ 9p24.3 đến 9q21.11) với tỷ lệ khảm cao (70,6%) khi phân tích NST bạch cầu lympho máu ngoại vi, có biểu hiện lâm sàng rất ít, trí tuệ bình thường, cong vẹo ngón cái và rải rác mụn thịt ở lòng bàn tay trái, có khả năng sinh con khỏe mạnh sau một tiền sử hồng thai liên tiếp. Theo hiểu biết của chúng tôi, đây là ca bệnh chưa từng được công bố trong y văn. Từ đó, bổ sung vào vốn kiến thức tư vấn di truyền đối với các ca bệnh hiếm của trisomy 9 thể khảm. Trong tư vấn di truyền chẩn đoán trước sinh các trường hợp thai khảm trisomy 9 toàn phần hoặc một phần, cần xét nghiệm di truyền ở các mô khác nhau và phối hợp kết quả với biểu hiện bất thường của thai qua siêu âm để tiên lượng thật sát và đưa ra lời khuyên phù hợp cho gia đình lựa chọn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C. Stoll, D. Chognot, A. Halb, J.C. Luckel (1993), "Trisomy 9 mosaicism in two girls with multiple congenital malformations and mental retardation", *J. Med. Genet.*, **30**, pp.433-435, DOI: 10.1136/jmg.30.5.433.
- [2] A. Okumura, F. Hayakawa, T. Kato, K. Kuno, K. Watanabe (2000), "Two patients with trisomy 9 mosaicism", *Pediatr. Int.*, **42**, pp.89-91, DOI: 10.1046/j.1442-200x.2000.01159.x.
- [3] E.S. Cantu, D.J. Eicher, G.S. Pai, C.J. Donahue, R.A. Harley (1996), "Mosaic vs. nonmosaic trisomy 9: report of a liveborn infant evaluated by fluorescence in situ hybridization and review of the literature", *Am. J. Med. Genet.*, **62**, pp.330-335.
- [4] Ljiljana Pejic, et al. (2018), "Clinical manifestations in trisomy 9 mosaicism", *Turk. J. Pediatr.*, **60(6)**, pp.729-734.
- [5] Jana López-Félix, et al. (2017), "Partial trisomy 9: prenatal diagnosis and recurrence within same family", *Clin. Case Rep.*, **5(6)**, pp.986-992.
- [6] D. Bruns (2011), "Presenting physical characteristics, medical conditions, and developmental status of long-term survivors with trisomy 9 mosaicism", *Am. J. Med. Genet. A*, **155A(5)**, pp.1033-1039.
- [7] J. Ginsberg, S. Soukup, E.T. Ballard (1982), "Pathologic features of the eye in trisomy 9", *J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus*, **19**, pp.37-41.

Nhận xét thói quen ăn uống, lâm sàng ở bệnh nhân viêm teo niêm mạc dạ dày

Đào Trần Tiến^{1*}, Vũ Trường Khanh¹, Phí Thị Thùy Ngân¹, Nguyễn Công Long¹,
Nguyễn Thế Phương^{1,2}, Nguyễn Hoài Nam¹, Bùi Quang Thạch¹, Hoàng Nam¹

¹Trung tâm Tiêu hóa - Gan mật, Bệnh viện Bạch Mai

²Bộ môn Nội, Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 1/3/2021; ngày chuyển phản biện 5/3/2021; ngày nhận phản biện 22/4/2021; ngày chấp nhận đăng 27/4/2021

Tóm tắt:

Viêm teo niêm mạc dạ dày (VTNMDD) mạn tính là một trong những bệnh đường tiêu hóa phổ biến nhất có nhiều yếu tố nguy cơ. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá mối liên quan giữa các thói quen ăn uống và biểu hiện lâm sàng của bệnh nhân VTNMDD. Nghiên cứu thiết kế mô tả cắt ngang từ tháng 10/2018-10/2020 tại Trung tâm Tiêu hóa - Gan mật, Bệnh viện Bạch Mai với tổng số 3.508 bệnh nhân VTNMDD tuổi từ 40 (tỷ lệ nữ/nam là 1,68/1). Tất cả bệnh nhân được phỏng vấn dựa trên bộ câu hỏi sàng lọc thiết kế sẵn và nội soi dạ dày chẩn đoán VTNMDD. Kết quả cho thấy, triệu chứng hay gặp nhất là đau thượng vị (73,9%), ợ hơi/ợ chua (42,4%), đầy bụng (41%), trào ngược (15,4%). Đa số bệnh nhân viêm teo mức độ nhẹ (C1, C2, chiếm 80,4%) và vừa (C3, O1, chiếm 17%), mức độ nặng (O2, O3) chỉ chiếm 2,6%. Các yếu tố làm tăng nguy cơ biểu hiện lâm sàng gồm: chế độ ăn nhiều đồ rán kỹ, đồ nướng tăng nguy cơ đau thượng vị (OR 1,343; 95%CI 1,002-1,801); chế độ ăn nhiều thịt và các loại hạt/lạc tăng nguy cơ biểu hiện đầy bụng (OR 1,296; 95%CI 1,100-1,526 và OR 1,316; 95%CI 1,033-1,676), ợ hơi/ợ chua (OR 1,243; 95%CI 1,058-1,461 và OR 1,376; 95%CI 1,082-1,751). Chế độ ăn mặn và nhiều các loại hạt/lạc tăng nguy cơ biểu hiện trào ngược (OR 1,359; 95%CI 1,055-1,752 và OR 1,532; 95%CI 1,023-2,293). Chế độ ăn nhiều rau xanh là yếu tố bảo vệ giảm nguy cơ tiến triển viêm teo vừa, nặng (OR 0,616; 95%CI 0,403-0,941). Có thể thấy, chế độ ăn và loại thức ăn là yếu tố ảnh hưởng đến triệu chứng lâm sàng biểu hiện ở bệnh nhân VTNMDD, và việc điều chỉnh chế độ dinh dưỡng có ý nghĩa trong việc điều trị bệnh viêm dạ dày bên cạnh việc điều trị bằng thuốc.

Từ khóa: chế độ dinh dưỡng, viêm teo niêm mạc dạ dày (VTNMDD), yếu tố liên quan.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

VTNMDD mạn tính là một trong những bệnh đường tiêu hóa phổ biến nhất nhưng diễn biến từ từ. Ước tính có hàng trăm triệu người trên toàn thế giới bị viêm dạ dày với các mức độ khác nhau. Ở Việt Nam, chẩn đoán viêm dạ dày chủ yếu dựa vào nội soi trong đa số các trường hợp (>90%) [1]. Biểu hiện lâm sàng của viêm dạ dày rất đa dạng, gặp chủ yếu là đau vùng thượng vị, chướng bụng (70%) [1], thậm chí không có triệu chứng gì, tuy nhiên hiện nay không tìm được mối liên quan rõ ràng giữa biểu hiện lâm sàng và tổn thương trên nội soi.

Khi đánh giá các yếu tố làm tăng nguy cơ ung thư dạ dày, các nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh ngoài nhiễm vi khuẩn HP thì chế độ sinh hoạt như ăn nhiều muối, đồ nướng hoặc hút thuốc có mối liên quan chặt chẽ với nguy cơ phát triển ung thư 2-5 lần [2, 3]. Tuy nhiên, các nghiên

cứu thường ít đề cập đến ảnh hưởng của chế độ sinh hoạt tới các nguy cơ ung thư dạ dày như loạn sản dạ dày hoặc VTNMDD. Mặc dù không có bằng chứng rõ ràng cho thấy có mối liên quan giữa một số chế độ ăn với các biểu hiện và mức độ nặng VTNMDD mạn tính, cũng như chưa có nghiên cứu lâm sàng về hiệu quả điều trị của chế độ ăn, điều chỉnh lối sống tham gia vào điều trị VTNMDD mạn tính, nhưng các hướng dẫn điều trị đều đồng thuận rằng chế độ ăn hợp lý, thay đổi lối sống có thể góp phần cải thiện triệu chứng viêm dạ dày mạn tính đồng thời với việc sử dụng các điều trị thuốc [3, 4].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung vào bệnh nhân VTNMDD mạn tính với các triệu chứng tiêu hóa nhằm xác định mối liên quan giữa chế độ ăn, lối sinh hoạt và biểu hiện lâm sàng của bệnh nhân VTNMDD. Trên cơ sở đó có thể thiết lập mô hình chế độ ăn uống lành mạnh, giúp cải thiện chất lượng cuộc sống của bệnh nhân.

*Tác giả liên hệ: Email: daotrantien1982@gmail.com

Association of eating habits and clinical symptoms in atrophic gastritis patients

Tran Tien Dao^{1*}, Truong Khanh Vu¹, Thi Thuy Ngan Phi¹,
 Cong Long Nguyen¹, The Phuong Nguyen^{1,2},
 Hoai Nam Nguyen¹, Quang Thach Bui¹, Nam Hoang¹

¹Bach Mai Hospital

²Hanoi Medical University

Received 1 March 2021; accepted 27 April 2021

Abstract:

Atrophic gastritis is one of the most common gastric diseases, and many risk factors may increase the risk. This study aimed to assess the relationship between dietary factors and clinical symptoms of patients with atrophic gastritis. A cross-sectional study was conducted from October 2018 to October 2020 in the Center of Gastroenterology and Hepatology of Bach Mai Hospital with a total of 3508 atrophic gastritis patients aged ≥ 40 years (female/male ratio was 1.68). All patients were interviewed based on a designed questionnaire and underwent a gastroscopy procedure. The most common symptoms were epigastric pain (73.9%), belching/heartburn (42.4%), the feeling of fullness (41%), reflux symptom (15.4%). A majority of patients had mild atrophic gastritis (C1, C2) (80.4%), followed by moderate atrophic gastritis (C3, O1) (17%), and severe atrophic gastritis (O2, O3) (2.6%). A diet with much deep-fried or grilled food increased the risk of epigastric pain (OR 1.343; 95%CI 1.002-1.801); diets with much meat or nuts increased the risk of the feeling of fullness (meat: OR 1.296; 95%CI 1.100-1.526 and nuts: OR 1.316; 95%CI 1.033-1.676), and belching/heartburn (meat: OR 1.243; 95%CI 1.058-1.461 and nuts: OR 1.376; 95%CI 1.082-1.751). Diets with much salt or nuts increased the risk of reflux symptoms (salt: OR 1.359; 95%CI 1.055-1.752 and nuts: OR 1.532; 95%CI 1.023-2.293). A diet with many vegetables was a protective factor that can help to decrease the risk of moderate and severe atrophic gastritis (OR 0.616; 95%CI 0.403-0.941). In conclusion, diets and food types are factors that affect the risk of clinical symptoms among patients with atrophic gastritis, so the action of adjusting diets and daily food also play an important role in atrophic gastritis.

Keywords: atrophic gastritis, diets, risk factors.

Classification number: 3.1

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu của chúng tôi được tiến hành tại Trung tâm Tiêu hoá - Gan mật, Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 10/2018 đến 10/2020.

Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân: tất cả bệnh nhân đến khám tại Trung tâm Tiêu hoá - Gan mật, Bệnh viện Bạch Mai có tuổi ≥ 40 , có hình ảnh VTNMDD trên nội soi theo phân loại Kimura Takemoto [5].

Tiêu chuẩn loại trừ: bệnh nhân đã cắt dạ dày, ung thư dạ dày, loét dạ dày, tá tràng, có các bệnh lý viêm tụy, xơ gan, các rối loạn đông máu.

Phương pháp nghiên cứu: thiết kế nghiên cứu mô tả cắt ngang, với cỡ mẫu 3.500 người.

Phương tiện sử dụng: dây nội soi Fujinon 4450.

Các bước tiến hành: bệnh nhân được thăm khám, hỏi bệnh theo một bộ câu hỏi thiết kế sẵn. Nghiên cứu viên hỏi bệnh nhân về đặc điểm chế độ ăn gồm có chế độ ăn mặn, ăn cay, ăn nhiều đồ lên men, đồ chiên rán kỹ/đồ nướng, chế độ ăn thịt, các loại hạt, và chế độ ăn rau. Bệnh nhân được xác định là có chế độ ăn nhiều và thường xuyên khi có ít nhất là 5 lần lặp lại loại thức ăn đó trong một tuần. Các thói quen sinh hoạt khác được hỏi gồm thói quen hút thuốc lá, uống rượu bia, uống trà, cà phê, tập thể dục, chế độ ngủ và thói quen sử dụng các thuốc có thể có hại cho dạ dày như các thuốc thuộc nhóm NSAID, Aspirin và thuốc chống điều trị trầm cảm. Các bệnh nhân được thăm khám đầy đủ, nội soi dạ dày chẩn đoán và phân loại mức độ viêm teo theo tiêu chuẩn Kimura Takemoto: dựa trên vị trí của bờ teo niêm mạc (atrophic border) là ranh giới giữa phần dạ dày không teo và phần dạ dày có teo niêm mạc. Niêm mạc vùng teo nhạt màu và thấy được mạng mao mạch nằm phía bên dưới; niêm mạc vùng không teo có màu đỏ đồng nhất và trơn láng. Hệ thống Kimura Takemoto gồm hai dạng chính là dạng đóng và mở. Đánh giá mức độ teo niêm mạc dạ dày trên nội soi theo phân loại Kimura Takemoto bao gồm: mức độ nhẹ - dạng C1, C2; mức độ vừa - dạng C3, O1; mức độ nặng - dạng O2, O3.

Đạo đức nghiên cứu: nghiên cứu này là một phần của đề tài cấp quốc gia “Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử, hóa sinh và nội soi trong sàng lọc, chẩn đoán và điều trị ung thư dạ dày sớm”, được thực hiện theo quy định của Hội đồng đạo đức Bệnh viện Bạch Mai.

Xử lý số liệu: số liệu được xử lý trên phần mềm Epidata

7.0 và phần mềm xử lý thống kê SPSS 25.0. Chỉ những yếu tố liên quan có ý nghĩa thống kê trong phân tích đơn biến được đưa vào mô hình đa biến. $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

Kết quả

Đặc điểm nhóm nghiên cứu

Nghiên cứu thực hiện trên 3.508 bệnh nhân VTNMDD mạn tính, trong đó tỷ lệ nữ/nam là 1,68, với nữ chiếm hơn 62,7% ($n=2.198$), nam chiếm 37,3% ($n=1.310$). Độ tuổi trung bình (SD) của nhóm đối tượng là 56,2 (9,2) tuổi, bệnh nhân trẻ nhất là 40 tuổi và cao tuổi nhất là 91 tuổi, tập trung chủ yếu ở nhóm đối tượng tuổi trung niên từ 40 đến 65 tuổi, chiếm 83,9% ($n=2.943$). Tỷ lệ bệnh nhân sử dụng thuốc NSAID, Aspirin là 2,7%. Hầu hết bệnh nhân có BMI bình thường.

Đặc điểm chế độ ăn và sinh hoạt

Thói quen sử dụng các chất kích thích không tốt cho dạ dày được kể đến trong nghiên cứu gồm thuốc lá, rượu/bia. Tổng số 26,8% từng có thói quen duy trì hút thuốc lá ít nhất 1 điếu mỗi ngày liên tục từ 6 tháng trở lên ($n=940$), độ tuổi trung bình (SD) bắt đầu thói quen này là 19,5 (6,9), trung bình hút 13,3 (9,6) điếu một ngày. Có 543/3.508 đối tượng có thói quen uống rượu bia ít nhất 1 cốc một tuần (15,5%), thói quen thường kéo dài trung bình 24 (11,1) năm, đa số uống rượu mạnh, trung bình 15,5 chén một tuần, theo sau là bia và rượu nhẹ (5 cốc so với 5,8 chén một tuần). Sự khác biệt về thói quen hút thuốc, uống rượu bia, trà, cà phê, và tập thể dục giữa hai nhóm nam và nữ có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) (bảng 1).

Bảng 1. Phân bố đặc điểm thói quen và chế độ sinh hoạt theo giới.

Thói quen	Chung		Nam ($n=1.310$)		Nữ ($n=2.198$)		p value
	n	%	n	%	n	%	
Hút thuốc lá	940	26,8	908	69,3	32	1,5	<0,001
Uống bia rượu	543	15,5	510	38,9	33	1,5	<0,001
Uống trà	643	18,3	534	40,8	109	5	<0,001
Uống cà phê	118	3,4	71	5,4	47	2,1	<0,001
Tập thể dục	1.324	37,7	525	40,1	799	36,4	0,028
Ngủ đủ 8h/ngày	948	27	401	30,6	547	24,9	<0,001
Sử dụng thuốc (NSAID/Aspirin, trầm cảm)	95	2,7	27	2,1	68	3,1	0,068

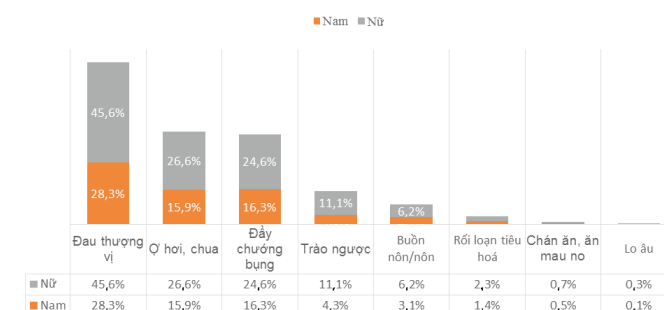
Về chế độ ăn, 21,2% có chế độ ăn mặn và 11,8% có chế độ ăn cay, 5,7% có thói quen ăn các đồ lên men ít nhất 5 lần/tuần, 8,2% có ăn nhiều các đồ rán kỹ và đồ nướng ít nhất 5 lần/tuần. Có sự khác biệt trong chế độ ăn của nam và nữ (bảng 2). Tuy nhiên, số lượng người ăn rau xanh khá nhiều (chiếm 91,4%), và gặp nhiều hơn ở nữ (91,8 so với 91,4%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê).

Bảng 2. Phân bố đặc điểm thói quen ăn uống theo giới.

Thói quen ăn uống	Chung		Nam ($n=1.310$)		Nữ ($n=2.198$)		p value
	n	%	n	%	n	%	
Ăn mặn	742	21,2	335	25,6	407	18,5	<0,001
Ăn cay	415	11,8	274	20,9	141	6,4	<0,001
Ăn các đồ lên men	200	5,7	91	6,9	109	5	0,014
Ăn đồ rán kỹ, đồ nướng	288	8,2	129	9,8	159	7,2	0,006
Ăn nhiều thịt	815	23,2	442	32,2	393	17,9	<0,001
Chế độ ăn các loại hạt, lạc	299	8,5	115	8,8	184	8,4	0,676
Ăn nhiều rau xanh	3.205	91,4	1.188	90,7	2017	91,8	0,271

Biểu hiện lâm sàng và mức độ viêm teo dạ dày trên nội soi

Trong 3.508 bệnh nhân VTNMDD, biểu hiện đau thượng vị hay gặp nhất - chiếm tỷ lệ 73,9% ($n=2.593$), ợ hơi/ợ chua chiếm 42,5% ($n=1.489$), đầy bụng 40,9% ($n=1.437$), trào ngược 15,4% ($n=541$) (biểu đồ 1). Tỷ lệ có biểu hiện đầy bụng ở nhóm nữ cao hơn nhóm nam ($24,6 > 16,3\%$, $p=0,01$), tỷ lệ biểu hiện trào ngược ở nhóm bệnh nhân nữ cao hơn nhóm nam ($11,1 > 4,3\%$, $p < 0,001$).



Biểu đồ 1. Biểu hiện lâm sàng ở bệnh nhân VTNMDD mạn tính.

Về hình ảnh nội soi dạ dày theo phân loại Kimura Takemoto, trong số 3.508 bệnh nhân tham gia nghiên cứu, số lượng bệnh nhân bị VTNMDD mức độ nhẹ gặp nhiều

nhất, trong đó C2 54,3% (n=1.906), C1 26,1% (n=916), giảm dần ở các mức độ vừa, C3 13,7% (n=479), O1 3,3% (n=116). VTNMDD mức độ nặng chiếm rất ít (2,6%), trong đó O2 chiếm 1,9% (n=66) và O3 0,7% (n=25).

Mối liên quan giữa chế độ ăn, sinh hoạt và biểu hiện lâm sàng

Đánh giá các yếu tố liên quan đến triệu chứng đau thượng vị, chúng tôi thấy rằng triệu chứng đau thượng vị thường gặp ở những người có hút thuốc (75,6%), uống bia rượu (75%), một số loại trà, ăn các đồ lên men (75,5%), hoặc đồ rán kỹ (78,8%), tuy nhiên khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Chỉ có chế độ ăn đồ rán kỹ, đồ nướng cho thấy có mối liên quan với triệu chứng đau thượng vị ($p=0,049$) (bảng 3).

Bảng 3. Các yếu tố chế độ ăn và sinh hoạt liên quan đến từng biểu hiện lâm sàng.

Yếu tố	n	%	Đơn biến		Đa biến	
			p	OR [95%CI]	p	OR [95%CI]
Đau thượng vị						
Ăn đồ rán kỹ, đồ nướng (n=288)	227	78,8	0,049	1,343 [1,002-1,801]		
Ợ hơi/ợ chua						
Ăn nhiều thịt (n=815)	388	47,6	0,001	1,314 [1,122-1,538]	0,008	1,243 [1,058-1,461]
Chế độ ăn các loại hạt, lạc (n=299)	153	51,2	0,001	1,469 [1,159-1,863]	0,009	1,376 [1,082-1,751]
Đầy bụng						
Ăn nhiều thịt (n=815)	386	47,4	<0,001	1,406 [1,201-1,646]	0,002	1,296 [1,100-1,526]
Chế độ ăn các loại hạt, lạc (n=299)	147	49,2	0,003	1,439 [1,135-1,824]	0,026	1,316 [1,033-1,676]
Trào ngược						
Ăn mặn (n=742)	84	11,3	0,001	1,550 [1,210-1,987]	0,018	1,359 [1,055-1,752]
Chế độ ăn các loại hạt, lạc (n=299)	29	9,7	0,005	1,767 [1,191-2,622]	0,038	1,532 [1,023-2,293]

Ghi chú: chỉ những yếu tố có liên quan trong phân tích đơn biến được đưa vào mô hình đa biến và báo cáo.

Về liên quan giữa triệu chứng ợ hơi và ợ chua với chế độ ăn, chúng tôi thấy những bệnh nhân có biểu hiện ợ hơi, ợ chua gặp ở nhóm người ăn nhiều thịt (47,6%, $p=0,001$) và ăn các loại hạt (51,2%, $p=0,001$). Chế độ ăn nhiều thịt (OR 1,243; 95%CI 1,058-1,461), và nhiều các loại hạt/lạc (OR 1,376; 95%CI 1,082-1,751) làm gia tăng nguy cơ xuất hiện triệu chứng ợ hơi.

Liên quan giữa chế độ ăn và triệu chứng trào ngược như nóng rất sau xương ức, nuốt vướng hoặc nuốt nghẹn, cảm giác mắc ở cổ đối với chế độ ăn ở bệnh nhân viêm dạ dày, chế độ ăn mặn (11,3%), hoặc ăn các loại hạt, lạc (9,7%) có nguy cơ làm gia tăng xuất hiện các biểu hiện trào ngược (OR 1,359; 95%CI 1,055-1,752, và OR 1,532; 95%CI 1,023-2,293).

Liên quan giữa chế độ ăn, sinh hoạt và mức độ viêm teo nặng

Bảng 4. Các yếu tố chế độ ăn và sinh hoạt liên quan đến mức độ viêm teo nặng O1-O3.

Yếu tố/thời quen	n	%	Đơn biến		Đa biến	
			p	OR [95%CI]	p	OR [95%CI]
Uống trà (n=643)	50	7,8	0,026	1,454 [1,045-2,024]	0,090	1,343 [0,955-1,890]
Ăn cay (n=415)	35	8,4	0,021	1,564 [1,071-2,285]	0,068	1,440 [0,974-2,129]
Ăn nhiều rau xanh, củ quả (n=3.205)	180	5,6	0,021	0,608 [0,399-0,928]	0,025	0,616 [0,403-0,941]

Các yếu tố hút thuốc lá, uống rượu, hay chế độ ăn thức ăn đồ nướng, đồ muối mặn không thấy có liên quan đến mức độ viêm teo trung bình, nặng trên nội soi. Tuy nhiên, chế độ ăn nhiều rau xanh, củ quả là yếu tố bảo vệ giúp làm giảm nguy cơ tiến triển viêm teo mức độ nặng (O1-O3) (OR 0,616; 95%CI 0,403-0,941).

Bàn luận

VTNMDD mạn tính là một bệnh lý thường gặp, diễn biến từ từ với nhiều biểu hiện lâm sàng đa dạng, dễ chẩn đoán nhưng cũng dễ nhầm với các triệu chứng khác. Trong đó, triệu chứng đau thượng vị, ợ hơi, chướng bụng thường gặp nhất [1]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, các triệu chứng này cũng là các triệu chứng hay gặp nhất: đau thượng vị (73,9%), ợ hơi/ợ chua (42,4%), đầy bụng (41%), và trào ngược (15,4%) gặp phổ biến ở cả nam và nữ. Tỷ lệ có biểu hiện đầy bụng ở nam nhiều hơn nữ, tỷ lệ biểu hiện trào ngược ở nhóm bệnh nhân nữ cao hơn nhóm nam ($p<0,05$). Điều này có thể giải thích là do chế độ sinh hoạt ở nam và nữ giới có sự khác biệt. Nam giới thường hút thuốc, ăn cay, ăn chua, ăn thịt cũng như các loại đồ uống có cồn nhiều hơn nữ giới.

Mối liên quan giữa các biểu hiện viêm dạ dày với chế độ ăn và sinh hoạt đã được ghi nhận trong các nghiên cứu trước đây [2, 3, 6]. Một số nghiên cứu cho thấy đau thượng vị thường xảy ra ở người ăn đồ nướng, tinh bột hoặc snack, trong khi triệu chứng chướng hơi lại hay gặp ở người ăn nhiều đồ ngọt, còn chế độ ăn nhiều muối, đồ nướng và nhiều thịt lại liên quan đến các biểu hiện trào ngược [4].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, triệu chứng đau thượng vị thường liên quan với chế độ ăn đồ rán kỹ, đồ nướng (khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p=0,048$), không thấy có sự liên quan với hút thuốc lá, hay uống rượu, cũng như chế độ ăn cay, hoặc mặn. Kết quả này cũng tương đồng với các tác giả Trung Quốc [4]. Điều đó có thể giải thích là do đồ nướng thường có rất nhiều chất béo, nên khó tiêu hoá, và tiêu hoá chậm gây ra cảm giác căng chướng và gây đau bụng. Một nhóm triệu chứng khác của viêm dạ dày là ợ hơi và chướng bụng. Trong nhóm triệu chứng này, chúng tôi thấy các triệu chứng chủ yếu liên quan đến chế độ ăn nhiều thịt (OR 1,243), (OR 1,296), ăn các loại hạt giàu tinh bột (OR 1,376), (OR 1,316). Các nghiên cứu cho rằng chế độ ăn ngũ cốc có chứa nhiều carbon hydrate và được vi khuẩn chuyển hoá, sinh ra nhiều hơi trong dạ dày hình thành cảm giác đầy chướng bụng. Mặt khác, chế độ ăn nhiều đồ ngọt cũng làm thay đổi hệ vi khuẩn đường ruột, đặc biệt là khả năng dung nạp glucose của ruột và thúc đẩy quá trình viêm mạn tính. Mỗi liên quan giữa triệu chứng chướng bụng, ợ hơi - đồ ăn ngọt (giàu tinh bột) cũng tương tự như trong nghiên cứu của tác giả Trung Quốc, có lẽ bởi chế độ và thói quen ăn uống tương đồng của hai đất nước. Các triệu chứng trào ngược như nóng rát sau xương ức, khó chịu khi nuốt, trào ngược acid thường liên quan đến chế độ ăn nhiều muối (OR 1,359), hoặc ăn các loại hạt, tinh bột (OR 1,532). Muối thực sự có có ảnh hưởng đến các triệu chứng trào ngược đường tiêu hoá như nôn, nóng rát sau xương ức hoặc trào ngược acid. Mỗi liên quan giữa trào ngược và muối đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây. Muối cũng được coi như yếu tố ảnh hưởng bất lợi và với lượng cao natriclorid có thể gây tổn thương niêm mạc thành dạ dày, tăng nồng độ các enzym tiền viêm, cũng như các cytokin trong niêm mạc dạ dày kết hợp với vi khuẩn HP gây huỷ hoại tế bào và thúc đẩy quá trình tái tạo tế bào, dẫn đến hậu quả là quá trình viêm và teo niêm mạc [7]. Nghiên cứu về VTNMDD trên nội soi, chúng tôi thấy rằng mức độ teo niêm mạc trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như các nghiên cứu về viêm teo khác ở Việt Nam. Trong đó, nhóm bệnh nhân viêm teo mức độ nhẹ trên nội soi chiếm chủ yếu (80%), ngược lại các trường hợp viêm teo mức độ nặng chỉ chiếm khoảng 2,6% (O2, O3), thấp hơn nhiều so với nghiên cứu tại Nhật Bản (13,3%) [8]. Tuy nhiên, chỉ viêm teo mức độ nặng và vừa mới có nguy cơ tiến triển thành ung thư, điều này lý giải vì sao tỷ lệ ung thư dạ dày ở Nhật Bản cao hơn nhiều so với các nước trong khu vực cũng như trên thế giới. Mặc dù hút thuốc lá và chế độ ăn nhiều muối được chứng minh là có liên quan đến nguy cơ ung thư dạ dày [9]. Tuy nhiên, ảnh hưởng của thuốc lá trong VTNMDD vẫn là một

chủ đề tranh cãi, một số nghiên cứu cho thấy có liên quan, trong khi nghiên cứu khác lại không. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng không thấy hút thuốc liên quan đến mức độ viêm teo dạ dày vừa và nặng, tuy nhiên lại thấy chế độ ăn nhiều rau xanh như một yếu tố bảo vệ đối với VTNMDD, đặc biệt là đối với viêm teo vừa và nặng (OR 0,616). Tác giả Shibata và cs (2002) [9] cũng nhận thấy chế độ ăn nhiều rau xanh là yếu tố bảo vệ VTNMDD. Các tác giả cho rằng rau củ xanh có chứa nhiều yếu tố vi lượng như caroten, đặc biệt là vitamin C có tác dụng ức chế sự hình thành nitrosamine, cũng như làm giảm tiến triển quá trình viêm [7].

Nhìn chung, kết quả nghiên cứu của chúng tôi gợi ý những mối liên quan đặc biệt giữa thói quen ăn uống và triệu chứng đã được đề cập trong các bằng chứng nghiên cứu trước đây. Viêm dạ dày là tình trạng viêm mạn tính kéo dài, tiến triển và trải qua nhiều giai đoạn, triệu chứng khá đa dạng, do vậy cần thiết phải điều chỉnh chế độ ăn uống, lối sống hàng ngày tương ứng với các biểu hiện bệnh hơn là phụ thuộc hoàn toàn vào thuốc. Nhiều bệnh nhân viêm dạ dày có thể biết chính xác loại thức ăn gây ra triệu chứng, nhưng nhiều bệnh nhân thì không. Do đó, cần thiết phải ghi lại các loại thức ăn đã ăn, cũng như thời điểm và biểu hiện triệu chứng, từ đó bệnh nhân có thể xác định loại thức ăn nào làm giảm hoặc làm nặng triệu chứng của mình, và tự mình có thể xây dựng một chế độ ăn lành mạnh và phù hợp.

Tuy nhiên, nghiên cứu của chúng tôi còn một số điểm hạn chế như bộ câu hỏi chưa lượng hoá chi tiết bữa ăn, thức ăn cụ thể, hoặc thời điểm ăn uống, các yếu tố tâm lý, thần kinh, cũng như theo dõi hiệu quả của việc điều chỉnh chế độ ăn lên triệu chứng hay trên mô bệnh học. Điều này cho thấy sự cần thiết phải tiến hành thêm các nghiên cứu đánh giá trong tương lai.

Kết luận

Nhìn chung, nghiên cứu này của chúng tôi đã giúp cung cấp thêm dữ liệu về mối liên quan giữa chế độ ăn uống ở bệnh nhân có VTNMDD. Kết quả cho thấy, các chế độ ăn thường xuyên ăn mặn, ăn nhiều thịt, ăn nhiều thực phẩm rán kỹ, hoặc ăn nhiều các loại hạt/lạc có góp phần làm tăng nguy cơ biểu hiện các triệu chứng lâm sàng ở các bệnh nhân VTNMDD. Từ đó cho thấy sự cần thiết phải điều chỉnh chế độ ăn cho phù hợp với bệnh nhân viêm dạ dày mạn, việc hạn chế chế độ ăn nhiều các loại hạt/lạc, ăn thịt nhiều hoặc ăn nhiều muối cũng như các đồ nướng, rán kỹ sẽ giúp giảm các triệu chứng viêm dạ dày. Ngoài ra, việc điều chỉnh chế độ ăn với nhiều rau xanh có thể xem như là một yếu tố bảo vệ giúp giảm nguy cơ tiến triển nặng VTNMDD. Điều này

rất có ý nghĩa trong việc điều trị bệnh viêm dạ dày bên cạnh việc điều trị bằng thuốc. Tuy nhiên, đây chỉ là nghiên cứu cắt ngang nên cần các nghiên cứu sâu hơn tập trung vào theo dõi dọc để đánh giá ảnh hưởng cũng như hiệu quả của việc thay đổi chế độ, thói quen sinh hoạt với bệnh viêm dạ dày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Đặng Ngọc Quý Huệ (2018), *Nghiên cứu tỷ lệ kháng Clarithromycin, Levofloxacin của Helicobacter Pylori bằng epsilon meter và hiệu quả của phác đồ EBMT ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn tính*, Luận án tiến sỹ, Trường Đại học Y dược Huế.

[2] P. Bertuccio, et al. (2013), “Dietary patterns and gastric cancer risk: a systematic review and meta-analysis”, *Annals of Oncology*, **24**(6), pp.1450-1458.

[3] L.T. Ngoan, et al. (2002), “Dietary factors and stomach cancer mortality”, *British Journal of Cancer*, **87**, pp.37-42.

[4] Yuan Li, et al. (2020), “Association of symptoms with eating habits and food preferences in chronic gastritis patients: a cross-sectional study”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2020**, Article ID 5197201.

[5] H. Masuyama, N. Yoshitake (2015), “Relationship between the degree of endoscopic atrophy of the gastric mucosa and carcinogenic risk”, *Digestion*, **91**, pp.30-36.

[6] C. Feinle-Bisset, F. Azpiroz (2013), “Dietary and lifestyle factors in functional dyspepsia”, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **10**, pp.150-157.

[7] M. Dias Neto, et al. (2010), “Salt intake and risk of gastric intestinal metaplasia: systematic review and meta-analysis”, *Nutrition and Cancer*, **62**, pp.133-147.

[8] Nobutake Yamamichi, et al. (2016), “Comparative analysis of upper gastrointestinal endoscopy, double-contrast upper gastrointestinal barium X-ray radiography, and the titer of serum anti - *Helicobacter pylori* IgG focusing on the diagnosis of atrophic gastritis”, *Gastric Cancer*, **19**, pp.670-675.

[9] K. Shibata, et al. (2002), “Relation of *Helicobacter pylori* infection and lifestyle to the risk of chronic atrophic gastritis: a cross-sectional study in Japan”, *J. Epidemiol.*, **12**(3), pp.105-111.

Biến đổi nồng độ VEGF thủy dịch do tiêm Bevacizumab nội nhãn trong điều trị bệnh võng mạc đái tháo đường tăng sinh biến chứng

Vũ Tuấn Anh^{1*}, Nguyễn Tuấn Thanh Hảo²

¹Bệnh viện Mắt Trung ương

²Bệnh viện Mắt Đà Nẵng

Ngày nhận bài 14/5/2021; ngày chuyển phản biện 20/5/2021; ngày nhận phản biện 21/6/2021; ngày chấp nhận đăng 28/6/2021

Tóm tắt:

Bài báo này nghiên cứu sự biến đổi nồng độ yếu tố tăng sinh tân mạch (VEGF) trong thủy dịch trước và sau tiêm nội nhãn Bevacizumab điều trị võng mạc đái tháo đường (ĐTĐ) tăng sinh biến chứng. Nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp tiền cứu, can thiệp lâm sàng trên 48 mắt (29 bệnh nhân) bị biến chứng võng mạc ĐTĐ tăng sinh có chỉ định tiêm Bevacizumab nội nhãn tại Bệnh viện Mắt Đà Nẵng. Mẫu thủy dịch được lấy ngay trước và 1 tuần sau tiêm nội nhãn 1,25 mg Bevacizumab. Kết quả cho thấy, nồng độ VEGF thủy dịch trước tiêm là $474,23 \pm 361,32$ pg/ml giảm xuống chỉ còn $16,96 \pm 18,11$ pg/ml ($p=0,000$) ở tất cả các mắt sau tiêm 1 tuần; không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ VEGF giữa các nhóm bệnh theo mức độ xuất huyết dịch kính, theo tình trạng bong võng mạc co kéo, theo tăng sinh xơ. Như vậy, có thể thấy rõ vai trò của thuốc kháng VEGF trong điều trị bệnh.

Từ khóa: Bevacizumab, bệnh võng mạc ĐTĐ tăng sinh biến chứng, VEGF.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Bệnh võng mạc ĐTĐ giai đoạn tăng sinh là giai đoạn bệnh lý nặng, tiến triển của bệnh võng mạc ĐTĐ. Cơ chế bệnh sinh là do tắc vi mạch võng mạc, dẫn đến thiếu máu võng mạc và thoát dịch ra khỏi lòng mạch võng mạc. Khi võng mạc thiếu máu, sẽ tiết ra nhiều Cytokine trong đó có yếu tố tăng sinh tân mạch (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF) vào buồng dịch kính, là yếu tố chính gây ra tân mạch [1-3]. Khi tân mạch vỡ gây ra một loạt các biến chứng như xuất huyết dịch kính, tăng sinh xơ, bong võng mạc co kéo. Phương pháp điều trị là phẫu thuật cắt dịch kính, giải phóng co kéo rất phức tạp, có nhiều nguy cơ, nhất là chảy máu trong mổ [2].

Bevacizumab (Avastin, Genentech Inc.) là một trong những thuốc kháng VEGF được sử dụng phổ biến trong điều trị bệnh võng mạc ĐTĐ. Bevacizumab tiêm nội nhãn làm giảm nồng độ yếu tố tăng sinh tân mạch, gây thoái triển tân mạch võng mạc ở bệnh võng mạc ĐTĐ tăng sinh, giảm nguy cơ chảy máu trong phẫu thuật [2-4].

Trên thế giới, nhiều nghiên cứu đã cho thấy, tiêm Bevacizumab nội nhãn làm giảm đáng kể nồng độ VEGF cả trong dịch kính và thủy dịch ở bệnh võng mạc ĐTĐ và có sự liên quan giữa nồng độ VEGF nội nhãn với mức độ bệnh võng mạc ĐTĐ [3, 5, 6]. Các nghiên cứu trước đây có đo nồng độ VEGF bằng cách lấy bệnh phẩm trong dịch kính [3, 4], tuy nhiên việc lấy mẫu dịch kính rất phức tạp, khó có thể

lấy nhiều lần. Một số tác giả cũng đã nghiên cứu nồng độ VEGF trong thủy dịch, cho phép đánh giá dễ dàng hơn và có thể làm nhiều lần [1, 3, 5].

Ở Việt Nam, đã có một số nghiên cứu về hiệu quả lâm sàng của Bevacizumab trong điều trị bệnh lý võng mạc ĐTĐ, trong đó sử dụng Bevacizumab tiêm trước phẫu thuật nhằm tránh biến chứng trong và sau mổ. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có nghiên cứu nào về nồng độ yếu tố tăng sinh tân mạch ở bệnh võng mạc do ĐTĐ. Trong khuôn khổ thời gian và nguồn lực chưa cho phép, các tác giả tiến hành nghiên cứu này trước hết nhằm so sánh nồng độ yếu tố tăng sinh tân mạch trong thủy dịch trước và sau tiêm nội nhãn Bevacizumab ở bệnh võng mạc ĐTĐ tăng sinh có biến chứng

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Tiêu chuẩn lựa chọn: bệnh nhân được chẩn đoán xác định bệnh võng mạc ĐTĐ tăng sinh có biến chứng xuất huyết dịch kính, bong võng mạc co kéo, tăng sinh xơ trước võng mạc có chỉ định tiêm Bevacizumab nội nhãn đến khám và điều trị tại Bệnh viện Mắt Đà Nẵng từ 1/2016 đến 5/2018.

Tiêu chuẩn loại trừ: bệnh nhân có tiền sử bệnh tim mạch hay đột quỵ, bệnh nhân dị ứng với Bevacizumab, đang có nhiễm trùng cấp tính tại mắt và bộ phận phụ thuộc, đã tiêm các thuốc nội nhãn như Triamcinolone, các thuốc ức chế VEGF (bao gồm cả Bevacizumab và một số thuốc khác),

*Tác giả liên hệ: Email: vta.oph@gmail.com

Changing of the vascular endothelial growth factor concentration in aqueous humor before and after intravitreal injection of Bevacizumab adjuvant treating complicated proliferative diabetic retinopathy

Tuan Anh Vu^{1*}, Tuan Thanh Hao Nguyen²

¹Vietnam National Institute of Ophthalmology

²Da Nang Eye Hospital

Received 14 May 2021; accepted 28 June 2021

Abstract:

This article studies the changing of concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) from the aqueous humor sample, before and after intravitreal injection of Bevacizumab, for treatment of complicated proliferative diabetic retinopathy (PDR) and the correlation with clinical features. This study was implemented with prospective and interventional case series; 1.25 mg of Bevacizumab was injected into the vitreous cavity to treat PDR in 48 eyes of 29 patients. Aqueous humor samples were obtained before intravitreal injection of Bevacizumab and one week after. Study results showed: VEGF concentration decreased from 474.23 ± 361.32 pg/ml to 16.96 ± 18.11 pg/ml ($p=0.000$) at all eyes after one-week injection. There were no differences in levels of VEGF among groups according to the vitreous haemorrhage, tractional retinal detachment, and retinal fibrosis. Therefore, the study exhibited a better understanding of the role of anti-VEGF in the adjuvant treatment of complicated PDR.

Keywords: Bevacizumab, complicated proliferative diabetic retinopathy, VEGF.

Classification number: 3.2

đã laser võng mạc, đã phẫu thuật dịch kính trong vòng 3 tháng trước khi nghiên cứu, bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu.

Phương pháp

Thiết kế nghiên cứu: phương pháp thử nghiệm lâm sàng không đối chứng.

Tiến hành nghiên cứu:

- Khám xác định bệnh nhân có bệnh võng mạc ĐTD tăng sinh có biến chứng như xuất huyết dịch kính, bong võng mạc co kéo, tăng sinh xơ trước võng mạc có chỉ định tiêm Bevacizumab nội nhãn.

+ Tình trạng xuất huyết dịch kính: chúng tôi chia thành 4 nhóm theo phân độ của DRVS [4]: i) độ 0: không có xuất huyết dịch kính; ii) độ 1: xuất huyết dịch kính nhẹ, có thể soi rõ chi tiết đáy mắt; iii) độ 2: xuất huyết dịch kính trung bình, có thể soi được đáy mắt nhưng không rõ chi tiết; iv) độ 3: xuất huyết dịch kính nặng, không thể soi được đáy mắt.

+ Tình trạng tăng sinh xơ được chia thành 4 nhóm [7]: i) độ 0: không có tăng sinh xơ; ii) độ 1: rất ít màng xơ trước võng mạc nhẹ, có thể giống như màng trước võng mạc; iii) độ 2: màng xơ trước võng mạc rõ ràng màu trắng nhô nhẹ vào buồng dịch kính; iv) độ 3: màng xơ trước võng mạc rõ ràng màu trắng nhô nhiều hẳn vào buồng dịch kính.

+ Tình trạng bong võng mạc co kéo được chia thành 2 nhóm: i) không bong võng mạc co kéo; ii) có bong võng mạc co kéo.

+ Tình trạng tăng sinh võng mạc được chia thành 2 nhóm [2, 5]: i) tiến triển: xuất hiện những tân mạch là những mạch máu trước võng mạc nhiều nhánh có tưới máu; ii) yên lặng: tăng sinh võng mạc đã thoái triển hoàn toàn hoặc chỉ có những mạch xơ không có tưới máu hoặc mô xơ hiện diện.

- Khám võng mạc và mắt gồm: đo thị lực, khám bán phần trước, chụp ảnh đáy mắt không chuẩn bị, chụp mạch huỳnh quang, chụp OCT hoàng điểm trước và sau tiêm 1 tuần.

- Lấy mẫu bệnh phẩm thủy dịch (0,2 ml) trước và sau tiêm Bevacizumab 1 tuần, ngay trước khi tiêm nội nhãn và ngay trước khi mổ cắt dịch kính, sau đó đo nồng độ yếu tố tăng sinh tân mạch trong thủy dịch ở 2 thời điểm đó bằng phương pháp định lượng elisa với kit elisa mã số DVE00 (R&D System).

Xử lý số liệu: số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm SPSS 20.0, dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn, sử dụng test T-student, kiểm định Pearson, giá trị p, tỷ lệ % để so sánh, xác định sự khác biệt và tìm

mối liên quan.

Đạo đức nghiên cứu

- Nghiên cứu được thông qua Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu y sinh học Trường Đại học Y Hà Nội; Hội đồng Khoa học, Hội đồng Y đức Bệnh viện Mắt Đà Nẵng.

- Tất cả các bệnh nhân và người nhà bệnh nhân đều được giải thích, tư vấn kỹ về bệnh, hướng điều trị, tác dụng không mong muốn có thể gặp, mục đích của nghiên cứu. Chỉ đưa vào danh sách những bệnh nhân tự nguyện tham gia nghiên cứu. Các trường hợp không đồng ý tham gia nghiên cứu không bị phân biệt đối xử.

- Tất cả bệnh nhân thuộc nhóm nghiên cứu đều được quyền điều trị và theo dõi.

Kết quả

Nghiên cứu của chúng tôi thực hiện trên 48 mắt của 29 bệnh nhân.

Đặc điểm mẫu bệnh nhân nghiên cứu (bảng 1, 2 và 3)

Bảng 1. Đặc điểm chung của mẫu nghiên cứu.

Đặc điểm	Trung bình ± Độ lệch chuẩn	Nhỏ nhất - Lớn nhất
Tuổi (năm)	53,17±7,97	33-70
Giới tính (nam/nữ)	14/15	-
ĐTĐ (type 1/type 2)	4/25	-
Thời gian mắc ĐTĐ (năm)	12,24±6,40	1-24
Glucose máu đói (mmol/l)	8,15±2,41	4,50-13,20
HbA1c (%)	7,76±2,16	3,90-15,00

Bảng 2. Sự khác biệt về nồng độ VEGF (pg/ml) theo mức độ xuất huyết dịch kính.

Nồng độ VEGF		p
Xuất huyết dịch kính	Trung bình ± SD	
Độ 0 (n=19)	411,62±235,98	0,406
Độ 1 (n=11)	683,02±514,39	
Độ 2 (n=7)	416,28±424,11	
Độ 3 (n=11)	410,49±280,40	

Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ VEGF giữa 4 nhóm chia theo mức độ xuất huyết dịch kính (p=0,406).

Bảng 3. Sự khác biệt về nồng độ VEGF (pg/ml) theo tình trạng bong võng mạc co kéo.

Nồng độ VEGF		p
Bong võng mạc co kéo	Trung bình ± SD	
Có (n=8)	358,52±336,74	0,135
Không (n=40)	497,38±365,63	

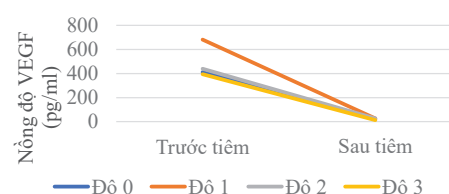
Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ VEGF giữa 2 nhóm bệnh võng mạc ĐTĐ tăng sinh có bong võng mạc và không có bong võng mạc co kéo (p=0,135).

So sánh nồng độ VEGF trước và sau tiêm nội nhãn Bevacizumab (bảng 4, hình 1)

Bảng 4. Nồng độ VEGF trước và sau tiêm ở tất cả bệnh nhân nghiên cứu.

Nồng độ VEGF (pg/ml)	Trung bình ± Độ lệch chuẩn	p
Trước tiêm	474,23±361,32	0,000
Sau tiêm	16,96±18,11	

Nồng độ VEGF sau tiêm giảm so với trước tiêm và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê (p=0,000).



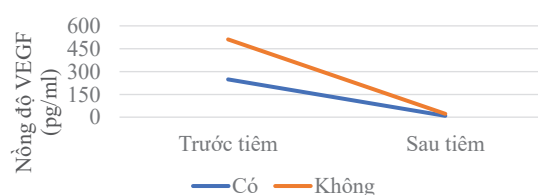
Hình 1. Nồng độ VEGF (pg/ml) trước và sau tiêm theo mức độ xuất huyết dịch kính.

Ở cả 4 nhóm bệnh phân loại theo mức độ xuất huyết dịch kính, nồng độ VEGF sau tiêm đều giảm (hình 1), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với trước tiêm (p lần lượt = 0,000; 0,003; 0,018; 0,003).

Bảng 5. Nồng độ VEGF (pg/ml) trước và sau tiêm theo tình trạng xuất huyết dịch kính.

Xuất huyết dịch kính	Nồng độ VEGF		p
	Trước tiêm	Sau tiêm	
Không (n=19)	411,62±235,98	15,53±16,52	0,000
Có (n=29)	515,26±423,01	17,89±19,3	0,000

Nồng độ VEGF giảm sau tiêm thuốc 1 tuần có ý nghĩa ở cả 2 nhóm xuất huyết dịch kính và không xuất huyết dịch kính (p=0,000) (bảng 5).

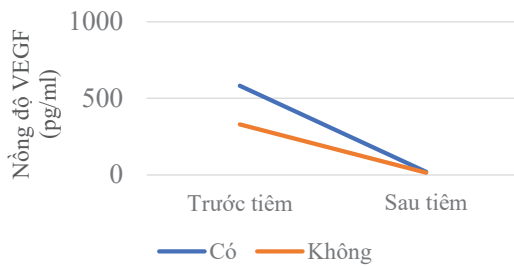


Hình 2. Nồng độ VEGF (pg/ml) trước và sau tiêm theo tình trạng bong võng mạc co kéo.

Ở cả 2 nhóm có và không có bong võng mạc co kéo, nồng độ VEGF sau tiêm đều giảm so với trước tiêm (hình 2) và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê (p=0,012 và p=0,000).

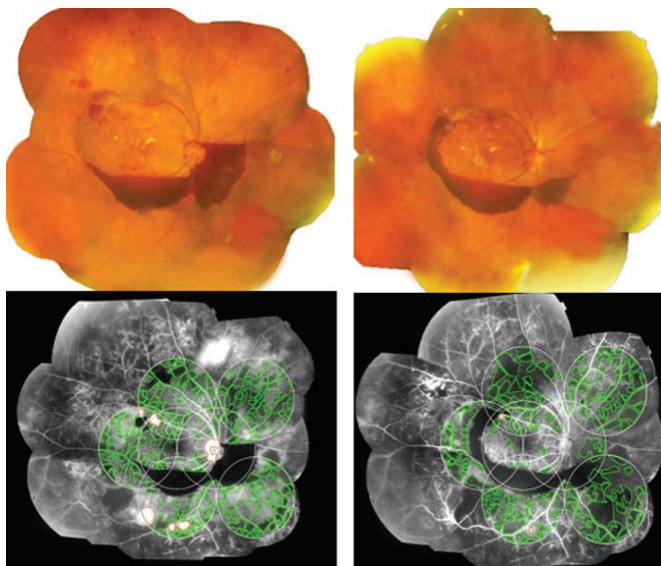
Bảng 6. Nồng độ VEGF (pg/ml) trước và sau tiêm theo tình trạng tăng sinh xơ.

Tăng sinh xơ	Nồng độ VEGF		p
	Trước tiêm	Sau tiêm	
Có (n=24)	581,46±434,63	19,60±22,41	0,000
Không (n=13)	330,23±185,92	13,64±12,07	0,001



Hình 3. Nồng độ VEGF theo tình trạng tăng sinh xơ.

Trong số 48 mắt bệnh võng mạc do ĐTD tăng sinh có 11 mắt bị xuất huyết dịch kính độ 3 nên không thể soi được đáy mắt, do đó không thể khảo sát được tình trạng tăng sinh xơ ở 11 mắt này. Nghiên cứu trên 37 mắt còn lại có thể soi rõ đáy mắt cho thấy có 24 mắt có tăng sinh xơ và 13 mắt chưa có tăng sinh xơ (bảng 6, hình 3). Ở cả 2 nhóm có hay không có tăng sinh xơ, nồng độ VEGF sau tiêm đều giảm rõ rệt so với trước tiêm, khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p=0,000$ và $p=0,001$). Hình 4 cho thấy thay đổi trước và sau tiêm của một bệnh nhân nữ, 60 tuổi.



Hình 4. Kết quả trước và sau tiêm Bevacizumab ở một bệnh nhân nữ, 60 tuổi, mắt phải. Bệnh võng mạc ĐTD tăng sinh có xuất huyết dịch kính (hình trái: trước tiêm, hình phải: sau tiêm; ảnh trên: chụp không tiêm thuốc cản quang, ảnh dưới: chụp mạch huỳnh quang).

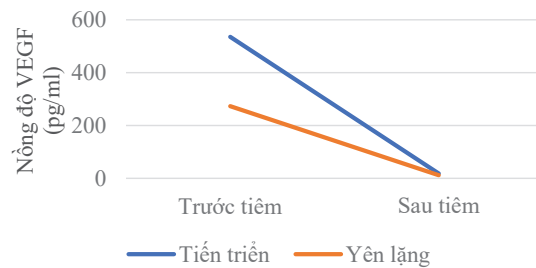
Bảng 7. Nồng độ VEGF (pg/ml) trước và sau tiêm theo tình trạng bong võng mạc co kéo.

Bong võng mạc co kéo	Nồng độ VEGF		p
	Trước tiêm	Sau tiêm	
Có (n=8)	358,52±336,74	8,76±11,61	0,012
Không (n=40)	497,38±365,63	18,60±18,82	0,000

Giữa 2 nhóm có bong võng mạc và không bong, nồng độ VEGF sau tiêm 1 tuần đều giảm và có ý nghĩa ($p=0,012$; $0,000$) (bảng 7).

Bảng 8. Nồng độ VEGF (pg/ml) trước và sau tiêm theo tình trạng tăng sinh võng mạc.

Tăng sinh võng mạc	Nồng độ VEGF		p
	Trước tiêm	Sau tiêm	
Tiến triển (n=31)	535,72±392,03	18,66±19,30	0,000
Yên lặng (n=6)	273,44±258,99	11,55±20,84	0,028



Hình 5. Nồng độ VEGF theo tình trạng tăng sinh võng mạc.

Trong số 48 mắt bệnh võng mạc ĐTD tăng sinh, có 11 mắt bị xuất huyết dịch kính độ 3 nên không thể soi được đáy mắt, do đó cũng không thể khảo sát được tình trạng tăng sinh võng mạc ở 11 mắt này. Nghiên cứu trên 37 mắt có bệnh võng mạc ĐTD tăng sinh cho thấy, có 31 mắt có tình trạng tăng sinh võng mạc tiến triển và chỉ có 6 mắt có tình trạng tăng sinh võng mạc yên lặng (bảng 8). Ở 31 mắt của nhóm tăng sinh võng mạc tiến triển, nồng độ VEGF trước tiêm là $535,72\pm392,03$ pg/ml, giảm xuống rõ rệt sau tiêm chỉ còn $18,66\pm19,30$ pg/ml (hình 5), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p=0,000$). Ở 6 mắt của nhóm tăng sinh võng mạc yên lặng, nồng độ VEGF trước tiêm là $273,44\pm258,99$ pg/ml, giảm xuống rõ rệt sau tiêm còn $11,55\pm20,84$ pg/ml (bảng 8), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p=0,028$) (hình 5).

Bàn luận

Nồng độ VEGF thủy dịch trước tiêm trung bình là $474,23\pm361,32$ pg/ml đã giảm xuống chỉ còn $16,96\pm18,11$ pg/ml sau tiêm nội nhãn 1 tuần. Kết quả tương tự cũng đã được công bố bởi nhiều tác giả khác trên thế giới [5, 6, 8].

Sự khác biệt này cũng xảy ra ở từng nhóm bệnh nhân phân loại theo mức độ xuất huyết dịch kính, theo tình trạng bong võng mạc co kéo. Bevacizumab khi được tiêm vào buồng dịch kính có thời gian bán hủy là 4,32 ngày [5]. Khi tiêm nội nhãn Bevacizumab được sử dụng như liệu pháp hỗ trợ cho phẫu thuật cắt dịch kính, thuốc thường được tiêm cách khoảng 3 đến 14 ngày trước khi phẫu thuật. Vì thế các phẫu thuật viên thường chọn thời điểm sau tiêm 1 tuần, vừa để phát huy tối đa tác dụng của thuốc, vừa có thể lấy bệnh phẩm định lượng nồng độ VEGF [7, 8].

Nồng độ yếu tố VEGF tăng cả trong dịch kính và thủy dịch ở bệnh võng mạc ĐTD tiến triển [1, 3, 4]. Nghiên cứu này đo nồng độ VEGF trong thủy dịch vì lấy mẫu thủy dịch dễ dàng và an toàn hơn nhiều so với lấy mẫu dịch kính, và cũng là xu thế nghiên cứu mới [5]. Những nghiên cứu khác trên thế giới cũng đã cho thấy tiêm nội nhãn thuốc kháng VEGF làm giảm đáng kể nồng độ VEGF nội nhãn ở bệnh võng mạc ĐTD tăng sinh [2, 3, 5].

Mối liên quan giữa nồng độ VEGF nội nhãn với tình trạng xuất huyết dịch kính ở bệnh võng mạc ĐTD tăng sinh cũng vẫn còn chưa rõ ràng. Nghiên cứu của A.P. Adamis và cộng sự (1994) [4] cho rằng có mối liên quan giữa nồng độ VEGF nội nhãn với xuất huyết dịch kính ở bệnh võng mạc ĐTD và điều này là hợp lý do xuất huyết dịch kính có liên quan với tân mạch võng mạc. Tuy nhiên, hầu hết những nghiên cứu mới sau này đều cho thấy nồng độ VEGF nội nhãn không có mối liên quan với mức độ xuất huyết dịch kính, có thể vì xuất huyết dịch kính còn có thể tự tiêu một phần theo thời gian. Nghiên cứu của H. Funatsu và cộng sự (2004) [2] trên 61 mắt mắc bệnh võng mạc ĐTD tăng sinh trong đó có 33 mắt có xuất huyết dịch kính cho thấy, không có mối liên quan giữa nồng độ VEGF nội nhãn với mức độ xuất huyết dịch kính với $p=0,3001$. Nghiên cứu của Anna Praidou và cộng sự (2009) [9] trên 33 mắt mắc bệnh võng mạc ĐTD tăng sinh cũng cho thấy không có mối liên quan giữa nồng độ VEGF nội nhãn với mức độ xuất huyết dịch kính. Kết quả nghiên cứu này là phù hợp với kết quả của những nghiên cứu mới trước đây.

Khi bệnh võng mạc ĐTD tăng sinh tiến triển, sự co kéo những nguyên bào sợi trong màng xơ mạch trước võng mạc gây bong võng mạc co kéo, co kéo hoàng điểm và có thể kèm rách võng mạc. Tăng sinh tế bào đệm dẫn đến hình thành màng xơ mạch. Khi màng xơ mạch co kéo sẽ gây bong võng mạc co kéo. Kết quả nghiên cứu này cho thấy nồng độ VEGF không có liên quan với tình trạng bong võng

mạc là phù hợp với kết quả của những nghiên cứu khác trên thế giới [8, 9].

Kết luận

Nồng độ VEGF trong thủy dịch giảm đáng kể sau tiêm nội nhãn Bevacizumab 1 tuần ở nhóm bệnh võng mạc ĐTD tăng sinh có biến chứng. Qua đó bước đầu cho thấy vai trò điều trị của Bevacizumab trong việc hỗ trợ phẫu thuật. Hướng nghiên cứu tiếp theo trong thời gian tới là cần đánh giá mối liên quan giữa nồng độ VEGF với kích thước và khối lượng tân mạch võng mạc nhằm tối ưu hóa quá trình phẫu thuật điều trị bệnh (liều lượng, thời gian).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Funatsu, H. Yamashita, et al. (2002), "Increased levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the aqueous humor of diabetics with macular edema", *Am. J. Ophthalmol.*, **133**(1), pp.70-77.
- [2] H. Funatsu, H. Yamashita, et al. (2004), "Risk evaluation of outcome of vitreous surgery for proliferative diabetic retinopathy based on vitreous levels of vascular endothelial growth factor and angiotensin II", *Br. J. Ophthalmol.*, **88**, pp.1064-1068.
- [3] H. Funatsu, H. Yamashita, et al. (2005), "Aqueous humor levels of cytokines are related to vitreous levels and progression of diabetic retinopathy in diabetic patients", *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **243**(1), pp.3-8.
- [4] A.P. Adamis, J.W. Miller, et al. (1994), "Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy", *Am. J. Ophthalmol.*, **118**(4), pp.445-450.
- [5] O. Sawada, H. Kawamura, et al. (2007), "Vascular endothelial growth factor in aqueous humor before and after intravitreal injection of bevacizumab in eyes with diabetic retinopathy", *Arch. Ophthalmol.*, **125**(10), pp.1363-1366.
- [6] C. Costagliola, A. Daniele, et al. (2013), "Aqueous humor levels of vascular endothelial growth factor and adiponectin in patients with type 2 diabetes before and after intravitreal bevacizumab injection", *Exp. Eye. Res.*, **110**, pp.50-54.
- [7] J.K. Li, F. Wei, et al. (2015), "Changes in vitreous VEGF, bFGF and fibrosis in proliferative diabetic retinopathy after intravitreal bevacizumab", *Int. J. Ophthalmol.*, **8**(6), pp.1202-1206.
- [8] Y. Suzuki, K. Suzuki, et al. (2014), "Effects of intravitreal injection of bevacizumab on inflammatory cytokines in the vitreous with proliferative diabetic retinopathy", *Retina.*, **34**(1), pp.165-171.
- [9] Anna Praidou, et al. (2009), "Vitreous and serum levels of platelet-derived growth factor and their correlation in patients with proliferative diabetic retinopathy", *Curent Eye Research*, **34**, pp.152-161.

Phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất từ loài *Adinandra poilanei* Gagnep.

Vũ Thị Kim Oanh^{1,2}, Bùi Thu Hà³, Đinh Ngọc Thức⁴, Lê Nguyễn Thành^{1,2*}

¹Học viện Khoa học và Công nghệ, VAST

²Viện Hóa sinh biển, VAST

³Khoa Sinh, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

⁴Trường Đại học Hồng Đức

Ngày nhận bài 25/1/2021; ngày chuyển phân biện 29/1/2021; ngày nhận phân biện 3/2/2021; ngày chấp nhận đăng 25/2/2021

Tóm tắt:

Chi *Adinandra* (họ Ngũ liệt) có hơn 100 loài, trong đó có hơn 10 loài phân bố ở Việt Nam. Một số cây thuộc chi *Adinandra* đã được sử dụng để điều trị ung thư, đau dạ dày và chữa rắn cắn. Nghiên cứu hóa thực vật thân cành loài *A. poilanei* thu ở Lâm Đồng đã phân lập được 5 hợp chất gồm lupeol (1), 2 β -hydroxypomolic acid (2), 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (3), scopoletin (4) và tyrosol (5). Các hợp chất 2-5 lần đầu tiên được phân lập từ chi *Adinandra*.

Từ khóa: *Adinandra poilanei*, phenolic, quinone, scopoletin, triterpene.

Chỉ số phân loại: 3.4

Mở đầu

Chi *Adinandra*, họ Ngũ liệt (Pentaphylacaceae) gồm một số cây bụi hay cây thường xanh với khoảng hơn 100 loài phân bố ở các nước như Trung Quốc, Ấn Độ, Bangladesh, Nhật Bản, vùng nhiệt đới châu Phi và các nước Đông Nam Á, trong đó ở Việt Nam có hơn 10 loài [1]. Theo tác giả Võ Văn Chi, một số loài thuộc chi *Adinandra* ở Việt Nam như *A. hainanensis*, *A. integerrima* hay *A. millettii* đã được sử dụng để điều trị ung thư vòm họng, chữa đau dạ dày, rắn cắn [2]. Ở Trung Quốc, loài *A. nitida* được sử dụng làm trà uống với nhiều công dụng như chống oxy hóa, chống ung thư, hạ huyết áp. Các nghiên cứu khoa học cho thấy *A. nitida* có triterpen saponin, flavonoid với thành phần chủ yếu là camellianin A [3-5].

Nhóm tác giả đã tiến hành nghiên cứu thân cành và lá loài *A. hainanensis* [6, 7] và phát hiện thành phần hóa học loài này khá khác biệt so với loài *A. nitida* với nhiều hợp chất triterpene. Hiện nay, chưa có các nghiên cứu về thành phần hóa học của loài *A. poilanei* ở Việt Nam cũng như trên thế giới. Tiếp tục nghiên cứu các loài thuộc chi *Adinandra* ở Việt Nam, trong bài báo này, nhóm nghiên cứu báo cáo việc phân lập và xác định cấu trúc của 5 hợp chất lupeol (1), acid 2 β -hydroxypomolic (2), 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (3), scopoletin (4) và tyrosol (5) từ thân cành loài *A. poilanei*. Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định dựa trên phổ khối, phổ cộng hưởng từ hạt nhân và so sánh với tài liệu tham khảo.

*Tác giả liên hệ: Email: lethanh@imbc.vast.vn

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Mẫu thực vật được thu tại Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà, tỉnh Lâm Đồng vào tháng 5/2018 và được TS Lương Văn Dũng (Khoa Sinh, Trường Đại học Đà Lạt) và TS Bùi Thu Hà (Khoa Sinh, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội) giám định tên khoa học là *Adinandra poilanei*, họ Ngũ liệt (Pentaphylacaceae). Mẫu tiêu bản (AP-01) được lưu giữ tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hóa chất, dung môi, máy móc, trang thiết bị

Dung môi, hóa chất dùng để chiết xuất và phân lập được mua từ các đơn vị cung cấp đạt tiêu chuẩn thí nghiệm. Sắc ký cột (CC) được tiến hành với chất hấp phụ silica gel pha thường (240-430 mesh, Merck) hoặc Sephadex LH-20 (Sigma). Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn (Merck 60 F₂₅₄), hiện màu bằng đèn tử ngoại bước sóng 254 nm hay phun thuốc thử acid sulfuric 10%. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được ghi trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer, Viện Hóa học. Phổ khối lượng (ESI-MS) được đo trên máy Agilent 1260 LC/MS, Viện Hóa sinh biển.

Kết quả và thảo luận

Thực nghiệm

Thân cành *A. poilanei* phơi khô, xay nhỏ (2,5 kg) được ngâm chiết với MeOH ở nhiệt độ phòng (10 lít/lần/24h×3

Isolation and structural elucidation of some chemical constituents from *Adinandra poilanei* Gagnep.

Thi Kim Oanh Vu^{1,2}, Thu Ha Bui³, Ngoc Thuc Dinh⁴,
Nguyen Thanh Le^{1,2*}

¹Graduate University of Science and Technology, VAST

²Institute of Marine Biochemistry, VAST

³Faculty of Biology, Hanoi National University of Education

⁴Hong Duc University

Received 25 January 2021; accepted 25 February 2021

Abstract:

Adinandra genus (Pentaphylacaceae family) comprised over 100 species, among that more than 10 species distributed in Vietnam. Several *Adinandra* plants have been used for the treatment of cancer, snake bite, and stomach aches. Phytochemical study of *A. poilanei* stems collected in Lam Dong province led to the isolation of five compounds including lupeol (1), 2 β -hydroxypomolic acid (2), 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (3), scopoletin (4), and tyrosol (5). Compounds 2-5 were isolated from the *Adinandra* genus for the first time.

Keywords: *Adinandra poilanei*, phenolic, quinone, scopoletin, triterpene.

Classification number: 3.4

lần). Dịch chiết được cất loại dưới áp suất giảm thu được cặn MeOH. Hòa cặn MeOH với 1 lít nước cất và chiết phân bổ với dung môi ethyl acetate. Cất loại dung môi hữu cơ để thu được 34 g cặn ethyl acetate. Cặn ethyl acetate (34 g) được đưa lên cột silica gel pha thường, rửa giải với hệ dung môi *n*-hexane/ethyl acetate (0-100% ethyl acetate) để thu được 11 phân đoạn (E1-E11).

Phân đoạn E5 (2,3 g) được phân tách trên cột silica gel với hệ dung môi *n*-hexane/ethyl acetate (9/1) thu được 4 phân đoạn (E5.1-E5.4). Phân đoạn E5.3 (210 mg) được tinh chế qua sắc ký silica gel với hệ dung môi *n*-hexane/dichloromethane (9/1) thu được hợp chất **1** (12 mg). Phân đoạn E10 (2 g) được đưa lên cột Sephadex LH-20, rửa giải với hệ dung môi MeOH/dichloromethane (9/1) thu được 3 phân đoạn E10.1-E10.3. Phân đoạn E10.2 (859 mg) được phân tách qua cột silica gel với hệ dung môi dichloromethane/acetone (9/1) thu được 8 phân đoạn E10.2.1-E10.2.9. Hợp chất **3** (4,1 mg) thu được bằng kết tinh từ phân đoạn E10.2.1. Phân đoạn E11 (3 g) được phân tách qua cột Sephadex LH-20, rửa giải với hệ dung môi MeOH/dichloromethane (9/1) thu được 3 phân đoạn E11.1-E11.3. Phân đoạn E11.2 (1,5 g) được phân tách qua cột silica gel với hệ dung môi dichloromethane/acetone (9/1) thu được 9 phân đoạn E11.2.1-E11.2.9. Hợp chất **2** (15 mg) thu được bằng kết tinh từ phân đoạn E11.2.7. Phân đoạn E11.2.4 được tinh chế qua cột Sephadex LH-20, rửa giải với MeOH thu được hợp chất **5**. Phân đoạn E11.3 (347 mg) được tinh chế qua cột Sephadex LH-20 và silica gel với hệ dung môi dichloromethane/acetone (19/1) thu được hợp chất **4** (8 mg).

Lupeol (1): chất rắn màu trắng. ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 427. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4,68 (1H, d, $J=2,0$ Hz, Hb-29); 4,56 (1H, d, $J=2,0$ Hz, Ha-29); 3,18 (1H, dd, $J=11,0$ Hz, 5 Hz, H-3); 1,68 (3H, s, Me-30); 1,03; 0,97; 0,95; 0,83; 0,79; 0,76 (Me-26, Me-23, Me-27, Me-25, Me-28, Me-24). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 150,9 (C-20); 109,5 (C-29); 79,0 (C-3); 55,3 (C-5); 50,4 (C-9); 48,3 (C-19); 48,0 (C-18); 43,0 (C-17); 42,8 (C-14); 40,8 (C-8); 40,0 (C-22); 38,8 (C-4); 38,7 (C-1); 38,0 (C-13); 37,1 (C-10); 35,6 (C-16); 34,2 (C-7); 29,8 (C-21); 28,0 (C-23); 27,4 (C-15); 27,4 (C-2); 25,1 (C-12); 20,9 (C-11); 19,3 (C-30); 18,3 (C-6); 18,0 (C-28); 16,1 (C-26); 15,9 (C-25); 15,3 (C-24); 14,5 (C-27).

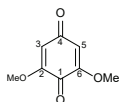
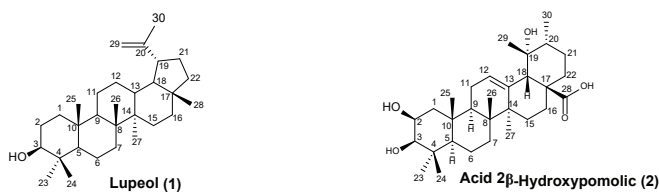
Acid 2 β -Hydroxypomolic (2): chất rắn màu trắng. ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 489. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ (ppm): 5,17 (1H, br s, H-12); 3,84 (1H, brd, $J=3$ Hz, H-2); 2,98 (1H, d, $J=3$ Hz, H-3); 1,27 (3H, s, H-27); 1,17 (3H, s, H-25); 1,07 (3H, s, H-29); 0,90 (6H, s, H-23, H-24); 0,84 (3H, d, $J=7,0$ Hz, H-30); 0,71 (3H, s, H-26). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ (ppm) 179,0 (C-28); 138,6 (C-13);

127,0 (C-12); 77,3 (C-3); 71,6 (C-19); 70,0 (C-2); 54,9 (C-5); 53,2 (C-18); 47,0 (C-17); 46,9 (C-9); 43,9 (C-1); 41,4 (C-14); 41,2 (C-20); 39,8 (C-8); 37,8 (C-4); 37,2 (C-22); 36,4 (C-10); 32,7 (C-7); 29,6 (C-23); 28,0 (C-15); 26,4 (C-29); 25,9 (C-21); 25,2 (C-16); 24,0 (C-27); 23,2 (C-11); 17,9 (C-6); 17,5 (C-24); 16,6 (C-26); 16,3 (C-30); 15,9 (C-25).

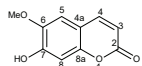
2,6-Dimethoxy-1,4-benzoquinone (3): chất rắn màu vàng, ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 169. 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ (ppm): 5,85 (2H, s, H-3, H-5); 3,82 (3H, s, H-7, H-8). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ (ppm): 186,8 (C-4); 176,6 (C-1); 157,3 (C-2, C-4); 107,4 (C-3, C-5); 56,4 (OMe x 2).

Scopoletin (4): chất rắn màu vàng. ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 193. 1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ (ppm): 7,88 (1H, d, $J=9,5$ Hz, H-4); 7,12 (1H, s, H-5); 6,79 (1H, s, H-8); 6,22 (1H, d, $J=9,5$ Hz, H-3); 3,97 (3H, s, OCH_3). ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ (ppm): 164,0 (C-2); 152,9 (C-7); 151,4 (C-4a); 147,1 (C-6); 146,1 (C-4); 112,6 (C-3); 112,5 (C-8a); 109,9 (C-5); 104,0 (C-8); 56,8 (OMe).

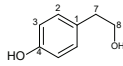
Tyrosol (5): chất rắn màu vàng nhạt. ESI-MS m/z $[M+H]^+$ 139. 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ (ppm): 7,09 (2H, d, $J=8,5$ Hz, H-2, H-6); 6,79 (2H, d, $J=8,5$ Hz, H-3, H-5); 3,82 (2H, d, $J=6,5$ Hz, H-8); 2,80 (2H, d, $J=6,5$ Hz, H-8). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) δ (ppm): 154,3 (C-4); 130,4 (C-1); 130,1 (C-2, C-4); 115,5 (C-3, C-5); 63,8 (C-8); 38,3 (C-7).



2,6-Dimethoxy-1,4-benzoquinone (3)



Scopoletin (4)



Tyrosol (5)

Hình 1. Cấu trúc của các hợp chất 1-5 phân lập từ thân cây *A. poilanei*.

Bàn luận

Lupeol (1)

Hợp chất **1** thu được dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối ESI-MS cho tín hiệu ion giả phân tử tại m/z $[M+H]^+$ 427, gợi ý cho công thức phân tử $C_{30}H_{50}O$. Phổ 1H -NMR thể hiện đặc trưng của triterpen vòng lupan với tín hiệu 2 hydro của nhóm $CH_2=C$ tại δ_H 4,68 (1H, d, $J=2,0$ Hz, Hb-29); 4,56 (1H, d, $J=2,0$ Hz, Ha-29), bên cạnh đó còn có tín hiệu proton của H-3 ở δ_H 3,18 (1H, dd, $J=11,0$ Hz, 5 Hz, H-3) và tín hiệu của 7 nhóm methyl singlet ở các vị trí δ_H

1,68; 1,03; 0,97; 0,95; 0,83; 0,79 và 0,76. Phổ ^{13}C -NMR và phổ DEPT cho thấy tín hiệu của 30 carbon, trong đó có 7 tín hiệu CH_3 , 10 tín hiệu nhóm CH_2 (trong đó có tín hiệu nhóm olefin CH_2 tại δ_C 109,5 (C-29)), 5 tín hiệu nhóm CH (trong đó tín hiệu nhóm oxymethine ở vị trí 79,0 (C-3)). Các dữ liệu phổ NMR gợi ý cho biết công thức của hợp chất **1** là hợp chất lupeol. So sánh dữ liệu phổ với hợp chất đã công bố cho thấy sự trùng khớp [8].

Acid 2β-Hydroxypomolic (2)

Chất **2** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ khối ESI-MS cho pic ion giả phân tử proton hóa ở m/z 489 $[M+H]^+$, gợi ý cho công thức phân tử là $C_{30}H_{48}O_5$. Phổ 1H -NMR cho các tín hiệu của hợp chất triterpen khung ursan với tín hiệu của 7 nhóm methyl gồm 6 singlet và 1 doublet tại δ_H 1,27 (3H, s, H-27); 1,17 (3H, s, H-25); 1,07 (3H, s, H-29); 0,90 (6H, s, H-23, H-24); 0,84 (3H, d, $J=7,0$ Hz, H-30); 0,71 (3H, s, H-26); 2 tín hiệu nhóm oxymethine ở δ_H 3,84 (1H, brd, $J=3,0$ Hz, H-2) và 2,98 (1H, d, $J=3,0$ Hz, H-3), tín hiệu 1 olefinic proton tại 5,17 (1H, br s, H-12). Phổ ^{13}C -NMR và phổ DEPT cho tín hiệu cộng hưởng của 30 carbon, trong đó có nhóm carboxylic tại δ_C 179,0 (C-28), 2 olefinic carbon tại δ_C 138,6 (C-13), 127,0 (C-12), 2 nhóm oxymethine tại δ_C 77,3 (C-3), 70,0 (C-2), tín hiệu carbon alcohol bậc 3 tại δ_C 71,6 (C-19) và 7 nhóm methyl. Hằng số tương tác của H-3 nhỏ $J=3,0$ Hz gợi ý cho hai proton ở H-2 và H-3 là cùng một phía α . Từ việc phân tích dữ kiện phổ NMR, MS kết hợp so sánh với tài liệu [9] đã công bố cho phép xác định hợp chất **2** là acid 2β-hydroxypomolic.

2,6-Dimethoxy-1,4-benzoquinone (3)

Chất **3** thu được dưới dạng chất rắn màu vàng. Phổ khối ESI-MS cho pic ion giả phân tử proton hóa ở m/z 169 $[M+H]^+$, gợi ý cho công thức phân tử là $C_8H_8O_4$ ($M=168$). Phổ 1H -NMR cho các tín hiệu olefinic proton tại 5,85 (2H, s, H-3, H-5) và tín hiệu nhóm methoxy tại δ_H 3,82 (3H, s, H-7, H-8). Phổ ^{13}C -NMR cho tín hiệu của 8 carbon, trong đó có 2 tín hiệu nhóm carbonyl tại δ_C 186,8 (C-4), 176,6 (C-1). Ngoài ra còn có các tín hiệu nhóm methoxy tại δ_C 56,4 (C-7, C-8) và 2 olefinic carbon tại δ_C 157,3 (C-2, C-4), 107,4 (C-3, C-5) và đều là tín hiệu kép. Từ dữ liệu phổ NMR và ESI-MS, kết hợp so sánh với dữ liệu tham khảo [10] cho phép xác định hợp chất **3** là 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone.

Scopoletin (4)

Hợp chất **4** được phân lập từ cặn chiết ethyl acetate dưới dạng chất rắn màu vàng. Phổ khối ESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z 193 $[M+H]^+$. Trên phổ 1H -NMR cho tín hiệu hợp chất coumarin với tín hiệu 2 olefinic proton dạng *cis* tại δ_H 7,88 (1H, d, $J=9,5$ Hz, H-4) và 6,22 (1H, d, $J=9,5$ Hz, H-3), 2 proton vùng thơm ở δ_H 7,12 (1H, s, H-5), 6,79 (1H, s, H-8). Ngoài ra có tín hiệu nhóm methoxy tại δ_H 3,97 (3H,

s, OCH₃). Trên phổ ¹³C-NMR cho 10 tín hiệu carbon, trong đó có 1 nhóm carbonyl tại δ_C 164,0 (C-2), 8 tín hiệu olefinic carbon tại δ_C 152,9 (C-7); 151,4 (C-4a); 147,1 (C-6); 146,1 (C-4); 112,6 (C-3); 112,5 (C-8a); 109,9 (C-5); 104,0 (C-8) và 1 nhóm methoxy tại δ_C 56,8 (OMe). So sánh dữ liệu NMR với tài liệu đã công bố [11] cho phép xác định hợp chất **4** là scopoletin.

Tyrosol (5)

Hợp chất **5** thu được dưới dạng chất rắn màu vàng nhạt. Phổ khối ESI-MS của **5** xuất hiện pic ion giả phân tử ở *m/z* 139 [M+H]⁺, tương ứng với công thức phân tử C₈H₁₀O₂ (M=138). Trên phổ ¹H-NMR cho tín hiệu hợp chất vòng thơm thế *para* với tín hiệu 4 proton vòng thơm tại δ_H 7,09 (2H, d, *J*=8,5 Hz, H-2, H-6); 6,79 (2H, d, *J*=8,5 Hz, H-3, H-5). Ngoài ra có tín hiệu hai nhóm oxymethylene tại δ_H 3,82 (2H, d, *J*=6,5 Hz, H-8) và 2,80 (2H, d, *J*=6,5 Hz, H-7). Trên phổ ¹³C-NMR cho 8 tín hiệu carbon, trong đó có 6 carbon vòng thơm tại δ_C 154,3 (C-4); 130,4 (C-1); 130,1 (C-2, C-4); 115,5 (C-3, C-5), 1 nhóm oxymethylene tại δ_C 63,8 (C-8), 1 nhóm methylene tại δ_C 38,3 (C-7). Từ phân tích các dữ liệu phổ kết hợp so sánh với tài liệu đã được công bố [12] cho phép xác định hợp chất **5** là tyrosol.

Kết luận

Từ dịch chiết ethyl acetat của thân cây *A. poilanei*, 5 hợp chất đã được phân lập và xác định là lupeol (**1**), acid 2β-hydroxypomolic (**2**), 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (**3**), scopoletin (**4**) và tyrosol (**5**). Các hợp chất **2-5** lần đầu được phát hiện từ chi *Adinandra*, còn hợp chất **1** đã được tìm thấy từ loài *A. hainanensis*.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí từ Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) thông qua đề tài mã số 104.01-2018.16.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Phạm Hoàng Hộ (2003), *Cây cỏ Việt Nam*, Nhà xuất bản Trẻ TP Hồ Chí Minh, 1, tr.415.
- [2] Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản

Y học, 2, tr.734-736.

- [3] H. Gao, B. Liu, F. Liu, Y. Chen (2010), "Anti-proliferative effect of camellianin A in *Adinandra nitida* leaves and its apoptotic induction in human Hep-G2 and MCF-7 cells", *Molecules*, **15**(6), pp.3878-3886.

- [4] Y. Chen, G. Chen, X. Fu, R.H. Liu (2015), "Phytochemical profiles and antioxidant activity of different varieties of *Adinandra* tea (*Adinandra* Jack)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**(1), pp.169-176.

- [5] C. Yuan, L. Huang, J.H. Suh, Y. Wang (2019), "Bioactivity-guided isolation and identification of antiadipogenic compounds in Shiya tea (leaves of *Adinandra nitida*)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **67**(24), pp.6785-6791.

- [6] Vũ Thị Kim Oanh, Phạm Thị Lan Phương, Đinh Ngọc Thúc, Nguyễn Quang Huy, Nguyễn Thị Minh Hằng, Lê Nguyễn Thành (2019), "Hợp chất triterpen và tác dụng sinh học từ lá cây sum hải nam (*Adinandra hainanensis* Hayata.)", *Tạp chí Dược học*, **59**(523), tr.65-68.

- [7] T.K.O. Vu, T.T.O. Nguyen, H.G. Tran, T.H. Bui, N.T. Dinh, T.M.H. Nguyen, N.T. Le (2019), "Triterpenes from the stems of *Adinandra hainanensis* Hayata", *Vietnam Journal of Chemistry*, **57**(4e3,4), pp.333-336.

- [8] C.M. Wang, H.T. Chen, Z.Y. Wu, Y.L. Jhan, C.L. Shyu, C.H. Chou (2016), "Antibacterial and synergistic activity of pentacyclic triterpenoids isolated from *Alstonia scholaris*", *Molecules*, **21**(2), DOI: 10.3390/molecules21020139.

- [9] J.J. Cheng, L.J. Zhang, H.L. Cheng, C.T. Chiou, I.J. Lee, Y.H. Kuo (2010), "Cytotoxic hexacyclic triterpene acids from *Euscaphis japonica*", *Journal of Natural Products*, **73**(10), pp.1655-1658.

- [10] A. Harasawa, A. Tagashira (1994), "Isolation of 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone from *Hydrangea* (*Hydrangea macrophylla* Seringe var. otaksa Makino) and its deodorant activity against methyl mercaptan", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **58**(11), pp.2073-2074.

- [11] M. Adfa, T. Yoshimura, K. Komura, M. Koketsu (2010), "Antitermite activities of coumarin derivatives and scopoletin from *Protium javanicum* Burm. f.", *Journal of Chemical Ecology*, **36**(7), pp.720-726.

- [12] C.H. Park, K.H. Kim, I.K. Lee, S.Y. Lee, S.U. Choi, J.H. Lee, K.R. Lee (2011), "Phenolic constituents of *Acorus gramineus*", *Archives of Pharmacal Research*, **34**(8), pp.1289-1296.

Đánh giá thành phần hóa học và một số hoạt tính sinh học của tinh dầu cây Bạc hà (*Mentha arvensis* L.) trồng tại Việt Nam

Trần Bảo Trâm*, Nguyễn Thị Hiền, Trương Thị Chiên, Phan Xuân Bình Minh, Nguyễn Thị Thanh Mai, Hoàng Quốc Chính, Vũ Xuân Tạo

Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ KH&CN

Ngày nhận bài 26/5/2021; ngày chuyển phân biện 31/5/2021; ngày nhận phân biện 24/6/2021; ngày chấp nhận đăng 28/6/2021

Tóm tắt:

Việt Nam có nguồn tài nguyên thực vật rất phong phú và đa dạng, nhiều loài thực vật được coi là nguồn dược liệu quý. Nghiên cứu, tìm kiếm và đánh giá các hoạt chất có hoạt tính sinh học từ thực vật là hướng nghiên cứu tiềm năng trong việc tạo ra các sản phẩm chăm sóc sức khỏe con người. Cây Bạc hà (*Mentha arvensis* L.) hiện đã được trồng nhiều tại Việt Nam, dùng làm nguyên liệu sản xuất tinh dầu phục vụ nội tiêu và xuất khẩu. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá thành phần hóa học và một số hoạt tính sinh học của tinh dầu cây Bạc hà trồng tại 3 tỉnh Thái Bình, Bình Thuận và An Giang. Kết quả cho thấy, hàm lượng tinh dầu trong các mẫu Bạc hà thu được đạt từ 0,69 đến 0,84%. Phân tích thành phần hóa học của tinh dầu Bạc hà bằng phương pháp sắc ký khí đã nhận diện được 29 chất với thành phần và hàm lượng khác nhau giữa các mẫu tinh dầu, trong đó menthol và menthone được xác định là 2 thành phần chính, tương ứng khoảng 53,62-62,61% và 18,81-21,06%. Đồng thời, các mẫu tinh dầu Bạc hà cũng được xác định đều có hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* được đánh giá thông qua khả năng dọn gốc tự do DPPH và hoạt tính kháng một số chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*. Trong đó, cây Bạc hà trồng tại Thái Bình có hàm lượng tinh dầu với thành phần menthol, menthone đạt cao nhất và biểu hiện hoạt tính sinh học mạnh nhất.

Từ khóa: Bạc hà, chống oxy hóa, kháng khuẩn, *Mentha arvensis* L., tinh dầu.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Ngày nay, nhu cầu sử dụng các sản phẩm chăm sóc sức khỏe con người có nguồn gốc từ thảo dược thiên nhiên ngày càng tăng cao. Việt Nam là nước có nguồn thảo dược rất phong phú và đa dạng, với nhiều bài thuốc lưu truyền trong dân gian đã được sử dụng hiệu quả nhiều năm qua. Trong đó, Bạc hà được coi là nguồn dược liệu quý, tiềm năng cho nghiên cứu các hoạt chất có hoạt tính sinh học nhằm phát triển các sản phẩm chăm sóc, bảo vệ sức khỏe. *Mentha arvensis* hay còn gọi là Bạc hà Á, Bạc hà Nhật, có nguồn gốc phân bố ở các vùng ôn đới khu vực châu Âu, phía tây các nước Trung Á, phía đông Himalaya và Siberia. Đến nay, Bạc hà Á đã được trồng ở nhiều nước trên thế giới như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Nga, Braxin, Ấn Độ, Việt Nam... Bạc hà Á được trồng phổ biến do đặc tính dễ trồng, chịu được khô hạn, thích hợp trên đất chua và đất sét nặng. Trong y học cổ truyền, Bạc hà được biết đến như một loại thuốc chữa rối loạn tiêu hóa, trị sốt, cúm, cảm lạnh, chảy máu cam, các bệnh về mũi họng... [1].

Các nghiên cứu khoa học hiện đại đã chỉ ra rằng, cây Bạc hà chứa một lượng lớn tinh dầu với nhiều hoạt tính sinh học quý. Tinh dầu Bạc hà có khả năng chống oxy hóa,

kháng khuẩn, kháng nấm, diệt côn trùng... [2, 3]. Do có đặc tính kháng khuẩn nổi trội cùng với hương thơm đặc trưng nên tinh dầu Bạc hà được sử dụng phổ biến trong sản xuất các sản phẩm chăm sóc sức khỏe răng miệng như nước súc miệng, kem đánh răng dùng cho điều trị sưng nướu răng, loét miệng và đau răng [4]. Các hoạt tính của tinh dầu Bạc hà phụ thuộc vào thành phần hóa học của chúng. Tuy nhiên, thành phần hóa học của tinh dầu Bạc hà lại phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố như giống, điều kiện thổ nhưỡng, khí hậu của nơi trồng Bạc hà, bộ phận thu hái để lấy tinh dầu, thời gian thu hoạch... Các bộ phận của cây Bạc hà có chứa hàm lượng tinh dầu rất khác nhau: lá là bộ phận cho sản lượng tinh dầu cao nhất, trong khi thân chứa lượng dầu không đáng kể và rễ thì không chứa tinh dầu [5]. Thổ nhưỡng, khí hậu của nơi trồng Bạc hà là yếu tố ảnh hưởng chính tới thành phần hóa học hay chính là chất lượng của tinh dầu Bạc hà. Thái Bình, Bình Thuận và An Giang là các địa phương trồng nhiều Bạc hà ở Việt Nam. Đây được coi là các vùng nguyên liệu chính cho việc sản xuất tinh dầu Bạc hà xuất khẩu. Tuy nhiên, các nghiên cứu đánh giá chất lượng tinh dầu Bạc hà của các vùng nguyên liệu này chưa nhiều và chưa tổng quát. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu đánh giá đồng thời thành phần hóa học và một số hoạt tính sinh học

*Tác giả liên hệ: Email: trantram_74@yahoo.com

Evaluation of the chemical components and some bioactive compounds of the peppermint essential oil (*Mentha arvensis* L.) cultivated in Vietnam

Bao Tram Tran*, Thi Hien Nguyen, Thi Chien Truong,
Xuan Binh Minh Phan, Thi Thanh Mai Nguyen,
Quoc Chinh Hoang, Xuan Tao Vu

Center of Experimental Biology, National Center for Technological Progress,
Ministry of Science and Technology

Received 26 May 2021; accepted 28 June 2021

Abstract:

Vietnam has diverse plant resources and many species are considered to be valuable medicinal sources. Studying, seeking, and evaluating the bioactive compounds from plants is a valuable research endeavor for producing human healthcare products. Peppermint (*Mentha arvensis* L.) is widely cultivated in Vietnam as a raw material for the production of essential oils serving local needs and exports. This study compared the chemical components and some bioactive compounds in essential oil from *Mentha arvensis* L. cultivated in Thai Binh, Binh Thuan, and An Giang provinces. The essential oil yields in all samples ranged from 0.69 to 0.84%. Gas chromatography analyses identified 29 substances in total. Menthol and menthone were the two main ingredients in the oils, accounting for 53.62-62.61% and 18.81-21.06%, respectively. Furthermore, all essential oils exhibited free radical scavenging capacity *in vitro* and antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*. The plants collected in Thai Binh had the highest content of essential oil, menthol, and menthone, as well as the strongest bioactivities.

Keywords: antibacterial ability, antioxidant activity, essential oil, *Mentha arvensis* L., peppermint.

Classification number: 3.4

của tinh dầu cây Bạc hà *Mentha arvensis* L. trồng tại Thái Bình, Bình Thuận và An Giang - đại diện cho các vùng địa lý với điều kiện canh tác khác nhau của Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp

Vật liệu nghiên cứu

Phần trên mặt đất của cây Bạc hà (*Mentha arvensis* L.) ở giai đoạn ra hoa đạt 70% được thu tại Thái Bình, Bình Thuận và An Giang vào tháng 3-4/2020 (các mẫu lần lượt được ký hiệu là TB, BT và AG).

Các chủng vi khuẩn kiểm định gồm *Staphylococcus aureus* VTCC 11123, *Bacillus subtilis* VTCC 21195, *Escherichia coli* VTCC 12272 được cung cấp bởi Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật, Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội và lưu giữ tại Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ.

Phương pháp xác định hiệu suất thu hồi tinh dầu

Mẫu Bạc hà tươi (500 g) được nghiền nhỏ và chưng cất bằng hệ thống Clevenger trong vòng 3 giờ [6]. Tinh dầu thu được có màu vàng được tách loại nước bằng Na_2SO_4 khan. Tinh dầu được giữ trong lọ tối màu bảo quản ở từ 4°C đến khi phân tích. Từ hàm lượng tinh dầu (%), tính toán ra hiệu suất thu hồi tinh dầu: $X(\%) = \frac{m_1}{m_2} \times 100$, trong đó m_1 là khối lượng tinh dầu thu được (g), m_2 là khối lượng nguyên liệu đem chiết (g).

Phân tích thành phần hóa học của tinh dầu Bạc hà

Sử dụng phương pháp sắc ký khí GC/MS: sử dụng GC-FID (đầu dò ion hóa ngọn lửa) kết hợp GC/MS (đầu dò khối phổ). GC của Hãng Agilent Technologies HP 6890, cột mao quản HP-5MS có kích thước 0,25 μm x 60 m x 0,25 mm. Chương trình nhiệt độ với điều kiện 40°C/phút, tăng nhiệt độ 3°C/phút cho đến 230°C và duy trì trong 10 phút. Máy dò và nhiệt độ kim phun lần lượt là 250°C và 230°C. Sắc ký khí được tiến hành trên hệ thống HP 6890 ghép nối với detector HP 5973, cột mao quản như trên, khí mang heli có tốc độ dòng chảy 1,0 ml/phút với tỷ lệ phân chia 1/50. Xác định thời gian lưu của các chất trên sắc ký đồ giống với những chất đã biết, được thực hiện bằng cách so sánh các dữ liệu phổ MS của chúng với phổ chuẩn đã được công bố có trong thư viện Willey/Chemstation HP [7]. Mặt khác, dựa trên peak của các cấu tử xác định được tỷ lệ % các chất có trong mẫu phân tích.

Xác định hoạt tính dọn gốc tự do DPPH

DPPH là phương pháp được sử dụng để kiểm tra khả năng chống oxy hóa trong các mẫu tinh dầu Bạc hà. Các bước tiến hành gồm: hút 40 μl tinh dầu được pha loãng bằng DMSO ở các nồng độ khác nhau: 20, 40, 60 và 100 $\mu\text{g/ml}$, thêm 4 ml dung dịch DPPH (TCI, Nhật Bản) (pha trong methanol) 0,004%, lắc đều và để trong tối 1 giờ, tiến hành

đo mẫu ở bước sóng 517 nm. Sử dụng Vitamin C (Merck, Mỹ) làm mẫu đối chứng so sánh [8]. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập.

Hoạt tính chống oxy hóa (%) = $(A_0 - A_1/A_0) \times 100$, trong đó: A_0 là độ hấp thụ của mẫu trắng (methanol), A_1 là độ hấp thụ của mẫu thử nghiệm.

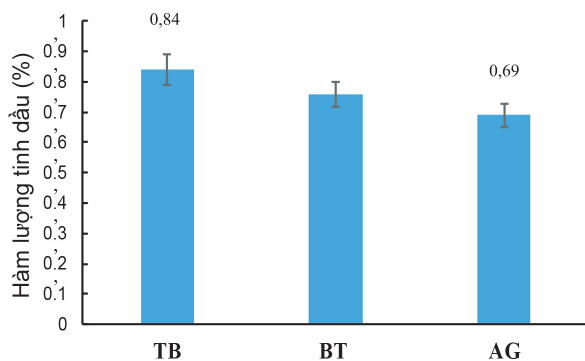
Xác định khả năng kháng khuẩn của tinh dầu Bạc hà

Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu Bạc hà được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [9]. Các bước tiến hành: hút 50 μ l dịch các chủng vi khuẩn kiểm định (nồng độ 10^6 tế bào/ml) cấy trải trên môi trường LB. Tiến hành khoan lỗ thạch trên đĩa, sau đó hút 50 μ l các mẫu tinh dầu Bạc hà vào các giếng thạch, ủ đĩa petri ở 37°C trong 24 giờ. Sử dụng kháng sinh Kanamycin nồng độ 100 μ g/ml làm đối chứng dương. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định theo công thức: D-d (mm), trong đó D là đường kính vòng kháng khuẩn (mm), d là đường kính lỗ khoan (mm).

Kết quả và thảo luận

Đánh giá hàm lượng tinh dầu Bạc hà

Các mẫu cây Bạc hà tươi sau khi thu thập được đưa ngay về phòng thí nghiệm để tiến hành tách chiết tinh dầu bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước. Tinh dầu thu được từ các mẫu cây Bạc hà trồng tại Thái Bình, Bình Thuận và An Giang có màu vàng nhạt, mùi thơm đặc trưng với hàm lượng tinh dầu thu hồi được từ 0,69 đến 0,84% tính theo nguyên liệu tươi (hình 1).



Hình 1. Hàm lượng tinh dầu của các mẫu cây Bạc hà thu tại các vùng trồng khác nhau.

Kết quả tách chiết tinh dầu cho thấy, hàm lượng tinh dầu thu được từ các mẫu cây Bạc hà trồng tại các vùng khác nhau có sự khác biệt rõ rệt. Theo đó, hàm lượng tinh dầu thu được thấp nhất đối với mẫu cây Bạc hà trồng tại An Giang (0,69%) và cao nhất là mẫu cây Bạc hà trồng tại Thái Bình (0,84%). Các điều kiện ngoại cảnh như nhiệt độ, độ ẩm có ảnh hưởng trực tiếp đến tỷ lệ tinh dầu Bạc hà. Nhiệt độ dao động từ 28-30°C sẽ làm tăng tỷ lệ tinh dầu, nhiệt độ cao trên 30°C và gió nhiều sẽ làm giảm tỷ lệ tinh dầu [10]. Thời gian

thu hoạch mẫu Bạc hà tại 3 vùng trồng trong tháng 3-4, với nền nhiệt độ dao động tại Thái Bình là 29-30°C, Bình Thuận và An Giang 30-32°C, với ngưỡng nhiệt độ trên có thể cho thấy lý do Bạc hà thu hái tại Thái Bình cho hàm lượng tinh dầu cao hơn so với các mẫu còn lại. Bên cạnh đó, điều kiện thổ nhưỡng, chế độ canh tác cũng có ảnh hưởng đến hàm lượng tinh dầu trong mẫu. So với thế giới, hàm lượng tinh dầu của các mẫu cây Bạc hà trồng tại Thái Bình, Bình Thuận và An Giang của Việt Nam thu được khá thấp. Lượng tinh dầu thu được từ cây Bạc hà trồng tại Ấn Độ đạt 0,62-1,09% [5, 11], cây Bạc hà trồng tại Argentina cho hàm lượng tinh dầu đạt 1,6-2% [12]. Sự khác biệt này có thể do nhiều yếu tố như thổ nhưỡng, khí hậu, chế độ canh tác... Nhìn nhận từ thực tế cho thấy, các vùng trồng nguyên liệu Bạc hà tại Việt Nam cần phải có những nghiên cứu, cải tiến trong quá trình canh tác để nâng cao hàm lượng tinh dầu cho cây Bạc hà.

Thành phần hóa học của tinh dầu Bạc hà

Để đánh giá chất lượng nguyên liệu cây Bạc hà trồng tại các vùng khác nhau, ngoài chỉ số hàm lượng tinh dầu thu được thì thành phần hóa học của tinh dầu là một trong những căn cứ quan trọng nhất. Sau khi tách chiết, các mẫu tinh dầu Bạc hà được tiến hành phân tích thành hóa học bằng phương pháp sắc ký GC/MS. Kết quả phân tích thành hóa học của các mẫu tinh dầu được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả phân tích thành hóa học của các mẫu tinh dầu cho thấy, thành phần hóa học của tinh dầu cây Bạc hà trồng tại các vùng khác nhau của Việt Nam đều đáp ứng tiêu chuẩn quốc tế ISO 9776:1996 về tinh dầu Bạc hà *Mentha arvensis*. Kết quả phân tích GC/MS trong nghiên cứu này đã nhận diện được 29 chất có trong 3 mẫu tinh dầu Bạc hà (TB, BT và AG), chiếm 99,77-99,88% tinh dầu. Cụ thể, trong mẫu tinh dầu Bạc hà Thái Bình nhận diện được 12 chất, tinh dầu Bạc hà Bình Thuận nhận diện được 19 chất, mẫu tinh dầu Bạc hà An Giang nhận diện được 16 chất. Menthol và menthone là 2 thành phần chính có trong tất cả các mẫu tinh dầu Bạc hà và đây cũng được coi là 2 chỉ tiêu quan trọng để đánh giá chất lượng tinh dầu Bạc hà [5]. Hàm lượng menthol và menthone cao nhất ở mẫu tinh dầu của cây Bạc hà trồng tại Thái Bình với tỷ lệ lần lượt là 62,61 và 21,06%; thấp nhất ở mẫu tinh dầu Bạc hà Bình Thuận với hàm lượng tương ứng là 53,62 và 18,81%. Menthol và menthone cùng với một số thành phần hóa học khác có thể thay đổi theo sự phát triển của cây, vùng địa lý và điều kiện xử lý sau thu hoạch [8]. Tinh dầu cây Bạc hà thu được tại Ấn Độ và Mỹ có hàm lượng menthol đạt 67-78% [3, 13]. Trong khi, các mẫu tinh dầu chiết xuất từ hoa, lá và toàn bộ cây Bạc hà *Mentha arvensis* trồng ở khu vực đông nam của Macedonia có hàm lượng menthol chiếm tỷ lệ tương ứng là 35,64, 32,47 và 52,53% [14]. Như vậy có thể thấy, cây Bạc hà trồng tại các vùng khác nhau của Việt Nam (Thái Bình, Bình Thuận và An Giang) cho chất lượng tinh dầu tương đối cao so với các vùng trồng khác trên thế giới.

Bảng 1. Thành phần hóa học của các mẫu tinh dầu cây Bạc hà trồng tại Thái Bình, Bình Thuận và An Giang.

STT	Tên chất	TB	BT	AG
1	α -pinene	1,28	1,91	1,60
2	α -myrcene	1,71	0,67	2,03
3	α -phellandrene	0,57	0,64	-
4	D-limonene	3,37	5,49	5,01
5	l-menthone	21,06	18,81	19,54
6	dI-menthol	62,61	53,62	59,38
7	Valeric anhydride	2,74	-	-
8	Menthyl acetate	4,88	7,84	-
9	Isoledene	0,21	-	-
10	Caryophyllene	0,57	0,60	0,53
11	α -bourbonene	0,71	0,23	-
12	γ -elemene	0,17	0,08	-
13	Camphene	-	-	-
14	Eucalyptol	-	-	-
15	α -santalol	-	-	-
16	Bis(2-ethylhexyl)phthalate	-	-	-
17	Pyriproxyfen	-	-	0,51
18	Pulegone	-	-	2,15
19	Resorcinol monoacetate	-	-	0,34
20	Creosol	-	-	7,30
21	Memantine	-	-	0,35
22	8-azaadenine	-	-	0,22
23	Isosativene	-	-	0,06
24	Germacrene	-	0,41	0,33
25	Longifolene	-	0,14	0,13
26	α -cubebene	-	-	0,29
27	3-carene	-	1,55	-
28	Menthane (1S, 3S)	-	0,10	-
29	3-methylthiazolidine	-	3,12	-
30	Acenaphthylene	-	2,50	-
31	Adrenalone	-	2,06	-
32	Caryophyllene oxide	-	0,03	-
33	Hotrienol	-	0,05	-
Tổng		99,88	99,85	99,77

Khả năng dọn gốc tự do DPPH của tinh dầu Bạc hà

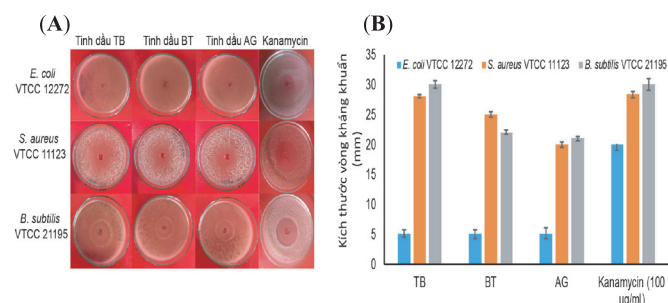
Khả năng chống oxy hóa là một trong các đặc tính sinh học quan trọng của tinh dầu. Kết quả xác định khả năng chống oxy hóa của các mẫu tinh dầu Bạc hà cho thấy, khả năng dọn gốc tự do DPPH trong các mẫu khá cao. Ở nồng độ tinh dầu 100 $\mu\text{g/ml}$, 3 mẫu tinh dầu đều có khả năng ức chế trên 50% gốc tự do DPPH. Giá trị IC_{50} của các mẫu tinh dầu TB, BT và AG lần lượt đạt 75,26; 85,70; 92,86 $\mu\text{g/ml}$ (bảng 2). Khả năng dọn gốc DPPH tốt nhất là ở mẫu tinh dầu Bạc hà Thái Bình. Tác dụng này có thể do thành phần hóa học của tinh dầu chủ yếu chứa các hydrocarbon monoterpene, tinh dầu giàu monoterpene có hoạt tính chống oxy hóa cao [15]. Các hợp chất loại bỏ gốc tự do cao nhất đã được báo cáo là xeton monoterpene (menthone, isomenthone) và 1,8-cineole [16]. Như vậy, tinh dầu Bạc hà là một nguồn chất chống oxy hóa tự nhiên, có tiềm năng ứng dụng làm nguyên liệu cho các sản phẩm chăm sóc sức khỏe và ngăn ngừa lão hóa cho con người.

Bảng 2. Khả năng dọn gốc tự do DPPH (%) của các mẫu tinh dầu Bạc hà.

Mẫu	Nồng độ			
	20 $\mu\text{g/ml}$	40 $\mu\text{g/ml}$	60 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
TB	20,68 $\pm$ 0,12	32,56 $\pm$ 0,22	45,61 $\pm$ 0,19	60,70 $\pm$ 0,13
BT	18,79 $\pm$ 0,15	30,58 $\pm$ 0,14	35,64 $\pm$ 0,17	57,35 $\pm$ 0,15
AG	16,58 $\pm$ 0,21	28,40 $\pm$ 0,16	33,64 $\pm$ 0,13	53,35 $\pm$ 0,14
Vitamin C	28,95 $\pm$ 0,17	46,40 $\pm$ 0,17	63,84 $\pm$ 0,23	94,76 $\pm$ 0,17
IC_{50} TB	75,26 $\pm$ 1,25 $\mu\text{g/ml}$			
IC_{50} BT	85,70 $\pm$ 1,10 $\mu\text{g/ml}$			
IC_{50} AG	92,86 $\pm$ 1,13 $\mu\text{g/ml}$			
IC_{50} Vitamin C	44,12 $\pm$ 1,08 $\mu\text{g/ml}$			

Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu Bạc hà

Kết quả xác định khả năng kháng khuẩn cho thấy, các mẫu tinh dầu nghiên cứu đều có khả năng kháng khuẩn trên các chủng vi khuẩn *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*. Tinh dầu Bạc hà có khả năng kháng tốt vi khuẩn *S. aureus* và *B. subtilis*, trong khi khả năng kháng *E. coli* của cả 3 mẫu tinh dầu đều tương đối thấp. Mẫu tinh dầu Bạc hà Thái Bình có khả năng kháng khuẩn tốt nhất trong 3 mẫu tinh dầu nghiên cứu, khả năng kháng *S. aureus* và *B. subtilis* tương đương với kháng sinh kanamycin nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$ (hình 2). Trong nghiên cứu trên, tinh dầu Bạc hà Thái Bình được đánh giá có chất lượng tốt nhất trong 3 mẫu tinh dầu nghiên cứu (có hàm lượng menthol và menthone cao), đây có thể là lý do giúp tinh dầu Bạc hà Thái Bình có khả năng kháng khuẩn cao. Chất lượng của tinh dầu Bạc hà ảnh hưởng rất lớn tới hoạt tính kháng khuẩn. Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu Bạc hà là một trong những hoạt tính sinh học quan trọng, giúp định hướng ứng dụng nguồn tinh dầu này vào việc phát triển các sản phẩm chăm sóc sức khỏe con người [2-4].



Hình 2. Hoạt tính kháng khuẩn của các mẫu tinh dầu Bạc hà. (A) Kết quả thử nghiệm khả năng kháng khuẩn trên đĩa thạch; (B) Kích thước vòng kháng khuẩn.

Kết luận

Nghiên cứu này đã đánh giá được hàm lượng tinh dầu của cây Bạc hà trồng tại 3 tỉnh Thái Bình, Bình Thuận và An Giang (0,69-0,84%). Phân tích thành phần hóa học của tinh dầu Bạc hà bằng hệ thống sắc ký khí GC/MS đã nhận diện được 29 chất, tuy nhiên số lượng và hàm lượng các chất khác nhau giữa các mẫu tinh dầu. Menthol và menthone được xác định là 2 thành phần chính trong tinh dầu Bạc hà, tương ứng chiếm khoảng 53,62-62,61% và 18,81-21,06%. Đồng thời, các mẫu tinh dầu Bạc hà đều được xác định có khả năng kháng oxy hóa thông qua khả năng loại bỏ gốc tự do DPPH với IC_{50} của các mẫu tinh dầu tại TB, BT và AG lần lượt đạt 75,26; 85,70; 92,96 µg/ml và có khả năng kháng khuẩn với đường kính vòng kháng đối với *E. coli* trung bình là 5 mm, đối với *S. aureus*, *B. subtilis* đạt từ 21 đến 30 mm. Đặc biệt, kết quả nghiên cứu này cho thấy, mẫu tinh dầu của cây Bạc hà trồng tại Thái Bình cho hàm lượng đạt 0,84% và chất lượng tinh dầu cao nhất (menthol, menthone lần lượt đạt 62,61 và 21,06%).

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ Bộ Khoa học và Công nghệ thông qua nhiệm vụ KH&CN: “Đánh giá năng suất và chất lượng tinh dầu của cây Bạc hà (*Mentha arvensis*) trồng tại các vùng khác nhau ở Việt Nam”. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. Akram, M. Uzair, N.S. Malik, A. Mahmood, N. Sarwer, A. Madni, H.M. Asif (2011), “*Mentha arvensis* Linn.: a review article”, *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**(18), pp.4499-4503.
- [2] K. Ashok, S. Ravindra, S. Priyanka, K. Amit, K. Nawal (2009), “Use of essential oil from *Mentha arvensis* L. to control storage moulds and insects in stored chickpea”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**(15), pp.2643-2640.
- [3] A.K. Pandey, M.K. Rai, D. Acharya (2003), “Chemical composition and antimycotic activity of the essential oils of corn mint (*Mentha arvensis*) and lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) against

human pathogenic fungi”, *Pharmaceutical Biology*, **41**(6), pp.421-425.

- [4] J. Varma, N.K. Dubey (2001), “Efficacy of essential oils of *Caesulia axillaris* and *Mentha arvensis* against some storage pests causing biodeterioration of food commodities”, *International Journal of Food Microbiology*, **68**(3), pp.207-210.
- [5] B.R.R. Rajeswara, A.K. Bhattacharya, G.R. Mallavarapu, S. Ramesh (1999), “Volatile constituents of different parts of cornmint (*Mentha arvensis* L.)”, *Flavour and Fragrance Journal*, **14**(5), pp.262-264.

[6] Tống Thị Ánh Ngọc và Nguyễn Văn Kiên (2011), “Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chưng cất tinh dầu gừng”, *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*, **19b**, tr.62-69.

- [7] R.P. Adams (2001), *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry*, Allured Publishing Corp.
- [8] S. Albayrak, A. Aksoy, O. Sagdic, M. Hamzaoglu (2010), “Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey”, *Food Chemistry*, **119**(1), pp.114-122.
- [9] F. Hadacek, H. Greger (2000), “Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice”, *Phytochemical Analysis: an International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, **11**(3), pp.137-147.

[10] Chu Thị Thơm, Phan Thị Lài, Nguyễn Văn Tó (2006), *Kỹ thuật trồng cây Bạc hà*, NXB Lao động.

- [11] S. Desai, T.N. Pushpa, D. Srikantaprasad, V. Kantharaju, I.B. Biradar, R.M. Shalini, M.R. Asha (2018), “Effect of dates of planting on growth, yield and quality of menthol mint (*Mentha arvensis* L.) cultivars planted during Rabi season”, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **7**(9), pp.625-633.
- [12] D.A. Melonia, M.P. Arraizac, F. Garaya, D.M. Silvab, G. Abdalaa, R.N. Davida, J.V. Lopezc, R.E. Beltrana (2015), “Biomass and essential oil yields of cornmint (*Mentha arvensis* L.) grown in the irrigation area of Río Dulce, Santiago del Estero, Argentina”, *Journal of Essential Oil Research*, **27**(2), pp.148-152.

[13] V.D. Zheljazkov, C.L. Cantrell, T. Astakie (2010), “Yield and composition of oil from Japanese cornmint fresh and dry material harvested successively”, *Agronomy Journal*, **102**(6), pp.1652-1656.

- [14] L. Mihajlov, S. Kostadinovic-Velickovska, G. Naumova, P.V. Podea, H. Mirhosseini (2019), “Isolation, chemical composition, antioxidant and antimicrobial potential of essential oil from *Mentha Arvensis* L. organically planted from Macedonia”, *Rivista Italiana Sostanze Grasse*, **96**(3), pp.151-160.

[15] B. Tepe, M. Sokmen, H.A. Akpulat, D. Daferera, M. Polissiou, A. Sokmen (2005), “Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *rosulans*”, *Journal of Food Engineering*, **66**(4), pp.447-454.

[16] N. Mimica-Dukic, B. Bozin, M. Sokovic, B. Mihajlovic, M. Matavulj (2003), “Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils”, *Planta Medica*, **69**(05), pp.413-419.

Nghiên cứu chế tạo mẫu chuẩn RNA bền với nucleases dùng trong định lượng virút viêm gan C

Nguyễn Minh Tuấn^{1,2}, Nguyễn Thị Lệ Thủy¹, Thượng Thị Thu Thủy¹, Nguyễn Ngọc Lệ³, Nguyễn Mạnh Kiên³, Lê Quang Trí³, Nguyễn Bảo Toàn⁴, Tatyana Ilinichna⁵, Phạm Thị Kim Trâm¹, Nguyễn Hoàng Chương⁶, Nguyễn Đăng Quân^{1*}

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Bách khoa TP Hồ Chí Minh

³Bệnh viện Quân y 7A

⁴Trung tâm Y khoa MEDIC, TP Hồ Chí Minh

⁵Đại học Sechenov, Liên bang Nga

⁶Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 31/3/2021; ngày chuyển phản biện 8/4/2021; ngày nhận phản biện 18/5/2021; ngày chấp nhận đăng 25/5/2021

Tóm tắt:

Chứng dương (hay mẫu chuẩn) là thành phần không thể thiếu trong các xét nghiệm sinh học phân tử ứng dụng trong định lượng axit nucleic mục tiêu. Mẫu chuẩn thường được sử dụng phổ biến nhất là plasmid DNA, cDNA hay RNA trần với đặc tính kém bền và dễ bị phân hủy bởi các enzyme phân cắt axit nucleic tồn tại trong môi trường, vì vậy có thể ảnh hưởng tới độ chính xác của kết quả định lượng. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả thiết kế và tạo mẫu chuẩn có bản chất là một vùng trình tự RNA của virút viêm gan C (HCV) được đóng gói trong protein vỏ của thực khuẩn thể MS2 bằng công nghệ thiết kế armored RNA. Vùng trình tự không mã hóa 5'UTR của HCV được khuếch đại và tạo dòng vào plasmid BH20. Armored RNA HCV (AR-HCV) được cảm ứng biểu hiện trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) bằng bổ sung chất cảm ứng IPTG. AR-HCV được thu nhận bằng siêu ly tâm tỷ trọng sucrose, tinh sạch bằng cột sắc ký lọc gel Superdex 75 và được xác định nồng độ, đánh giá sự hình thành cấu trúc đóng gói virút bằng quan sát dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Kết quả đánh giá độ bền khi xử lý với đồng thời 2 enzyme DNase và RNase cho thấy AR-HCV có khả năng kháng các nucleases. Ngoài ra, AR-HCV duy trì được tính ổn định ở các điều kiện và thời gian bảo quản khác nhau. Khắc phục được hạn chế của các loại chất chuẩn khác, AR-HCV có thể bổ sung trực tiếp vào mẫu, giúp kiểm soát và đảm bảo độ chính xác của toàn bộ quy trình định lượng HCV.

Từ khóa: armored RNA, HCV, kháng nucleases, thực khuẩn thể MS2.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Viêm gan C là một bệnh lây nhiễm gây ra bởi virút viêm gan C (HCV - hepatitis C virus). Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO) năm 2015, trên toàn thế giới có khoảng 71 triệu người nhiễm HCV mạn tính, xấp xỉ 399.000 người tử vong do viêm gan C, chủ yếu do xơ gan và ung thư tế bào gan [1]. Ở Việt Nam, tỷ lệ nhiễm viêm gan C vào khoảng 1-2,9% dân số [2]. Hiện nay, chưa có vaccine phòng ngừa HCV hiệu quả nên chẩn đoán chính xác và điều trị là phương pháp duy nhất giúp loại bỏ HCV và ngăn ngừa sự lây truyền HCV trong cộng đồng [3]. Trong điều trị bệnh viêm gan C, lượng HCV trong máu là một yếu tố quan trọng cần được xác định để đưa ra phác đồ điều trị, thời gian điều trị và tiền lượng đáp ứng thuốc điều trị. Phương pháp chủ yếu để định lượng HCV trong máu hiện nay là real-time polymerase chain reaction (real-time PCR), hay còn gọi là quantitative PCR (qPCR).

Phương pháp real-time PCR sử dụng DNA hoặc RNA

làm mẫu chuẩn để xác định tải lượng virút có trong mẫu xét nghiệm. Việc sử dụng các DNA và RNA trần có nhược điểm là chúng dễ bị phân hủy trong môi trường có chứa các enzyme phân huỷ nuclease (bao gồm DNase và RNase), dẫn đến sai lệch trong kết quả định lượng [4]. Ngoài ra, việc sử dụng mẫu chuẩn là cDNA, RNA hay plasmid trong các bộ kit thương mại thường không kiểm soát được độ chính xác của toàn bộ quy trình do bỏ qua hiệu suất của bước tách chiết RNA, hiệu suất phiên mã, dẫn đến kết quả định lượng có thể sai lệch so với thực tế. Công nghệ armored RNA (hay armored DNA) ra đời giúp khắc phục nhược điểm này. Armored RNA là một thể giống virút bao gồm trình tự RNA của tác nhân cần định lượng được đóng gói trong protein vỏ của thực khuẩn thể (bacteriophage). Chính vì thể armored RNA có thể kháng lại sự phân hủy bởi nuclease có trong môi trường, giúp đảm bảo độ chính xác của xét nghiệm [5]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện tạo mẫu chuẩn HCV dùng trong định lượng HCV bằng công nghệ armored RNA.

*Tác giả liên hệ: Email: ndquan.snn@tphcm.gov.vn

Preparation of nuclease-resistant RNA standard for hepatitis C virus quantification

Minh Tuan Nguyen^{1,2}, Thi Le Thuy Nguyen¹,
Thi Thu Thuy Thuong¹, Ngoc Le Nguyen³,
Manh Kien Nguyen³, Quang Tri Le³, Bao Toan Nguyen⁴,
Tatyana Ilinichina⁵, Thi Kim Tram Pham¹,
Hoang Chuong Nguyen⁶, Dang Quan Nguyen^{1*}

¹Biotechnology Centre of Ho Chi Minh city

²Ho Chi Minh city University of Technology

³7A Military Hospital

⁴MEDIC Medical Centre, Ho Chi Minh city

⁵Sechenov University, Russia

⁶University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh city

Received 31 March 2021; accepted 25 May 2021

Abstract:

Positive control (or standard) is an indispensable ingredient in molecular biology assays widely used for the quantification of nucleic acid. The commonly used standards are plasmid DNA, cDNA, or naked RNA, which are unstable and easily degraded by nucleases in the surrounding environment; this might affect the accuracy of quantitative results. In this study, the authors designed and created a positive control for the hepatitis C virus (HCV) quantification based on armored RNA technology. The 5'UTR non-encoding sequence of HCV was cloned into the BH20 plasmid. Armored RNA HCV (AR-HCV) was induced for expression in the *E. coli* BL21 (DE3) by the addition of an IPTG inducer. AR-HCV was collected by sucrose density gradient ultracentrifugation followed by gel filtration chromatography using Superdex 75 column. Created AR-HCV was determined the concentration and examined the formation of pseudo viral particles by transmission electron microscopy (TEM). Stability assessment of AR-HCV to DNase and RNase treatment simultaneously has demonstrated its ability to resist these nucleases. Moreover, AR-HCV is stable over time and storage conditions. Strikingly, AR-HCV can be directly added to the specimen, allowing better and more accurate control of the whole quantitative procedure of HCV.

Keywords: armored RNA, HCV, MS2 phage, nuclease resistance.

Classification number: 3.5

Đối tượng và phương pháp

Thiết kế môi và mẫu dò TaqMan đặc hiệu cho HCV

Trình tự bộ gen HCV của 24 chủng đại diện cho các genotype, subtype khác nhau (bảng 2) được tham khảo và tải về từ cơ sở dữ liệu HCV (<https://hcv.lanl.gov/content/index>) và Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia Hoa Kỳ (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Vùng trình tự nucleotide bảo tồn giữa các genotype được lựa chọn bằng phần mềm BLAST. Trên vùng trình tự bảo tồn (vùng 5'UTR), môi và mẫu dò TaqMan đặc hiệu cho HCV được thiết kế bằng phần mềm Primer-BLAST. Cặp môi dùng cho định lượng AR-HCV (môi HCV-F và HCV-R) có khả năng khuếch đại đoạn trình tự có kích thước 237-240 bp, tùy theo genotype. Cặp môi để thiết kế AR-HCV (môi 5'UTRHindIII-F và 5'UTRHindIII-R) có trình tự tương tự như môi HCV-F và HCV-R, có gắn thêm trình tự của enzyme cắt giới hạn HindIII và 3 nucleotide phía trước ở đầu 5' trên mỗi môi, tạo sản phẩm khuếch đại có chiều dài 255 bp. Các đoạn oligonucleotide đã thiết kế được kiểm tra các đặc tính kỹ thuật bằng phần mềm AmplifX để đảm bảo hoạt động tốt cho khuếch đại trình tự mục tiêu. Cuối cùng, các oligonucleotide này được kiểm tra tính đặc hiệu lý thuyết bằng phần mềm Primer-BLAST để đảm bảo chúng chỉ bắt cặp đặc hiệu vào bộ gen HCV trên vùng gen đã thiết kế. Các môi và mẫu dò đã thiết kế được đặt tổng hợp bởi Công ty IDT. Trình tự môi và mẫu dò thiết kế được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự môi và mẫu dò thiết kế dùng trong nghiên cứu.

Môi/Mẫu dò	Trình tự (5'-3')
HCV-F	CACGCAGAAAGCGYCTAGCCATG
HCV-R	CCCTATCAGGCAGTACCACAAGGC
5'UTRHindIII-F	TTTAAGCTTCACGCAGAAAGCGYCTAGCCATG
5'UTRHindIII-R	GCAAAGCTTCCCTATCAGGCAGTACCACAAGGC
HCV probe	FAM 5'-TAGCCGAGTAGYGTGGGTGCGAAAGGC -3' TAMRA

Khuếch đại trình tự mục tiêu, tạo plasmid tái tổ hợp pAU2-HCV để tạo mẫu chuẩn armored RNA-HCV (AR-HCV)

RNA của HCV được tách chiết từ mẫu máu của bệnh nhân dương tính HCV bằng GeneJET Viral DNA/RNA Purification Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Thermo Fisher Scientific). RNA sau khi tách chiết được phiên mã ngược thành cDNA bằng RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) với các bước ủ lần lượt 5 phút ở 25°C, 60 phút ở 42°C và 5 phút ở 70°C. Sau đó cDNA được tinh sạch bằng GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). Trình tự mục tiêu được khuếch đại bằng PCR với cặp môi HCV-F và HCV-R đã được thiết

kết với chu kỳ nhiệt: 2 phút ở 94°C; tiếp theo với 30 chu kỳ gồm các bước: 30 giây ở 94°C, 30 giây ở 61°C, 30 giây ở 72°C; cuối cùng ổn định phản ứng kéo dài (extension) trong 5 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose (1%) nhuộm bằng GelRed và được tinh sạch bằng GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) rồi được cắt bằng enzyme HindIII (Thermo Fisher Scientific) ở 37°C trong 3 giờ. Sản phẩm PCR sau khi cắt được tinh sạch bằng GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific).

Plasmid BH20 được mua từ ngân hàng chủng vi sinh vật của Bỉ (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organism - BCCM). Plasmid BH20 chuyên dụng cho thiết kế AR, mang trình tự gen A mã hóa cho protein tập hợp (assembly protein) và protein vỏ (coat) của MS2 bacteriophage giúp cho sự đóng gói tạo cấu trúc virút giả (phage-like particles - PLP); và trình tự promoter T7 kiểm soát sự biểu hiện của gen mục tiêu [6]. Plasmid BH20 được cắt bằng enzyme HindIII ở 37°C trong 3 giờ, phản ứng cắt được bổ sung thêm 0,25 U CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase, NEB) nhằm ngăn cản sự tự nối lại của plasmid bằng cách loại bỏ các nhóm phosphate ở đầu 5'. Phản ứng cắt plasmid và đoạn chèn được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose (1%). Plasmid AU2 (là plasmid BH20 sau khi cắt loại bỏ vùng RT-PCR positive control DNA) được tinh sạch từ agarose gel bằng GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific). Đoạn chèn và plasmid AU2 sau khi cắt được nối với nhau bằng T4 DNA ligase sử dụng bộ kit Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Fisher Scientific), thực hiện trong 30 phút ở nhiệt độ phòng (22°C). Plasmid tái tổ hợp (pAU2-HCV) được chuyển vào tế bào *E. coli* DH5 α khả nạp bằng phương pháp hóa biến nạp. Tế bào *E. coli* DH5 α mang plasmid tái tổ hợp được chọn lọc trên đĩa môi trường LB agar có bổ sung kanamycin 50 μ g/ml và được kiểm tra vùng trình tự mục tiêu HCV bằng phản ứng PCR khuẩn lạc. Plasmid tái tổ hợp sau đó được tách chiết và tinh sạch bằng GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) từ dịch nuôi cấy khuẩn lạc tương ứng trong môi trường LB lỏng có bổ sung kanamycin 50 μ g/ml.

Biến nạp plasmid pAU-HCV vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3) và cảm ứng sự biểu hiện AR-HCV

Plasmid tái tổ hợp pAU2-HCV (sau khi được nhân lên số lượng lớn nhờ *E. coli* DH5 α) được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3) khả nạp bằng phương pháp hóa biến nạp. Tế bào vi khuẩn sau khi biến nạp được sàng lọc và kiểm tra sự hiện diện của plasmid và đoạn chèn của trình tự mục tiêu bằng PCR và giải trình tự bằng phương pháp Sanger thực hiện trên hệ thống thiết bị giải trình tự tự động 3500 (Applied Biosystems).

Tế bào vi khuẩn sau đó được tăng sinh và cảm ứng sự biểu hiện để thu nhận armored RNA HCV (AR-HCV). Tế bào vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng có chứa kanamycin 50 μ g/ml ở 37°C qua đêm. 2 ml dịch nuôi cấy được cho vào 200 ml LB lỏng chứa kanamycin 50 μ g/ml rồi được nuôi cấy ở 37°C cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,6-0,8 thì đem ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Sau đó, phần cặn tế bào được tái huyền phù trong 200 ml LB lỏng có bổ sung kanamycin 50 μ g/ml và Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) để cảm ứng sự biểu hiện. Điều kiện cảm ứng được khảo sát bao gồm các nồng độ IPTG 0,1, 0,5, 1 và 2 mM ở các nhiệt độ 30 và 37°C. Sau thời gian cảm ứng, dịch tế bào được đem ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Phần cặn được tái huyền phù trong 20 ml buffer ly giải (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 1 mM PMSF), phá màng tế bào bằng sóng siêu âm với 50% biên độ, tổng thời gian là 2 phút 30 giây. Sự biểu hiện AR-HCV được kiểm tra bằng điện di sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel (SDS-PAGE).

Tinh sạch AR-HCV

Dịch ly giải tế bào được ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C và thu lấy dịch nổi. AR-HCV sau đó được tinh sạch bằng siêu ly tâm gradient tỷ trọng sucrose 45% và sucrose 25%. Siêu ly tâm được tiến hành ở tốc độ 50000 vòng/phút trong 5 giờ ở 4°C. Phân lớp chứa AR-HCV sau siêu ly tâm được thay đổi đệm TES (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) bằng Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Merck) có kích thước màng lọc là 30 kDa, ly tâm với tốc độ 4000 vòng/phút ở 4°C với 3 lần thể tích đệm TES so với thể tích mẫu. Dịch nằm trên màng lọc sau đó được xử lý với 100 U DNase và 50 U RNase ở 37°C trong 2 giờ để loại bỏ DNA và RNA tạp nhiễm. Dịch chứa AR-HCV sau đó được chạy qua cột sắc ký lọc gel Hiload 26/600 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare) với đệm TES bằng hai lần thể tích cột theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

AR-HCV thu nhận sau mỗi bước tinh sạch được kiểm tra bằng SDS-PAGE. Gel sau khi điện di được nhuộm với Coomassie Brilliant Blue và giải nhuộm bằng destain solution (40% methanol, 10% acetic acid, 50% nước). Sự hiện diện của protein vỏ (coat protein) của bacteriophage trong mẫu AR-HCV thu nhận sau siêu ly tâm được kiểm tra bằng phương pháp Western blot sử dụng bacteriophage MS2 Coat Protein antibody (Kerafast, USA) là kháng thể sơ cấp và Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (Thermo Fisher Scientific) là kháng thể thứ cấp. Protein mục tiêu được phát hiện bằng cơ chất Pierce ECL Western blotting substrate (Thermo Fisher Scientific) và chụp hình bằng thiết bị chụp hình quang hóa ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare).

Sự hình thành cấu trúc đóng gói virút giả của AR-HCV sau khi tinh sạch được xác định bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (transmission electron microscopy - TEM) được thực hiện bởi Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Y khoa Moscow (Nga).

Định lượng AR-HCV

AR-HCV sau khi tinh sạch được định lượng bằng phương pháp real-time PCR sử dụng bộ kit COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative v2.0 (Roches), được thực hiện bởi Trung tâm Y khoa MEDIC (TP Hồ Chí Minh).

Kiểm tra tính kháng với các enzyme nuclease của AR-HCV thiết kế

Tính ổn định của AR-HCV với các enzyme nuclease được xác định bằng cách ủ 1 ml dịch chứa AR-HCV với 100 U DNase I (Thermo Fisher Scientific) và 50 U RNase A (Thermo Fisher Scientific) ở 37°C trong 2 giờ. Đối chứng là plasmid pAU2-HCV và AR-HCV được xử lý nhiệt ở 95°C trong 5 phút (xử lý nhiệt làm biến tính protein vỏ làm lộ RNA trần) [7]. Khả năng kháng các nuclease của AR-HCV được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose (1%).

Kiểm tra tính ổn định của AR-HCV trong điều kiện bảo quản

AR-HCV được pha loãng bằng đệm TES bổ sung 0,05 mg/ml bovine serum albumin (BSA) về nồng độ 1×10^5 copies/ml rồi chia nhỏ vào các tube 1,5 ml, mỗi tube chứa 1 ml mẫu. Các tube chứa AR-HCV được bảo quản ở -80°C, -20°C, 4°C và 25°C. Tính ổn định theo thời gian được xác định bằng cách định lượng AR-HCV bằng real-time PCR với cặp mồi và probe thiết kế, tại các mốc thời gian bảo quản (0, 1, 2, 3 và 6 tháng). Đối chứng là plasmid pAU2-HCV và AR-HCV được xử lý nhiệt ở 95°C trong 5 phút (RNA trần). Kết quả đo nồng độ mẫu được phân tích và xử lý bằng chương trình Excel.

Kết quả và bàn luận

Đánh giá in-silico khả năng phát hiện các genotype, subtype HCV khác nhau của cặp mồi thiết kế

Primer và probe dùng cho khuếch đại và phát hiện HCV được thiết kế trên vùng 5'UTR trên bộ gen của HCV được trình bày trong bảng 1. Phân tích trình tự bộ gen HCV đã được công bố cho thấy, vùng 5'UTR có độ bảo tồn cao ở các genotype HCV khác nhau và đó là lý do vùng này thường được dùng trong các xét nghiệm phát hiện và định lượng HCV [8]. Kết quả kiểm tra in-silico PCR sử dụng phần mềm AmpliX của cặp mồi thiết kế (HCV-F và HCV-R) cho thấy khả năng khuếch đại vùng trình tự có kích thước 237-240 bp trên vùng 5'UTR của tất cả các genotype, subtype khác nhau của HCV đã được công bố trên cơ sở dữ liệu HCV Genome Database (bảng 2).

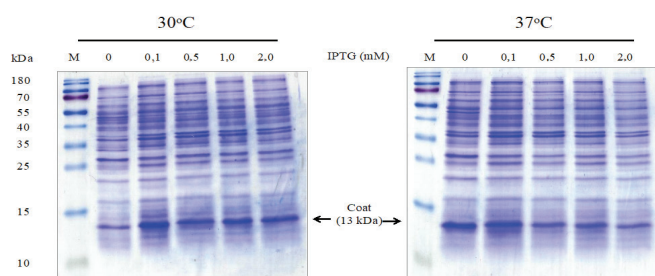
Bảng 2. Khả năng khuếch đại in-silico vùng 5'UTR của HCV sử dụng cặp mồi HCV-F và HCV-R.

Genotype/subtype	Mã trình tự (Accession No.)	Kích thước bộ gen (nucleotides)	5'UTR (nucleotides)	Sản phẩm PCR (nucleotides)
1a	M62321	9401	341	237
	M67463	9416	341	237
1b	D90208	9413	329	237
	M58335	9416	331	237
1c	D14853	9487	341	237
	AY051292	9441	341	237
2a	D00944	9589	340	237
	AB047639	9678	340	237
2b	D10988	9511	341	237
	AB030907	9654	341	237
2c	D50409	9513	340	237
2k	AB031663	9488	341	237
3a	D17763	9456	339	237
	D28917	9454	339	237
3b	D49374	9444	339	237
3k	D63821	9450	339	237
4a	Y11604	9355	279	237
5a	Y13184	9343	279	237
6a	Y12083	9340	283	240
6b	D84262	9628	342	240
6d	D84263	9615	338	237
6g	D63822	9461	338	237
6h	D84265	9621	338	237
6k	D84264	9601	338	237

Thu nhận AR-HCV

Vector biểu hiện pAU2-HCV mang đầy đủ các thông tin cần thiết để sản xuất AR-HCV. Trên vector này có trình tự mã hóa cho protein A hỗ trợ quá trình đóng gói tạo AR-HCV, trình tự mã hóa cho protein coat làm vỏ của AR-HCV và trình tự vùng 5'UTR-HCV cần đóng gói. T7 promoter với lac operator được điều khiển bởi chất cảm ứng là IPTG.

Kết quả cho thấy ở nhiệt độ 30°C, sự biểu hiện protein coat thấp khi không có chất cảm ứng IPTG, sự biểu hiện tốt nhất ở 0,1 mM IPTG và có xu hướng giảm xuống khi tăng nồng độ IPTG. Ở 37°C, nồng độ IPTG cho sự biểu hiện AR-HCV tốt nhất cũng là 0,1 mM và giảm xuống khi tăng nồng độ IPTG (hình 1). Mặc dù *E. coli* phát triển tốt nhất ở 37°C, việc giảm nhiệt độ cảm ứng xuống 30°C có thể làm giảm các phản ứng trao đổi chất không mong muốn cho sự tổng hợp các protein khác, do đó cải thiện năng suất tổng hợp protein mục tiêu. Bên cạnh đó, giảm nhiệt độ cảm ứng từ 37°C xuống 30°C cũng làm giảm đáng kể sự phân hủy protein sản phẩm, giảm sự kết tủa của protein biểu hiện vượt mức dưới dạng thể vùi (inclusion bodies) [9]. Nhìn chung, trong các điều kiện khảo sát, điều kiện tốt nhất để thực hiện cảm ứng sự biểu hiện AR-HCV là 0,1 mM IPTG ở 30°C. Kết quả này có sự tương đồng

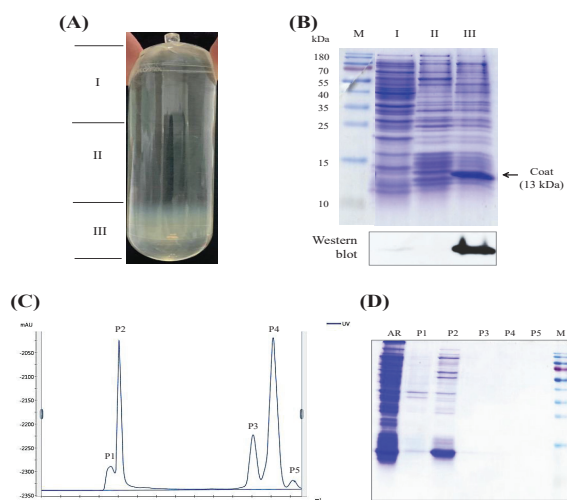


Hình 1. Kết quả điện di SDS-PAGE khảo sát điều kiện nhiệt độ và nồng độ IPTG cảm ứng sự biểu hiện AR-HCV của chủng *E. coli* BL21(DE3) sau 16 giờ nuôi cấy trong môi trường LB bổ sung IPTG.

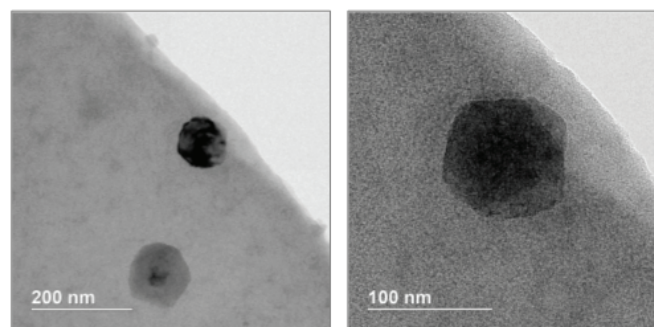
với nghiên cứu của Larentis và cộng sự (2014) [10] cho thấy điều kiện tốt nhất để thực hiện cảm ứng sự biểu hiện protein bằng IPTG trên *E. coli* BL21 (DE3) là 0,1 mM IPTG ở 28°C và nghiên cứu của Mühlmann và cộng sự (2017) [11] cho thấy nồng độ IPTG tốt nhất là 0,1 mM ở 28 và 30°C.

Tinh sạch AR-HCV

Dịch ly giải tế bào *E. coli* được siêu ly tâm gradient tỷ trọng sucrose để thu nhận AR-HCV (hình 2A). Sự hiện diện của AR-HCV trong các phân lớp được xác định bằng SDS-PAGE và Western blot (hình 2B). Kết quả cho thấy AR-HCV tập trung ở phân lớp dưới đáy. Đồng thời, quá trình siêu ly tâm cũng loại bớt một phần các protein tạp có tỷ trọng thấp hơn vào hai phân lớp trên. Phân lớp dưới được loại bỏ sucrose và thay đổi đệm TES bằng Amicon, sau đó được chạy qua cột sắc ký lọc gel (hình 2C, 2D). Để đánh giá sự đóng gói hình thành cấu trúc virút giả (phage like particle - PLP), mẫu AR-HCV sau khi tinh sạch qua sắc ký lọc gel được phân tích bằng TEM. Từ ảnh TEM có thể thấy các hạt AR-HCV tạo ra có cấu trúc nhị thập diện, kích thước 30-50 nm, tương tự với cấu trúc của thực khuẩn thể MS2 (hình 3).



Hình 2. Tinh sạch thu nhận AR-HCV. (A) Các phân lớp trong ống siêu ly tâm tỷ trọng sucrose thu nhận AR-HCV; (B) Điện di SDS-PAGE và Western blot kiểm tra sự hiện diện của coat protein trong các phân lớp sau siêu ly tâm; (C) Sắc ký đồ tinh sạch AR-HCV bằng cột lọc gel Hiload 26/600 Superdex 75 prep grade; (D) Điện di SDS-PAGE kiểm tra các phân đoạn thu được từ sắc ký lọc gel mẫu AR-HCV.



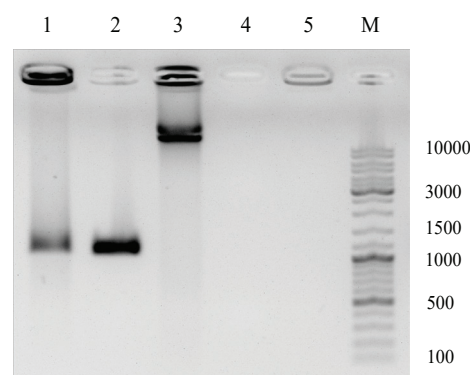
Hình 3. Cấu trúc AR-HCV nguyên vẹn sau khi tinh sạch được chụp bằng TEM.

Định lượng AR-HCV

Nồng độ AR-HCV sau tinh sạch được xác định bằng real-time PCR (sử dụng bộ kit COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative v2.0 - Roche). Bộ kit này sử dụng cặp mồi và probe để khuếch đại và phát hiện vùng 5'UTR của HCV, nằm trong vùng 5'UTR được nhân dòng để thiết kế AR-HCV, vì vậy có thể sử dụng để định lượng AR-HCV. Kết quả định lượng cho thấy đã tạo được AR-HCV hiệu quả với số lượng lớn ($1,48 \times 10^{11}$ copies/ml).

AR-HCV kháng với các nucleases

Tính kháng nuclease (DNase và RNase) của AR-HCV sau khi xử lý với các enzyme này được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose (1%) (hình 4).



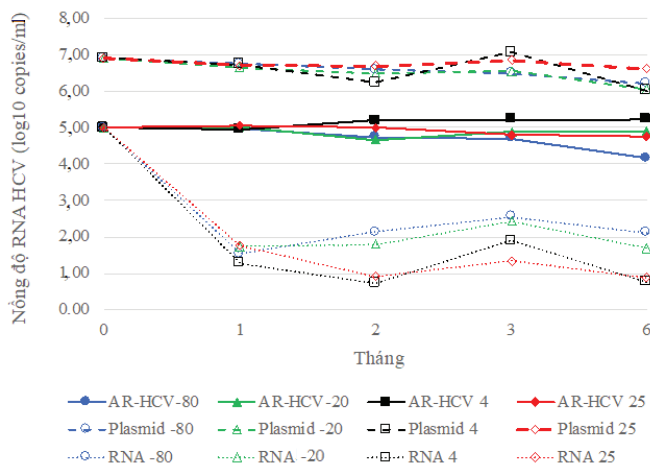
Hình 4. Kết quả điện di gel agarose (1%) kiểm tra tính kháng của AR-HCV sau khi xử lý với 100 U/ml DNase và 50 U/ml RNase ở 37°C trong 2 giờ. 1 - AR-HCV; 2 - AR-HCV xử lý với nucleases; 3 - plasmid pAU2-HCV; 4 - plasmid pAU2-HCV xử lý với nucleases; 5 - AR-HCV được xử lý nhiệt (95°C, 5 phút) và xử lý với nucleases; M - thang DNA (code SM0331, Thermo Scientific).

Kết quả điện di cho thấy chỉ có AR-HCV còn ổn định sau khi được xử lý đồng thời với DNase và RNase ở nồng độ cao, trong khi các phân tử plasmid DNA và RNA trần (AR-HCV được xử lý nhiệt ở 95°C trong 5 phút) bị phân hủy hoàn toàn sau 2 giờ xử lý (hình 4). Tính kháng lại nuclease làm cho AR-HCV trở nên ổn định, không bị phân hủy khi điều kiện bảo quản không đảm bảo sạch nuclease, vốn có ở khắp nơi trong môi trường xung quanh. Điều này đặc biệt

quan trọng đối với các mẫu chuẩn cho định lượng cần có nồng độ không hoặc rất ít thay đổi, làm tăng độ chính xác và đáng tin cậy cho kết quả định lượng. Do có đặc tính bền với các nucleases, AR-HCV có thể bổ sung trực tiếp vào mẫu máu hoặc huyết thanh, giúp kiểm soát và tăng độ chính xác của toàn bộ quy trình định lượng HCV.

AR-HCV ổn định trong điều kiện và thời gian bảo quản

Kết quả định lượng mẫu AR-HCV so sánh với mẫu plasmid (pAU2-HCV) và RNA trần (AR-HCV xử lý nhiệt ở 95°C trong 5 phút), được bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau theo thời gian được trình bày trong hình 5. Sau 6 tháng, nồng độ AR-HCV gần như không thay đổi so với ban đầu ở các điều kiện bảo quản -20°C, 4°C và 25°C, đảm bảo được tính ổn định để làm mẫu chuẩn dùng cho định lượng. Trong khi đó với mẫu RNA trần, nồng độ mẫu giảm mạnh (từ 10^5 copies/ml xuống dưới 10^2 copies/ml) ở tất cả các điều kiện bảo quản. Mẫu plasmid cũng có sự biến động và giảm nồng độ sau 6 tháng ở các điều kiện bảo quản.



Hình 5. Biểu đồ đánh giá độ ổn định của AR-HCV theo điều kiện và thời gian bảo quản.

Kết luận

Nghiên cứu đã tạo thành công mẫu chuẩn AR-HCV bằng công nghệ armored RNA có đặc tính bền và kháng tốt với nuclease. Mẫu chuẩn được tạo ra bằng cách chèn một đoạn trình tự bảo tồn thuộc vùng 5'UTR của bộ gen HCV có khả năng phát hiện các genotype, subtype khác nhau của HCV vào vector pBH20 tạo thành vector tái tổ hợp pAU2-HCV. AR-HCV được sản xuất bằng cách cảm ứng sự biểu hiện trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mang vector pAU2-HCV bằng chất cảm ứng IPTG 0,1 mM ở 30°C trong 16 giờ. Sau khi thu nhận và tinh sạch bằng siêu ly tâm tỷ trọng sucrose và sắc ký lọc gel, AR-HCV được đánh giá khả năng đóng gói RNA thành cấu trúc virut giả bằng ảnh TEM và được định lượng bằng real-time PCR với nồng độ $1,48 \times 10^{11}$ copies/ml. AR-HCV được chứng minh tính kháng với nuclease khi ủ với 100 U/ml DNase và 50 U/ml RNase trong 2 giờ và ổn

định sau 6 tháng bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau. Mẫu chuẩn AR-HCV được tạo ra từ nghiên cứu có khả năng ứng dụng trong các phương pháp sinh học phân tử như real-time PCR để định lượng HCV.

Ngoài đặc tính kháng nuclease, đảm bảo được tính ổn định của mẫu chuẩn và đảm bảo độ chính xác của xét nghiệm, armored RNA/DNA không có khả năng lây nhiễm [12], đảm bảo sự an toàn, thuận tiện trong việc bảo quản và vận chuyển (AR bền ở các điều kiện bảo quản khác nhau). Công nghệ armored RNA/DNA có nhiều tiềm năng để phát triển và ứng dụng trong tạo mẫu chuẩn, chứng nội để định lượng chính xác các tác nhân gây bệnh khác có bản chất di truyền là RNA như SARS-CoV-2, HIV cũng như DNA như HBV, baculovirus...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] WHO (2017), *Global Hepatitis Report 2017*, 83p.
- [2] L. Dunford, et al. (2012), "Hepatitis C virus in Vietnam: high prevalence of infection in dialysis and multi-transfused patients involving diverse and novel virus variants", *PLoS One*, **7(8)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0041266.
- [3] K.S. Abdelwahab, Z.N.A. Said (2016), "Status of hepatitis C virus vaccination: recent update", *World J. Gastroenterol.*, **22(2)**, pp.862-873.
- [4] C.P. Cartwright (1999), "Synthetic viral particles promise to be valuable in the standardization of molecular diagnostic assays for hepatitis C virus", *Clin. Chem.*, **45(12)**, pp.2057-2059.
- [5] D. Brown, and B.L. Pasloske (2001), "Ribonuclease-resistant RNA controls and standards", *Methods Enzymol.*, **341**, pp.648-654.
- [6] <http://bccm.belspo.be/catalogues/lmbp-plasmids-plasmid-details?NM=BH20>.
- [7] Y.J. Cheng, et al. (2006), "Preparation of His-tagged armored RNA phage particles as a control for real-time reverse transcription-PCR detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus", *J. Clin. Microbiol.*, **44(10)**, pp.3557-3561.
- [8] J. Bukh, R.H. Purcell, R.H. Miller (1992), "Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89(11)**, pp.4942-4946.
- [9] R.S. Donovan, C.W. Robinson, B.R. Glick (1996), "Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter", *Journal of Industrial Microbiol.*, **16**, pp.145-154.
- [10] A.L. Larentis, et al. (2014), "Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor", *BMC Research Notes*, **7(671)**, DOI: 10.1186/1756-0500-7-671.
- [11] M. Mühlmann, E. Forsten, S. Noack, J. Buchs (2017), "Optimizing recombinant protein expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures", *Microb. Cell Fact.*, **16(220)**, DOI: 10.1186/s12934-017-0832-4.
- [12] B.L. Pasloske, C.R. Walkerpeach, R.D. Obermoeller, M. Winkler, D.B. DuBois (1998), "Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards", *J. Clin. Microbiol.*, **36(12)**, pp.3590-3594.

Đánh giá đa dạng di truyền các quần thể cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng 20 chỉ thị phân tử microsatellite mới phát triển

Nguyễn Văn Sáng¹, Nguyễn Minh Thành², Nguyễn Hoàng Thông¹,
Trần Hoàng Gia Linh², Lê Hoàng Khôi Nguyên^{2*}, Nguyễn Hồng Lộc¹

¹Viện Nghiên cứu và Nuôi trồng Thủy sản II

²Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 3/5/2021; ngày chuyển phản biện 12/5/2021; ngày nhận phản biện 25/6/2021; ngày chấp nhận đăng 1/7/2021

Tóm tắt:

Cá Tra - *Pangasianodon hypophthalmus* là một trong những đối tượng thủy sản quan trọng mang lại giá trị xuất khẩu lớn tại Việt Nam. Nghiên cứu này sử dụng 26 chỉ thị microsatellite mới phát triển từ trình tự hệ gen cá Tra để đánh giá đa dạng di truyền 3 quần thể cá Tra tự nhiên (Biển Hồ, Cửu Long và Kratie) nhằm phục vụ cho Chương trình chọn giống cá Tra. Nghiên cứu phát hiện 6/26 locus có tần số alen ảo đáng kể và sai khác với định luật Hardy-Weinberg. Đối với 20 locus không mang alen ảo, nghiên cứu đã xác định được tổng cộng 255 alen, dao động từ 7 đến 21 alen mỗi locus, trong đó có nhiều alen đặc trưng cho quần thể. Kết quả phân tích trên 20 locus cho thấy, hệ số đa hình trung bình $PIC=0,783$; tỷ lệ dị hợp tử quan sát $H_o=0,809$; tỷ lệ dị hợp tử mong đợi $H_e=0,812$; hệ số cận huyết $F_{is}=-0,0147$ ($F_{is}<0$). Kết quả này cho thấy các quần thể cá Tra có mức độ đa dạng di truyền cao, phù hợp cho công tác chọn giống lâu dài. Kết quả phân tích AMOVA, kiểm định giá trị F_{ST} và so sánh khoảng cách di truyền D_{ST} cho thấy, 3 quần thể cá Tra có sự thay đổi mức độ phân tử nhỏ, trong đó quần thể Kratie có khoảng cách di truyền đáng kể so với hai quần thể còn lại.

Từ khóa: cá Tra, chỉ thị microsatellite, đa dạng di truyền, *Pangasianodon hypophthalmus*.

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Nghề nuôi cá Tra *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage 1878) đã rất phổ biến tại vùng Đồng bằng sông Mekong từ năm 1960 và trở thành biểu tượng cho sự phát triển của nuôi trồng thủy sản trong khu vực nhờ hệ thủy sinh đặc thù [1]. Theo Hiệp hội chế biến và xuất khẩu thủy sản Việt Nam (VASEP), riêng tại Việt Nam, trong năm 2018, cá Tra đã được xuất khẩu sang 132 thị trường trên thế giới với tổng giá trị xuất khẩu đạt 2,26 tỷ USD.

Viện Nghiên cứu và Nuôi trồng Thủy sản II (RIA2) đã tiến hành chương trình chọn giống trên cá Tra nhằm nâng cao các tính trạng tăng trưởng năm 2001 và kháng bệnh năm 2012, góp phần phát triển bền vững nghề nuôi cá Tra [2]. Các quần thể cá Tra tự nhiên được thu thập tại nhiều địa điểm khác nhau trên lưu vực sông Mekong như Đồng bằng sông Cửu Long (Việt Nam); Biển Hồ (Tonle Sap, Campuchia); thác Kratie (Campuchia). Tuy nhiên, một trong những thách thức hiện nay của chương trình là xây dựng thông tin phả hệ nhằm ước tính chính xác các thông số di truyền và kiểm soát sự cận huyết nhằm nâng cao hiệu quả chọn giống [3].

Chỉ thị microsatellite (còn gọi là SSR hay STR) là một trong những chỉ thị phân tử được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu về định danh loài, di truyền học quần thể, bản đồ di truyền và truy xuất phả hệ [4]. Các microsatellite có tính đa hình cao, đồng trội và phân bố khắp hệ gen của hầu hết các loài sinh vật nhân thực [5] và có thể được khuếch đại dễ dàng từ DNA hệ gen bằng phương pháp PCR. Tuy nhiên, cho đến năm 2019, chỉ có 5 chỉ thị phát triển trên cá Tra được tối ưu thành hai bộ PCR đa môi [6]. Việc không phát triển thành các bộ PCR đa môi khiến công đoạn khuếch đại microsatellite mất nhiều thời gian, đặc biệt với số lượng chỉ thị và số lượng mẫu lớn, đồng thời gây bất lợi cho phân tích và quản lý dữ liệu kiểu gen cá thể [7]. Hơn nữa, các phương pháp xác định alen trong các nghiên cứu trước đây (trừ nghiên cứu của So và cs (2006) [8]) như điện di gel acrylamide [9] có độ phân giải thấp và khó có thể xác định chính xác sự chênh lệch 2 nucleotide giữa các alen [10]. Điều này có thể dẫn đến kết quả sai lệch khi đánh giá đa dạng di truyền trong các nghiên cứu trên.

Những năm gần đây, phương pháp phát triển chỉ thị

*Tác giả liên hệ: Email: lkhnguyen98@gmail.com

Assessment of genetic diversity among wild populations of the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) by 20 novel microsatellite markers

Van Sang Nguyen¹, Minh Thanh Nguyen²,
Hoang Thong Nguyen¹, Hoang Gia Linh Tran²,
Hoang Khoi Nguyen Le^{2*}, Hong Loc Nguyen¹

¹Research Institute for Aquaculture No.2

²School of Biotechnology, International University,
Vietnam National University, Ho Chi Minh city

Received 3 May 2021; accepted 1 July 2021

Abstract:

The striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, is one of the most economically important aquaculture species in Vietnam. This study developed 26 novel microsatellite markers from the draft genome of the striped catfish to assess the genetic diversity of three wild populations of the striped catfish (Bien Ho, Cuu Long, and Kratie) for establishing the breeding program. The study exhibited that 6 out of 26 loci had significantly high null allele frequency and deviated from Hardy - Weinberg equilibrium; thus, they were eliminated for further analysis. Across 20 loci without null alleles, a total of 255 different alleles was identified, ranging from 7 to 21 alleles per locus, with many unique alleles for each population. The results based on 20 loci revealed the mean polymorphic information content PIC=0.783; the mean observed heterozygosity $H_o=0.809$; the mean expected heterozygosity $H_e=0.812$; inbreeding coefficient $F_{is}=-0.0147$ ($F_{is}<0$). The results indicated that the striped catfish populations have high genetic diversity and are suitable for selective breeding. The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) and comparison of genetic distances showed significant genetic differentiation among three populations while the Kratie population was distant from the others.

Keywords: genetic diversity, microsatellites, *Pangasianodon hypophthalmus*, striped catfish.

Classification number: 4.5

microsatellite với những loài đã biết trình tự hệ gen và xác định các alen của microsatellite bao gồm các bước: xác định nhanh chóng các chỉ thị bằng công cụ tin sinh học; thiết kế các cặp mồi khuếch đại vùng chứa chỉ thị hoạt động trong điều kiện PCR đồng nhất; sàng lọc và phát triển chúng thành các bộ multiplex PCR; sử dụng kỹ thuật điện di mao quản có đánh dấu huỳnh quang để phân tích đoạn DNA [7]. Chúng tôi đã áp dụng các phương pháp này và phát triển các microsatellite mới dựa vào trình tự hệ gen cá Tra đã được công bố [11]. Mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá đa dạng di truyền các quần thể cá Tra tự nhiên thuộc Chương trình chọn giống cá Tra bằng các bộ chỉ thị microsatellite mới phát triển. Đồng thời, nghiên cứu cũng thảo luận về tiềm năng ứng dụng của các chỉ thị microsatellite phục vụ công tác chọn giống nhằm phát triển bền vững nghề nuôi cá Tra ở Việt Nam.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

Tổng số 63 mẫu cá Tra từ tự nhiên theo 3 khu vực: quần thể Biển Hồ (20 mẫu) có nguồn gốc từ Biển Hồ, Campuchia; quần thể Cửu Long (22 mẫu) từ các trại giống ở Đồng bằng sông Cửu Long, thu thập từ cá bột hoặc cá trưởng thành ở tự nhiên; quần thể Kratie (21 mẫu) từ cá trưởng thành ở thác Kratie, Campuchia. Tất cả các mẫu cá này đều thuộc Chương trình chọn giống cá Tra thực hiện tại Trung tâm Quốc gia Giống thủy sản nước ngọt Nam Bộ. Các mẫu cá được bảo quản trong ethanol 80% và lưu trữ ở nhiệt độ -20°C.

Nghiên cứu sử dụng 26 chỉ thị microsatellite để phát triển thành 3 bộ PCR đa mồi bao gồm: M01 (10 chỉ thị) [12]; M02 (9 chỉ thị) và M03 (7 chỉ thị). Trình tự các mồi và thông tin cơ bản của các mồi không công bố ở đây do giới hạn độ dài của bài báo.

Phương pháp

Ly trích DNA tổng số: DNA tổng số được ly trích từ mẫu vây ngực bằng phương pháp kết tủa muối được điều chỉnh phù hợp với điều kiện tại RIA2 [12].

Khuếch đại đoạn chỉ thị bằng multiplex PCR và phân tích đoạn DNA: phản ứng multiplex PCR được thực hiện trên máy BIO-RAD S1000™ Thermal Cycler System với thể tích mỗi phản ứng 10 µl bao gồm 5 ng DNA tổng số, 5 µl Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN Multiplex PCR Kit™), hỗn hợp các mồi theo từng bộ multiplex. Điều kiện của phản ứng PCR như sau: 95°C trong 15 phút, 30 chu kỳ bao gồm 95°C trong 30 giây, 55°C trong 90 giây, 72°C trong 60 giây, và giai đoạn kéo dài cuối cùng ở 60°C trong 30 phút. Sản phẩm PCR (1 µl) được pha với 11,8 µl Hi-Di™ formamide, 0,2 µl GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard và phân tích đoạn DNA trên hệ thống điện di mao quản 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) tại Công ty TNHH

dịch vụ và thương mại Nam Khoa.

Phân tích số liệu: từng microsatellite được tiến hành xác định alen bằng phần mềm GeneMapper 5 (Applied Biosystems). Các alen ảo (null allele) được tính toán theo tần số của Chakraborty và cs (1992) [13] và kiểm tra sai khác với cân bằng Hardy-Weinberg (HWE) bằng phần mềm MICROCHECKER 2.2.3. Các tiêu chí đánh giá các locus microsatellite như hệ số đa hình (PIC), tỷ lệ dị hợp tử quan sát (H_o), tỷ lệ dị hợp tử mong đợi (H_e) được tính toán trên phần mềm Cervus 3.0.7. Các thông số đánh giá đa dạng di truyền ở mức độ quần thể như số alen thực tế (A), số alen hữu dụng (A_p), số alen hiệu quả (A_e), số alen đặc trưng (P_a), tỷ lệ dị hợp tử quan sát (H_o), tỷ lệ dị hợp tử mong đợi (H_e), hệ số cận huyết (F_{is}) được xác định trên Exel và FSTAT 2.9.4. So sánh tương quan di truyền trên cơ sở thay đổi mức độ phân tử (AMOVA) và kiểm định giá trị F_{ST} của Weir và Cockerham (1984) [14] để so sánh sự khác biệt di truyền theo phần mềm Arlequin 3.5. Biểu đồ cây di truyền theo phương pháp Neighbor-joining (NJ) được thiết lập theo khoảng cách di truyền D_{ST} của Nei (1972) [15] trên công cụ POPTREE2 với giá trị bootstrap là 1.000 lần lặp lại.

Kết quả và thảo luận

Đánh giá tính đa hình các microsatellite

Kết quả khuếch đại PCR đa môi và phân tích đoạn: kết quả khuếch đại PCR đa môi và phân tích đoạn với kích thước sản phẩm từ 101 đến 404 bp và tỷ lệ đọc kết quả khuếch đại thành công là 99,88%. Kiểm tra xác định các alen từ phần mềm MICROCHECKER 2.2.3 cho thấy, 6 locus (Pahy-02, Pahy-04, Pahy-08, Pahy-10, Pahy-20 và Pahy-27) có xuất hiện các alen ảo với tần số cao ($F_{null} > 0.06$) và sai khác đáng kể với HWE (giá trị $p < 0,05$). Do đó các microsatellite này không được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền và phân tích khác biệt di truyền giữa các quần thể. Nghiên cứu hiện tại chỉ sử dụng 20 microsatellite không có alen ảo và không sai khác với HWE cho các phân tích tiếp theo.

Kết quả đánh giá tính đa hình của 20 microsatellite: kết quả ước tính đa hình của 20 microsatellite cho các cá thể cá Tra được thể hiện ở bảng 1. Từ 63 mẫu cá Tra tự nhiên, nghiên cứu đã xác định được tổng cộng 255 alen trên 20 locus được khảo sát, dao động từ 7 alen (Pahy-01) đến 21 alen (Pahy-18), trung bình $12,75 \pm 3,97$ alen trên locus. Tất cả các locus đều có hệ số đa hình cao ($PIC > 0,5$), dao động từ 0,604 (Pahy-14) đến 0,883 (Pahy-07), tỷ lệ dị hợp tử mong đợi cao ($H_e > 0,6$), dao động từ 0,649 (Pahy-14) đến 0,899 (Pahy-07) [16]. Ngoài ra, tỷ lệ dị hợp tử trung bình H_o và H_e trên các locus không có sự sai khác đáng kể về mặt thống kê. Các kết quả này cho thấy, bộ PCR đa môi đã xác định được các microsatellite có tính đa hình cao, phù hợp cho nghiên cứu đa dạng di truyền quần thể và có tiềm năng ứng dụng vào xác định thông tin phả hệ trong các nghiên cứu sau này.

Bảng 1. Các thông số đa hình của 26 microsatellite phát triển trên cá Tra.

Locus	K	H_o	H_e	PIC	Tần số alen ảo
Pahy-02*	-	-	-	-	0,161
Pahy-04*	-	-	-	-	0,104
Pahy-10*	-	-	-	-	0,076
Pahy-08*	-	-	-	-	0,112
Pahy-20*	-	-	-	-	0,198
Pahy-27*	-	-	-	-	0,077
Pahy-01	7	0,762	0,785	0,747	0,011
Pahy-03	12	0,921	0,837	0,811	-0,052
Pahy-06	10	0,857	0,766	0,724	-0,060
Pahy-13	9	0,714	0,756	0,720	0,025
Pahy-15	14	0,746	0,765	0,728	0,009
Pahy-17	8	0,810	0,794	0,766	-0,014
Pahy-18	21	0,841	0,835	0,811	-0,008
Pahy-05	8	0,742	0,761	0,726	0,009
Pahy-07	20	0,873	0,899	0,883	0,010
Pahy-09	16	0,841	0,862	0,840	0,008
Pahy-11	15	0,921	0,871	0,851	-0,032
Pahy-14	8	0,683	0,649	0,604	-0,029
Pahy-16	11	0,794	0,794	0,761	-0,004
Pahy-19	15	0,778	0,834	0,806	0,031
Pahy-21	14	0,825	0,843	0,817	0,006
Pahy-22	15	0,825	0,858	0,836	0,015
Pahy-23	13	0,873	0,838	0,811	-0,024
Pahy-24	11	0,714	0,801	0,769	0,053
Pahy-26	11	0,810	0,818	0,787	0,001
Pahy-28	17	0,857	0,873	0,853	0,005
Trung bình	$12,75 \pm 3,97$	$0,809 \pm 0,067$	$0,812 \pm 0,057$	$0,783 \pm 0,064$	

Ghi chú: *: các locus có tần số alen ảo cao và sai khác với HWE; K: số alen trên mỗi locus; H_o : dị hợp tử quan sát; H_e : dị hợp tử mong đợi; PIC: mức độ đa hình.

Đánh giá đa dạng di truyền và so sánh cấu trúc di truyền giữa các quần thể

Đa dạng di truyền các quần thể: các thông số đánh giá đa dạng di truyền từng quần thể cá Tra trong nghiên cứu này bao gồm số alen thực tế (A), số alen hữu dụng (A_p), số alen hiệu quả (A_e), số alen đặc trưng (P_a), tỷ lệ dị hợp tử quan sát (H_o), tỷ lệ dị hợp tử mong đợi (H_e) được thể hiện trong bảng 2. Kết quả cho thấy, số alen hiệu quả (trung bình là $5,79 \pm 2,16$) thấp hơn so với số alen thực tế (trung bình là $8,62 \pm 2,84$) và số alen hữu dụng (trung bình là $8,42 \pm 2,70$) ở cả 3 quần thể cá Tra. Các quần thể đều có mức độ dị hợp tử thực tế rất cao ($H_o > 0,7$) cho thấy có nhiều biến dị di truyền xảy ra trong quần thể. Hệ số cận huyết F_{is} cho thấy quần thể Biển Hồ có hiện tượng cận huyết nhẹ ($0 < F_{is} = 0,0133 < 0,03$), trong khi hai quần thể còn lại có giá trị cận huyết âm (lần lượt là -0,0574 và -0,0001 với quần thể Cửu Long và Kratie). Điều này có thể giải thích vì sao quần thể Biển Hồ

có $H_0 < H_c$, mặc dù về mặt thống kê là không đáng kể (kiểm định student, t-test, trung bình 2 mẫu độc lập với giá trị $p=0,656>0,05$). Các thông số di truyền cũng cho thấy quần thể Cửu Long có mức độ đa dạng di truyền thấp nhất với chỉ 13 alen đặc trưng, trong khi đó quần thể Kratie có mức độ đa dạng di truyền cao nhất với 65 alen đặc trưng.

So với nghiên cứu của So và cs (2006) [8] bằng 7 chi thị microsatellite cũ trên 567 mẫu cá Tra thuộc 10 khu vực thu mẫu, các quần thể trong nghiên cứu này có số lượng alen hữu dụng trung bình (A_r) thấp hơn (8,42 so với 9,9); tuy nhiên lại có tỷ lệ dị hợp tử mong đợi trung bình (H_e) cao hơn (0,800 so với 0,773) và hệ số cận huyết F_{is} thấp hơn (-0,0147 so với 0,041). Nghiên cứu đã giải thích rằng, các chi thị cũ có tần số alen ảo cao (5 trên 7 chi thị), dẫn đến sự sai khác so với HWE và tỷ lệ đồng hợp tử ảo cao hoặc do bản thân các quần thể có xảy ra hiện tượng cận huyết hoặc do sự trộn lẫn các mẫu từ các quần thể khác nhau (hiệu ứng Wahlund). Do đó, chúng tôi nhận thấy các microsatellite có tần số alen ảo và tỷ lệ đồng hợp tử ảo cao, sai khác với HWE không nên sử dụng trong các nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền quần thể.

Bảng 2. Đặc điểm đa dạng di truyền của 3 quần thể cá Tra.

Quần thể	N	A	A_r	A_e	H_0	H_e	P_a	F_{is}
Biển Hồ	20	8,35±2,01	8,22±1,94	5,1±1,62	0,778±0,099	0,789±0,065	22	0,0133
Cửu Long	22	7,00±2,41	6,81±2,26	4,71±1,88	0,790±0,132	0,756±0,107	13	-0,0574
Kratie	21	10,50±2,95	10,23±2,76	7,43±1,96	0,855±0,070	0,85±0,042	65	-0,0001
Tất cả	63	8,62±2,84	8,42±2,70	5,79±2,16	0,808±0,106	0,800±0,086		-0,0147

Ghi chú: N: số mẫu nghiên cứu; A: số alen quan sát; A_r : số alen hữu dụng; A_e : số alen hiệu quả; H_0 : dị hợp tử quan sát; H_e : dị hợp tử mong đợi; P_a : số alen đặc trưng; F_{is} : hệ số cận huyết.

Phân tích AMOVA giữa các quần thể: phân tích mức độ thay đổi phân tử AMOVA (bảng 3) cho thấy mức độ thay đổi phân tử rất thấp giữa các quần thể (2,3%) và rất cao giữa tất cả các cá thể (99,0%). Điều này cho thấy mối quan hệ di truyền gần gũi giữa các cá thể cá Tra trên các lưu vực khác nhau của sông Mekong và có thể giải thích bởi tập tính di cư và vùng sinh sống rộng của cá Tra [17] với lượng cá thể rất lớn ($20-30 \times 10^6$) [18]. Tuy nhiên, giữa các quần thể cá Tra đã có sự thay đổi di truyền đáng kể (giá trị $p<0,05$). Kết quả này khác với nghiên cứu của So và cs (2006) [8] khi đánh giá các quần thể cá thể cá Tra trên cùng khu vực nghiên cứu không có sự khác biệt đáng kể về di truyền.

Bảng 3. Phân tích mức độ thay đổi phân tử AMOVA giữa 3 quần thể cá Tra.

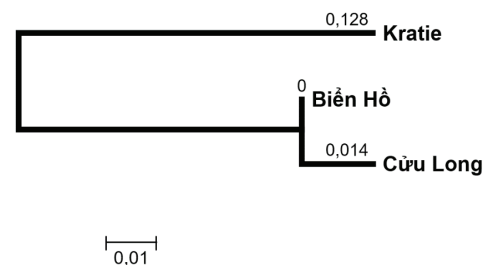
Nguồn biến động	Độ tự do	Tổng bình phương	Thành phần biến động	Phần trăm biến động	Chỉ số cố định	Giá trị p
Giữa các quần thể	2	31,6	0,189	2,3	0,023 (F_{ST})	<0,05
Giữa các cá thể trong quần thể	60	473,2	-0,101	-1,3	-0,013 (F_{IS})	0,387
Giữa các cá thể	63	509,5	8,093	99,0	0,01 (F_{IT})	0,806
Tổng	125	1014,3	8,181			

Khoảng cách di truyền và biểu đồ cây di truyền Neighbor-Joining: giá trị F_{ST} của Weir và Cockerham (1984) giữa các cặp quần thể (bảng 4) từ 0,002 (Biển Hồ - Cửu Long) đến 0,038 (Cửu Long - Kratie) và đều có giá trị $F_{ST}<0,05$, đồng nghĩa với việc các cặp quần thể đều có sai khác di truyền nhỏ. Tuy vậy, sự sai khác di truyền giữa cặp quần thể Biển Hồ - Kratie và Cửu Long - Kratie có ý nghĩa thống kê (giá trị $p<0,05$), trong khi cặp quần thể Biển Hồ - Cửu Long lại không có sai khác di truyền đáng kể. Biểu đồ NJ dựa trên khoảng cách di truyền D_{ST} của Nei (hình 1) thể hiện rõ mối quan hệ di truyền của 3 quần thể cá Tra được nghiên cứu. Trong đó quần thể Kratie có khoảng cách di truyền xa nhất, tách biệt so với mối quan hệ gần gũi giữa cặp quần thể Biển Hồ - Cửu Long, đồng thời có mối quan hệ gần hơn với quần thể Biển Hồ so với quần thể Cửu Long.

Bảng 4. Giá trị F_{ST} (góc dưới) và khoảng cách di truyền D_{ST} (góc trên) giữa các cặp quần thể cá Tra.

	Biển Hồ	Cửu Long	Kratie
Biển Hồ	-	0,002	0,116
Cửu Long	0,002	-	0,142
Kratie	0,026*	0,038*	-

*Khác biệt có ý nghĩa với giá trị $p<0,05$.



Hình 1. Biểu đồ cây di truyền NJ theo khoảng cách di truyền D_{ST} của Nei trên 3 quần thể cá Tra.

Dựa vào kết quả phân tích AMOVA, kiểm định giá trị F_{ST} và khoảng cách di truyền D_{ST} giữa các cặp quần thể có thể thấy đã có sự khác biệt di truyền giữa 3 quần thể. Quần thể Kratie có mức độ đa dạng di truyền cao và khác biệt so với quần thể Biển Hồ và Cửu Long. Kết quả này cho thấy, mặc dù quần thể Biển Hồ và Cửu Long có nguồn gốc từ tự nhiên nhưng đã được thu thập về các trại giống làm cá bố mẹ. Các trại giống có thể quản lý đàn cá bố mẹ không chặt chẽ khiến cho các quần thể này suy giảm mức độ đa dạng di truyền và dần có sự khác biệt di truyền so với quần thể Kratie còn hoang dã. Tuy vậy, quần thể Biển Hồ và Cửu Long vẫn còn an toàn vì vẫn duy trì mức độ đa dạng di truyền cao, chưa xảy ra hiện tượng cận huyết đáng kể và còn tồn tại các alen đặc thù. Do đó, Chương trình chọn giống cá Tra đang thực hiện tại Viện Nghiên cứu và Nuôi trồng Thủy sản II đã sử dụng nguồn vật liệu từ cả 3 quần thể này hình thành quần thể gốc cho chọn giống là hợp lý.

Kết luận

Nghiên cứu hiện tại đã xác định được 20 chỉ thị đa hình trong số 26 chỉ thị microsatellite mới được phát triển dựa vào hệ gen của cá Tra để đánh giá và so sánh đa dạng di truyền các quần thể cá Tra tự nhiên được sử dụng trong Chương trình chọn giống cá Tra. Kết quả phân tích các microsatellite cho thấy, các quần thể cá Tra có mức đa dạng di truyền cao, phù hợp để sử dụng cho Chương trình chọn giống. Ngoài ra, bộ chỉ thị mới cũng cho thấy nhiều ưu điểm so với các chỉ thị đã công bố trước đây và có tiềm năng ứng dụng trong các nghiên cứu về di truyền phân tử cá Tra trong tương lai.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Chương trình VLIR-UOS South Initiatives, mã số SI-2019-01-26. Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn đến GS. Filip Volckaert và ông Bart Hellemans - Laboratory of Biodiversity and Evolutionary Genomics (LBEG), Department of Biology, Faculty of Sciences, KU Leuven (Bỉ) với những hỗ trợ về công nghệ và kỹ thuật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] L.T. Phan, T.M. Bui, T.T.T. Nguyen, G.J. Gooley, B.A. Ingram, B.A. Nguyen, P.T. Nguyen, S.S. De Silva (2009), "Current status of farming practices of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* in the Mekong Delta, Vietnam", *Aquaculture*, **296**(3-4), pp.227-236.

[2] V.S. Nguyen, G. Klemetsdal, J. Ødegård, H. Gjøen (2012), "Genetic parameters of economically important traits recorded at a given age in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)", *Aquaculture*, **344-349**(12), pp.82-89.

[3] Q. Liu, F. Cui, P. Hu, G. Yi, Y. Ge, W. Liu, H. Yan, L. Wang, H. Liu, J. Song, Y. Jiang, L. Zhang, X. Tu (2018), "Using of microsatellite DNA profiling to identify hatchery-reared seed and assess potential genetic risks associated with large-scale release of swimming crab *Portunus trituberculatus* in Panjin, China", *Fisheries Research*, **207**, pp.187-196.

[4] N. Mittal, A. Dubey (2009), "Microsatellite markers - A new practice of DNA based markers in molecular genetics", *Pharmacogenosy Reviews*, **3**, pp.235-246.

[5] Y. Kelkar, N. Strubczewski, S. Hile, F. Chiaromonte, K. Eckert, K. Makova (2010), "What is a microsatellite: A computational and experimental definition based upon repeat mutational behavior at A/T and GT/AC repeats", *Genome Biology and Evolution*, **2**, pp.620-635.

[6] M.T. Nguyen, N.T.P. Le, T.L. Nguyen, A.L. Duong (2019), "Parentage assignment in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) based on microsatellite markers", *The Israel Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, **IJA_71.2019.1605**, p.9.

[7] E. Guichoux, L. Lagache, S. Wagner, P. Chaumeil, P. Leger, O. Lepais, C. Lepoittevin, T. Malausa, E. Revardel, F. Salin, R.J. Petit (2011), "Current trends in microsatellite genotyping", *Mol. Ecol. Resour.*, **11**(4), pp.591-611.

[8] N. So, G.E. Maes, F.A.M. Volckaert (2006), "High genetic diversity in cryptic populations of the migratory sutchi catfish *Pangasianodon hypophthalmus* in the Mekong River", *Heredity*, **96**(2), pp.166-174.

[9] Bùi Thị Liên Hà, Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Văn Hào, David Hurwood, Peter Mather (2011), "Bước đầu đánh giá đa dạng di truyền quần đàn cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) có nguồn gốc tự nhiên từ các trại giống và chương trình chọn giống ở Việt Nam", *Tuyển tập Nghề cá sông Cửu Long*, tr.13-23.

[10] X. Wang, T.A. Rinchart, P.A. Wadl, J.M. Spiers, D. Hadziabdic, M.T. Windham, R.N. Trigiano (2009), "A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles", *African Journal of Biotechnology*, **8**(11), pp.2432-2436.

[11] O.T.P. Kim, P.T. Nguyen, E. Shoguchi, K. Hisata, T.T.B. Vo, J. Inoue, C. Shinzato, B.T.N. Le, K. Nishitsuji, M. Kanda, V.H. Nguyen, H.V. Nong, N. Satoh (2018), "A draft genome of the striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, for comparative analysis of genes relevant to development and a resource for aquaculture improvement", *BMC Genomics*, **19**(1), p.733.

[12] Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Minh Thành, Nguyễn Hồng Lộc, Nguyễn Hoàng Thông, Lê Hoàng Khôi Nguyên (2013), "Kết quả bước đầu phát triển bộ chỉ thị microsatellite mới từ hệ gen cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng công cụ tin sinh học", *Tạp chí Nghề cá sông Cửu Long*, **18**, tr.14-22.

[13] R. Chakraborty, M. De Andrade, S.P. Daiger, B. Budowle (1992), "Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications", *Annals of Human Genetics*, **56**, pp.45-47.

[14] B.S. Weir, C.C. Cockerham (1984), "Estimating F-statistics for the analysis of population structure", *Evolution*, **38**, pp.1358-1370.

[15] M. Nei (1972), "Genetic distance between populations", *The American Naturalist*, **106**(949), pp.283-292.

[16] D. Botstein, R.L. White, M. Skolnick, R.W. Davis (1980), "Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms", *American Journal of Human Genetics*, **32**(3), pp.314-331.

[17] S.T. Touch (2000), *Life cycle of Pangasianodon hypophthalmus and the impact of catch and culture*, Paper presented at the Catfish Asia Conference, Bogor, Indonesia.

[18] N. So, T. Nao. (1999), *National aquaculture development review (1984-1999) and aquaculture development plan (2000-2020)*, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Phnom Penh, Cambodia.

Yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi (*Oreochromis* sp.) nuôi nước ngọt

Trương Thị Mỹ Hạnh^{1*}, Phan Thị Vân¹, Lê Thị Mỹ¹, Nguyễn Hữu Nghĩa¹,
Võ Văn Nha², Nguyễn Đình Xuân Quý³, Đặng Thị Lệ¹

¹Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1

²Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 3

³Trung tâm Khảo nghiệm, Kiểm nghiệm, Kiểm định nuôi trồng thủy sản Vùng I

Ngày nhận bài 28/4/2021; ngày chuyển phản biện 3/5/2021; ngày nhận phản biện 7/6/2021; ngày chấp nhận đăng 21/6/2021

Tóm tắt:

Các yếu tố nguy cơ liên quan đến sự xuất hiện của bệnh Streptococcosis ở cá rô phi nuôi nước ngọt tại các tỉnh Hải Dương, Bắc Giang, An Giang, Vĩnh Long và Đồng Tháp được xác định dựa trên kết quả thu được từ hoạt động quan trắc chủ động, theo dõi, phân tích một số thông số môi trường và sự xuất hiện bệnh ở cá rô phi trong khoảng thời gian 2012-2019. Kết quả nghiên cứu cho thấy, $\text{NO}_2\text{-N} > 0,25$ mg/l là mối nguy lớn nhất liên quan đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi với tỷ suất chênh $\text{OR} = 37,4$; tiếp đến lần lượt là các yếu tố nhiệt độ $\geq 30^\circ\text{C}$ ($\text{OR} = 16,5$), $\text{H}_2\text{S} > 0,02$ mg/l ($\text{OR} = 10$), $\text{NH}_3 > 1$ mg/l ($\text{OR} = 8,2$), mật độ *Streptococcus* spp. ≥ 1000 cfu/ml ($\text{OR} = 6,9$) và thấp nhất là $\text{pH} > 8,5$ ($\text{OR} = 2,5$). Nhu cầu oxy hóa học (COD) > 10 mg/l và $\text{NH}_4\text{-N} > 1$ mg/l là 2 yếu tố được xác định có tính tương quan dương nhưng không phải là yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi. Phân tích kết quả các yếu tố oxy hòa tan (DO), mật độ *Aeromonas* spp. và vi khuẩn hiếu khí tổng số cho thấy chúng không có tính tương quan và không phải là yếu tố nguy cơ liên quan đối với bệnh Streptococcosis ở cá rô phi.

Từ khóa: cá rô phi, nước ngọt, Streptococcosis, yếu tố nguy cơ.

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Cá rô phi (*Oreochromis* sp.) là một trong những loài cá nuôi quan trọng ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, đặc biệt gần đây cá rô phi được xem như nguồn thực phẩm của thế kỷ XXI [1]. Tổng sản lượng cá rô phi tăng nhanh từ 1,27 triệu tấn năm 2000 lên 3,6 triệu tấn năm 2014, 5,55 triệu tấn năm 2016 [2, 3] và dự kiến sẽ tăng lên 7,3 triệu tấn vào năm 2030 [4, 5]. Đóng góp chính cho sản lượng cá rô phi toàn cầu là Trung Quốc với mức 1,75 triệu tấn, tiếp theo là Indonesia (hơn 1,1 triệu tấn), Ai Cập (0,87 triệu tấn), Bangladesh (0,32 triệu tấn) và Việt Nam (0,28 triệu tấn) [6].

Bệnh do liên cầu khuẩn (Streptococcosis) gây ra hiện tượng xuất huyết, lồi mắt, tỷ lệ chết cao, gây thiệt hại nghiêm trọng về kinh tế, ảnh hưởng đến sản lượng cá rô phi trên toàn thế giới [7-9]. Tác nhân gây bệnh Streptococcosis ở cá rô phi đã được xác định có 3 chủng chính bao gồm *S. agalactiae* Biotype 1, *S. agalactiae* Biotype 2 và *S. iniae* [8, 10]. Ở Trung Quốc, dịch bệnh do *S. agalactiae* đã xảy ra ở nhiều vùng nuôi cá rô phi, gây chết 50-70% vào năm 2009 [11], thiệt hại 40 triệu USD tương ứng tỷ lệ chết trên 80% vào năm 2011 [12]. Ở Việt Nam, hiện đã ghi nhận *S. agalactiae* gây chết cá rô phi hàng loạt (80-90%) ở các tỉnh Bắc Ninh, Bắc Giang, Hải Dương, Hà Nội vào năm 2009 [13], Quảng Ninh và Hải Dương năm 2015 [14] và Hà Tĩnh năm 2016 [15].

*Tác giả liên hệ: Email: tmhanh@ria1.org

Các nghiên cứu liên quan đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi đã được quan tâm và triển khai như đề tài “Nghiên cứu miễn dịch cá rô phi và phát triển vắc xin bất hoạt cho bệnh *S. agalactiae* trên cá rô phi”, “Sản xuất thử nghiệm vắc xin phòng bệnh Streptococcosis trên cá rô phi quy mô công nghiệp”. Bên cạnh đó, chúng ta cũng đã đạt được một số kết quả trong phương pháp chẩn đoán bệnh, mô tả biểu hiện bệnh lý, biến đổi mô học... [16], song các nghiên cứu này chỉ thực hiện giải quyết khi bệnh đã xảy ra. Hoạt động giám sát, quan trắc môi trường, bệnh ở vùng nuôi cá rô phi tập trung đã được triển khai, tuy nhiên do còn nhiều hạn chế trong nghiên cứu xác định yếu tố nguy cơ liên quan đến bùng phát dịch bệnh nên việc cảnh báo bệnh chưa kịp thời. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định các yếu tố nguy cơ và đánh giá mức độ liên quan của các yếu tố này đến sự bùng phát bệnh Streptococcosis ở cá rô phi. Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học để dự báo sớm khả năng xuất hiện bệnh ở cá rô phi và đưa ra các giải pháp phòng, trị bệnh Streptococcosis hiệu quả hơn trong thời gian tới.

Phương pháp nghiên cứu

Thu thập số liệu

Thu thập số liệu của nhiệm vụ quan trắc môi trường, giám sát dịch bệnh ở cá rô phi giai đoạn 2012-2019 từ Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1, các Chi cục Thủy sản Hải

Risk factors related to Streptococcosis disease of tilapia in freshwater aquaculture

Thi My Hanh Truong^{1*}, Thi Van Phan¹, Thi May Le¹,
Huu Nghia Nguyen¹, Van Nha Vo²,
Dinh Xuan Quy Nguyen³, Thi Lua Dang¹

¹Research Institute for Aquaculture No 1

²Research Institute for Aquaculture No 3

³Aquaculture Surveying, Testing and Accreditation Center Branch I

Received 28 April 2021; accepted 21 June 2021

Abstract:

The risk factors related to the occurrence of Streptococcosis disease in cultured freshwater tilapia in Hai Duong, Bac Giang, An Giang, Vinh Long, and Dong Thap provinces, were determined based on results obtained by proactive monitoring approach, including observing and analysing water quality and disease occurrence in tilapia during the period 2012 to 2019. The results showed that $\text{NO}_2\text{-N} > 0.25 \text{ mg/l}$ is the most risk related to Streptococcosis disease in tilapia with odds ratio $\text{OR} = 37.4$, followed by temperature $\geq 30^\circ\text{C}$ ($\text{OR} = 16.5$), $\text{H}_2\text{S} > 0.02 \text{ mg/l}$ ($\text{OR} = 10$), $\text{NH}_3 > 1 \text{ mg/l}$ ($\text{OR} = 8.2$), the density of *Streptococcus* spp. $\geq 1000 \text{ cfu/ml}$ ($\text{OR} = 6.9$), and the lowest was $\text{pH} > 8.5$ ($\text{OR} = 2.5$). Chemical oxygen demand ($\text{COD} > 10 \text{ mg/l}$), $\text{NH}_4\text{-N} > 1 \text{ mg/l}$ are positively correlated, but not risk factors related to Streptococcosis in tilapia. Dissolved oxygen (DO), *Aeromonas* spp., and total aerobic bacteria density in cultured water were not correlated and associated with the appearance of Streptococcosis in tilapia.

Keywords: freshwater, risk factors, Streptococcosis, tilapia.

Classification number: 4.5

Duong, Bắc Ninh và Trung tâm Khảo nghiệm, Kiểm nghiệm, Kiểm định nuôi trồng thủy sản Vùng I tại An Giang, Vĩnh Long và Đồng Tháp. Số liệu thu thập bao gồm các yếu tố nhiệt độ, pH, DO, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, H_2S , COD, NH_3 , mật độ *Streptococcus* spp., *Aeromonas* spp., vi khuẩn hiếu khí tổng số và *S. agalactiae* gây Streptococcosis trên cá rô phi.

Phương pháp thu mẫu: mẫu nước phân tích chỉ tiêu $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, H_2S , COD, NH_3 , mật độ *Streptococcus* spp., *Aeromonas* spp., vi khuẩn hiếu khí tổng số được thu chứa trong chai nhựa. Nước được thu tại 3 vị trí theo đường chéo của ao. Tất cả các mẫu đều được ghi chú cẩn thận và được

giữ lạnh ($4\text{-}8^\circ\text{C}$) trong suốt quá trình vận chuyển đến khi phân tích. Tại phòng thí nghiệm, các thông số nêu trên được phân tích theo phương pháp chuẩn. Hàm lượng $\text{NH}_4\text{-N}$ và NH_3 phân tích theo SMEWW 4500-NH₃ F:2011. Phân tích $\text{NO}_2\text{-N}$ theo phương pháp SMEWW 4500-NO₂ B: 2011. Hàm lượng H_2S phân tích theo phương pháp SMEWW 4500-S₂-D:2011 và COD phân tích theo SMEWW 5220 C:2011. Mật độ *Streptococcus* spp., *Aeromonas* spp., vi khuẩn hiếu khí tổng số được định lượng theo phương pháp Buller (2004). Xác định *S. agalactiae* ở cá rô phi bằng nuôi cấy giám định loài bằng test API 20Strep. Ngoài ra, chỉ số pH, DO, nhiệt độ được đo tại hiện trường bằng máy YSI Pro 1020.

Tần suất thu mẫu bao gồm định kỳ 1 lần/tháng và đột xuất khi có biểu hiện cá bệnh ở mô hình ao nuôi bán thâm canh.

Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS 23, trong đó mô hình hồi quy đa biến logistic được dùng để phân tích sự tác động của nhiều yếu tố nguy cơ lên sự xuất hiện bệnh do *S. agalactiae* ở cá rô phi. Biến nhị phân phụ thuộc là kết quả xét nghiệm đối với mầm bệnh *S. agalactiae* gây Streptococcosis (có/không có) trên các mẫu cá rô phi. Biến độc lập bao gồm nhiệt độ, pH, DO, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, H_2S , COD, NH_3 , mật độ *Streptococcus* spp., *Aeromonas* spp. và vi khuẩn hiếu khí tổng số. Kết quả phân tích chỉ ra giá trị hệ số tương quan (r) giữa biến phụ thuộc với biến độc lập và sự sai khác có ý nghĩa hay không có ý nghĩa (p). Theo đó, nếu r càng tiến về 1 và -1 thì tương quan tuyến tính càng mạnh, càng chặt chẽ. Tiến về 1 là tương quan thuận và tiến về -1 là tương quan nghịch; r càng gần 0 thì tương quan tuyến tính càng yếu và $r=1$ là tương quan tuyến tính tuyệt đối, $r=0$ là không có mối tương quan tuyến tính. $p < 0,05$ có sự khác biệt ý nghĩa thống kê và $p > 0,05$ không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê.

Kế thừa kết quả phân tích nêu trên, yếu tố độc lập nào trong mô hình có tương quan với yếu tố phụ thuộc (bệnh do *S. agalactiae*) sẽ được thực hiện phân chia khoảng giá trị để tiếp tục thực hiện phân tích khoảng giá trị (chi tiết nêu ở bảng 1) của mỗi yếu tố độc lập có hay không tương quan với yếu tố phụ thuộc. Qua đó xác định yếu tố phụ thuộc sẽ có vùng phơi nhiễm (vùng tương quan $p < 0,05$) và không phơi nhiễm (vùng không tương quan $p > 0,05$). Đây là cơ sở để phân tích OR (Odd ratio - tỷ suất chênh), giá trị của yếu tố nguy cơ gây bệnh.

Tỷ suất chênh OR chỉ đánh giá mức độ liên quan giữa yếu tố nguy cơ và bệnh, không có ý nghĩa về việc tính xác suất có bệnh [17].

$\text{OR} = \frac{\text{Số chênh nhóm phơi nhiễm}}{\text{Số chênh nhóm không phơi nhiễm}} = \frac{(O_1/O_2)}{(a/b)(c/d)} = \frac{(a*d)}{(c*d)}$.

Trong đó: a: phơi nhiễm có bệnh; b: phơi nhiễm không bệnh; c: không phơi nhiễm bị bệnh; d: không phơi nhiễm không bệnh.

$$KTC\ 95\% = \exp[\ln(OR) \pm SE]$$

$$SE = \sqrt{1/a + 1/b + 1/c + 1/d}$$

Cách đánh giá giá trị của OR căn cứ vào giá trị thực:

OR<1: không có sự kết hợp nào giữa bệnh, sự phơi nhiễm hay yếu tố nguy cơ.

OR=1: yếu tố nguy cơ không có liên quan đến bệnh.

OR>1: có sự kết hợp giữa bệnh với sự phơi nhiễm, OR càng lớn thì sự kết hợp này càng mạnh.

Bảng 1. Khoảng giá trị các yếu tố phân tích nguy cơ tiềm năng liên quan đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi.

Chỉ tiêu	Đơn vị tính	Khoảng giá trị	Phân tích tương quan	Phân tích nguy cơ	Khoảng phù hợp nuôi thủy sản
Nhiệt độ	°C	≥30	x	x	
		20-30	x	x	x ⁽³⁾
		<20	x		
pH		6,5-8,5	x	x	x ⁽¹⁾
		>8,5	x	x	
		<6,5	x		
NH ₃	mg/l	>1	x	x	
		≤0,1	x		x ⁽³⁾
		0,1-1	x	x	
NH ₄ -N	mg/l	<1	x		x ⁽¹⁾
		≥1	x	x	
NO ₂ -N	mg/l	>0,25	x	x	
		≤0,05	x		x ⁽²⁾
		>0,05	x	x	
COD	mg/l	<10	x	x	x ⁽²⁾
		≥10	x		
H ₂ S	mg/l	<0,02	x		x ⁽³⁾
		≥0,02	x	x	
Mật độ <i>Streptococcus</i> spp.	cfu/ml	≤100	x		
		>100	x		
		≥1000	x	x	
		<1000	x		

Ghi chú: ⁽¹⁾: theo QCVN 02-22:2015/BNNPTNT; ⁽²⁾: theo QCVN 08:2015/ BTNMT; ⁽³⁾: theo QCVN 02-26:2017/BNNPTNT.

Kết quả và thảo luận

Yếu tố thủy lý, thủy hóa có nguy cơ liên quan đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi

Mối liên quan một số yếu tố thủy lý hóa đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi: phân tích tương quan giữa các yếu tố độc lập với yếu tố phụ thuộc trong mô hình lựa chọn cho thấy, bệnh do *S. agalactiae* ở cá rô phi có mối liên quan chặt chẽ với 7 yếu tố độc lập trong mô hình bao gồm: pH, nhiệt độ, NO₂-N, H₂S, COD, NH₃, NH₄-N với r=0,332-0,888 (r>0) cho thấy sự tương quan thuận giữa hai

biến, nếu giá trị biến này tăng sẽ làm tăng giá trị của biến kia, đồng thời mối tương quan của 7 yếu tố trên có ý nghĩa với p=0,000-0,027<0,05 (bảng 2). Bên cạnh đó, trong mô hình có yếu tố DO không có mối tương quan với yếu tố phụ thuộc, minh chứng với giá trị p=0,2>0,05. Với kết quả có được, cho phép nghiên cứu tiếp tục phân tích chia khoảng giá trị của các yếu tố độc lập để xác định được khoảng giá trị tương quan và không tương quan với bệnh Streptococcosis ở cá rô phi. Theo đó, khoảng giá trị tương quan là khoảng giá trị phơi nhiễm bệnh của cá rô phi và ngược lại khoảng giá trị không tương quan là khoảng giá trị không phơi nhiễm bệnh Streptococcosis ở cá rô phi.

Bảng 2. Tương quan giữa biến độc lập và biến phụ thuộc trong mô hình

Yếu tố xét trong mô hình	Bệnh do <i>S. agalactiae</i> gây ra ở cá rô phi			
	N	Hệ số tương quan (r)	Giá trị p	Kết quả tương quan
pH	1045	0,387	0,014	Có
Nhiệt độ	1009	0,761	0,000	Có
DO	1040	0,149	0,2	Không
NO ₂ -N	1041	0,812	0,000	Có
H ₂ S	962	0,782	0,000	Có
COD	1043	0,448	0,045	Có
NH ₃	704	0,888	0,000	Có
NH ₄ -N	764	0,332	0,027	Có

Ghi chú: bệnh do Streptococcosis ở cá rô phi là biến phụ thuộc vào nhiệt độ, pH, DO, NH₄-N, NO₂-N, H₂S, COD, NH₃, N: tổng số mẫu phân tích.

Giá trị của yếu tố thủy lý hóa có nguy cơ liên quan đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi: kết quả bảng 3 cho thấy, nhiệt độ<20°C, NO₂-N≤0,05 mg/l, H₂S≤0,02 mg/l, COD≤10 mg/l, pH<6,5 và NH₄-N, NH₃≤0,01 mg/l là điều kiện môi trường sống cá rô phi không phơi nhiễm với bệnh Streptococcosis. Trong điều kiện còn lại, nhiệt độ ≥20°C, pH>6,5, NO₂-N>0,05 mg/l, H₂S>0,02 mg/l, COD>10 mg/l, NH₄-N, NH₃>0,01 mg/l là khoảng môi trường phơi nhiễm bệnh Streptococcosis của cá rô phi (bảng 3).

Bảng 3. Tương quan giữa giá trị biến độc lập và biến phụ thuộc trong mô hình.

Yếu tố	Đơn vị tính	Giá trị	Bệnh do <i>S. agalactiae</i> gây ra ở cá rô phi				
			N	Hệ số tương quan (r)	Giá trị p	Kết quả tương quan	Phơi nhiễm bệnh
pH		<6,5	12	0,331	0,294	Không	x
		6,5-8,5	349	0,496	0,000	Có	x
		>8,5	57	0,306	0,021		
Nhiệt độ	°C	<20	13	-0,513	0,061	Không	x
		20-30	179	0,243	0,001	Có	x
		≥30	329	0,464	0,000		

NO ₂ -N	mg/l	>0,25	177	0,476	0,000	Có	x
		≤0,05	577	0,076	0,67	Không	x
		>0,05	452	0,412	0,000	Có	x
H ₂ S	mg/l	>0,02	553	0,432	0,000	Có	x
		≤0,02	350	-0,094	0,077	Không	x
COD	mg/l	≤10	416	0,072	0,144	Không	x
		>10	603	0,136	0,001	Có	x
NH ₃	mg/l	≤0,1	285	0,112	0,589	Không	x
		>1	94	0,289	0,005	Có	x
		0,1-1	322	0,143	0,01		
NH ₄ -N	mg/l	≤0,1	147	-0,042	0,617	Không	x
		>0,1	608	0,221	0,000	Có	x
		>1	73	0,005	0,009		

Ghi chú: N: tổng số mẫu phân tích.

Khoảng giá trị phơi nhiễm và không phơi nhiễm là cơ sở để phân tích yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi. Kết quả phân tích cho thấy, trong điều kiện pH≤8,5 sẽ giảm nguy cơ cá nhiễm bệnh Streptococcosis 2,5 lần so với điều kiện pH>8,5 (bảng 4). Kết quả này là tương đồng với kết quả nghiên cứu của Bonga và cs (1987) [18], Chen và cs (2001) [19] khi chứng minh cá rô phi bị sốc/stress sẽ làm tăng nguy cơ cho tác nhân gây bệnh Streptococcosis xâm nhập và bùng phát, và điều kiện pH cao (pH>9) là một trong những yếu tố gây stress của cá rô phi.

Trong điều kiện nhiệt độ >30°C cá rô phi có nguy cơ nhiễm bệnh Streptococcosis cao hơn 16,5 lần so với điều kiện nhiệt độ <30°C (bảng 4). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Pei-Chih Liao và cs (2020) [20] khi phân tích dữ liệu quan trắc từ các trang trại nuôi cá ở Đài Loan trong 10 năm (2006-2015) cho thấy, tỷ lệ nhiễm bệnh liên cầu khuẩn Streptococcosis ở cá rô phi tích lũy trong mỗi tháng đạt mức cao nhất (gần 50%) là từ tháng 7 đến tháng 9 (thời điểm nhiệt độ nước cao nhất mùa hè dao động trong khoảng 27-35°C). Bệnh Streptococcosis còn được gọi là bệnh “nước ấm” do bệnh xuất hiện phổ biến khi nhiệt độ nước trên 27°C [21, 22]. Ở Việt Nam, các đợt dịch bệnh Streptococcosis ở cá rô phi với tỷ lệ chết >80% đều có liên quan đến nhiệt độ nước nuôi >30°C [13-15].

NO₂-N>0,25 mg/l trong nước nuôi thì gây cá rô phi có nguy cơ nhiễm bệnh Streptococcosis cao gấp 37,4 lần so với điều kiện NO₂-N≤0,25 mg/l (bảng 4). Khi hàm lượng NO₂-N cao sẽ gây độc, suy hô hấp, mất khả năng vận chuyển oxy trong máu [23], từ đó làm cá yếu và tăng nguy cơ mắc bệnh (trong đó có bệnh do Streptococcosis) [24].

H₂S>0,02 và NH₃>1 mg/l trong nước là yếu tố nguy cơ gây cá nhiễm bệnh Streptococcosis cao lần lượt gấp 10 và 8,2 lần so với H₂S≤0,02 mg/l và NH₃≤1 mg/l (bảng 4). Khi cá rô phi sống trong môi trường có lượng NH₃>0,2 mg/l thì

lượng hồng cầu trong máu càng thấp, kéo theo giảm DO trong máu, tăng NH₃ độc tính và làm giảm sức đề kháng của cá [25, 26], đặc biệt khi NH₃>1 mg/l kết hợp lượng DO trong nước thấp, cá rô phi dễ mắc các bệnh, trong đó có bệnh liên cầu khuẩn Streptococcosis [25].

Qua đó cho thấy, NO₂-N>0,25 mg/l là khoảng giá trị có nguy cơ lớn nhất liên quan đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi (OR=37,4), tiếp đến là nhiệt độ ≥30°C (OR=16,5), H₂S>0,02 mg/l (OR=10), NH₃>1 mg/l (OR=8,2) và thấp nhất là pH>8,5 (OR=2,5). Bên cạnh đó, COD>10 mg/l, NH₄-N>1 mg/l có tính tương quan thuận nhưng không phải là yếu tố nguy cơ gây bệnh Streptococcosis ở cá rô phi (bảng 4).

Bảng 4. Mối quan hệ giá trị của yếu tố độc lập có tương quan với yếu tố phụ thuộc.

Tên biến (yếu tố)	Đơn vị tính	Kiểu biến (giá trị)	Bệnh do S. Agalactiae ở cá rô phi (% số hộ)		Khoảng tin cậy (95%)	Giá trị p	OR
			Có	Không			
pH		>8,5	89,3	76,9	0,57-9,58	0,005	2,5
		<6,5	10,7	23,1			
pH		6,5-8,5	98,5	98,9	0,21-2,86	0,000	0,77*
		<6,5	1,5	0,1			
Nhiệt độ	°C	>30	99,5	91,7	2,24-135,9	0,000	16,5
		<20	0,5	8,3			
Nhiệt độ	°C	20-30	96,8	98,2	0,07-4,6	0,754	0,5*
		<20	3,2	1,8			
NO ₂ -N	mg/l	>0,25	88,9	10,4	37,6-127,8	0,000	37,4
		≤0,05	11,1	89,6			
NO ₂ -N	mg/l	>0,05	63,1	60,4	0	0,000	0,98*
		≤0,05	36,9	39,6			
H ₂ S	mg/l	>0,02	92,4	53,1	6,3-18,3	0,000	10
		≤0,02	7,6	46,9			
COD	mg/l	>10	24,1	25,1	1,3-1,4	0,000	0,94*
		≤10	75,9	74,9			
NH ₃	mg/l	>1	66,7	19,4	4,8-16,2	0,000	8,2
		≤0,1	33,3	80,6			
NH ₃	mg/l	0,1-1	60	62,7	0,7-1,2	0,000	0,89*
		≤0,1	40	37,3			
NH ₄ -N	mg/l	>0,1	67,1	69,3	1,9-4,9	0,000	0,91*
		≤0,1	33,9	30,7			
NH ₄ -N	mg/l	>1	56,9	77,3	0,2-0,7	0,000	0,4*
		≤0,1	43,1	22,7			

Ghi chú: *: chỉ số thể hiện yếu tố bảo vệ.

Yếu tố vi sinh có nguy cơ liên quan đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi

Mối liên quan của một số yếu tố vi sinh đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi: kết quả bảng 5 cho thấy, mật độ vi khuẩn hiếu khí tổng số và mật độ *Aeromonas* spp. không có tính tương quan với bệnh Streptococcosis với $p=0,054-0,2>0,05$, trong khi đó mật độ *Streptococcus* spp. có tương quan thuận ($r=0,387>0$) với bệnh Streptococcosis. Vì vậy, giá trị mật độ *Streptococcus* spp. được chia ra 4 khoảng khác nhau để phân tích xác định khoảng giá trị không tương quan/không phơi nhiễm bệnh Streptococcosis của cá rô phi.

Bảng 5. Tương quan giữa biến độc lập và biến phụ thuộc trong mô hình.

Yếu tố xét trong mô hình	Bệnh do <i>S. agalactiae</i> gây ra ở cá rô phi			
	N	Hệ số tương quan (r)	Giá trị p	Kết quả tương quan
Mật độ vi khuẩn hiếu khí tổng số	407	0,281	0,054	Không
Mật độ <i>Aeromonas</i> spp. trong nước	407	0,149	0,2	Không
Mật độ <i>Streptococcus</i> spp. trong nước	407	0,387	0,012	Có

Ghi chú: bệnh Streptococcosis ở cá rô phi là biến phụ thuộc và mật độ *Streptococcus* spp., *Aeromonas* spp., vi khuẩn hiếu khí tổng số là biến độc lập; N: tổng số mẫu phân tích.

Giá trị của yếu tố vi sinh có nguy cơ liên quan đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi: bốn khoảng giá trị mật độ *Streptococcus* spp. được xem xét bao gồm: >100 cfu/ml, ≥ 1000 cfu/ml, ≤ 100 cfu/ml và <1000 cfu/ml. Kết quả chỉ rõ, mật độ *Streptococcus* spp. trong nước ≥ 1000 cfu/ml là yếu tố phơi nhiễm bệnh Streptococcosis (bảng 6) và trong điều kiện này cá nuôi có nguy cơ nhiễm bệnh cao gấp 6,9 lần cá nuôi trong điều kiện mật độ *Streptococcus* spp. <1000 cfu/ml (bảng 7). Hiện chưa có nghiên cứu nào nêu khoảng mật độ *Streptococcus* spp. ảnh hưởng hưởng đến cá rô phi, tuy nhiên một số kết quả nghiên cứu khác về nhóm vi khuẩn gây bệnh phổ biến cho đối tượng nuôi đã được đề cập như mật độ *Vibrio* spp. $>10^4$ cfu/ml có liên quan đến biểu hiện xấu trên gan tụy tôm. Phạm vi tối ưu được xác định đối với *Vibrio* spp. trong nước ao nuôi tôm ở mức $<10^3$ cfu/ml [27]. Hay mật độ *Vibrio* spp. trong nền đáy (đạt $3,6 \times 10^4$ cfu/g) có liên quan và đã ảnh hưởng nhiều nhất đến tu hài bị bệnh sung vôi [28].

Bảng 6. Tương quan giữa giá trị biến độc lập và biến phụ thuộc trong mô hình.

Yếu tố	Đơn vị tính	Giá trị	Bệnh do <i>S. agalactiae</i> gây ra ở cá rô phi			
			N	Hệ số tương quan (r)	Giá trị p	Kết quả tương quan
Mật độ <i>Streptococcus</i> spp.	cfu/ml	≥ 1000	27	0,487	0,010	Có
		<1000	190	0,062	0,399	
		>100	75	-0,132	0,26	Không
		≤ 100	124	0,164	0,069	

Bảng 7. Mối quan hệ giá trị của yếu tố độc lập có tương quan với yếu tố phụ thuộc.

Tên biến (yếu tố)	Đơn vị tính	Giá trị	Bệnh do <i>S. Agalactiae</i> ở cá rô phi (% số hộ)		KTC (95%)	Giá trị p	OR
			Có	Không			
Mật độ <i>Streptococcus</i> sp.	cfu/ml	≥ 1000	73,5	28,6	1,7-27,8	0,005	6,9
		<1000	26,5	71,4			

Kết luận

$\text{NO}_2\text{-N}>0,25$ mg/l là môi nguy lớn nhất liên quan đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi (OR=37,4), tiếp đến là nhiệt độ $\geq 30^\circ\text{C}$ (OR=16,5), $\text{H}_2\text{S}>0,02$ mg/l (OR=10), $\text{NH}_3>1$ mg/l (OR=8,2), mật độ *Streptococcus* spp. ≥ 1000 cfu/ml (OR=6,9) và thấp nhất là pH $>8,5$ (OR=2,5).

COD >10 mg/l, $\text{NH}_4\text{-N}>1$ mg/l có tính tương quan dương nhưng không phải là yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi.

Hàm lượng ôxy hoàn tan, mật độ *Aeromonas* spp. và vi khuẩn hiếu khí tổng số không có tính tương quan và không phải yếu tố nguy cơ liên quan đối với bệnh Streptococcosis ở cá rô phi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] E. Prabu, et al. (2019). "Tilapia - An excellent candidate species for world aquaculture: a review", *Annual Research & Review in Biology*, **31**, pp.1-14.
- [2] B.O. Acosta, et al. (2004), *Public and private partnerships in aquaculture: a case study on tilapia research and development*, The WorldFish Center.
- [3] FAO (2017), *The state of world fisheries and aquaculture*, FAO Fisheries and Aquaculture Department.

- [4] FAO (2014), *The state of world fisheries and aquaculture*, FAO Fisheries and Aquaculture Department.
- [5] World Bank (2013), *Fish to 2030, prospects for fisheries and aquaculture*, Public Disclosure Authorized.
- [6] <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/goal-2019-global-finfish-production-review-and-forecast/>.
- [7] C.A. Shoemaker, P.H. Klesius (1997), *Streptococcal disease problem and control: a review northwest regional aquaculture engineering service*, Tilapia Aquaculture Ithaca.
- [8] J.J. Evans, et al. (2006), “An overview of Streptococcus in warmwater fish”, *Aquatic Health International Journal*, **7**, pp.10-14.
- [9] W. Yang, A. Li (2009), “Isolation and characterization of *Streptococcus agalactiae* from diseased *Acipenser schrenckii*”, *Aquaculture*, **294**, pp.14-17.
- [10] M.N.A. Amal, M. Zamri-Saad (2011) “Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): a review”, *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, **34**, pp.195-206.
- [11] X. Ye, et al. (2011), “Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China”, *Fish Sci.*, **77**, pp.623-632.
- [12] Z. Zhang, et al. (2017), “Draft genome sequence of an attenuated *Streptococcus agalactiae* strain Isolated from the Gut of a Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)”, *Genome Announc.*, **5**, DOI: 10.1128/genomeA.01627-16.
- [13] Nguyễn Viết Khuê và cs (2009), *Xác định nguyên nhân gây chết hàng loạt cá rô phi nuôi thương phẩm tại một số tỉnh miền Bắc*, Báo cáo tổng kết đề tài khoa học Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1.
- [14] Đồng Thanh Hà, Nguyễn Viết Khuê, Nguyễn Thị Hạnh (2015), *Một số đặc điểm của Streptococcus agalactiae - Tác nhân gây bệnh Streptococcosis trên cá rô phi ở miền Bắc Việt Nam*, Báo cáo khoa học Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1.
- [15] Trương Thị Mỹ Hạnh và cs (2019), “Một số đặc điểm chính của *Streptococcus agalactiae* gây bệnh ở cá rô phi (*Oreochromis* sp.) nuôi trong nước lợ”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, **12**, tr.73-79.
- [16] Trương Đình Hoài và cs (2014), “Đặc điểm mô bệnh học của cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) nhiễm *Streptococcus* spp. nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **12(3)**, tr.360-371.
- [17] Phan Thị Vân, Trương Đình Hoài, Trương Thị Mỹ Hạnh (2020), *Giáo trình Dịch tễ học thủy sản*, Nhà xuất bản Học viện Nông nghiệp Việt Nam.
- [18] S.E.W. Bonga, et al. (1987), *Physiological adaption to acid stress in fish*, Symposium on Ecophysiology of Acid Stress in Aquatic Organism.
- [19] S.M. Chen, et al. (2001), “Effects of pH on the nitrogenous excretion and lethal DO of tilapia *Oreochromis mosasambica*”, *Sixth Asian Fisheries Forum*.
- [20] Pei-Chih Liao, et al. (2020), “Analysis of streptococcal infection and correlation with climatic factors in cultured tilapia *Oreochromis* spp. in Taiwan”, *Appl. Sci.*, **10**, DOI: 10.3390/app10114018.
- [21] P. Kayansamruaj, et al. (2014), “Increasing of temperature induces pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* and the upregulation of inflammatory related genes in infected Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)”, *Vet. Microbiol.*, **172**, pp.265-271.
- [22] G.F. Mian, et al. (2009), “Aspects of the natural history and virulence of *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia”, *Vet. Microbiol.*, **136**, pp.180-183.
- [23] E.C. Boyd, C.S. Tucker (1998), *Pond aquaculture water quality management*, Kluwer Academic Publisher.
- [24] A.F.M. El-Sayed (2006), *Tilapia culture*, CABI Publishing.
- [25] N.A. Ahmed, et al. (1992), “Effect of ammonia on some haematological parameters of *O. Niloticus*”, *Proceeding of Zoological Society of Arab Republic of Egypt*, **23**, pp.155-160.
- [26] T. Popma, M. Masser (1999), *Tilapia life story and biology*, Southern Regional Aquaculture Center Publication.
- [27] E.A. Ganesh, et al. (2010), “Monitoring of total heterotrophic bacteria and *Vibrio* spp. in an aquaculture pond”, *Current Research Journal of Biological Sciences*, **2(1)**, pp.48-52.
- [28] Trương Thị Mỹ Hạnh và cs (2019), “Mối tương quan giữa một số yếu tố môi trường nuôi đến tu hài (*Lutaria philippinarum* Reeve, 1854) bị bệnh sưng vôi”, *Tạp chí Khoa học Công nghệ Thủy sản*, **3**, tr.32-38.

Xác định các yếu tố điều hòa hoạt động (CRE) của gen *RMP1* và *RMP2* liên quan đến biểu hiện chuyên biệt ở hạt phấn lúa

Nguyễn Tiến Dũng*, Triệu Bích Huệ, Nguyễn Xuân Vũ

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

Ngày nhận bài 6/5/2021; ngày chuyển phản biện 11/5/2021; ngày nhận phản biện 15/6/2021; ngày chấp nhận đăng 23/6/2021

Tóm tắt:

Gen chuyên biệt mô, cơ quan thường được kiểm soát bởi các yếu tố điều hòa hoạt động (Cis Regulator Elements - CRE) nằm trên vùng điều hòa gen (promoter). Ở lúa, promoter chuyên biệt hạt phấn đã được chứng minh có sự tham gia của các CRE đặc hiệu như GTGANTG10, POLLEN1LELAT52... và các mô típ đặc thù khác. Hai gen, *RMP1* và *RMP2* biểu hiện chuyên biệt ở giai đoạn đầu hình thành hạt phấn lúa. Vùng promoter được phân tích bằng phần mềm NEW PLACE và PlantCARE đã xác định được 80 và 95 CRE nằm trên promoter *RMP1* và *RMP2*. Trong đó có 6 CRE phổ biến xuất hiện với tần số từ 12 đến 25 lần, gồm ARR1AT, CAATBOX1, CACTFTPPCA1, DOFCOREZM, EBOXBNNAPA, GATABOX. Đặc biệt, hai CRE liên quan trực tiếp đến biểu hiện chuyên biệt ở hạt phấn GTGANTG10, POLLEN1LELAT52 cũng xuất hiện trên các promoter này. Trong đó, GTGANTG10 xuất hiện với tần số 14 lần trên *RMP1* và 21 lần trên *RMP2*; POLLEN1LELAT52 xuất hiện với tần số 4 và 21 lần trên *RMP1* và *RMP2*.

Từ khóa: lúa, vùng điều hòa gen, yếu tố điều hòa.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Promoter là trình tự nucleotide nằm trước gen phía đầu 5' có vai trò quan trọng trong việc điều khiển hoạt động phiên mã của gen để tổng hợp protein. Promoter được phân làm 3 loại chính gồm: promoter cảm ứng, cơ định và chuyên biệt (specific promoter). Trong đó, promoter cơ định như 35S, actin hay ubiquitin được sử dụng phổ biến nhất [1-3]. Tuy nhiên, những promoter này thường tạo ra các kiểu hình không mong muốn do hoạt động không định hướng của gen gây ra. Vì thế, để khắc phục điều này các nhà khoa học có xu hướng sử dụng các promoter chuyên biệt để điều khiển các gen ở các mô, bộ phận theo chủ đích [4, 5].

Ở thực vật có hoa nói chung, lúa nói riêng năng suất hạt phụ thuộc rất nhiều vào hiệu quả của quá trình thụ phấn và thụ tinh, trong đó hạt phấn đóng vai trò rất quan trọng trong quá trình này. Bất kỳ một tổn thương nào của hạt phấn cũng sẽ ảnh hưởng đến quá trình tạo hạt [6]. Nguyen và cs (2019) [7] đã chứng minh ở điều kiện nhiệt độ cao 35°C hạt phấn cây *Arabidopsis* bị chết, cây không hình thành hạt. Ở khía cạnh phân tử, các báo cáo cho thấy rất nhiều gen tham gia vào quá trình phát triển của hạt phấn như: *OsIPK*, *OsIPA*, *OsBHLH*, *OsFbox*, *OsIPP3*, *OsEMSA1*, *OsLSP*, *EPAD1*... [8-13]. Promoter của các gen này đã được phân lập và

chứng minh có khả năng ứng dụng trong điều khiển các gen mục tiêu nhằm tạo dòng bất dục đực ở cây trồng như thuốc lá, lúa đã được báo cáo [14-16].

Nhìn chung, các promoter chuyên biệt thường có mặt các yếu tố điều khiển hoạt động chuyên biệt cho mô hay tế bào [17-20]. Khi phân tích trình tự vùng điều hòa chuyên biệt hạt phấn ở cây cà chua, Lat52, nhóm nghiên cứu của Twell đã tìm thấy một số yếu tố có vai trò chính đối với hoạt động của promoter như GTGANTG10, POLLEN1LeLAT52 [21]. Các yếu tố này cũng được tìm thấy ở một số promoter chuyên biệt hạt phấn khác như OsSCP, OSIPA, OsLPS10 và OsLPS11 [22, 23]. Ngoài vai trò của các yếu tố nêu trên, một số nghiên cứu cho thấy các mô típ mới hay trình tự bảo tồn cũng chi phối hoạt động chuyên biệt của promoter. Các mô típ phân bố ở các vị trí khác nhau và kiểm soát các hoạt động chuyên biệt của gen [19, 20, 24, 25]. Li và cs (2020) [26] đã xác định được 15 mô típ liên quan trực tiếp đến biểu hiện chuyên biệt hạt phấn của gen *hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGP)* ở cây *Arabidopsis*. Nguyen và cs (2016) [27] đã xác định được 9 gen chuyên biệt hạt phấn ở lúa (*Rice microspore pollen* từ 1 đến 9). Các promoter này đã được chứng minh hiệu quả thông qua gen chỉ thị GUS và *Sidecar pollen-2 (scp-2)* ở cây *Arabidopsis*. Trong phạm vi bài báo này, chúng tôi tiến hành phân tích vùng promoter

*Tác giả liên hệ: Email: nguyentindung@tuaf.edu.vn

Identification of *Cis*-regulator elements (CREs) of pollen-specific gene *RMP1* and *RMP2* in rice

Tien Dung Nguyen*, Bich Hue Trieu, Xuan Vu Nguyen

Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

Received 6 May 2021; accepted 23 June 2021

Abstract:

Tissue and organ-specific expression genes induced by *Cis*-regulator elements (CREs) are distributed in the promoter region of a gene. In rice, pollen-specific genes have been investigated to identify CREs related to specific expression in anther and pollen grain such as GTGANTG10, POLLEN1LELAT52... *RMP1* and *RMP2* genes that specifically express the early stage of pollen development were analysed their promoter region using NEW PLACE and PlantCARE tools. Results showed that 80 CREs were located in the *RMP1* promoter and 95 CREs in the *RMP2*. Among them, 6 CREs are abundant distribution with from 12 to 25 copies, including ARR1AT, CAATBOX1, CACTFTPPCA1, DOFCOREZM, EBOXBNNAPA, and GATABOX. Interestingly, two pollen-specific CREs, GTGANTG10, POLLEN1LELAT52, were also found in *RMP1* and *RMP2* promoters. In which, GTGANTG10 was counted 14 copies in *RMP1* and 21 copies in *RMP2*, whereas, POLLEN1LELAT52 was found 4 and 21 copies in *RMP1* and *RMP2*, respectively.

Keywords: *Cis*-regulator elements, promoter, rice.

Classification number: 4.6

của hai gen *RMP1* và *RMP2* nhằm tìm ra các CRE liên quan đến biểu hiện chuyên biệt của chúng.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Phân tích biểu hiện gen

Biểu hiện của gen *RMP1* và *RMP2* được phân tích dựa trên dữ liệu công bố RiceXPro (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>). Biểu hiện gen dựa trên cường độ huỳnh quang Cy3 ở các cơ quan sinh sản như mầm hoa, bao phấn, nhụy... Đồng thời, biểu hiện gen cũng được phân tích thêm dựa trên bản đồ nhiệt (heat map) bằng phần mềm ePlant (http://bar.utoronto.ca/eplant_rice/).

Lựa chọn vùng điều hòa hoạt động của gen và phân tích CRE

Trình tự gen *RMP1* (Os01g0533400) và *RMP2* (Os04g0561900) được lấy trên cơ sở dữ liệu Rice Functional Genomic Express Database (RiceGE, <http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE>). Vùng trình tự nucleotide nằm liền kề phía trước mã mở đầu ATG phía đầu 5' được xác định là promoter. Trình tự promoter của gen *RMP1* và *RMP2* lần lượt là 1.343 và 754 bp (bảng 1). Để xác định các yếu tố CRE, trình tự promoter gen *RMP1* và *RMP2* được phân tích bằng phần mềm NEW PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) và PlantCARE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>). Tần số xuất hiện các CRE sẽ được thống kê và xây dựng biểu đồ. Các yếu tố phiên mã sẽ được đánh dấu vị trí trên vùng promoter của gen.

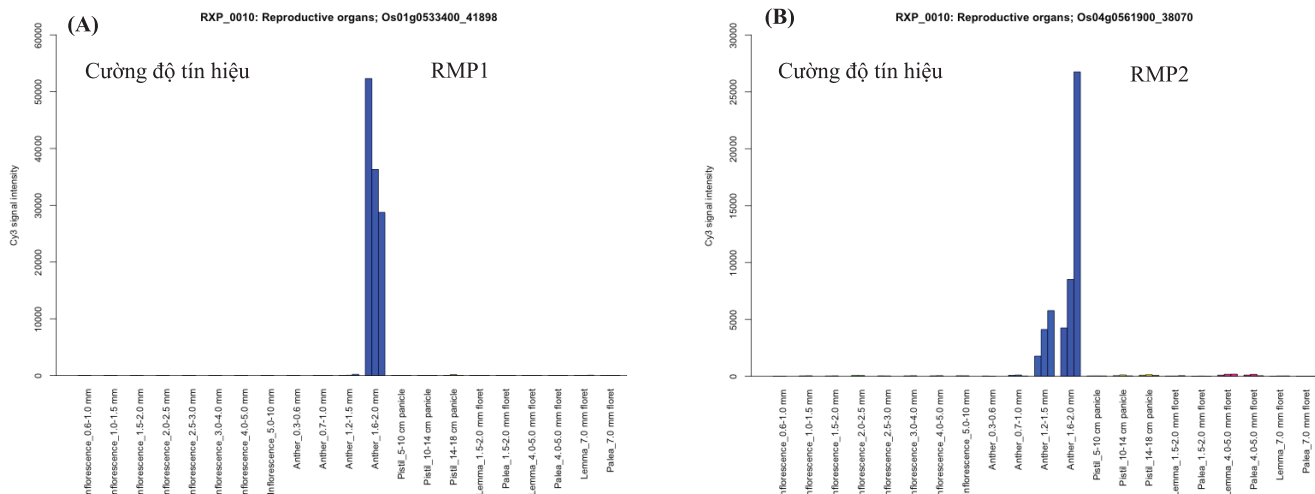
Bảng 1. Gen *RMP1* và *RMP2* sử dụng trong nghiên cứu.

Gen	Mã số trên NCBI	Sản phẩm gen mã hóa	Kích thước vùng điều hòa gen
<i>RMP1</i>	Os01g0533400	Glycoside hydrolase, family 35 protein	1.343 bp (-18 đến -1.360)
<i>RMP2</i>	Os04g0561900	Peptidase S9A, prolyl oligopeptidase family	754 bp (-97 đến -850)

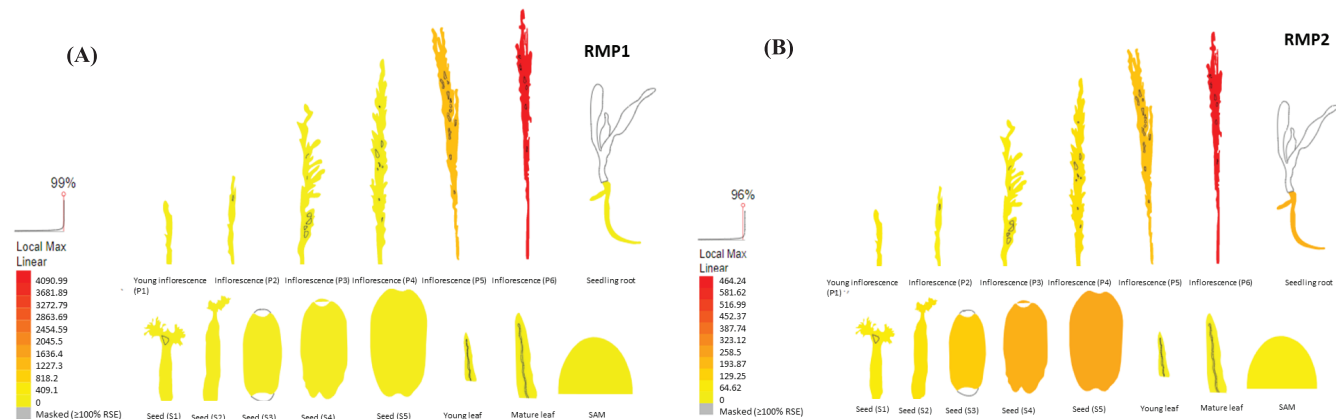
Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Biểu hiện của gen *RMP1* và *RMP2* ở hạt phấn

Kết quả phân tích database bằng phần mềm RiceXPro để kiểm tra biểu hiện gen ở các mẫu bao gồm mầm hoa, bao phấn, nhụy, vỏ trấu dựa trên cường độ tín hiệu huỳnh quang Cy3 cho thấy hầu hết các mẫu mầm hoa, nhụy, vỏ trấu không có tín hiệu biểu hiện. Gen *RMP1* và *RMP2* bắt đầu biểu hiện khi bao phấn được hình thành, và biểu hiện mạnh nhất ở giai đoạn bao phấn có kích thước từ 1,5 đến 2,0 mm (hình 1). Đồng thời bằng phần mềm ePlant gen *RMP1* và *RMP2* được phân tích biểu hiện dựa trên bản đồ nhiệt ở các cơ quan sinh sản (mầm hoa, hạt) và cơ quan sinh dưỡng (lá, thân, rễ). Kết quả cho thấy, gen chỉ biểu hiện ở cơ quan sinh sản, đặc biệt là giai đoạn P5 và P6, gen không hoặc biểu hiện rất ít ở các cơ quan sinh dưỡng (hình 2).



Hình 1. Biểu hiện của gen *RMP1* (A) và *RMP2* (B) ở giai đoạn sinh sản hữu tính được phân tích bằng phần mềm RiceXPro thông qua tín hiệu huỳnh quang Cy3 (inflorescence: hoa; anther: bao phấn; pistil: nhụy; lemma: đỉnh vỏ trấu; palea: vỏ trấu dưới).



Hình 2. Mô phỏng biểu hiện của gen *RMP1* (A) và *RMP2* (B) ở cơ quan sinh sản bằng phần mềm eFP dựa trên biểu đồ nhiệt. Biểu đồ nhiệt thể hiện mức độ biểu hiện gen tăng dần từ màu vàng đến màu đỏ tương ứng với các giai đoạn phát triển của hoa (inflorescence P1-P5), hạt (seed S1-S5), lá non (young leaf), lá trưởng thành (mature leaf), rễ cây con (seedling root).

CRE phổ biến trên vùng promoter *RMP1* và *RMP2*

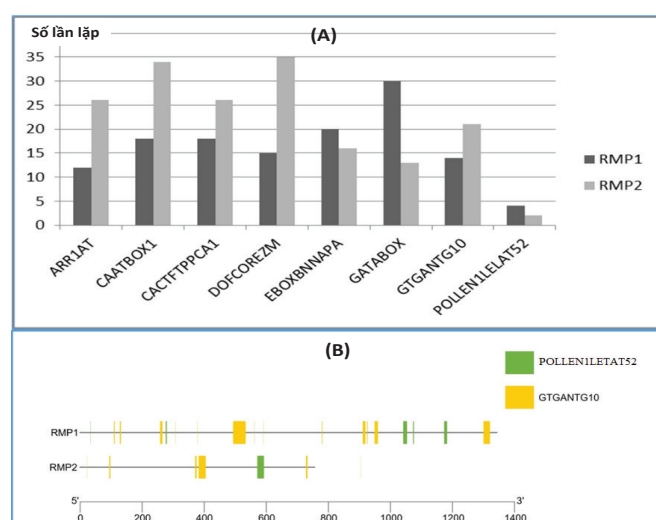
Kết quả phân tích cho thấy, có 80 CRE trên vùng promoter *RMP1* và 95 CRE trên vùng promoter *RMP2*. Các CRE xuất hiện với tần số và vai trò khác nhau trong điều hòa hoạt động của gen. Trong đó, có 6 CRE xuất hiện với tần số lớn từ 12 đến 35 lần (bảng 2, hình 3A). Các CRE tham gia vào các chức năng khác nhau như stress, hormon, biểu hiện gen... Trong đó, *ARR1AT* là yếu tố liên kết được tìm thấy trên các promoter của cây lúa và *Arabidopsis*. Sakai và cs (2000) [28] đã chứng minh *ARR1* và *ARR2* là các yếu tố phiên mã có vai trò điều hòa quá trình tổng hợp cytokinin. Trên trình tự promoter *RMP1* và *RMP2*, *ARR1AT* xuất hiện lần lượt 12 và 26 lần. *CAATBOX* chịu trách nhiệm kiểm soát hoạt động chuyên biệt ở mô của gen *LegA* ở cây đậu ngựa, đồng thời tham gia vào điều khiển quá trình ra hoa ở cây *Arabidopsis* [26, 29]. *DOFCEREZM* liên kết với

protein Dof tham gia điều hòa hoạt động của gen liên quan đến stress, tổng hợp hormon và biểu hiện đặc hiệu mô ở cây 1 và 2 lá mầm [30]. *DOFCEREZM* xuất hiện 15 và 35 lần trên promoter *RMP1* và *RMP2*. *GATABOX* tham gia điều hòa hoạt động đặc hiệu mô, kiểm soát mức độ biểu hiện gen [23]. *CACTFTPPCA1* là thành viên chính tham gia điều hòa hoạt động tổng hợp carbon ở tế bào trung bì (mesophyll). Sharma (2014) [31] đã phân tích promoter của 40 gen và nhận thấy *CACTFTPPCA1* là yếu tố phổ biến có mặt ở tất cả các promoter. Kết quả phân tích cho thấy, *CACTFTPPCA1* xuất hiện lần lượt 18 và 26 lần trên vùng promoter *RMP1* và *RMP2*. *EBOXBNNAPA* là yếu tố tham gia biểu hiện gen đặc hiệu ở mô của gen tổng hợp phenylpropanoid được chứng minh bởi Hartmann và cs (2005) [32]. Yếu tố này được phát hiện trên promoter của *RMP1* và *RMP2* với tần số lần lượt là 20 và 16. Đặc biệt, kết quả phân tích cho thấy hai yếu tố *GTGANTG10* và *POLLENILELAT52* kiểm soát

biểu hiện chuyên biệt ở hạt phấn và bao phấn đều có mặt trên promoter RMP1 và RMP2. Trong đó, GTGANTG10 xuất hiện với tần số 14 lần trên RMP1 và 21 lần trên RMP2, POLLEN1LELAT52 với tần số 4 lần trên RMP1 và 2 lần trên RMP2 (bảng 2, hình 3A). Đây là 2 motif quan trọng điều hòa hoạt động chuyên biệt hạt phấn được tìm thấy trên gen *g10* ở cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*), *Lat56*, *Lat52* ở cây cà chua (*Lycopersicon esculentum*) [33, 34]. Vị trí phân bố của các motif này được thể hiện ở hình 3B.

Bảng 2. Danh sách các CRE phổ biến trên promoter RMP1 và RMP2.

TT	CREs	Trình tự (5'-3')	Tần số xuất hiện		Chức năng
			RMP1	RMP2	
1	ARR1AT	NGATT (N=G/A/C/T)	12	26	Yếu tố phiên mã điều hòa cytokinin [28]
2	CAATBOX1	CAAT	18	34	Điều hòa hoạt động ở mô, cơ quan [29]
3	CACTFTPPCA1	YACT (Y=T/C)	18	26	Yếu tố điều hòa đặc hiệu meiocytes [35]
4	DOFCOREZM	AAAG	15	35	Yếu tố phiên mã Dof1 và Dof2 tham gia biểu hiện gen tổng hợp carbon [31]
5	EBOXBNNAPA	CANNTG (N=A/G/C/T)	20	16	Biểu hiện đặc hiệu mô tổng hợp phenylpropanoids [35]
6	GATABOX	GATA	30	13	Hộp GATA, điều hòa biểu hiện đặc hiệu mô [36]
7	GTGANTG10	GTGA	14	21	Điều hòa hoạt động đặc hiệu ở hạt phấn cây thuốc lá [37]
8	POLLEN1LELAT52	AGAAA	4	2	Điều hòa hoạt động đặc hiệu ở hạt phấn cây cà chua [34, 38]



Hình 3. Tần số xuất hiện các CRE phổ biến (A) và vị trí phân bố của POLLEN1LELAT52 và GTGANTG10 (B) trên promoter RMP1 và RMP2.

Promoter chuyên biệt hạt phấn là công cụ hữu hiệu có thể sử dụng để điều khiển các gen liên quan đến quá trình phát triển của hạt phấn, như điều khiển quá trình tổng hợp môn tạo cây lúa bất dục đực hoặc nâng cao hiệu quả thụ phấn thụ tinh của cây [16]. Gần đây, biến đổi khí hậu đã gây ra các hiện tượng cực đoan đối với cây trồng, đặc biệt là nhiệt độ thấp và nắng nóng tác động lớn đến quá trình thụ phấn thụ tinh, từ đó làm giảm năng suất và sản lượng của cây. Nhiều nhà khoa học đã tìm cách nâng cao tính chống chịu của hạt phấn thông qua điều khiển các gen liên quan bằng các promoter chuyên biệt [27, 31, 32]. Từ các nghiên cứu trên cho thấy, promoter RMP1 và RMP2 có thể là một trong những công cụ hữu ích được sử dụng để điều khiển các gen liên quan đến hạt phấn trong công tác chọn tạo giống ở Việt Nam.

Kết luận

Kết quả phân tích cho thấy, gen *RMP1* và *RMP2* biểu hiện mạnh ở giai đoạn hình thành bao phấn kích thước từ 1,5 đến 2,0 mm. Vùng promoter gen *RMP1* và *RMP2* có chứa nhiều yếu tố điều hòa hoạt động CRE, RMP1 có chứa 80 CRE, RMP2 có 95 CRE. Trong đó, có 6 CRE phổ biến xuất hiện với tần số từ 12 đến 25 lần gồm ARR1AT, CAATBOX1, CACTFTPPCA1, DOFCOREZM, EBOXBNNAPA, GATABOX. Hai yếu tố phiên mã liên quan trực tiếp đến biểu hiện chuyên biệt ở hạt phấn GTGANTG10, POLLEN1LELAT52 xuất hiện với tần số 14, 4 và 21, 2 trên promoter RMP1 và RMP2. Để đánh giá vai trò của các CRE này cần tiến hành kết hợp phân tích vai trò của chúng thông qua các chỉ thị khác như GUS, GFP.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) thông qua đề tài mã số 106.03-2017.19. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J.T. Odell, et al. (1985), "Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter", *Nature*, **6**, DOI: 10.1038/313810a0.
- [2] D. McElroy, et al. (1990), "Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation", *Plant Cell*, **2**, pp.163-171.
- [3] C.A. Christensen, et al. (1997), "Mega gametogenesis in *Arabidopsis* wild type and the *Gf* mutant", *Sex Plant Reprod.*, **10**, pp.49-64.
- [4] T. Umezawa, et al. (2006), "Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future", *Curr. Opin. Biotechnol.*, **17**, pp.113-122.
- [5] R. Satoh, et al. (2002), "ACTCAT, a novel *Cis*-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*", *Plant Physiol.*, **130**, pp.709-719.

- [6] R. Tayade, et al. (2018), "Effective strategies for enhancing tolerance to high-temperature stress in rice during the reproductive and ripening stages", *Plant Breed. Biotech.*, **6**, pp.1-18.
- [7] T.D. Nguyen, et al. (2019), "High daytime temperature induces male sterility with developmental defects in male reproductive organs of Arabidopsis", *Plant Biotechnol. Rep.*, **13**, pp.635-643.
- [8] M.J. Han, et al. (2006), "Rice immature pollen 1 (RIP1) is a regulator of late pollen development", *Plant Cell Physiol.*, **47**, pp.1457-1472.
- [9] R. Khurana, et al. (2013), "Spatial and temporal activity of upstream regulatory regions of rice anther-specific genes in transgenic rice and Arabidopsis", *Transgenic Res.*, **22**, pp.31-46.
- [10] R. Khurana, et al. (2013), "286 bp upstream regulatory region of a rice antherspecific gene, OSIPP3, confers pollen-specific expression in Arabidopsis", *Biotechnol. Lett.*, **35**, pp.455-462.
- [11] Q. Zhu, et al. (2017), "A lysM domain-containing gene OsEMSA1 involved in embryo sac development in rice (*Oryza sativa* L.)", *Front Plant Sci.*, **8**, DOI: 10.3389/fpls.2017.01596.
- [12] M. Wang, et al. (2020), "Identification of late-stage pollen-specific promoters for construction of pollen-inactivation system in rice", *Plant Rep. Biol.* DOI: 10.1111/jipb.12912.
- [13] H.J. Li, et al. (2020), "Grass-specific *EPAD1* is essential for pollen exine patterning in rice", *The Plant Cell*, **32**, pp.3961-3977.
- [14] S. Moritoh, et al. (2005), "RNAi-mediated silencing of OsGEN-L (OsGEN-like), a new member of the RAD2/XPG nuclease family, causes male sterility by defect of microspore development in rice", *Plant Cell Physiol.*, **46**, pp.699-715.
- [15] G. Nematzadeh, G. Kiani (2010), "Genetic analysis of fertility restoration genes for WA type cytoplasmic male sterility in Iranian restorer rice line DN-33-18", *African J. Biotechnology*, **9**, pp.6273-6277.
- [16] H.K. Bae, et al. (2010), "Transgenic rice plants carrying RNA interference constructs of AOS (allene oxide synthase) genes show severe male sterility", *Plant Breeding*, **129**, pp.647-651.
- [17] S. Ijaz, et al. (2020), "Plant *Cis*-regulatory elements: methods of identification and applications", *Asian J. Agric. & Biol.*, **8**, pp.207-222.
- [18] K. Arnav, et al. (2019), "Interspersed 5' *Cis*-regulatory elements ascertain the spatio-temporal transcription of cytoskeletal profilin gene family in Arabidopsis", *Com. Biol. and Chem.*, **80**, pp.177-186.
- [19] G. Wang, et al. (2020), "Molecular dissection of *TaLTP1* promoter reveals functional *Cis*-elements regulating epidermis-specific expression", *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, DOI: 10.3390/ijms21072261.
- [20] R.Z. Naqvi, et al. (2016), "Role of plant promoters and their *cis* regulatory elements in gene expression regulation", *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, **1**, pp.347-352.
- [21] D. Twell, et al. (1998), "Asymmetric division and cell fate determination in developing pollen", *Trends Plant Science*, **3**, pp.305-310.
- [22] L. Swapna, et al. (2011), "Pollen specific expression of *Oryza sativa* indica pollen allergen gene (*OSIPA*) promoter in rice and Arabidopsis transgenic systems", *Mol. Biotechnol.*, **48**, pp.49-59.
- [23] Y.Z. Yue, et al. (2014), "Characterization of a novel anther-specific gene encoding a leucine-rich repeat protein in petunia", *Gen. Mol. Res.*, **13**, pp.9889-9898.
- [24] A. Kaur, et al. (2017), "In-silico analysis of *Cis*-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*", *PLOS ONE*, **12**, DOI: 10.1371/journal.pone.0184523.
- [25] H. Sharma, et al. (2018), "In-silico identification of *Cis*-acting regulatory elements in 5' regulatory region of Betaine aldehyde dehydrogenase isoenzymes of selected monocot and dicot", *Annals of Plant Sciences*, **7**, pp.2026-2036.
- [26] Y. Li, et al. (2020), "Identification of *Cis*-regulatory sequences controlling pollen-specific expression of hydroxyproline-rich glycoprotein genes in *Arabidopsis thaliana*", *Plants*, **9**, DOI: 10.3390/plants9121751.
- [27] T.D. Nguyen, et al. (2016), "Application of rice microspore-preferred promoters to manipulate early pollen development in Arabidopsis: a heterologous system", *Plant Reproduction*, **29**, pp.291-300.
- [28] H. Sakai, et al. (2000), "*Arabidopsis* *ARR1* and *ARR2* response regulators operate as transcriptional activators", *Plant J.*, **24**, pp.703-711.
- [29] S. Wenkel, et al. (2006), "CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*", *Plant Cell*, **18**, pp.2971-2984.
- [30] S. Yanagisawa (2000), "*Dof1* and *Dof2* transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize", *Plant J.*, **21**, pp.281-288.
- [31] K.D. Sharma (2014), "Pollen development under cold stress: a molecular perspective", *Austin J. Genet. Genomic. Res.*, **1**, p.4.
- [32] U. Hartmann, et al. (2005), "Differential combinatorial interactions of *Cis*-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light responsive and tissue-specific activation of phenyl propanoid biosynthesis genes", *Plant Mol. Biol.*, **57**, pp.155-171.
- [33] N. Bate, D. Twell (1998), "Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage specific and co-dependent activator elements", *Plant Mol. Biol.*, **37**, pp.859-866.
- [34] S.A. Filichkin, et al. (2004), "A novel *endo-beta-mannanase* gene in tomato *LeMAN5* is associated with anther and pollen development", *Plant Physiol.*, **134**, pp.1080-1088.
- [35] U. Gowik, et al. (2004), "*Cis*-Regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the C4 plant *Flaveria trinervia*, the promoter of the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene", *Plant Cell*, **16**, pp.1077-1090.
- [36] J.C. Reyes, et al. (2004), "The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and rice", *Plant Physiol.*, **134**, pp.1718-1732.
- [37] H.J. Rogers, et al. (2001), "Functional analysis of *Cis*-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene *g10*", *Plant Mol. Biol.*, **45**, pp.577-585.
- [38] X. Liu, et al. (2013), "The rice *OsLTP6* gene promoter directs anther-specific expression by a combination of positive and negative regulatory elements", *Planta*, **238**, pp.845-857.

Nghiên cứu tạo nguồn vật liệu khởi đầu trong nhân giống *in vitro* cây hoa Dạ yến thảo (*Petunia hybrida* L.)

Nguyễn Tiến Long^{1*}, Lê Thị Thu Hằng^{1,2}, Trần Thị Triều Hà^{1,2}, Dương Thanh Thủy^{1,2}, Lê Như Cường¹

¹Nhóm nghiên cứu công nghệ cao trong trồng trọt, Đại học Huế

²Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

Ngày nhận bài 2/2/2021; ngày chuyển phản biện 8/2/2021; ngày nhận phản biện 19/3/2021; ngày chấp nhận đăng 26/3/2021

Tóm tắt:

Với mục đích tạo nguồn vật liệu khởi đầu cho nhân giống *in vitro* cây hoa Dạ yến thảo, nghiên cứu này đã xác định được phương pháp khử trùng và môi trường dinh dưỡng trong các giai đoạn khác nhau: tái sinh chồi, nhân nhanh chồi và các cơ quan sinh dưỡng của cây *in vitro* sử dụng để nhân nhanh. Kết quả cho thấy, sử dụng đoạn thân mang mắt ngủ làm nguồn nguyên liệu khởi đầu và khử trùng bằng dung dịch $HgCl_2$ nồng độ 0,1% trong thời gian 10 phút cho hiệu quả khử trùng tốt nhất (tỷ lệ mẫu sống đạt 60%). Môi trường tái sinh chồi từ đoạn thân mang mắt ngủ tốt nhất là: MS + 1 mg BAP/l + 6,5 g agar/l + 30 g sacarose/l (tỷ lệ mẫu tạo chồi 100%, số chồi trung bình/mẫu đạt 2,73); môi trường nhân nhanh chồi tốt nhất là MS + 1 mg BA/l + 0,2 mg IBA/l + 6,5 g agar/l + 30 g sacarose/l (số chồi trung bình/mẫu đạt 19,53). Mô lá của cây *in vitro* là cơ quan sinh dưỡng phù hợp nhất để nhân nhanh, 100% các chồi *in vitro* tái sinh thông qua hình thức mô sẹo, tỷ lệ số chồi/mẫu đạt 21,53.

Từ khóa: hoa Dạ yến thảo, nuôi cấy *in vitro*, tái sinh chồi.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Dạ yến thảo (*Petunia hybrida* L.) thuộc họ Cà (Solanaceae) là loài cây thân thảo mềm, ưa sáng, chịu nhiệt, nở nhiều hoa, thời gian nở hoa dài và rất phong phú về màu sắc hoa (trắng, hồng, đỏ, tím...) và kiểu dáng cây [1]. Phần lớn Dạ yến thảo trồng ngày nay được lai tạo từ *Petunia axillaris*, *Petunia violacea* và *Petunia inflata*.

Hiện nay, ở Việt Nam cây hoa Dạ yến thảo được trồng chủ yếu từ hạt với giá hạt tương đối đắt (từ 1.000 đến 5.000 đ/hạt tùy thuộc vào dạng cây và màu sắc hoa), cộng thêm vào đây, kích cỡ hạt rất nhỏ, tỷ lệ nảy mầm chỉ khoảng 60-65%, tỷ lệ chết cao nên giá thành cây giống khá cao. Dạ yến thảo còn có thể nhân giống bằng phương pháp giâm cành nhưng có nhược điểm là cần lượng cây mẹ lớn, hệ số nhân giống thấp, cây con sinh trưởng kém và dễ nhiễm các loại bệnh... [2].

Vì những lý do đó, việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật để nâng cao hệ số nhân giống, cây giống tạo ra hoàn toàn sạch bệnh, đồng nhất về kiểu hình, ổn định về tính di truyền là hướng đi gần như tất yếu trong nền sản xuất nông nghiệp công nghệ cao hiện nay. Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn của sản xuất, chúng tôi thực hiện “Nghiên cứu

tạo nguồn vật liệu khởi đầu trong nhân giống *in vitro* cây hoa Dạ yến thảo (*Petunia hybrida* L.)”.

Vật liệu và Phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Giống hoa Dạ yến thảo sử dụng để nghiên cứu có màu tím hồng, được nhập về từ Thái Lan.

Cây giống sử dụng để nghiên cứu đã phân cành dài 15-20 cm và chưa ra hoa.

Vật liệu nuôi cấy khởi đầu là đoạn thân mang mắt ngủ của cây giống khỏe mạnh, không bị sâu bệnh.

Phương pháp nghiên cứu

Sử dụng các phương pháp nuôi cấy thường quy trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật.

Nghiên cứu phương pháp khử trùng tạo nguồn vật liệu khởi đầu (TN1): vật liệu là các đoạn thân mang mắt ngủ cùng chung một chế độ xử lý (rửa mẫu vật, khử trùng, môi trường dinh dưỡng...) với yếu tố thí nghiệm là các khoảng thời gian xử lý khác nhau (5, 7, 10 và 15 phút). Đánh giá kết quả tại thời điểm 2 tuần sau khi nuôi cấy.

Nghiên cứu tạo sự phát sinh chồi *in vitro* và nhân nhanh:

*Tác giả liên hệ: Email: nguyentienlong@huanf.edu.vn

A study on the primary materials for *in vitro* propagation of *Petunia hybrida* L.

Tien Long Nguyen^{1*}, Thi Thu Hang La^{1,2},
Thi Trieu Ha Tran^{1,2},
Thanh Thuy Duong^{1,2}, Nhu Cuong Le¹

¹High Technology in Crop Production Group, Hue University

²University of Agriculture and Forestry, Hue University

Received 2 February 2021; accepted 26 March 2021

Abstract:

The aim of this study was to identify the primary materials for *in vitro* propagation of the *Petunia hybrida* L. The sterilisation method and the medium in different stages: shoot regeneration, rapid shoot multiplication, and the part of the *in vitro* plant used for rapid multiplication were identified. The study results showed that using nodal segments with axillary buds as the primary material and sterilising by $HgCl_2$ 0.1% in 10 minutes gave the best disinfection effect (survival rate reached 60%). Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1 mg of BAP/l + 6.5 g agar/l + 30 g saccharose/l was reported as the best one for shoot regeneration (100% of shoot formed and number shoot per sample was 2.73), meanwhile, the mixture of MS + 1 mgBA/l + 0.2 mg IBA/l + 6.5 g agar/l + 30 g saccharose/l was considered as the best medium for rapid shoot multiplication (average shoots/sample reached 19.53). *In vitro*, leaf tissue is the most suitable vegetative organ for rapid multiplication, 100% of *in vitro* shoots regenerate through the form of callus, and the ratio of shoots/sample reached 21.53.

Keywords: *in vitro* propagation, *Petunia hybrida* L., shoots regeneration.

Classification number: 4.6

- Xác định ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi *in vitro* (TN2): sử dụng môi trường MS + 30 g/l saccharose + 6,5 g/l agar và bổ sung BAP ở các nồng độ khác nhau (0-2 mg/l). Đánh giá thí nghiệm sau 6 tuần nuôi cấy.

- Xác định ảnh hưởng của tổ hợp BAP và IBA đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* (TN3): môi trường nuôi cấy tương tự ở TN 2 với nồng độ BAP tốt nhất, bổ sung IBA với các mức nồng độ khác nhau (0, 0,1, 0,2, 0,3 và 0,4 mg/l). Đánh giá thí nghiệm sau 6 tuần nuôi cấy.

- Xác định nguồn thực liệu nuôi cấy mô phù hợp (TN4): các cơ quan sinh dưỡng khác nhau bao gồm: chồi ngọn *in vitro* dài 1 cm, đoạn thân *in vitro* mang mắt ngủ dài 1 cm, mảnh lá *in vitro* (1x1 cm) được cấy vào môi trường tốt nhất rút ra từ TN3. Đánh giá thí nghiệm sau 6 tuần nuôi cấy.

Các chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ mẫu nhiễm (%); tỷ lệ mẫu sạch (%); tỷ lệ mẫu sống (%); số mẫu tái sinh chồi; số chồi/mẫu; chiều cao chồi; số lá/chồi; hệ số nhân chồi; mẫu tạo callus; chất lượng chồi.

Điều kiện thí nghiệm: nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào, Bộ môn Di truyền - giống, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

Môi trường nuôi cấy MS [3] bổ sung saccharose, agar và các chất điều hòa sinh trưởng, pH 5,8, được khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD), 3 lần lặp lại mỗi lần 10 mẫu, theo dõi 30 mẫu, nhiệt độ 25±2°C, cường độ ánh sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 14h/ngày.

Số liệu thí nghiệm được xử lý trên phần mềm Microsoft Excel và Statistis 10.0.

Kết quả và thảo luận

Xác định thời lượng khử trùng nguồn vật liệu khởi đầu

Hiệu quả của phương pháp khử trùng mẫu bằng $HgCl_2$ nồng độ 0,1% ở các khoảng thời gian 5, 7, 10 và 15 phút trên cơ quan sinh dưỡng đưa vào nuôi cấy là đoạn thân mang mắt ngủ được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến sự tạo nguồn vật liệu khởi đầu (sau 2 tuần nuôi cấy).

Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu sống và sạch (%)
5	96,67	0,00	3,33
7	73,33	16,67	10,00
10	16,67	23,33	60,00
15	0,00	93,33	6,67

Nhận xét được rút ra là tỷ lệ mẫu sống và sạch tăng theo chiều tăng của thời gian khử trùng trong phạm vi thời lượng từ 5 lên 10 phút. Cụ thể, ở thời gian khử trùng 10 phút, hiệu quả khử trùng đạt cao nhất với tỷ lệ mẫu sống và sạch đạt 60%, tỷ lệ mẫu nhiễm 16,67%. Tuy nhiên, khi tăng thời gian khử trùng lên 15 phút thì tỷ lệ mẫu sống và sạch giảm rõ rệt, các mẫu theo dõi gần như chết hoàn toàn (93,33%). Điều này có thể được giải thích là do chất khử trùng $HgCl_2$

(0,1%) ngoài tác dụng diệt các vi sinh vật thì nó cũng gây độc cho mô nuôi cấy.

Thời gian khử trùng ảnh hưởng đến tỷ lệ mẫu sạch bệnh và mẫu nhiễm bệnh [4], thời gian khử trùng ngắn thì tỷ lệ mẫu nhiễm tăng, tăng thời gian khử trùng thì tỷ lệ mẫu nhiễm giảm nhưng tỷ lệ mẫu chết lại tăng. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Wesely và cs (2011) [5], Johnson và cs (2011) [6].

Xác định nồng độ BA, tổ hợp BAP và IBA thích hợp trong giai đoạn phát sinh chồi và nhân nhanh

Nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi: BAP là một trong những cytokinin có ảnh hưởng rất rõ rệt đến sự hình thành và phân hóa cơ quan của thực vật, đặc biệt là sự phân hóa chồi trong nuôi cấy mô tế bào thực vật [7].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng các đoạn thân mang mắt ngủ hoàn toàn sạch vi sinh vật cấy vào môi trường có bổ sung BAP ở các nồng độ khác nhau (0-2 mg/l). Sau 6 tuần nuôi cấy, đánh giá khả năng tái sinh chồi và sinh trưởng của chồi *in vitro*, chúng tôi thu được kết quả ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh và sinh trưởng của chồi *in vitro*.

Công thức	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao trung bình/chồi (cm)	Chất lượng chồi
Đ/C	0,00	0,00 ^d	0,00 ^e	-
Đ/C + 0,5 mg BAP/l	100,00	1,57 ^c	1,57 ^d	+++
Đ/C + 1,0 mg BAP/l	100,00	2,73^a	2,85^a	+++
Đ/C + 1,5 mg BAP/l	100,00	2,03 ^b	2,41 ^b	++
Đ/C + 2,0 mg BAP/l	100,00	1,40 ^c	2,02 ^c	+
LSD _{0,05}		0,31	0,31	

Ghi chú: Đ/C: môi trường MS + 30 g/l saccharose + 6,5 g/l agar. Trong cùng 1 cột, các chữ a, b, c... thể hiện sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức về mặt thống kê ở mức =0,05; +++: chồi to, khỏe, lá màu xanh đặc trưng; ++: chồi nhỏ, lá bé màu xanh nhạt; +: chồi nhỏ, sinh trưởng yếu.

Số liệu ở bảng 2 cho thấy, BAP có vai trò quyết định đến khả năng tái sinh chồi và sinh trưởng của chồi *in vitro*. Tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt 100% ở tất cả các công thức có bổ sung BAP, trong khi môi trường không bổ sung BAP hoàn toàn không có biểu hiện kích ứng tạo chồi. Trong phạm vi nồng độ BAP tăng từ 0,5 đến 1 mg/l, sự phát sinh chồi tăng theo chiều thuận với sự tăng nồng độ và cho hiệu quả phát sinh chồi cao nhất ở mức 1 mg BAP/l (tỷ lệ mẫu tạo chồi 100,00%, số chồi trung bình/mẫu đạt 2,73 chồi, chồi khỏe, đồng đều, màu xanh đặc trưng). Khi tăng nồng độ BAP lên 2,0 mg/l, số chồi trung bình/mẫu đã giảm rõ rệt (chỉ còn 1,40 chồi), đồng thời một số chồi được tạo ra bắt đầu có những biểu hiện thay đổi về hình thái bên ngoài như chồi nhỏ, lá bị

cong, mỏng nước, xuất hiện các khối callus màu xanh nhạt, sinh trưởng chậm. Như vậy, môi trường thích hợp để tái sinh chồi là MS + 1 mg/l BAP + 6,5 g agar/l + 30 g saccharose/l. Kết quả này cao hơn chút ít so với Hassan và cs (2010) [8] trong một nghiên cứu tương tự và phù hợp với nghiên cứu của Bùi Thị Cúc và cs (2017) [2] khi sử dụng nguồn vật liệu khởi đầu để tái sinh là đoạn thân cho khả năng tái sinh tốt hơn so với việc sử dụng mô lá.

Nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp BAP và IBA đến khả năng tăng hệ số nhân chồi và sinh trưởng của chồi: ảnh hưởng kết hợp giữa BAP với IBA đến khả năng tái sinh chồi, tăng hệ số nhân chồi và sinh trưởng của chồi *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và IBA đến khả năng tăng hệ số nhân chồi và sinh trưởng của chồi (sau 8 tuần nuôi cấy).

Công thức	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao trung bình/chồi (cm)	Số lá trung bình/chồi (cái)
Đ/C	15,16 ^b	2,09 ^{bc}	4,40 ^b
Đ/C + 0,1 mg IBA/l	17,87 ^a	2,63 ^{ab}	4,63 ^b
Đ/C + 0,2 mg IBA/l	19,53^a	2,80^a	5,17^a
Đ/C + 0,3 mg IBA/l	18,60 ^b	2,11 ^{bc}	3,62 ^c
Đ/C + 0,4 mg IBA/l	9,43 ^c	1,57 ^c	3,20 ^c
LSD _{0,05}	1,93	0,67	0,49

Ghi chú: Đ/C: môi trường MS + 1,0 mg/l BAP + 30 g/l saccharose + 6,5 g/l agar. Trong cùng 1 cột, các chữ a, b, c... thể hiện sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức về mặt thống kê ở mức =0,05.

Kết quả bảng 3 cho thấy, có sự khác biệt rõ rệt khi kết hợp BAP và IBA trong môi trường nuôi cấy so với công thức đối chứng (chỉ bổ sung 1 mg BAP/l). Cụ thể, môi trường bổ sung 1 mg BAP/l kết hợp với 0,2 mg IBA/l cho kết quả tốt nhất, thể hiện ở số chồi được tạo ra nhiều nhất (19,53 chồi/mẫu), chiều cao chồi và số lá cũng lớn nhất. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ IBA lên 0,4 mg/l, hệ số nhân chồi và chiều cao chồi thu được đều giảm so với công thức đối chứng. Như vậy, môi trường thích hợp để nhân nhanh chồi *in vitro* cây hoa Dạ yến thảo là MS + 1 mg BAP/l + 0,2 mg IBA/l + 6,5 g agar/l + 30 g saccharose/l. Kết quả nghiên cứu này cho hệ số nhân chồi cao hơn của Natanija và cs (2015) [9] khi nhân nhanh cây hoa Dạ yến thảo trên môi trường MS có bổ sung 0,8 mg/l BAP kết hợp với 0,1 mg/l NAA.

Xác định nguồn thực liệu nuôi cấy mô phù hợp

Một số cơ quan sinh dưỡng khác nhau bao gồm đoạn thân mang mắt ngủ, lá, chồi ngọn của cây *in vitro* được cấy vào môi trường dinh dưỡng cơ bản có bổ sung 1 mg BAP/l và 0,2 mg IBA/l nhằm xác định nguồn thực liệu phù hợp nhất thông qua các tiêu chí cơ bản như khả năng tạo chồi và chất lượng chồi sinh ra, kết quả được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của cơ quan nuôi cấy đến khả năng tạo chồi và sinh trưởng của chồi (sau 8 tuần nuôi cấy).

Công thức	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chất lượng chồi
Đoạn thân mang mắt ngủ	100,00	19,24	Chồi nhỏ, màu xanh đặc trưng
Chồi ngọn	100,00	18.17	Chồi nhỏ, màu xanh đặc trưng
Mô lá	100,00	21,53	Chồi mập, màu xanh đặc trưng
<i>LSD_{0,05}</i>		<i>1,39</i>	

Số liệu bảng 4 cho thấy, ở cả 3 cơ quan sử dụng để nuôi cấy tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo đều đạt 100%, sau đó tất cả các mô sẹo này đều phát triển tạo nên cụm chồi. Như vậy, sự kết hợp giữa BAP và IBA với tỷ lệ thích hợp có tác dụng kích thích sự hình thành callus và phân hóa các tế bào callus thành các chồi, trong đó mô lá cho kết quả tốt nhất, tỷ lệ mẫu tạo chồi 100%, số chồi/mẫu thu được cao nhất (21,53), chồi mập và có màu xanh đặc trưng. Kết quả nghiên cứu này cao hơn so với công bố của Hassan và cs (2010) [8] (bổ sung 2,0 mg/l BA vào môi trường nuôi cấy, tỷ lệ tái sinh cao nhất chỉ đạt 45%) và gần tương tự với nghiên cứu của Sara và Naglaa (2015) [10], Bùi Thị Cúc và cs (2017) [2].

Kết luận

Để tạo nguồn vật liệu khởi đầu cây hoa Dạ yến thảo bằng phương pháp *in vitro* có hiệu quả, cần thực hiện qua các bước sau đây:

1. Sử dụng đoạn thân mang mắt ngủ và khử trùng mẫu bằng $HgCl_2$ nồng độ 0,1% trong thời gian 10 phút đạt hiệu quả cao nhất, tỷ lệ mẫu sống và sạch đạt 60%.

2. Môi trường dinh dưỡng phù hợp để tái sinh chồi là MS + 1 mg/l BA + 6,5 g agar/l + 30 g saccarose/l. Tỷ lệ mẫu tạo chồi là 100%, số chồi/mẫu là 2,73. Môi trường dinh dưỡng phù hợp để nhân nhanh chồi là MS + 1 mg BA/l + 0,2 mg

IBA/l + 6,5 g agar/l + 30 g saccarose/l. Số chồi/mẫu đạt 19,53, chiều cao chồi 2,65 cm.

3. Cơ quan sinh dưỡng sử dụng để nhân nhanh chồi là mô lá của cây *in vitro*, 100% các chồi *in vitro* tái sinh thông qua hình thức mô sẹo, số chồi/mẫu là 21,53.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Phạm Hoàng Hộ (2000), *Cây cỏ Việt nam*, Nhà xuất bản Trẻ.
- [2] Bùi Thị Cúc, Đồng Huy Giới, Bùi Thị Thu Hương (2017), “Nhân nhanh *in vitro* cây Dạ yến thảo hoa hồng sọc tím (*Petunia hybrid*.)”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, **10**, tr.3-10.
- [3] T. Murashige, F. Skoog (1962), “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”, *Physiol. Plant*, **15**, pp.473-497.
- [4] K.E. Danso, et al. (2011), “Effective decontamination and subsequent plantlet regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) *in vitro*”, *International Journal of Integrative Biology*, **11**, pp.90-96.
- [5] E.G. Wesely, M.A.A. Johnson, M.S. Kavitha, N. Selvan (2011), “Micropropagation of *Alternanthera sessilis* (L.) using shoot tip and nodal segments”, *Iranian Journal of Biotechnology*, **9**, pp.206-212.
- [6] M Johnson, E.G. Wesely, M.S. Kavitha, V. Uma (2011), “Antibacterial activity of leaves and inter-nodal callus extracts of *Mentha arvensis* L.”, *Asian Pac. J. Trop. Med.*, **4**, pp.196-200.
- [7] Nguyễn Hoàng Lộc (1998), *Giáo trình nuôi cấy mô tế bào thực vật*, Nhà xuất bản Trường Đại học Khoa học Huế.
- [8] A.Q. Hassan, Anas Abu-Rayya, Y. Sami (2010), “*In vitro* regeneration and somaclonal variation *Petunia hybrida*”, *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, **18**, pp.71-81.
- [9] B. Nataniya, B. Ausra, J. Vaida (2015), “*In vitro* regeneration from leaf explants of *Petunia hybrida* L.”, *Journal of Propagation of Ornamental Plants*, **15**, pp.47-52.
- [10] E.G. Sara, M.E. Naglaa (2015), “*In vitro* preliminary study on *Petunia hybrida* breeding under Sodium Chloride stress condition”, *Middle East Journal of Agriculture Research*, **4**, pp.867-872.

Nghiên cứu ứng dụng đèn LEDs để kéo dài thời gian nuôi tảo xoắn *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) ở miền Bắc Việt Nam

Nguyễn Đức Bách*, Phí Thị Cẩm Miện, Kim Anh Tuấn, Nguyễn Thị Hiền, Vũ Lê Diệu Hương

Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 20/5/2021; ngày chuyển phản biện 26/5/2021; ngày nhận phản biện 30/6/2021; ngày chấp nhận đăng 5/7/2021

Tóm tắt:

Tảo xoắn *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) được nuôi ở Việt Nam chủ yếu làm thực phẩm chức năng cho người và thức ăn bổ sung cho thủy sản. Ở miền Bắc, thời điểm thích hợp nhất để nuôi trồng tảo *Spirulina* là từ đầu tháng 5 đến cuối tháng 9. Các thời điểm khác do cường độ ánh sáng và nhiệt độ giảm nên nuôi tảo cho năng suất thấp, đặc biệt là giai đoạn từ tháng 12 đến cuối tháng 2. Nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của đèn LED đến sự phát triển của tảo *Spirulina* trong các khoảng thời gian từ đầu tháng 3 đến cuối tháng 4 (T3-T4), từ đầu tháng 10 đến cuối tháng 11 (T10-T11) và từ đầu tháng 12 đến cuối tháng 2 (T12-T2) tại Hà Nội. Kết quả cho thấy, việc chiếu sáng đèn LED đỏ liên tục đã làm tăng năng suất và hàm lượng chlorophyll, carotenoid và phycocyanin trong hai giai đoạn (T3-T4) và (T10-T11). Việc bổ sung đèn LED đỏ và xanh không cho hiệu quả đáng kể ở giai đoạn T12-T2. Đèn LED xanh không có tác động đáng kể đến sự phát triển của *Spirulina*. Kết quả nghiên cứu tạo cơ sở ban đầu để ứng dụng đèn LED đỏ nhằm kéo dài thời gian nuôi tảo *Spirulina* ở miền Bắc Việt Nam.

Từ khóa: ánh sáng, đèn LED, miền Bắc Việt Nam, nhiệt độ, tảo xoắn *Spirulina*.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Tảo xoắn *Spirulina* là tên thường gọi chung của 2 loài vi khuẩn lam *Arthrospira platensis* và *Arthrospira maxima* có cấu trúc dạng sợi xoắn, phân bố rộng ở các thủy vực trên thế giới. Tảo xoắn *Spirulina* thuộc nhóm quang tự dưỡng, sinh trưởng tốt trong môi trường nước ấm, giàu khoáng và ưu kiềm. Tảo xoắn giàu protein (60-70% khối lượng khô) với thành phần axit amin cân đối và axit béo không no gamma-linolenic [1, 2]. Ngoài ra, tảo xoắn còn chứa nhiều sắc tố như chlorophyll, β -caroten, phycocyanin, xanthophyll, zeaxanthin, lutein, các khoáng chất như kẽm, sắt, magie và các loại vitamin nhóm B và E [3-5]. Chính vì vậy, tảo xoắn *Spirulina* được sử dụng làm thực phẩm chức năng hoàn hảo, giúp cân bằng nội tiết, tăng cường khả năng miễn dịch, ngăn ngừa lão hóa và giảm nguy cơ ung thư, được Tổ chức Y tế thế giới (WHO) công nhận là thực phẩm tốt nhất cho loài người trong thế kỷ XXI [5-8].

Ở miền Bắc Việt Nam, giai đoạn hè thu (tháng 5 đến tháng 10) tảo xoắn sinh trưởng tốt nhờ điều kiện ánh sáng và nhiệt độ phù hợp. Tuy nhiên, vào giai đoạn đông xuân (tháng 11 đến tháng 4) do thời tiết lạnh, cường độ ánh sáng thấp và thời gian chiếu sáng trong ngày giảm nên tảo sinh trưởng chậm. Trong đó, khoảng thời gian từ tháng 12 đến

cuối tháng 2 được coi là giai đoạn khó khăn nhất khi nuôi tảo ở miền Bắc do nhiệt độ xuống thấp và kéo trong nhiều ngày, dẫn đến hiệu ứng ức chế quang hợp (photoinhibition) xảy ra mạnh [9-11]. Để kéo dài thời gian nuôi tảo xoắn cần bổ sung ánh sáng và nâng nhiệt độ trong khu sản xuất tại các thời điểm cường độ ánh sáng giảm và nhiệt độ xuống thấp, chủ yếu ở giai đoạn đầu tháng 3 đến cuối tháng 4 và đầu tháng 11 đến cuối tháng 12. Tuy nhiên, trong thời điểm từ đầu tháng 1 đến cuối tháng 2 hàng năm, nhiệt độ và cường độ ánh sáng tụt giảm trong nhiều ngày, thậm chí xuống thấp hơn 15°C. Việc nâng nhiệt độ môi trường bể nuôi đòi hỏi nhiều giải pháp kỹ thuật và chi phí đầu tư lớn, đặc biệt là xây nhà kính khép kín, do đó, giải pháp bổ sung ánh sáng có tính khả thi hơn trong những giai đoạn khi nhiệt độ môi trường nuôi giảm nhưng vẫn ở mức cho phép tảo sinh trưởng [9-11]. Thực tế trong những năm gần đây cho thấy, mặc dù khoảng thời gian từ tháng 2 đến tháng 4 và từ tháng 11 đến tháng 12 cường độ ánh sáng và thời gian chiếu sáng tự nhiên giảm nhưng nhiệt độ vẫn ở trong phạm vi sinh trưởng của tảo xoắn, do đó có thể bổ sung chiếu sáng vào các khoảng thời gian này.

Đối với tảo xoắn *Spirulina*, sắc tố tham gia vào quang hợp bao gồm chlorophyll a (chlorophyll b chiếm tỷ lệ rất

*Tác giả liên hệ: Email: ndbach@vnua.edu.vn

Application of light-emitting diodes (LEDs) in the extension of the cultivation period of *Spirulina* in Northern Vietnam

Duc Bach Nguyen*, Thi Cam Mien Phi, Anh Tuan Kim, Thi Hien Nguyen, Le Dieu Huong Vu

Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture

Received 20 May 2021; accepted 5 July 2021

Abstract:

Spirulina (*Arthrospira platensis*) is cultured in Vietnam mainly as a functional food for humans and supplementary food for aquatic species. In the North, the most suitable time to cultivate *Spirulina* is from early May to late September. Other times, due to the decrease in light intensity and temperature, the growth of *Spirulina* significantly reduced and gave low yield, especially in the period from December to the end of February. This study investigated the influence of LEDs light on the growth of *Spirulina* during the periods from early March to late April (T3-T4), from early October to late November (T10-T11), and from early December to late February (T12-T2) in Hanoi. The results showed that the continuous irradiation of red LEDs increased the yield of *Spirulina* and pigments, phycocyanin, and chlorophyll in the two stages (T3-T4) and (T10-T11). The irradiation of both red and blue LEDs did not show a significant effect in the period T12-T2. Green LEDs did not significantly affect the growth of *Spirulina*. The research results provided an initial basis for the application of red LEDs to the extent of the cultivation time of *Spirulina* in the North of Vietnam.

Keywords: LED, light, Northern Vietnam, *Spirulina*, temperature.

Classification number: 4.6

nhỏ), carotenoid, phycocyanin. Trong đó, chlorophyll a là sắc tố quang hợp chủ yếu hấp thụ ánh sáng chủ yếu ở vùng ánh sáng xanh với đỉnh 430 nm và ánh sáng đỏ với đỉnh 662 nm; carotenoid hấp thụ ở vùng ánh sáng xanh với các đỉnh 440 và 470 nm; phycocyanin hấp thụ ở bước sóng đỉnh 605 nm [12, 13]. Do đó, việc bổ sung ánh sáng xanh và đỏ trong phạm vi đỉnh hấp thụ cực đại của các sắc tố sẽ góp phần tăng cường hiệu quả quang hợp của tảo xoắn.

Trong các loại đèn chiếu sáng hiện nay, đèn LED phát ra ánh sáng với bước sóng hẹp, hiệu suất chuyển đổi năng lượng cao nên có nhiều lợi thế trong việc sử dụng để nuôi tảo [14]. Gần đây, trên thế giới một số nghiên cứu đã sử dụng đèn LED để nuôi và sản xuất các hợp chất có giá trị từ tảo *Spirulina* trên cơ sở cung cấp ánh sáng đơn sắc ở vùng hấp thụ cực đại của các sắc tố quang hợp [15-21]. Ở Việt Nam, một số nghiên cứu ứng dụng đèn LED để nuôi tảo ở quy mô nhỏ và pilot đã được thực hiện [19-21]. Dựa trên cơ sở khoa học và điều kiện thực tiễn, nghiên cứu này đã khảo sát ảnh hưởng của đèn LED đỏ và đèn LED xanh ở các bước sóng 580 đến 720 nm (đỉnh 660 nm) và 430 đến 480 nm (đỉnh 460 nm) để nuôi tảo xoắn quy mô pilot trong các bể raceway ở các khoảng thời gian khác nhau tại huyện Gia Lâm, Hà Nội, nhằm đánh giá ảnh hưởng của đèn LED đến sự sinh trưởng của tảo xoắn, từ đó xác định được khoảng thời gian phù hợp để bổ sung đèn LED hiệu quả nhằm kéo dài thêm thời gian nuôi tảo trong năm ở miền Bắc Việt Nam.

Đối tượng và phương pháp

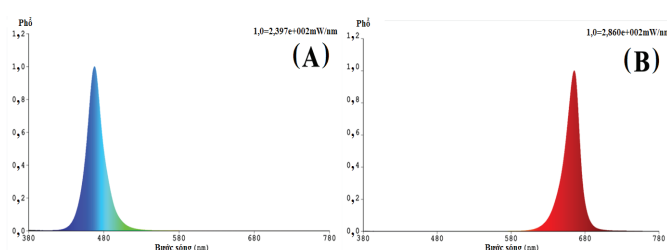
Đối tượng

Chủng giống tảo xoắn *Arthrospira platensis* NIES-46 được nhập từ Nhật Bản (Microbial Culture Collection/ National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan, 2018). Chủng *A. platensis* NIES-46 được nhân giống và nuôi trong môi trường Zarrouk [22] có hàm lượng (g/l): K_2HPO_4 (0,5), K_2SO_4 (1,0), $NaNO_3$ (2,5), $CaCl_2$ (0,04), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2), $EDTA \cdot Na_2 \cdot 2H_2O$ (0,08), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01), $NaHCO_3$ (16,8), vi lượng A5 (1 ml), B6 (1 ml). Trong đó, dung dịch A5 có thành phần (g/l): H_3BO_3 (2,88), $MnSO_4 \cdot H_2O$ (2,5), $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$ (0,222), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,079), $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ (0,021) và dung dịch B6 (mg/l): NH_4VO_3 (22,96), $K_2Cr_2(SO_4)_4 \cdot 24H_2O$ (96,0), $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ (47,85), $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ (17,94), $TiOSO_4 \cdot H_2SO_4 \cdot 8H_2O$ (61,1), $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (43,98), pH môi trường khoảng 8,5-9,0. Thí nghiệm được triển khai tại huyện Gia Lâm, Hà Nội từ 2018 đến 2020.

Điều kiện nuôi cấy

Trong nghiên cứu này, đèn LED được cung cấp bởi Trung tâm R&D chiếu sáng, Công ty Cổ phần bóng đèn

phích nước Rạng Đông, gồm đèn huỳnh quang ánh sáng trắng T8 Deluxe 22 W 1,2 m, bóng thủy tinh, nguồn rời (model: BD TT01 NR M11/22Wx1). Đèn LED dài 1,2 mét, công suất 25 W gồm LED xanh (B) và LED đỏ (R) phát ra ánh sáng xanh từ 430 đến 480 nm (đỉnh 460 nm) và ánh sáng đỏ từ 580 đến 720 nm (đỉnh 660 nm) (hình 1). Trong khoảng thời gian thí nghiệm, đèn LED được chiếu bổ sung liên tục 24/24. Mức độ ảnh hưởng của đèn LED được đánh giá thông qua đường cong sinh trưởng, mật độ quang của huyền phù tảo được đo ở bước sóng 750 nm (A_{750}) và sinh khối tảo được quy đổi theo khối lượng tảo khô trong 1 lít huyền phù tảo (g/l).



Hình 1. Phổ phát quang của đèn LED xanh và đỏ. (A) Đèn LED xanh 25 W Rạng Đông, đỉnh 467 nm, cường độ PPF 26,643 $\mu\text{mol/s}$; (B) Đèn LED đỏ 25 W Rạng Đông, đỉnh 666 nm, cường độ PPF 41,371 $\mu\text{mol/s}$ (do bằng thiết bị HaasSuite (EVERFINE)).

Trong các thí nghiệm sử dụng đèn LED, khoảng cách đèn được đặt 20 cm từ nguồn sáng tới bình nuôi tảo hoặc bề mặt tảo nuôi trong 5 bể raceway (diện tích 50 m², 25x2 m, được đặt trong nhà lưới có mái che bằng nylon trong suốt) tại huyện Gia Lâm, Hà Nội. Tảo được nuôi trong bể raceway với mật độ tiếp giống ban đầu 0,12 g/l và khuấy trộn với tốc độ dòng chảy 20 cm/s bằng cánh khuấy.

Phương pháp nghiên cứu

Nhân tảo giống trong phòng thí nghiệm: chủng giống được nhân từ đĩa thạch, qua từng bước nâng dần thể tích trong môi trường Zarrouk ở nhiệt độ phòng ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) bằng đèn huỳnh quang ánh sáng trắng, chu kỳ sáng:tối 16:8, sục khí qua màng lọc với tốc độ 5 l/phút. Sau đó, chủng giống được nâng lên thể tích 2,0 l trong bình thủy tinh Pyrex và nuôi trong nhà lưới có mái che cắt sáng (cường độ ánh sáng được điều chỉnh trong ngưỡng 15-25 klux, tương đương 270 đến 463 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Khi giống đạt độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 750 nm (A_{750}) là 0,8 (tương đương 0,85 g tảo khô/l) thì được chuyển sang bể raceway nhỏ (diện tích 2 m²) để tiếp tục nhân giống với tỷ lệ pha loãng giống 1:5 (v/v). Sau khi giống đạt mật độ tương tự như trên sẽ được chuyển sang bể giống lớn diện tích 50 m² với mật độ ban đầu 0,12 g/l. Môi trường Zarrouk được sử dụng cho tất cả các thí nghiệm và nhân sinh khối trong bể raceway. Môi trường được khử khuẩn qua đèn (12 giờ) trước khi tiếp giống bằng

cách sử dụng 6 đèn UV chìm công suất mỗi đèn 120 W đặt cách nhau 9 m.

Xác định năng suất sinh khối và tốc độ sinh trưởng riêng: tốc độ sinh trưởng của tảo *A. platensis* được xác định dựa vào khối lượng khô và mật độ quang (độ hấp thụ ánh sáng) ở bước sóng 750 nm (A_{750}) [23, 24]. Năng suất sinh khối được xác định theo phương trình: $PX = (X_t - X_0)/(t - t_0)$, trong đó: X_t là sinh khối (g/l) ở thời gian t (tính theo ngày) và X_0 là lượng sinh khối (g/l) ở thời điểm t_0 là thời điểm bắt đầu sau khi cấy giống. Tốc độ sinh trưởng riêng hay đặc trưng (μ) được xác định theo phương trình $\mu = \ln(X_t/X_0)/(t - t_0)$, khi tảo đang sinh trưởng ở trong pha logarit. Thời gian nhân đôi hay thời gian thế hệ (doubling time) $T_d = \ln(2)/\mu$ (theo ngày) [25].

Xác định mối tương quan giữa khối lượng tảo khô và mật độ quang A_{750} : khối lượng tảo khô được xác định như sau: lấy 100 ml huyền phù tảo nuôi ở giai đoạn cuối của pha logarit lọc qua giấy lọc (Whatman GF/C filter No. 1), sấy khô ở 60°C cho tới khi khối lượng không đổi (khoảng 10 giờ), và xác định khối lượng bằng cách cân trực tiếp (OHAUS PX225D, Trung Quốc). Khối lượng khô (g/l) được tính bằng sự chênh lệch giữa khối lượng của giấy lọc có chứa tảo trước và sau khi đã sấy khô. Mối tương quan giữa A_{750} với khối lượng tảo khô được xây dựng dựa vào phân tích tương quan giữa các giá trị A_{750} tương ứng với các mức độ pha loãng huyền phù tảo [23, 24]. Đồ thị tương quan được xây dựng theo phương trình tuyến tính dạng $y = ax + b$ với hệ số tương quan R.

Xác định ảnh hưởng của đèn LED: thí nghiệm được tiến hành trong 4 khoảng thời gian: i) từ tháng 3 đến hết tháng 4 (T3-T4); ii) từ tháng 5 đến hết tháng 9 (T5-T9); iii) từ tháng 10 đến hết tháng 11 (T10-T11) và (iv) từ tháng 12 đến hết tháng 2 (T12-T2) trong 3 năm (2018-2020). Theo chiều dài 25 m của mỗi bể raceway, 6 đèn LED đỏ hoặc LED xanh được đặt ở một phía của bể, khoảng cách các đèn cách nhau 3 m và đèn cách mặt nước nuôi tảo 20 cm. Cường độ ánh sáng phát ra của đèn LED đỏ và LED xanh với PPF (Photosynthetic Photon Flux) tương ứng 40,948 và 26,643 mmol/s. Trong thời gian thí nghiệm, các đèn LED được chiếu sáng liên tục (cả ngày và đêm) trong khi vẫn được chiếu sáng bằng ánh sáng tự nhiên vào ban ngày với mục tiêu đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung đèn LED trong quá trình nuôi tảo ở quy mô sản xuất pilot trong các khoảng thời gian nêu trên. Ảnh hưởng của đèn LED đến sinh trưởng của tảo được đánh giá thông qua năng suất tảo khô tính theo g/l, đường cong sinh trưởng, tốc độ sinh trưởng riêng (μ) và thời gian thế hệ. Trong đó, đường cong sinh trưởng được xác định dựa vào mối tương quan giữa thời gian nuôi và lượng sinh khối tính theo khối lượng tảo khô/thể tích huyền

phù tảo (g/l) khi theo dõi liên tục trong 20 ngày, tính từ ngày bắt đầu tiếp giống vào môi trường.

Xác định hàm lượng các sắc tố: hàm lượng các sắc tố được xác định theo phương pháp của Aouir và cs (2017) [26] như sau: bột tảo khô (1 g) được nghiền trong acetone và khuấy mạnh bằng máy khuấy từ (Model 85-2, Trung Quốc). Hỗn hợp được đặt trong tối ở 4°C và ly tâm ở 4000 g trong 10 phút (Centrifuge 5403, Eppendorf, Đức). Dịch trong chứa các sắc tố chlorophyll a (Chl_a), chlorophyll b (Chl_b) và carotenoid tổng số (C_t) được phân tích sử dụng máy đo quang phổ (Shimadzu, UV-2600, Nhật Bản). Hàm lượng Chl_a , Chl_b và C_t (mg/g) được xác định ở bước sóng 645, 662 và 470 nm theo công thức của Lichtenthaler: $Chl_a = 13,75.A_{664} - 5,19.A_{649}$, $Chl_b = 27,43.A_{649} - 8,12.A_{664}$, $C_t = 1000.A_{470} - 2,13.Chl_a - 97,64.Chl_b/209$ [27]. Trong đó, A_{662} , A_{645} và A_{470} là độ hấp thụ ở ánh sáng tương ứng với các bước sóng 662, 645 và 470 nm. Hàm lượng phycocyanin được xác định theo phương pháp của Yoshikawa (2008) [28]. Bột tảo khô (2 g) được ngâm trong dung dịch đệm phosphate 0,1 M chứa Na_2HPO_4 và KH_2PO_4 (pH 6,5), trộn đều và ủ ở trong bể ổn nhiệt 30°C trong 16 giờ. Sau đó, dung dịch được ly tâm trong 20 phút tại 10°C ở 4000 g và dịch nổi chứa PC được thu lại. Dịch nổi được đo độ hấp thụ ở bước sóng 620, 650 và 280 nm. Hàm lượng phycocyanin (mg/ml) được xác định theo công thức: $[PC] = [A_{620} - (0,72.A_{650})]/6,29$. Hàm lượng aphyocyanin (mg/ml) $= [A_{650} - (0,191.A_{620})]/5,79$ [25]. Trong đó, A_{620} và A_{650} là độ hấp thụ quang học ở các bước sóng 620 và 650 nm. Độ sạch của PC (c-phycocyanin) được đánh giá dựa vào tỷ lệ A_{620}/A_{280} , giá trị từ 0,65 đến 0,82 được coi là sạch [29]. Hàm lượng sau đó được quy đổi theo khối lượng tảo khô sử dụng để tách chiết tính theo mg/g.

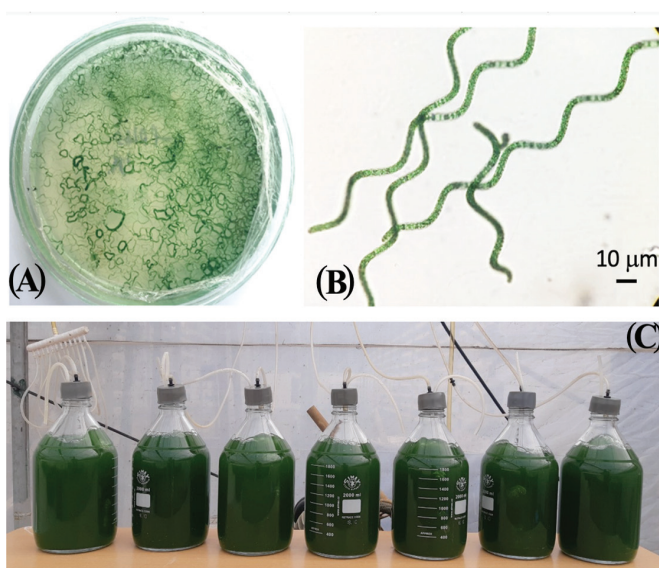
Phân tích số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần để phân tích giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (SD). Chương trình Microsolf Excel (2016) được sử dụng để vẽ các đồ thị. Sự sai khác giữa các giá trị trung bình được phân tích bằng phân tích phương sai (ANOVA) với mức ý nghĩa $p=0,05$. Hậu kiểm (Tukey's test) được áp dụng để xác định sự khác nhau giữa cặp các giá trị trung bình trong các thí nghiệm.

Kết quả và thảo luận

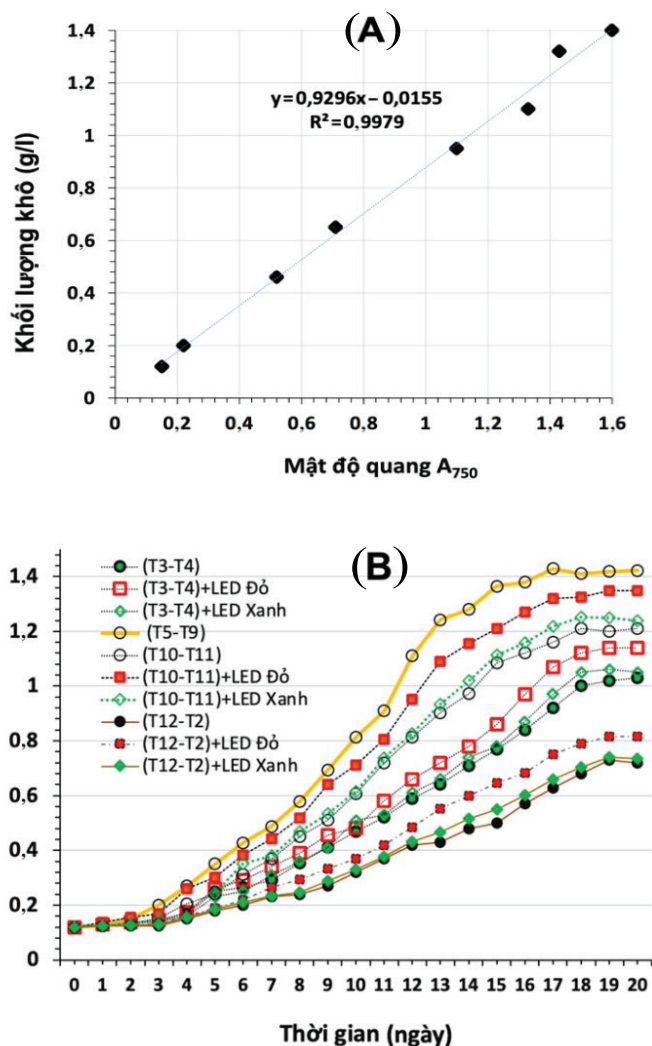
Xác định đường cong sinh trưởng và khối lượng tảo khô

Chủng giống *A. platensis* NIES-46 được nhân lên từ đĩa thạch bằng môi trường Zarrouk lỏng trong các bình thủy tinh với thể tích tăng dần từ 200 đến 1000 ml trong phòng thí nghiệm. Sau đó tảo giống tiếp tục được nhân lên trong các bình thủy tinh Pyrex 2 l trong nhà lưới (hình 2).



Hình 2. Chủng giống tảo xoắn *A. platensis* NIES-46. (A) Chủng giống được lưu giữ trên đĩa thạch, (B) Hình thái chủng giống dưới kính hiển vi quang học với độ khuếch đại 100 lần (thang 10 μ m), (C) Tảo giống được nhân trong bình thủy tinh Pyrex 2 l trong nhà lưới.

Các thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của đèn LED được thực hiện 3 mẻ liên tục từ đầu tháng 3 đến cuối tháng 4 với thời gian mỗi mẻ 20 ngày tính từ ngày tiếp giống. Khi phân tích đường cong sinh trưởng của chủng NIES-46 ở quy mô bể nuôi raceway 50 m² cho thấy, giai đoạn T3-T4, tảo sinh trưởng chậm, mật độ tảo đạt tối đa $1,07 \pm 0,05$ ở bể đối chứng (không chiếu bổ sung đèn LED đỏ), trong khi thí nghiệm chiếu bổ sung đèn LED đỏ mật độ tảo đạt $1,12 \pm 0,07$ (hình 3, bảng 1). Nguyên nhân của việc tăng mật độ tảo khi chiếu sáng bổ sung bằng đèn LED từ tháng 3 đến cuối tháng 4 chủ yếu là do cường độ và thời gian chiếu sáng trong ngày ở giai đoạn này tương đối thấp (từ 5-6 giờ/ngày), nhiệt độ trong bể nuôi thấp (dao động từ 18-25°C) và thời tiết biến động mạnh. Việc bổ sung đèn LED xanh mặc dù có tác dụng tăng mật độ tế bào nhưng mức độ tăng không có ý nghĩa thống kê. Tiếp đó, giai đoạn T5-T9, tảo sinh trưởng nhanh và cho năng suất cao nhất, đây cũng là khoảng thời gian lý tưởng nhất để nuôi tảo ở miền Bắc Việt Nam. Số liệu theo dõi liên tục trong 3 năm (2018-2020) cho thấy, năng suất tảo cao nhất trong giai đoạn T5-T9 đạt $1,41 \pm 0,08$ g/l, tương đương $A_{750} = 1,53$ (hình 3B, bảng 1). Trong 2 tháng, giai đoạn T10-T11, mặc dù nhiệt độ và cường độ ánh sáng đã giảm nhưng thời tiết tương đối ổn định, do đó, tảo vẫn sinh trưởng tốt, thời gian đạt pha cân bằng từ 17-18 ngày và năng suất cao nhất đạt $1,21 \pm 0,06$ g/l ở ngày thứ 18 (hình 3B). Tuy nhiên, khi chiếu ánh sáng LED liên tục trong giai đoạn này đã giúp tăng mật độ tảo lên $1,36 \pm 0,11$ vào ngày thứ 17 ($p < 0,01$). Thực tế qua khảo sát từ



Hình 3. Tương quan giữa mật độ quang với khối lượng khô và đường cong sinh trưởng. (A) Mối tương quan giữa khối lượng khô (g/l) và mật độ quang (A_{750}) đo ở bước sóng 750 nm, (B) Đường cong sinh trưởng của tảo theo thời gian ở các điều kiện nuôi khác nhau.

2018 đến 2020, trong giai đoạn T12-T2, cường độ ánh sáng và thời gian chiếu sáng trong ngày giảm mạnh, đồng thời nhiệt độ trong bể nuôi giảm xuống mức thấp hơn 15°C và kéo dài hàng tuần. Trong điều kiện này, việc nuôi tảo rất khó khăn bởi vì việc chiếu sáng bổ sung bằng đèn LED không có tác động tích cực do hiệu ứng quang ức chế trong điều kiện nhiệt độ thấp [9-11]. Chính vì vậy, nhiều cơ sở nuôi tảo trong nước và khu vực châu Á đã dừng nuôi trong giai đoạn này, do đó, thời gian nuôi tảo trong năm thường bị giảm đáng kể [30, 31]. Đường cong sinh trưởng của tảo ở giai đoạn T12-T2 biểu hiện tăng chậm, không thể hiện rõ pha sinh trưởng logarit và sau từ 18 đến 20 ngày tảo mới đạt pha cân bằng với mật độ tương đối thấp (0,6-0,7 g/l) (hình 3B).

Bảng 1. Khối lượng khô tối đa và hàm lượng sắc tố của chủng NIES-46 nuôi ở các điều kiện khác nhau.

Điều kiện nuôi	Khối lượng khô tối đa (g/l)	Hàm lượng các sắc tố (mg/g khô)			Tỷ lệ Chl/Ct
		Phycocyanin	Chlorophyll (Chl)	Carotenoid (Ct)	
(T3-T4)	$1,07 \pm 0,05^a$	$121,03 \pm 7,4^a$	$5,76 \pm 0,11^a$	$2,69 \pm 0,18^a$	2,14
(T3-T4) + LED đỏ	$1,16 \pm 0,08^b$	$137,46 \pm 9,37^b$	$5,85 \pm 0,10^b$	$2,52 \pm 0,08^a$	2,32
(T3-T4) + LED xanh	$1,12 \pm 0,07^a$	$125,63 \pm 7,22^a$	$5,54 \pm 0,12^c$	$2,78 \pm 0,13^a$	1,99
(T5-T9)	$1,41 \pm 0,08^c$	$158,98 \pm 8,78^c$	$6,53 \pm 0,13^c$	$2,85 \pm 0,16^b$	2,29
(T10-T11)	$1,21 \pm 0,06^b$	$135,03 \pm 9,75^b$	$5,96 \pm 0,07^b$	$2,63 \pm 0,09^a$	2,27
(T10-T11) + LED đỏ	$1,36 \pm 0,11^c$	$147,16 \pm 7,26^c$	$6,29 \pm 0,12^d$	$2,57 \pm 0,11^a$	2,45
(T10-T11) + LED xanh	$1,25 \pm 0,10^b$	$130,52 \pm 9,56^a$	$6,15 \pm 0,16^d$	$2,96 \pm 0,18^b$	2,08
(T12-T2)	$0,73 \pm 0,09^d$	$138,63 \pm 7,59^d$	$5,68 \pm 0,15^d$	$2,89 \pm 0,12^b$	1,97
(T12-T2) + LED đỏ	$0,82 \pm 0,07^d$	$138,51 \pm 9,12^d$	$5,47 \pm 0,10^d$	$2,75 \pm 0,09^a$	1,99
(T12-T2) + LED xanh	$0,76 \pm 0,09^d$	$136,47 \pm 8,96^d$	$5,34 \pm 0,09^d$	$3,02 \pm 0,12^b$	1,77

Ghi chú: các chỉ số a,b,c và d thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$) khi so sánh giá trị trung bình giữa các nhóm công thức thí nghiệm. Các giá trị khối lượng khô và hàm lượng các sắc tố được phân tích dựa vào số liệu thu được từ kết quả của 3 mẻ nuôi/năm qua các năm 2018, 2019 và 2020.

Ảnh hưởng của đèn LED đến sinh trưởng của tảo về hiệu quả kinh tế

Khi so sánh ảnh hưởng của việc chiếu bổ sung đèn LED liên tục (24/24) tới sinh trưởng của tảo khi nuôi trong nhà lưới ở các giai đoạn T3-T4 và T10-T11 cho thấy, việc bổ sung đèn LED đỏ ở bước sóng 580 đến 720 nm (đỉnh 660 nm) cho tốc độ sinh trưởng và năng suất cao hơn khoảng 10-12% so với không bổ sung ánh sáng (nuôi trong điều kiện ánh sáng tự nhiên) (hình 3B). Khi so sánh với đối chứng T5-T9, việc bổ sung đèn LED đỏ, mặc dù có kích thích sinh trưởng của tảo nhưng thời gian để đạt tới pha cân bằng vẫn kéo dài hơn từ 3 đến 4 ngày và năng suất thấp hơn tương ứng khoảng 10% ở giai đoạn T10-T11 và 18% ở giai đoạn T3-T4. Xét về mặt hiệu quả kinh tế, ở giai đoạn T10-T11, việc bổ sung đèn LED đỏ có tác động tích cực tới sự sinh trưởng của tảo, năng suất tăng 10-12%. Tuy nhiên, mức tăng này cũng chỉ bằng gần 80% so với đối chứng T5-T9. Ảnh hưởng của đèn LED đỏ và xanh đối với thành phần sắc tố phycocyanin, chlorophyll và carotenoid không rõ rệt đáng kể. Ở giai đoạn T10-T11, việc bổ sung đèn LED đỏ kích thích sinh trưởng của tảo đi kèm với việc tăng hàm lượng phycocyanin 8,2% và chlorophyll 5,5% so với việc không chiếu đèn. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu về tác động của đèn LED đỏ và xanh đến sản xuất phycocyanin [17, 32-34]. Trong điều kiện thí nghiệm, tác động của đèn LED xanh và LED đỏ đến hàm lượng sắc tố thuộc nhóm carotenoid không thực sự rõ rệt so với đối chứng (bảng 1).

Trong điều kiện thí nghiệm ở quy mô pilot, việc sử dụng đèn LED công suất 25 Wh chiếu sáng liên tục 24/24 khi nuôi theo dạng mẻ 15 ngày (thu sinh khối khi tảo phát triển

gần cuối pha logarit, với giá trị A_{750} khoảng 1,1-1,2) với 6 bóng đèn tiêu thụ 54 kWh cho mỗi bể raceway 50 m² (hình 4A, B). Tính trung bình thời gian nuôi tảo mỗi mẻ từ 12-13 ngày, lượng tảo thu được của mỗi bể diện tích 50 m² khoảng 4 kg tảo khô/mẻ. Tại thời điểm nghiên cứu (2018-2020), 1 kWh điện giá từ 1500 đến 2000 đồng thì chi phí điện năng khi bổ sung đèn LED cho 1 mẻ đối với 1 bể nuôi khoảng 80 đến 110 nghìn đồng. Nếu giá tảo dao động từ 1,0 đến 1,5 triệu đồng/kg khô thì với mức tăng năng suất 10-12% hoàn toàn có thể bù được năng lượng điện tiêu hao để duy trì sản xuất. Như vậy, xét ở khía cạnh chi phí điện năng và lợi ích đem lại, việc bổ sung chiếu sáng bằng đèn LED đỏ có hiệu quả về mặt kinh tế. Tuy nhiên, việc đầu tư đèn LED ban đầu là khá lớn, do đó hiệu quả kinh tế thực cần phải tính toán đến diện tích nuôi. Theo tính toán sơ bộ trong điều kiện nghiên cứu này, với diện tích nuôi thực 1000 m² (20 bể nuôi raceway với diện tích 50 m²/bể) thì việc đầu tư và sử dụng đèn LED hoàn toàn đem lại lợi ích về mặt kinh tế.

Ở giai đoạn T3-T4, mặc dù năng suất tảo tăng khoảng 10% khi sử dụng đèn LED đỏ so với không sử dụng nhưng năng suất so với đối chứng (T5-T9) là thời điểm thuận lợi nhất vẫn thấp hơn 18%. Do đó, việc áp dụng đèn LED ở giai đoạn này cần phải tính toán chặt chẽ đến các tham số như tổng chi phí điện năng, nhân công và giá thành thương mại. Qua khảo sát thị trường tảo xoắn tươi những năm gần đây, nhu cầu sử dụng tảo tươi ở giai đoạn T3-T4 vẫn khá cao, do đó vẫn có thể áp dụng đèn LED đỏ để duy trì nuôi tảo (số liệu không công bố). Tuy nhiên, nếu để thu tảo ở dạng bột khô thì việc duy trì sản xuất cần phải tính toán chi tiết hơn về quy mô, năng suất, công nghệ cũng như điều kiện nuôi tại mỗi cơ sở nuôi tảo, vì về cơ bản điều kiện thời tiết miền Bắc không thuận lợi so với các vùng khác trong cả nước.

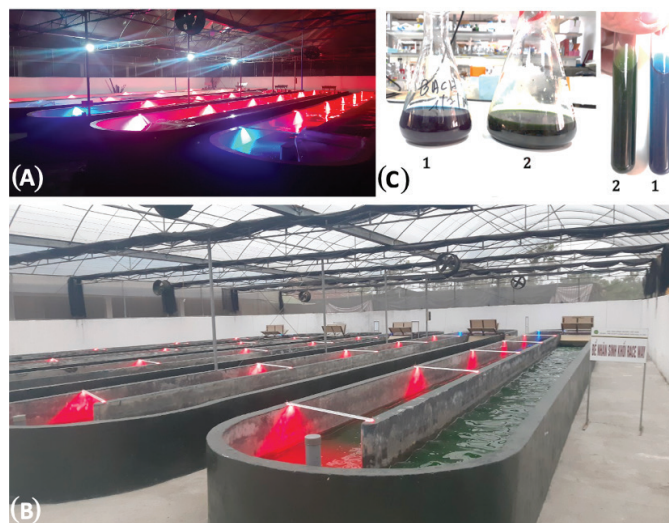
Phân tích ảnh hưởng của đèn LED xanh cho thấy, đèn LED xanh có tác dụng kích thích sự sinh trưởng của tảo xoắn *Spirulina* ở cả giai đoạn T3-T4 và T11-T12 nhưng không đáng kể (hình 3B và bảng 1). Tuy nhiên, trong điều kiện thử nghiệm này, việc chiếu sáng bổ sung liên tục bằng đèn LED xanh lại có tác dụng làm giảm đáng kể sự hình thành biofilm và mật độ động vật nguyên sinh trong bể raceway (dữ liệu chưa công bố) [19]. Điều này có thể do ánh sáng xanh ức chế một phần sự hoạt động của các vi khuẩn và nguyên sinh động vật. Tác động ức chế vi khuẩn, nguyên sinh động vật và các dạng ký sinh bởi đèn LED xanh cũng đã được mô tả bởi một số nghiên cứu [19, 34, 35]. Mặc dù vậy, xét về mặt năng suất và giá trị kinh tế, việc sử dụng đèn LED xanh để nuôi tảo trong các giai đoạn T3-T4 và T11-T12 cần phải tính toán chi phí nhân công, vật tư tiêu hao và chi phí đầu tư mua đèn.

Ở giai đoạn T12-T2, hiệu ứng của đèn LED không được thể hiện rõ rệt, nguyên nhân có thể là do hiện tượng quang ức chế (photoinhibition) nhiệt độ trong bể nuôi xuống thấp dưới ngưỡng hoạt động của hệ thống quang hợp. Đây cũng là hiện tượng phổ biến xảy ra không chỉ ở điều kiện khí hậu

miền Bắc Việt Nam mà còn ở nhiều vùng sinh thái khác trên thế giới [9, 10, 31, 36]. Do đó, việc kiểm soát nhiệt độ hoặc theo dõi nhiệt độ trong bể nuôi là điều kiện bắt buộc để duy trì sản xuất nếu nuôi tảo trong giai đoạn T12-T2.

Ảnh hưởng của đèn LED đến khối lượng khô tối đa và hàm lượng sắc tố

Phân tích khối lượng khô và hàm lượng các sắc tố cho thấy có sự khác biệt rõ rệt về khối lượng khô khi nuôi ở các thời điểm khác nhau trong năm. Tảo nuôi ở giai đoạn T3-T4 cho khối lượng khô tối đa đạt 1,07 g/l sau 18 ngày nuôi, trong khi vào giai đoạn T5-T9, giá trị này đạt cao nhất 1,41 g/l (gấp 1,32 lần). Hàm lượng chlorophyll tỷ lệ với tốc độ sinh trưởng và mật độ của tảo, cao nhất vào giai đoạn T5-T9 6,53 mg/g (hình 3B và bảng 1). Trong 3 năm (2018-2020), cường độ ánh sáng có thể đạt mức 60 klux (1110 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) tại bề mặt bể nuôi vào thời điểm từ 13 đến 15 giờ, cường độ này vượt ngưỡng phù hợp cho tảo sinh trưởng từ 30-40 klux (556-740 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) [1, 37].



Hình 4. Nghiên cứu ảnh hưởng của đèn LED và tách chiết sắc tố từ tảo xoắn *Spirulina*. Hình ảnh minh họa ảnh hưởng của đèn LED đến sinh trưởng của chủng NIES-46 ban đêm (A) và ban ngày (B) trong khoảng thời gian từ T2-T4 năm 2019 thực hiện tại Gia Lâm, Hà Nội. Kết quả tách các sắc tố từ tảo xoắn *Spirulina* (C), trong đó dung dịch phycocyanin (1) và dung dịch chlorophyll (2).

Khi so sánh tỷ lệ chlorophyll/carotenoid ở các giai đoạn tháng T2-T4, T10-T12 và đối chứng T5-T9 cho thấy tỷ lệ tương ứng 2,14, 2,26 và 2,46 (bảng 1), chứng tỏ giai đoạn T5-T9 tốc độ sinh trưởng của tảo đạt cao nhất. Theo nghiên cứu của Valdés và cs (2016) [38], hàm lượng chlorophyll cao tỷ lệ với tốc độ sinh trưởng của vi tảo nói chung, trong đó có tảo xoắn *Spirulina*. Trong điều kiện thí nghiệm, tốc độ sinh trưởng riêng (μ) ở giai đoạn T5-T9 đạt cao nhất 0,176, tương đương với thời gian thế hệ (nhân đôi) của tảo khoảng 3,94 ngày/thế hệ (bảng 2). Việc chiếu đèn LED đỏ giúp tăng tỷ lệ chlorophyll/carotenoid ở tất cả các công thức

thí nghiệm (bảng 1), chứng tỏ ánh sáng LED đỏ có tác dụng kích thích tăng trưởng của tảo xoắn *Spirulina*, điều này cũng phù hợp với kết quả phân tích khối lượng khô tối đa trong các công thức thí nghiệm.

Bảng 2. Tốc độ sinh trưởng riêng và thời gian nhân đôi của tảo trong các điều kiện khác nhau.

Các điều kiện thí nghiệm	Tốc độ sinh trưởng riêng (μ)	Thời gian nhân đôi (ngày)
(T3-T4)	0,157 $\pm$ 0,023 ^a	4,41 $\pm$ 0,43 ^a
(T3-T4) + LED đỏ	0,171 $\pm$ 0,034 ^b	4,05 $\pm$ 0,31 ^b
(T3-T4) + LED xanh	0,163 $\pm$ 0,027 ^a	4,25 $\pm$ 0,58 ^a
(T5-T9)	0,176$\pm$0,043^b	3,94$\pm$0,43^c
(T10-T11)	0,163 $\pm$ 0,033 ^a	4,25 $\pm$ 0,53 ^a
(T10-T11) + LED đỏ	0,178 $\pm$ 0,042 ^b	3,89 $\pm$ 0,37 ^c
(T10-T11) + LED xanh	0,165 $\pm$ 0,018 ^a	4,20 $\pm$ 0,39 ^a
(T12-T2)	0,129 $\pm$ 0,024 ^c	5,37 $\pm$ 0,60 ^d
(T12-T2) + LED đỏ	0,142 $\pm$ 0,024 ^d	4,88 $\pm$ 0,51 ^c
(T12-T2) + LED xanh	0,13 $\pm$ 0,021 ^c	5,33 $\pm$ 0,42 ^d

Ghi chú: các chỉ số a, b, c, d và e thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$) khi so sánh giá trị trung bình giữa các nhóm công thức thí nghiệm. Các giá trị tốc độ sinh trưởng riêng (μ) và hàm lượng các sắc tố được phân tích dựa vào số liệu thu được từ kết quả của 3 mẻ nuôi/năm qua các năm 2018, 2019 và 2020.

Thực tế, dải phổ hấp thụ ánh sáng của các sắc tố của vi tảo bao gồm chủ yếu là chlorophyll a, phycocyanin và phycobilisome (một phần phycoerythrin) phổ hấp thụ ánh sáng đỏ từ 580 đến 720 nm (đỉnh 660 nm) thuộc quang hệ II. Đối với tảo xoắn *Spirulina*, thành phần Chl_a chiếm tỷ lệ lớn trong khi thành phần Chl_b chỉ chiếm tỷ lệ nhỏ. Đỉnh hấp thụ của Chl_a chủ yếu ở bước sóng 662 nm và một phần ở vùng ánh sáng xanh với đỉnh 430 nm. Phycocyanin là nhóm sắc tố thuộc nhóm phycobiliprotein có mặt ở vi khuẩn lam, trong đó ở tảo xoắn *Spirulina*, tùy thuộc vào điều kiện nuôi mà tỷ lệ phycocyanin sẽ chiếm từ 9-20% khối lượng khô [39, 40]. Phycocyanin hấp thụ vùng ánh sáng đỏ, trong đó đỉnh hấp thụ ở bước sóng 605 nm. Chính vì vậy, việc sử dụng ánh sáng LED đỏ sẽ phù hợp cho cả hai loại sắc tố Chl_a và phycocyanin, giúp tảo sinh trưởng tốt và hiệu quả hơn.

Kết luận

Trong điều kiện ở miền Bắc Việt Nam, giai đoạn T5-T9 phù hợp nhất để nuôi tảo *Spirulina*. Ở mật độ cấy giống 0,12 g/l, sau 12 đến 13 ngày cho hiệu quả thu hoạch tốt nhất. Đèn LED đỏ từ 580-720 nm (đỉnh 660 nm) có tác dụng kích thích sinh trưởng và tăng hàm lượng chlorophyll ở tảo xoắn *Spirulina* trong giai đoạn T3-T4 và T10-T11 nuôi ở quy pilot tại Gia Lâm, Hà Nội. Việc bổ sung chiếu sáng bằng đèn LED đỏ giúp tăng năng suất và kéo dài thời gian nuôi thêm từ 2 đến 3 tháng/năm, đặc biệt ở giai đoạn T10-T12. Đèn LED xanh từ 430-480 nm (đỉnh 460 nm) mặc dù có tác động tăng sinh trưởng của tảo nhưng chưa thực sự hiệu quả

trong điều kiện thử nghiệm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được cấp kinh phí từ đề tài: “Nghiên cứu công nghệ sản xuất sản phẩm giàu chất chống oxy hóa từ 3 loài vi tảo *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis* và *Dunalliella salina*”, thuộc Dự án thành phần “Tăng cường năng lực khoa học công nghệ và đào tạo nguồn nhân lực phục vụ tái cơ cấu nông nghiệp và xây dựng nông thôn mới”, mã số ĐTKHCN.WB.10/20. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Vonshak (1997), *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology, CRC Press, DOI: 10.1201/9781482272970.
- [2] A.L.C. Menegotto, C. Luciane, C.E. Cristiane (2016), “Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **97**(3), pp.724-732.
- [3] W.S. Park, H.J. Kim, M. Li, D.H. Lim, J. Kim, J.J. Kwak, C.M. Kang, M.G. Ferruzzi, M.J. Ahn (2018), “Two classes of pigments, carotenoids and C-Phycocyanin, in *Spirulina* powder and their antioxidant activities”, *Molecules*, **23**(8), DOI: 10.3390/molecules23082065.
- [4] M.R. Farag, M. Alagawany, M.E.A.E. Hack, K. Dhama (2016), “Nutritional and health aspects of *Spirulina* (Arthrospira) for poultry, animals and human”, *International Journal of Pharmacology*, **12**, pp.36-51.
- [5] M.A.B. Habib, M. Parvin, T.C. Huntington, M.R. Hasan (2008), “A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals”, *F.A.O. Fisheries and Aquaculture Circular*, **1034**, 33pp.
- [6] Đặng Diễm Hồng (2019), *Nuôi trồng vi tảo giàu dinh dưỡng làm thực phẩm chức năng cho người và động vật nuôi ở Việt Nam*, Chương 4. Bộ sách chuyên khảo Tài nguyên thiên nhiên và môi trường Việt Nam, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, 750tr.
- [7] M. Mathur (2019), *Bioactive Molecules of Spirulina: a Food Supplement*, *Bioactive Molecules in Food*, Springer, DOI: 10.1007/978-3-319-54528-8_97-1.
- [8] N. Seyidoglu, S. Inan, C. Aydin (2017), “A prominent superfood: *Spirulina platensis*, superfood and functional food - The development of superfoods and their roles as medicine”, *IntechOpen*, DOI: 10.5772/66118.
- [9] A. Vonshak R. Guy (1992), “Photoadaptation, photoinhibition and productivity in the blue-green alga”, *Plant, Cell and Environment*, **15**, pp.613-616.
- [10] A. Vonshak (1994), “Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of the cyanobacterium *Spirulina platensis*”, *Biomass and Bioenergy*, **6**(5), pp.399-403.
- [11] A. Vonshak, S. Laorawat, B. Bunnag, M. Tanticharoen (2014), “The effect of light availability on the photosynthetic activity and productivity of outdoor cultures of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*)”, *Journal of Applied Phycology*, **26**, pp.1309-1315.
- [12] E. Jacob-Lopes, M.I. Queiroz, L.Q. Zepka (2020), *Pigments from microalgae handbook*, Springer International Publishing, pp.1-80.

- [13] S. Akimoto, M. Yokono, F. Hamada, A. Teshigahara, S. Aikawa, A. Kondo (2012), "Adaptation of light-harvesting systems of *Arthrospira platensis* to light conditions, probed by time-resolved fluorescence spectroscopy", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1817**(8), pp.1483-1489.
- [14] H.S.G. Raqiba (2019), "Light emitting diode (LED) illumination for enhanced growth and cellular composition in three microalgae", *Advances in Microbiology Research*, **3**(1), pp.1-6.
- [15] G. Markou (2014), "Effect of various colors of light-emitting diodes (LEDs) on the biomass composition of *Arthrospira platensis* cultivated in semi-continuous mode", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **172**(5), pp.2758-2768.
- [16] D.D. Prates, E.M. Radmann, J.H. Duarte, M.G. Morais, J.A.V. Costa (2018), "*Spirulina* cultivated under different light emitting diodes: enhanced cell growth and phycocyanin production", *Bioresour. Technol.*, **256**, pp.38-43.
- [17] E. Kilimtizi, S.C. Bermudez, G. Markou, K. Goiris, D. Vandamme, K. Muylaert (2019), "Enhanced phycocyanin and protein content of *Arthrospira* by applying neutral density and red light shading filters: a small-scale pilot experiment", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **94**(6), pp.2047-2054.
- [18] C.Y. Wang, C.C. Fu, Y.C. Liu (2007), "Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*", *Biochemical Engineering Journal*, **37**(1), pp.21-25.
- [19] Nguyễn Đức Bách, Nguyễn Phan Khuê, Phí Thị Cẩm Miên, Kim Anh Tuấn, Nguyễn Thị Hiền (2020), "Nghiên cứu ảnh hưởng của đèn LED đến sinh trưởng, hàm lượng sắc tố và khả năng thích ứng của một số chủng tảo xoắn *Arthrospira platensis* trong mùa đông ở miền bắc Việt Nam", *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, **18**(8), tr.637-648.
- [20] L.C. Kim, T.N.H. Huỳnh, Q.P. Trương (2018), "Ảnh hưởng của màu sắc ánh sáng lên sự phát triển của tảo *Spirulina platensis*", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **54**(9B), tr.75-81.
- [21] Võ Hồng Trung, Nguyễn Thị Bích Ngọc, Trần Huỳnh Phong, Nguyễn Thị Hồng Phúc (2017), "Ảnh hưởng của chất lượng ánh sáng lên sự tăng trưởng, hàm lượng carbohydrate và protein ở *Spirulina* sp.", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh*, **14**(12), tr.117-126.
- [22] C. Zarrouk (1966), *Contribution a l'etude d'une cyanobacterie: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de Spirulina maxima (Setchell et Gardner)* Geitler, Ph.D thesis, University of Paris, France.
- [23] M.J. Griffiths, C. Garcin, R.P. Hille, S.T.L. Harrison (2011), "Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density", *J. Microbiol. Methods*, **85**(2), pp.119-123.
- [24] G.F.P. da Silva de Castro, R.F. Rizzo, T.S. Passos, B.N.C. dos Santos, D. da Silva Dias, J.R. Domingues, K.G. de Lima Araújo (2015), "Biomass production by *Arthrospira platensis* under different culture conditions", *Food Sci. Technol. Campinas*, **35**(1), pp.18-24.
- [25] A.M. Wood, R.C. Everroad, L.M. Wingard (2005), "Chapter 18 Measuring growth rates in microalgal cultures", *Algal Culturing Techniques*, Elsevier Academic Press, pp.269-285.
- [26] M. Aouir, A. Amiali, A. Bitam, A. Benchabane, V. Raghavan (2017), "Comparison of the biochemical composition of different *Arthrospira platensis* strains from Algeria, Chad and the USA", *Journal of Food Measurement and Characterization*, **11**(2), DOI: 10.1007/s11694-016-9463-4.
- [27] H.K. Lichtenthaler (1987), "Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes", *Methods Enzymology*, **148**, pp.350-382.
- [28] O. Yoshikawa (2008), "Single-laboratory validation of a method for the determination of c-phycocyanin and allophycocyanin in *Spirulina* (*Arthrospira*) supplements and raw materials by spectrophotometry", *J. AOAC Int.*, **91**(3), pp.524-529.
- [29] A. Herrera, A. Napoleone, A. Hohlberg (1989), "Recovery of c-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*", *Journal of Applied Phycology*, **1**, pp.325-331.
- [30] G.F.P. Castro, R.F. Rizzo, T.S. Passos, B.N.C. Santos, J.R. Dias, K.G. Domingues, L. Araújo (2015), "Biomass production by *Arthrospira platensis* under different culture conditions", *Food Science and Technology (Campinas)*, **35**(1), pp.18-24.
- [31] Y.M. Lu, W.Z. Xiang, Y.H. Wen (2011), "*Spirulina* (*Arthrospira*) industry in inner Mongolia of China: current status and prospects", *Journal of Applied Phycology*, **23**, pp.265-269.
- [32] F. Tian, D. Buso, T. Wang, M. Lopes, U. Niangoran, G. Zissis (2018), "Effect of red and blue LEDs on the production of phycocyanin by *Spirulina platensis* based on photosynthetically active radiation", *Journal of Science and Technology in Lighting*, **41**, pp.148-152.
- [33] M.B. Bachchhav, M.V. Kulkarni, A.G. Ingale (2016), "Enhanced phycocyanin production from *Spirulina platensis* using Light Emitting Diode", *Journal of the Institution of Engineers (India) Series E*, **98**(1), pp.41-45.
- [34] H.J. Roh, A. Kim, G. Kang, D.H. Kim (2018), "Blue light-emitting diode light at 405 and 465 nm can inhibit a protozoan infection in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*", *Aquaculture*, **493**, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.04.045.
- [35] A.D. Lucca, C.C. Wientjes, K.A. Williams, D. Bhatnagar (2012), "Blue light (470 nm) effectively inhibits bacterial and fungal growth", *Letters in Applied Microbiology*, **55**(6), DOI: 10.1111/lam.12002.
- [36] J. Chen, Y. Wang, J.R. Benemann, X. Zhang, H. Hu, S. Qin (2015), "Microalgal industry in China: challenges and prospects", *J. Appl. Phycol.*, **28**, pp.715-725.
- [37] R.A. Soni, K. Sudhakar, R.S. Rana (2019), "Comparative study on the growth performance of *Spirulina platensis* on modifying culture media", *Energy Reports*, **5**, pp.327-336.
- [38] J.R. Benavente-Valdés, C. Aguilar, J.C. Contreras-Esquivel, A. Méndez-Zavala, J. Montañez (2016), "Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species", *Biotechnology Reports*, **10**, pp.117-125.
- [39] R. Chaiklahan, N. Chirasuwan, V. Loha, S. Tia, B. Bunnag (2018), "Stepwise extraction of high-value chemicals from *Arthrospira* (*Spirulina*) and an economic feasibility study", *Biotechnology Reports*, **20**, DOI: 10.1016/j.btre.2018.e00280.
- [40] Z. Cohen (1997), "The chemical of *Spirulina*", *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology, CRC Press, pp.175-204.

QUY ĐỊNH VỀ BÀI VIẾT ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài viết gửi đăng trên Tạp chí phải là bài viết nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài viết trên các tạp chí khác cho đến khi có quyết định xét duyệt của Ban Biên tập.

Bài báo dài không quá 10 trang (bao gồm cả bảng biểu, ghi chú, tài liệu tham khảo và phụ lục); font chữ: Times New Roman; cỡ chữ 13; khổ giấy A4, lề trên 2 cm, lề dưới 2 cm, lề trái 3 cm, lề phải 2 cm.

Bài viết gửi về Tòa soạn dưới dạng file mềm và bản in; có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, Cầu Giấy, Hà Nội) hoặc qua hòm thư điện tử, địa chỉ: khcnvn@most.gov.vn.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, không gạch chân hay viết nghiêng.

- Tên bài báo phải ngắn gọn, rõ ràng và phù hợp với nội dung bài báo.

- Phía dưới tên bài báo là tên tác giả không viết chức danh và học hàm, học vị. Nếu có nhiều tác giả làm việc ở các cơ quan khác nhau thì tên tác giả được đánh số (^{1,2,...}) ở phía trên. Dấu hoa thị (*) chỉ tác giả liên hệ, được viết ở cuối trang đầu tiên của bài báo.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh. Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khoá bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet. Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

Dẫn nhập/đặt vấn đề

Định nghĩa vấn đề; tóm lược vấn đề nghiên cứu đã được công bố trong và ngoài nước, nêu mục tiêu nghiên cứu và giải thích sự lựa chọn đề tài và mục tiêu nghiên cứu để thấy được tính thời sự, tính khoa học và sự cần thiết của vấn đề nghiên cứu.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu cần trình bày tiêu chuẩn lựa chọn, đặc điểm đối tượng nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu cần nêu rõ cách tiếp cận nghiên cứu, loại hình nghiên cứu, phương pháp đo lường, công thức tính cỡ mẫu, phương pháp xử lý số liệu, mô tả kỹ các kỹ thuật tiến hành trong nghiên cứu; các quan điểm, lập luận, ý kiến tranh luận, các dẫn chứng...

Kết quả

Trình bày đầy đủ, khách quan các kết quả thu được sau nghiên cứu, các kết quả này phải phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu. Các số liệu phải chính xác và khớp với nhau.

Phần kết quả nghiên cứu chỉ trình bày các kết quả nghiên cứu của đề tài, không giải thích, so sánh và bàn luận.

Bàn luận

Chủ yếu bàn luận các vấn đề liên quan đến mục tiêu đề tài.

Nhận xét, đánh giá một cách khách quan các kết quả nghiên cứu, có so sánh với các tác giả khác để khẳng định hoặc phủ định những hiểu biết đã có, qua đó nêu được những điểm mới và đóng góp của đề tài.

Dự báo hướng nghiên cứu tiếp và khả năng ứng dụng các kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

Kết luận

Nêu kết quả nghiên cứu chủ yếu của đề tài có tính khái quát liên quan đến mục tiêu nghiên cứu, đề xuất các vấn đề tiếp tục nghiên cứu.

Chú thích và tài liệu tham khảo

Chú thích được đánh số theo thứ tự xuất hiện (^{1,2,3...}) và được trình bày ngay ở cuối trang viết (footnote).

Các tài liệu tham khảo được đánh số theo thứ tự xuất hiện để chỉ dẫn chúng được trích dẫn ở đâu trong bài báo. Số thứ tự được đánh trong ngoặc vuông, ví dụ: [3] với 1 hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập (số)**, pp<trang đầu-trang cuối>

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Năm xuất bản: năm xuất bản của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Tên tài liệu được trích dẫn: là tên bài báo, chương/phần sách...

Tên nguồn có thể là tên tạp chí, tên sách, hay tên tài liệu gốc của tài liệu được trích dẫn (phần này được in nghiêng).

Tập (số): dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này in đậm).

Trang đầu-trang cuối là số thứ tự các trang phản ánh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

Chú ý: nếu có ≥ 2 tài liệu tham khảo do cùng 1 tác giả/nhóm tác giả, cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a).

Nếu có một số tài liệu tham khảo trong cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: Kitchen (1982, p 39).

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Tòa soạn không trả lại bản thảo.

- Bài viết chỉ được đăng khi phản biện nhận xét về chất lượng bài báo đồng ý cho đăng.

- Bản quyền: tác giả đồng ý trao bản quyền bài viết (bao gồm cả phần tóm tắt) cho Ban Biên tập Tạp chí.

PHÂN LOẠI LĨNH VỰC KHOA HỌC

1. Khoa học tự nhiên

- 1.1. Toán học và thống kê
- 1.2. Khoa học máy tính và thông tin
- 1.3. Vật lý
- 1.4. Hóa học
- 1.5. Khoa học trái đất và môi trường
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học nano
- 1.8. Khoa học tính toán
- 1.9. Các lĩnh vực khác của khoa học tự nhiên

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

- 2.1. Kỹ thuật dân dụng: kỹ thuật kiến trúc; kỹ thuật xây dựng; kỹ thuật kết cấu và đô thị; kỹ thuật giao thông vận tải; kỹ thuật thủy lợi; kỹ thuật địa chất công trình
- 2.2. Kỹ thuật điện, kỹ thuật điện tử, kỹ thuật thông tin
- 2.3. Kỹ thuật cơ khí, chế tạo máy
- 2.4. Kỹ thuật hóa học
- 2.5. Kỹ thuật vật liệu và luyện kim
- 2.6. Kỹ thuật y học
- 2.7. Kỹ thuật môi trường
- 2.8. Công nghệ sinh học công nghiệp
- 2.9. Công nghệ nano
- 2.10. Kỹ thuật thực phẩm và đồ uống
- 2.11. Các lĩnh vực khác của khoa học kỹ thuật và công nghệ

3. Khoa học y - dược

- 3.1. Y học cơ sở
- 3.2. Y học lâm sàng
- 3.3. Y học dự phòng
- 3.4. Dược học
- 3.5. Các lĩnh vực khác của Y - dược học

4. Khoa học nông nghiệp

- 4.1. Trồng trọt
- 4.2. Chăn nuôi
- 4.3. Thú y
- 4.4. Lâm nghiệp
- 4.5. Thủy sản
- 4.6. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp, thủy sản
- 4.7. Các lĩnh vực khác của khoa học nông nghiệp

5. Khoa học xã hội và nhân văn

- 5.1. Tâm lý học
- 5.2. Kinh tế và kinh doanh
- 5.3. Khoa học giáo dục
- 5.4. Xã hội học
- 5.5. Pháp luật
- 5.6. Khoa học chính trị
- 5.7. Địa lý kinh tế và xã hội
- 5.8. Thông tin đại chúng và truyền thông
- 5.9. Lịch sử và khảo cổ học
- 5.10. Ngôn ngữ học và văn học
- 5.11. Triết học, đạo đức và tôn giáo
- 5.12. Nghiên cứu về khu vực và quốc tế
- 5.13. Các lĩnh vực khác của khoa học xã hội và nhân văn

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 63 - Number 7 - July 2021

Phát hiện đột biến mới D252N trên gen SCN5A ở bệnh nhân hội chứng Brugada.

Đặng Duy Phương, Nguyễn Minh Hà, Đỗ Doãn Lợi, Trần Văn Khánh, Trần Huy Thịnh

Báo cáo ca bệnh khảm trisomy một phần nhiễm sắc thể số 9.

Hoàng Thị Hải, Hoàng Thị Ngọc Lan, Vũ Thị Hà, Nguyễn Thị Sim, Hồ Khánh Dung, Đoàn Thị Kim Phượng

Nhận xét thói quen ăn uống, lâm sàng ở bệnh nhân viêm teo niêm mạc dạ dày.

Đào Trần Tiến, Vũ Trường Khanh, Phí Thị Thùy Ngân, Nguyễn Công Long, Nguyễn Thế Phương, Nguyễn Hoài Nam, Bùi Quang Thạch, Hoàng Nam

Biến đổi nồng độ VEGF thủy dịch do tiêm Bevacizumab nội nhãn trong điều trị bệnh vông mạc đái tháo đường tăng sinh biến chứng.

Vũ Tuấn Anh, Nguyễn Tuấn Thanh Hào

Phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất từ loài *Adinandra poilanei* Gagnep.

Vũ Thị Kim Oanh, Bùi Thu Hà, Đinh Ngọc Thứ, Lê Nguyễn Thành

Đánh giá thành phần hóa học và một số hoạt tính sinh học của tinh dầu cây Bạc hà (*Mentha arvensis* L.) trồng tại Việt Nam.

Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Hiền, Trương Thị Chiên, Phan Xuân Bình Minh, Nguyễn Thị Thanh Mai, Hoàng Quốc Chính, Vũ Xuân Tạo

Nghiên cứu chế tạo mẫu chuẩn RNA bền với nucleases dùng trong định lượng virút viêm gan C.

Nguyễn Minh Tuấn, Nguyễn Thị Lê Thủy, Thượng Thị Thu Thủy, Nguyễn Ngọc Lê, Nguyễn Mạnh Kiên, Lê Quang Trí, Nguyễn Bảo Toàn, Tatyana Ilinichna, Phạm Thị Kim Trâm, Nguyễn Hoàng Chương, Nguyễn Đăng Quân

Đánh giá đa dạng di truyền các quần thể cá Tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng 20 chỉ thị phân tử microsatellite mới phát triển.

Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Minh Thành, Nguyễn Hoàng Thông, Trần Hoàng Gia Linh, Lê Hoàng Khôi Nguyên, Nguyễn Hồng Lộc

Yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi (*Oreochromis* sp.) nuôi nước ngọt.

Trương Thị Mỹ Hạnh, Phan Thị Vân, Lê Thị Mỹ, Nguyễn Hữu Nghĩa, Võ Văn Nha, Nguyễn Đình Xuân Quý, Đặng Thị Lua

Xác định các yếu tố điều hòa hoạt động (CRE) của gen *RMP1* và *RMP2* liên quan đến biểu hiện chuyên biệt ở hạt phấn lúa.

Nguyễn Tiến Dũng, Triệu Bích Huệ, Nguyễn Xuân Vũ

Nghiên cứu tạo nguồn vật liệu khởi đầu trong nhân giống *in vitro* cây hoa Dạ yến thảo (*Petunia hybrida* L.).

Nguyễn Tiến Long, Lê Thị Thu Hằng, Trần Thị Triều Hà, Dương Thanh Thủy, Lê Như Cương

Nghiên cứu ứng dụng đèn LEDs để kéo dài thời gian nuôi tảo xoắn *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) ở miền Bắc Việt Nam.

Nguyễn Đức Bách, Phí Thị Cẩm Miên, Kim Anh Tuấn, Nguyễn Thị Hiền, Vũ Lê Diệu Hương

1 Brugada syndrome with a novel missense mutation D252N in SCN5A gene: a case report.

Duy Phuong Dang, Minh Ha Nguyen, Doan Loi Do, Van Khanh Tran, Huy Thinh Tran

7 Report of a case with partial trisomy 9 mosaicism.

Thi Hai Hoang, Thi Ngoc Lan Hoang, Thi Ha Vu, Thi Sim Nguyen, Khanh Dung Ho, Thi Kim Phuong Doan

11 Association of eating habits and clinical symptoms in atrophic gastritis patients.

Tran Tien Dao, Truong Khanh Vu, Thi Thuy Ngan Phi, Cong Long Nguyen, The Phuong Nguyen, Hoai Nam Nguyen, Quang Thach Bui, Nam Hoang

17 Changing of the vascular endothelial growth factor concentration in aqueous humor before and after intravitreal injection of Bevacizumab adjuvant treating complicated proliferative diabetic retinopathy.

Tuan Anh Vu, Tuan Thanh Hao Nguyen

22 Isolation and structural elucidation of some chemical constituents from *Adinandra poilanei* Gagnep.

Thi Kim Oanh Vu, Thu Ha Bui, Ngoc Thuc Dinh, Nguyen Thanh Le

26 Evaluation of the chemical components and some bioactive compounds of the peppermint essential oil (*Mentha arvensis* L.) cultivated in Vietnam.

Bao Tram Tran, Thi Hien Nguyen, Thi Chien Truong, Xuan Binh Minh Phan, Thi Thanh Mai Nguyen, Quoc Chinh Hoang, Xuan Tao Vu

31 Preparation of nuclease-resistant RNA standard for hepatitis C virus quantification.

Minh Tuan Nguyen, Thi Le Thuy Nguyen, Thi Thu Thuy Thuong, Ngoc Le Nguyen, Manh Kien Nguyen, Quang Tri Le, Bao Toan Nguyen, Tatyana Ilinichna, Thi Kim Tram Pham, Hoang Chuong Nguyen, Dang Quan Nguyen

37 Assessment of genetic diversity among wild populations of the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) by 20 novel microsatellite markers.

Van Sang Nguyen, Minh Thanh Nguyen, Hoang Thong Nguyen, Hoang Gia Linh Tran, Hoang Khoi Nguyen Le, Hong Loc Nguyen

42 Risk factors related to Streptococcosis disease of tilapia in freshwater aquaculture.

Thi My Hanh Truong, Thi Van Phan, Thi May Le, Huu Nghia Nguyen, Van Nha Vo, Dinh Xuan Quy Nguyen, Thi Lua Dang

48 Identification of Cis-regulator elements (CREs) of pollen-specific gene *RMP1* and *RMP2* in rice.

Tien Dung Nguyen, Bich Hue Trieu, Xuan Vu Nguyen

53 A study on the primary materials for *in vitro* propagation of *Petunia hybrida* L.

Tien Long Nguyen, Thi Thu Hang La, Thi Trieu Ha Tran, Thanh Thuy Duong, Nhu Cuong Le

57 Application of light-emitting diodes (LEDs) in the extension of the cultivation period of *Spirulina* in Northern Vietnam.

Duc Bach Nguyen, Thi Cam Mien Phi, Anh Tuan Kim, Thi Hien Nguyen, Le Dieu Huong Vu