



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 63 - Số 12 - Tháng 12 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

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP PHỤ TRÁCH

Nguyễn Thị Hương Giang

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP

Nguyễn Thị Hải Hằng

TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP

Phạm Thị Minh Nguyệt

TRƯỞNG BAN TẬP CHÍ ĐIỆN TỬ

Vũ Văn Hưng

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 Bui - 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, VNU, Hanoi
Vu Minh Giang - VNU, 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, VNU, 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 - VNU, Hanoi
Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University
Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi
Pham Hung Viet - University of Science, VNU, Hanoi

EXECUTIVE DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

Nguyen Thi Huong Giang

DEPUTY EDITOR

Nguyen Thi Hai Hang

HEAD OF EDITORIAL BOARD

Pham Thi Minh Nguyet

HEAD OF E-JOURNAL BOARD

Vu Van Hung

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: khoahocvacongnghevietnam@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: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn
E-journal: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 459/GP-BTTTT ngày 20/7/2021

Giá: 18000^d

PUBLICATION LICENCE

No. 459/GP-BTTTT 20th July 2021

Phát hiện đột biến mất đoạn lớn trên gen *EDA* gây loạn sản ngoại bì ở gia đình bệnh nhân Việt Nam bằng giải trình tự hệ gen mã hóa

Nguyễn Phương Anh¹, Nguyễn Thùy Dương^{1, 2*}, Nông Văn Hải^{1, 2}

¹Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 15/6/2021; ngày chuyển phản biện 18/6/2021; ngày nhận phản biện 19/7/2021; ngày chấp nhận đăng 22/7/2021

Tóm tắt:

Loạn sản ngoại bì (Hypohidrotic ectodermal dysplasia - HED) (OMIM # 305100) là bệnh di truyền hiếm gặp do đột biến gen *EDA* (NM_001399) nằm trên nhiễm sắc thể X gây nên. Trẻ mắc bệnh này có các biểu hiện bất thường ở các cấu trúc biểu bì như da, tóc, móng tay, răng và tuyến mồ hôi. Trong nghiên cứu này, các tác giả tiến hành xác định đột biến trong gen *EDA* từ các thành viên của một gia đình người Việt Nam có con trai có 5 răng và không có tuyến mồ hôi bằng kỹ thuật giải trình tự hệ gen mã hóa (Whole exome sequencing - WES) và multiplex PCR. Kết quả cho thấy, bệnh nhân mang đột biến bán dị hợp tử mất đoạn toàn bộ exon 1 của gen *EDA* (c.2_396del) được di truyền từ mẹ. Kết quả này đóng góp cho nghiên cứu về hội chứng loạn sản ngoại bì ở mức độ phân tử, hỗ trợ công tác điều trị và tư vấn di truyền y học.

Từ khóa: đột biến, *EDA*, giải trình tự hệ gen mã hóa, loạn sản ngoại bì, Việt Nam.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

HED (OMIM # 305100) là một nhóm các rối loạn bẩm sinh đặc trưng bởi sự suy giảm phát triển của tóc, răng, móng tay hoặc tuyến mồ hôi [1]. Cho đến nay, hơn 200 loại loạn sản ngoại bì (Ectodermal Dysplasia - ED) đã được miêu tả, trong đó dạng phổ biến nhất là loạn sản ngoại bì HED với tần suất xuất hiện là 1/17.000 trên toàn thế giới [1, 2]. Hội chứng HED được chứng minh là có liên quan đến đột biến trên một số gen gồm *EDA*, *EDAR*, *EDARADD*, *WNT10A*, *TRAF6*, *NEMO* và *IKBKKG*. Trong đó, các đột biến trên gen *EDA* nằm trên nhiễm sắc thể X gây bệnh dạng XLHED được tìm thấy ở 95% bệnh nhân HED [3]. Theo thống kê của Trzeciak và cs [4], tính đến năm 2016, có 345 trường hợp mắc HED được ghi nhận, trong đó 206 trường hợp là do đột biến ở gen *EDA* gây ra.

Gen *EDA* (NM_001399) có kích thước khoảng 425 kb nằm trên nhánh dài của nhiễm sắc thể X (Xq12-13.1), bao gồm 12 exon nhưng chỉ có 8 exon mã hóa cho protein xuyên màng ectodysplasin-A. Quá trình phiên mã và dịch mã của *EDA* tạo ra 13 dạng RNA (tất cả đều chứa exon 1) và 8 loại protein khác nhau. Hai protein dài nhất của gen *EDA* là EDA-A1 có 391 axit amin và EDA-A2 có 389 axit amin. Chúng là các thành viên của họ yếu tố hoại tử khối u (Tumor necrosis factor family - TNF) và là các protein xuyên màng trimeric loại II. Các protein này đều chứa 7 vùng, gồm vùng nội bào nhỏ ở đầu N-terminal, vùng protein xuyên màng, vùng cuống có chức năng chưa được xác định, vùng trình tự phân cắt đồng thuận furin cho quá trình phân giải protein của EDA, vùng trình tự ngắn mang

điện tích dương cần thiết cho các tương tác với heparan-sulfat proteoglycan, vùng collagen ở giữa có 19 lần lặp lại Gly-X-Y và vùng cấu trúc tương đồng TNF ở đầu C dài 150 gốc axit amin (TNF homology domain - THD) [5]. Để có thể liên kết với thụ thể EDAR, EDA-A1 phải được xử lý bằng sự phân cắt protein tại vị trí furin gần vùng collagen, từ đó giải phóng phối tử EDA vào khoang ngoại bào dưới dạng một protein hòa tan [6]. Protein EDA-A1 và EDA-A2 liên kết với các thụ thể TNFR (The tumor necrosis factor receptor) thông qua motif TNF, trong đó protein EDA1 (EDA-A1) liên kết với thụ thể EDAR, còn EDA2 (EDA-A2) liên kết với thụ thể XEDAR. Mặc dù cả 2 thụ thể này đều kích hoạt các yếu tố NF-κB nhưng có thể chỉ có tương tác EDA1-EDAR là có liên quan tới sự hình thành, phát triển và biệt hóa của các cơ quan có nguồn gốc ngoại bì [7]. Các đột biến gen *EDA1* và *EDAR* dẫn đến các sai hỏng trong quá trình phát triển ngoại bì và gây nên hội chứng HED, tuy nhiên các đột biến ở gen *XEDAR* vẫn chưa được tìm thấy ở bệnh nhân HED [7].

Đột biến đầu tiên trên gen *EDA*, mất đoạn trên locus DXS732, gây bệnh HED đã được miêu tả năm 1993 [8]. Tiếp theo đó, nhiều nghiên cứu phát hiện đột biến gây bệnh HED đã được thực hiện [9-11]. Nghiên cứu xác định đột biến ở gen *EDA* trên 1 ca bệnh nhi người Trung Quốc đã phát hiện một đột biến điểm c.896G>A (p.G299D) trên gen *EDA* sử dụng kỹ thuật giải trình tự hệ gen mã hóa WES [9]. Nghiên cứu khác ở 10 bệnh nhân HED Việt Nam sử dụng giải trình tự Sanger cho thấy, đã phát hiện được 2 đột biến điểm 1133C>T (p.T378 M)

*Tác giả liên hệ: Email: tnguyen@igr.ac.vn

Whole exome sequencing revealed a large deletion in *EDA* of a Vietnamese patient with hypohidrotic ectodermal dysplasia

Phuong Anh Nguyen¹, Thuy Duong Nguyen^{1,2*},
Van Hai Nong^{1,2}

¹Institute of Genome Research, VAST

²Graduate University of Science and Technology, VAST

Received 15 June 2021; accepted 22 July 2021

Abstract:

Hypohidrotic ectodermal dysplasia (HED) (OMIM # 305100) is a congenital genetic disorder caused by mutations in *EDA* (NM_001399) on chromosome X. Children with HED have the abnormal development of epidermal structures such as skin, hair, nails, teeth, and sweat glands. The present study aimed to detect mutations in *EDA* of a Vietnamese family with a son having only five teeth and no sweat glands, using whole exome sequencing (WES) and multiplex PCR. The results showed that patient had a deletion of exon 1 in *EDA* (c.2_396del), which is likely to be inherited from the healthy mother. The results will partly contribute to molecular studies on HED, helping in genetic counseling and disease treatment.

Keywords: *EDA*, hypohidrotic ectodermal dysplasia, mutation, Vietnam, whole exome sequencing.

Classification number: 3.1

và c.1045G>A (p.A349T) trên 8 bệnh nhân [10]. Nghiên cứu trên 2 bệnh nhân HED người Trung Quốc đã tìm được 2 đột biến là c.1127C>T (p.T376M) và mất đoạn c.648_683del ở gen *EDA* sử dụng WES [11]. Cho tới nay, theo thống kê của Cơ sở dữ liệu đột biến gen người đã ghi nhận có 357 đột biến được tìm thấy trên gen *EDA*, trong đó hơn 50% là các đột biến sai nghĩa và vô nghĩa, khoảng 25% là các đột biến mất đoạn lớn và nhỏ (www.hgmd.cf.ac.uk). Các đột biến còn lại là các chèn đoạn lớn nhỏ và các đột biến có ảnh hưởng tới quá trình cắt nối exon và intron [1]. Hầu hết các đột biến tìm thấy cho tới nay được xác định bằng phương pháp giải trình tự Sanger và WES.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen mã hoá để tìm hiểu các đột biến gen *EDA* ở một bệnh nhi mắc hội chứng loạn sản ngoại bì. Kết quả phát hiện đột biến mất toàn bộ exon 1 (c.2_396del) của gen *EDA* ở

bệnh nhân. Đột biến này đã được kiểm tra lại trên các thành viên gia đình bằng kỹ thuật multiplex PCR. Kết quả này sẽ góp phần cho những nghiên cứu hội chứng loạn sản ngoại bì ở mức độ phân tử tiếp theo.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu máu của bố mẹ và bệnh nhân loạn sản ngoại bì được lấy, đựng trong ống chống đông EDTA và bảo quản ở -20°C. Việc tiến hành lấy mẫu và nghiên cứu trên người bệnh đã được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Viện Nghiên cứu Hệ gen đồng ý thông qua (Số: 2-2019/NCHG-HĐĐĐ).

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết từ mẫu máu đông lạnh, sử dụng kit GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification (Thermo Fisher Scientific, USA) theo hướng dẫn của hãng. Nồng độ và chất lượng của DNA được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% và phương pháp quang phổ trên máy Nanodrop Lite (ThermoFisher Scientific, USA).

Phân tích WES

DNA tổng số của gia đình bệnh nhân sau khi phân cắt thành các đoạn ngắn 150-200 bp bằng sóng siêu âm được sử dụng cho chuẩn bị thư viện DNA với bộ kit SureSelectXT Human All Exon V6 theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiếp đến, thư viện hệ gen mã hoá được giải trình tự trên máy HiSeq 4000, Illumina, USA. Các đoạn đọc trình tự ngắn được đóng hàng vào bộ gen tham chiếu của người hg19 (Build 37.1) sử dụng Novoalign (<http://www.novocraft.com/products/novoalign/>). Các bản sao PCR được đánh dấu và lọc ra bởi Picard V.2.18.7 (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Biểu thể gen được phát hiện bằng GATK UnifiedGenotyper (<https://www.broadinstitute.org/gatk/index.php>). Tất cả các biến thể nucleotide đơn (SNV) hoặc indels có tần suất lớn hơn 1% xuất hiện ở IGS và gnomAD được loại bỏ. Sau đó, các biến thể còn lại được chú giải bằng phần mềm ANNOVAR

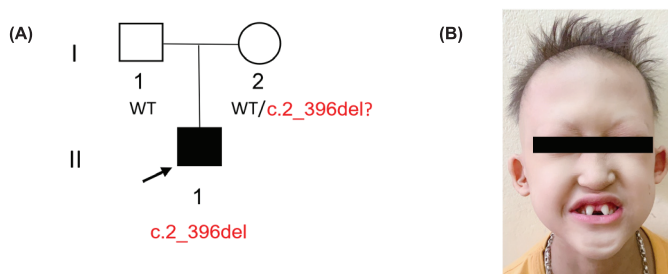
Phương pháp PCR và giải trình tự Sanger

DNA tổng số của bố mẹ và bệnh nhân được sử dụng khuếch đại toàn bộ 8 exon của gen *EDA* bằng phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu. Phản ứng multiplex PCR cũng được thực hiện sử dụng đồng thời 2 cặp mồi đặc hiệu nhân exon 1 của gen *EDA* và exon 4 của gen *ACTB*. Các cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự gen *EDA* và *ACTB* đã được công bố trên GenBank với mã số tương ứng là NM_001399 và NG_007992.1. Sản phẩm PCR được đánh giá chất lượng bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,2%. Sản phẩm nhân gen *EDA* sau đó được tinh sạch và giải trình tự Sanger bằng kit đọc trình tự ABI Big Dye Terminator V3.1 (Applied Biosystems, CA) trên máy đọc trình tự ABI 3500 (Applied Biosystems). Kết quả giải trình tự Sanger được phân tích bằng phần mềm BioEdit.

Kết quả

Bệnh nhân loạn sản ngoại bì

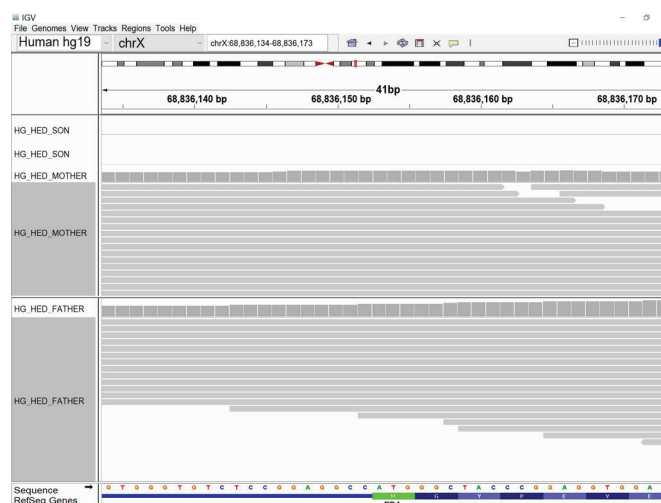
Bệnh nhân nhi sinh năm 2012 là con trai của một gia đình có bố mẹ khỏe mạnh (hình 1A). Bệnh nhân có 4 răng ở hàm trên và 1 răng ở hàm dưới, các răng nhọn và có hình nón, không có tuyến mỡ hôi, tóc mọc rất thưa thớt, trên da đầu bệnh nhân có các mảng hói bất thường (hình 1B). Lông mày và lông mi của bệnh nhân hoàn toàn không phát triển. Những đặc điểm này của bệnh nhân đều là những biểu hiện lâm sàng điển hình của hội chứng loạn sản ngoại bì thiếu tuyến mỡ hôi.



Hình 1. Phả hệ và ảnh bệnh nhân loạn sản ngoại bì. (A) Phả hệ gia đình bệnh nhân. I.1: bố bệnh nhân không mang đột biến c.2_396del; I.2: mẹ bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử c.2_396del; II.1: bệnh nhân mang đột biến bán dị hợp tử c.2_396del; (B) Ảnh chụp mặt bệnh nhân mắc loạn sản ngoại bì.

Kết quả WES

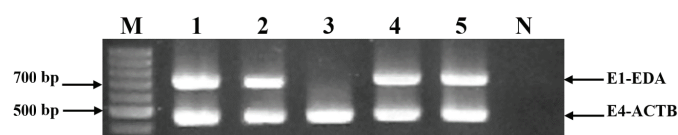
8 đoạn exon của gen *EDA* ở bệnh nhân và bố mẹ bệnh nhân được khuếch đại bằng phương pháp PCR. Ở cả 3 lần khuếch đại gen, đều không thu được sản phẩm khuếch đại vùng exon 1 từ mẫu DNA của bệnh nhân. Kết quả giải trình tự các sản phẩm khuếch đại thu được bằng giải trình tự Sanger không phát hiện được đột biến nào ở cả bố mẹ và bệnh nhân. Do đó, tiến hành kỹ thuật WES của cả gia đình để xác định đột biến gây bệnh. Thông tin trình tự các đoạn đọc ngắn của toàn bộ các đoạn exon nhận được ở dạng file BAM của cả gia đình bệnh nhân sau khi được so sánh với hệ gen tham chiếu hg19 được sử dụng để kiểm tra số lượng đoạn đọc trên các mẫu. Kết quả hiển thị trên công cụ trực quan hóa dữ liệu hệ gen (Integrative genomics viewer - IGV) cho thấy, không có thông tin các đoạn đọc ngắn ở vùng exon 1 của gen *EDA* (chrX: 68,836,134-68,836,173) ở bệnh nhân, trong khi vùng gen này ở bố mẹ bệnh nhân vẫn có kết quả đọc (hình 2). Do đó, kết quả phân tích WES cho thấy, bệnh nhân mang đột biến bán dị hợp tử mất đoạn toàn bộ vùng exon 1 (c.2_396del) của gen *EDA*. Ngoài ra, kết quả còn cho thấy, số lượng đoạn đọc ngắn ở vùng exon 1 của gen *EDA* ở mẫu bố và mẹ là tương đối như nhau. Vì vậy, mẹ bệnh nhân có mang đột biến dị hợp tử c.2_396del trên gen *EDA*, do gen này nằm trên nhiễm sắc thể X. Bố bệnh nhân không mang đột biến. Tuy nhiên, để khẳng định chính xác mẹ mang đột biến dị hợp tử c.2_396del, cần thực hiện thêm phương pháp giải trình tự toàn bộ hệ gen hay phương pháp MLPA.



Hình 2. Kết quả WES của bệnh nhân, bố và mẹ được phân tích bằng công cụ IGV. HD_HED_SON: mẫu bệnh nhân, HD_HED_MOTHER: mẫu mẹ bệnh nhân, HD_HED_FATHER: mẫu bố bệnh nhân.

Kết quả multiplex PCR

Để kiểm tra lại kết quả WES, tiến hành phản ứng nhân gen sử dụng đồng thời 2 cặp mồi đặc hiệu, một cặp nhân exon 1 của gen *EDA* và 1 cặp mồi nội chuẩn nhân gen exon 4 của gen *ACTB*. Kết quả phản ứng multiplex PCR cho thấy thu được 2 băng đặc hiệu ở cả mẫu bố mẹ bệnh nhân, mẫu đối chứng nam và nữ khỏe mạnh. Đây là sản phẩm khuếch đại của exon 1 gen *EDA* và exon 4 gen *ACTB* với kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết tương ứng khoảng 700 và 500 bp. Tuy nhiên, kết quả PCR chỉ thu được một băng khuếch đại exon 4 gen *ACTB* ở mẫu bệnh nhân, chứng tỏ bệnh nhân mang đột biến mất đoạn toàn bộ exon 1 của gen *EDA* (hình 3).



Hình 3. Ảnh PCR exon 1 gen *EDA* và exon 4 gen *ACTB* trên gel agarose 1,2%. M: marker 100 bp; 1: sản phẩm PCR của bố bệnh nhân; 2: sản phẩm PCR của mẹ bệnh nhân; 3: sản phẩm PCR của bệnh nhân; 4: sản phẩm PCR của mẫu nam khỏe mạnh; 5: sản phẩm PCR của mẫu nữ khỏe mạnh; N: chứng âm.

Bàn luận

Trong nghiên cứu này, bệnh nhân nam có các triệu chứng điển hình của loạn sản ngoại bì như thiếu tuyến mỡ hôi, tóc thưa, thiếu nhiều răng. Phân tích kết quả giải trình tự hệ gen mã hoá đã phát hiện được đột biến mất đoạn toàn bộ exon 1 (c.2_396del) của gen *EDA* bắt đầu từ vị trí g.68836154 trên nhiễm sắc thể X ở bệnh nhân. Vị trí này tương ứng với vị trí nucleotide T trong bộ ba khởi đầu dịch mã ATG trên gen *EDA*. Đột biến mất đoạn này làm mã mở đầu không được nhận biết

và ảnh hưởng đến quá trình dịch mã bình thường của gen. Quá trình dịch mã có thể sẽ không xảy ra, hoặc được bắt đầu tại bộ ba ATG đầu tiên được tìm thấy trên exon 2. Đột biến mất toàn bộ exon 1 (c.2_396del) làm mất đoạn trình tự axit amin của chuỗi polipeptid (132 amino acid), ảnh hưởng lớn đến chức năng của protein. Đột biến này cũng đã được tìm thấy ở các bệnh nhân mắc bệnh không răng khác trên thế giới. Năm 2001, nghiên cứu của nhóm Pääkkönen và cs [12] trên 16 gia đình có bệnh nhân mắc HED, sử dụng kỹ thuật giải trình tự Sanger đã phát hiện ra 13 đột biến gồm cả đột biến mất đoạn toàn bộ exon 1. Năm 2011, Schneider và cs [13] đã nghiên cứu về khả năng tiết mồ hôi và kiểu gen của 31 bệnh nhân nam mắc hội chứng XLHED. Kết quả là đã phát hiện được 25 đột biến trên *EDA*, trong đó có 15 đột biến gồm đột biến điểm, mất đoạn lớn và nhỏ và 1 đột biến mất đoạn toàn bộ exon 1 trên 1 bệnh nhân. Những bệnh nhân XLHED mang đột biến mất đoạn trong nghiên cứu của Schneider đều không có khả năng tiết mồ hôi, giống như triệu chứng lâm sàng trên bệnh nhân trong nghiên cứu này. Điều đó cho thấy mối liên quan giữa đột biến mất đoạn lớn trên gen *EDA* với tổn thương chức năng của tuyến mồ hôi, một trong những yếu tố chính gây bệnh và tử vong của bệnh nhân XLHED. Năm 2019, nghiên cứu xác định đột biến gây bệnh ở 4 gen *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* và *WNT10A* trên 63 bệnh nhân HED người Tây Ban Nha cũng tìm thấy đột biến mất đoạn toàn bộ exon 1 của gen *EDA* trên 2 bệnh nhân [14]. Trong 63 bệnh nhân mắc hội chứng HED được nghiên cứu, sử dụng kỹ thuật giải trình tự Sanger và kỹ thuật khuếch đại đa đoạn dò MLPA, đã phát hiện đột biến trên 47 bệnh nhân với 36 trường hợp đột biến nằm trên gen *EDA*. Các đột biến được tìm thấy trên gen *EDA* đều nằm trong các vùng được bảo tồn và có chức năng.

Trong nhiều nghiên cứu trước đây, ảnh hưởng của đột biến trên gen *EDA* tới các bệnh nhân không răng cũng đã được nghiên cứu. Các đột biến trên gen *EDA* chủ yếu nằm ở 4 vùng chức năng quan trọng, bao gồm vùng protein xuyên màng (Transmembrane domain - TM) có liên quan đến sự phân cực của các amino acid, vùng trình tự phân cắt đồng thuận furin tham gia vào quá trình phân cắt và giải phóng dạng hòa tan của các protein EDA, vùng collagen giúp liên kết nhiều chuỗi protein EDA với nhau kích thích con đường tín hiệu xuôi dòng và vùng tương đồng TNF ở đầu C-terminal (C-terminal THD) có vai trò trong việc hình thành trimer và liên kết đặc hiệu với các thụ thể [15]. Bất kỳ đột biến gen *EDA* nào được tìm thấy trong vùng cấu trúc THD, collagen, furin hay miền protein xuyên màng đều có thể gây ra hội chứng HED [1]. Theo các nghiên cứu trước đây, exon 1 là nơi chứa vùng nội bào nhỏ ở đầu N-terminal và miền protein xuyên màng TM [5, 12]. Do đó, đột biến mất đoạn exon 1 (c.2_396del) sẽ làm mất đi vùng chức năng quan trọng của gen, từ đó ảnh hưởng đến cấu trúc và chức năng của protein. Hiện nay, các bệnh nhân HED được chẩn đoán dựa trên các đặc điểm lâm sàng biểu hiện ngay từ giai đoạn sơ sinh. Các xét nghiệm chẩn đoán đột biến trên các gen *EDA*, *EDAR*, *EDARADD* hoặc *WNT10A* được tiến hành để kiểm chứng các chẩn đoán lâm sàng và sử dụng cho sàng lọc trước sinh cho các gia đình có tiền sử mắc bệnh. Hiện nay, chưa có cách điều trị cụ thể cho bệnh nhân

HED, người bệnh chỉ có thể khắc phục các triệu chứng lâm sàng như sinh sống trong môi trường mát mẻ để tránh thời tiết nóng và tăng thân nhiệt, chăm sóc nha khoa từ nhỏ và cấy ghép răng. Chính vì vậy, việc chẩn đoán và xác định đột biến có thể giúp tư vấn di truyền cho bệnh nhân và gia đình, từ đó có những phương pháp cải thiện sức khỏe và chất lượng cuộc sống [16].

Kết luận

Nghiên cứu đã phát hiện một đột biến mất đoạn toàn bộ exon 1 của gen *EDA* (c.2_396del) gây hội chứng loạn sản ngoại bì HED ở một bệnh nhân nhi nam. Đột biến này được di truyền từ mẹ của bệnh nhân. Kết quả nghiên cứu cho thấy tính ứng dụng cao của kỹ thuật WES trong xác định nguyên nhân gây bệnh di truyền. Kết quả này cũng cung cấp thông tin hữu ích cho việc điều trị bệnh nhân và tư vấn di truyền trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Reyes-Real, et al. (2018), "Hypohidrotic ectodermal dysplasia: clinical and molecular review", *Int. J. Dermatol.*, **57**(8), pp.965-972.
- [2] M. Mikkola (2009), "Molecular aspects of hypohidrotic ectodermal dysplasia", *Am. J. Med. Genet. A*, **149A**, pp.2031-2036.
- [3] S. Deshmukh, S. Prashanth (2012), "Ectodermal dysplasia: a genetic review", *Int. J. Clin. Pediatr. Dent.*, **5**(3), pp.197-202.
- [4] W. Trzeciak, R. Koczorowski (2016), "Molecular basis of hypohidrotic ectodermal dysplasia: an update", *J. Appl. Genet.*, **57**, pp.51-61.
- [5] C. Kowalczyk-Quintas, P. Schneider (2014), "Ectodysplasin A (EDA) - EDA receptor signalling and its pharmacological modulation", *Cytokine Growth Factor Reviews*, **25**, pp.195-203.
- [6] F. Andreoni, et al. (2021), "Missense mutations in EDA and EDAR genes cause dominant syndromic tooth agenesis", *Mol. Genet. Genomic Med.*, **9**, DOI: 10.1002/mgg3.1555.
- [7] G. Mues, et al. (2010), "Functional analysis of Ectodysplasin-A mutations causing selective tooth agenesis", *Eur. J. Hum. Genet.*, **18**, pp.19-25.
- [8] J. Zonana, et al. (1993), "Detection of a molecular deletion at the DXS732 locus in a patient with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (EDA), with the identification of a unique junctional fragment", *Am. J. Hum. Genet.*, **52**, pp.78-84.
- [9] S. Huang, et al. (2015), "EDA mutation as a cause of hypohidrotic ectodermal dysplasia: a case report and review of the literature", *Genet. Mol. Res.*, **14**, pp.10344-10351.
- [10] V. Ngoc, et al. (2018), "Clinical, radiographic, and genetic characteristics of hypohidrotic ectodermal dysplasia: a cross-sectional study", *Clin. Genet.*, **94**, pp.484-486.
- [11] Y. Han, et al. (2020), "Pathogenic EDA mutations in Chinese han families with hypohidrotic ectodermal dysplasia and genotype-phenotype: a correlation analysis", *Front. Genet.*, **11**, p.21.
- [12] K. Pääkkönen, et al. (2001), "The mutation spectrum of the EDA gene in X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia", *Hum. Mutat.*, **17**, p.349.
- [13] H. Schneider, et al. (2011), "Sweating ability and genotype in individuals with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia", *J. Med. Genet.*, **48**, pp.426-432.
- [14] M. Martinez-Romero, et al. (2019), "EDA, EDAR, EDARADD and WNT10A allelic variants in patients with ectodermal derivative impairment in the Spanish population", *Orphanet. J. Rare Dis.*, **14**, p.281.
- [15] F. He, et al. (2018), "Conservation analysis and pathogenicity prediction of mutant genes of ectodysplasin A", *BMC Med. Genet.*, **19**, p.209.
- [16] J. Wright, et al. (1993), "Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia", *GeneReviews*, Seattle (WA), <http://europepmc.org/article/nbk1112>.

Bệnh lý nền ở trẻ viêm phổi nặng dai dẳng tại Khoa Điều trị tích cực, Bệnh viện Nhi Trung ương

Hoàng Kim Lâm¹, Tạ Anh Tuấn^{2*}, Nguyễn Thị Hồng Yến², Phạm Thu Nga¹, Phạm Văn Thắng¹

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Nhi Trung ương

Ngày nhận bài 3/8/2021; ngày chuyển phản biện 9/8/2021; ngày nhận phản biện 10/9/2021; ngày chấp nhận đăng 15/9/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu tiến hành nhằm xác định bệnh lý nền ở trẻ viêm phổi nặng dai dẳng (severe persistent pneumonia - sPP) tại Khoa Điều trị tích cực (ICU), Bệnh viện Nhi Trung ương. Nghiên cứu mô tả tiến cứu, tất cả trẻ sPP (kéo dài từ 30 ngày trở lên, dù đã điều trị kháng sinh tối thiểu 10 ngày) nhập ICU, Bệnh viện Nhi Trung ương từ tháng 11/2019 đến tháng 8/2020 được lựa chọn. Sau đó, phân loại theo nhóm có tổn thương lặp lại tại một thùy phổi hoặc nhóm có tổn thương đa thùy phổi và được tiến hành các thăm dò giúp chẩn đoán bệnh lý nền theo lưu đồ. 82 bệnh nhi sPP chiếm 21,9% trẻ viêm phổi nhập ICU, 10,6% tổng số trẻ nhập khoa. Bệnh lý nền được chẩn đoán ở 82,9% trẻ, thường gặp là các bất thường của hệ hô hấp (19,5%), rối loạn miễn dịch (18,3%), tim bẩm sinh (17,1%). 17,1% trẻ không tìm được bệnh lý nền, trong số này viêm phổi hoại tử hoặc abscess phổi do tụ cầu chiếm 50%, ARDS 21,4%, lao phổi 14,3%. Tổn thương x-quang khu trú, lặp lại tại một thùy phổi chiếm 22%.

Từ khóa: bệnh lý nền, viêm phổi dai dẳng, viêm phổi nặng.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

Viêm phổi là bệnh lý phổ biến và là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu ở trẻ em [1]. Trong đó, viêm phổi dai dẳng (Persistent Pneumonia - PP) luôn là thách thức với các bác sĩ lâm sàng nhi khoa, được định nghĩa là viêm phổi với các triệu chứng lâm sàng và tổn thương viêm phổi trên X-quang kéo dài từ 30 ngày trở lên, mặc dù đã được điều trị liệu trình kháng sinh tối thiểu 10 ngày [1-4]. Nghiên cứu của Bolursaz và cs (2017) [1] tại Iran trên 601 trẻ viêm phổi nhập viện, tỷ lệ PP chiếm tới 16,8%. Ở một trẻ viêm phổi thông thường, tổn thương thâm nhiễm trên X-quang sẽ hồi phục và biến mất trong 1-3 tuần, những trường hợp không hồi phục hoàn toàn sau 4 tuần thường liên quan đến các nhóm nguyên nhân đặc biệt [5]. Hiện nay, dữ liệu trên y văn về nguyên nhân và bệnh lý nền ở trẻ PP còn rất hạn chế, dẫn tới những khó khăn trên lâm sàng trong điều trị và kiểm soát bệnh, đặc biệt ở nhóm trẻ sPP phải nhập các ICU. Trẻ nhập ICU thường kèm theo tình trạng suy các chức năng sống, suy đa tạng, hoặc đã có các biến chứng nặng của bệnh (tràn dịch, tràn khí màng phổi, viêm phổi hoại tử...), hoặc nhiễm các căn nguyên vi sinh đặc biệt (lao, nấm, các vi khuẩn không điển hình hoặc đa kháng kháng sinh...) [6, 7]. Chính vì vậy, việc tiếp cận chẩn đoán bệnh lý nền đòi hỏi những khuyến cáo riêng. Tại Việt Nam, hiện chưa có các nghiên cứu được thực hiện một cách hệ thống trên trẻ sPP nhập ICU, do vậy tỷ lệ mắc bệnh và mô hình bệnh lý nền chưa được xác định. Qua thực hành lâm sàng, chúng tôi nhận thấy còn nhiều trường hợp bỏ sót chẩn đoán, hoặc chẩn đoán muộn, dẫn tới thất bại trong điều

trị. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu xác định bệnh lý nền ở trẻ sPP nhập ICU, Bệnh viện Nhi Trung ương.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Tất cả bệnh nhân đủ tiêu chuẩn sPP, nhập ICU, Bệnh viện Nhi Trung ương từ tháng 11/2019 đến tháng 8/2020.

Tiêu chuẩn viêm phổi: ho, sốt kèm theo ít nhất 1 trong 3 dấu hiệu: (1) Thở nhanh, (2) Rút lõm lồng ngực, (3) Khám phổi thấy bất thường: giảm thông khí, ran ẩm nhỏ hạt... và có tổn thương viêm phổi trên X-quang [8].

Viêm phổi nặng: trẻ viêm phổi có từ một tiêu chuẩn chính hoặc từ hai tiêu chuẩn phụ theo hướng dẫn của Hiệp hội các Bệnh truyền nhiễm trẻ em (PIDS) và Hiệp hội các Bệnh truyền nhiễm Hoa Kỳ (IDSA) [9, 10].

PP: viêm phổi với các triệu chứng lâm sàng và tổn thương viêm phổi trên X-quang kéo dài từ 30 ngày trở lên, mặc dù đã được điều trị liệu trình kháng sinh tối thiểu 10 ngày [1-4].

Tiêu chuẩn loại trừ: dưới 1 tháng hoặc trên 15 tuổi; trẻ đẻ non - loạn sản phổi; gia đình từ chối thủ thuật; trẻ từ vong và không thu thập đủ thông tin.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: mô tả tiến cứu.

Xác định bệnh lý nền: tất cả trẻ sPP nhập ICU được khai

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

Underlying causes of persistent pneumonia in children at the Intensive Care Unit, Vietnam National Children's Hospital

Kim Lam Hoang¹, Anh Tuan Ta^{2*},
Thi Hong Yen Nguyen², Thu Nga Pham¹, Van Thang Pham¹

¹Hanoi Medical University

²Vietnam National Children's Hospital

Received 3 August 2021; accepted 15 September 2021

Abstract:

The study describes underlying causes of children with severe persistent pneumonia (sPP) admitted to the Intensive Care Unit (ICU), Vietnam National Children's Hospital. In the prospective and descriptive study, all patients classified as sPP (pneumonia persisting for 30 days or more, despite receiving antibiotics for a minimum period of 10 days), admitted to ICU, Vietnam National Children's Hospital from November 2019 to August 2020 were recruited. Patients were divided into groups based on having a recurrent lesion in the same lobe or lesion in multiple lobes before undergoing several investigational tests to identify the underlying causes. 82 patients with sPP accounted for 21.9% of children admitted to ICU due to pneumonia and 10.6% of total patients at ICU. Underlying causes were diagnosed in 82.9% of sPP children, with the most common causes are abnormalities in respiratory (19.5%), immune disorders (18.3%), congenital heart diseases (17.1%). Underlying causes couldn't be identified in 17.1% of the patients, among whom necrotizing pneumonia or lung abscess account for 50%, ARDS 21.4%, and tuberculosis 14.3%. Local and recurrent x-ray lesions in one lung lobe accounted for 22%.

Keywords: persistent pneumonia, severe pneumonia, underlying causes.

Classification number: 3.1

thác tiền sử, bệnh sử, thăm khám lâm sàng và thực hiện các xét nghiệm ban đầu giúp định hướng nguyên nhân. Các thông tin được thu thập theo mẫu bệnh án nghiên cứu trẻ sPP. Trẻ được phân loại theo nhóm sPP có tổn thương phổi khu trú lặp lại tại một thùy phổi hoặc nhóm có tổn thương đa thùy phổi, sau đó được tiến hành các thăm dò giúp chẩn đoán xác định bệnh lý nền. Các bất thường về đường thở hoặc nhu mô phổi được khẳng định bằng chụp cắt lớp vi tính lồng ngực và/hoặc nội soi phế quản, xét nghiệm dịch rửa phế quản hoặc sinh thiết phổi. Viêm tiểu phế quản bất

sau nhiễm trùng (PIBO) được chẩn đoán dựa trên tiêu chuẩn lâm sàng và chụp cắt lớp lồng ngực [9]. Các bất thường tim mạch được chẩn đoán bằng siêu âm tim, chụp cắt lớp vi tính, hoặc thông tim chẩn đoán. Các rối loạn miễn dịch được chẩn đoán dựa vào định lượng các Immunoglobulin máu (IgG, IgA, IgM, IgE), đếm số lượng tế bào Lympho T-CD3, T-CD4, T-CD8 bằng kỹ thuật flow cytometry, hoặc các tiêu chuẩn bệnh cụ thể (bạch cầu cấp, hội chứng thực bào máu...). Hội chứng hít được chẩn đoán dựa vào lâm sàng. Các bệnh lý di truyền được chẩn đoán xác định bằng phân tích gen.

Xử lý số liệu: số liệu được nhập và phân tích bằng phần mềm SPSS 22.0.

Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng một phần số liệu của đề tài nghiên cứu sinh "Nghiên cứu sPP/tái diễn ở trẻ em được điều trị tại Bệnh viện Nhi Trung ương" được Hội đồng đạo đức Trường Đại học Y Hà Nội thông qua ngày 29/3/2019, mã số NCS12/HMU-IRB.

Kết quả

Đặc điểm chung của trẻ sPP nhập ICU

Trong thời gian nghiên cứu có 771 bệnh nhân nhập ICU, với 374 trẻ có tình trạng viêm phổi. 82 bệnh nhi đủ tiêu chuẩn sPP, chiếm 21,9% trẻ viêm phổi và 10,6% tổng số ca nhập Khoa. sPP gặp chủ yếu ở trẻ nhỏ, 50% trẻ sPP dưới 7 tháng tuổi, 75% dưới 19,5 tháng tuổi. Tuổi trung vị là 7 tháng. Tỷ lệ trẻ nam mắc sPP cao hơn trẻ gái (bảng 1).

Bảng 1. Một số đặc điểm chung của trẻ sPP nhập ICU.

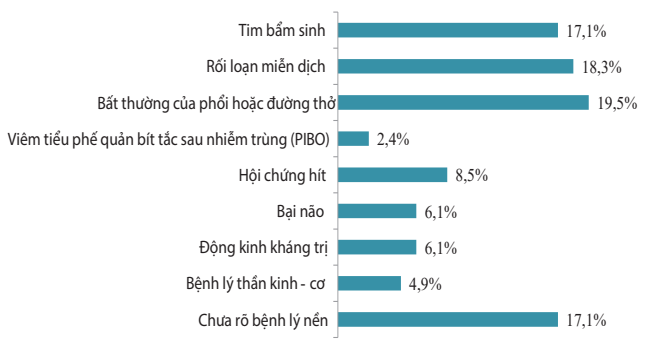
Tuổi	Trung bình (Mean ± SD)	Khoảng tuổi (Range)	Trung vị (Median)	Khoảng phân tứ vị		
				p25	p50	p75
Tuổi nhập viện (tháng)	21,5±36,7	1,0-163,0	7,0	3,0	7,0	19,5
Giới	Tổng (n=82)					
	n			%		
Nam	51			62,2		
Nữ	31			37,8		
Địa lý	Tổng (n=82)					
	n			%		
Thành thị	Hà Nội			13,4		
	Các tỉnh khác			15,9		
Nông thôn	58			70,7		

*: có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê với p<0,05.

Bệnh nhân nhập ICU đến từ cả 3 miền, trong đó các tỉnh miền Bắc chiếm 84,2%, miền Trung 13,4%, miền Nam 2,4%, phần lớn từ các khu vực nông thôn hoặc các thành thị ngoài Hà Nội (86,6%).

Tỷ lệ mắc các nhóm bệnh lý nền ở trẻ SPP và sự phân bố theo tuổi

Bệnh lý nền được chẩn đoán ở 68 trẻ (82,9%). Các nhóm bệnh lý nền thường gặp là các bất thường của hệ hô hấp (19,5%), các rối loạn miễn dịch (18,3%), tim bẩm sinh (17,1%). 17,1% trẻ không phát hiện bệnh lý nền, trong số này viêm phổi tự cầu chiếm 50%, ARDS 21,4%, lao phổi 14,3% (biểu đồ 1).



Biểu đồ 1. Tỷ lệ mắc các nhóm bệnh lý nền ở trẻ SPP.

Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ mắc các nhóm bệnh lý nền giữa các nhóm tuổi khác nhau, với $p<0,05$ (bảng 2). Bệnh lý nền chiếm ưu thế ở trẻ <1 tuổi là tim bẩm sinh, rối loạn miễn dịch và các bất thường hệ hô hấp; ở trẻ 1-5 tuổi là các bất thường hệ hô hấp, bại não và rối loạn miễn dịch; trong khi ở trẻ >5 tuổi là các rối loạn miễn dịch và hội chứng hít.

Bảng 2. Bệnh lý nền ở trẻ SPP theo nhóm tuổi.

Nhóm tuổi bệnh lý nền	<1 tuổi	1-5 tuổi	>5 tuổi
Tim bẩm sinh	12 (22,6%)	2 (10,5%)	0 (0%)
Rối loạn miễn dịch	9 (17,0%)	3 (15,8%)	3 (30,0%)
Bất thường hệ hô hấp	9 (17,0%)	6 (31,5%)	1 (10,0%)
PIBO	1 (1,9%)	1 (5,3%)	0 (0%)
Hội chứng hít	3 (5,7%)	1 (5,3%)	3 (30,0%)
Bại não	1 (1,9%)	4 (21,0%)	0 (0%)
Động kinh kháng trị	3 (5,7%)	1 (5,3%)	1 (10,0%)
Bệnh lý thần kinh - cơ	4 (7,5%)	0 (0%)	0 (0%)
Chưa rõ bệnh lý nền	11 (20,7%)	1 (5,3%)	2 (20,0%)
p (test)	0,044* Phi and Cramer's V		

*: có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê với $p<0,05$.

Bệnh lý nền ở trẻ SPP theo tổn thương X-quang phổi

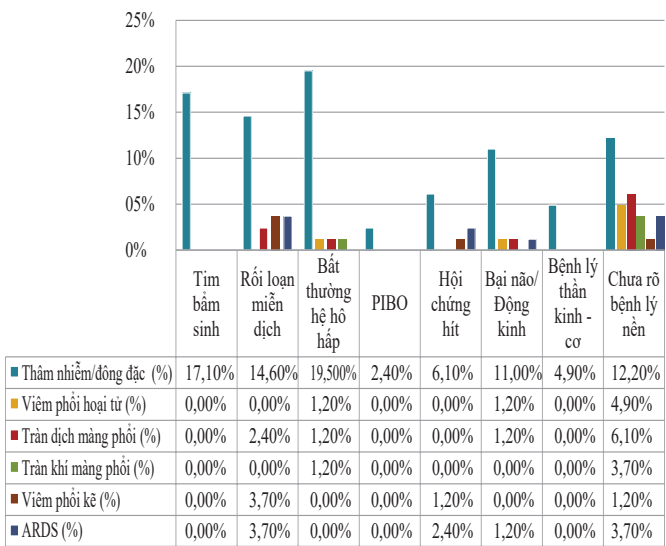
Phân loại SPP theo 2 nhóm có tổn thương X-quang khu trú lặp lại tại một thùy phổi và nhóm có tổn thương đa thùy phổi, tỷ lệ mắc các nhóm bệnh lý nền có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 2 nhóm với $p<0,05$ (bảng 3).

Bảng 3. Bệnh lý nền ở trẻ SPP theo tổn thương X-quang phổi.

Bệnh lý nền	Tổn thương X-quang khu trú tại một thùy phổi		Tổn thương X-quang đa thùy phổi	
	n	%	n	%
Tim bẩm sinh	0	0	14	21,9
Rối loạn miễn dịch	1	5,6	14	21,9
Bất thường hệ hô hấp	6	33,3	10	15,6
PIBO	0	0	2	3,1
Hội chứng hít	3	16,7	4	6,3
Bại não/động kinh kháng trị	1	5,6	9	14,1
Bệnh lý thần kinh - cơ	1	5,6	3	4,7
Chưa rõ bệnh lý nền	6 ^a	33,3	8 ^b	12,5
p (test)	0,036* Phi and Cramer's V			

*: có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê với $p<0,05$; ^a: trẻ SPP không tìm được bệnh lý nền có tổn thương X-quang khu trú lặp lại tại một thùy phổi, tất cả trẻ nhóm này được chẩn đoán viêm phổi do căn nguyên tự cầu, trong đó 83,3% có biến chứng viêm phổi hoại tử hoặc abscess phổi; ^b: trẻ SPP không tìm được bệnh lý nền có tổn thương X-quang đa thùy phổi.

Trẻ SPP có tổn thương X-quang khu trú lặp lại tại một thùy phổi chiếm 22%, thường do các bất thường của đường thở hoặc phổi, hội chứng hít; hoặc các biến chứng của viêm phổi do tự cầu.



Biểu đồ 2. Đặc điểm tổn thương X-quang theo nhóm bệnh lý nền.

Kết quả biểu đồ 2 cho thấy, tổn thương X-quang hay gặp nhất ở trẻ sPP là thâm nhiễm hoặc đông đặc phổi (87,8%), tràn dịch màng phổi chiếm 10,9%, ARDS chiếm 11%, viêm phổi hoại tử 7,3%, viêm phổi kẽ 6,1%, tràn khí màng phổi 4,9%. Tổn thương thâm nhiễm hoặc đông đặc phổi phổ biến ở tất cả các nhóm bệnh lý nền, phần lớn viêm phổi hoại tử xác định được căn nguyên do tụ cầu (66,7%); viêm phổi kẽ thường do các căn nguyên gây viêm phổi ở nhóm rối loạn miễn dịch (60%); ARDS gây sPP thường gặp ở trẻ rối loạn miễn dịch (3,7%), hội chứng hít (2,4%), nhưng cũng xảy ra ở trẻ trước đó khỏe mạnh (3,7%).

Bàn luận

sPP chiếm tới 21,9% trẻ viêm phổi nhập ICU, tỷ lệ này cao hơn so với tỷ lệ mắc PP ở trẻ viêm phổi nói chung. Theo nghiên cứu của Saad và cs (2013) [2], ở thượng Ai Cập trên 1228 bệnh nhi nhập viện với chẩn đoán viêm phổi, chỉ có 27 trường hợp mắc PP (chiếm 2,2%) [2]. Nghiên cứu của Bolursaz và cs (2017) [1] tại Iran trên 601 trẻ viêm phổi nhập viện, tỷ lệ PP chiếm 16,8% [1]. Điều này cho thấy trẻ viêm phổi nặng nhập ICU có khả năng tiến triển thành PP cao hơn so với trẻ viêm phổi nhập viện nói chung.

Tỷ lệ mắc bệnh ở trẻ trai cao hơn trẻ gái, kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đó trên trẻ PP nhập viện [1, 2, 4]. Khoảng tuổi nhập viện của trẻ sPP trong nghiên cứu dao động từ 1 đến 163 tháng tuổi, tuổi trung bình là 21,5 tháng, tuy nhiên giá trị trung vị là 7 tháng tuổi và trẻ dưới 6 tháng chiếm tới 50%, dưới 1 tuổi chiếm 64,6%. Trong khi đó, tuổi trung bình của trẻ PP trong nghiên cứu của Bolursaz và cs (2017) [1] cao hơn nhiều (8 tuổi), theo nghiên cứu của Saad và cs (2013) là 3,2 tuổi [2] và của Kumar và cs (2009) [4] là 3,3 tuổi. Nhóm tuổi dưới 1 cũng chiếm tỷ lệ thấp hơn trong nghiên cứu của Bolursaz và Saad so với nghiên cứu của chúng tôi, lần lượt là 7 và 31% [1, 4]. Nghiên cứu của Koh và cs (2017) [6] trên trẻ viêm phổi nặng nhập ICU cũng cho thấy tuổi trung bình nhập viện là 3,3 (0,8-8,4). Như vậy, qua kết quả nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy sPP xảy ra chủ yếu ở trẻ nhỏ, đặc biệt là trẻ <1 tuổi.

Phần lớn trẻ sPP phải nhập ICU đến từ các khu vực nông thôn hoặc thành thị ngoài Hà Nội, điều này có thể liên quan tới điều kiện y tế hạn chế, dẫn tới chậm trễ trong việc phát hiện sớm và kiểm soát bệnh.

Tỷ lệ trẻ sPP nhập ICU có bệnh lý nền đi kèm khá cao (82,9%). 17,1% trẻ không phát hiện bệnh lý nền, tuy nhiên trong số này viêm phổi do tụ cầu chiếm tới 50%; lao phổi 14,3%; 7,1% nhiễm nấm *Candida albicans* sau ho gà nặng, đây đều là các căn nguyên gây viêm phổi nặng và PP đã được ghi nhận [1, 2, 4, 6]; còn lại ARDS chiếm 21,4%; bệnh lý phổi kẽ 7,1%, đây là các thể bệnh có tổn thương phổi và biến chứng nặng, khiến thời gian điều trị và nằm ICU kéo dài [6]. Kết quả này cho thấy, trẻ mắc sPP thường liên quan đến các bệnh lý nền hoặc các nhóm căn nguyên đặc biệt, việc xác định bệnh lý nền ở trẻ mắc viêm phổi nặng phải

nhập ICU nói chung, đặc biệt ở trẻ sPP là thực sự cần thiết.

Về tỷ lệ mắc các nhóm bệnh lý nền, thường gặp nhất là các bất thường của hệ hô hấp (19,5%), các rối loạn miễn dịch (18,3%) và tim bẩm sinh (17,1%). Các nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra đây là những bệnh lý nền thường gặp [1-4, 7]. Tuy nhiên, tỷ lệ mắc từng nhóm bệnh lý ở mỗi lứa tuổi có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Các bất thường của hệ hô hấp (dị tật lồng ngực, đường thở hoặc phổi) phổ biến ở trẻ sPP dưới 5 tuổi, ít gặp ở trẻ >5 tuổi. Trong đó, trẻ dưới 1 tuổi thường liên quan đến các dị dạng của đường thở (88,9%), trẻ >1 tuổi liên quan nhiều hơn đến các bất thường của lồng ngực (71,4%), gồm tật lõm lồng ngực, hẹp lồng ngực hoặc lồng ngực biến dạng kết hợp gù vẹo cột sống. Các dị tật này đều làm tăng nguy cơ suy hô hấp và mức độ nặng của viêm phổi, đồng thời gây khó khăn trong chăm sóc thở máy và cai máy thở. Tim bẩm sinh là bệnh lý nền phổ biến thứ hai sau các bất thường của hệ hô hấp (chiếm 17,1%), nhưng lại là bệnh lý nền phổ biến nhất ở nhóm trẻ dưới 1 tuổi (chiếm 22,6%), ít gặp ở trẻ 1-5 tuổi (chiếm 10,5%), và không gặp ở nhóm trẻ >5 tuổi. Các rối loạn miễn dịch cũng là bệnh lý nền thường gặp (chiếm 17,1%) và có thể xảy ra ở mọi lứa tuổi, nhưng là nguyên nhân gây sPP phổ biến nhất ở nhóm trẻ lớn >5 tuổi (chiếm 30%), cùng với hội chứng hít (chiếm 30%). Kết quả nghiên cứu cho thấy, chỉ có 8,5% trẻ sPP được chẩn đoán hội chứng hít thứ phát do rối loạn nuốt, dẫn đến mất khả năng kiểm soát dịch tiết hô hấp hoặc dịch dạ dày trào ngược. Các trẻ này đều được ghi nhận sự khó khăn trong việc ăn hoặc bú, cũng như sự liên quan đến các triệu chứng hô hấp. Các nghiên cứu trước đây trên trẻ PP chỉ ra rằng hội chứng hít là một trong những nguyên nhân thường gặp nhất [1, 2, 4]. Hội chứng này bao gồm tất cả các tình trạng mà dịch hoặc chất ở hầu họng bị hít vào phổi. Việc chẩn đoán hội chứng hít ở trẻ em còn là một thách thức với người thực hành lâm sàng. Hội chứng hít trong nghiên cứu này được chẩn đoán dựa vào khai thác lâm sàng. Các thăm dò còn hạn chế do thiếu trang thiết bị và không thực hiện được do tình trạng bệnh nặng. Nhóm bệnh lý thần kinh gồm bại não (6,1%), động kinh kháng trị (6,1%) và thần kinh - cơ (4,9%), gặp chủ yếu ở trẻ <5 tuổi. Cơ chế gây sPP của nhóm này có thể bao gồm hội chứng hít tiềm ẩn, xảy ra thứ phát sau trào ngược dạ dày thực quản; và/hoặc rối loạn nuốt và giảm làm sạch chất nhầy đường thở; hoặc do giảm trương lực cơ và phản xạ ho do sử dụng các thuốc chống động kinh kéo dài [11]. Hoạt động ho là một cơ chế bảo vệ quan trọng, đòi hỏi sự hoạt động cơ có hiệu quả, đặc biệt là các cơ hô hấp. Vì thế, các tình trạng ảnh hưởng tới khả năng hoạt động của cơ sẽ dẫn đến nhiễm trùng tái diễn, ứ đọng chất nhầy và xẹp phổi [12]. PIBO gặp với tỷ lệ nhỏ 2,4%, các trẻ này đều có tiền sử khỏe mạnh, khởi phát triệu chứng và được chẩn đoán PIBO sau khi nhiễm Adenovirus.

Kết quả phân loại bệnh lý nền theo tổn thương X-quang cho thấy, các bất thường của hệ hô hấp chiếm phần lớn trong nhóm tổn thương khu trú lặp lại tại một thùy phổi (33,3%),

trong đó 66,7% là các bất thường của đường thở, 33,3% là bất thường của nhu mô phổi; tổn thương X-quang chủ yếu là các tổn thương thâm nhiễm hoặc đồng đặc. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu về PP hoặc tái diễn trước đây [1, 2, 7]. Viêm phổi do tụ cầu chiếm 33,3% các trường hợp tổn thương khu trú lặp lại tại một thùy phổi, chủ yếu là các tổn thương viêm phổi hoại tử, tràn dịch màng phổi, tràn khí màng phổi.

Kết luận

sPP là bệnh lý phổ biến ở ICU, chiếm 10,6% tổng số bệnh nhân và 21,9% bệnh nhân viêm phổi nặng nhập Khoa. Phần lớn có bệnh lý nền đi kèm (82,9%). Bệnh lý nền thường gặp nhất là các bất thường của hệ hô hấp hoặc tim mạch và các rối loạn miễn dịch. Trẻ sPP có tổn thương X-quang khu trú lặp lại một thùy phổi chiếm 22%, thường do các bất thường của đường thở hoặc phổi (33,3%), hội chứng hít (16,7%), hoặc các biến chứng của viêm phổi do tụ cầu (33,3%).

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Tập đoàn Vingroup và hỗ trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sỹ, tiến sỹ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VinBigdata) thông qua đề tài mã số VINIF.2020.TS.87. Nhóm nghiên cứu xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] M.R. Bolursaz, et al. (2017), "Underlying causes of persistent and recurrent pneumonia in children at a Pulmonary Referral Hospital in Tehran, Iran", *Arch. Iran. Med.*, **20(5)**, pp.266-269.

[2] K. Saad, et al. (2013), "Recurrent/persistent pneumonia among children in Upper Egypt", *Mediterr J. Hematol. Infect. Dis.*, **5(1)**, DOI: 10.4084/MJHID.2013.028.

[3] R. Lodha, et al. (2003). "Persistent pneumonia in children", *Indian Pediatrics*, **40(10)**, pp.967-970.

[4] M. Kumar, et al. (2009), "Persistent pneumonia: underlying cause and outcomes", *Indian J. Pediatr.*, **76(12)**, pp.1223-1226.

[5] A.G. Griffiths, T.P. Green (2016), "Chronic or recurrent Respiratory symptoms", *Nelson Textbook of Pediatrics*, Elsevier Health Sciences, pp.2027-2031.

[6] J.W.J.C. Koh, et al. (2017), "Risk factors for mortality in children with pneumonia admitted to the pediatric intensive care unit", *Pediatric Pulmonology*, **52(8)**, pp.1076-1084.

[7] S. Montella, et al. (2017), "Recurrent pneumonia in children: a reasoned diagnostic approach and a single centre experience", *Int. J. Mol. Sci.*, **18(2)**, DOI: 10.3390/ijms18020296.

[8] WHO (2001), *Standardization of Interpretation of Chest Radiographs for the Diagnosis of Pneumonia in Children*.

[9] J.S. Bradley, et al. (2011), "The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America", *Clinical Infectious Diseases*, **53(7)**, pp.e25-e76.

[10] T.A. Florin, et al. (2018), "Validation of the PIDS/IDSA severity criteria in children with community-acquired pneumonia", *Clinical Infectious Diseases*, **67(1)**, pp.112-119.

[11] G.B. Fischer, et al. (2010), "Post infectious bronchiolitis obliterans in children", *Paediatric Respiratory Reviews*, **11(4)**, pp.233-239.

[12] J.D. Finder (2010), "Airway clearance modalities in neuromuscular disease", *Paediatric Respiratory Reviews*, **11(1)**, pp.31-34.

Đánh giá mức độ biểu hiện của gen *SOCS1* trên bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan liên quan đến nhiễm virus viêm gan B

Võ Thị Thúy Quỳnh¹, Trần Thị Phương Thảo², Nguyễn Việt Phương³,
Phạm Văn Dũng⁴, Nguyễn Linh Toàn⁵, Hoàng Văn Tổng^{4,5*}

¹Trung tâm Y học Hạt nhân và Ung bướu, Bệnh viện Bạch Mai

²Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

⁴Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y

⁵Bộ môn Sinh lý Bệnh, Học viện Quân y

Ngày nhận bài 6/9/2021; ngày chuyển phản biện 10/9/2021; ngày nhận phản biện 11/10/2021; ngày chấp nhận đăng 15/10/2021

Tóm tắt:

Ung thư biểu mô tế bào gan (UTBMTBG) là dạng thường gặp của ung thư gan và một trong các nguyên nhân được xác định là do nhiễm virus viêm gan B (VGB) mạn tính. Sự đáp ứng miễn dịch của cơ thể với virus VGB làm kích hoạt con đường truyền tín hiệu và hoạt hóa phiên mã (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription - JAK/STAT). Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) được biết đến là một trong các yếu tố điều hòa âm con đường JAK/STAT. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá mức độ biểu hiện gen *SOCS1* và tương quan giữa các đặc điểm chỉ số cận lâm sàng với biểu hiện gen này trong UTBMTBG nhiễm virus VGB. Mức độ biểu hiện mRNA *SOCS1* được xác định trên mẫu mô gan lành lân cận và mô u gan từ 44 bệnh nhân UTBMTBG bằng phương pháp realtime RT-PCR. Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện gen *SOCS1* ở mô gan lân cận u cao hơn, có ý nghĩa thống kê so với mô u gan ($p=0,003$). Biểu hiện gen *SOCS1* cao ở mô lành lân cận được quan sát thấy ở nhóm có 1 khối u ($p=0,024$), kích thước khối u ≤ 5 cm ($p=0,011$), có sự xâm lấn mạch ($p=0,047$) và không có sự xâm lấn mạch ($p=0,007$). Số lượng hồng cầu có tương quan thuận với mức độ biểu hiện của gen *SOCS1* (Spearman's $\rho=0,359$, $p=0,018$). Từ các dữ liệu thu nhận được, biểu hiện gen *SOCS1* có thể được xem là yếu tố tiềm năng tham gia vào quá trình sinh bệnh học của UTBMTBG.

Từ khóa: JAK/STAT, *SOCS1*, ung thư biểu mô tế bào gan, virus viêm gan B.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Theo GLOBOCAN 2020 [1], ung thư gan là loại bệnh phổ biến thứ 6 trên thế giới, với khoảng 905.677 trường hợp mới phát hiện và 830.180 trường hợp tử vong hàng năm. Ở Việt Nam, ung thư gan đứng đầu về số ca mắc (ước tính khoảng 26.418) và tử vong (khoảng 25.272) [1]. Dạng ung thư gan thường gặp nhất là UTBMTBG, chiếm 75-85% [2]. Một trong những nguyên nhân chính dẫn tới UTBMTBG là do nhiễm virus VGB mạn tính. Khi nhiễm virus, cơ thể sẽ xảy ra sự đáp ứng miễn dịch bẩm sinh bằng cách tiết ra các interferon (IFN) và cytokine để kích hoạt quá trình viêm. Những IFN và cytokine gắn với các thụ thể trên bề mặt tế bào, hoạt hóa con đường JAK/STAT, từ đó hình thành quá trình phosphoryl hóa protein JAK [3]. Các protein này sau khi được kích hoạt sẽ phosphoryl hóa protein STAT. Protein STAT khi đó sẽ ở trạng thái dimer và di chuyển vào trong nhân, đóng vai trò là yếu tố phiên mã, hoạt hóa phiên mã của các gen liên quan đến con đường tín hiệu. Khi quá trình viêm nhiễm kéo dài dẫn tới sự rối loạn hoạt động của các

con đường tín hiệu trong tế bào, cụ thể là JAK/STAT [4].

Sự truyền thông tin của các IFN và cytokine qua con đường JAK/STAT có thể được điều hòa âm qua sự hoạt động của họ protein SOCS (gồm 8 thành viên: SOCS1 đến SOCS7 và CISH). Protein SOCS điều hòa con đường truyền tín hiệu JAK/STAT qua 3 cách: i) Liên kết trực tiếp với JAK, ức chế sự phosphoryl hóa của JAK; ii) Cạnh tranh với STAT cho vị trí gắn trên JAK, cản trở sự hoạt hóa STAT; iii) Liên kết với protein tín hiệu và phức các enzyme protease để phân giải protein [4]. SOCS1 là một protein nội bào có vai trò quan trọng trong một số loại tín hiệu cytokine, chẳng hạn như IFN- γ , interleukin (IL)-2 và IL-4. Khi có sự biến đổi ác tính đối với một số bệnh ung thư thường gặp (như UTBMTBG, ung thư phổi không tế bào nhỏ, ung thư đầu cổ), biểu hiện SOCS-1 giảm dẫn đến con đường tín hiệu JAK/STAT - con đường dẫn truyền tín hiệu cytokine chính bị diễn ra quá mức [5].

Từ điều kiện thực tế đặt ra, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm mục tiêu đánh giá mức độ biểu hiện của gen

*Tác giả liên hệ: Email: hoangvantong@vmmu.edu.vn

Association of *SOCS1* mRNA expression with hepatitis B virus infection-related hepatocellular carcinoma

Thi Thuy Quynh Vo¹, Thi Phuong Thao Tran²,
Viet Phuong Nguyen³, Van Dung Pham⁴,
Linh Toan Nguyen⁵, Van Tong Hoang^{4,5*}

¹The Nuclear Medicine and Oncology Centre, Bach Mai Hospital

²Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

³Military Hospital 103, Vietnam Military Medical University

⁴Institute of Biomedicine and Pharmacy, Vietnam Military Medical University

⁵Department of Pathophysiology, Vietnam Military Medical University

Received 6 September 2021; accepted 15 October 2021

Abstract:

Hepatocellular carcinoma (HCC), the predominant form of liver cancer worldwide, can be triggered by a variety of causes such as chronic hepatitis B virus (HBV) infection. The immune response to HBV activates the janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) signaling pathway. Suppressor of cytokine signaling 1 (*SOCS1*) is a negative feedback regulator of JAK/STAT pathway. Our study was carried out to evaluate *SOCS1* mRNA expression and its correlation with paraclinical characteristics in patients with HBV-related HCC. The *SOCS1* mRNA expression level in adjacent non-tumour tissues and tumour liver tissues were determined in 44 patients with HBV infection-associated HCC by real-time RT-PCR. Our results showed that *SOCS1* mRNA expression level in adjacent non-tumour tissues were significantly higher than in HCC tissues ($p=0.003$). High expression of *SOCS1* in adjacent non-tumour tissue was observed in patients with single tumour ($p=0.024$), tumour size ≤ 5 cm ($p=0.011$), vascular invasion ($p=0.047$), and no vascular invasion ($p=0.007$). Red blood cell counts were positively correlated with *SOCS1* gene expression (Spearman's $\rho=0.359$, $p=0.018$). Our results suggested that *SOCS1* expression may be considered as a potential factor involved in the pathogenesis of HCC.

Keywords: hepatitis B virus, hepatocellular carcinoma, JAK/STAT, *SOCS1*.

Classification number: 3.2

SOCS1, cũng như tìm hiểu mối tương quan giữa mức độ biểu hiện của gen này với yếu tố lâm sàng và cận lâm sàng ở những bệnh nhân UTBMTBG liên quan đến nhiễm virus VGB để làm rõ hơn tiềm năng ứng dụng của gen *SOCS1* trong quá trình sinh bệnh học UTBMTBG.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu mô của 44 bệnh nhân UTBMTBG tham gia nghiên cứu đã trải qua phẫu thuật cắt u gan. Các mẫu mô được thu thập ở hai vị trí tại thời điểm phẫu thuật: tại khối u (mô u) và phần mô gan lành lân cận khối u (mô lân cận u). Các mô gan lành lân cận được lấy cách rìa khối u trên 2 cm. Các mẫu mô lân cận u và mô u được kiểm tra bằng mô bệnh học để đánh giá là mô u lành hay ung thư. Mẫu mô sau khi thu thập được bảo quản trong dung dịch TRIzol ở -80°C .

Tách chiết RNA tổng số và đánh giá mức độ biểu hiện gen *SOCS1* bằng kỹ thuật realtime RT-PCR

RNA tổng số được tách chiết bằng kit QIAamp RNA tổng số theo quy trình của nhà sản xuất. Sau khi tách chiết, cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số bằng kit Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit. Gen *SOCS1* được đánh giá biểu hiện bằng kỹ thuật realtime RT-PCR với các cặp mồi được sử dụng bao gồm: mồi cho gen *SOCS1* gồm 5'-AGA CCC CTT CTCACC TCT TG-3' (mồi xuôi) và 5'-CTG CAC AGC AGA AAA TAA AGC-3' (mồi ngược); mồi cho gen *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) gồm 5'-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC-3' (mồi xuôi) và 5'-CCA CCC ATG GCAAAT TCC ATG GCA-3' (mồi ngược). Phản ứng PCR có thể tích 20 μl /1 phản ứng gồm thành phần: 2 μl cDNA, 0,5 μM mồi mỗi loại, 10 μl SensiFAST™ Sybr No-Rox (Bioline) 2X và nước DEPC (diethylpyrocarbonate). Phản ứng được diễn ra với thời gian tách mạch ở 95°C trong 2 phút và chu kỳ nhiệt bao gồm: 95°C trong 5 giây, 57°C trong 10 giây, 72°C trong 10 giây với 45 chu kỳ. Kỹ thuật realtime RT-PCR định lượng gen *SOCS1* được thực hiện trên hệ thống Rotor Gene-Q (Qiagen). Mức độ biểu hiện của gen *SOCS1* được đánh giá bằng tỷ lệ giữa gen *SOCS1* và *GAPDH* trên mỗi mẫu theo phương pháp chu kỳ ngưỡng $2^{-\Delta\text{Ct}}$ [6].

Phân tích số liệu

Số liệu được nhập và quản lý bằng Excel 2010 và phân tích bằng phần mềm SPSS V.16. So sánh sự biểu hiện gen *SOCS1* giữa mô u và mô lành bằng thuật toán Mann-Whitney U test. Tương quan của biểu hiện gen *SOCS1* với chỉ số cận lâm sàng được xác định bằng kiểm định Spearman's rho test. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Kết quả

Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của đối tượng nghiên cứu

Giá trị các chỉ số lâm sàng và cận lâm sàng của 44 bệnh nhân được tóm tắt ở bảng 1. Nhóm bệnh nhân tham gia nghiên cứu phần lớn có độ tuổi >50 (35/44 bệnh nhân, chiếm khoảng 79,5%) và hầu hết là nam giới với 37/44 bệnh nhân tham gia nghiên cứu (84,1%). Các bệnh nhân UTBMTBG chủ yếu ở giai đoạn trung gian và tiến triển theo tiêu chuẩn phân loại giai đoạn ung thư gan Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) (giai đoạn B: 72,7% và giai đoạn C: 20,5%). Phần lớn các kết quả xét nghiệm huyết đồ, chỉ số đông máu và sinh hoá đều nằm trong khoảng giá trị bình thường. Tuy nhiên, duy nhất chỉ số AFP (Alpha fetoprotein) cao hơn trên ngưỡng giới hạn. Thông thường chỉ số này thường tăng cao ở trên 70% nhóm bệnh nhân ung thư gan. Mức độ AFP càng cao đặc biệt ở những bệnh nhân xơ gan và nhiễm virus mạn tính [7].

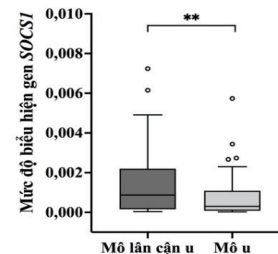
Bảng 1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của đối tượng nghiên cứu.

Đặc điểm cận lâm sàng		Đặc điểm lâm sàng khối u	
Đặc điểm huyết đồ	Trung vị (khoảng)	Vị trí u gan	Số bệnh nhân (%)
Hồng cầu (M/μl)	4,68 (2,96-7,48)	Trái	25/44 (56,8)
Huyết sắc tố (g/dl)	142,5 (90-165)	Phải	17/44 (38,6)
Bạch cầu (K/μl)	7,04 (4,1-46)	Cả hai	2/44 (4,6)
Tiểu cầu (K/μl)	185 (1,56-391)	Số lượng khối u	Số bệnh nhân (%)
Chỉ số đông máu	Trung vị (khoảng)	1 khối u	32/44 (72,7)
PT (s)	11,85 (10,50-25,10)	Nhiều khối u	12/44 (27,3)
PT (%)	94 (39-119)	Kích thước khối u (cm)	Số bệnh nhân (%)
INR	1,04 (0,90-2,02)	≤5	23/44 (52,3)
Fibrinogen (g/l)	3,63 (2,4-5,96)	>5	21/44 (47,7)
APTT (s)	31,70 (25-40)	Khả năng xâm lấn mạch	Số bệnh nhân (%)
Chỉ số sinh hoá	Trung vị (khoảng)	Có	10/44 (22,7)
Glucose	5,49 (3,36-9,87)	Không	29/44 (65,9)
Ure	5,60 (2,70-8,10)	Không xác định	5/44 (11,4)
Creatinin	82 (54,2-109)	Phân loại giai đoạn BCLC	Số bệnh nhân (%)
AST	36,90 (15-204)	A (sớm)	3/44 (6,8)
ALT	34,7 (8,50-257,70)	B (trung gian)	32/44 (72,7)
Bilirubin toàn phần	10,40 (3,80-71,80)	C (tiến triển)	9/44 (20,5)
Bilirubin trực tiếp	4,3 (1,2-49,1)	Dấu ấn ung thư	Nồng độ dấu ấn
Protein	75 (63-84)	AFP (ng/ml)	33,14 (1,96-19.724,4)
Albumin	41 (4,6-49)	CEA (ng/ml)	3,19 (0,74-19,87)
		CA 19-9 (ng/ml)	12,55 (0,6-128,3)

PT (s): prothrombin time; INR: international normalized ratio; APTT (s): activated partial thromboplastin; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; CEA: carcinoembryonic antigen; CA19-9: cancer antigen 19-9.

Mức độ biểu hiện gen SOCS1 giữa mô lân cận u và mô u

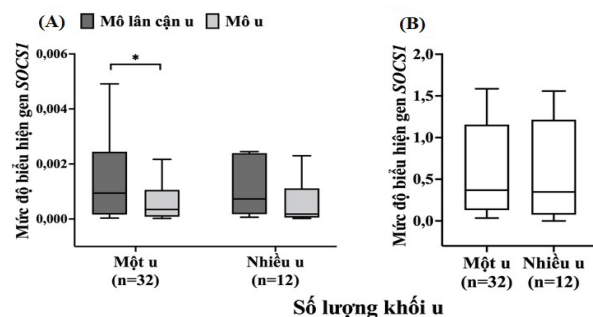
Kết quả phân tích thống kê cho thấy mức độ biểu hiện tương đối của gen *SOCS1* ở mô gan lân cận u cao hơn có ý nghĩa thống kê so với mô u là 12,03 lần ($p=0,003$) (hình 1).



Hình 1. Mức độ biểu hiện gen SOCS1 ở mô lân cận u và mô u (: $p<0,01$).**

Mối liên quan giữa mức độ biểu hiện gen SOCS1 và số lượng khối u

Mức độ biểu hiện gen *SOCS1* ở mô lân cận u và mô u được phân tích trong nhóm bệnh nhân có 1 khối u và nhiều khối u. Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện gen *SOCS1* trong nhóm bệnh nhân có 1 khối u cao hơn ở mô lân cận u so với mô u ($p=0,024$). Tuy nhiên, trong nhóm bệnh nhân có nhiều khối u, không nhận thấy biểu hiện gen *SOCS1* giữa mô lân cận u và mô u có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ($p=0,05$) (hình 2A). Đồng thời, khi đánh giá mức độ biểu hiện gen *SOCS1* giữa 2 nhóm bệnh nhân (có 1 khối u và nhiều khối u) thông qua tỷ số biểu hiện giữa mức độ biểu hiện trong mô u và mô lành lân cận cũng không nhận thấy sự khác biệt ($p=0,51$) (hình 2B).

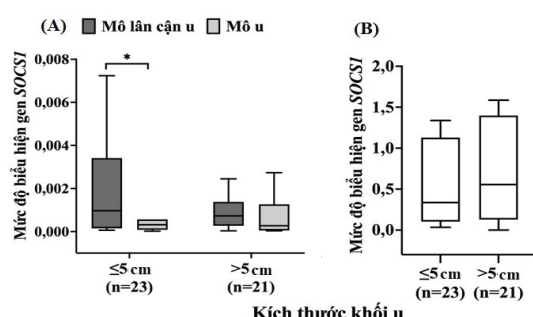


Hình 2. Mức độ biểu hiện gen SOCS1 và số lượng khối u. (A) Mức độ biểu hiện gen *SOCS1* ở mô lân cận u và mô u trong nhóm bệnh nhân có 1 khối u và nhiều khối u; **(B)** Mức độ biểu hiện gen *SOCS1* giữa nhóm bệnh nhân có 1 khối u và nhiều khối u (*: $p<0,05$).

Mối liên quan giữa mức độ biểu hiện gen SOCS1 và kích thước khối u

Mức độ biểu hiện gen *SOCS1* ở mô lân cận u và mô u được phân tích trong nhóm bệnh nhân có kích thước khối u ≤5 cm và u >5 cm. Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện gen

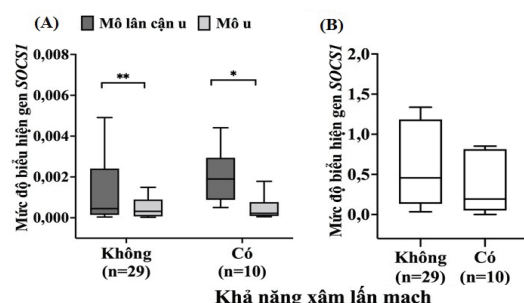
SOCS1 trong nhóm bệnh nhân có kích thước khối u ≤ 5 cm ở mô lân cận u cao hơn so với mô u ($p=0,011$). Tuy nhiên, trong nhóm bệnh nhân có kích thước khối u >5 cm, không nhận thấy biểu hiện gen *SOCS1* giữa mô u và mô lân cận u có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ($p=0,114$) (hình 3A). Đồng thời, khi đánh giá mức độ biểu hiện gen *SOCS1* giữa 2 nhóm bệnh nhân có kích thước khối u ≤ 5 cm và >5 cm thông qua tỷ số biểu hiện giữa mức độ trong mô u và mô lân cận u cũng không nhận thấy sự khác biệt ($p=0,549$) (hình 3B).



Hình 3. Mức độ biểu hiện gen *SOCS1* và kích thước khối u. (A) Mức độ biểu hiện gen *SOCS1* ở mô lân cận u và mô u trong nhóm bệnh nhân có kích thước khối u ≤ 5 cm và >5 cm; (B) Mức độ biểu hiện gen *SOCS1* giữa nhóm bệnh nhân có kích thước khối u ≤ 5 cm và >5 cm (*: $p<0,05$).

Mối liên quan giữa mức độ biểu hiện gen *SOCS1* và khả năng xâm lấn mạch của khối u

Mức độ biểu hiện gen *SOCS1* ở mô lân cận u và mô u được phân tích trong nhóm bệnh nhân có sự xâm lấn mạch và không có sự xâm lấn mạch. Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện gen *SOCS1* trong nhóm bệnh nhân có sự xâm lấn mạch ở mô lân cận u cao hơn so với mô u ($p=0,047$). Trong nhóm bệnh nhân không có sự xâm lấn mạch, kết quả cũng cho thấy biểu hiện gen *SOCS1* giữa mô lân cận u cao hơn so với ở mô u ($p=0,007$) (hình 4A). Đồng thời, khi đánh giá mức độ biểu hiện gen *SOCS1* giữa 2 nhóm bệnh nhân có sự

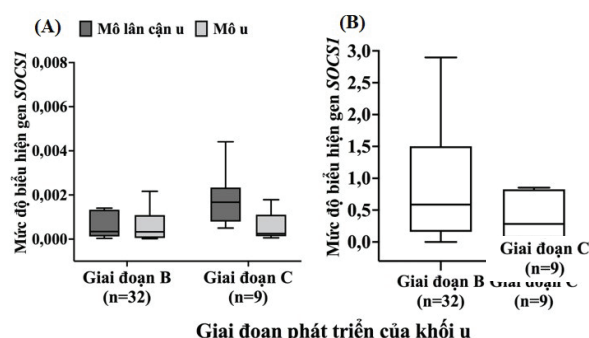


Hình 4. Mức độ biểu hiện gen *SOCS1* và khả năng xâm lấn mạch của khối u. (A) Mức độ biểu hiện gen *SOCS1* ở mô lân cận u và mô u trong nhóm bệnh nhân có sự xâm lấn mạch và không có sự xâm lấn mạch; (B) Mức độ biểu hiện gen *SOCS1* giữa nhóm bệnh nhân có sự xâm lấn mạch và không có sự xâm lấn mạch (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$).

xâm lấn mạch và không có sự xâm lấn mạch thông qua tỷ số biểu hiện giữa mức độ biểu hiện trong mô u và mô lân cận u cũng không nhận thấy sự khác biệt ($p=0,072$) (hình 4B).

Mối liên quan giữa mức độ biểu hiện gen *SOCS1* và giai đoạn phát triển của khối u theo phân loại BCLC

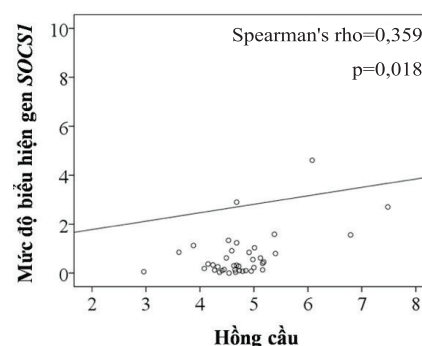
Mức độ biểu hiện gen *SOCS1* ở mô lân cận u và mô u được phân tích trong nhóm bệnh nhân giai đoạn B và C theo phân loại BCLC. Kết quả chỉ ra rằng, không nhận thấy biểu hiện gen *SOCS1* giữa mô u và mô lân cận u có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ở nhóm bệnh nhân giai đoạn B ($p=0,085$) và C ($p=0,086$) (hình 5A). Đồng thời, khi đánh giá mức độ biểu hiện gen *SOCS1* giữa 2 nhóm bệnh nhân giai đoạn B và C thông qua tỷ số biểu hiện giữa mô u và mô lân cận u cũng không nhận thấy sự khác biệt ($p=0,108$) (hình 5B).



Hình 5. Mức độ biểu hiện gen *SOCS1* và giai đoạn phát triển của khối u theo phân loại BCLC. (A) Mức độ biểu hiện gen *SOCS1* ở mô lân cận u và mô u trong nhóm bệnh nhân giai đoạn B và C; (B) Mức độ biểu hiện gen *SOCS1* giữa nhóm bệnh nhân giai đoạn B và C.

Mối tương quan giữa mức độ biểu hiện gen *SOCS1* với các chỉ số cận lâm sàng

Khi đánh giá mối tương quan giữa mức độ biểu hiện gen *SOCS1* với các chỉ số cận lâm sàng cho thấy, mức độ biểu hiện gen *SOCS1* có mối tương quan thuận với số lượng hồng cầu (Spearman's $\rho=0,359$, $p=0,018$) (hình 6).



Hình 6. Tương quan mức độ biểu hiện gen *SOCS1* và số lượng hồng cầu.

Bàn luận

Nhiều nghiên cứu cho thấy, *SOCS1* có sự giảm biểu hiện trong nhiều loại ung thư, khi đó xảy ra sự rối loạn yếu tố điều hoà con đường truyền tín và một trong những con đường chính - JAK/STAT sẽ diễn ra quá mức [8, 9]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, kết quả chỉ ra sự khác biệt của biểu hiện mRNA *SOCS1* giữa mô lành cận u và mô u có ý nghĩa với mức độ biểu hiện mRNA cao hơn ở mô lành cận u trên nhóm bệnh nhân mắc UTBMTBG nhiễm virus VGB.

Nghiên cứu của Chu và cs (2010) [5] cho thấy, 63% mẫu nghiên cứu (29/46) có sự giảm biểu hiện mRNA *SOCS1* trong các tế bào UTBMTBG so với các tế bào lành cận u. Tuy nhiên, nghiên cứu của Khan và cs (2020) [10] không nhận thấy sự khác biệt của biểu hiện gen *SOCS1* giữa mô lành cận u và mô u. Biểu hiện *SOCS1* cũng không có ý nghĩa khi đánh giá sự tương quan với các giai đoạn khác nhau của khối u UTBMTBG. Bên cạnh đó, *SOCS3* cũng được đánh giá trong nghiên cứu của Khan, kết quả cho thấy biểu hiện *SOCS3* cao hơn có ý nghĩa ở mô lành cận u so với mô u. Biểu hiện *SOCS3* cao ở mô lành tương quan với giai đoạn của khối u (I đến IV). Trong khi đó, kết quả chúng tôi cho thấy, biểu hiện *SOCS1* cao hơn ở mô lành cận u trong nhóm bệnh nhân có 1 khối u, khối u kích thước ≤ 5 cm, có sự xâm lấn mạch và không có sự xâm lấn mạch. Đặc điểm xâm lấn mạch thường gặp ở các giai đoạn tiến triển của khối u UTBMTBG.

Nghiên cứu của chúng tôi thực hiện đánh giá mối tương quan giữa biểu hiện gen *SOCS1* với các chỉ số xét nghiệm cận lâm sàng. Kết quả cho thấy, *SOCS1* có tương quan thuận với số lượng hồng cầu ở những bệnh nhân UTBMTBG nhiễm virus VGB. Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy, phản ứng viêm mạn tính xảy ra có thể ngăn chặn quá trình tạo hồng cầu và rút ngắn thời gian tồn tại của hồng cầu trong máu. Ngoài ra, khi các tế bào gan bị nhiều tổn thương (xơ gan, gan nhiễm mỡ, nhiễm virus viêm gan hay ung thư gan), các cytokine gây viêm (như IL-6), yếu tố hoại tử khối u- α (TNF- α) giải phóng ức chế erythropoietin (EPO) và điều chỉnh giảm thụ thể EPO, do đó làm suy giảm quá trình tạo hồng cầu và gây ra hiện tượng mất hồng cầu [11].

Kết quả của nghiên cứu này đã cung cấp một số thông tin bước đầu về vai trò của *SOCS1* trong UTBMTBG. Nghiên cứu cần được thực hiện với cỡ mẫu lớn hơn, đánh giá biểu hiện *SOCS1* ở mức độ protein để có những kết quả sâu hơn, tăng ý nghĩa của *SOCS1* tham gia vào con đường sinh bệnh học UTBMTBG.

Kết luận

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, *SOCS1* có thể là một yếu tố đánh giá tiềm năng trong UTBMTBG. Biểu hiện *SOCS1* có sự giảm rõ rệt trong mô UTBMTBG so với mô

lành lân cận. Sự tương quan giữa biểu hiện *SOCS1* với các đặc điểm cận lâm sàng cho thấy biểu hiện *SOCS1* cao ở mô lành lân cận có ý nghĩa với nhóm bệnh nhân có một u, kích thước $u \leq 5$ cm, có sự xâm lấn mạch và không có sự xâm lấn mạch. Số lượng hồng cầu có tương quan thuận với mức độ biểu hiện *SOCS1*. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu vẫn cần đánh giá và kiểm tra nhiều hơn trong tương lai.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn các bệnh nhân và những người hiến máu tình nguyện đã tham gia vào nghiên cứu. Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.02-2017.15. Tác giả Võ Thị Thuý Quỳnh được tài trợ bởi chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VinBigdata), mã số VINIF.2020.ThS.31. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Sung, et al. (2021), "Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries", *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, **71**(3), pp.209-249.
- [2] X. Zhang, et al. (2014), "An integrated analysis of *SOCS1* down-regulation in HBV infection-related hepatocellular carcinoma", *Journal of Viral Hepatitis*, **21**(4), pp.264-271.
- [3] J.J.H. Tang, et al. (2020), "JAK/STAT signaling in hepatocellular carcinoma", *Hepatic Oncology*, **7**(1), DOI: 10.2217/hep-2020-0001.
- [4] S. Huang, et al. (2020), "*SOCS* proteins participate in the regulation of innate immune response caused by viruses", *Frontiers in Immunology*, **11**, DOI: 10.3389/fimmu.2020.558341.
- [5] P.Y. Chu, et al. (2010), "Epigenetic alteration of the *SOCS1* gene in hepatocellular carcinoma", *Swiss Medical Weekly*, **140**, DOI: 10.4414/smw.2010.13065.
- [6] https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf.
- [7] K. Ki, et al. (2016), "Alpha-fetoprotein-targeted reporter gene expression imaging in hepatocellular carcinoma", *World J. Gastroenterol.*, **22**(27), pp.6127-6134.
- [8] N.X. Hoan, et al. (2017), "*SOCS3* genetic variants and promoter hypermethylation in patients with chronic hepatitis B", *Oncotarget*, **8**(10), pp.17127-17139.
- [9] R.N. Aravalli, C.J. Steer, E.N.K. Cressman (2008), "Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma", *Hepatology*, **48**(6), pp.2047-2063.
- [10] M.G.M. Khan, et al. (2020), "Prognostic significance of *SOCS1* and *SOCS3* tumor suppressors and oncogenic signaling pathway genes in hepatocellular carcinoma", *BMC Cancer*, **20**(1), pp.1-18.
- [11] H. Goyal, Z.D. Hu (2017), "Prognostic value of red blood cell distribution width in hepatocellular carcinoma", *Annals of Translational Medicine*, **5**(13), DOI: 10.21037/atm.2017.06.30.

Báo cáo một số trường hợp khảm nhiễm sắc thể trong chẩn đoán trước sinh và so sánh kết quả tương ứng sau sinh

Nguyễn Thị Huyền¹, Hoàng Thị Hải¹, Đào Thị Trang¹, Hoàng Thị Ngọc Lan^{1,2}, Nguyễn Thị Duyên¹,
Nguyễn Ngân Hà¹, Vũ Thị Hà^{1,2}, Đoàn Thị Kim Phượng^{1,2*}

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 7/5/2021; ngày chuyển phản biện 11/5/2021; ngày nhận phản biện 31/5/2021; ngày chấp nhận đăng 4/6/2021

Tóm tắt:

Thể khảm nhiễm sắc thể (NST) trong chẩn đoán trước sinh là một vấn đề phức tạp, gây bối rối trong nhận định khảm thật hay giả, do đó thường gây khó khăn trong tư vấn di truyền. Trong nghiên cứu này, các tác giả báo cáo 5 trường hợp khảm NST trong chẩn đoán karyotype trước sinh và so sánh với kết quả karyotype tương ứng của trẻ sau khi ra đời. Tế bào dịch ối và máu ngoại vi được làm NST theo phương pháp gián tiếp và phân tích NST theo tiêu chuẩn ISCN 2016. Mẫu được thu thập và phân tích, nghiên cứu tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội từ năm 2017 đến 2020. Kết quả cho thấy, có 3 trường hợp khảm NST bất thường trước sinh nhưng cho kết quả NST bình thường sau sinh và 2 trường hợp khảm NST bất thường trước sinh cho kết quả NST máu ngoại vi bất thường sau sinh. Các thông tin này góp phần cung cấp những bằng chứng quan trọng để tiên lượng các trường hợp khảm NST trong chẩn đoán trước sinh và tư vấn di truyền tốt hơn cho người bệnh.

Từ khóa: chẩn đoán sau sinh, chẩn đoán trước sinh, thể khảm giả, thể khảm thật.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Karyotyping (lập bản đồ NST) từ dịch ối được coi là một phương pháp tiêu chuẩn trong chẩn đoán các bất thường di truyền NST của thai trước sinh. Tuy nhiên, thể khảm trong chẩn đoán trước sinh phức tạp cả trong chẩn đoán cũng như tiên lượng kiểu hình của thai, gây nhiều khó khăn trong tư vấn di truyền trước sinh. Khảm NST là hiện tượng sinh học khi có ít nhất 2 dòng tế bào có kiểu karyotype khác nhau cùng tồn tại trong một cơ thể được phát triển từ một hợp tử đơn. Thể khảm từ dịch ối tùy mức độ mà có tiên lượng khảm thật và giả khác nhau với 3 mức độ (I, II và III) [1]. Biểu hiện lâm sàng của thể khảm hay thay đổi tùy vào các dòng tế bào bất thường, cơ quan và tỷ lệ khảm, do đó rất khó xác định kiểu hình chính xác mà thai nhi sẽ phát triển hướng tới. Sự không đồng nhất giữa kết quả của các phương pháp chẩn đoán khác nhau hay sự khác biệt kết quả giữa chẩn đoán trước và sau sinh cũng là những tình trạng bất thường cần được quan tâm. Y văn thế giới đã có nhiều nghiên cứu và báo cáo liên quan đến các dạng khảm phổ biến, nhất là bất thường cấu trúc NST thường, khảm lệch bội NST thường, khảm marker và khảm liên quan đến NST giới tính [2, 3]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi báo cáo 5 trường hợp khảm NST trong chẩn đoán karyotype trước sinh và so sánh với kết quả karyotype máu ngoại vi của trẻ sau khi ra đời. Tế bào dịch ối và máu ngoại vi được làm NST theo phương pháp gián tiếp và phân tích NST theo tiêu chuẩn ISCN 2016. Các mẫu khảm được đánh giá ít nhất 50 cụm tế bào kỳ giữa

ở 2 lần nuôi cấy độc lập. Kết quả của nghiên cứu cung cấp thêm các thông tin quan trọng để tiên lượng các trường hợp khảm NST trong chẩn đoán trước sinh và thực hiện tư vấn di truyền tốt hơn cho người bệnh.

Báo cáo ca bệnh

Trường hợp 1

Thai phụ 39 tuổi được chỉ định chọc hút dịch ối làm chẩn đoán trước sinh lúc thai 18 tuần do xét nghiệm sàng lọc huyết thanh mẹ có nguy cơ thai Down là 1/203. Kết quả karyotype của thai thu được từ 2 flask nuôi cấy tế bào ối riêng biệt là 45,X[38]/47,XXY[38]. Kỹ thuật định lượng huỳnh quang (QF-PCR) bằng máy giải trình tự gen 3500 (Applied Biosystems, Life Technologies, Mỹ) từ các tế bào ối tươi không phát hiện bất thường trên các NST khảo sát. Bố mẹ có kiểu hình và karyotype từ tế bào máu ngoại vi là bình thường. Trong thai kỳ, siêu âm phát hiện thấy dây rốn nhỏ và thai nhi tăng cân chậm trong 2 tháng cuối, nhưng không thấy các dấu hiệu phát triển giới tính bất thường ở thai. Trẻ sau sinh có biểu hiện chậm phát triển tinh thần (nói, nghe, hiểu kém hơn trẻ cùng lứa tuổi) theo bảng đánh giá sự phát triển tinh thần vận động trẻ em của Bộ Y tế. Trẻ phát triển giới tính theo xu hướng nam, các dấu hiệu bất thường phát triển giới tính chưa được phát hiện. Nuôi cấy tế bào máu ngoại vi của trẻ sau sinh cho kết quả karyotype là 47,XXY[60]/46,XY[60].

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

Report of some cases with chromosomal mosaicism in prenatal diagnosis and the corresponding results after birth

Thi Huyen Nguyen¹, Thi Hai Hoang¹, Thi Trang Dao¹,
Thi Ngoc Lan Hoang^{1,2}, Thi Duyen Nguyen¹,
Ngan Ha Nguyen¹, Thi Ha Vu^{1,2}, Thi Kim Phuong Doan^{1,2*}

¹Hanoi Medical University

²Hanoi Medical University Hospital

Received 7 May 2021; accepted 4 June 2021

Abstract:

Chromosomal mosaicism in prenatal diagnosis is a complex problem that confuses the perception of true mosaicism or pseudomosaicism and often causes difficulties in genetic counseling. In this study, the authors reported 5 cases of chromosomal mosaicism in prenatal karyotype diagnosis and compared them with the corresponding karyotype results of children after birth. Amniotic fluid and peripheral blood cells were prepared chromosomal metaphase by culture method and chromosomal analysis according to ISCN 2016 standards. Samples were collected and analysed at Hanoi Medical University Hospital from 2017 to 2020. There were 3 cases of abnormal prenatal chromosomal mosaicism, but the postnatal results were normal, two cases of abnormal prenatal chromosome mosaicism, but had abnormal peripheral blood postnatal chromosome results. These results, together with discussion, will provide more valuable information for the prognosis of chromosome mosaicism cases in prenatal diagnosis and give better genetic counseling for the patients.

Keywords: postnatal diagnosis, prenatal diagnosis, pseudomosaicism, true mosaicism.

Classification number: 3.2

Trường hợp 2

Thai phụ 45 tuổi được chỉ định chọc hút dịch ối để chẩn đoán trước sinh lúc 18 tuần do xét nghiệm sàng lọc huyết thanh mẹ có nguy cơ thai Down là 1/106. Kết quả karyotype khi nuôi cấy tế bào ối là 46,XY[28]/46,XX[24]. 2 dòng tế bào này chỉ xuất hiện ở 1 flask nuôi cấy. Kỹ thuật QF-PCR từ các tế bào ối tươi không phát hiện bất thường trên các NST khảo sát. Không phát hiện thấy bất thường hình thái của thai trong suốt thai kỳ. Trẻ được sinh ra khi đủ tháng, sau sinh phát triển tâm thần và vận động bình thường. Nuôi cấy tế bào máu ngoại vi sau sinh của trẻ cho kết quả karyotype là 46,XY (đánh giá 60 cụm NST kỳ giữa).

Trường hợp 3

Thai phụ 27 tuổi được chỉ định chọc hút dịch ối để chẩn đoán trước sinh lúc 19 tuần do xét nghiệm sàng lọc huyết thanh mẹ có nguy cơ thai Down là 1/116. Nuôi cấy tế bào ối cho karyotype là 46,XY,t(4;6;11)(p15.2;p21.1;p15)[3]/46,XY[48]. Dòng tế bào bất thường này chỉ xuất hiện ở 1 flask nuôi cấy. Kỹ thuật QF-PCR từ các tế bào ối tươi không phát hiện bất thường trên các NST khảo sát. Trẻ được sinh ra sau một thai kỳ bình thường, sau sinh trẻ có các mốc phát triển tâm thần và vận động bình thường. Nuôi cấy tế bào máu ngoại vi của trẻ sau sinh cho kết quả karyotype là 46,XY (đánh giá 60 cụm NST kỳ giữa).

Trường hợp 4

Thai phụ 23 tuổi được chỉ định chọc hút dịch ối để chẩn đoán trước sinh lúc 19 tuần do xét nghiệm sàng lọc huyết thanh mẹ có nguy cơ thai Down là 1/210. Nuôi cấy tế bào ối cho kết quả karyotype là 46,XY,t(1;2)(q12;q310)[5]/46,XY[50] chỉ ở 1 flask. Kỹ thuật QF-PCR từ các tế bào ối tươi không phát hiện bất thường trên các NST khảo sát. Trong suốt thai kỳ không phát hiện thấy các bất thường hình thái của thai trên siêu âm. Sau sinh, trẻ có các mốc phát triển tâm thần và vận động bình thường. Nuôi cấy tế bào máu ngoại vi của trẻ sau sinh cho karyotype 46,XY.

Trường hợp 5

Thai phụ 37 tuổi được chỉ định chọc hút dịch ối làm chẩn đoán trước sinh lúc 17 tuần do xét nghiệm sàng lọc huyết thanh mẹ có nguy cơ thai mắc Trisomy 18 là 1/92. Nuôi cấy tế bào ối cho kết quả karyotype là 46,XY,t(1;5)(p36.3;q31)[7]/46,XY[163] ở cả 2 flask nuôi cấy. Kỹ thuật QF-PCR từ các tế bào ối tươi không phát hiện bất thường trên các NST khảo sát. Trẻ được sinh ra sau một thai kỳ bình thường, sau sinh có các mốc phát triển tâm thần và vận động bình thường. Nuôi cấy tế bào từ máu ngoại vi trẻ sau sinh cho kết quả karyotype là 46,XY.

Đặc điểm 5 trường hợp nêu trên được tóm tắt ở bảng 1.

Bảng 1. Thống kê đặc điểm 5 trường hợp báo cáo.

Ca bệnh	Trường hợp 1	Trường hợp 2	Trường hợp 3	Trường hợp 4	Trường hợp 5
Tuần thai (tuần)	18	18	19	19	17
Chỉ định chọc ối	Sàng lọc huyết thanh mẹ có nguy cơ thai bị Down là 1/203	Sàng lọc huyết thanh mẹ có nguy cơ thai bị Down là 1/106	Sàng lọc huyết thanh mẹ có nguy cơ thai bị Down là 1/116	Sàng lọc huyết thanh mẹ có nguy cơ thai bị Down là 1/210	Sàng lọc huyết thanh mẹ có nguy cơ thai mắc Trisomy 18 là 1/92
Karyotype trước sinh flask 1	45,X[23]/47,XXY[22]	46,XY[28]/46,XX[24]	46,XY,t(4;6;11)(p15.2;p21.1;p15)[3]/46,XY[48]	46,XY,t(1;2)(q12;q310)[5]/46,XY[50]	46,XY,t(1;5)(p36.3;q31)[4]/46,XY[93]
Karyotype trước sinh flask 2	45,X[15]/47,XXY[16]	46,XY	46,XY	46,XY	46,XY,t(1;5)(p36.3;q31)[3]/46,XY[70]
QF-PCR từ mẫu dịch ối tươi	Không phát hiện bất thường trên các NST khảo sát	Không phát hiện bất thường trên các NST khảo sát	Không phát hiện bất thường trên các NST khảo sát	Không phát hiện bất thường trên các NST khảo sát	Không phát hiện bất thường trên các NST khảo sát
Karyotype sau sinh	47,XXY[60]/46,XY[60]	46,XY	46,XY	46,XY	46,XY
Đánh giá tâm thần vận động sau sinh	Chậm phát triển tinh thần: nói được 3 từ, gọi đáp chậm, chưa nói được câu phức tạp	Phát triển tâm thần, vận động bình thường	Phát triển tâm thần, vận động bình thường	Phát triển tâm thần, vận động bình thường	Phát triển tâm thần, vận động bình thường
Tuổi đánh giá sau sinh (tháng)	37	26	46	27	24

Bàn luận

Các mức độ khảm trong lập karyotype từ tế bào dịch ối được chia ra làm 3 mức độ: mức độ I được xác định khi chỉ có một tế bào bất thường đơn lẻ; mức độ II được xác định khi có nhiều tế bào có cùng bất thường trong một flask hoặc clone đơn lẻ; mức độ III được xác định khi có nhiều tế bào có cùng bất thường ở nhiều flask hoặc clone khác nhau và thường được coi là khảm thật sự [1]. Trong một số nghiên cứu, khảm mức độ I đã được quan sát thấy ở 5% các mẫu nước ối nuôi cấy và được báo cáo là không có ý nghĩa lâm sàng, tỷ lệ giả khảm liên quan đến nhiều tế bào là 0,7-1,07%. Trong số đó, hơn 80% các trường hợp được báo cáo là bình thường, tỷ lệ khảm thật trong nuôi cấy dịch ối là 0,37% [4, 5]. Tuy nhiên, sự tiên lượng này không phải là tuyệt đối khi vẫn có các trường hợp khảm mức độ I và II từ tế bào dịch ối nhưng lại cho kết quả khảm thực sự từ cơ thể của thai. Trong báo cáo này, các trường hợp 2, 3 và 4 phù hợp với các hiện tượng giả khảm. Cả 5 trường hợp báo cáo đều chọc ối chẩn đoán trước sinh do sàng lọc huyết thanh nguy cơ cao mà không phát hiện thấy bất thường hình thái của thai.

Các phương pháp di truyền phân tử như QF-PCR phát hiện được các bất thường số lượng 5 loại NST: 13, 18, 21, X và Y. Phương pháp này được thực hiện với mẫu dịch tế bào ối không qua nuôi cấy nên cho kết quả nhanh chóng trong vòng 24 giờ, hạn chế sự xuất hiện các bất thường trong quá trình nuôi cấy dài ngày - được thể hiện rõ trong trường hợp 2. Ca bệnh này có kết quả karyotype khảm 2 dòng tế bào XX/XY nhưng phương pháp QF-PCR cho kết quả bình thường, trùng hợp với karyotype sau khi trẻ sinh ra là 46,XY. Tuy nhiên, kỹ thuật QF-PCR không phát hiện được các bất thường cấu trúc khi không có sự mất cân bằng

vật chất di truyền (trường hợp 3, 4). Đây là các bất thường chuyển đoạn chỉ xuất hiện ở 1 lần nuôi cấy với tỷ lệ thấy <10% và không xuất hiện ở lần nuôi cấy độc lập khác, có thể giải thích bằng hiện tượng giả khảm đã xuất hiện trong quá trình nuôi cấy tế bào dài ngày [6, 7]. Luận điểm này được khẳng định thêm bởi karyotype của trẻ sau khi ra đời bình thường là 46,XY, đánh giá các mốc phát triển tinh thần vận động của trẻ trong ngưỡng bình thường.

Sự phức tạp của thể khảm trong chẩn đoán trước sinh còn thể hiện ở sự không tương đồng kết quả của chẩn đoán trước và sau sinh. Trường hợp 1 và 5 có khảm mức độ III với tiên lượng là các khảm thật, nhưng kết quả karyotype chẩn đoán sau sinh từ máu ngoại vi lại cho ra một kết quả khác với từ tế bào ối. Tất cả sự kiểm soát chất lượng xét nghiệm nội bộ đã cho phép loại trừ trường hợp trao đổi mẫu và nhiễm tế bào mẹ. Sự khác biệt kết quả karyotype giữa tế bào ối và tế bào máu ngoại vi sau sinh là một tình trạng rất bất thường, đã được báo cáo ở một số nghiên cứu trước đây [8, 9]. Sự không nhất quán này có thể bắt nguồn từ sự khảm giới hạn ở các cơ quan khác nhau. Nhưng đây cũng có thể là kết quả của sự chọn lọc ưu thế các dòng tế bào trong quá trình phát triển của thai. Sự chọn lọc tự nhiên chống lại các sự bất thường xảy ra ở thai làm tăng khả năng sống sót cũng như hạn chế các bất thường có thể xảy ra ở thai trong những thể khảm thực sự, được thể hiện trong trường hợp 5 của nghiên cứu này. Tuy nhiên, sự chọn lọc này không xảy ra đồng đều ở cả 2 giới, nam giới có xu hướng chọn lọc tốt hơn để lại các bất thường có sự cân bằng vật chất di truyền, được cho là có liên quan đến đến sự có mặt của NST Y. Trong khi đó, nữ giới lại có sự chọn lọc kém hơn, dẫn đến tỷ lệ nữ giới có sự khảm các dòng tế bào bất thường không cân bằng vật chất di truyền cao hơn nam giới [10]. Trường hợp 1 gọi

ý hiện tượng phôi thai có sự suy giảm các dòng tế bào bất thường 45,X để làm tiền đề cho một thai kỳ thuận lợi. Đồng thời với dòng 45,X, dòng tế bào thứ 2 cũng bất thường XYY có thể gây nên phân ly không đồng đều trong nguyên phân, tạo ra cơ thể trẻ sau sinh có karyotype là 47,XYY/46,XY với biểu hiện chậm phát triển tinh thần.

Kết luận

Các phát hiện khảm NST trong chẩn đoán trước sinh gây khó khăn trong tiên lượng di truyền của thai. Tiên lượng này còn phụ thuộc vào biểu hiện tương quan kiểu gen - kiểu hình của thể khảm rất nhiều. Trong thể khảm, mức độ khảm và loại khảm không có sự tương quan tỷ lệ với biểu hiện kiểu hình của người mang thể khảm. Biểu hiện lên kiểu hình của dòng tế bào bất thường còn phụ thuộc vào loại khảm, cơ quan, tỷ lệ khảm ở từng cơ quan, quá trình phát triển của từng cá thể khiến các dòng tế bào bất thường bị ức chế hoặc tăng cường biểu hiện. Hiểu biết về những cơ chế này kết hợp với các xét nghiệm nuôi cấy tế bào, không nuôi cấy tế bào (QF-PCR) để loại trừ trường hợp khảm chỉ xuất hiện trong quá trình nuôi cấy dài ngày mà không xuất hiện ở thai. Bên cạnh đó, cần đánh giá NST ở ít nhất 2 lần tế bào nuôi cấy độc lập với một mẫu dịch ối. Sau cùng, để tư vấn di truyền trước sinh những mẫu khảm NST, cần phối hợp các kết quả siêu âm hình thai và xem xét đầy đủ các yếu tố ảnh hưởng đến thai kỳ để tiên lượng và đưa ra sự tư vấn di truyền tốt nhất cho người bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] F.R. Grati (2014), "Chromosomal mosaicism in human fetoplacental development: implications for prenatal diagnosis", *J. Clin. Med.*, **3**(3), pp.809-837.
- [2] L.Y. Hsu, et al. (1996), "Incidence and significance of chromosome mosaicism involving an autosomal structural abnormality diagnosed prenatally through amniocentesis: a collaborative study", *Prenatal Diagnosis*, **16**(1), pp.1-28.
- [3] O.P. Hamiel, et al. (2002), "Prenatal diagnosis of sex differentiation disorders: the role of fetal ultrasound", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**(10), pp.4547-4553.
- [4] P. Benn, et al. (1984), "Prenatal diagnosis of chromosome mosaicism", *Prenatal Diagnosis*, **4**(1), pp.1-9.
- [5] L.Y. Hsu, T.E. Perlis (1984), "United States survey on chromosome mosaicism and pseudomosaicism in prenatal diagnosis", *Prenatal Diagnosis*, **4**(7), pp.97-130.
- [6] C.P. Chen, et al. (2011), "Cytogenetic discrepancy between uncultured amniocytes and cultured amniocytes in mosaic isochromosome 20q detected at amniocentesis", *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, **50**(22), pp.245-248.
- [7] C.P. Chen, et al. (2015), "Mosaic trisomy 15 at amniocentesis: prenatal diagnosis, molecular genetic analysis and literature review", *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, **54**(4), pp.426-431.
- [8] D. Bizzoco, et al. (2012), "Discordance between karyotype from amniotic fluid and postnatal lymphocyte cultures", *Journal of Prenatal Medicine*, **6**(2), pp.34-35.
- [9] A. Loft, A. Tabor (1984), "Discordance between prenatal cytogenetic diagnosis and outcome of pregnancy", *Prenatal Diagnosis*, **4**(1), pp.51-59.
- [10] N.V. Kovaleva, P.D. Cotter (2016), "Somatic/gonadal mosaicism for structural autosomal rearrangements: female predominance among carriers of gonadal mosaicism for unbalanced rearrangements", *Molecular Cytogenetics*, **8**(9), DOI: 10.1186/s13039-015-0211-y.

Tỷ lệ *Escherichia coli* mang gen mã hóa sinh ESBL ở bệnh nhân mắc một số bệnh thông thường đến khám tại tuyến y tế cơ sở ở một số tỉnh, thành phố của Việt Nam

Trần Thị Mai Hưng*, Dương Thị Hồng, Lương Minh Tân, Lê Thị Trang, Phạm Duy Thái, Hồ Hoàng Dung, Nguyễn Thị Lan Phương, Nguyễn Thị Minh, Khương Thị Tâm, Đặng Đức Anh, Trần Huy Hoàng

Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

Ngày nhận bài 18/5/2021; ngày chuyển phản biện 24/5/2021; ngày nhận phản biện 25/6/2021; ngày chấp nhận đăng 30/6/2021

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm xác định tỷ lệ *E. coli* mang gen mã hoá sinh ESBL (Extended-spectrum beta-lactamase) ở bệnh nhân mắc một số bệnh thông thường đến khám tại tuyến y tế cơ sở ở 8 tỉnh, thành phố tại khu vực miền Bắc (Hà Nội, Hà Nam, Hải Dương, Bắc Ninh), Trung (Thừa Thiên - Huế, Khánh Hoà) và Nam (Cần Thơ, Bến Tre) của Việt Nam. Nghiên cứu cắt ngang trên những người có các triệu chứng nhiễm khuẩn tiêu chảy, viêm đường tiết niệu, nhiễm khuẩn da và hô hấp tại trạm y tế xã; sử dụng bộ câu hỏi thiết kế sẵn để thu thập thông tin dịch tễ học và thu thập mẫu bệnh phẩm để nuôi cấy, phân lập và xét nghiệm *E. coli* mang gen mã hoá sinh ESBL bằng kỹ thuật PCR. Kết quả cho thấy, tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen mã hoá sinh ESBL khá cao (57,4%), cao nhất ở vi khuẩn *E. coli* trên mẫu bệnh phẩm của triệu chứng tiêu chảy (65,4%), sau đó đến nhiễm khuẩn tiết niệu (22,1%), viêm phổi (8,82%) và nhiễm khuẩn da (3,68%). Tỷ lệ đồng nhiễm 2 gen chiếm 40,9%. Gen TEM chiếm 88,2% và CTX-M 51%. Tỷ lệ mang gen này ở các mẫu bệnh phẩm khác nhau cũng khác nhau. Chúng vi khuẩn *E. coli* phân lập được tại khu vực miền Nam có nguy cơ mang gen mã hóa sinh ESBL kháng kháng sinh chỉ bằng 42% so với khu vực miền Bắc (RR=0,42, p<0,001). Những gia đình có sử dụng kháng sinh có tỷ lệ nhiễm vi khuẩn mang gen mã hoá sinh ESBL cao hơn so với các gia đình không sử dụng kháng sinh.

Từ khóa: *E. coli*, ESBL, gen kháng kháng sinh, kháng kháng sinh, kháng sinh.

Chỉ số phân loại: 3.3

Đặt vấn đề

ESBL là các enzyme do vi khuẩn sinh ra, có khả năng làm bất hoạt các thuốc nhóm β -lactam, vì vậy các vi khuẩn có enzyme này có khả năng kháng lại các kháng sinh nhóm β -lactam. ESBL thường được tìm thấy trong các nhóm *Enterobacteriaceae*, hay gặp ở *E. coli*. *E. coli* là vi khuẩn sống cộng sinh trong đường tiêu hóa nhưng cũng là một trong những tác nhân gây bệnh khá phổ biến khác ở người như nhiễm khuẩn tiết niệu và huyết. *E. coli* sinh ESBL đang làm tăng mối lo ngại về sức khỏe toàn cầu do các plasmid của vi khuẩn này không chỉ mang gen mã hóa sinh ESBL mà còn kèm các gen kháng kháng sinh khác, vì vậy chúng có thể kháng đồng thời nhiều loại kháng sinh [1, 2]. Bên cạnh đó, *E. coli* mang gen mã hóa sinh ESBL còn có khả năng truyền các gen kháng kháng sinh từ thể hệ vi khuẩn này sang thể hệ khác, làm trầm trọng hóa tình trạng kháng kháng sinh trong cộng đồng và gây ra những khó khăn trong điều trị lâm sàng [1, 3]. Trên thế giới, tỷ lệ nhiễm *E. coli* sinh ESBL chiếm 5-62%, đặc biệt là các nước khu vực Nam Á và Trung Quốc chiếm tỷ lệ trên 50% [4]. Tại Việt Nam, tỷ lệ nhiễm *E. coli* sinh ESBL là tương đối cao (18-57,3% trong bệnh viện) [3].

Có 3 loại gen chính mã hóa sinh ESBL, bao gồm TEM, SHV và CTX-M. Các *E. coli* mang những gen mã hoá sinh

ESBL khác nhau sẽ có tác động đến các kháng sinh khác nhau [5]. Trước đây, ESBLs thường được tìm thấy ở hầu hết các chủng phân lập từ các trường hợp nhiễm khuẩn bệnh viện. Các chủng *E. coli* sinh ESBL gần đây đã được báo cáo từ các bệnh nhiễm trùng cộng đồng. Do đó, cần có những số liệu về *E. coli* sinh ESBL để đưa ra những khuyến cáo về sử dụng kháng sinh thích hợp.

Các nghiên cứu có liên quan đến *E. coli* sinh ESBL tại Việt Nam chủ yếu tại bệnh viện, rất ít các nghiên cứu được thực hiện ở cộng đồng. Một số nghiên cứu được thực hiện ở ngoài bệnh viện như nghiên cứu trên người khỏe mạnh ở xã Nguyễn Xá (Thái Bình) và xã Thanh Hà (Hà Nam). Tuy nhiên, những nghiên cứu này chỉ thực hiện trong phạm vi 1 xã và trên 1 loại mẫu bệnh phẩm [6, 7]. Những thông tin về các loại nhiễm khuẩn do *E. coli*, đặc điểm sinh học phân tử của *E. coli* sinh ESBL và các yếu tố liên quan đến kháng kháng sinh tại cộng đồng chưa được chú ý. Do đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm xác định tỷ lệ *E. coli* mang gen mã hóa sinh ESBL kháng kháng sinh phân lập được từ các loại mẫu bệnh phẩm khác nhau của bệnh nhân đến khám tại trạm y tế xã trên địa bàn 8 tỉnh, thành phố để có bức tranh rộng hơn về vấn đề sinh học phân tử kháng kháng sinh của vi khuẩn này.

*Tác giả liên hệ: Email: ttmh@nihe.org.vn

Prevalence of *Escherichia coli* carrying a gene encoding ESBLs in patients with common infectious diseases visiting primary health care centres in some provinces and cities of Vietnam

Thi Mai Hung Tran*, Thi Hong Duong, Minh Tan Luong, Thi Trang Le, Duy Thai Pham, Hoang Dung Ho, Thi Lan Phuong Nguyen, Thi Minh Nguyen, Thi Tam Khuong, Duc Anh Dang, Huy Hoang Tran

National Institute of Hygiene and Epidemiology

Received 18 May 2021; accepted 30 June 2021

Abstract:

The objective of the study was to determine the prevalence of *E. coli* carrying the gene encoding ESBLs in patients with common diseases visiting primary health care centres in 8 provinces of the Northern region (Ha Noi, Ha Nam, Hai Duong, Bac Ninh), the Central region (Thua Thien - Hue, Khanh Hoa), and the Southern region (Can Tho, Ben Tre) of Vietnam. A cross-sectional study was implemented on patients with symptoms of diarrhea, urinary tract infections, skin infections, and respiratory infections. The study used questionnaires to collect epidemiological information and samples to culture, isolate and test *E. coli* carrying genes encoding ESBLs by PCR technique. The results showed that the percentage of *E. coli* bacteria carrying genes encoding ESBLs was relatively high (57.4%), the highest rate was in *E. coli* bacteria on patients with diarrhea (65.4%), followed by urinary tract infections (22.1%), pneumonia (8.82%) and skin infections (3.68%). The rate of co-infection with two genes accounted for 40.9%. The TEM gene was dominant (88.2%), followed by the CTX-M gene (51%). Different types of specimens were also found to have a different rate of carrying this gene. *E. coli* isolated in the Southern region has a lower risk of carrying genes encoding antibiotic-resistant ESBL, only 42% of the Northern region's rates (RR=0.42, p<0.001). Families that used antibiotics also had a higher rate of being infected with bacteria carrying genes encoding ESBLs than families that did not use antibiotics.

Keywords: antibiotic resistance, antibiotic resistance genes, antibiotics, *E. coli*, ESBL.

Classification number: 3.3

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Bệnh nhân được xác định nhiễm khuẩn da, tiết niệu, tiêu chảy và viêm phổi (theo định nghĩa ca bệnh của nghiên cứu có tham khảo định nghĩa của Tổ chức Y tế thế giới - WHO và Trung tâm Dự phòng và Kiểm soát bệnh tật Mỹ) đến khám tại trạm y tế xã được chọn vào nghiên cứu. Tiêu chuẩn loại trừ là phụ nữ có thai hoặc người không có đủ năng lực hành vi.

Nghiên cứu được thực hiện ở 8 xã của 8 tỉnh, thành phố tại khu vực miền Bắc (Hà Nội, Hà Nam, Hải Dương, Bắc Ninh), Trung (Thừa Thiên - Huế, Khánh Hòa) và Nam (Cần Thơ, Bến Tre) trong năm 2018-2019.

Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu mô tả cắt ngang.

Cỡ mẫu nghiên cứu

1.498 bệnh nhân có triệu chứng của một trong 4 bệnh được thu tuyển vào nghiên cứu. Tuy nhiên, chỉ có 1.427 đối tượng được đưa vào phân tích thông tin do đảm bảo tính đầy đủ của số liệu được thu thập.

Phương pháp chọn mẫu

Sử dụng phương pháp chọn mẫu chủ đích đối với tuyến tính (4 miền Bắc, 2 miền Trung và 2 miền Nam), tuyển huyện (mỗi tỉnh, thành phố chọn 1 huyện), tuyển xã (mỗi huyện chọn 1 xã). Chọn toàn bộ bệnh nhân mắc viêm phổi, tiêu chảy, nhiễm khuẩn tiết niệu và da đến khám tại 8 trạm y tế xã của 8 tỉnh, thành phố nêu trên trong năm 2018-2019. 4 loại mẫu bệnh phẩm được thu thập cho 4 loại triệu chứng bệnh: mẫu mủ với nhiễm khuẩn da, nước tiểu với nhiễm khuẩn tiết niệu, mẫu phân trên bệnh nhân tiêu chảy và dịch tỵ hầu với viêm phổi.

Biến số/chỉ số nghiên cứu

Biến số sử dụng để xây dựng câu hỏi được tham khảo từ kết quả các nghiên cứu đã triển khai, các bài báo khoa học đã được công bố và tài liệu hướng dẫn của WHO, có điều chỉnh phù hợp với thực tế của Việt Nam, cụ thể:

- Nhóm biến số nghiên cứu thông tin chung của đối tượng gồm: tuổi, giới, dân tộc, hôn nhân, trình độ học vấn, nghề nghiệp, tình trạng kinh tế.
- Nhóm biến số về tình trạng có vi khuẩn *E. coli*, *E. coli* mang gen mã hoá sinh ESBL kháng kháng sinh như CTX-M, TEM.
- Nhóm biến số các yếu tố liên quan: đối tượng sử dụng kháng sinh, gia đình có sử dụng kháng sinh, sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi, vệ sinh môi trường xung quanh nhà ở, dịch vụ y tế.

Phương pháp thu thập thông tin

Sau khi được đối chiếu phù hợp với tiêu chuẩn lựa chọn và loại trừ, đối tượng nghiên cứu sẽ được cung cấp thông tin, ký thỏa thuận tham gia nghiên cứu và phỏng vấn các câu hỏi liên quan để thu thập các thông tin cho các biến số trên. Biến số được sử dụng để xây dựng câu hỏi được tham khảo từ kết quả các nghiên cứu đã triển khai, các bài báo đã được công bố và tài liệu hướng dẫn của

WHO, có điều chỉnh phù hợp với thực tế của Việt Nam. Sau đó, đối tượng tham gia nghiên cứu được lấy mẫu bệnh phẩm và đưa về Phòng thí nghiệm Kháng kháng sinh của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương lưu trữ và xử lý. Việc lấy mẫu bệnh phẩm, vận chuyển và bảo quản được thực hiện theo quy trình xây dựng cho nghiên cứu và được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương thông qua trước khi triển khai.

Xử lý và phân tích số liệu

Thu thập bệnh phẩm: mẫu bệnh phẩm được thu thập, bảo quản trong ống vô trùng chứa môi trường bảo quản than hoạt tính, vận chuyển từ trạm y tế xã hàng ngày và lưu giữ tại Trung tâm Y tế dự phòng tỉnh, thành phố ở điều kiện -20°C. Mẫu được vận chuyển về Phòng thí nghiệm Kháng kháng sinh, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương hàng tháng ở nhiệt độ thường, được đóng gói theo đúng nguyên tắc đóng gói vận chuyển mẫu theo quy định của Bộ Y tế.

Phương pháp nuôi cấy: được tiến hành theo thường quy xét nghiệm để phân lập và định danh *E. coli* của phòng thí nghiệm. Mẫu bệnh phẩm được cấy phân vùng trên môi trường MacConkey có kháng sinh Cefazepidime, ủ hiếu khí 37°C/18-24 giờ. Lựa chọn khuẩn lạc nghi ngờ *E. coli* màu đỏ hồng, có kết tủa muối mật để định danh bằng máy Maldi-tof.

Phương pháp xét nghiệm bằng kỹ thuật PCR: các khuẩn lạc *E. coli* sau đó được cấy thuần, giữ chủng, tách DNA bằng phương pháp nhiệt độ - dịch nổi thu được làm khuôn cho phản ứng PCR phát hiện gen kháng kháng sinh. 2 cặp mồi được sử dụng trong kỹ thuật PCR là TEM (TEM-F: TTTTCGTGTCGCCCTTATCC; TEM-R: CGTTCATCCATAGTTGCCTGACTC) và CTX-M (CTX-M F: CGATGTGCAGTACCAGTAA; CTX-M R: TTAGTGACCAGAATCAGCGG). Pha hỗn hợp phản ứng PCR với thành phần phản ứng như sau: 10 µl 2X Go Taq Master Mix (Promega, Mỹ), 0,2 µl mỗi xuôi/ngược (nồng độ 2 pcomol/phản ứng), 2 µl khuôn mẫu ADN và 7,6 µl nước siêu sạch (Invitrogen, Mỹ). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 94°C trong vòng 5 phút, lặp lại 30 chu kỳ gồm biến tính ở 95°C trong 60 giây, bắt cặp ở 55°C trong 60 giây, kéo dài ở 72°C trong 60 giây, kéo dài ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được phát hiện và phân tích qua điện di trên thạch Agarose 1,5% với thang chuẩn 100 bp [8].

Số liệu dịch tễ: bộ câu hỏi được nhập bằng Epidata V3.1, quản lý và phân tích bằng STATA V15.0. Các phiếu thu thập thông tin bị thiếu từ 15% tổng số trường thông tin cần thu thập đã được loại bỏ trong quá trình làm sạch số liệu. Các phiếu thiếu dưới 15% mà không thu thập được các thông tin còn thiếu sẽ được bổ sung bằng cách gán giá trị phổ biến, giá trị trung bình tính toán được từ các phiếu thông tin khác.

Tính toán tần suất, tỷ lệ, trung bình, độ lệch chuẩn, trung vị, tứ phân vị, so sánh sự khác biệt giữa các nhóm bằng kiểm định ANOVA, χ^2 ...

Tỷ suất nguy cơ tương đối (relative risk - RR) và mô hình hồi quy log - nhị phân được sử dụng thay cho tỷ suất chênh (OR) và mô hình hồi quy logistic để đảm bảo đưa ra được kết quả chính xác hơn, đặc biệt là trong nghiên cứu với tỷ lệ vi khuẩn mang gen mã hóa sinh ESBL tính toán được tương đối lớn.

Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu đảm bảo các nguyên tắc y đức và được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương thông qua trước khi triển khai tại IRB-VN01057-38/2016 cấp ngày 21/10/2016.

Kết quả

Trong số 1.498 đối tượng thu thập, có 1.427 (95,3%) đối tượng có phiếu thông tin được thu thập đầy đủ (số trường thông tin thiếu dưới 15% tổng số thông tin cần thu thập) được đưa vào phân tích.

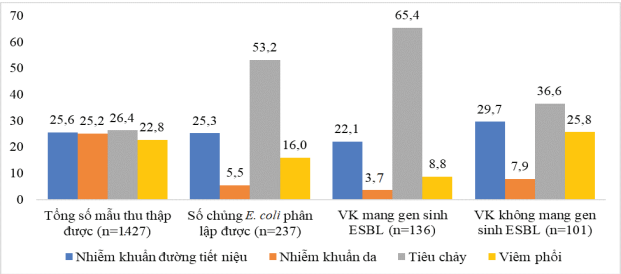
Bảng 1. Đặc điểm nhân khẩu học của đối tượng nghiên cứu.

Đặc điểm	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Nhóm tuổi (n=1.427)		
<18	460	32,2
18-29	141	9,9
30-45	275	19,3
46-60	303	21,2
>60	248	17,4
Giới tính (n=1.427)		
Nam	671	47,0
Nữ	756	53,0
Tỉnh/thành phố (n=1.427)		
Hà Nội	197	13,8
Hà Nam	200	14,0
Bắc Ninh	198	13,9
Hải Dương	200	14,0
Thừa Thiên - Huế	135	9,5
Khánh Hòa	199	13,9
Cần Thơ	200	14,0
Bến Tre	98	6,9
Nghề nghiệp (n=1.427)		
Trẻ em/học sinh	433	30,4
Làm ruộng/hoa màu	438	30,7
Làm việc tại/liên quan đến chăm sóc y tế	25	1,8
Cán bộ nhà nước	99	6,9
Nội trợ	169	11,8
Cán bộ thú y/trực tiếp chăn nuôi	2	0,1
Công nhân/viên chức nghỉ hưu	101	7,1
Khác (công nhân, buôn bán...)	160	11,2
Tiền sử bệnh mạn tính (n=1.427)		
Có	182	12,7
Không	1.211	84,9
Không biết	34	2,4

Đối tượng tham gia nghiên cứu chủ yếu là người ≤45 tuổi (61,4%), trong đó người dưới 18 tuổi chiếm tới 32,2%. Tỷ lệ nam và nữ tham gia nghiên cứu khá tương đồng. Tỷ lệ ca bệnh từ các tỉnh cũng đồng đều trừ Bến Tre và Thừa Thiên - Huế có số lượng ca bệnh thấp hơn so với các tỉnh còn lại. Phần lớn người tham

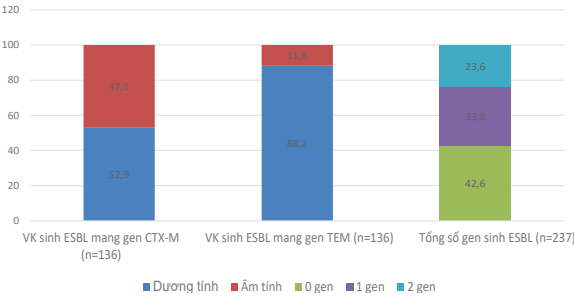
gia nghiên cứu là trẻ em/học sinh hoặc người làm nông nghiệp (61,1%), cũng tương ứng với tỷ lệ cao người không biết chữ hoặc có trình độ học vấn tiểu học (bảng 1).

Trong tổng số 1.427 mẫu thu thập từ các đối tượng tham gia nghiên cứu được chẩn đoán nhiễm khuẩn đường tiết niệu, nhiễm khuẩn da, tiêu chảy và viêm phổi với số mẫu thu được từ 4 nhóm này là tương đồng nhau, số lượng chủng *E. coli* phân lập được từ 4 loại bệnh phẩm trên là 237 chủng (chiếm 16,6% tổng số mẫu bệnh phẩm). Tuy nhiên, tỷ lệ này khác nhau ở các loại bệnh phẩm, cao nhất ở mẫu bệnh phẩm của người mắc tiêu chảy (53,2%), tiếp theo là nhiễm khuẩn đường tiết niệu (25,3%), viêm phổi (16,0%) và nhiễm khuẩn da (5,5%) (biểu đồ 1).



Biểu đồ 1. Tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* phân lập được và sinh ESBL theo nhóm bệnh. VK: vi khuẩn.

Trong số 237 chủng *E. coli* phân lập được thì có 136 chủng mang gen mã hóa sinh ESBL (57,4%). Trong đó, tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen mã hóa sinh ESBL ở các bệnh phẩm khác nhau là khác nhau, cao nhất ở mẫu bệnh phẩm của triệu chứng tiêu chảy (65,4%), sau đó đến nhiễm khuẩn tiết niệu (22,1%), viêm phổi (8,8%) và nhiễm khuẩn da (3,7%).



Biểu đồ 2. Đặc điểm mang gen sinh ESBL của vi khuẩn *E. coli* (n=237).

Tất cả các chủng *E. coli* phân lập được từ các mẫu bệnh phẩm được xác định các gen sinh ESBL (CTX-M và TEM) bằng kỹ thuật PCR. Trong 237 chủng *E. coli* có 136 chủng sinh ESBL được phát hiện có ít nhất một gen mã hoá, chiếm tỷ lệ 57,4% (biểu đồ 2).

Bảng 2. Một số đặc điểm mang gen sinh ESBL của vi khuẩn *E. coli* theo nhóm triệu chứng của đối tượng.

Đặc điểm mang gen sinh ESBL	Số lượng (%)	Nhiễm khuẩn đường tiết niệu (n=30)	Nhiễm khuẩn da (n=5)	Tiêu chảy (n=89)	Viêm phổi (n=12)
TEM	120/136 (88,2%)	25 (83,3%)	5 (100%)	80 (89,9%)	10 (83,3%)
CTX-M	72/136 (52,9%)	10 (33,3%)	1 (20,0%)	56 (62,9%)	5 (41,7%)
TEM và CTX-M	56/136 (41,2%)	5 (16,7%)	1 (20,0%)	47 (52,8%)	3 (25,0%)

Bảng 3. Một số yếu tố liên quan tới đặc điểm mang gen sinh ESBL của vi khuẩn *E. coli* tại cộng đồng trong mô hình hồi quy đơn biến.

Đặc điểm	Mang gen sinh ESBL (n=136)	Không mang gen sinh ESBL (n=101)	p-value	RR (KTC 95%)	p-value
Khu vực (n=237)					
<0,001					
Miền Bắc	110 (65,1%)	59 (34,9%)		1	
Miền Trung	11 (61,1%)	7 (38,9%)		0,94 (0,64-1,38)	0,41
Miền Nam	15 (30,0%)	35 (70,0%)		0,42 (0,29-0,71)	<0,001
Nhóm tuổi (n=237)					
0,043					
<18	71 (65,7%)	37 (34,3%)		1	
18-29	4 (33,3%)	8 (66,7%)		0,51 (0,23-1,14)	0,10
30-45	19 (43,2%)	25 (56,8%)		0,66 (0,46-0,95)	0,02
46-60	27 (60,0%)	18 (40,0%)		0,91 (0,69-1,2)	0,51
>60	15 (53,6%)	13 (46,4%)		0,81 (0,56-1,18)	0,28
Nhóm triệu chứng (n=237)					
<0,001					
Nhiễm khuẩn đường tiết niệu	30 (50,0%)	30 (50,0%)		1	
Nhiễm khuẩn da	5 (38,5%)	8 (61,5%)		0,77 (0,37-1,6)	0,48
Tiêu chảy	89 (70,6%)	37 (29,4%)		1,41 (1,07-1,86)	0,01
Viêm phổi	12 (31,6%)	26 (68,4%)		0,63 (0,37-1,08)	0,09
Trình độ học vấn (n=237)					
0,057					
Không biết chữ	63 (69,2%)	28 (30,8%)		1	
Tiểu học	17 (45,9%)	20 (54,1%)		0,66 (0,46-0,97)	0,032
Trung học cơ sở	26 (51,0%)	25 (49,0%)		0,74 (0,54-0,99)	0,047
Trung học phổ thông/bỏ túc	17 (48,6%)	18 (51,4%)		0,7 (0,49-1,01)	0,059
Đại học trở lên	13 (56,5%)	10 (43,5%)		0,82 (0,56-1,2)	0,3
Thành viên trong gia đình có sử dụng kháng sinh trong vòng 3 tháng trước thời điểm nghiên cứu (n=237)					
0,07					
Không	27 (47,4%)	30 (52,6%)		1	
Có	80 (57,6%)	59 (42,4%)		1,22 (0,89-1,65)	0,22
Không biết	29 (70,7%)	12 (29,3%)		1,49 (1,07-2,09)	0,02
Đối tượng có sử dụng kháng sinh trong vòng 3 tháng trước thời điểm nghiên cứu (n=237)					
0,60					
Không	56 (56,0%)	44 (44,0%)		1	
Có	59 (56,2%)	46 (43,8%)		1 (0,79-1,28)	0,98
Không biết	21 (65,6%)	11 (34,4%)		1,17 (0,86-1,59)	0,31
Mức độ dễ dàng mua thuốc kháng sinh nếu không có đơn tại các nhà thuốc (n=237)					
0,84					
Không	3 (50,0%)	3 (50,0%)		1	
Có	129 (57,3%)	96 (42,7%)		1,15 (0,51-2,57)	0,74
Không biết	4 (66,7%)	2 (33,3%)		1,33 (0,5-3,55)	0,57
Mức độ kiến thức - thái độ (n=237)					
0,68					
Đạt	41 (55,4%)	33 (44,6%)		1	0,68
Chưa đạt	95 (58,3%)	68 (41,7%)		1,05 (0,83-1,34)	
Mức độ thực hành sử dụng kháng sinh (n=237)					
0,64					
Đạt	34 (54,8%)	28 (45,2%)		1	0,64
Chưa đạt	102 (58,3%)	73 (41,7%)		1,06 (0,82-1,38)	

Kết quả bảng 2 cho thấy, trong 136 chủng sinh ESBL được phát hiện có ít nhất một gen mã hoá, có 41,2% chứa cả hai gen. Gen TEM chiếm 88,2% và CTX-M 52,9%. Tỷ lệ mang gen này ở các loại bệnh phẩm khác nhau cũng khác nhau. Gen TEM cao nhất ở mẫu bệnh phẩm nhiễm khuẩn da (100%), tiếp đó là tiêu chảy (89,9%), viêm phổi và nhiễm khuẩn đường tiết niệu (83,3%). Với gen CTX-M, tỷ lệ mang gen lại cao nhất ở mẫu bệnh phẩm tiêu chảy 62,9%, tiếp đó là viêm phổi (41,7%), nhiễm khuẩn đường tiết niệu (33,3%) và thấp nhất ở mẫu nhiễm khuẩn da (20%). Tỷ lệ đồng mang 2 gen cao nhất ở mẫu bệnh phẩm tiêu chảy (52,8%), tiếp đó là viêm phổi (25%), nhiễm khuẩn da (20%) và đường tiết niệu (16,7%).

Phân tích đơn biến các yếu tố liên quan đến vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL cho thấy có sự khác nhau giữa các khu vực. Chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập tại khu vực miền Nam có nguy cơ mang gen mã hóa sinh ESBL kháng kháng sinh chỉ bằng 42% so với khu vực miền Bắc (RR=0,42, $p<0,001$). Nhóm tuổi 30-45 có nguy cơ mang các gen mã hoá sinh ESBL chỉ bằng 66% so với các nhóm tuổi khác (RR=0,66, $p<0,02$). Bệnh tiêu chảy là nhóm có vi khuẩn *E. coli* mang gen mã hoá sinh ESBL cao hơn nhóm bệnh khác 41% (RR=1,41, $p<0,01$). Những gia đình có sử dụng kháng sinh cho người có tỷ lệ nhiễm vi khuẩn mang gen mã hoá sinh ESBL cao hơn so với những gia đình không sử dụng kháng sinh (bảng 3).

Bàn luận

Việc điều tra tỷ lệ kháng thuốc kháng sinh ESBL có ý nghĩa quan trọng trong việc đưa ra các chiến lược điều trị theo kinh nghiệm và đánh giá các hướng dẫn hiện có. Tần suất và các loại nhiễm trùng do *Enterobacteriaceae* sinh ESBL đã tăng lên đáng kể trong vài thập kỷ qua với sự chênh lệch giữa các địa điểm và quốc gia khác nhau. Kể từ đầu thiên niên kỷ mới, *E. coli* đã trở thành loại vi khuẩn sinh ESBL được phân lập phổ biến nhất trên toàn thế giới, với CTX-M là loại phân lập được thường xuyên nhất [5]. *E. coli* sinh ESBL bùng phát gây thêm gánh nặng lớn cho điều trị nhiễm khuẩn tiêu hoá và đường tiết niệu khởi phát từ cộng đồng, vì các chủng này thường đa kháng thuốc, làm tăng thất bại trong điều trị [9, 10]. Vì không có giám sát toàn diện về nhiễm trùng do *E. coli* mắc phải trong cộng đồng ở Việt Nam, nghiên cứu này nhằm đánh giá tỷ lệ hiện mắc và cơ chế sản xuất ESBL của chúng. Số liệu từ nghiên cứu này sẽ góp phần đưa ra bức tranh về thực trạng vi khuẩn *E. coli* kháng kháng sinh sinh ESBL ở cộng đồng.

Trong tổng số 237 chủng *E. coli* phân lập, 136 chủng (57,4%) dương tính với ESBL. Tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL khác nhau giữa các địa phương. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, tỷ lệ nhiễm ESBL cao hơn nghiên cứu từ Sudan với 30,2% sinh ESBL ở *E. coli* [11]. Nghiên cứu của Hsueh và cs (2011) [12] cho thấy, tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL cao nhất ở Ấn Độ (60%), tiếp theo là Hồng Kông (48%) và Singapore (33%). Trong nghiên cứu của chúng tôi tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL ở Việt Nam cũng khác nhau giữa các khu vực, ở miền Nam (30%) tỷ lệ chỉ bằng một nửa so với miền Bắc (65,1%) và miền Trung (61,1%) (sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê). Các nghiên cứu trên từng địa phương riêng biệt cũng cho thấy tỷ lệ tương tự. Một nghiên

cứ tại Thái Bình trên mẫu phân của người khỏe mạnh có tỷ lệ là 66,7% [6], trong khi tỷ lệ này tại nghiên cứu trên mẫu thu thập từ Bệnh viện Nguyễn Đình Chiểu (Bến Tre) là 44,4% [13]. Đây có thể là một gợi ý cho các nghiên cứu tiếp theo để tìm hiểu sâu hơn về lý do dẫn đến sự khác nhau này.

Tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL ở các bệnh phẩm khác nhau là khác nhau, cao nhất ở vi khuẩn *E. coli* trên mẫu bệnh phẩm của triệu chứng tiêu chảy (65,4%), sau đó đến nhiễm khuẩn đường tiết niệu (22,1%), viêm phổi (8,8%) và nhiễm khuẩn da (3,7%). Tại Việt Nam, các nghiên cứu về vi khuẩn *E. coli* kháng kháng sinh ở cộng đồng chưa có nhiều, chỉ có một vài nghiên cứu về vi khuẩn *E. coli* trên mẫu phân của người khỏe mạnh. Một nghiên cứu tại Thái Bình năm 2016 [6] cho thấy, tỷ lệ sinh ESBL ở trên mẫu phân của người khỏe mạnh là 64,6%, khá tương đồng với kết quả nghiên cứu này. *E. coli* gây nhiễm khuẩn tiết niệu và sinh ESBL cũng đang là vấn đề đáng quan tâm, tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL ở nhiễm khuẩn tiết niệu cộng đồng tăng ở mức độ toàn cầu. Tuy nhiên, rất ít nghiên cứu ở Việt Nam thực hiện trên mẫu nước tiểu ở bệnh nhân có triệu chứng nhiễm khuẩn tiết niệu. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* tìm thấy ở mẫu bệnh phẩm nhiễm khuẩn đường tiết niệu là 25,3%, trong đó tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL là 22,1%.

Từ nhiều nghiên cứu khác nhau, người ta nhận thấy, gen của ESBL rất đa dạng. Các báo cáo trước đó đã đề cập rằng, loại gen ESBL phổ biến nhất là SHV, TEM và CTX-M. Trong thập kỷ qua, các loại TEM và SHV được báo cáo là những loại gen β -lactam phổ biến nhất, nhưng gần đây, loại CTX-M đã phổ biến trên toàn thế giới so với các kiểu gen SHV [14]. CTX-M chiếm ưu thế ở nhiều vùng, một số báo cáo được thực hiện từ Iran (74%) [15], Ma Rốc, Bắc Phi (70%) [16, 17] và Ấn Độ (93,7%). Tuy nhiên, nghiên cứu hiện tại đã chỉ ra rằng, TEM là gen sinh ESBL chiếm ưu thế trong vi khuẩn *E. coli* đã được chứng thực với các báo cáo của một số nghiên cứu khác trước đó [15-18]. Gen này chiếm ưu thế ở các nước châu Âu như Ý (45,4%) [19] và Thổ Nhĩ Kỳ (72,7%) [20]. Nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như các nghiên cứu này, trong đó TEM chiếm ưu thế (88,2%), sau đó là CTX-M (51%).

Một số nghiên cứu đã báo cáo sự đồng tồn tại của các gen sinh ESBL khác nhau trong cùng các dòng phân lập. Sự đồng tồn tại chính của cả 2 gen là CTX-M và TEM (41,8%) trong các dòng phân lập của chúng tôi. Kết quả này cũng phù hợp với những nghiên cứu khác ở Iran [21] và Ấn Độ [22] đã báo cáo cả TEM và CTX-M là 2 loại phổ biến nhất.

Các nghiên cứu chỉ ra một số yếu tố làm gia tăng vi khuẩn sinh ESBL như đã từng sử dụng kháng sinh. Trong nghiên cứu này cũng cho thấy có sự liên quan giữa việc gia đình có sử dụng kháng sinh và sự gia tăng của vi khuẩn *E. coli* sinh ESBL. Lee và cs (2013) [23] đã mô tả rằng, việc gia tăng tiếp xúc với fluoroquinolon/cephalosporin làm cho vi khuẩn đề kháng với fluoroquinolon/cephalosporin nhiều hơn. Baquero (2001) [24] cho rằng, việc tiếp xúc với nồng độ kháng sinh rất thấp có thể chọn ra những đột biến kháng thuốc ở mức độ thấp, đóng vai trò là bước đệm cho các chủng có mức độ cao sức đề kháng.

Tiếp xúc không mong muốn với kháng sinh thường xảy ra do lạm dụng hoặc sử dụng sai thuốc kháng sinh. Ở nhiều quốc gia, thuốc kháng sinh có thể mua dễ dàng và không cần đơn thuốc của bác sĩ [25], đây là một nguyên nhân chính dẫn đến lạm dụng thuốc kháng sinh.

Kết luận

Tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* mang gen sinh ESBL cao đối với các nhiễm khuẩn ở cộng đồng (57,3%), đặc biệt ở nhóm nhiễm khuẩn đường tiêu hóa (65,4%) và tiết niệu (22,1%). Tuy nhiên, có sự khác nhau về tỷ lệ này giữa các khu vực, ở miền Nam (30%) tỷ lệ chỉ bằng một nửa so với miền Bắc (65,1%) và miền Trung (61,1%). TEM (88,2%) là gen phổ biến trong các nhiễm khuẩn tại cộng đồng ở Việt Nam, tiếp sau là gen CTX-M (51%). Tỷ lệ đồng mang 2 gen (41,8%) cũng cao hơn so với các nghiên cứu khác ở các nước. Đây là những gợi ý cho các bác sĩ lâm sàng trong định hướng kê đơn kháng sinh cho các nhiễm khuẩn tại cộng đồng. Đã từng sử dụng kháng sinh trong gia đình là yếu tố liên quan đến việc gia tăng tỷ lệ *E. coli* sinh ESBL tại cộng đồng. Điều này khẳng định thêm rằng, quản lý việc sử dụng kháng sinh trong cộng đồng đang cần được các nhà quản lý, hoạch định chính sách đặt là vấn đề ưu tiên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P.A. Bradford (2001), "Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat", *Clinical Microbiology Reviews*, **14**(4), pp.933-951.
- [2] D.L. Paterson, R.A. Bonomo (2005), "Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update", *Clinical Microbiology Reviews*, **18**(4), pp.657-686.
- [3] S.P. Hawser, S.K. Bouchillon, D.J. Hoban, R.E. Badal, P.R. Hsueh, D.L. Paterson (2009), "Emergence of high levels of extended-spectrum-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the Asia-Pacific region: data from the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART) program, 2007", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**(8), pp.3280-3284.
- [4] I. Morrissey, M. Hackel, R. Badal, S. Bouchillon, S. Hawser, D. Biedenbach (2013), "A review of ten years of the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART) from 2002 to 2011", *Pharmaceuticals*, **6**(11), pp.1335-1346.
- [5] Y. Chong, S. Shimoda, N. Shimono (2018), "Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*", *Infection, Genetics and Evolution*, **61**, pp.185-188.
- [6] Không Thị Diệp, Phạm Ngọc Khái, Hoàng Thị Thu Hà (2019), "Thực trạng *Escherichia coli* sinh beta-lactamase phổ mở rộng ở người khỏe mạnh tại cộng đồng xã Nguyễn Xá, huyện Vũ Thư, tỉnh Thái Bình, năm 2016", *Tạp chí Y học Dự phòng*, **29**(12), tr.111-117.
- [7] Trần Đức Tiến và cs (2020), "Một số đặc điểm sinh học phân tử của vi khuẩn đường ruột kháng kháng sinh nhóm β -lactam phổ rộng phân lập được tại cộng đồng xã Thanh Hà, huyện Thanh Liêm, tỉnh Hà Nam, năm 2015", *Tạp chí Y học Dự phòng*, **30**(7), tr.49-54.
- [8] Hoàng Thị Hằng, Phạm Duy Thái, Trần Thị Vân Phương, Ngô Thị Hồng Hạnh, Trần Huy Hoàng (2019), "Một số đặc điểm kháng kháng sinh và mối liên hệ kiểu gen của *Serratia marcescens* phân lập trên bệnh nhân điều trị tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **61**(12), tr.20-25.
- [9] D.S. Lee, S.J. Lee, H.S. Choe (2018), "Community-acquired urinary tract infection by *Escherichia coli* in the era of antibiotic resistance", *BioMed Research International*, **2018**, DOI: 10.1155/2018/7656752.

- [10] World Health Organization (2014), *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*, 232p.
- [11] M.E. Ibrahim, N.E. Bilal, M.A. Magzoub, M.E. Hamid (2013), "Prevalence of extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* from hospitals in Khartoum State, Sudan", *Oman Medical Journal*, **28**(2), DOI: 10.5001/omj.2013.30.
- [12] P.R. Hsueh, et al. (2011), "Consensus review of the epidemiology and appropriate antimicrobial therapy of complicated urinary tract infections in Asia-Pacific region", *Journal of Infection*, **63**(2), pp.114-123.
- [13] Lê Thanh Điền và cs (2017), "Tình hình đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *Escherichia coli* và *Klebsiella pneumoniae* tại Bệnh viện Nguyễn Đình Chiểu, Bến Tre", *Tạp chí Y học Dự phòng*, **27**(11), tr.180-186.
- [14] R.Y. Shash, A.A. Elshimy, M.Y. Soliman, A.A. Mosharafa (2019), "Molecular characterization of extended-Spectrum β -lactamase *Enterobacteriaceae* isolated from Egyptian patients with community-and hospital-acquired urinary tract infection", *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **100**(3), pp.522-528.
- [15] M. Moosavian, B. Deiham (2012), "Distribution of TEM, SHV and CTX-M genes among ESBL-producing enterobacteriaceae isolates in Iran", *African Journal of Microbiology Research*, **6**(26), pp.5433-5439.
- [16] E. Lautenbach, J.B. Patel, W.B. Bilker, P.H. Edelstein, N.O. Fishman (2001), "Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes", *Clinical Infectious Diseases*, **32**(8), pp.1162-1171.
- [17] M.S. Rezai, et al. (2015), "Characterization of multidrug resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among uropathogens of pediatrics in North of Iran", *BioMed Research International*, **2015**, DOI: 10.1155/2015/309478.
- [18] A.A. Abujnah, A. Zorgani, M.A. Sabri, H.E. Mohammady, R.A. Khalek, K.S. Ghenghesh (2015), "Multidrug resistance and extended-spectrum β -lactamases genes among *Escherichia coli* from patients with urinary tract infections in Northwestern Libya", *Libyan Journal of Medicine*, **10**(1), DOI: 10.3402/ljm.v10.26412.
- [19] A. Carattoli, et al. (2008), "Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases isolated in Rome, Italy", *Journal of Clinical Microbiology*, **46**(1), pp.103-108.
- [20] E. Bali, L. Açıık, N. Sultan (2010), "Phenotypic and molecular characterization of SHV produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital", *Afr. J. Microbiol. Res.*, **4**(8), pp.650-654.
- [21] S.S. Seyedjavadi, M. Goudarzi, F. Sabzehali (2016), "Relation between blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genes and acute urinary tract infections", *Journal of Acute Disease*, **5**(1), pp.71-76.
- [22] M. Sharma, S. Pathak, P. Srivastava (2013), "Prevalence and antibiogram of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing gram negative bacilli and further molecular characterization of ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.", *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, **7**(10), pp.2173-2177.
- [23] D.S. Lee, et al. (2013), "Antimicrobial susceptibility pattern and epidemiology of female urinary tract infections in South Korea, 2010-2011", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**(11), pp.5384-5393.
- [24] F. Baquero (2001), "Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance", *Drug Resistance Updates*, **4**(2), pp.93-105.
- [25] H.J. Simon, P.I. Folb, H. Rocha (1987), "Policies, laws, and regulations pertaining to antibiotics: Report of task force 3", *Reviews of Infectious Diseases*, **9**(3), DOI: 10.1093/clinids/9.Supplement_3.S261.

Tác dụng hạ sốt của cao chiết Bàng biển, Bạch đầu ông và Tiết dê trên mô hình thử gây sốt bằng lipopolysaccharid

Lê Thị Xoan*, Nguyễn Thị Phụng, Nguyễn Văn Hiệp, Phạm Thị Nguyệt Hằng, Nguyễn Văn Tài

Viện Dược liệu

Ngày nhận bài 18/3/2021; ngày chuyển phản biện 22/3/2021; ngày nhận phản biện 22/4/2021; ngày chấp nhận đăng 29/4/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá tác dụng hạ sốt của các cao chiết Bàng biển (*Calotropis gigantea*), Bạch đầu ông (*Vernonia cinerea*) và Tiết dê (*Cissampelos pareira*). Thử thí nghiệm sau khi uống các cao chiết được liệu hoặc thuốc đối chứng dương paracetamol được gây sốt bằng cách tiêm tĩnh mạch dung dịch lipopolysaccharide (LPS). Kết quả cho thấy, cao chiết còn Bàng biển và Bạch đầu ông ở liều 125 và 250 mg/kg và paracetamol liều 150 mg/kg có tác dụng hạ sốt đáng kể trên thử gây sốt bằng LPS. Hơn thế nữa, cao phân đoạn ethyl acetate (50 mg/kg) của Bàng biển có tác dụng hạ sốt trên mô hình này, trong khi các phân đoạn dichloromethan, n-butanol hay cồn nước của Bàng biển lại không thể hiện tác dụng này. Nghiên cứu đã gợi ý rằng, cao chiết còn Bàng biển và Bạch đầu ông có tác dụng hạ sốt và các thành phần hoạt chất có trong phân đoạn ethyl acetate của Bàng biển đóng vai trò quan trọng đối với tác dụng hạ sốt của dược liệu này.

Từ khóa: Bạch đầu ông, Bàng biển, hạ sốt, lipopolysaccharid, Tiết dê.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Với điều kiện thuận lợi là nước nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa, nóng ẩm, mưa nhiều nên hệ thực vật Việt Nam phát triển rất đa dạng. Có nhiều loại thảo dược tại Việt Nam được dùng trong y học cổ truyền để hạ sốt, chữa sốt rét hoặc chữa sốt xuất huyết, trong đó có thể kể đến là Bàng biển, Bạch đầu ông và Tiết dê. Bàng biển còn gọi là Nam tì bà diệp, Bồng bồng, Cốc may (Tây)..., có tên khoa học là *Calotropis gigantea* L., họ *Asclepiadaceae*. Trong dân gian, Bàng biển được dùng để chữa trị bệnh hen, chữa phong hủi, giang mai. Chitme và cs (2005) [1] đã nghiên cứu tác dụng hạ sốt của phần trên mặt đất cây Bàng biển đối với chuột cống. Kết quả cho thấy, thân nhiệt của chuột được kiểm soát ở mức bình thường khi tiêm màng bụng liều 200 và 400 mg/kg thể trọng. Bạch đầu ông còn có tên là Nụ áo hoa tím, Bạc đầu nâu - *Vernonia cinerea* (L.) Less., thuộc họ Cúc - *Asteraceae*. Dược liệu này thường dùng để trị sổ mũi, sốt, ho (lá); ly, tiêu chầy, đau dạ dày (rễ); viêm gan; suy nhược thần kinh; mụn nhọt, viêm tuyến sữa, hắc lao, chàm, rần cấn. Nghiên cứu của Gupta và cs (2003) [2] đã chứng minh cao chiết toàn phần cây Bạch đầu ông ở liều 250 và 500 mg/kg có tác dụng hạ sốt trên chuột cống trắng. Tiết dê còn gọi là dây Hồ đăng, Sâm nam, có tên khoa học là *Cissampelos pareira* L., thuộc họ Tiết dê - *Menispermaceae*. Ở Ấn Độ, rễ cây Tiết dê được xem là có tác dụng chống sốt chu kỳ, lợi tiểu, khử lọc, lợi tiêu hoá. Ở Philippin, người ta thường sắc rễ cây Tiết dê làm thuốc uống lợi tiểu, tiêu sỏi, làm toát mồ

hôi, điều kinh, giảm đau, chữa ho, sốt; lá cây chữa rắn cắn và trị ghê. Gần đây, Singh và cs (2016) [3] đã chứng minh bột cây Tiết dê có tác dụng hạ sốt. Mặc dù các dược liệu nêu trên đã được sử dụng trong y học cổ truyền hoặc đã được một số công trình nghiên cứu trên thế giới chứng minh tác dụng hạ sốt nhưng ở Việt Nam vẫn còn rất ít công trình nghiên cứu khoa học chứng minh tác dụng hạ sốt của các dược liệu này.

Để đánh giá tác dụng hạ sốt của thuốc, mô hình gây sốt trên thử bằng cách tiêm LPS thường được sử dụng. LPS từ vi khuẩn gram âm, ví dụ như *E. coli* có khả năng gây sốt trên thử sau khi tiêm tĩnh mạch tại với liều lượng sử dụng từ 0,1 đến 0,2 µg/kg. Bên cạnh mô hình gây sốt trên thử, LPS còn được sử dụng trong mô hình gây sốt trên chuột cống và chuột nhắt trắng [4-6]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá tác dụng hạ sốt của các cao chiết dược liệu Tiết dê, Bàng biển và Bạch đầu ông trên mô hình thử gây sốt bằng LPS.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu

Mẫu thử: Bàng biển (*Calotropis gigantea*, lá) được thu hái năm 2019 tại Kiên Lương - Kiên Giang, Bạch đầu ông (*Vernonia cinerea*, phần trên mặt đất) được thu hái năm 2019 tại Phú Quốc - Kiên Giang và Tiết dê (*Cissampelos pareira*, lá) được thu hái năm 2019 tại An Giang. Các dược

*Tác giả liên hệ: Email: xoanle@nimm.org.vn

Antipyretic activity of *Calotropis gigantea*, *Vernonia cinerea*, and *Cissampelos pareira* extracts on lipopolysaccharide-induced pyrexia in rabbits

Thi Xoan Le*, Thi Phuong Nguyen, Van Hiep Nguyen,
Thi Nguyet Hang Pham, Van Tai Nguyen

National Institute of Medicinal Materials

Received 18 March 2021; accepted 29 April 2021

Abstract:

This study aims to evaluate the antipyretic activity of *Calotropis gigantea* (CG), *Vernonia cinerea* (VC), and *Cissampelos pareira* (CP) extracts. Rabbits were received an intravenous lipopolysaccharide (LPS) after being orally administered with the plant extracts or paracetamol, a reference drug. The treatment of CG and VC ethanolic extract (125 and 250 mg/kg) and paracetamol (150 mg/kg) significantly reduced LPS-induced pyrexia. Moreover, ethyl acetate fraction (50 mg/kg) of CG showed a more significant effect in lowering the hyperthermia than dichloromethane, n-butanol fraction, or water residue. In conclusion, this study demonstrated that CG and VC ethanolic extract possess antipyretic activity. Besides, the components in the ethyl acetate fraction of CG play an important role in the antipyretic property of this herb.

Keywords: antipyretic activity, *Calotropis gigantea*, *Cissampelos pareira*, lipopolysaccharide, *Vernonia cinerea*.

Classification number: 3.4

liệu được thu mẫu và giám định tên khoa học bởi Bộ môn Tài nguyên Dược liệu, Trung tâm Sâm và Dược liệu TP Hồ Chí Minh, tiêu bản được lưu tại Khoa Hóa thực vật, Viện Dược liệu. Mẫu được loại bỏ tạp chất rồi sấy khô ở nhiệt độ dưới 50°C đến khi có độ ẩm dưới 12%. Dược liệu được cắt, xay nhỏ đến kích thước 2-3 mm.

Để chuẩn bị cao chiết còn toàn phần, 100 g dược liệu được chiết hồi lưu 3 lần bằng ethanol 70% với tỷ lệ dung môi/dược liệu lần lượt là 10, 8, 8/1 (thể tích/khối lượng), thời gian tương ứng với mỗi lần chiết là 2,5, 2 và 1 giờ. Dịch chiết của 3 lần được lọc rồi gộp lại, cất thu hồi ethanol dưới

áp suất giảm, sau đó cô hết nước trên bếp cách thủy rồi sấy trong tủ sấy chân không đến khi thu được cao khô, độ ẩm dưới 5%. Thông tin mẫu dược liệu, hiệu suất chiết và độ ẩm của các cao chiết được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Hiệu suất chiết Tiết dê, Bàng biển và Bạch đầu ông.

STT	Tên mẫu	Bộ phận dùng	Hiệu suất (%)	Độ ẩm (%)
1	Cao chiết còn Bàng biển (<i>Calotropis gigantea</i>)	Lá	23,8	3,2
2	Cao chiết còn Bạch đầu ông (<i>Vernonia cinerea</i>)	Phần trên mặt đất	18,2	3,2
3	Cao chiết còn Tiết dê (<i>Cissampelos pareira</i>)	Lá	16,9	3,9

Các phân đoạn chiết của Bàng biển được chuẩn bị mẫu như sau: 1 kg lá Bàng biển khô được chiết hồi lưu 3 lần bằng ethanol 70% với tỷ lệ dung môi/dược liệu lần lượt là 10, 8, 8/1 (thể tích/khối lượng), nhiệt độ hồi lưu của dung môi, thời gian chiết cho 3 lần là 2,5, 2 và 1,5 giờ. Dịch lọc 3 lần chiết được cô cạn đến khi còn khoảng 1,5-2 lít. Các dịch này được chiết phân đoạn lỏng lần lượt với các dung môi dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAC) và n-butanol (n-BuOH). Mỗi lần chiết với 1 loại dung môi được thực hiện tối thiểu 3 lần, theo dõi bằng quan sát màu dịch chiết ở pha hữu cơ và bằng chấm sắc ký lớp mỏng. Các phân đoạn dung môi hữu cơ riêng biệt được cất thu hồi dưới áp suất giảm, sấy khô trong tủ sấy chân không ở nhiệt độ không quá 50°C đến khi độ ẩm dưới 5%. Hiệu suất chiết các cao phân đoạn DCM, EtOAC, BuOH và cồn nước lần lượt tương ứng là 6,33, 10,02, 12,97 và 70,67%.

Động vật thí nghiệm: thỏ trưởng thành chủng *New Zealand White*, màu trắng, khỏe mạnh, cả 2 giống, trọng lượng 1,8-2,2 kg, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm. Thỏ mua về được nuôi ổn định 3-5 ngày trong nhà chăn nuôi trước khi được sử dụng để làm thí nghiệm. Nhiệt độ phòng nhà chăn nuôi được duy trì ở 24-25°C. Thỏ được cung cấp thức ăn, nước uống theo nhu cầu.

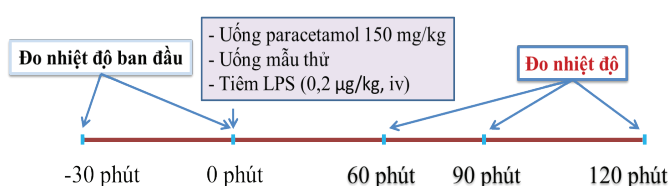
Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp đánh giá tác dụng hạ sốt của các mẫu cao chiết trên mô hình gây sốt bằng LPS: áp dụng phương pháp gây sốt trên thỏ đã được công bố trước đây [4] có sửa đổi cho phù hợp thực tế phòng thí nghiệm. Trước khi gây sốt, đo nhiệt độ từng thỏ theo đường hậu môn bằng nhiệt kế điện tử (Omron, Nhật Bản), mỗi con đo 2 lần, mỗi lần cách nhau khoảng 30 phút (nếu 2 lần đo mà số liệu không tương đương nhau thì đo lại lần thứ 3). Các cao chiết còn Bàng biển, Bạch đầu ông và Tiết dê được phân tán trong nước cất và cho thỏ uống với các liều 125, 250 và 500 mg/kg.

Cao chiết phân đoạn Bàng biển được phân tán trong nước cất và cho thỏ uống với liều 50 mg/kg. Paracetamol (dạng viên sủi, biệt dược Effergal 500 mg) được hòa tan trong nước cất và cho thỏ uống với liều 150 mg/kg. Cho thỏ của các lô uống nước (lô chứng bệnh lý) hoặc paracetamol (lô đối chứng dương) hoặc mẫu thử với cùng thể tích (2 ml/kg). Ngay sau thời điểm cho thỏ uống thuốc, tiến hành gây sốt cho tất cả các thỏ bằng cách tiêm tĩnh mạch tai dung dịch LPS với liều 0,2 µg/kg thể trọng thỏ (thể tích tiêm 0,2 ml/kg). Đo nhiệt độ trực tràng thỏ vào các thời điểm 60, 90 và 120 phút sau khi gây sốt (hình 1). Đánh giá sự thay đổi nhiệt độ (Δt) của thỏ ở các lô nghiên cứu ở các thời điểm 60, 90 và 120 phút so với thời điểm ban đầu T_0 . Phần trăm (%) ức chế sự gia tăng nhiệt độ được tính theo công thức:

$$\% \text{ ức chế} = (T\Delta t_{\text{chứng}} - T\Delta t_{\text{thử}}) \times 100 / T\Delta t_{\text{chứng}}$$

trong đó: $T\Delta t_{\text{chứng}}$: giá trị trung bình sự thay đổi nhiệt độ (Δt) của các con thỏ ở lô chứng bệnh lý; $T\Delta t_{\text{thử}}$: giá trị trung bình sự thay đổi nhiệt độ (Δt) của các con thỏ ở lô uống thuốc thử nghiệm tác dụng hạ sốt.



Hình 1. Sơ đồ thiết kế thí nghiệm đánh giá tác dụng hạ sốt của các cao chiết dược liệu.

Phân tích số liệu

Theo dõi sự thay đổi nhiệt độ của thỏ trước và sau khi gây sốt. So sánh sự thay đổi nhiệt độ trung bình của các lô mẫu thuốc với lô chứng bệnh lý tại cùng thời điểm. Kết quả nghiên cứu được trình bày dưới dạng $M \pm SE$ của nhiệt độ và hiệu nhiệt độ. Sự khác biệt giữa các nhóm được đánh giá bằng phương pháp phân tích phương sai một yếu tố (ONE WAY ANOVA), sau đó sử dụng test hậu kiểm Student-Newman-Keuls để so sánh từng cặp, sử dụng phần mềm phân tích thống kê SigmaPlot 12.0 (SYSTA Software Inc, Richmond, CA, USA). So sánh các giá trị trung bình đạt ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Kết quả nghiên cứu

Tác dụng hạ sốt của các cao chiết cồn Bàng biển, Bạch đầu ông và Tiết dê trên mô hình gây sốt bằng LPS

Tác dụng hạ sốt của Bàng biển: mô hình gây sốt trên thỏ với chất gây sốt là LPS được sử dụng để đánh giá tác dụng hạ sốt của cao chiết cồn lá Bàng biển. Các kết quả được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Tác dụng hạ sốt của cao chiết cồn Bàng biển trên thỏ gây sốt bằng LPS.

Thông số	Lô	Chứng bệnh lý (n=6)	Cao chiết cồn Bàng biển (mg/kg)			Paracetamol 150 mg/kg (n=5)
			125 (n=6)	250 (n=6)	500 (n=6)	
To		38,6±0,2	38,5±0,1	38,7±0,1	38,7±0,2	38,9±0,1
60 phút	t	39,9±0,1	39,2±0,2**	39,5±0,1*	39,7±0,3	39,2±0,1**
	Δt	1,3±0,1	0,6±0,1**	0,8±0,1**	1,0±0,2	0,4±0,1**
	% ức chế		45,5	41,7	26,9	72,3
90 phút	t	39,8±0,1	39,3±0,1*	39,5±0,1	39,6±0,2	39,1±0,1**
	Δt	1,2±0,1	0,8±0,1*	0,8±0,1*	0,8±0,1*	0,3±0,1**
	% ức chế		24,2	32,4	29,6	78,0
120 phút	t	39,8±0,1	39,3±0,1*	39,3±0,2*	39,3±0,2	39,1±0,1**
	Δt	1,2±0,1	0,7±0,1*	0,6±0,1**	0,6±0,1**	0,2±0,1**
	% ức chế		25,1	51,1	48,2	84,5

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ so với chứng bệnh lý cùng thời điểm.

Kết quả bảng 2 cho thấy, tại các thời điểm 60, 90 và 120 phút sau khi gây sốt, nhiệt độ của thỏ ở lô chứng bệnh lý tăng từ 1,2 đến 1,3°C so với thời điểm ban đầu chưa gây sốt. Lô uống cao chiết lá Bàng biển với liều 125 mg/kg tại cả 3 thời điểm 60, 90 và 120 phút sau khi gây sốt đều đã giảm so với lô chứng bệnh lý đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Lô uống cao chiết cồn Bàng biển với liều 250 mg/kg tại các thời điểm 60, 90 và 120 phút sau khi gây sốt đã ức chế sự tăng nhiệt độ lần lượt là 41,7, 32,4 và 51,1% so với lô chứng bệnh lý cùng thời điểm và đều đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý với $p < 0,05$ (sau 90 phút) và $p < 0,01$ (sau 60 và 120 phút). Lô uống cao chiết Bàng biển với liều 500 mg/kg tại các thời điểm 60, 90 và 120 phút sau khi gây sốt đã ức chế sự tăng nhiệt độ lần lượt là 26,9, 29,6 và 48,2% so với lô chứng bệnh lý cùng thời điểm, trong đó thời điểm 90 phút và 120 phút ức chế đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý với $p < 0,05$ và $p < 0,01$. Thỏ được uống paracetamol liều 150 mg/kg có nhiệt độ giảm rõ rệt so với lô bệnh lý ở cả 3 thời điểm 60, 90 và 120 phút đánh giá.

Tác dụng hạ sốt của cao chiết cồn Bạch đầu ông: cao chiết cồn phần trên mặt đất cây Bạch đầu ông được đánh giá tác dụng hạ sốt ở các mức liều 125-500 mg/kg. Kết quả bảng 3 cho thấy, lô chứng bệnh lý không được điều trị có mức gia tăng nhiệt độ cao và ổn định trong 120 phút theo dõi. Lô uống cao chiết Bạch đầu ông với liều 125 mg/kg tại cả 3 thời điểm 60, 90 và 120 phút sau khi gây sốt đều có mức thay đổi nhiệt độ (Δt) giảm so với lô chứng bệnh lý đạt ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Lô uống cao chiết Bạch đầu ông với liều 250 mg/kg tại các thời điểm 60, 90 và 120 phút sau khi gây sốt đã ức chế mạnh sự tăng nhiệt độ, lần lượt là 49,4, 60,6 và 53,2% so với lô chứng bệnh lý cùng thời điểm và đều đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý

với $p < 0,01$. Ở mức liều cao 500 mg/kg, cao Bạch đầu ông tại các thời điểm 60, 90 và 120 phút sau khi gây sốt đã ức chế sự tăng nhiệt độ lần lượt là 5,1, 14,8 và 32,4% so với lô chứng bệnh lý cùng thời điểm, tuy nhiên sự ức chế chưa đạt ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh lý tại cả ba thời điểm này ($p > 0,05$).

Bảng 3. Tác dụng hạ sốt của cao chiết cỏn Bạch đầu ông trên thỏ gây sốt bằng LPS.

Thông số	Lô Chứng bệnh lý (n=6)	Cao chiết cỏn Bạch đầu ông (mg/kg)				Paracetamol 150 mg/kg (n=5)
		125 (n=6)	250 (n=6)	500 (n=6)	150 mg/kg (n=5)	
T ₀		38,6±0,2	38,7±0,1	38,8±0,1	38,7±0,2	38,9±0,1**
t		39,9±0,1	39,5±0,2	39,4±0,2	39,9±0,1	39,2±0,1**
60 phút	Δt	1,3±0,1	0,8±0,1*	0,7±0,1**	1,2±0,2	0,4±0,1**
	% ức chế		32,9	49,4	5,1	72,3
t		39,8±0,1	39,5±0,2	39,2±0,1**	39,7±0,3	39,1±0,1**
90 phút	Δt	1,2±0,1	0,8±0,1*	0,5±0,1*	1,0±0,2	0,3±0,1**
	% ức chế		25,1	60,6	14,8	78,0
t		39,8±0,1	39,3±0,1	39,3±0,1*	39,5±0,3	39,1±0,1**
120 phút	Δt	1,2±0,1	0,6±0,1*	0,5±0,1**	0,8±0,2	0,2±0,1**
	% ức chế		40,5	53,2	32,4	84,5

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ so với chứng bệnh lý cùng thời điểm.

Tác dụng hạ sốt của cao chiết cỏn Tiết dê: tương tự cao chiết cỏn Bàng biển và Bạch đầu ông, cao chiết cỏn lá Tiết dê cũng được đánh giá tác dụng hạ sốt trên thỏ với chất gây sốt là LPS. Các kết quả được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Tác dụng hạ sốt của cao chiết cỏn Tiết dê trên mô hình thỏ gây sốt bằng LPS.

Thông số	Lô Chứng bệnh lý (n=6)	Cao chiết cỏn Tiết dê (mg/kg)		Paracetamol 150 mg/kg (n=5)
		125 (n=6)	250 (n=6)	
To		38,8±0,1	38,9±0,1	38,7±0,1
t		39,7±0,2	39,6±0,2	39,5±0,2
60 phút	Δt	0,9±0,1	0,7±0,1	0,8±0,2
	% ức chế		23,6	18,9
t		39,8±0,1	39,7±0,2	39,7±0,1
90 phút	Δt	1,1±0,1	0,8±0,1*	1±0,1
	% ức chế		27,1	9,4
t		39,8±0,2	39,7±0,2	39,6±0,2
120 phút	Δt	1,1±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1
	% ức chế		22,4	20,5

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ so với chứng bệnh lý cùng thời điểm.

Kết quả cho thấy, lô chứng bệnh lý không được điều trị có mức gia tăng nhiệt độ khá cao và ổn định trong 120 phút theo dõi. Cao chiết cỏn lá Tiết dê với liều 125 mg/kg ức chế sự tăng nhiệt độ so với lô chứng bệnh lý tại các thời điểm 60, 90 và 120 phút lần lượt là 23,6, 27,1 và 22,4%. Sự ức chế này đạt ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ tại thời điểm 90 phút; không đạt ý nghĩa thống kê tại thời điểm 60 và 120 phút ($p > 0,05$). Ở mức liều 250 mg/kg, cao Tiết dê ức chế sự tăng nhiệt độ so với lô chứng bệnh lý tại các thời điểm 60, 90 và 120 phút lần lượt là 18,9, 9,4 và 20,5%, tuy nhiên sự ức chế này không đạt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Lô uống paracetamol liều 150 mg/kg có tác dụng hạ sốt tốt trên thỏ ở cả 3 thời điểm 60, 90 và 120 phút đánh giá.

Tác dụng hạ sốt của các cao chiết phân đoạn lá Bàng biển mô hình gây sốt bằng LPS

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao chiết Bàng biển và Bạch đầu ông có tác dụng hạ sốt đáng kể ở các liều 125 và 250 mg/kg, gợi ý là 2 dược liệu có tác dụng hạ sốt tiềm năng. Trong nghiên cứu này, nhằm làm sáng tỏ thành phần cao chiết có tác dụng hạ sốt trong Bàng biển, chúng tôi tiến hành đánh giá tác dụng hạ sốt của các phân đoạn cao chiết cỏn Bàng biển là dichloromethane (DCM), ethylacetat (EtOAc) và n-butanol (BuOH) trên mô hình thỏ gây sốt bằng LPS ở mức liều giống nhau là 50 mg/kg.

Bảng 5. Tác dụng hạ sốt của các cao chiết phân đoạn lá Bàng biển trên thỏ gây sốt bằng LPS.

Lô thí nghiệm	Chứng bệnh lý (n=6)	DCM 50 mg/kg (n=6)	EtOAc 50 mg/kg (n=6)	BuOH 50 mg/kg (n=6)	Nước 50 mg/kg (n=6)	Paracetamol 150 mg/kg (n=5)
To		38,9±0,1	38,8±0,1	38,9±0,1	38,9±0,1	38,8±0,1
t		40,0±0,1	39,7±0,1	39,9±0,1	39,8±0,1	39,9±0,2
60 phút	Δt	1,1±0,1	0,9±0,1	1,1±0,1	1,0±0,1	0,3±0,1***
	% ức chế		13,85	0,00	6,15	5,4
t		40,2±0,1	40,0±0,0	39,8±0,1	39,9±0,1	39,9±0,1
90 phút	Δt	1,3±0,0	1,2±0,1	1,0±0,1*	1,1±0,1	0,4±0,1***
	% ức chế		9,21	22,37	12,50	17,1
t		40,0±0,1	39,8±0,2	39,9±0,1	39,8±0,1	39,9±0,1
120 phút	Δt	1,1±0,0	1,0±0,2	1,0±0,1	1,0±0,1	0,3±0,1***
	% ức chế		6,06	6,06	6,06	4,5

* $p < 0,05$ so với chứng bệnh lý cùng thời điểm.

Kết quả bảng 5 cho thấy, 3 lô thỏ uống các phân đoạn DCM, BuOH và nước từ Bàng biển liều 50 mg/kg đều chưa có tác dụng hạ sốt tại các thời điểm 60, 90 và 120 phút. Thỏ được uống cao phân đoạn EtOAc của Bàng biển chưa thể hiện tác dụng hạ sốt tại thời điểm 60 và 120 phút. Tuy nhiên,

tại thời điểm 90 phút sau khi tiêm LPS, cao chiết phân đoạn EtOAc của Bàng biển có tác dụng hạ sốt (giảm 22,37%), đạt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm đối chứng không được điều trị. Như vậy, cao phân đoạn etylacteate của Bàng biển có tác dụng hạ sốt tiềm năng.

Bàn luận

Nghiên cứu này đã đánh giá tác dụng hạ sốt của cao chiết còn 70% của lá Bàng biển, cao chiết còn 70% của phần trên mặt đất cây Bạch đầu ông và cao chiết còn 70% của lá Tiết dê ở các mức liều 125-500 mg/kg trên thỏ gây sốt bằng LPS. Kết quả nghiên cứu đã chứng minh: cao chiết Bàng biển có tác dụng hạ sốt ở các liều 125, 250 và 500 mg/kg; Bạch đầu ông có tác dụng hạ sốt ở mức liều 125 và 250 mg/kg trong 120 phút theo dõi. Mặt khác, đối với cao chiết lá Tiết dê, mặc dù ở mức liều 125 mg/kg có khả năng ức chế sự gia tăng nhiệt độ sau khi tiêm LPS gây sốt ở thời điểm 90 phút đạt ý nghĩa thống kê, nhưng tác dụng này không duy trì được đến thời điểm 120 phút. Hơn nữa, ở mức liều cao hơn là 250 mg/kg, cao chiết Tiết dê không có khả năng ức chế đáng kể sự gia tăng nhiệt độ của thỏ tiêm LPS trong 120 phút theo dõi. Bên cạnh việc đánh giá tác dụng hạ sốt của cao chiết còn Tiết dê ở các liều 125 và 250 mg/kg, chúng tôi đã tiến hành thăm dò sơ bộ tác dụng hạ sốt của cao chiết Tiết dê ở mức liều 500 mg/kg, tuy nhiên cũng không thấy có xu hướng hạ sốt ở mức liều này (số liệu không đưa ra ở đây). Như vậy, kết quả nghiên cứu đã cho thấy tiềm năng phát triển thuốc hạ sốt từ dược liệu Bàng biển và Bạch đầu ông. Tuy nhiên, dược liệu Bạch đầu ông khó khai thác với số lượng lớn, gây khó khăn khi triển khai nghiên cứu ứng dụng ở quy mô lớn, trong khi Bàng biển lại sẵn có, nên trong khuôn khổ nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn dược liệu Bàng biển để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo về tác dụng hạ sốt. Kết quả nghiên cứu đã chứng minh cao chiết phân đoạn EtOAc của Bàng biển có tác dụng hạ sốt tốt nhất so với các phân đoạn khác, gợi ý thành phần hoạt chất có tác dụng hạ sốt của Bàng biển nằm trong phân đoạn này.

Lá Bàng biển có chứa các hợp chất chủ yếu thuộc nhóm flavonoid (isorhamnetin 3-O-[2-O- β -D-galactopyranosyl-6-O- α -L-rhamnopyranosyl]- β -D-glucopyranosid, isorhamnetin-3-O-rutinosid, isorhamnetin-3-O-glucopyranosid), các glycosid tim cũng như các sapogenin (calotropin, cardenolid, calatropon, uscharin, calotoxin...) [7-9]. Các hợp chất glycosid tim được phân lập trong lá Bàng biển thu hái tại Việt Nam khá đa dạng và có độ độc tế bào ung thư khá cao [8]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, từ phân đoạn EtOAc có tác dụng hạ sốt đã phân lập được 1 hợp chất thuộc nhóm cardenolid là 15 β -hydroxycalotropin và 5 flavonoid là isorhametin và dẫn xuất của isorhamnetin như isorhametin-3-O-glucopyranosid, isorhamnetin-3-O-galactopyranosid, isorhametin-3-O-rutinosid, isoquercetin

[10]. Kết quả nghiên cứu đã gợi ý rằng, các chất này có thể đóng vai trò trong tác dụng hạ sốt của cao chiết Bàng biển và cần có những nghiên cứu tiếp theo để làm sáng tỏ các giả thuyết này.

Kết luận

Cao chiết còn Bàng biển và Bạch đầu ông liều 125-250 mg/kg có tác dụng hạ sốt trên mô hình thỏ gây sốt bằng LPS. Các chất trong phân đoạn EtOAc của Bàng biển đóng vai trò quan trọng đối với tác dụng hạ sốt của dược liệu này.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi “Chương trình KH&CN phục vụ phát triển bền vững vùng Tây Nam Bộ” thông qua đề tài mã số KHCN-TNB/14-19. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H.R. Chitme, R. Chandra, S. Kaushik (2005), “Evaluation of antipyretic activity of *Calotropis gigantea* (Asclepiadaceae) in experimental animals”, *Phytother. Res.*, **19**, pp.454-456.
- [2] M. Gupta, et al. (2003), “Evaluation of antipyretic potential of *Vernonia cinerea* extract in rats”, *Phytother. Res.*, **17**, pp.804-806.
- [3] S.G. Singh, K. Nishteswar, B.R. Patel, et al. (2016), “Comparative antipyretic and analgesic activities of *Cissampelos pareira* Linn. and *Cyclea peltata* (Lam.) Hook. F. & Thomas”, *AYU*, **37**(1), pp.62-66.
- [4] X.J. Yao, et al. (2012), “Puerarin exerts antipyretic effect on lipopolysaccharide-induced fever in rats involving inhibition of pyrogen production from macrophages”, *J. Ethnopharmacol.*, **141**(1), pp.322-323.
- [5] M. Iwata, H.T.T. Shimozato, E. Tsubura (1987), “Antipyretic activity of a human immunoglobulin preparation for intravenous use in an experimental model of fever in rabbits”, *Infect. Immun.*, **55**(3), pp.547-554.
- [6] V. Daniel (2016), “Anti-pyretic activity”, *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*, Springer, Cham.
- [7] T. Lhinhatrakool, S. Sutthivaiyakit (2006), “19-Nor- and 18,20-Epoxy-cardenolides from the Leaves of *Calotropis gigantea*”, *J. Nat. Prod.*, **69**, pp.1249-1251.
- [8] D.H.N. Khang, et al. (2017), “Phytochemical and cytotoxic studies on the leaves of *Calotropis gigantea*”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **27**, pp.2902-2906.
- [9] C. Seeka, S. Sutthivaiyakit (2010), “Cytotoxic cardenolides from the leaves of *Calotropis gigantea*”, *Chem. Pharm. Bull.*, **58**(5), pp.725-728.
- [10] Nguyễn Văn Tài và cs (2021), “Hợp chất flavonoid phân lập từ lá Bàng biển (*Calotropis gigantea*)”, *Tạp chí Dược học* (chấp nhận đăng).

Phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất từ phần trên mặt đất cây Cà đại hoa trắng (*Solanum torvum* Swartz.) ở Thừa Thiên - Huế

Nguyễn Phúc Khánh Nhi¹, Trần Phương Hà¹, Hoàng Lê Tuấn Anh², Đinh Thị Quý Thủy³,
Lã Bích Hương⁴, Võ Thị Mỹ Dung⁵, Nguyễn Hải Phong⁵, Lê Cảnh Việt Cường^{1*}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học miền Trung, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao công nghệ, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

³Trường THPT Huỳnh Thúc Kháng, IaGrai, Gia Lai

⁴Phòng Cảnh sát Môi trường, Công an TP Hải Phòng

⁵Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Ngày nhận bài 28/5/2021; ngày chuyển phản biện 14/6/2021; ngày nhận phản biện 21/7/2021; ngày chấp nhận đăng 28/7/2021

Tóm tắt:

Cây Cà đại hoa trắng (hay còn gọi là Cà hoang gai, Cà nông, Cà dũ) có tên khoa học là *Solanum torvum* Swartz. thuộc họ Cà (Solanaceae), phân bố rộng rãi ở Việt Nam. Theo y học cổ truyền Việt Nam, cây Cà đại hoa trắng được sử dụng để chữa đau bụng, ho, sốt, đau răng và ong đốt. Trong nghiên cứu này, từ phân đoạn nước của phần trên mặt đất cây Cà đại hoa trắng đã phân lập và xác định cấu trúc 3 hợp chất là paniculonin A (1), paniculonin B (2) và isorhamnetin-3-O-glucopyranoside (3). Trong đó, hợp chất 3 lần đầu tiên được phân lập từ cây Cà đại hoa trắng.

Từ khóa: isorhamnetin-3-O-glucopyranoside, paniculonin A, paniculonin B, *Solanum torvum*.

Chỉ số phân loại: 3.4

Mở đầu

Cà đại hoa trắng (*Solanum torvum* Swartz.) thuộc họ Cà (Solanaceae), phân bố phổ biến ở các quốc gia nhiệt đới. Tại Việt Nam, Cà đại hoa trắng được tìm thấy ở nhiều địa phương như: Sơn La, Lào Cai, Bắc Giang, Hà Nội, Thừa Thiên - Huế, Kon Tum, Đắk Lắk, Lâm Đồng và khu vực Nam Bộ. Theo y học cổ truyền Việt Nam, loài này thường dùng để chữa các bệnh thường gặp như đau bụng, ho, sốt, đau răng và ong đốt. Ở các quốc gia châu Á khác như Trung Quốc, Ấn Độ, Cà đại hoa trắng được sử dụng làm thuốc lợi tiểu, giảm đau, kích thích tiêu hóa [1]. Thành phần hóa học loài Cà đại hoa trắng chứa nhiều lớp chất có hoạt tính sinh học cao như flavonoid [2, 3], phenolic [4, 5], sesquiterpenoid [6], steroidal glycoalkaloid [7] và steroidal glycoside [3, 8-12]. Các nghiên cứu về tác dụng sinh học cho biết, dịch chiết và các hợp chất phân lập từ loài này có tác dụng kháng viêm [9], kháng vi rút [2], kháng vi sinh vật [13], chống oxy hóa [4, 14], chống tiểu đường [4, 15] và đặc biệt là khả năng gây độc nhiều dòng tế bào ung thư ở người [10, 11, 16]. Tuy nhiên, đến nay các nghiên cứu về loại dược liệu này (thành phần hóa học và hoạt tính sinh học) ở Việt Nam còn khá khiêm tốn, chưa tương xứng với tiềm năng ứng dụng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 3 hợp chất từ phân đoạn nước cây Cà đại hoa trắng thu được ở Thừa Thiên - Huế.

*Tác giả liên hệ: Email: lcvuong@misr.vast.vn

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Mẫu thực vật là phần trên mặt đất loài Cà đại hoa trắng thu tại xã Hương Nguyên, huyện A Lưới, tỉnh Thừa Thiên - Huế vào tháng 7/2019 và được TS Trần Thị Phương Anh (Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam) giám định. Mẫu (MISR2019-14) lưu giữ tại Viện Nghiên cứu Khoa học miền Trung thuộc Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam.

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

Hóa chất, dung môi dùng để chiết xuất, phân lập gồm *n*-hexane (Hàn Quốc), dichloromethane (Trung Quốc), ethyl acetate (Trung Quốc), acetone (Hàn Quốc), methanol (Malaysia) được nhập khẩu bởi Công ty Bình Trị - Thu Đạt (Long An) và nước cất đạt tiêu chuẩn thí nghiệm. Sử dụng sắc ký cột với các chất hấp phụ pha thường (silica gel 240-430 mesh, Hãng Merck), pha đảo C-18 (150 μ m, Fujisilica Chemical Ltd); sắc ký bản mỏng được tiến hành trên DC-Alufoilen 60 F₂₅₄, RP₁₈ F_{254s} (Hãng Merck); dùng đèn tử ngoại (bước sóng 254 và 365 nm) để phát hiện vết chất hoặc dùng thuốc thử là H₂SO₄ trong ethanol 10% được phun đều lên bản mỏng, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR (Bruker Corporation, Mỹ), phổ

Isolation and structure determination of some compounds from the aerial parts of *Solanum torvum* Swartz. collected in Thua Thien - Hue

Phuc Khanh Nhi Nguyen¹, Phuong Ha Tran¹,
Le Tuan Anh Hoang², Thi Quy Thuy Dinh³,
Bich Huong La⁴, Thi My Dung Vo⁵,
Hai Phong Nguyen⁵, Canh Viet Cuong Le^{1*}

¹Mien Trung Institute for Scientific Research, VAST

²Center for Research and Technology Transfer, VAST

³Huynh Thuc Khang High School, Ia Grai, Gia Lai province

⁴Haiphong Department of Environment, Haiphong's Police

⁵University of Sciences, Hue University

Received 28 May 2021; accepted 28 July 2021

Abstract:

Solanum torvum Swartz, belonging to the family Solanaceae, a herb known as “Ca dai hoa trang”, “Ca hoang gai”, “Ca nong”, or “Ca du” in Vietnam, is widely distributed in Vietnam. *Solanum torvum* has been used as folk medicine to treat various illnesses, such as stomachache, cough, fever, toothache, and bee stings. As a part of our research on genus *Solanum* in Vietnam, three natural compounds including paniculonin A (1), paniculonin B (2), and isorhamnetin-3-O-glucopyranoside (3) were isolated from the water layer of *Solanum torvum* collected in Thua Thien - Hue. This is the first time compound 3 was isolated from this species.

Keywords: isorhamnetin-3-O-glucopyranoside, paniculonin A, paniculonin B, *Solanum torvum*.

Classification number: 3.4

khối (ESI-MS): đo trên máy Agilent 1200 series LC-MS (Agilent Technologies, Mỹ) tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam.

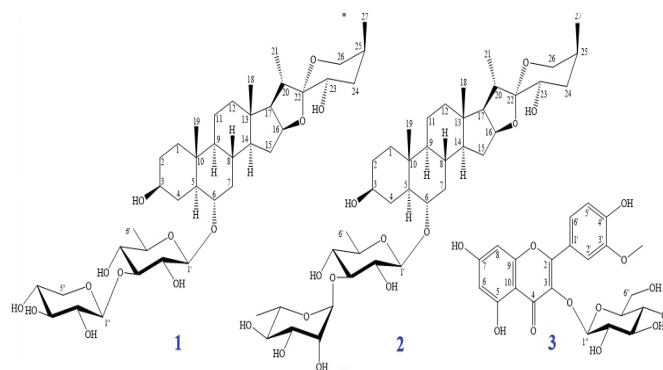
Kết quả và bàn luận

Thực nghiệm và kết quả

Phần trên mặt đất cây Cà đại hoa trắng được phơi khô dưới bóng râm, sau đó xay nhỏ đến kích thước 0,5-2 mm thu được phần bột (4,5 kg). Bột Cà đại hoa trắng được ngâm chiết với methanol ở nhiệt độ phòng trong 72 giờ (20 l x 3 lần). Dịch chiết được gộp lại và cô đặc bởi thiết bị cô quay chân không thu được cao chiết toàn phần (280 g). Cao toàn

phần tiếp tục được hòa tan trong 2 lít nước cất và đem chiết lần lượt với n-hexane, dichloromethane và ethyl acetate (có độ phân cực tăng dần). Sau đó thu được cặn n-hexane (STH, 55,1 g), cặn dichloromethane (STD, 67,7 g), cặn ethyl acetate (STE, 13,2 g) và lớp nước (STW, 64,0 g).

Lớp nước (STW) tiếp tục được đưa lên sắc ký cột Diaion-HP20, rửa bằng nước cất để loại đường, sau đó được phân tách với hệ dung môi tăng dần thể tích methanol trong nước (25, 50, 75 và 100%) thu được 4 phân đoạn (STW1-STW4). Phân đoạn STW4 (22,4 g) tiếp tục được phân tách thành 5 phân đoạn nhỏ hơn (STW4a-STW4e) trên sắc ký cột pha thường (Silica gel) kết hợp với rửa giải bằng hệ dung môi gradient có độ phân cực tăng dần là dichloromethane/methanol (20/1 → 1/1). Tiếp tục phân tách phân đoạn STW4c (2,4 g) bằng sắc ký cột sử dụng hạt silica gel pha đảo và hỗn hợp dung môi acetone/nước (1/1) làm chất rửa giải thu được 3 phân đoạn, STW4C1-STW4C3. Hợp chất 1 (4 mg) thu được khi tinh chế phân đoạn STW4C1 (155 mg) trên sắc ký cột pha thường với hệ dung môi dichloromethane/methanol/nước (7/1/0,05) làm pha động. Tiếp tục phân tách phân đoạn STW4A (3,2 g) trên cột sắc ký pha đảo sử dụng methanol/nước (2/1) làm pha động thu được 4 phân đoạn nhỏ hơn, STW4A1-STW4A4. Hợp chất 2 (5 mg) thu được khi phân tách phân đoạn STW4A4 (220 mg) bằng cột sắc ký pha thường sử dụng dichloromethane/methanol/nước (7/1/0,05) làm chất rửa giải. Cuối cùng, phân đoạn STW2 (2,3 g) được phân tách trên cột sắc ký pha đảo (methanol/nước, 1/1,2) thu được 3 phân đoạn nhỏ hơn (STW2A-STW2C). Tiếp tục phân tách phân đoạn STW2B (410 mg) trên sắc ký cột và dùng dichloromethane/methanol/nước (10/1/0,05) làm pha động thu được hợp chất 3 (8 mg) (hình 1).



Hình 1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập từ cây Cà đại hoa trắng.

Bàn luận

Hợp chất 1 phân tách được có dạng bột, màu trắng. Trên phổ ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) của hợp chất 1 xuất hiện những đặc trưng của 4 nhóm methyl, bao gồm 2 nhóm methyl singlet tại δ_H 0,88 (3H, s, H-18), 0,90 (3H, s, H-19) và 2 nhóm methyl doublet tại δ_H 0,98 (3H, d, J=7,0 Hz, H-21), 1,12 (3H, d, J=7,0 Hz, H-27). Bên cạnh đó, sự có mặt của 2 anomeric proton tại δ_H 4,34 (1H, d, J=8,0 Hz,

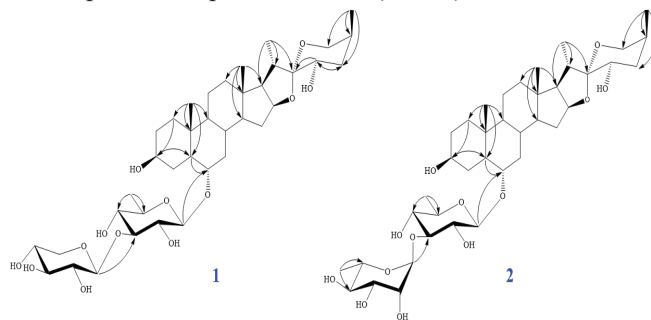
H-1'), 4,50 (1H, d, $J=7,5$ Hz, H-1'') gợi ý sự có mặt của 2 đơn vị đường β . Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) và HSQC của **1** quan sát thấy tín hiệu của 38 carbon bao gồm 27 tín hiệu carbon của phần aglycone và 11 tín hiệu carbon của hai đơn vị đường. Trong đó, 27 tín hiệu carbon của phần aglycone xác định sự có mặt của 4 nhóm methyl tại δ_{C} 17,0 (C-18), 13,8 (C-19), 14,3 (C-21) và 17,6 (C-27); 9 nhóm methylene tại δ_{C} 38,5 (C-1), 31,9 (C-2), 32,7 (C-4), 41,6 (C-7), 22,1 (C-11), 41,3 (C-12), 32,6 (C-15), 36,0 (C-24) và 65,0 (C-26); 11 nhóm methine tại δ_{C} 71,9 (C-3), 51,8 (C-5), 80,4 (C-6), 35,1 (C-8), 55,1 (C-9), 57,4 (C-14), 82,6 (C-16), 63,2 (C-17), 37,1 (C-20), 64,0 (C-23) và 31,3 (C-25); 3 carbon không liên kết với hydro tại δ_{C} 37,6 (C-10), 42,2 (C-13) và 112,7 (C-22). Các giá trị phổ thu được gợi ý hợp chất **1** là một spirostanol steroid. Các tín hiệu quan sát được trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC xác định phần đường của **1** có mặt trong 9 nhóm methine tại δ_{C} 104,8 (C-1'), 75,0 (C-2'), 87,8 (C-3'), 75,2 (C-4'), 72,7 (C-5'), 106,0 (C-1''), 75,2 (C-2''), 77,7 (C-3'') và 71,0 (C-4''); 1 nhóm methylene tại δ_{C} 67,1 (C-5'') và 1 nhóm methyl tại δ_{C} 18,2 (C-6'). Phân tích dữ liệu phổ NMR thu được kết hợp so sánh với nghiên cứu của Challal và cs (2014) [8] cho phép xác định phần đường của **1** là *O*- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-quinovopyranosyl, chuỗi disaccharide thường gặp ở các hợp chất steroid glycoside phân lập từ cây Cà đại hoa trắng [8, 9, 11].

Phân tích các tín hiệu trên phổ HMBC của hợp chất **1** cho thấy, các tương tác từ H-19 (δ_{H} 0,90) đến C-1 (δ_{C} 38,5)/C-5 (δ_{C} 51,8)/C-9 (δ_{C} 55,1)/C-10 (δ_{C} 37,6) và H-1 (δ_{H} 1,05, 1,73)/H-5 (δ_{H} 1,18) đến C-3 (δ_{C} 71,9) xác định sự có mặt của nhóm hydroxy tại C-3. Tương tự, các tương tác HMBC từ H-21 (δ_{H} 0,98) đến C-17 (δ_{C} 63,2)/C-20 (δ_{C} 37,1)/C-22 (δ_{C} 112,7), H-27 (δ_{H} 1,12) đến C-24 (δ_{C} 36,0)/C-25 (δ_{C} 31,3)/C-26 (δ_{C} 65,0) và H-23 (δ_{H} 3,70) đến C-22 (δ_{C} 112,7)/C-24 (δ_{C} 36,0) xác định sự có mặt của nhóm hydroxy tại C-23. Vị trí của phần đường gắn vào khung chất tại C-6 được xác định dựa vào các tương tác HMBC từ H-5 (δ_{H} 1,18) đến C-6 (δ_{C} 80,4), H-1'' (δ_{H} 4,50) đến C-3' (δ_{C} 87,8) và H-1' (δ_{H} 4,34) đến C-6 (δ_{C} 80,4) cùng với giá trị độ dịch chuyển hóa học của carbon C-6 (δ_{C} 80,4). Từ các phân tích trên kết hợp đối chiếu với nghiên cứu của Manases và cs (2004) [17] cho phép xác định hợp chất **1** là spirostanol disaccharide có tên là paniculonin A.

Hợp chất **2** phân lập được có dạng bột, màu trắng. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **2** xuất hiện những đặc trưng của 4 nhóm methyl đặc trưng của HC spirostane tại δ_{H} 0,88 (3H, s, H-18), 0,90 (3H, s, H-19), 0,98 (3H, d, $J=7,0$ Hz, H-21), 1,27 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H-6''). Ngoài ra, còn có sự xuất hiện 2 tín hiệu anomeric proton tại δ_{H} 4,29 (1H, d, $J=8,0$ Hz, H-1'), 5,16 (1H, d, $J=1,5$ Hz, H-1'') và tín hiệu của 2 nhóm methyl tại δ_{H} 1,30 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H-6'), 1,27 (3H, d, $J=6,5$ Hz, H-6''). Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) và HSQC của hợp chất **2**

xuất hiện tín hiệu của 27 carbon thuộc phần aglycone gồm 4 nhóm methyl tại δ_{C} 17,0 (C-18), 13,9 (C-19), 14,4 (C-21) và 17,6 (C-27); 9 nhóm methylene tại δ_{C} 38,5 (C-1), 31,8 (C-2), 32,7 (C-4), 41,7 (C-7), 22,1 (C-11), 41,3 (C-12), 32,5 (C-15), 35,9 (C-24) và 65,0 (C-26); 11 nhóm methine tại δ_{C} 71,8 (C-3), 51,7 (C-5), 80,5 (C-6), 35,0 (C-8), 55,1 (C-9), 57,4 (C-14), 82,6 (C-16), 63,1 (C-17), 37,0 (C-20), 63,9 (C-23) và 31,2 (C-25); 3 carbon không liên kết với hydro tại δ_{C} 37,6 (C-10), 42,0 (C-13), 112,6 (C-22). Và tín hiệu của 12 carbon thuộc 2 đơn vị đường tại δ_{C} 105,1 (C-1'), 76,3 (C-2'), 84,4 (C-3'), 75,7 (C-4'), 72,9 (C-5'), 18,4 (C-6'), 102,8 (C-1''), 72,2 (C-2''), 72,3 (C-3''), 73,9 (C-4''), 70,0 (C-5''), 17,9 (C-6'').

Dữ kiện phổ thu được của hợp chất **2** khá giống với hợp chất **1** ngoại trừ phần đường. Điều này cho phép dự đoán hợp chất **2** là spirostanol disaccharide. So sánh số liệu phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ thuộc phần đường của hợp chất **2** với số liệu phổ thuộc phần đường của torvoside J, torvoside K và torvoside L [8, 18, 19] cho phép xác định phần đường của hợp chất **2** là *O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-quinovopyranosyl. Bên cạnh đó, các tương tác HMBC từ H-1'' (δ_{H} 5,16) đến C-3' (δ_{C} 84,4) và H-1' (δ_{H} 4,29) đến C-6 (δ_{C} 80,5) xác định vị trí gắn kết của phần đường vào khung chất tại C-6. Các bằng chứng phổ trên kết hợp đối chiếu với số liệu được công bố ở nghiên cứu của Challal và cs (2014) [8], cho phép xác định hợp chất **2** là paniculonin B (hình 2).



Hình 2. Các tương tác HMBC chính của hợp chất **1** và **2**.

Hợp chất **3** phân lập được có dạng bột, màu vàng. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) của hợp chất **3** xuất hiện đặc trưng của 5 aromatic proton thuộc 2 hệ tương spin AX và ABX tại δ_{H} 6,41 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-6), 6,22 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-8), 7,94 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-2'), 6,93 (1H, d, $J=8,0$ Hz, H-5'), 7,61 (1H, dd, $J=2,0, 8,0$ Hz, H-6'); tín hiệu của 1 anomeric proton tại δ_{H} 5,41 (1H, d, $J=7,5$ Hz, H-1'') và 1 nhóm methoxy tại δ_{H} 3,96 (3H, s). Trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) của hợp chất **3** cho thấy tín hiệu của 22 carbon, bao gồm 15 tín hiệu carbon thuộc phần aglycone flavone tại δ_{C} 158,5 (C-2), 135,4 (C-3), 179,4 (C-4), 163,1 (C-5), 99,9 (C-6), 166,0 (C-7), 94,7 (C-8), 158,7 (C-9), 105,8 (C-10), 123,1 (C-1'), 114,4 (C-2'), 150,9 (C-3'), 148,4 (C-4'), 116,0 (C-5'), 123,8 (C-6'); 6 tín hiệu carbon đặc trưng của phần đường glucopyranosyl tại δ_{C} 103,7 (C-1''), 75,9 (C-2''), 78,5 (C-3''), 71,5 (C-4''), 78,1 (C-5''), 62,6 (C-

6") và 1 nhóm methoxy tại δ_c 56,8. Từ các dữ liệu phổ trên kết hợp đối chiếu với nghiên cứu của Beck và Häberlein (1999) [20] cho phép xác định hợp chất **3** là isorhamnetin-3-*O*-glucopyranoside. Hợp chất này được thông báo đã phân lập được từ một số loài thuộc chi *Solanum* như *S. incanum*, *S. rostratum*, *S. americanum* và *S. stramonifolium* [21-24]. Đây là lần đầu tiên, isorhamnetin-3-*O*-glucopyranoside được phân lập từ loài Cà dại hoa trắng (*S. torvum*).

KẾT LUẬN

Từ phân đoạn nước của phần trên mặt đất cây Cà dại hoa trắng đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 3 hợp chất gồm paniculonin A (**1**), paniculonin B (**2**) và isorhamnetin-3-*O*-glucopyranoside (**3**). Trong đó, hợp chất isorhamnetin-3-*O*-glucopyranoside lần đầu tiên được phân lập từ cây Cà dại hoa trắng. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của các hợp chất phân lập được sẽ được công bố trong thời gian tới.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển KH&CN Quốc gia (NAFOSTED) thông qua đề tài mã số 104.01.2018.321. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Võ Văn Chi (2012), *Từ điển Cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, tr.282-283.
- [2] D. Arthan, et al. (2002), "Antiviral isoflavonoid sulfate and steroidal glycosides from the fruits of *Solanum torvum*", *Phytochemistry*, **59**(4), pp.459-463.
- [3] Y.Y. Lu, J.G. Luo, L.Y. Kong (2011a), "Chemical constituents from *Solanum torvum*", *Chinese Journal of Natural Medicines*, **9**(1), pp.30-32.
- [4] G.R. Gandhi, S. Ignacimuthu, M.G. Paulraj (2011), "*Solanum torvum* Swartz. fruit containing phenolic compounds shows antidiabetic and antioxidant effects in streptozotocin induced diabetic rats", *Food and Chemical Toxicology*, **49**(11), pp.2725-2733.
- [5] A. Simaratanamongkol, et al. (2014), "Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of *Solanum torvum* and isolation of a novel methyl salicylate glycoside", *Journal of Functional Foods*, **11**, pp.557-562.
- [6] P.L. Yuan, et al. (2016), "Sesquiterpenes with immunosuppressive effect from the stems of *Solanum torvum*", *Phytochemistry Letters*, **17**, pp.126-130.
- [7] S.W. Smith, et al. (2008), "Solanaceous steroidal glycoalkaloids and poisoning by *Solanum torvum*, the normally edible susumber berry", *Toxicon*, **52**(6), pp.667-676.
- [8] S. Challal, et al. (2014), "Zebrafish bioassay-guided microfractionation identifies anticonvulsant steroid glycosides from the Philippine medicinal plant *Solanum torvum*", *ACS Chemical Neuroscience*, **5**(10), pp.993-1004.
- [9] C.L. Lee, et al. (2013), "Anti-neutrophilic inflammatory steroidal glycosides from *Solanum torvum*", *Phytochemistry*, **95**, pp.315-321.
- [10] J. Li, et al. (2014), "Five new cytotoxic steroidal glycosides from the fruits of *Solanum torvum*", *Fitoterapia*, **93**, pp.209-215.
- [11] Y. Lu, et al. (2009), "Four new steroidal glycosides from *Solanum torvum* and their cytotoxic activities", *Steroids*, **74**(1), pp.95-101.
- [12] S. Yahara, et al. (1996), "Steroidal glycosides from *Solanum torvum*", *Phytochemistry*, **43**(5), pp.1069-1074.
- [13] K.F. Chah, K.N. Muko, S.I. Oboegbulem (2000), "Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit", *Fitoterapia*, **71**(2), pp.187-189.
- [14] A. Thenmozhi, M. Rao Us (2012), "Comparative free radical scavenging potentials of different parts of *Solanum torvum*", *Free Radicals and Antioxidants*, **2**(2), pp.24-29.
- [15] R. Suthangkornkul, et al. (2016), "A *Solanum torvum* GH3 β -glucosidase expressed in *Pichia pastoris* catalyzes the hydrolysis of furostanol glycoside", *Phytochemistry*, **127**, pp.4-11.
- [16] C. Balachandran, et al. (2015), "In vitro anticancer activity of methyl caffeate isolated from *Solanum torvum* Swartz. fruit", *Chemico-Biological Interactions*, **242**, pp.81-90.
- [17] G. Manases, et al. (2004), "Antimycotic spirostanol saponins from *solanum hispidum* leaves and their structure - Activity relationships", *J. Nat. Prod.*, **67**, pp.938-941.
- [18] Y. Lu, J. Luo, L. Kong (2011b), "Steroidal alkaloid saponins and steroidal saponins from *Solanum surattense*", *Phytochemistry*, **72**(7), pp.668-673.
- [19] Y. Iida, et al. (2005), "Three unusual 22-beta-O-23-hydroxy-(5 alpha)-spirostanol glycosides from the fruits of *Solanum torvum*", *Chem. Pharm. Bull.*, **53**(9), pp.1122-1125.
- [20] M.A. Beck, H. Häberlein (1999), "Flavonol glycosides from *Eschscholtzia californica*", *Phytochemistry*, **50**(2), pp.329-332.
- [21] T. Omar, et al. (2018), "Phytochemical constituents and antioxidant effect of *Solanum rostratum* species from Algeria", *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, **11**(6), pp.219-223.
- [22] J.M. Vagula, et al. (2018), "Analysis of *Solanum americanum* Mill. by ultrafast liquid chromatography with diode array and time-of-flight mass spectrometry detection with evaluation of anti-inflammatory properties in rodent models", *Analytical Letters*, **51**(13), pp.1973-1985.
- [23] B. Svobodova, et al. (2017), "Non-edible parts of *Solanum stramonifolium* Jacq. - a new potent source of bioactive extracts rich in phenolic compounds for functional foods", *Food & Function*, **8**(5), pp.2013-2021.
- [24] Y.L. Lin, et al. (2000), "Nonsteroidal constituents from *Solanum incanum* L.", *Journal of the Chinese Chemical Society*, **47**(1), pp.247-251.

Ảnh hưởng của vật liệu bao gói đến chất lượng của nấm sò (*Pleurotus sajjo caju*) trong quá trình bảo quản

Trần Thu Hà^{1*}, Trịnh Thị Mỹ Ngọc², Nguyễn Duy Trinh¹, Nguyễn Văn Giang³

¹Viện Di truyền Nông nghiệp

²Trường Đại học Nha Trang

³Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 20/9/2021; ngày chuyển phản biện 24/9/2021; ngày nhận phản biện 25/10/2021; ngày chấp nhận đăng 29/10/2021

Tóm tắt:

Mục đích của nghiên cứu là lựa chọn được vật liệu bao gói tối ưu nhằm hạn chế tối đa quá trình biến đổi sinh lý, sinh hóa sau thu hoạch gây nên sự suy giảm chất lượng của nấm sò (*Pleurotus sajjo caju*) trong quá trình bảo quản. Nghiên cứu tiến hành khảo sát 6 loại bao gói, gồm hộp nhựa PET; hộp nhựa PET lót giấy kraft; hộp nhựa PET lót giấy kraft và bọc túi GreenMAP; khay xếp bọc túi GreenMAP; khay xếp lót giấy kraft, bọc túi GreenMAP và túi giấy kraft. Kết quả cho thấy, hộp nhựa PET có lót giấy kraft và bọc túi GreenMAP là phù hợp để bảo quản nấm sò. Sau 10 ngày bảo quản ở 4°C, nấm sò có tỷ lệ hao hụt khối lượng ($5,78 \pm 0,28\%$), giảm hàm lượng protein hòa tan ($65,49 \pm 1,28\%$) và vitamin C thấp nhất ($27,87 \pm 0,28$ mg/100 g); quả thể nấm sau khi bảo quản đã duy trì màu sắc, mùi vị và cấu trúc tốt hơn so với các công thức thí nghiệm khác.

Từ khóa: bảo quản, hộp nhựa PET, khay xếp, nấm sò, *Pleurotus* spp., túi giấy kraft.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Nấm sò *Pleurotus* spp. là một trong số các chi nấm được khai thác và sử dụng phổ biến nhất trên thế giới (chiếm khoảng 19% tổng sản lượng nấm toàn cầu) [1]. Các nước châu Á, đặc biệt là Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Thái Lan, Việt Nam và Ấn Độ là những quốc gia sản xuất và tiêu thụ nấm sò chính, sản lượng tiêu thụ hàng năm chiếm khoảng 99% tổng sản lượng nấm của thế giới, riêng Trung Quốc chiếm khoảng 87%. Theo Ramya và cs (2017) [2], quả thể nấm *Pleurotus* spp. có chứa 25-30% protein, 2,5% chất béo, 17-44% đường, 7-38% mycellose và 8-12% chất khoáng (kali, photpho, canxi, natri). Nhiều loài nấm thuộc chi *Pleurotus* spp. còn có tầm quan trọng về mặt y học rất cao, quả thể của chúng chứa nhiều hợp chất có hoạt tính kháng vi khuẩn, virus, chống ung thư, chống viêm và ổn định huyết áp [1, 3]. Hợp chất β -glucan trong dịch chiết của nấm *Pleurotus* spp. có tác dụng tăng cường sự phân giải lipid và có giá trị trong việc hỗ trợ điều trị bệnh béo phì [4].

Nấm là một sản phẩm rất dễ hỏng do hàm lượng nước trong quả thể cao (>90%), cấu trúc quả thể mỏng, cùng với hàm lượng protein cao nên thời gian bảo quản không quá 24 giờ ở 25-30°C [1]. Theo Palacios và cs (2011) [5], nấm tươi rất dễ bị hỏng và nhanh chóng mất đi đặc tính cảm quan sau khi thu hoạch, vì vậy chúng phải được xử lý và đóng gói

đúng cách để tăng thời gian bảo quản. Tốc độ hô hấp cao làm giảm nồng độ khí O₂ và nâng cao nồng độ CO₂. Sự mất cân bằng ở thể khí được tạo ra trong quá trình bảo quản là nguyên nhân kích hoạt một số quá trình sinh hóa (phản ứng thủy phân, hóa nâu và sự phát triển của vi sinh vật) góp phần làm hư hỏng nấm [5]. Sử dụng vật liệu bao gói phù hợp sẽ giúp kéo dài thời gian lưu trữ và hạn chế sự giảm chất lượng sản phẩm nấm [6, 7]. Bao gói MAP đã được sử dụng rộng rãi để bảo quản nấm tươi. MAP có thể giúp tránh một phần quá trình hóa nâu, lên men và các quá trình sinh hóa của enzyme bằng cách kiểm soát và tạo ra một trạng thái cân bằng thể khí xung quanh sản phẩm nấm [5].

Ở Việt Nam, nghiên cứu về vật liệu bao gói trong bảo quản nấm vẫn còn rất hạn chế, đặc biệt là việc sử dụng đồng thời nhiều loại vật liệu bao bì nhằm ức chế quá trình sinh lý, sinh hóa, kéo dài thời gian bảo quản nấm hầu như chưa có. Bên cạnh đó, quá trình sản xuất nấm đã chuyển dần từ thủ công sang quy mô công nghiệp, sản lượng có thể đạt hàng chục tấn nấm tươi/ngày, nếu không có phương pháp bảo quản phù hợp sẽ ảnh hưởng lớn đến chất lượng và thu nhập của người trồng nấm. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành với mục đích khảo sát ảnh hưởng của một số loại vật liệu bao gói đến cấu trúc, trạng thái, màu sắc, chất lượng của quả thể nấm sò *P. sajjo caju* sau thu hoạch, từ đó lựa chọn loại bao bì phù hợp nhất phục vụ bảo quản.

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

Effect of packaging materials on the quality of oyster mushrooms (*Pleurotus sajjo caju*) during storage

Thu Ha Tran^{1*}, Thi My Ngoc Trinh²,
Duy Trinh Nguyen¹, Van Giang Nguyen³

¹Agricultural Genetics Institute

²Nha Trang University

³Vietnam National University of Agriculture

Received 20 September 2021; accepted 29 October 2021

Abstract:

The study aims to investigate the optimal packaging material to maximise the restriction of physiological and biochemical changes which reduce oyster mushroom (*Pleurotus sajjo caju*) quality during the storage after harvesting. There are six packaging techniques tested, including PET box, PET box with kraft paper, PET box with kraft covered by GreenMAP bag, soft tray covered GreenMAP bag, soft tray with kraft paper in GreenMAP bag, and kraft paper. The result shows that the PET box with kraft paper in the GreenMAP bag is the most suitable for the storage of oyster mushrooms. After 10 days under 4°C, the lowest weight reduction can be seen with only 5.78%, soluble protein declines 65.49%, and decrease of vitamin C with 27.87 mg/100 g. In addition, the fruit body can maintain the colour, structure, and taste better than those packed with other materials.

Keywords: kraft paper, oyster mushroom, PET box, *Pleurotus* spp., soft tray, storage.

Classification number: 4.1

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu

- Nấm sò *P. sajjo caju* được trồng trên cơ chất 89% mùn cưa, 10% cám gạo, 1% bột CaCO₃ tại Trung tâm Ứng dụng và Chuyển giao công nghệ Phú Yên (tỉnh Phú Yên). Sau 45 ngày cấy giống, quả thể nấm sò đầu tiên được thu hái, đựng trong các khay nhựa, sau đó vận chuyển về phòng thí nghiệm, cắt gốc, phân loại, đóng gói và bảo quản (hình 1). Nấm sò được phân loại theo kích thước với đường kính mũ nấm 3-4 cm, loại bỏ những cây nấm bị bệnh, kích thước mũ

nấm quá lớn hoặc quá nhỏ. Quá trình từ khi thu hoạch đến đóng gói, bảo quản nấm sò không quá 24 giờ.



Hình 1. Quả thể nấm sò *P. sajjo caju* mới thu hoạch.

- Hộp nhựa PET H04 được sản xuất bởi Công ty TNHH Hunufa Việt Nam, có kích thước 18x12x4 cm, độ dày 0,2 mm, phần nắp hộp đục 6 lỗ Ø2 mm.

- Bao bì GreenMAP làm từ nhựa LDPE có kích thước 27x47 cm do Viện Hóa học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam nghiên cứu và Công ty Cổ phần Sao Nam phân phối.

- Túi giấy kraft màu nâu, kích thước 10,5x20x5 cm, độ dày 35 gms được sản xuất và phân phối bởi Công ty TNHH Sản xuất Thương mại Xuất nhập khẩu Đức Nam.

- Khay xếp trắng, kích thước 19,5x11x2 cm được sản xuất và phân phối bởi Công ty Bao bì Thực phẩm Lan Hùng.

Bố trí thí nghiệm

Quả thể nấm sò *P. sajjo caju* được đóng gói theo các công thức thí nghiệm như sau: đóng gói trong hộp nhựa PET; đóng gói trong hộp nhựa PET lót giấy kraft; đóng gói trong hộp nhựa PET lót giấy kraft và sau đó bọc túi GreenMAP; đóng gói trong khay xếp và sau đó bọc túi GreenMAP; đóng gói trong khay xếp lót giấy kraft và sau đó bọc túi GreenMAP; đóng gói trong túi giấy kraft (hình 2). Mỗi mẫu thí nghiệm có khối lượng 100 g nấm sò tươi và bảo quản trong tủ bảo ôn ở nhiệt độ 4±1°C. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại và việc đánh giá chất lượng nấm sò *P. sajjo caju* được tiến hành tại các thời điểm 2, 4, 6, 8 và 10 ngày sau bảo quản [8].

Xác định tỷ lệ hao hụt khối lượng

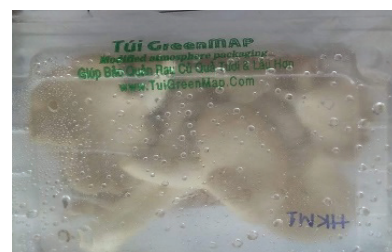
Tỷ lệ hao hụt khối lượng của nấm sò trong quá trình bảo quản được tính bằng % giữa khối lượng nấm sò tươi trước



Hộp nhựa PET



Hộp nhựa PET-kraft



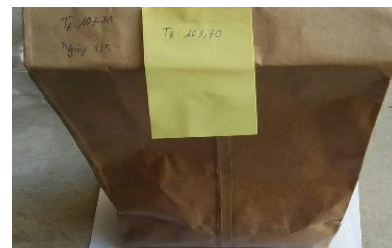
Hộp nhựa PET-kraft-GreenMAP



Khay xốp-GreenMAP



Khay xốp-kraft-GreenMAP



Túi giấy kraft

Hình 2. Bao gói quả thể nấm sò *P. sajio caju*.

khí bảo quản và khối lượng của nấm sò tại các thời điểm phân tích [9].

$$X = \frac{(M_1 - M_2)}{M_1} \times 100$$

trong đó: X: hao hụt khối lượng tự nhiên ở mỗi thời điểm phân tích (%); M_1 : khối lượng nấm sò tươi trước khi bảo quản (g); M_2 : khối lượng nấm sò ở các thời điểm phân tích (bao gồm cả quả thể thối hỏng) (g).

Đánh giá chất lượng cảm quan

Chất lượng cảm quan của nấm sò được đánh giá theo TCVN 3215-79 với thang điểm 6 bậc (từ 0 đến 5) và điểm cao nhất cho mỗi chỉ tiêu là 5 điểm. Điểm cảm quan sẽ là tổng điểm riêng lẻ của các chỉ tiêu. Hệ số quan trọng cho chỉ tiêu màu sắc, trạng thái, mùi, vị lần lượt là 0,8, 0,8, 1,2 và 1,2.

Xác định hàm lượng protein hòa tan:

Hàm lượng protein hòa tan được xác định bằng phương pháp Biuret theo Kelleher và Hultin (1991) [10].

Xác định hàm lượng vitamin C:

Hàm lượng vitamin C trong mẫu nấm sò tươi được xác định theo TCVN 4715:1989.

Xác định cường độ nâu hóa:

Cường độ nâu hóa của nấm sò tươi sau khi bảo quản được xác định theo phương pháp của Ranganna (1986) [11]. Giá trị nâu hóa được đo bằng máy quang phổ UV (Cary100) tại bước sóng 440 nm của dịch chiết 1,0 g nấm sò tươi

trong 15 ml ethanol 60% (OD_{440}).

Xử lý số liệu

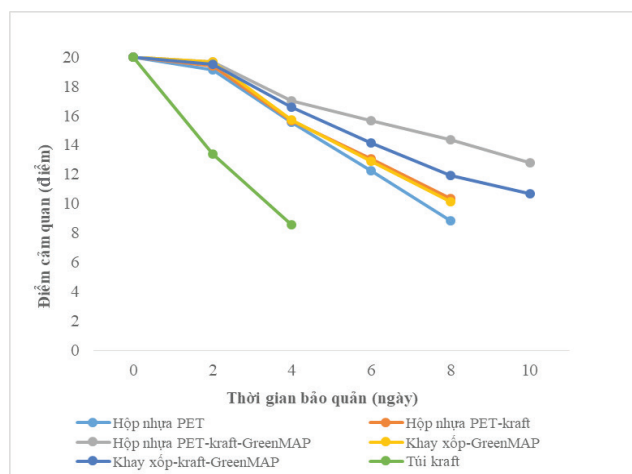
Kết quả nghiên cứu được phân tích phương sai ANOVA và kiểm định Duncan (Duncan's Multiple-Comparison Test) trên phần mềm Statgraphics V15.1.02 với mức ý nghĩa $p < 0,05$ [12].

Kết quả và bàn luận

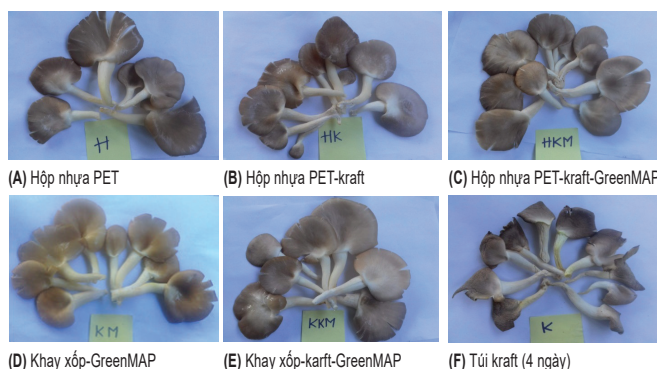
Sự biến đổi chất lượng cảm quan của nấm sò

Theo thời gian bảo quản, chất lượng cảm quan của nấm sò có xu hướng giảm dần so với chất lượng nấm sò tại thời điểm thu hái (hình 3) và có sự sai khác giữa các phương pháp bao gói ($p < 0,05$). Mẫu nấm được bảo quản bằng túi giấy kraft bị khô nhão, có màu vàng úa, mùi khai nồng (hình 4F), điểm đánh giá chỉ đạt 8,56. Mẫu nấm đóng gói trong hộp nhựa PET lót giấy kraft và bọc túi GreenMAP có mức độ suy giảm chất lượng ít và chậm hơn so với các vật liệu bao bì còn lại, điểm cảm quan đạt 12,77, sau 10 ngày bảo quản, quả thể nấm giữ được độ tươi, chắc (hình 4C). Hộp nhựa PET có đục lỗ Ø2 mm và giấy kraft vừa có tác dụng bảo vệ quả thể nấm khỏi những tác động cơ học từ bên ngoài, vừa thấm hút và giảm sự ngưng tụ hơi nước trong môi trường bảo quản. Đồng thời, khả năng thấm khí có chọn lọc của túi GreenMAP đã tạo ra môi trường khí quyển thích hợp nhất về nồng độ O_2 , CO_2 xung quanh sản phẩm nấm, giảm cường độ hô hấp, ức chế sự tạo thành ethylene và tăng trưởng của vi sinh vật, từ đó giảm quá trình suy thoái, giúp tăng thời gian lưu trữ nấm [13]. Do khả năng

giữ ẩm của khay xốp kém hơn hộp nhựa PET nên các mẫu nấm sò được bao gói trong khay xốp lót giấy kraft và bọc túi GreenMAP hoặc khay xốp bọc túi GreenMAP có điểm cảm quan thấp hơn so với bao bì hộp nhựa PET lót giấy kraft và bọc túi GreenMAP [14] (hình 4D và 4E). Hơn nữa, một số nghiên cứu *in vivo* và *in vitro* đã chỉ ra rằng, các hạt nano polystyrene từ các vật liệu nhựa polystyrene có thể xâm nhập vào cơ thể sinh vật qua đường hô hấp, tiêu hóa hoặc tiếp xúc qua da. Vì vậy, các loại bao bì có nguồn gốc từ polystyrene (khay xốp) không được khuyến khích sử dụng trong bảo quản thực phẩm [15].



Hình 3. Sự thay đổi chất lượng cảm quan của nấm sò trong quá trình bảo quản.

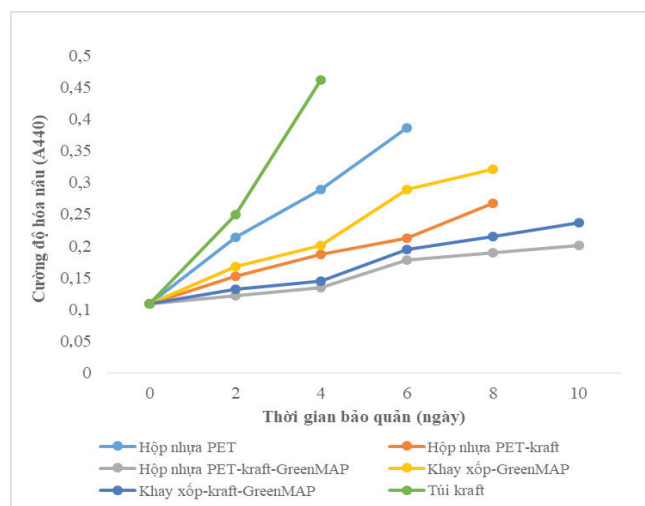


Hình 4. Hình thái nấm sò sau 8 ngày bảo quản ở nhiệt độ $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Cường độ nâu hóa của nấm sò

Cường độ nâu hóa của các mẫu nấm sò đều tăng theo thời gian bảo quản và có sự sai khác với mức ý nghĩa ($p < 0,05$) giữa các loại bao bì dùng trong nghiên cứu (hình 5). Mẫu nấm sò bảo quản trong hộp nhựa PET lót giấy kraft và bọc túi GreenMAP có tốc độ nâu hóa chậm nhất, giá trị OD_{440} tại ngày bảo quản thứ 10 là $0,201 \pm 0,03$. Mẫu nấm sò bảo quản trong khay xốp lót giấy kraft và bọc túi GreenMAP có

cường độ biến nâu thấp thứ 2, giá trị OD_{440} đạt $0,236 \pm 0,02$. Tốc độ nâu hóa của nấm sò bảo quản trong túi giấy kraft diễn ra mạnh nhất, giá trị OD_{440} tại ngày bảo quản thứ 4 là $0,461 \pm 0,021$. Các loại bao bì khác như khay xốp bọc túi GreenMAP, hộp nhựa PET và hộp nhựa PET bọc túi GreenMAP được ghi nhận là vật liệu bao gói không phù hợp với bảo quản nấm sò. Nấm sò bao gói trong các loại vật liệu này có cường độ nâu hóa nhanh, lần lượt là $0,289 \pm 0,032$, $0,386 \pm 0,02$ và $0,212 \pm 0,011 \text{ OD}_{440}$ sau 6 ngày bảo quản.



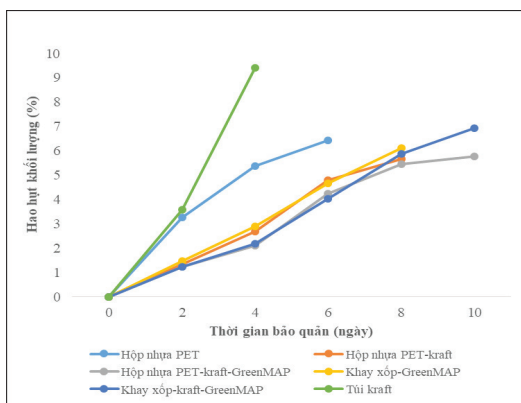
Hình 5. Cường độ biến nâu của nấm sò trong quá trình bảo quản.

Màu sắc là dấu hiệu để đánh giá chất lượng thương mại của sản phẩm nấm [16]. Nâu hóa là nguyên nhân quan trọng làm suy giảm chất lượng của nấm sau khi thu hoạch [17] và diễn ra trong suốt quá trình bảo quản [18]. Sắc tố nâu xuất hiện khi oxy phản ứng với enzyme tyrosinase trong nấm [19] hoặc do quá trình oxy hóa các hợp chất phenolic bởi enzyme polyphenol oxidase góp phần vào hiệu ứng hóa nâu [20]. Sự nâu hóa của nấm sò diễn ra rõ nhất sau 7 ngày bảo quản [21] và có sự sai khác đáng kể về trị số nâu hóa giữa các loại vật liệu bao gói [22]. Các hệ thống bao gói khác nhau sẽ tạo ra độ thấm và thành phần không khí khác nhau bên trong bao bì [22]. Giấy kraft trong nghiên cứu này đã làm giảm sự ngưng tụ hơi nước, túi GreenMAP điều chỉnh các thành phần không khí bên trong bao bì, giảm nồng độ oxy, hạn chế hô hấp và ngăn chặn các phản ứng oxy hóa. Ngoài ra, điều kiện bảo quản ở nhiệt độ thấp (4°C) cũng góp phần ức chế hoạt động của enzyme polyphenol oxidase, dẫn đến giảm tốc độ hóa nâu của nấm sò. Do đó, nấm sò được bảo quản trong túi kraft và bọc bao bì GreenMAP có tốc độ nâu hoá chậm hơn so với các loại bao bì khác trong thí nghiệm. Nhiều công trình nghiên cứu đã công bố kết quả tương tự với kết quả của thí nghiệm này. Nghiên cứu của Villaescusa và Gil (2003) [21] đã nhận định, MAP là kỹ thuật bao gói phù hợp nhất đối với nấm *Pleurotus* spp..

Theo Jafri và cs (2013) [23], nấm sò *P. florida* được bảo quản bằng bao gói MAP có trị số nâu hóa thấp hơn đáng kể so với các loại bao bì khác.

Tỷ lệ hao hụt khối lượng của nấm sò

Một trong những nguyên nhân chính của sự suy giảm chất lượng là nấm bị hao hụt khối lượng [24] và mức độ hao hụt này tăng theo thời gian bảo quản [25]. Kết quả thí nghiệm cho thấy, sau 4 ngày bảo quản trong túi giấy kraft khối lượng nấm sò giảm $9,42 \pm 0,41\%$ và $5 \pm 0,32\%$ khi bảo quản trong hộp nhựa PET. Các mẫu nấm được bao gói bằng bao bì GreenMAP có tốc độ hao hụt khối lượng chậm hơn. Tỷ lệ hao hụt khối lượng của nấm sò được bảo quản bằng hộp nhựa PET lót giấy kraft và bọc túi GreenMAP; khay xốp lót giấy kraft và bọc túi GreenMAP thấp nhất, lần lượt là $5,78 \pm 0,28$ và $6,92 \pm 0,37\%$ sau 10 ngày bảo quản (hình 6). Như vậy, túi kraft và hộp nhựa PET kết hợp với công nghệ bao gói MAP (túi GreenMAP từ vật liệu LDPE) có vai trò ngăn chặn sự bay hơi nước của sản phẩm, đồng thời khả năng điều tiết thành phần không khí bên trong vật liệu bao gói một cách thích hợp của bao bì GreenMAP đã giảm tối đa cường độ hô hấp của nấm, hạn chế sụt giảm khối lượng nấm bảo quản. Kết quả tương tự được Lee và cs (2003) [26] ghi nhận khi sử dụng bao bì MAP để bảo quản nấm. Theo các tác giả này, chất lượng nấm sò được bảo quản trong bao bì MAP sản xuất từ nhựa LDPE 0,05 mm vượt trội hơn so với các loại vật liệu đóng gói khác về suy giảm khối lượng, độ cứng và khác biệt về màu sắc.

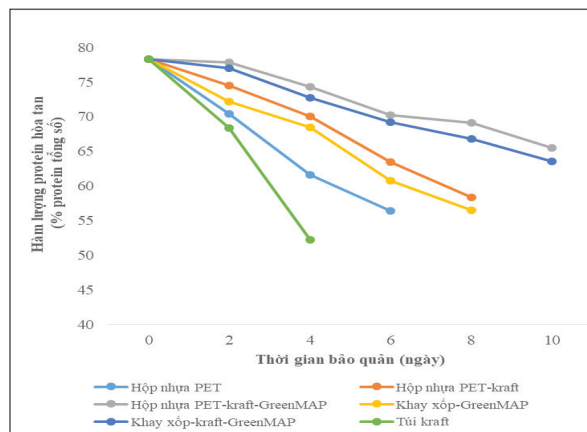


Hình 6. Sự hao hụt khối lượng của nấm sò trong quá trình bảo quản.

Sự biến đổi hàm lượng protein hòa tan

Hàm lượng protein hòa tan ban đầu của nấm sò *P. sajjo caju* là 78,34% và giảm dần theo thời gian bảo quản. Mẫu nấm sò được bao gói trong hộp nhựa PET lót giấy kraft và bọc bao bì GreenMAP có mức độ sụt giảm hàm lượng protein hoà tan ít nhất, từ 78,34 xuống còn $65,49 \pm 1,28\%$ sau 10 ngày bảo quản. Ngược lại, mẫu nấm sò được bao gói bằng túi giấy kraft có mức độ sụt giảm hàm lượng protein

hòa tan cao nhất, từ 78,34 xuống còn $52,21 \pm 1,41\%$ sau 4 ngày bảo quản. Hàm lượng protein hoà tan của các mẫu nấm sò được bảo quản trong hộp nhựa PET lót giấy kraft, khay xốp bọc bao bì GreenMAP, khay xốp lót giấy kraft và bọc bao bì GreenMAP sau 8 ngày lần lượt là $58,38 \pm 1,42$, $56,48 \pm 1,11$ và $66,83 \pm 1,11\%$ (hình 7).

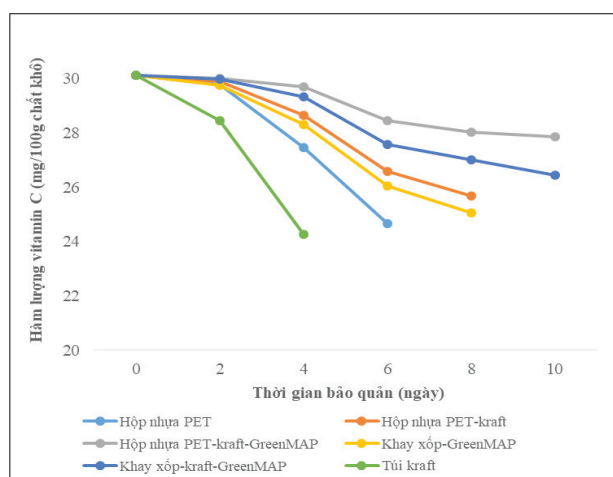


Hình 7. Sự thay đổi hàm lượng protein của nấm sò trong quá trình bảo quản.

Protein là thành phần dinh dưỡng quan trọng của quả thể nấm, gồm đầy đủ các acid amin thiết yếu như isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan và valine [27]. Theo Gliguem và Aragon (2005) [28], hàm lượng protein tổng số của sản phẩm ít bị ảnh hưởng trong quá trình bảo quản. Tuy nhiên, Arumuganathan và cs (2012) [29] đã báo cáo rằng, các protein đã bị phân hủy và biến tính do sự gia tăng hoạt động của enzyme protease trong quá trình bảo quản. Tác giả nhận thấy, hàm lượng protein của nấm mỡ *Agaricus bisporus* đã giảm từ 3,46 xuống 2,4% sau 8 ngày bảo quản. Việc mất hoạt tính sinh học của protein và một số acid amin thiết yếu (đặc biệt là lysine và tryptophan) cũng đã được Lecle're và cs (2002) [30], Puscasu và Aragon (2002) [31] ghi nhận và giải thích bằng phản ứng Maillard có nguồn gốc từ vitamin C. Ramdas (2012) [6] quan sát thấy, hàm lượng protein của nấm sò *Pleurotus* spp. trong quá trình bảo quản có xu hướng giảm nhẹ (từ 26,96 xuống còn 25,7% tại ngày bảo quản thứ 24). Đồng thời, tác giả này cũng khẳng định, vật liệu bao gói có ảnh hưởng đáng kể ($p < 0,01$) đến hàm lượng protein của nấm sò trong chu kỳ bảo quản. Sử dụng hộp nhựa PET kết hợp với lót giấy bạc và lá chuối có thể kéo dài thời gian bảo quản nấm sò *Pleurotus* spp. lên 16 ngày, hàm lượng protein của sản phẩm đạt 25,83% [6]. Vì vậy, bao gói nấm sò bằng hộp nhựa PET lót giấy kraft và bọc bao bì GreenMAP là vật liệu thích hợp nhất để hạn chế tối đa mức hao hụt protein hòa tan của nấm sò nhờ khả năng tạo ra môi trường không khí thích hợp, giúp kìm hãm hoạt động của các enzyme protease.

Sự biến đổi của hàm lượng vitamin C

Hàm lượng vitamin C trong mẫu nấm sò tươi nghiên cứu không cao, đạt 30,12 mg/100 g chất khô. Kết quả hình 8 cho thấy, hàm lượng vitamin C của nấm sò *P. sajjo caju* bị sụt giảm trong quá trình bảo quản và có sự sai khác giữa các loại vật liệu bao gói ($p < 0,05$). Hàm lượng vitamin C của mẫu nấm sò bao gói trong túi giấy kraft giảm nhiều nhất, còn $24,26 \pm 0,41$ mg/100 g nấm khô sau 4 ngày bảo quản (giảm 5,86 mg/100 g chất khô). Mẫu nấm được đóng gói trong hộp nhựa PET hoặc khay xếp lót giấy kraft và bọc túi GreenMAP có tốc độ giảm hàm lượng vitamin C chậm nhất, sau 10 ngày bảo quản, hàm lượng vitamin C lần lượt là $27,87 \pm 0,28$ mg/100g và $26,45 \pm 0,37$ mg/100g nấm khô, giảm 2,25 và 3,67 mg/100 g chất khô.



Hình 8. Sự biến đổi hàm lượng vitamin C của nấm sò trong quá trình bảo quản.

Vitamin C là thành phần dinh dưỡng kém ổn định và nhạy cảm với quá trình oxy hóa, đồng thời sự sụt giảm vitamin C tương quan thuận với mất nước qua quá trình thoát hơi nước của rau, quả [32-34]. Arumuganathan và cs (2012) [29] đã khẳng định, trong quá trình bảo quản acid ascorbic sẽ bị oxy hóa thành acid dehydroascorbic bởi nhiều chất oxy hóa, đặc biệt là acid ascorbic oxidase. Ngoài ra, hợp chất quinon - một sản phẩm của quá trình oxy hóa phenol bằng enzym phenol oxidase cũng được xem là nguyên nhân làm giảm hàm lượng vitamin C ở nấm [35]. Nhiều nghiên cứu trên nấm kim châm *Flammulina velutipes* và nấm sò *Pleurotus* spp. đã cho thấy, hàm lượng vitamin C giảm khi tăng thời gian bảo quản trong tất cả loại vật liệu bao gói [5, 36]. Như vậy, khả năng giảm sự mất nước của nấm thông qua hạn chế quá trình thoát hơi nước và giảm cường độ hô hấp nhờ điều chỉnh nồng độ khí CO₂ và O₂ phù hợp là nguyên nhân khiến nấm sò được bao gói trong hộp nhựa PET lót giấy kraft và bọc túi GreenMAP giảm được sự thất thoát vitamin C trong quá trình bảo quản. Sự sụt giảm hàm lượng vitamin C của nấm sò thấp nhất (0,94 mg/100 g nấm khô) đã được Ramya

và cs (2017) [2] quan sát thấy khi sử dụng bao bì LDPE-A, cao nhất (1,49 mg/100 g) khi sử dụng bao bì HDPE-R. Li và Zhang (2013) [37] báo cáo có sự sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$) về hàm lượng vitamin C của nấm mỡ *Agaricus bisporus* giữa 6 loại vật liệu bao gói. Nấm mỡ bảo quản bằng bao bì MAP gắn màng silicon có lỗ thở 1,2 cm² mức độ sụt giảm hàm lượng vitamin C cao nhất 40,7%. Ngược lại, bao bì MAP gắn màng silicon có lỗ thở là 0,8 cm² đã tối ưu được bầu không khí để bảo quản nấm và giữ nấm mỡ *Agaricus bisporus* với chất lượng tốt nhất, mức giảm nồng độ vitamin C chậm nhất (19,2%), thời gian lưu trữ dài nhất (15 ngày).

Kết luận

Quả thể nấm sò được bao gói bằng hộp nhựa PET lót giấy kraft và bao bì GreenMAP làm từ vật liệu LDPE có chất lượng tốt nhất, sau 10 ngày bảo quản ở 4°C hao hụt $5,78 \pm 0,28\%$ khối lượng, hàm lượng protein hòa tan đạt $65,49 \pm 1,28\%$ protein tổng số, hàm lượng vitamin C đạt $27,87 \pm 0,28$ mg/100 g nấm khô, cấu trúc và màu sắc quả thể nấm ít biến đổi, trị số biến màu là $0,201 \pm 0,03$ và điểm đánh giá chất lượng cảm quan đạt 12,77 điểm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D.J. Royse, J. Baars, Q. Tan (2017), "Current overview of mushroom production in the world", *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications*, pp.5-13.
- [2] H.G. Ramya, S. Kumar, V. Tomer (2017), "Influence of packaging material, storage condition and duration on quality attributes of osmo-cum-microwave dehydrated mushroom flakes", *Journal of Applied and Natural Science*, **8**, pp.2311-2318.
- [3] N.G. Cimerman (1999), "Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P.Karst. (Agaricales s.l., Basidiomycetes)", *International Journal of Medicinal Mushroom*, **1**(1), pp.69-80.
- [4] J. Czapski (2001), "The effect of methyl jasmonate and ethyl alcohol vapours on storage of mushrooms", *Vegetable Crops Research Bulletin*, **54**, pp.219-222.
- [5] I. Palacios, et al. (2011), "Use of modified atmosphere packaging to preserve mushroom quality during storage", *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture*, **3**(3), pp.196-203.
- [6] A.A. Ramdas (2012), *Packaging and Storage of Oyster Mushroom (Pleurotus spp.)*, University of Agricultural Sciences, 155p.
- [7] H.G. Ramya, K. Satish (2017), "Storage studies on osmo-microwave dehydrated oyster mushroom flakes; impact of storage condition, interval and packaging material", *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, **5**(2), pp.479-490.
- [8] M.J. Nur Sakinah, et al. (2020), "Evaluation of storage temperature, packaging system and storage duration on postharvest quality of straw mushroom (*Volvariella volvacea*)", *Food Research*, **4**(3), pp.679-689.

- [9] H.F. Lyn, et al. (2020), "Application of modified atmosphere and active packaging for oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*)", *Food Packaging and Shelf Life*, **23**, DOI: 10.1016/j.fpsl.2019.100451.
- [10] S.D. Kelleher, H.O. Hultin (1991), "Lithium chloride as a preferred extractant of fish protein", *Journal of Food Science*, **56**, pp.315-317.
- [11] S. Ranganna (1986), *Hand Book of Analysis and Quality Control for Fruit and Vegetable Products*, Tata McGraw Hill Pub. Co. Ltd.
- [12] Hà Thị Cẩm Giang, Nguyễn Văn Minh, Nguyễn Duy Trinh, Lê Thanh Uyên, Hoàng Ngọc Đình, Đỗ Thị Hạnh, Trần Thu Hà (2020), "Ảnh hưởng nhiệt độ sấy đến chất lượng của nấm bào ngư (*Pleurotus sajor caju*) sử dụng công nghệ sấy lạnh kết hợp bức xạ hồng ngoại", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, **6**, tr.41-47.
- [13] J.N. Farber, et al. (2003), "Microbiological safety of controlled and modified atmosphere packaging of fresh-cut produce", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2**, pp.142-160.
- [14] Nguyễn Minh Thủy, Nguyễn Phú Cường, Nguyễn Thị Mỹ Tuyền, Mông Thị Hưng (2012), "Ảnh hưởng của nhiệt độ và bao bì đến khả năng tồn trữ trái chôm chôm nhân (nghịch vụ) ở huyện Chợ Lách, tỉnh Bến Tre", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, **22B**, tr.311-321.
- [15] K. Kik, B. Bukowska, P. Sicińska (2020), "Polystyrene nanoparticles: sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms", *Environmental Pollution*, **262**, DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114297.
- [16] R. Ahvenainen (1996), "New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruits and vegetables", *Trends in Food Science & Technology*, **7**, pp.179-187.
- [17] G. Ares, et al. (2006), "Sensory shelf life of shiitake mushrooms stored under passive modified atmosphere", *Postharvest Biology and Technology*, **41(2)**, pp.191-197.
- [18] C. Parentelli, et al. (2007), "Sensory and microbiological quality of shitake mushrooms in odified atmosphere packages", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**, pp.1645-1652.
- [19] A. Kumari, P. Baskaran (2015), "An overview on mushroom technology: cultivation, harvesting, post-harvest management and marketing", *Recent Trends in Post Harvest Technology and Management*, pp.68-82.
- [20] M. Alikhani-Koupaei, et al. (2014), "Enhancing stability of essential oils by microencapsulation for preservation of button mushroom during postharvest", *Food Science and Nutrition*, **2(5)**, pp.526-533.
- [21] R. Villaescusa, M. Gil (2003), "Quality improvement of *Pleurotus* mushrooms by modified atmosphere packaging and moisture absorbers", *Postharvest Biology and Technology*, **28(1)**, pp.160-179.
- [22] N. Sakinah, et al. (2020), "Evaluation of storage temperature, packaging system and storage duration on postharvest quality of straw mushroom (*Volvariella volvacea*)", *Food Research*, **4(3)**, pp.679-689.
- [23] M. Jafri, et al. (2013), "Quality retention of oyster mushrooms (*Pleurotus florida*) by a combination of chemical treatments and modified atmosphere packaging", *Postharvest Biology and Technology*, **76**, pp.112-118.
- [24] R. Gholami, E. Ahmadi, S. Farris (2017), "Shelf life extension of white mushrooms (*Agaricus bisporus*) by low temperatures conditioning, modified atmosphere, and nanocomposite packaging material", *Food Packaging and Shelf Life*, **14**, pp.88-95.
- [25] F. Tao, et al. (2006), "Effects of different storage conditions on chemical and physical properties of white mushrooms after vacuum cooling", *Journal of Food Engineering*, **77(3)**, pp.545-549.
- [26] H.D. Lee, et al. (2003), "Estimated gas concentration of MA (modified atmosphere) and changes of quality characteristics during the MA storage on the oyster mushrooms", *Korean Journal of Food Preservation*, **10**, pp.16-22.
- [27] S.T. Chang, et al. (1981), "The cultivation and nutritional value of *Pleurotus sajor caju*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **12**, pp.58-62.
- [28] H. Gliguem, I. Birlouez Aragon (2005), "Effects of sterilization, packaging, and storage on vitamin C degradation, protein denaturation, and glycation in fortified milks", *Journal of Dairy Science*, **88**, pp.891-899.
- [29] T. Arumuganathan, et al. (2012), "Studies on modified atmosphere storage of button mushroom using diffusion channel system", *Mushroom Research*, **21(1)**, pp.55-65.
- [30] J. Lecle're, et al. (2002), "Fortification of milk with iron-ascorbate promotes lysine glycation and tryptophan oxidation", *Food Chemistry*, **76**, pp.491-499.
- [31] C. Puscasu, I. Birlouez Aragon (2002), "Intermediary and/or advanced maillard product exhibit a prooxidant activity on Trp: in vitro study on α -lactalbumin", *Food Chemistry*, **78**, pp.399-406.
- [32] M.W. Davey, et al. (2000), "Plant L-ascorbic acid chemmstry function, netabolism bioavalability and effects of processing", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, pp.825-860.
- [33] A.A. Franke, et al. (2004), "Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawau", *Journal of Food Composition and Analysis*, **17**, pp.1-35.
- [34] P.H. Heinze (1973), "Effects of storage, transportation, and marketing conditions on the composition and nutritional values of fresh fruit and vegetables", *U.S.D.A. Eastern Regional Research Laboratory Publications*, **3786**, pp.29-34.
- [35] R.D. Rai, S. Saxena (1988), "Effect of storage temperature on vitamin C content of mushroom (*Agaricus bisporus*)", *Current Science*, **57**, pp.434-435.
- [36] F. Donglu, et al. (2016), "Effect of nanocomposite-based packaging on storage stability of mushrooms (*Flammulina velutipes*)", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **33**, pp.489-497.
- [37] T. Li, M. Zhang (2013), "The physiological and quality change of mushroom agaricus bisporus stored in modified atmosphere packaging with various sizes of silicone gum film window", *Food Science and Technology Research*, **19(4)**, pp.569-576.

Tính đối kháng thực vật và định lượng một số chất đối kháng trong cây cỏ đậu (*Arachis pinto*)

Phan Khánh Linh, Phòng Ngọc Hải Triều, Nguyễn Lê Vân, Hồ Lệ Thi*

Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long

Ngày nhận bài 5/7/2021; ngày chuyển phản biện 9/7/2021; ngày nhận phản biện 11/8/2021; ngày chấp nhận đăng 16/8/2021

Tóm tắt:

Cỏ đậu (*Arachis pinto*) - loài cây họ đậu có khả năng cải tạo đất và làm thức ăn gia súc được sử dụng làm đối tượng nghiên cứu về tính đối kháng thực vật đã được biết với sự nảy mầm và phát triển của hạt cỏ hôi (*Ageratum conyzoides* L.), tai hùm (*Comnyza canadensis*), hoa xuyên chi (*Bidens pilosa* L.), cà chua (*Solanum lycopersicum*) và tiêu (*Capsicum annum*) thông qua dịch chiết methanol (MeOH) từ các bộ phận khác nhau của cỏ đậu trên cải bẹ xanh (*Brassica juncea*), cỏ lồng vực nước (*Echinochloa crusgalli*) và lồng vực cạn (*Echinola colonum*). Đánh giá sự phát triển thân và rễ của 3 loài này sau 48 giờ ủ với dịch chiết cho thấy, dịch chiết MeOH từ thân cỏ đậu ức chế 100% sự phát triển của cải bẹ xanh; 77,7% lên thân và 93,5% lên rễ cỏ lồng vực nước; 57,2% lên thân và 92,7% lên rễ cỏ lồng vực cạn ở nồng độ 1,0 g/ml, cao hơn so với dịch chiết của các bộ phận khác. Khả năng đối kháng thực vật qua quá trình chiết lỏng - lỏng của pha ethyl acetate cao hơn so với pha nước. Dịch chiết từ cột C18 được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC) thu được 6 hợp chất phenolic có hàm lượng trong 1 g trọng lượng tươi của cỏ đậu là các axit cinamic 0,214 µg, caffeic 0,8344 µg, coumaric 7,7676 µg, ferullic 2,2354 µg, salicylic 32,1162 µg và 2-4 dimehydroxy benzoic 0,045 µg. Những kết quả này góp phần vào việc nghiên cứu các loại thuốc diệt cỏ tự nhiên tiềm năng mới.

Từ khóa: cỏ đậu, cỏ lồng vực cạn, cỏ lồng vực nước, đối kháng thực vật, phenolic acids.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Cỏ đậu (còn gọi là cỏ đậu phộng, hoàng lạc thảo) thuộc họ Đậu (*Fabaceae*) có nguồn gốc từ Nam Mỹ, với khoảng 70-80 loài được tìm thấy ở Braxin, Bolivia, Paraguay, Argentina và Uruguay, là cây thân thảo lâu năm, chiều cao 20-40 cm, rễ phát triển trung bình đến độ sâu 30 cm [1]. Với khả năng chịu hạn và úng tốt, cỏ đậu có thể trồng được quanh năm ở Việt Nam nhưng tốt nhất là vào mùa xuân và mùa thu với các tỉnh miền Bắc, mùa mưa với các tỉnh miền Trung, Tây Nguyên và miền Nam. Khi trồng xen dưới tán cây ăn quả, cỏ đậu có khả năng sinh trưởng tốt, không cạnh tranh ánh sáng với cây trồng chính, tạo độ che phủ cao, hạn chế quá trình xói mòn vào mùa mưa, duy trì độ ẩm đồng ruộng vào mùa khô. Cỏ đậu có thể trồng thuần (dạng đồng cỏ) hay trồng xen với các loại cỏ khác hoặc trong vườn cây ăn quả trên nhiều loại đất (từ đất xấu bạc màu, nghèo dinh dưỡng, đất đồi núi dốc đến đất cát, đất chua mặn ven biển) vừa giúp cải tạo đất (có khả năng cố định 200-300 kg N/ha/năm hoặc với lượng chất xanh có thể cung cấp cho đất mỗi năm 595 kg N/ha, 140 kg P₂O₅/ha và 200 kg K₂O/ha), vừa làm phân xanh và thức ăn cho gia súc.

Một số nghiên cứu trên thế giới còn cho thấy, trồng cỏ đậu xen kẽ với cây cà phê giúp cung cấp đạm cho cây và giảm lượng N₂O thải ra từ đất so với đất phủ cỏ thông

thường [2]; trồng xen cỏ đậu vào đồng cỏ giúp giải phóng 50% N và P tồn dư trong đất trong 130 ngày vào mùa khô và 20 ngày vào mùa mưa, tạo điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật hòa tan P trong đất phát triển, phục hồi đồng cỏ bị suy thoái [3]. Tuy nhiên, cây cỏ đậu lại gây ảnh hưởng không tốt đến năng suất của chuối, cụ thể là trên đất trồng chuối có cỏ đậu, ở độ sâu 30 cm, nồng độ một số nguyên tố trong đất tăng lên (cacbon hữu cơ 5,6%, tổng nitơ 8,5%, kali trao đổi 52%, canxi 26%...) dẫn đến làm giảm 9% số nải chuối và 4% số trái trên nải, từ đó làm sụt giảm năng suất và làm tăng giá thành sản phẩm [4].

Tiềm năng đối kháng thực vật trên cây cỏ đậu đã được nghiên cứu đối với sự nảy mầm và phát triển của hạt cà chua và tiêu [1] trên một số cỏ họ cúc (*Asteraceae*) như cỏ hôi, cỏ tai hùm và hoa xuyên chi. Kết quả cho thấy, dịch chiết từ lá cỏ đậu kìm hãm sự nảy mầm, phát triển của hạt cỏ hôi và cỏ tai hùm, trong khi dịch chiết từ rễ lại không có tác động [5].

Mặc dù cỏ đậu được coi là cây có tính đối kháng thực vật cao nhưng với một số loài cỏ phổ biến trong ruộng lúa, các công trình nghiên cứu ở Việt Nam gần như chưa có. Xuất phát từ thực tiễn nêu trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm đánh giá và làm rõ hơn khả năng đối kháng thực vật của dịch chiết từng bộ phận cây cỏ đậu lên một loài cây mầm cảm là cải bẹ xanh và 2 loài cỏ dại phổ biến trên ruộng

*Tác giả liên hệ: Email: thihl.clrri@mard.gov.vn

Allelopathy and allelochemical quantitative analysis in Pinto peanut (*Arachis pintoi*)

Khanh Linh Phan, Ngoc Hai Trieu Phong,
Le Van Nguyen, Le Thi Ho*

Cuu Long Delta Rice Research Institute

Received 5 July 2021; accepted 16 August 2021

Abstract:

Pinto peanut (*Arachis pintoi*) considered as a perennial legume animal fed plant with good soil fertility improvement was used for its allelopathy that had been reported on the germination of *Ageratum conyzoides* L., *Comnyza canadensis* L. Cronq., *Bidens pilosa* L., *Solanum lycopersicum* and *Capsicum annum*. through the solutions extracted from different parts of pinto peanut on mustard greens (*Brassica juncea*), barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) and junglerice (*Echinochloa colonum*). Consideration of the growth of hypocotyls and rootlets at 48 hours after incubation with pinto peanut extracts, results showed that 1.0 g/ml of the methanolic pinto peanut stem extract greatly inhibited 100% mustard greens growth, 77.7% and 93.5% the hypocotyls and rootlets growth of barnyardgrass, 57.2% and 92.7% the hypocotyls and rootlets growth of junglerice, respectively. The allelopathic activity after liquid-liquid extraction of the ethyl acetate phase greater than the aqueous phase. Allelopathic extract loading from C18 chromatographic column was purified by HPLC to obtain 6 phenolic compounds with the contents in 1 g fresh pinto peanut weight were 0.214 µg (cinamic acid), 0.8344 µg (caffeic acid), 7.7676 µg (coumaric acid), 2.2354 µg (ferullic acid), 0.045 µg (2-4 dimehydroxy benzoic) and 32.1162 µg (salicylic acid). These results should be accordingly considered in the production of biological herbicides.

Keywords: allelopathy, *Arachis pintoi*, *Echinochloa colonum*, *Echinochloa crusgalli*, phenolic acids.

Classification number: 4.1

lúa (cỏ lồng vực nước và lồng vực cạn) làm tiền đề cho việc tạo chế phẩm sinh học trừ cỏ phục vụ cho hệ thống canh tác lúa bền vững trong tương lai, góp phần bảo vệ môi trường.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Cây cỏ đậu: thu thập từ khu vực ruộng thí nghiệm của Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long.

Cây thử nghiệm: hạt cỏ lồng vực nước, lồng vực cạn được thu từ ruộng thí nghiệm của Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long. Hạt cải bẹ xanh mua từ cửa hàng (Công ty TNHH - Thương mại Trang Nông, TP Hồ Chí Minh).

Hóa chất thí nghiệm: MeOH, Ethyl acetate (EtOAC), Hexane (H)... và một số chất hóa học thông thường trong phòng thí nghiệm.

Dụng cụ: đĩa petri đường kính 30 mm, giấy lọc Whatman (Vietchem Ltd. Hà Nội, Việt Nam), máy đo pH (SI Analytics lab 875), máy thu hồi dung môi dưới áp suất thấp (Rotary Evaporator RE-2000), bộ dụng cụ tách chiết, bộ sắc ký lỏng...

Phương pháp nghiên cứu [6]

Tách chất đối kháng thực vật từ từng bộ phận cây cỏ đậu bằng dịch chiết MeOH: thu mẫu cây cỏ đậu (rễ/thân rễ, thân, lá) rửa sạch, cân 100 g trọng lượng tươi mỗi bộ phận, sau đó đem tách chiết bằng 1000 ml MeOH 60% trong 48 giờ, lọc lấy dịch chiết bằng phễu Buncher sử 320 ml Fisherbrand™ và giấy lọc Whatman™. Bã được chiết tiếp tục với 500 ml MeOH 100% trong 48 giờ tiếp theo và lọc lần 2. Hỗn hợp dịch chiết thu được đem bay hơi hết MeOH ở 42°C bằng thiết bị cô quay (Evaporator). Trữ dịch chiết ở 4°C đến khi sử dụng.

Các thí nghiệm đánh giá tính đối kháng của dịch chiết với hạt đã nảy mầm của 3 loài cây thử nghiệm được tiến hành trên các đĩa petri đặt trong phòng với 6 nghiệm thức, 3 lần lặp bao gồm đối chứng không chứa dịch chiết và 5 nồng độ dịch chiết (0,03, 0,1, 0,3, 0,5 và 1,0 g/ml tính theo khối lượng mẫu tươi), theo dõi chiều dài thân và rễ cây thử nghiệm sau 48 giờ ủ trong tối ở 25°C.

Số liệu được xử lý và phân tích thống kê bằng phần mềm Excel và SPSS.

Tách chất đối kháng thực vật từ bộ phận cây cỏ đậu cho hiệu quả đối kháng thực vật cao nhất bằng phương pháp tách lỏng - lỏng với EtOAC: dịch chiết MeOH từ bộ phận cây cỏ đậu cho hiệu quả đối kháng thực vật cao nhất sẽ được tách chiết với EtOAC với tỷ lệ 1:2. Sau khi tách chiết 3 lần thu được 2 pha chiết chứa chất đối kháng là pha H₂O và pha EtOAC. Hai pha chiết này sẽ được tiến hành thử nghiệm sinh học lên hai loài cỏ dại với 5 nồng độ dịch chiết là 0,03, 0,1, 0,3, 0,5 và 1,0 g/ml cùng với đối chứng không chứa chất đối kháng.

Làm tinh khiết chất đối kháng thực vật bằng phương pháp HPLC: dịch chiết từ phân đoạn tách lỏng - lỏng sẽ được phân cắt bằng phương pháp chiết pha rắn qua các cột sắc ký Silica gel, Sephadex và C18. Dịch chiết từ cột C18 sẽ được đưa vào hệ thống HPLC để phân tích.

Hệ thống HPLC sử dụng được tiến hành trên hệ thống Shimadzu LC-2030C và được trang bị hệ thống -10A VP kết hợp với phần mềm CLASS-VP (Shimadzu Co., Ltd) đầu dò PDA; cột VertiSep™ GES C18 HPLC Column (250x4,6 mm, 5,0 µm). Hệ dung môi rửa giải bao gồm MeOH (A) và H₂O + 0,1% Formic axit (B) với chương trình gradient 25% A trong 3 phút, 25-40% A trong 5 phút, giữ 40% A trong 5 phút, 40-60% A đến phút thứ 16, 60% A trong 5 phút, 60-80% A trong 3 phút, 80% A trong 3 phút, sau đó hạ về 25% A đến phút thứ 35. Hệ phân tích rửa giải với tốc độ dòng là 0,8 ml/phút, với dây sóng UV quét từ 200 đến 400 nm.

Kết quả và bàn luận

Hiệu quả đối kháng thực vật của dịch chiết MeOH từ từng bộ phận cây cỏ đậu lên cải bẹ xanh và 2 loài cỏ dại

Đối với cải bẹ xanh: dịch MeOH tách chiết từ từng bộ phận cây cỏ đậu với các mức nồng độ khác nhau đều có tác động đến sự phát triển của cải bẹ xanh thể hiện số đo chiều dài thân và rễ ở các nghiệm thức đều khác biệt có ý nghĩa ở mức 5% so với đối chứng (bảng 1), trong đó hiệu quả ức chế bắt đầu xảy ra ở nồng độ 0,1 g/ml và đạt hiệu quả cao nhất (100% thân và rễ cải không phát triển) ở nồng độ 1,0 g/ml.

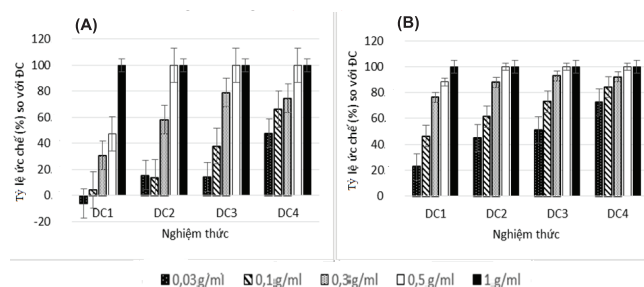
Bảng 1. Sự phát triển (mm) của cải bẹ xanh dưới ảnh hưởng của dịch chiết MeOH từ cây cỏ đậu.

Nồng độ (g/ml)	DC1	DC2	DC3	DC4
ĐC (0,0)	18,54 ^a			
0,03	19,67 ^a	15,56 ^b	15,93 ^a	9,68 ^b
0,1	17,74 ^b	15,89 ^b	11,52 ^b	6,28 ^c
0,3	12,81 ^c	7,74 ^c	3,82 ^c	4,70 ^d
0,5	9,76 ^d	0 ^d	0 ^d	0 ^e
1,0	0 ^e	0 ^d	0 ^d	0 ^e
ĐC (0,0)	35,42 ^a			
0,03	27,41 ^a	19,54 ^b	17,19 ^b	9,76 ^b
0,1	19,02 ^b	13,64 ^c	9,71 ^c	5,59 ^c
0,3	8,39 ^c	4,22 ^d	2,22 ^d	2,79 ^d
0,5	4,19 ^d	0 ^e	0 ^d	0 ^e
1,0	0 ^e	0 ^e	0 ^d	0 ^e

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chữ cái đi kèm khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Kết quả so sánh Duncan^{0,05} dịch chiết x nồng độ; ĐC: đối chứng; DC1: dịch chiết 1 - cả cây; DC2: dịch chiết 2 - rễ/thân rễ; DC3: dịch chiết 3 - thân; DC4: dịch chiết 4 - lá.

So sánh hiệu quả ức chế của 4 loại dịch chiết lên thân và rễ cải bẹ xanh cho thấy, hiệu quả ức chế của DC1 thấp hơn so với dịch chiết từ từng bộ phận riêng lẻ. Ở nồng độ 0,03 g/ml, DC1 có tác động kích thích lên thân cải bẹ xanh, chiều dài thân trung bình cao hơn 6,1% so với đối chứng. Bên cạnh đó, ở nồng độ 0,5 g/ml, DC1 có hiệu quả ức chế

lên thân cải bẹ xanh đạt 47,3% và lên rễ đạt 88,2%, thấp hơn cả 3 loại dịch chiết còn lại. DC2, DC3 và DC4 đều cho hiệu quả ức chế lên đến 100% đối với cả thân và rễ cải bẹ xanh ở nồng độ 0,5 g/ml (hình 1).



Hình 1. Ảnh hưởng của dịch chiết MeOH từ cây cỏ đậu lên sự phát triển của thân (A) và rễ (B) cải bẹ xanh.

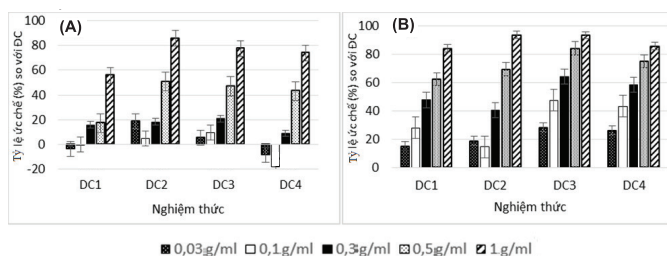
Đối với cỏ lồng vực nước: kết quả bảng 2 cho thấy, chiều dài trung bình của thân cỏ khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng ở nghiệm thức 0,5 g/ml của tất cả các dịch chiết. Rễ cỏ lồng vực nước nhạy cảm hơn so với thân, chiều dài trung bình của rễ khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng ngay từ nghiệm thức 0,03 g/ml ở tất cả các dịch chiết.

Bảng 2. Sự phát triển (mm) của cỏ lồng vực nước dưới ảnh hưởng của dịch chiết MeOH từ cây cỏ đậu.

Nồng độ (g/ml)	DC1	DC2	DC3	DC4
ĐC (0,0)	23,70 ^a			
0,03	24,56 ^a	19,25 ^b	22,4 ^a	25,68 ^{ab}
0,1	23,71 ^a	22,59 ^a	21,43 ^{ab}	27,93 ^{ab}
0,3	19,93 ^b	19,35 ^b	18,79 ^b	21,56 ^{abc}
0,5	19,59 ^b	11,68 ^c	12,71 ^c	13,49 ^d
1,0	10,42 ^c	3,29 ^d	5,18 ^d	6,20 ^e
ĐC (0,0)	26,6 ^a			
0,03	22,55 ^b	21,58 ^b	19,1 ^b	19,63 ^b
0,1	19,18 ^c	22,8 ^b	14,07 ^c	15,11 ^c
0,3	13,96 ^d	15,78 ^c	9,62 ^d	11,03 ^d
0,5	9,98 ^e	8,28 ^d	4,29 ^e	6,7 ^e
1,0	4,25 ^f	1,27 ^e	0,97 ^f	3,5 ^f

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chữ cái đi kèm khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Kết quả so sánh Duncan^{0,05} dịch chiết x nồng độ; ĐC: đối chứng; DC1: dịch chiết 1 - cả cây; DC2: dịch chiết 2 - rễ/thân rễ; DC3: dịch chiết 3 - thân; DC4: dịch chiết 4 - lá.

Sự phát triển của thân và rễ cỏ lồng vực nước đều bị ảnh hưởng bởi 4 loại dịch chiết từ cây cỏ đậu. DC1 và DC4 có tác động kích thích đối với thân cỏ ở nồng độ thấp và gây ức chế ở các nồng độ cao hơn. Rễ cỏ lồng vực nước nhạy cảm hơn so với thân, bị ức chế ở cả 4 loại dịch chiết ngay từ nồng độ thấp nhất là 0,03 g/ml. Trong đó, DC3 gây ức chế lên cả thân và rễ cỏ ở nồng độ thấp nhất, tỷ lệ ức chế tăng tỷ lệ thuận với nồng độ dịch chiết và đạt cao nhất ở nồng độ 1,0 g/ml (78,7% đối với thân và 93,7% đối với rễ cỏ) (hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng của dịch chiết MeOH từ cây cỏ đậu lên sự phát triển của thân (A) và rễ (B) cỏ lồng vực nước.

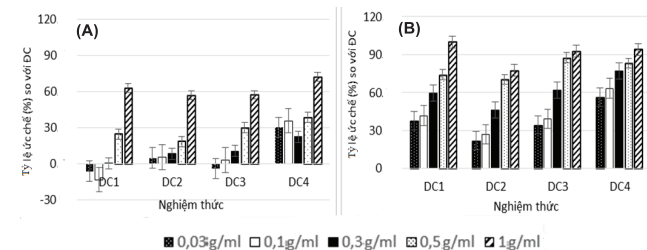
Đối với cỏ lồng vực cạn: dưới ảnh hưởng của 4 loại dịch chiết, rễ cỏ lồng vực cạn nhạy cảm hơn so với thân. Chiều dài trung bình thân cỏ khác biệt so với đối chứng ở nồng độ 0,5 g/ml đối với nghiệm thức DC1, DC3 và DC4, trong khi chiều dài rễ khác biệt từ nồng độ thấp nhất là 0,03 g/ml ở cả bốn loại dịch chiết (bảng 3).

Bảng 3. Sự phát triển (mm) của cỏ lồng vực cạn dưới ảnh hưởng của dịch chiết MeOH từ cây cỏ đậu.

Nồng độ (g/ml)	ĐC	DC1	DC2	DC3	DC4
ĐC (0,0)	17,38 ^a				
0,03	18,61 ^a	16,54 ^a	17,99 ^a	12,06 ^b	
0,1	19,67 ^a	16,27 ^a	16,86 ^{ab}	11,09 ^b	
0,3	17,38 ^a	15,97 ^a	16,04 ^{ab}	13,49 ^{ab}	
0,5	13,01 ^b	14,10 ^a	11,60 ^b	10,72 ^b	
1,0	5,99 ^c	7,57 ^b	5,32 ^c	2,14 ^c	
ĐC (0,0)	23,17 ^a				
0,03	14,67 ^b	17,85 ^b	15,24 ^b	10,08 ^b	
0,1	13,52 ^b	16,96 ^b	14,50 ^b	8,35 ^b	
0,3	9,72 ^c	12,46 ^c	8,86 ^c	5,31 ^c	
0,5	6,13 ^d	7,04 ^d	1,45 ^d	4,28 ^c	
1,0	0 ^e	5,19 ^d	1,36 ^d	1,37 ^d	

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chữ cái đi kèm khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Kết quả so sánh Duncan^{0,05} dịch chiết x nồng độ; ĐC: đối chứng; DC1: dịch chiết 1 - cả cây; DC2: dịch chiết 2 - rễ/thân rễ; DC3: dịch chiết 3 - thân; DC4: dịch chiết 4 - lá.

Hiệu quả ức chế của từng loại dịch chiết lên thân và rễ cỏ lồng vực cạn ở hình 3 cho thấy, DC4 thể hiện sự ức chế lên thân cỏ không ổn định khi tăng dần nồng độ dịch chiết từ 0,03 đến 0,5 g/ml và đạt cao nhất là 72,2% ở nồng độ 1,0 g/ml. DC1 gây ức chế 100% lên rễ cỏ ở nồng độ 1,0 g/ml nhưng lại kích thích sự phát triển thân cỏ ở nồng độ 0,03 và 0,5 g/ml. DC2 và DC3 cho tỷ lệ ức chế lên thân và rễ cỏ lồng vực cạn tăng tỷ lệ thuận với nồng độ dịch chiết, ở nồng độ 1,0 g/ml đạt trên 50,0% đối với thân và trên 75,0% đối với rễ cỏ.



Hình 3. Ảnh hưởng của dịch chiết MeOH từ cây cỏ đậu lên sự phát triển của thân (A) và rễ (B) cỏ lồng vực cạn.

Dịch chiết MeOH từ cây cỏ đậu có hiệu quả ức chế rất cao lên cải bẹ xanh và hai loài cỏ dại. Ở nồng độ 1,0 g/ml, cả 4 loại dịch chiết đều cho hiệu quả ức chế cao hơn 50% đối với cả thân và rễ cây thử nghiệm. Các nghiên cứu về đối kháng thực vật của các loài thực vật khác bằng dịch chiết MeOH của chúng cũng ghi nhận kết quả tương tự, chẳng hạn chiết xuất MeOH của các loài thuộc họ Bóng nước (*Impatiens* sp.) gây ức chế mạnh lên sự nảy mầm của hạt giống cây mù tạt trắng (*Leucosinapis alba*) và hạt cải dầu (*Brassica napus*) [7]; dịch chiết MeOH của rễ cây cỏ mù (*Euphorbia heterophylla* L.) gây ức chế 100% sự nảy mầm, sự phát triển rễ và chồi của các cây chỉ thị là cỏ miến (*Sorghum bicolor*) và xà lách (*Lactuca sativa*) ở nồng độ 2,0 mg/ml [8]; dịch chiết MeOH của cây lá lốt (*Piper sarmentosum*) gây ức chế tất cả 12 loài thực vật thử nghiệm, trong đó có cỏ lồng vực nước và cỏ lồng vực cạn với các giá trị ức chế khác nhau [9]; chiết xuất MeOH của 14 giống lúa Bangladesh có tác dụng ức chế sự kéo dài chồi và rễ đối với sự phát triển của ba loài thực vật mục tiêu là cải xoong (*Lepidium sativum* L.), cỏ càng cua (*Digitaria sanguinalis* L.) và cỏ timothy (*Phleum pratense* L.) [10]; chiết xuất MeOH của thân và lá cây tầm gửi năm nhĩ (*Dendrophthoe pentandra*) gây ức chế hơn 80% đối với hạt cỏ mần trầu (*Eleusine indica*) ở nồng độ 5 mg/ml [11].

Đối với cỏ đậu, DC3 có hiệu quả ức chế cao và ổn định lên cả ba loài cây thử nghiệm và có xu hướng tăng dần theo nồng độ dịch chiết nên được chọn để tách chiết tiếp theo bằng phương pháp tách lỏng - lỏng nhằm làm rõ hơn cơ chế đối kháng thực vật của loài này.

Hiệu quả đối kháng thực vật của hai pha cất sau khi tách lỏng - lỏng DC3 lên hai loài cỏ dại

Với cỏ lồng vực nước: kết quả bảng 4 cho thấy, chiều dài trung bình thân cỏ có sự khác biệt ý nghĩa so với đối chứng ở nghiệm thức 0,3 g/ml ở pha H₂O và nghiệm thức 0,1 g/ml ở pha EtOAC. Đối với rễ cỏ, pha H₂O cho thấy sự khác biệt ý nghĩa ở nồng độ 1,0 g/ml, trong khi đó, sự khác biệt này ở pha EtOAC thể hiện từ nồng độ thấp nhất là 0,03 g/ml.

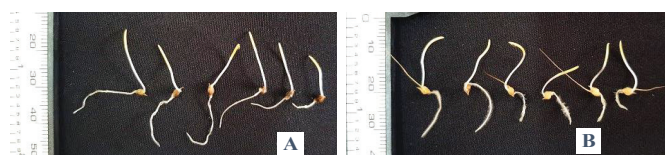
Bảng 4. Sự phát triển (mm) của cỏ lồng vực nước dưới ảnh hưởng của 2 pha cất lỏng - lỏng từ DC3.

Nồng độ (g/ml)	Pha H ₂ O		Pha EtOAC	
	Thân	Rễ	Thân	Rễ
ĐC (0,0)	20,6 ^{bc}	26,27 ^a	19,68 ^a	20,21 ^a
0,03	32,22 ^a	26,75 ^a	18,26 ^{ab}	14,39 ^b
0,1	31,08 ^a	23,29 ^a	17,33 ^b	11,2 ^c
0,3	24,32 ^b	17,87 ^a	16,81 ^{bc}	10,12 ^c
0,5	17,97 ^c	14,9 ^{ab}	14,84 ^c	7,34 ^d
1,0	8,36 ^d	3,7 ^b	10,22 ^d	4,23 ^e

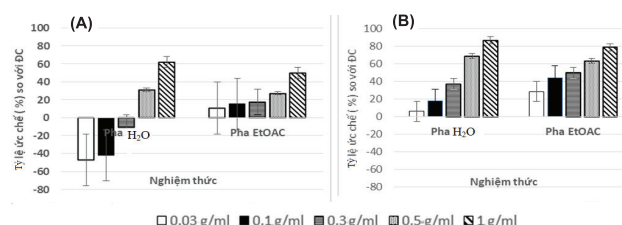
Ghi chú: trong cùng một cột, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%; kết quả so sánh pha chiết x nồng độ.

Liên quan đến hiệu quả đối kháng thực vật lên cỏ lồng vực nước, số liệu bảng 4 cho thấy có sự ức chế lên thân và rễ, ở cả hai pha, thể hiện rõ ngay ở ngưỡng nồng độ 0,5 g/ml. Đối với thân lồng vực nước, các hoạt chất trong pha H₂O có sự kích thích tương đối mạnh (-47,3% ở nồng độ 0,03 g/ml và -42% ở nồng độ 0,1 g/ml), tuy nhiên khi nâng nồng độ lên 0,3 g/ml, hiệu quả lại giảm đi

khá rõ (-10,8%). Ở pha EtOAC, các hoạt chất ức chế thân và rễ thể hiện ngay từ nồng độ thấp 0,03 g/ml (79% trên rễ và 48% trên thân ở nồng độ 1,0 g/ml, hình 4 và 5).



Hình 4. Sự phát triển của cỏ lồng vực nước dưới ảnh hưởng của pha H₂O (A) và pha EtOAC (B) từ DC3 với các nghiệm thức (g/ml) từ trái sang: ĐC, 0,03, 0,1, 0,3, 0,5 và 1,0.



Hình 5. Ảnh hưởng của hai pha chiết lỏng - lỏng từ DC3 lên thân (A) và rễ (B) cỏ lồng vực nước.

Với cỏ lồng vực cạn: tác động của các hoạt chất trong pha H₂O đến chiều dài thân và rễ xảy ra ngay ở ngưỡng nồng độ 0,03 g/ml, khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng. Còn trong pha EtOAC, sự khác biệt này được ghi nhận ở nồng độ 0,3 g/ml đối với thân và 0,1 g/ml đối với rễ cỏ (bảng 5).

Bảng 5. Sự phát triển (mm) của cỏ lồng vực cạn dưới ảnh hưởng của 2 pha chiết lỏng - lỏng từ DC3.

Nồng độ (g/ml)	Pha H ₂ O		Pha EtOAC	
	Thân	Rễ	Thân	Rễ
ĐC (0,0)	16,13 ^a	21,42 ^a	15,24 ^a	18,26 ^a
0,03	14,48 ^b	15,82 ^b	14,63 ^a	14,25 ^{ab}
0,1	13,9 ^{bc}	9,96 ^c	12,09 ^{ab}	10,7 ^{bc}
0,3	13,41 ^{bc}	8,24 ^c	10,12 ^{bc}	7,58 ^{cd}
0,5	12,39 ^c	4,02 ^d	8,69 ^c	6,73 ^{cd}
1,0	6,33 ^d	3,27 ^d	7,74 ^c	4,18 ^d

Ghi chú: trong cùng một cột, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%; kết quả so sánh pha chiết x nồng độ.

Về hiệu quả đối kháng thực vật, hai pha chiết đều thể hiện khả năng ức chế lên cả thân và rễ, xảy ra ngay ở nồng độ thấp nhất (0,03 g/ml) và tăng dần lên theo sự tăng của nồng độ. Sự ức chế của cả 2 pha thể hiện rõ hơn đối với rễ cỏ, đạt 84,6% (pha H₂O) và 77,4% (pha EtOAC) ở nồng độ 1,0 g/ml. Tuy nhiên, các hoạt chất trong pha H₂O có hiệu quả ức chế cao hơn so với pha EtOAC đối với cỏ lồng vực cạn (hình 6).



Hình 6. Sự phát triển của cỏ lồng vực cạn dưới ảnh hưởng của pha H₂O (A) và pha EtOAC (B) từ DC3 với các nghiệm thức (g/ml) từ trái sang: ĐC, 0,03, 0,1, 0,3, 0,5 và 1,0.

Kết quả nghiên cứu của một số công trình liên quan cũng chỉ ra rằng, dịch chiết từ 2 pha cắt của phân đoạn tách lỏng - lỏng đều có chứa những chất đối kháng có hiệu quả đối kháng thực vật nhất định lên các loài mục tiêu. Dịch chiết EtOAC từ hạt của cây *Amburana cearensis* làm giảm 50% chiều dài rễ của dưa (*Melon*), trong khi dịch chiết H₂O làm giảm hơn 50% [12]. Ở cây mãng cầu nước (*Annona crassiflora*), chiết xuất EtOAC từ hạt làm giảm sự phát triển rễ và thân mầm của cỏ mủ (*Euphorbia heterophylla*) [13]. Dịch chiết EtOAC lá cây atiso dại (*Cynara cardunculus* var. *altilis*) cho hiệu quả ức chế mạnh nhất (gần 100%) so với dịch chiết từ MeOH, etanol và nước lên tỷ lệ nảy mầm, chiều dài rễ và chiều dài chồi của sáu loài cỏ dại, trong đó có cỏ lồng vực nước [14]. Ở cây cỏ đậu, dịch chiết của hai pha H₂O và EtOAC từ DC3 đều cho hiệu quả ức chế cao, hơn 50% lên thân và rễ của 2 loài cỏ dại ở nồng độ 1,0 g/ml. Tuy nhiên, ở nồng độ 0,01-0,3 g/ml, các chất đối kháng chứa trong pha H₂O gây kích thích đối với thân cỏ lồng vực nước, trong khi các chất đối kháng ở pha EtOAC lại cho hiệu quả ức chế.

Trên nền tảng hiệu quả đối kháng thực vật của 2 pha chiết lỏng - lỏng được ghi nhận từ DC3 với tác dụng ức chế tương đối ổn định, tăng dần theo nồng độ dịch chiết lên cả thân và rễ của hai loài cỏ dại ở pha EtOAC, chúng tôi tiếp tục phân tách chất đối kháng ở pha này nhằm làm rõ vai trò của các chất đối kháng thực vật có trong cây cỏ đậu.

Làm tinh khiết chất đối kháng thực vật bằng phương pháp HPLC

Phân tích các pha cắt từ cột C18 bằng phương pháp HPLC để xác định các chất/nhóm chất đối kháng thực vật chứa trong các pha này, kết quả ghi nhận được sự hiện diện của các chất đối kháng như: axit salicylic, coumaric, caffeic, ferulic... Các chất này phần lớn thuộc nhóm phenolic acids. Hợp chất Flavonoid chưa được tìm thấy trong các pha cắt này hoặc do nồng độ quá thấp không thể phát hiện (bảng 6).

Bảng 6. Nồng độ các chất đối kháng thực vật có trong pha cắt C18 từ DC3 khi được phân tích bằng HPLC.

TT	Tên chất/nhóm chất	Nồng độ trong dịch chiết (mg/l)	Trong 1 g trọng lượng tươi (µg/g)
1	Cinamic acid	1,07	0,214
2	Caffeic acid	4,172	0,8344
3	Coumaric acid	38,838	7,7676
4	Ferullic acid	11,177	2,2354
5	2-4 dimehydroxy benzoic	0,225	0,045
6	Salicylic acid	160,581	32,1162

Ghi chú: nồng độ dịch chiết ban đầu 1 g/ml (theo khối lượng tươi).

Các hợp chất phenolic có dạng vòng thơm, mang một hoặc nhiều nhóm hydroxyl [15, 16], có khả năng ức chế quá trình sinh trưởng, phát triển của cây bằng cách làm thay đổi tính thẩm của màng, qua đó ức chế khả năng hấp thu dinh dưỡng của cây và cuối cùng tác động lên quá trình sinh tổng hợp hormones nội sinh, chức

năng và các hoạt động khác nhau của các enzyme, quá trình quang hợp, tổng hợp protein, phân chia và kéo dài tế bào thực vật [17]. Thêm vào đó, phenolic có thể làm giảm hàm lượng diệp lục bằng cách ức chế tổng hợp diệp lục tố hoặc phân hủy diệp lục tố [18].

Tác dụng của các axit phenolic đã được nghiên cứu nhiều trên các loài thực vật khác nhau cho thấy, caffeic ở nồng độ 0,1 mM làm giảm sự hình thành rễ và ức chế sự phát triển rễ của cây đậu xanh (*Phaseolus aureus*) [19]. Axit ferulic làm giảm đáng kể chiều dài rễ và trọng lượng tươi của cây ngô (*Zea mays* L.), sự phát triển của rễ bị ức chế nhiều hơn so với thân [20]. Axit caffeic, coumaric, ferulic, cinnamic và vanillic ở nồng độ 10-30 $\mu\text{mol/l}$ gây ức chế đáng kể sự phát triển của đậu tương (*Glycine max*) [21]. Kết quả nghiên cứu của Li và cs (1993) [22] cho thấy, axit trans-Cinnamic và axit o-, m-, p-coumaric đã ức chế sự phát triển của xà lách ở nồng độ cao hơn 10^{-4} M và sự nảy mầm của hạt ở nồng độ cao hơn 10^{-3} M; coumarin ức chế sự phát triển của cây con và sự nảy mầm của hạt ở 10^{-5} M trở lên. Axit chlorogenic ức chế sự phát triển của cây con trên 10^{-4} M, nhưng không ức chế sự nảy mầm của hạt ở 10^{-5} - 5×10^{-3} M. Nồng độ thấp (dưới 10^{-3} M) của các axit caffeic và ferulic thúc đẩy sự kéo dài của các lá mầm, nhưng nồng độ cao hơn (trên 10^{-3} M) đã ức chế sự phát triển của cây con và sự nảy mầm của hạt. Những kết quả này cho thấy, trong tự nhiên axit trans-cinnamic, axit o-, m-, p-coumaric, coumarin và chlorogenic ức chế sự phát triển của thực vật không phụ thuộc vào nồng độ. Tuy nhiên, axit caffeic và ferulic có thể kích thích hoặc ức chế sự phát triển của thực vật tùy theo nồng độ của chúng.

Trong nghiên cứu này, 4 loại dịch chiết MeOH và các pha cất lỏng - lỏng của DC3, bên cạnh tạo nên hiệu quả ức chế ở nồng độ thấp (0,03-0,3 g/ml) còn có tác động kích thích quá trình sinh trưởng, phát triển của loài mục tiêu. Điều này có thể do sự có mặt của axit caffeic và ferulic đã góp phần thúc đẩy số lượng và kích thước các tế bào thực vật khi ở nồng độ thấp và kìm hãm sinh trưởng khi ở nồng độ cao.

Kết luận

1. Dịch chiết MeOH từ thân rễ, thân và lá cỏ đậu đều có tác động ức chế cao lên cải bẹ xanh, cỏ lồng vực nước và lồng vực cạn, đạt 100% ở nồng độ 1,0 g/ml, trong đó, DC3 cho hiệu quả ức chế ổn định và tỷ lệ thuận với nồng độ dịch chiết. Hai pha cất lỏng - lỏng từ DC3 đều gây ức chế lên hai loài cỏ dại với tỷ lệ ức chế đều cao hơn 50% ở nồng độ 1,0 g/ml.

2. Kết quả HPLC của pha cất C18 từ pha EtOAc của DC3 ghi nhận được sự có mặt của 6 hợp chất phenolic với hàm lượng trong 1 g chất tươi thấp nhất là 0,045 μg (2-4 dimehydroxy benzoic) và cao nhất là 32,1162 μg (axit salicylic).

3. Cây cỏ đậu có tiềm năng đối kháng cỏ dại cao và có thể sử dụng trong nghiên cứu phòng trừ sinh học cỏ dại trong canh tác lúa bền vững.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] F. Monteles, et al. (2011), “Efeito alelopático dos extratos aquosos de amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) e da erva-de-touro (*Tridax procumbens*) sobre a germinação de sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) e pimentão

(*Capsicum annuum*)”, *Cadernos De Agroecologia*, **6**, pp.1-5.

[2] T.J. Rose, et al. (2019), “Pinto peanut cover crop nitrogen contributions and potential to mitigate nitrous oxide emissions in subtropical coffee plantations”, *Sci. Total. Environ.*, **656**, pp.108-117.

[3] Christiane Abreu Oliveira, et al. (2002), “Decomposition of *Arachis pintoi* litter intercropped with forage grass in “Cerrado” soil in the dry and wet seasons”, *Biology and Fertility of Soils*, **36**, pp.405-410.

[4] G.G. Johns (1994), “Effect of *Arachis pintoi* groundcover on performance of bananas in northern New South Wales”, *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **34**, pp.1197-1204.

[5] Zhu Chaohua, et al. (2006), *Allelopathy of Manihot utilissima and Arachis pintoi*, http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-RDZX200601020.htm.

[6] H. Thi, et al. (2014), “Isolation and identification of an allelopathic phenylethylamine in rice”, *Phytochemistry*, **108**, pp.109-121.

[7] N. Vrchotová, et al. (2011), “Allelopathic activity of extracts from *Impatiens* species”, *Plant, Soil and Environment*, **57**, pp.57-60.

[8] U.P. Da Silva, et al. (2018), “Allelopathic activity and chemical constituents of extracts from roots of *Euphorbia heterophylla* L”, *Natural Product Research*, **1-4**, DOI: 10.1080/14786419.2018.1460829.

[9] Piyatida Pukclai, Hisashi Kato-Noguchi (2011), “Allelopathic activity of *Piper sarmentosum* Roxb”, *Asian Journal of Plant Sciences*, **10**, pp.147-152.

[10] M.A. Salam, H. Kato-Noguchi (2010), “Allelopathic potential of methanol extract of Bangladesh rice seedlings”, *Journal Article: Asian Journal of Crop Science*, **2**, pp.70-77.

[11] L. Alharits, et al. (2020), “Allelopathic activity of *Dendrophthoe pentandra* as a potential bioherbicide to inhibit seed germination and seedling growth of *Eleusine indica*”, *Nusantara Bioscience*, **12**, pp.33-39.

[12] A.K.D. Oliveira, et al. (2019), “Allelopathic activity of *Amburana cearensis* seed extracts on melon emergence”, *Technical. Note Rev. Caatinga*, **33**, DOI: 10.1590/1983-21252020v33n130rc.

[13] M.H. Inoue, et al. (2010), “Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de araticum (*Annona crassiflora*)”, *Planta Daninha*, **28**, pp.735-741.

[14] A. Scavo, et al. (2019), “The extraction procedure improves the allelopathic activity of cardoon (*Cynara cardunculus* var. *altilis*) leaf allelochemicals”, *Industrial Crops and Products*, **128**, pp.479-487.

[15] M. Leri, et al. (2020), “Healthy effects of plant polyphenols: molecular mechanisms”, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, DOI: 10.3390/ijms21041250.

[16] B. Tohidi, et al. (2016), “Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran”, *Food Chem.*, **220**, pp.153-161.

[17] M.R. Abenavoli, et al. (2003), “Coumarin inhibits the growth of carrot (*Daucus carota* L. cv. *Saint Valery*) cells in suspension culture”, *Journal of Plant Physiology*, **160**, pp.227-237.

[18] C.M. Yang, et al. (2004), “Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*Oryza sativa*) seedlings: II. Stimulation of consumption-orientation”, *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **45**, pp.119-125.

[19] D.R. Batish, et al. (2008), “Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*)”, *J. Plant Physiol.*, **165**, pp.297-305.

[20] S.R. Devi, M.N.V. Prasad (1992), “Effect of ferulic acid on growth and hydrolytic enzyme activities of germinating maize seeds”, *Journal of Chemical Ecology*, **18**, pp.1981-1990.

[21] D.T. Patterson (1981), “Effects of allelopathic chemicals on growth and physiological response of soybean (*Glycine max*)”, *Weed Sci.*, **29**, pp.53-58.

[22] H.H. Li, et al. (1993), “Interaction of trans-cinnamic acid, its related phenolic allelochemicals, and abscisic-acid in seedling growth and seed-germination of lettuce”, *J. Chem. Ecol.*, **19**, pp.1775-1787.

Phân tích hệ gen phiên mã của tôm sú cái (*Penaeus monodon*) ở Việt Nam liên quan đến tính trạng sinh sản bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới

Nguyễn Minh Thành¹, Trần Thị Hải Yến¹, Võ Thị Minh Thu^{1,2},
Lê Thị Hồng Thắm¹, Nguyễn Văn Sáng³, Nguyễn Thành Luân³, Nguyễn Việt Tuấn^{2*}

¹Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

²Trung tâm Nghiên cứu GeneCology, Đại học Sunshine Coast, Australia

³Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2 (RIA2)

Ngày nhận bài 20/7/2021; ngày chuyển phản biện 22/7/2021; ngày nhận phản biện 25/8/2021; ngày chấp nhận đăng 30/8/2021

Tóm tắt:

Tôm sú (*Penaeus monodon*) là loài tôm được nuôi phổ biến ở nước ta và trên thế giới. Hiện nay, sản xuất giống tôm sú vẫn phụ thuộc vào nguồn tôm bố mẹ tự nhiên bởi vì chất lượng sinh sản của tôm tự nhiên cao hơn tôm sú gia hóa. Trước thực tế đó, nhóm tác giả đã tiến hành nghiên cứu hệ gen phiên mã của tôm sú cái tự nhiên và gia hóa ở giai đoạn buồng trứng tiền thành thực bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới. Giải trình tự bằng thiết bị Illumina đạt số lượng đoạn trình tự (read) sau tinh sạch là 20.977.708 cho tôm tự nhiên và 31.185.197 cho tôm gia hóa. Kết quả lắp ráp theo phương pháp không có hệ gen tham chiếu đạt 35.870 contig, trong đó độ dài trung bình và N50 của contig lần lượt là 1.018 và 1.488 bp. Chú giải gen chức năng dựa vào 7 cơ sở dữ liệu đạt tỷ lệ tương đồng từ 19,74 đến 47,77%. Hệ gen phiên mã của nghiên cứu này có tỷ lệ tương đồng cao nhất với loài *Hyaella azteca*, *Cryptotermes secundus*, *Zootermopsis nevadensis* và các loài tôm thuộc họ *Penaeus*. Nghiên cứu cũng xác định được tổng cộng 5.788 gen có biểu hiện khác biệt ở tôm tự nhiên khi so sánh với tôm gia hóa. Các gen có biểu hiện khác biệt được tiếp tục phân loại dựa theo khóa thuật ngữ của Gene Ontology (GO). Kết quả phân loại chức năng theo GO ở tôm sú tự nhiên cho thấy, các gen hemolymph clottable, peritrophin, ecdysteroid có biểu hiện tăng và các gen serine protease, alpha-L-fucosidase-like, actin, catenin alpha có biểu hiện giảm. Nghiên cứu này là cơ sở quan trọng bổ sung thông tin hệ phiên mã của tôm sú liên quan đến tính trạng sinh sản và có thể ứng dụng để cải thiện chất lượng sinh sản của tôm sú gia hóa.

Từ khóa: hệ gen phiên mã, *Penaeus monodon*, RNA-seq, tính trạng sinh sản.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Tôm sú (*Penaeus monodon*) là loài thủy sản mang lại giá trị kinh tế lớn, đóng góp đáng kể vào phát triển kinh tế - xã hội của đất nước. Năm 2020, sản lượng tôm sú đạt 267.700 tấn và giá trị xuất khẩu đạt 575,44 triệu USD [1]. Tôm sú được xác định là một trong hai đối tượng tôm nuôi nước lợ chủ lực của nước ta (cùng với tôm thẻ chân trắng), do đó nhu cầu giống tôm sú ngày càng tăng về số lượng và chất lượng. Tôm sú bố mẹ hiện nay chủ yếu đánh bắt từ tự nhiên là nguồn lây truyền mầm bệnh, làm cho nghề nuôi tôm sú của Việt Nam không bền vững do dịch bệnh dễ bùng phát. Việc chủ động phát triển đàn tôm sú bố mẹ gia hóa chất lượng cao để phục vụ nghề nuôi tôm bền vững là cần thiết tại Việt Nam. Tuy nhiên, chất lượng sinh sản của tôm sú bố mẹ gia hóa thấp hơn tôm sú bố mẹ tự nhiên. Các cơ sở sản xuất giống tôm sú (năm 2020 có 1.750 cơ sở [1]) vẫn có khuynh hướng sử dụng tôm bố mẹ tự nhiên. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu hệ phiên mã của tôm sú cái liên quan đến tính trạng sinh sản nhằm cải thiện đặc điểm sinh sản của tôm sú gia hóa. Nghiên cứu áp dụng RNA-sequencing là phương pháp nhờ vào ưu điểm vượt trội của kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới để phát hiện toàn bộ bản phiên mã mRNA của một loài. Mục tiêu của nghiên cứu là xây dựng cơ sở dữ liệu hệ gen phiên mã

của tôm sú tự nhiên và gia hóa, đồng thời tìm kiếm các gen tiềm năng liên quan đến tính trạng sinh sản ở giai đoạn buồng trứng tiền thành thực. Đây sẽ là nguồn thông tin gen chức năng giá trị có thể sử dụng cho những chương trình chọn giống nâng cao sức sinh sản của tôm sú sau này.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Mẫu tôm thí nghiệm

Nghiên cứu thu thập mẫu tôm sú cái tự nhiên (do cơ sở thu mua tôm sú bố mẹ cung cấp) và gia hóa (do Chương trình chọn giống của Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 2 cung cấp). Buồng trứng ở giai đoạn tiền thành thực (giai đoạn 0) là cơ quan đích của nghiên cứu hệ gen phiên mã được lưu trữ trong RNAlater (Invitrogen, USA) và bảo quản ở -80°C cho đến khi thực hiện ly trích RNA tại Phòng thí nghiệm, Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Quốc tế.

Ly trích RNA tổng số, tổng hợp thư viện cDNA và giải trình tự bằng Illumina

Mẫu buồng trứng được ly trích RNA tổng số bằng phương pháp TRIzol/Chloroform (Invitrogen) [2]. RNA tổng số được

*Tác giả liên hệ: Email: tnguyen@usc.edu.au

Transcriptome analyses of female black tiger shrimps (*Penaeus monodon*) for reproductive trait using RNA-sequencing approach

Minh Thanh Nguyen¹, Thi Hai Yen Tran¹,
Thi Minh Thu Vo^{1,2}, Thi Hong Tham Le¹,

Van Sang Nguyen³, Thanh Luan Nguyen³, Viet Tuan Nguyen^{2*}

¹School of Biotechnology, International University, VNU, Ho Chi Minh city

²GeneCology Research Centre, University of the Sunshine Coast, Australia

³Research Institute for Aquaculture No.2 (RIA2)

Received 20 July 2021; accepted 30 August 2021

Abstract:

The black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) is the widely cultured aquaculture species in Vietnam and worldwide. Production of *P. monodon* postlarvae still relies on the wild broodstock due to their higher fecundity and larval quality in comparison with the domesticated broodstock. Therefore, the current study applied an RNA-sequencing approach by the Illumina platform to generate the transcriptomic resources for the wild and domesticated females at the previtellogenic stage of ovaries (stage 0). Total clean reads were 20,977,708 for the wild female and 31,185,197 for the domesticated female. *De novo* assembly was employed to generate 35,870 contigs with an average length of 1,018 bp and N50 length of 1,488 bp. The ratios of contigs possessing significant similarity through annotation across seven databases ranged from 19.74 to 47.77%. Top hit species from BLASTx searches included *Hyalomma azteca*, *Cryptotermes secundus*, *Zootermopsis nevadensis*, followed by *Penaeus* sp.. We identified a total of 5,788 differentially expressed transcripts between the ovaries of wild and domesticated shrimps. The differentially expressed transcripts were further enriched according to the classification terms of Gene Ontology (GO). Results of GO enrichment analysis in the wild female indicated that many genes such as hemolymph clottable, peritrophin, ecdysteroid were up-regulated while the following genes, including serine protease, alpha-L-fucosidase-like, actin, catenin alpha were down-regulated. The current study provides more transcriptomic resources for the reproductive trait in *P. monodon*. These resources are potentially applied for the improvement of reproduction in the domesticated shrimp.

Keywords: *Penaeus monodon*, reproductive trait, RNA-sequencing, transcriptome.

Classification number: 4.6

định tính và định lượng bằng máy quang phổ Nanodrop™ (ThermoFisher) và Bioanalyser 2100 (Agilent). RNA tổng số cũng được kiểm tra độ tinh sạch (nhiễm DNA hoặc protein) và sự phân hủy bằng phương pháp điện di agarose. mRNA được ly tách khỏi hỗn hợp RNA tổng số bằng Dynabeads mRNA purification kit (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó mRNA được phân cắt đoạn ngẫu nhiên và được sử dụng làm khuôn mẫu để tổng hợp cDNA bằng TruSeq® Stranded mRNA Library Prep kit của Illumina theo hướng dẫn của nhà sản xuất. cDNA tiếp tục được định tính và định lượng bằng Qubit 2.0 (Invitrogen) và Bioanalyser, cuối cùng thư viện cDNA được giải trình tự bằng máy Illumina NovaSeq 6000 tại Novogene (Singapore).

Lắp ráp các đoạn trình tự không có hệ gen tham chiếu và chú giải các đoạn mRNA

Các đoạn trình tự thô sau khi giải trình tự được xử lý loại bỏ các adapter gắn vào khi chuẩn bị các thư viện cDNA để giải trình tự. Phần mềm FastQC được sử dụng để đánh giá chất lượng các đoạn trình tự thô. Các đoạn trình tự có tỷ lệ nucleotide không thể xác định >10% và chất lượng thấp (QC<20) được loại bỏ bằng phần mềm Trimmomatic [3]. Các đoạn trình tự ngắn đạt chất lượng được lắp ráp thành bộ phiên mã theo định dạng không có hệ gen tham chiếu bằng phần mềm Trinity [4]. Các contig lắp lại sau khi lắp ráp từ Trinity được loại bỏ bằng phần mềm CORSET và các transcript dài nhất của mỗi gen được báo cáo là các unigene.

Các công cụ tin sinh học khác nhau được sử dụng để chú giải các transcript dựa vào 7 cơ sở dữ liệu. Đầu tiên công cụ BLASTX của NCBI [5] được sử dụng cho cơ sở dữ liệu NR (Non-redundant protein sequences) (giá trị $E < 1e^{-5}$). Sau đó chương trình DIAMOND [6] sử dụng cho các cơ sở dữ liệu NT (NCBI nucleotide sequences), KOG (euKaryotic orthologous groups) và Swiss-Prot (giá trị $E < 1e^{-5}$). Chương trình HMMER sử dụng cho cơ sở dữ liệu PFAM (Protein family) (giá trị $E < 0,01$). Phần mềm Blast2GO [7] áp dụng cho cơ sở dữ liệu GO (giá trị $E < 1e^{-6}$) và KAAS - KEGG Automatic annotation server sử dụng cho cơ sở dữ liệu KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genome) (giá trị $E < 1e^{-5}$).

Sơ sánh sự biểu hiện gen giữa tôm tự nhiên và gia hóa

Phần mềm Bowtie [8] được sử dụng để giống hàng các transcript và phần mềm RSEM [9] được sử dụng cho định lượng gen biểu hiện của mẫu tôm tự nhiên và gia hóa. Phân tích biểu hiện gen khác biệt giữa mẫu tôm tự nhiên và gia hóa bằng phần mềm EgdeR [10] dựa vào các giá trị: $|\log_2\text{FoldChange}| > 2$ và giá trị p điều chỉnh (p-adjusted value) $< 0,005$ [11]. Sau khi xác định được các gen có biểu hiện khác biệt giữa 2 nhóm tôm, các gen này được tiếp tục phân loại thành các nhóm gen chức năng theo các khóa thuật ngữ của GO bằng phần mềm

GOSeq (V1.32.0) [12] và topGO (2.32.0) [13]. Bước phân tích này nhằm xác định các nhóm chức năng mà các gen có biểu hiện sai khác tham gia liên quan đến tính trạng nghiên cứu.

Kết quả và bàn luận

Kết quả giải trình tự và lắp ráp các đoạn trình tự

Thư viện cDNA chuẩn bị từ mô buồng trứng của tôm sú tự nhiên và gia hóa được giải trình tự bằng thiết bị Illumina. Kết quả giải trình tự đạt được dữ liệu 6,5 Gbp cho mẫu tôm tự nhiên và 9,5 Gbp cho mẫu tôm gia hóa. Số lượng đoạn trình tự ngắn thô lần lượt là 21.642.150 và 31.742.591 cho mẫu tôm tự nhiên và gia hóa (bảng 1). Kích thước trung bình của các đoạn trình tự thô là 150 bp theo tiêu chuẩn kỹ thuật của thiết bị Illumina HiSeq4000. Sau khi sàng lọc các đoạn trình tự không đạt chất lượng, tỷ lệ đoạn trình tự ngắn được sử dụng cho lắp ráp là 96,93 và 98,24% cho từng nhóm tôm.

Bảng 1. Tóm tắt kết quả giải trình tự bằng thiết bị Illumina.

Chỉ số phân tích	Tôm tự nhiên	Tôm gia hóa
Tổng số base (Gbp)	6,5	9,5
Tổng số base đạt chuẩn >Q20 (Gbp)	6,3	9,4
Số lượng đoạn trình tự ngắn	21.642.150	31.742.591
Số lượng đoạn trình tự sau tinh sạch	20.977.708 (96,93%)	31.185.197 (98,24%)

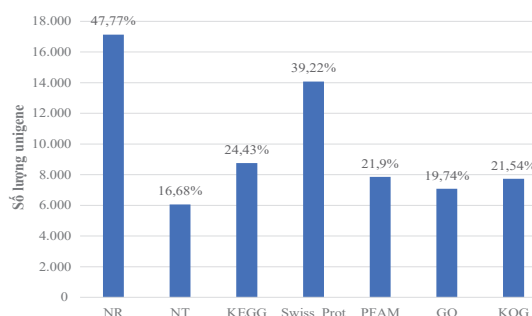
Kết quả lắp ráp đạt 35.870 contig (đã sàng lọc các contig lặp lại) từ các đoạn trình tự tinh sạch cộng gộp của tôm tự nhiên và gia hóa. Chiều dài trung bình của các contig là 1.018 bp, dao động từ 301 bp đến 9.245 bp (bảng 2). Ngoài ra, chiều dài contig N50 là 1.488 bp. Chiều dài trung bình của các contig và chiều dài N50 là các chỉ tiêu để đánh giá chất lượng của phần mềm lắp ráp [14]. Nghiên cứu của Sadamoto và cs (2012) [15] cho rằng, chiều dài contig N50 càng dài cho thấy chất lượng càng cao của kết quả lắp ráp. Chiều dài N50 của nghiên cứu hiện tại lớn hơn N50 của nghiên cứu hệ gen tôm sú cũng sử dụng thiết bị Illumina giải trình tự [16]. Tỷ lệ các unigene ≥ 1.000 bp đạt tương đối cao (33%), rất có ý nghĩa cho các bước phân tích tiếp theo.

Bảng 2. Kết quả lắp ráp và sàng lọc các contig.

Chỉ số phân tích	Giá trị
Tổng số contig	35.870
Tổng số base (bp)	36.498.375
Chiều dài contig trung bình (bp)	1.018
Chiều dài contig ngắn nhất (bp)	301
Chiều dài contig lớn nhất (bp)	9.245
Chiều dài contig N50 (bp)	1.488
Số lượng contig ≥ 1.000 bp	11.856 (33%)

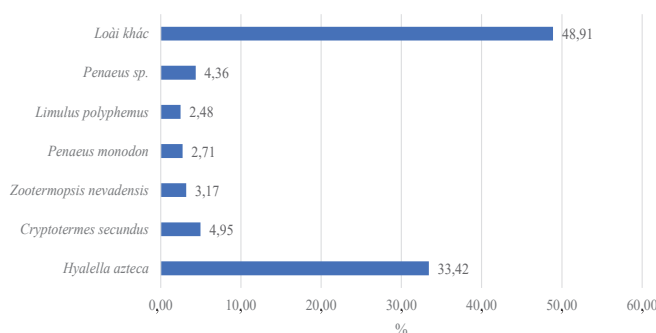
Kết quả chú giải và phân loại các gen chức năng

Kết quả chú giải các gen chức năng sau khi lắp ráp dựa vào 7 cơ sở dữ liệu khác nhau được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Tỷ lệ chú giải các unigene dựa vào các cơ sở dữ liệu khác nhau.

Kết quả hình 1 cho thấy, tỷ lệ chú giải đạt cao nhất là 47,77% khi dựa vào cơ sở dữ liệu NR của NCBI. Đây là cơ sở dữ liệu tập hợp trình tự protein từ nhiều nguồn dữ liệu khác nhau trên thế giới. Vì vậy cơ sở dữ liệu này luôn được lựa chọn để chú giải gen chức năng nhằm tìm kiếm mức độ tương đồng cao nhất giữa các trình tự đang được nghiên cứu và các gen đã được công bố lưu trữ trên các cơ sở dữ liệu. Tỷ lệ chú giải cao nhất khi dựa vào NR là điều hiển nhiên. Kế tiếp, tỷ lệ chú giải đạt 39,22% khi dựa vào cơ sở dữ liệu Swiss_Prot. Cơ sở dữ liệu này chuyên biệt cho các trình tự protein và đã được kiểm chứng bởi các thực nghiệm nên là cơ sở dữ liệu tin cậy cho chú giải gen chức năng. Tỷ lệ chú giải dựa vào Swiss_Prot trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn công bố của Huerlimann và cs (2018) [17] cũng nghiên cứu hệ gen phiên mã của tôm sú đạt tỷ lệ chú giải khoảng 30%. Nhóm nghiên cứu khẳng định, tỷ lệ chú giải thấp là kết quả thông thường khi nghiên cứu hệ gen phiên mã của các loài không phải là các loài nghiên cứu tiêu biểu (non-model species). Các cơ sở dữ liệu còn lại cũng được chúng tôi sử dụng để chú giải nhằm phân loại các nhóm protein (PFAM), nhóm gen chức năng (GO và KOG) và các chuỗi chuyển hóa sinh học (KEGG). Kết quả so sánh mức độ tương đồng của các unigene của nghiên cứu hiện tại với các loài đã được nghiên cứu được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Tỷ lệ unigene tương đồng với các loài bằng phân tích BLASTX.

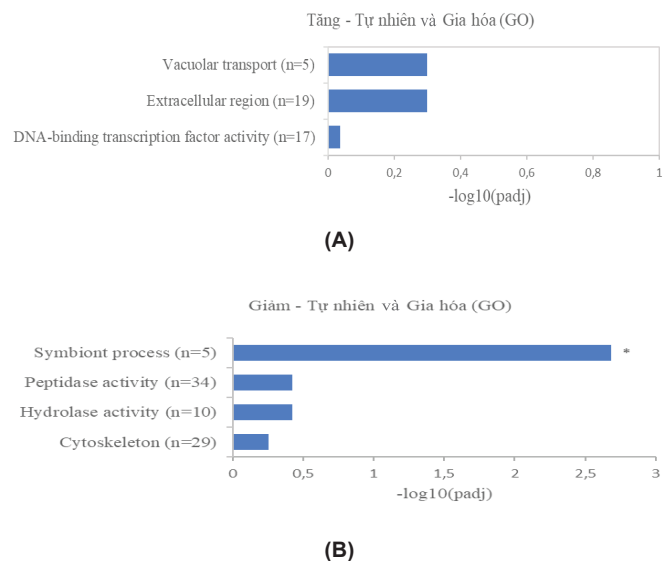
Kết quả ở hình 2 cho thấy, loài có mức độ tương đồng cao nhất là phiêu sinh động vật *Hyalella azteca*. Đây là một trong những loài giáp xác của dự án i5k với mục tiêu giải mã toàn bộ hệ gen của 5.000 loài thuộc ngành động vật chân khớp [18]. Hệ gen của *H. azteca* đã được giải mã hoàn toàn và công bố nên trình tự gen của loài này phong phú trên các cơ sở dữ liệu. Các loài kế tiếp có mức độ tương đồng cao với tôm sú là *Cryptotermes*

secundus và *Zootermopsis nevadensis*. Hệ gen nhân và hệ gen phiên mã của các loài này cũng đã được công bố gần đây nên có sẵn trên các cơ sở dữ liệu [19-21]. Đối với tôm sú, nghiên cứu của chúng tôi đạt mức độ tương đồng chỉ 2,71% mặc dù hệ gen phiên mã của tôm sú đã được công bố [11, 17]. Điều này cho thấy, nghiên cứu của chúng tôi chỉ giải trình tự một loại mô nên không thể thu nhận tỷ lệ lớn hệ gen phiên mã của tôm sú. Điểm đáng lưu ý là hệ gen phiên mã của tôm sú đã công bố có tỷ lệ lặp lại cao (51,3%) [17] nên mức độ đa dạng nguồn gen không cao và có thể ảnh hưởng đến kết quả so sánh tương đồng nghiên cứu của chúng tôi và cơ sở dữ liệu hiện có. Ngoài ra, kết quả lắp ráp các đoạn trình tự dựa vào phương pháp lắp ráp không có hệ gen tham chiếu và phần mềm lắp ráp khác nhau cũng có thể ảnh hưởng đến mức độ sai khác của kết quả lắp ráp khi so sánh các nghiên cứu khác nhau. Tương tự, tỷ lệ tương đồng của các unigene tôm sú của chúng tôi cũng chỉ đạt 4,36% khi so sánh với các loài thuộc giống *Penaeus*, bao gồm *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. chinensis*, *P. indicus*, *P. semisulcatus*, *P. stylirostris*, *P. setiferus* và *Litopenaeus vannamei*. Kết quả này thể hiện cơ sở dữ liệu của các loài tôm thuộc họ *Penaeus* còn hạn chế và chưa được nghiên cứu đáng kể mặc dù chúng là các loài thủy sản có giá trị thương mại cao. Mức độ tương đồng cao của hệ gen phiên mã tôm sú với các loài *H. azteca*, *Z. nevadensis*, *L. polyphemus*, *L. vannamei* cũng tương tự công bố của Nguyen và cs (2020) [11] khi nghiên cứu hệ gen phiên mã của tôm sú gia hóa ở các giai đoạn thành thực sinh sản.

So sánh sự biểu hiện gen giữa tôm tự nhiên và gia hóa

Dựa vào giá trị $|\log_2\text{FoldChange}|$ và padj đã được thiết lập để so sánh sự biểu hiện gen khác biệt giữa tôm tự nhiên và tôm gia hóa, nghiên cứu của chúng tôi xác định được tổng cộng 5.788 gen có biểu hiện khác biệt. Trong đó tôm tự nhiên có 3.290 gen biểu hiện tăng và 2.498 gen biểu hiện giảm khi so sánh với gia hóa. Các gen có biểu hiện tăng ở tôm sú tự nhiên được phân loại thành 3 nhóm gen chức năng chính của GO, bao gồm quá trình sinh học: vận chuyển bằng không bào (vacuolar transport), thành phần tế bào: vùng ngoại bào (extracellular region) và chức năng phân tử: nhân tố tương tác DNA điều hòa phiên mã (DNA-binding transcription factor activity) (hình 3A). Trong nhóm vùng ngoại bào, gen hemolymph clottable có biểu hiện tăng, tương tự như công bố của [11] khi nghiên cứu tôm sú gia hóa ở giai đoạn tiền thành thực. Protein tổng hợp từ gen hemolymph clottable thuộc họ glycoprotein và có cấu trúc tương tự với vitellogenin. Những protein này giữ vai trò quan trọng trong quá trình thành thực buồng trứng của tôm sú [22]. Ngoài ra, nghiên cứu cũng xác định được gen tổng hợp peritrophin buồng trứng thuộc nhóm extracellular region là protein bảo vệ các trứng sau khi sinh sản [23]. Đối với nhóm chức năng phân tử, gen tổng hợp ecdysteroid được xác định có vai trò điều hòa các quá trình phát triển, thành thực sinh dục và sinh sản ở các loài chân khớp [24]. Tương tự, số lượng gen có biểu hiện giảm ở tôm sú tự nhiên cũng được phân loại thành nhóm gen chức năng, bao gồm quá trình sinh học: cộng sinh (symbiont process), thành phần tế bào: thành phần nâng đỡ

tế bào (cytoskeleton) và chức năng phân tử: hoạt tính phân cắt peptide (peptidase activity) và hoạt tính thủy phân (hydrolase activity) (hình 3B). Trong nhóm chức năng phân tử, nghiên cứu của chúng tôi tìm kiếm được gen tổng hợp serine protease có hoạt tính phân cắt peptide tham gia vào quá trình hoạt hóa hệ miễn dịch ở tôm [25]. Tác giả Ye và cs (2016) [26] công bố rằng, nhiều gen tham gia vào quá trình miễn dịch cũng tham gia vào quá trình thành thực buồng trứng. Tuy nhiên, gen này có biểu hiện giảm ở tôm sú tự nhiên trong nghiên cứu hiện tại. Ngoài ra, chúng tôi xác định được gen tổng hợp alpha-L-fucosidase-like protein có hoạt tính thủy phân cũng có biểu hiện giảm ở tôm sú tự nhiên. Fucosidase có tác dụng tiêu hóa các polysaccharide có trong thực vật [27]. Nghiên cứu của Sittikankaew và cs (2020) [28] báo cáo sử dụng thức ăn công nghiệp cho tôm sú mẹ hoạt hóa các gen tham gia vào các quá trình chuyển hóa khác với sử dụng thức ăn tươi sống nuôi vỗ tôm mẹ thành thực. Thức ăn tươi sống bao gồm giun nhiều tơ, mực, nhuyễn thể cung cấp nguồn dinh dưỡng giàu protein và chất béo không bão hòa (PUFA). Đây là nguồn dinh dưỡng cần thiết đã hoạt hóa các gen vitellogenin, collagen alpha-1V chain-like và heme-binding protein 2-like tham gia vào quá trình phát triển buồng trứng và thành thực sinh sản của tôm mẹ. Trong khi thức ăn công nghiệp chỉ hoạt hóa các gen tham gia vào quá trình chuyển hóa để duy trì hoạt động thông thường của tế bào. Điều này có thể giải thích gen tổng hợp enzyme tiêu hóa thức ăn có nguồn gốc từ thực vật giảm biểu hiện ở tôm sú tự nhiên trong quá trình thành thực sinh sản ở nghiên cứu của chúng tôi. Các gen thuộc nhóm cytoskeleton bao gồm actin và catenin alpha là các gen tham gia vào quá trình giảm stress sau khi cắt mắt ở tôm sú mẹ nhằm kích thích buồng trứng thành thực [28]. Các gen này cũng có biểu hiện giảm ở tôm sú tự nhiên khi so sánh với tôm sú gia hóa.



Hình 3. Phân loại các gen có biểu hiện khác biệt ở tôm sú tự nhiên theo khóa thuật ngữ của GO. (A) Các gen có biểu hiện tăng; (B) Các gen có biểu hiện giảm. Hàm $-\log_{10}(\text{padj})$ được sử dụng để điều chỉnh thang đo của ý nghĩa xác suất thống kê.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được cơ sở dữ liệu hệ gen phiên mã của tôm sú tự nhiên và gia hóa ở giai đoạn buồng trứng tiền thành thực, đồng thời xác định được một số gen liên quan đến quá trình phát triển và thành thực của buồng trứng khi so sánh gen biểu hiện giữa hai nhóm tôm sú. Đây là cơ sở dữ liệu hoàn chỉnh có ý nghĩa to lớn trong nghiên cứu cải thiện chất lượng sinh sản của tôm sú gia hóa, góp phần phát triển ngành công nghiệp nuôi tôm sú bền vững ở Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển KH&CN Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.05-2019.36. Nhóm nghiên cứu xin trân trọng cảm ơn NAFOSTED và RIA2 đã cung cấp mẫu tôm sú gia hóa của Chương trình chọn giống tôm sú cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Hiệp hội Chế biến và Xuất khẩu Thủy sản Việt Nam (2021), *Báo cáo xuất khẩu thủy sản Việt Nam năm 2020*, 103tr.
- [2] P. Chromczynski, K. Mackey (1995), "Modification of TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide-and proteoglycan-rich sources", *Biotechniques*, **19**, pp.942-945.
- [3] A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel (2014), "Trimomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data", *Bioinformatics*, **30**(15), pp.2114-2120.
- [4] M.G. Grabherr, et al. (2011), "Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome", *Nat. Biotechnol.*, **29**(7), pp.644-652.
- [5] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.*, **25**, pp.3389-3402.
- [6] B. Buchfink, C. Xie, D.H. Huson (2014), "Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND", *Nature Methods*, **2**, pp.59-60.
- [7] S. Götz, J.M. Garcia-Gomez, J. Terol, T.D. William, S.H. Gagaraj (2008), "High-throughput functional annotation and data mining with Blast2GO suite", *Nucleic Acids Res.*, **36**, pp.3420-3435.
- [8] B. Langmead, C. Trapnell, M. Pop, S.L. Salzberg (2009), "Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome", *Genome Biology*, **10**(3), DOI: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.
- [9] B. Li, C. Dewey (2011), "RSEM: accurate transcript quantification from RNA-seq data with or without a reference genome", *BMC Bioinformatics*, **12**, DOI: 10.1186/1471-2105-12-333.
- [10] M.D. Robinson, A. Oshlack (2010), "A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data", *Genome Biol.*, **11**, p.25.
- [11] T.V. Nguyen, L.W. Ryan, J. Nocillado, M. Le Groumellec, A. Elizur, T. Ventura (2020), "Transcriptomic changes across vitellogenesis in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*), neuropeptides and G protein-coupled receptors repertoire curation", *General and Comparative Endocrinology*, **298**, DOI: 10.1186/gb-2010-11-2-114.
- [12] M.D. Young, M.J. Wakefield, G.K. Smyth, A. Oshlack (2010), "Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias", *Genome Biology*, **11**, pp.4.
- [13] A. Alexa, J. Rahnenfuhrer (2021), *topGO: Enrichment Analysis*

for Gene Ontology, R package version 2.44.0.

- [14] S. Liu, (2013), "Efficient assembly and annotation of the transcriptome of catfish by RNA-seq analysis of a doubled haploid homozygote", *BMC Genomics*, **13**, DOI: 10.1186/1471-2164-13-595.
- [15] H. Sadamoto, H. Takahashi, T. Okada, H. Kenmoku, M. Toyota, Y. Asakawa (2012), "De novo sequencing and transcriptome analysis of the central nervous system of mollusc *Lymnaea stagnalis* by deep RNA sequencing", *PLOS ONE*, **7**, DOI: 10.1371/Journal.pone.0042546.
- [16] D.V. Quyen, H.M. Gan, Y.P. Lee, D.D. Nguyen, T.H. Nguyen, X.T. Tran, V.S. Nguyen, D.D. Khang, C.M. Austin (2020), "Improved genomic resources for the black tiger prawn (*Penaeus monodon*)", *Marine Genomics*, **52**, DOI: 10.1016/j.margen.2020.100751.
- [17] R. Huerlimann, et al. (2018), "De novo assembly, characterization, functional annotation and expression patterns of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) transcriptome", *Sci. Rep.*, **8**, pp.13553, DOI: 10.1038/s41598-018-31148-4.
- [18] M. Poelchau, C. Childers, G. Moore, V. Tsavatapalli, J. Evans, C.Y. Lee, H. Lin, J.W. Lin, K. Hackett (2015), "The i5k workspace@NAL-enabling genomic data access, visualization and curation of arthropod genomes", *Nucleic Acids Research*, **43**, pp.D714-D719.
- [19] C.L. Schoch, et. al. (2020), "NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools", *Database*, **2020**, DOI: 10.1093/database/baaa062.
- [20] Z.Q. Qian (2016), "The complete mitogenome of the dampwood termite *Zootermopsis nevadensis* (Insecta: Isoptera: Termitidae)", *Mitochondrial DNA Part A*, **27**(2), pp.1163-1164.
- [21] S.D. Simpson, J.S. Ramsdell, W.H. Watson, C.C. Chabot (2017), "The draft genome and transcriptome of the Atlantic horseshoe crab, *Limulus polyphemus*", *International Journal of Genomics*, **1017** DOI: 10.1155/2017/7636513.
- [22] W. Cheng, P.C. Chiang, C.Y. Lai, M.S. Yeh (2008), "Expression of clottable protein of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in gonads and its possible role as nutrient source for the embryo", *Dev. Comp. Immunol.*, **32**, pp.1422-1429.
- [23] W. Loongyai, J.C. Avarre, M. Cerutti, E. Lubzens, W. Chotigeat (2007), "Isolation and functional characterization of a new shrimp ovarian peritrophin with antimicrobial activity from *Fenneropenaeus merguensis*", *Marine Biotechnology*, **9**, pp.624-637.
- [24] Z. Qian, et al., (2014), "Identification of ecdysteroid signaling late-response genes from different tissues of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*", *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.*, **172**, pp.10-30.
- [25] Y. Liu, F. Hou, X. Liu (2017), "Characterization and expression analysis of serpin B3, the first clade B serine protease inhibitor in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*", *Developmental and Comparative Immunology*, **72**, pp.103-111.
- [26] H. Ye, X. Li, T. Zheng, X. Liang, J. Li, J. Huang, Z. Pan, Y. Zheng (2016), "The effect of the immune system on ovarian function and features of ovarian germline stem cells", *SpringerPlus*, **5**, DOI: 10.1186/s40064-016-2390-3.
- [27] O. Berteau, I. McCort, N. Goasdoué, B. Tissot, R. Daniel (2002), "Characterization of a new alpha-L-fucosidase isolated from the marine mollusk *Pecten maximus* that catalyzes the hydrolysis of alpha-L-fucose from algal fucoidan (*Ascophyllum nodosum*)", *Glycobiology*, **12**(4), pp.273-282.
- [28] K. Sittikankaew, et al. (2020), "Transcriptome analyses reveal the synergistic effects of feeding and eyestalk ablation on ovarian maturation in black tiger shrimp", *Sci. Rep.*, **10**, DOI: 10.1038/s41598-020-62221-6.

Phân tích *in-silico* xác định và mô tả họ gen kháng *NBS-LRR* ở chuối *Musa acuminata*

Trần Đức Trung*, Tạ Hồng Linh

Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 1/9/2021; ngày chuyển phản biện 6/9/2021; ngày nhận phản biện 7/10/2021; ngày chấp nhận đăng 12/10/2021

Tóm tắt:

Bệnh hại do vi khuẩn, virus là mối đe dọa nghiêm trọng đối với ngành sản xuất chuối trên thế giới nói chung, Việt Nam nói riêng. Ngoài các biện pháp canh tác, việc khai thác và ứng dụng nguồn gen kháng - phần lớn thuộc họ gen *NBS-LRR* (Nucleotide binding site - Leucine rich repeat) trong chọn tạo, cải thiện giống chuối là phương thức bền vững để đối phó với dịch bệnh. Hệ gen loài chuối *Musa acuminata* được giải mã tạo tiền đề cho các nghiên cứu di truyền chuyên sâu, bao gồm xác định họ gen kháng *NBS-LRR*. Trong nghiên cứu này, các công cụ tin sinh học đã được sử dụng để xác định, mô tả cấu trúc và quá trình tiến hóa của 97 gen *NBS-LRR*. Ngoại trừ gen *Ma_NBS_083* thuộc phân họ *RNL*, các gen kháng còn lại ở chuối *M. acuminata* thuộc phân họ *CNL* và hầu hết là gen chứa một exon. 66 gen *NBS-LRR* (68%) được định vị trên 11 nhiễm sắc thể (NST), 38 gen trong số đó (39%) hình thành các cụm gen. Các gen *NBS-LRR* của chuối được chia thành 7 phân nhóm dựa trên sự đa dạng về trình tự và số lượng, cấu trúc các motif bảo thủ đặc trưng cho các vùng chức năng. Kết quả này cung cấp cơ sở khoa học cho các nghiên cứu đánh giá biểu hiện gen kháng và khai thác ứng dụng trong chọn tạo giống chuối.

Từ khóa: cây phát sinh, gen kháng *NBS-LRR*, MEME motif, *Musa acuminata*, phân tích *in-silico*, tiến hóa.

Chỉ số phân loại: 4.6

Giới thiệu

Trải qua quá trình tiến hóa với mối tương tác biến động liên tục từ các tác nhân gây bệnh (virus, vi khuẩn, nấm, sâu bệnh...), giới thực vật đã kiến tạo hệ thống miễn dịch hiệu quả. Tuy nhiên, do không sở hữu hệ miễn dịch thích nghi (adaptive immune system) hay các tế bào miễn dịch lưu động (mobile immune cell) như ở động vật nên sự đáp ứng miễn dịch ở thực vật hoàn toàn phụ thuộc vào hệ thống miễn dịch nội sinh (innate immune system), bao gồm miễn dịch bề mặt tế bào và nội bào. Đáp ứng miễn dịch bề mặt tế bào được khởi động dựa trên cơ chế nhận diện các phân tử ngoại lai (có nguồn gốc từ tác nhân gây bệnh với đặc tính bảo thủ về tiến hóa) bằng các thụ thể nhận diện khuôn mẫu (Pattern recognition receptors - PRRs). Trong khi đó, đáp ứng miễn dịch nội bào được kích hoạt thông qua cơ chế nhận diện (trực tiếp hoặc gián tiếp) các protein từ tác nhân gây bệnh (Avirulence - Avr) xâm nhập nội bào của protein kháng (R) [1, 2] theo cơ chế đặc hiệu đã được Flor mô tả qua mô hình “gen đối gen” [3].

Hầu hết, các protein R ở thực vật được mã hóa bởi họ gen *NBS-LRR* đặc trưng bởi các vùng gắn nucleotide và vùng lặp giàu leucine. Trải qua quá trình tiến hóa, họ gen *NBS-LRR* đã phân thành 3 phân họ khác biệt bởi vùng chức năng đặc trưng tại đầu N của protein được mã hóa, có thụ

thể tương tự là Toll/interleukin-1 (Toll/interleukin 1 receptor like - TIR), vùng xoắn kép (Coiled coil - CC) hoặc vùng kháng bệnh phấn trắng số 8 (Resistance to powdery mildew 8 - RPW8) [4]. Theo đó, các phân họ được định danh là *TIR-NBS-LRR* (*TNL*), *CC-NBS-LRR* (*CNL*) và *RPW8-NBS-LRR* (*RNL*). Các protein *TNL* và *CNL* có chức năng như là cảm biến phát hiện tác nhân gây bệnh thông qua sự bắt gắp hoặc kiểm soát trạng thái các protein tác hiệu của vùng *LRR*, qua đó kích hoạt chuỗi tín hiệu và khởi động đáp ứng miễn dịch của tế bào [5]. Trong khi đó, phân họ *RNL* (bao gồm hai nhóm được đặt tên theo gen chức năng là *ADRI* và *NRG1*) tham gia vận hành quá trình truyền tín hiệu thay vì phát hiện tác nhân gây bệnh [6]. Trong cấu trúc protein *NBS-LRR*, *NBS* là vùng chức năng đặc trưng, dài khoảng 300 axit amin (aa), được cấu trúc bởi 8 motif có mức độ bảo thủ biến thiên giữa các phân họ là P-loop, RNBS-A, Kinase2, RNBS-B, RNBS-C, GLPL, RNBS-D và MHDV. Vùng *LRR* ở đầu C đặc trưng bởi motif LxxLxLxxNxL(s/t)GxLP liên quan đến cấp độ biểu hiện tính kháng của gen *NBS-LRR* [7].

Kế thừa kết quả các nghiên cứu giải mã hệ gen và ứng dụng tin sinh học, họ gen kháng *NBS-LRR* đã được xác định ở nhiều loài thực vật [8-11]. Theo đó, số lượng gen *NBS-LRR* được xác định từ khoảng 50 gen ở đu đủ [12] đến 1.015 gen ở táo [13] và phân bố không đồng đều, thường được

*Tác giả liên hệ: Email: ductrung83@gmail.com

In-silico* genome-wide identification and characterisation of *NBS-LRR* gene family in banana *Musa acuminata

Duc Trung Tran*, Hong Linh Ta

Vietnam Academy of Agricultural Sciences

Received 1 September 2021; accepted 12 October 2021

Abstract:

Various common diseases caused by bacteria and viruses are increasing threats to the production of bananas worldwide. Besides the practical application of cultivation techniques, intensive exploitation of resistant genes, most of which belong to the *NBS-LRR* (Nucleotide-binding site - Leucine-rich repeat) gene family, in fortifying banana's disease resistance, has been considered as a sustainable approach. The recently published genome assembly of *Musa acuminata*, a species of the *Musa* genus native to Southern Asia, has facilitated the genome-wide identification and characterisation of *NBS-LRR* genes. In the present study, an *in-silico* approach was employed to identify and characterise 97 *NBS-LRR* genes and their evolution in *M. acuminata* genome. Except *Ma_NBS_083* belonging to the *RNL* sub-family, other identified genes are members of the sub-family *CNL* and most of them contain only one exon. Sixty-six (66) *NBS-LRR* genes (68%) were mapped on 11 banana chromosomes, among them 38 genes (39%) located in clusters. Phylogenetic analysis in combination with conserved motif identification classified the banana *NBS-LRR* genes into seven groups. This study provides novel insight into the *NBS-LRR* gene family in bananas as a potential resource for further research in functional evaluation and utilisation of resistant genes.

Keywords: evolution, *in-silico* analysis, MEME motifs, *Musa acuminata*, *NBS-LRR* genes, phylogenetics.

Classification number: 4.6

tìm thấy trong các cụm cluster trên các NST [14]. Việc duy trì số lượng lớn gen *NBS-LRR* như vậy phản ánh quá trình đấu tranh sinh học lâu dài ở mức độ phân tử thông qua quá trình tiến hóa giữa thực vật và các tác nhân gây bệnh. Hiểu rõ phân bố trong hệ gen và đường hướng tiến hóa của gen *NBS-LRR* sẽ góp phần quan trọng trong nghiên cứu cải thiện tính kháng cây trồng phục vụ nông nghiệp [7].

Chuối (*Musa* spp.) là cây trồng có giá trị kinh tế và phổ biến ở các vùng nhiệt đới, á nhiệt đới ẩm. Được thuần hóa từ hơn 7.000 năm trước ở khu vực Đông Nam Á, các giống chuối hiện nay là kết quả của quá trình lai khác loài (chủ yếu dựa trên *M. acuminata* và *M. balbisiana*) trong chi chuối *Musa*, được củng cố liên tục và trong thời gian dài bởi quá trình chọn lọc, nhân giống vô tính những dòng nhị bội, đa bội để đáp ứng nhu cầu của con người. Giống Cavendish chiếm hơn một nửa sản lượng chuối thế giới là dòng chuối tam bội vô tính được chọn lọc bởi quá trình này [15]. Chính vì đặc điểm trên, sâu bệnh hại (đặc biệt là các bệnh do virus, vi khuẩn, nấm) ngày càng trở nên thích nghi và dần phá vỡ tính kháng (vốn bị giới hạn do nền di truyền kém đa dạng của chuối) đã trở thành hiểm họa hiện hữu với ngành sản xuất chuối trên thế giới [16]. Thông qua khai thác cơ sở dữ liệu (CSDL) trình tự hệ gen của chuối *M. acuminata* [17], nghiên cứu này sẽ xác định và dự đoán cấu trúc, hướng tiến hóa của họ gen kháng *NBS-LRR*, qua đó góp phần tạo lập cơ sở di truyền phục vụ công tác cải thiện tính kháng bệnh ở chuối.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Trình tự hệ gen và hệ phiên mã của chuối *M. acuminata* được thu thập từ CSDL Banana genome hub (<https://banana-genome-hub.southgreen.fr/>). Hệ gen chuối được giải mã có kích thước 450,6 Mbp (tương đương 75,8% kích thước hệ gen được ước lượng bằng phương pháp Flow cytometry), bao gồm 11 NST giả định và 7.248 scaffold không được lắp ráp.

Họ protein NB-ARC đặc trưng cho các gen *NBS-LRR* thực vật thu nhập từ CSDL Pfam (định danh PF00931).

Phương pháp nghiên cứu

Họ protein NB-ARC được sử dụng làm trình tự tham vấn trong phân tích so sánh tBLASTn (e-value 1e-20) với CSDL hệ gen chuối (đã loại bỏ các scaffold có kích thước <1.000 bp) để xác định và trích xuất các Blast hit không trùng lặp. Bằng công cụ FGENSEH, các gen và protein tương ứng trên các Blast hit được dự đoán thông qua so sánh với CSDL gen của lớp thực vật một lá mầm. Cấu trúc của các protein dự đoán được sàng lọc thông qua so sánh với cơ sở dữ liệu

InterProScan. Chỉ những protein mang vùng chức năng NB-ARC và được mã hóa bởi gen nguyên vẹn mới được sử dụng cho các phân tích cấu trúc tiếp theo.

Cấu trúc của từng gen/protein *NBS-LRR* được chú giải bằng các công cụ: trình tự và cấu trúc exon-intron được xác định từ kết quả dự đoán gen FGENESH [18], vùng xoắn CC được xác định bằng MARCOIL [19], vùng lặp *LRR* được chú giải bằng LRRfinder2.0 [20], các motif bảo thủ của các protein *NBS-LRR* được xác định bằng MEME [21].

Tương đồng trình tự các gen và protein *NBS-LRR* của chuỗi được xác định bằng thuật toán MUSCLE, cây phân loại được xây dựng bằng phương pháp MLM dựa trên mô hình của Whelan và Goldman với giá trị tin cậy bootstrap 500 bằng phần mềm Geneious V11. Mô hình và chiều hướng tiến hóa của các protein *NBS-LRR* được xác định thông qua tỷ lệ giữa đột biến không đồng nghĩa với đột biến đồng nghĩa (Ka/Ks) và các gen *NBS-LRR* được định vị trên các NST chuỗi bằng công cụ TBTools [22].

Kết quả nghiên cứu

Số lượng và phân loại các gen mã hóa *NBS-LRR*

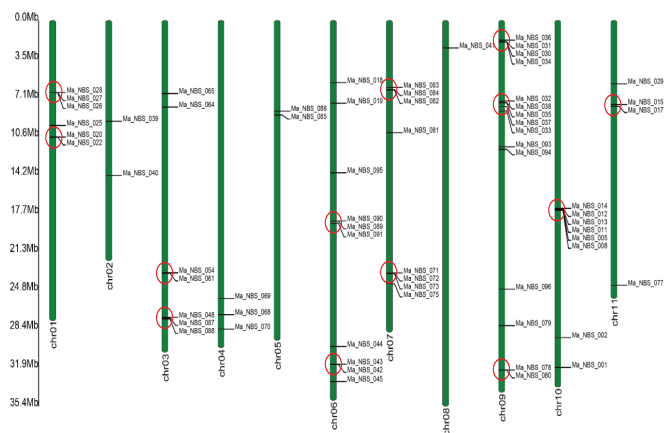
Bằng việc sử dụng họ protein NB-ARC làm trình tự tham vấn để sàng lọc đầy đủ các gen mã hóa *NBS-LRR* tiềm năng, 246 trình tự mã hóa protein NBS đã được phát hiện trên toàn hệ gen chuỗi *M. acuminata* V2.0. Tiếp theo đó, phân tích dự đoán gen trên các vùng trình tự này đã xác định được 97 gen không trùng lặp và nguyên vẹn mã hóa protein NBS (ký hiệu từ *Ma_NBS_001* đến *Ma_NBS_097*). Thông qua bước phân tích chú giải, trình tự và cấu trúc các vùng chức năng đặc trưng (vùng xoắn CC, vùng lặp *LRR* và các vùng chức năng khác) được xác định. Theo đó, 96 gen *NBS-LRR* ở *M. acuminata* thuộc phân họ *CNL* và được phân thành 4 nhóm, bao gồm 44 gen *CC-NBS-LRR*, 9 gen *CC-NBS*, 33 gen *NBS-LRR* và 10 gen *NBS*. Đáng chú ý, đã xác định được 1 gen mã hóa protein *RPW8-NBS-LRR* thuộc phân họ *RNL* (bảng 1).

Bảng 1. Thống kê số lượng gen *NBS-LRR* thuộc các phân họ và phân bố trên các NST trong hệ gen chuỗi *M. acuminata*.

Phân họ	Số lượng												
	Tổng	NST 1	NST 2	NST 3	NST 4	NST 5	NST 6	NST 7	NST 8	NST 9	NST 10	NST 11	Scaffolds
Phân họ <i>CNL</i>													
<i>CC-NBS-LRR</i>	44	2	1	5	2	2	3	4	-	5	2	2	16
<i>CC-NBS</i>	9	-	-	1	-	-	-	-	-	2	3	-	3
<i>NBS-LRR</i>	33	2	1	1	1	-	7	3	1	6	3	2	6
<i>NBS</i>	10	2	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	6
Phân họ <i>RNL</i>													
<i>RPW8-NBS-LRR</i>	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Tổng số	97	6	2	7	3	2	10	8	1	15	8	4	31

Cấu trúc và sự phân bố của các gen *NBS-LRR* trên các NST

Các gen *NBS-LRR* trong hệ gen chuỗi *M. acuminata* có chiều dài trung bình 4.560 bp, biến thiên từ 690 (*Ma_NBS_028*) đến 13.566 bp (*Ma_NBS_094*), số lượng exon trung bình là 2,03. Có 61 (62,9%) gen *NBS-LRR* chỉ có 1 exon. Các gen *NBS-LRR* phân bố trên cả 11 NST giả định. Tuy nhiên, chỉ có 66/97 gen *NBS-LRR* (68%) được định vị trên các NST, 31 gen còn lại (32%) nằm trên các scaffold không được lắp ráp vào các NST. Các gen *NBS-LRR* không phân bố rải rác trên các NST, tập trung nhiều nhất trên các NST 9 (15 gen) và 6 (10 gen) hình thành các cụm gen. Căn cứ vào tiêu chí xác định các cụm gen của Schranz và cs (2006) [23] (khoảng cách giữa 2 gen *NBS-LRR* liền kề không quá 200 kb và không có hơn 8 gen khác) cho thấy, có 38 (39%) gen *NBS-LRR* được định vị trong 13 cụm gen và 35 gen *NBS-LRR* còn lại được xác định là gen đơn (hình 1).



Hình 1. Phân bố trên 11 NST giả định của 66 gen *NBS-LRR* (38 gen được định vị trong 13 cụm gen, vòng tròn đỏ).

Mô hình motif bảo thủ và quan hệ phát sinh giữa các protein *NBS-LRR*

20 motif bảo thủ có kích thước từ 11 (motif 17) đến 72 aa (motif 9) đã được xác định bằng công cụ MEME trên 97 protein *NBS-LRR* là chỉ dấu cho sự đa dạng về cấu trúc của các protein này. Theo vị trí trên trình tự protein, vùng xoắn

kép CC tại đầu N của 53 protein được đại diện bởi các motif 16, 5 và 15. Vùng NBS đặc trưng của toàn bộ protein *NBS-LRR* có kích thước từ 66 đến 351 aa được đại diện bởi các motif 1, 10, 6, 7, 17, 3, 18, 2, 13, 8 và 12. Trong khi đó, các motif 4, 20, 19, 14, 9 và 11 đại diện cho vùng lặp LRR tại đầu C của các protein. Thông qua so sánh với CSDL Pfam, xác định được 10/20 motif bảo thủ tương đồng cao với các vùng chức năng đặc trưng của họ gen *NBS-LRR* thực vật (bảng 2).

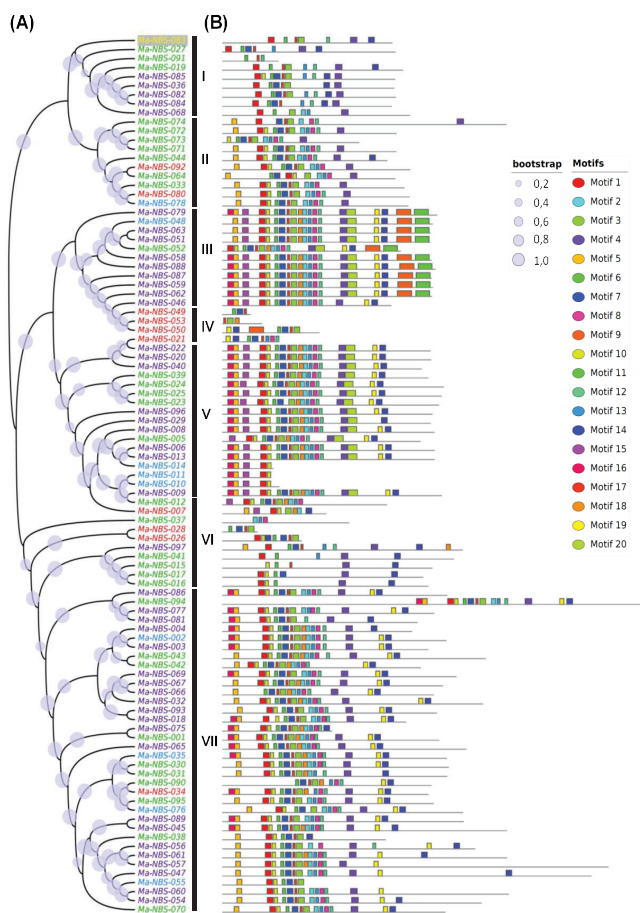
Nhằm đánh giá mô hình cấu trúc và quan hệ tiến hóa giữa các gen *NBS-LRR* ở chuỗi, cây phân loại dựa trên trình tự đầy đủ của 97 protein đã được xây dựng. Theo đó, hầu hết các protein *NBS-LRR* thuộc các nhóm định danh dựa trên chú giải các vùng chức năng thể hiện quan hệ tiến hóa

gần gũi với mức độ tin cậy cao (hình 2A). Kết hợp với mô hình cấu trúc dựa trên số lượng và tổ chức của các motif bảo thủ, các protein *NBS-LRR* cho thấy sự đa dạng về cấu trúc và được phân thành 7 phân nhóm chính (hình 2B). Các phân nhóm I (9 protein), IV (4 protein) và VI (10 protein) có đặc điểm cấu trúc không đặc trưng cho protein *NBS-LRR* do thiếu các motif bảo thủ cho vùng CC ở đầu N, trong khi các motif thành phần vùng NBS và LRR ở đầu C không đồng nhất. *Ma NBS 083* là gen mã hóa protein *RPW8-NBS-LRR* duy nhất của phân họ *RNL* tìm thấy trong hệ gen *M. acuminata* thuộc nhóm này. Trong khi đó, cấu trúc của 10 protein *NBS-LRR* trong phân nhóm II đã có mặt motif 5 đặc trưng cho vùng Rx ở đầu N, hầu hết các motif cấu trúc của vùng NBS và motif 4 của vùng LRR ở đầu C. Cấu trúc xoắn

Bảng 2. Thông tin 10 motif bảo thủ được xác định bởi công cụ MEME tương đồng với các vùng chức năng đã biết của protein R trên CSDL Pfam.

Tên motif và kích thước	MEME logo	Số protein mang motif	Vùng tương đồng trên CSDL Pfam		
			Họ protein	Mô tả	E-value
Motif 1 (29 aa)		86	NB-ARC	Vùng NBS trên các gen kháng <i>NBS-LRR</i>	4,6e-08
Motif 3 (29 aa)		83	NB-ARC	Vùng NBS trên các gen kháng <i>NBS-LRR</i>	5,9e-08
Motif 4 (33 aa)		79	LRR_4	Vùng chứa motif lặp LRR_4 (2 copies)	7,6e-08
Motif 5 (24 aa)		72	Rx_N	Vùng Rx đặc trưng ở đầu N của các protein kháng ở thực vật	4,7e-09
Motif 6 (15 aa)		90	NB-ARC	Vùng NBS trên các gen kháng <i>NBS-LRR</i>	0,00045
Motif 7 (29 aa)		84	NB-ARC	Vùng NBS trên các gen kháng <i>NBS-LRR</i>	0,0021
Motif 9 (72 aa)		11	LRR_4	Vùng chứa motif lặp LRR_4 (2 copies)	0,0042
Motif 15 (29 aa)		29	Matriline_ccoil	Cấu trúc xoắn kép CC đặc trưng	0,008
Motif 16 (29 aa)		39	Rx_N	Vùng Rx đặc trưng ở đầu N của các protein kháng ở thực vật	7,7e-09
Motif 20 (46 aa)		24	LRR_8	Leucine rich repeat	0,0043

CC không có mặt ở các protein trong phân nhóm này. Phân nhóm III bao gồm 11 protein có cấu trúc đầy đủ nhất với sự có mặt của 20 motif bảo thủ đại diện cho các vùng chức năng của protein *NBS-LRR*. 2 motif 9 và 11 bảo thủ cho vùng LRR là điểm đặc trưng phân biệt phân nhóm III với các protein còn lại trong hệ gen chuối. Cấu trúc của phân nhóm V (17 protein) tương đồng với phân nhóm III, ngoại trừ sự vắng mặt của các motif 9 và 11 đặc trưng cho vùng LRR đầu C. 3 protein thuộc phân nhóm CC-NBS (mặc dù thiếu 9/11 motif vùng NBS và các motif vùng LRR) được xếp vào phân nhóm này bởi mức độ tương đồng cao cả về trình tự và cấu trúc vùng CC, NBS với các protein còn lại trong nhóm. 36 protein của phân nhóm VII có cấu trúc đa dạng hơn với đặc điểm chung là thiếu motif 15 đặc trưng cho vùng xoắn kép CC và các motif 20, 9 và 11 đặc trưng cho vùng LRR ở đầu C (hình 2B).



Hình 2. Quan hệ phân loại, cấu trúc và các motif bảo thủ của các gen *NBS-LRR* ở chuối *M. acuminata*. (A) Cây phân loại dựa trên trình tự đầy đủ của 97 protein *NBS-LRR*. Giá trị bootstrap thể hiện mức độ tin cậy của từng nhánh trong cây phân loại (20-100% xác suất). Tên các protein được đánh dấu màu theo phân loại gen *NBS-LRR* dựa trên chú giải các vùng chức năng tại bảng 1; (B) Thành phần và tổ chức của các motif bảo thủ trong cấu trúc các protein *NBS-LRR*. Các motif được ký hiệu từ 1 đến 20 và phân biệt bởi các màu sắc khác nhau. Các protein được biểu thị tỷ lệ với chiều dài thực tế.

Gen lặp và mô hình tiền hóa của các gen *NBS-LRR*

Quá trình phân tán của một họ gen trong hệ gen nhờ các sự kiện sao chép diễn ra trên quy mô toàn hệ gen hoặc một vùng cụ thể trên NST. Trong hệ gen chuối, thông qua so sánh tương đồng trình tự đã phát hiện 28 cặp gen *NBS-LRR* lặp có mức độ tương đồng >80%. Trong số này, 20 cặp được xác định là gen lặp liên tiếp (TD) dựa vào tiêu chí khoảng cách giữa 2 gen dưới 200 kb [23]. 8 cặp gen còn lại có khoảng cách trên 200 kb hoặc nằm trên các NST khác nhau nên được phân loại là gen lặp phân tán (SD) (bảng 3). Các cặp TD phân bố không đồng đều trên các NST của chuối, bao gồm các nhóm lặp của 2, 3 hoặc 5 gen *NBS-LRR* trên các NST số 1, 3, 7, 9, 10 và 11. Trong khi đó, các SD được phát hiện trên NST số 9 (bao gồm 2 gen) và nhóm 4 gen trên NST số 10 và 11 (hình 3).

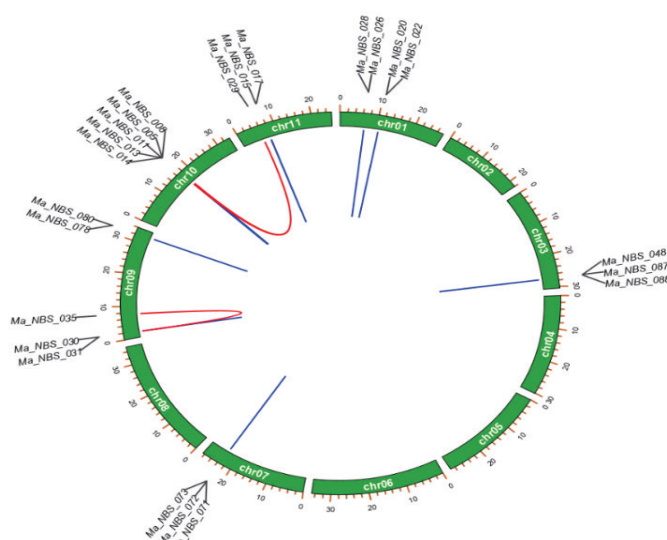
Bảng 3. Mô hình các cặp gen *NBS-LRR* lặp và chiều hướng chọn lọc trong quá trình tiến hóa của hệ gen chuối.

TT	Cặp gen	Mô hình	Ka/Ks	Mya
1	<i>Ma_NBS_028</i> / <i>Ma_NBS_026</i>	TD	0,46	9,02
2	<i>Ma_NBS_020</i> / <i>Ma_NBS_022</i>	TD	0,48	3,95
3	<i>Ma_NBS_048</i> / <i>Ma_NBS_087</i>	TD	0,80	4,68
4	<i>Ma_NBS_048</i> / <i>Ma_NBS_088</i>	TD	0,72	4,94
5	<i>Ma_NBS_088</i> / <i>Ma_NBS_087</i>	TD	0,67	4,85
6	<i>Ma_NBS_071</i> / <i>Ma_NBS_072</i>	TD	0,72	2,98
7	<i>Ma_NBS_073</i> / <i>Ma_NBS_071</i>	TD	1,01	2,17
8	<i>Ma_NBS_073</i> / <i>Ma_NBS_072</i>	TD	1,16	1,76
9	<i>Ma_NBS_031</i> / <i>Ma_NBS_035</i>	SD	0,23	35,59
10	<i>Ma_NBS_030</i> / <i>Ma_NBS_031</i>	TD	0,23	36,23
11	<i>Ma_NBS_030</i> / <i>Ma_NBS_035</i>	SD	0,29	32,33
12	<i>Ma_NBS_078</i> / <i>Ma_NBS_080</i>	TD	0,79	4,58
13	<i>Ma_NBS_014</i> / <i>Ma_NBS_005</i>	TD	0,97	2,27
14	<i>Ma_NBS_014</i> / <i>Ma_NBS_008</i>	TD	0,31	14,61
15	<i>Ma_NBS_014</i> / <i>Ma_NBS_005</i>	TD	0,97	2,27
16	<i>Ma_NBS_014</i> / <i>Ma_NBS_008</i>	TD	0,31	14,61
17	<i>Ma_NBS_014</i> / <i>Ma_NBS_011</i>	TD	0,27	20,07
18	<i>Ma_NBS_014</i> / <i>Ma_NBS_013</i>	TD	0,71	2,17
19	<i>Ma_NBS_014</i> / <i>Ma_NBS_029</i>	SD	0,29	27,83
20	<i>Ma_NBS_011</i> / <i>Ma_NBS_005</i>	TD	0,26	20,10
21	<i>Ma_NBS_011</i> / <i>Ma_NBS_008</i>	TD	0,36	5,38
22	<i>Ma_NBS_005</i> / <i>Ma_NBS_008</i>	TD	0,42	5,07
23	<i>Ma_NBS_005</i> / <i>Ma_NBS_013</i>	TD	0,44	3,80
24	<i>Ma_NBS_008</i> / <i>Ma_NBS_013</i>	TD	0,43	5,56
25	<i>Ma_NBS_029</i> / <i>Ma_NBS_005</i>	SD	0,27	29,36
26	<i>Ma_NBS_029</i> / <i>Ma_NBS_008</i>	SD	0,31	27,03
27	<i>Ma_NBS_029</i> / <i>Ma_NBS_011</i>	SD	0,27	27,77
28	<i>Ma_NBS_015</i> / <i>Ma_NBS_017</i>	TD	0,60	4,39

Mya: triệu năm trước.

Các đột biến liên quan đến một hay một vài nucleotide trên trình tự một gen có thể tạo ra sự thay đổi (đột biến không đồng nghĩa) hoặc không làm thay đổi (đột biến đồng nghĩa) trình tự protein mà gen đó mã hóa. Tỷ lệ *Ka/Ks* của một gen mã hóa protein phản ánh mức độ và chiều hướng của áp lực chọn lọc mà gen đó đang trải qua trong hệ gen. Tỷ lệ *Ka/Ks* < 1 cho thấy một cặp gen đang trải qua quá trình thanh lọc nhằm

loại bỏ những đột biến, trong khi đó $Ka/Ks > 1$ là chỉ dấu của quá trình chọn lọc thích nghi của đột biến [24]. Kết quả xác định chiều hướng chọn lọc của các cặp gen lặp cho thấy, 26 cặp gen *NBS-LRR* trong hệ gen chuối đang trải qua quá trình thanh lọc ($Ka/Ks < 1$) ở các mức độ khác nhau. Thời gian phân kỳ trong hệ gen của cặp gen lặp này ước tính từ 2,17 đến 36,23 triệu năm trước. Trong khi đó, chỉ có 2 cặp gen (*Ma_NBS_073* và *Ma_NBS_071*, *Ma_NBS_073* và *Ma_NBS_072*) đang trải qua quá trình chọn lọc thích nghi ($Ka/Ks > 1$). Thời gian phát sinh của hai cặp gen lặp này khá gần so với các cặp gen còn lại, ước tính khoảng 2 triệu năm trước (bảng 3).



Hình 3. Phân bố của các nhóm gen *NBS-LRR* lặp trong hệ gen *M. acuminata*. Đường nối màu xanh biểu thị TD, đường nối màu đỏ thể hiện SD. Vị trí tương đối của các gen có thể được xác định thông qua ký hiệu và kích thước của các NST.

Bàn luận

M. acuminata là 1 trong 2 loài thuộc chi *Musa* (cùng với *M. balbisiana*) và là tổ tiên của các giống chuối lai lưỡng bội, đa bội phổ biến trong sản xuất hiện nay [25]. Việc phân tích hệ gen *M. acuminata* không chỉ cung cấp luận cứ cho quá trình phát sinh, tiến hóa của các loài thuộc chi *Musa* mà quan trọng hơn là tạo cơ sở khoa học phục vụ cho quá trình cải tạo các giống chuối hiện nay. *NBS-LRR* là họ gen quan trọng quy định tính kháng sâu bệnh hại và đã được xác định ở nhiều loài thực vật thông qua các cách tiếp cận khác nhau [12, 13, 26, 27]. Trong nghiên cứu này, số lượng, cấu trúc, sự phân bố và mô hình tiến hóa của họ gen *NBS-LRR* đã được mô tả trên quy mô toàn hệ gen (phiên bản V2.0) của loài chuối *M. acuminata* [17].

Tổng số 97 gen mã hóa protein *NBS-LRR* đã được xác định trên hệ gen chuối thông qua kết hợp công cụ so sánh trình tự tBLASTn nhằm rà soát các vùng gen tương đồng cao và dự đoán gen FGENESH để xác định chính xác các gen hoàn chỉnh (với trình tự từ vị trí TATA-box của promoter đến vùng PolyA và không chứa các khoảng trống) [28]. Số lượng gen *NBS-LRR* hoàn chỉnh trong hệ gen chuối được xác định đầy đủ hơn so với các công bố trước đây của Martin và cs (2016) [17] (90

gen mã hóa *NBS-LRR*) khi áp dụng thuật toán chú giải hệ gen; Chang và cs (2020) [29] (94 gen mã hóa *NBS-LRR*) dựa trên sàng lọc CSDL chú giải protein của hệ gen *M. acuminata* v2.0. Theo kết quả phân tích mô tả cấu trúc, hầu hết các gen *NBS-LRR* ở chuối thuộc phân họ *CNL* tương tự với thành phần gen kháng ở các cây một lá mầm khác [4]. Đáng chú ý, đã xác định được gen *Ma_NBS-083* duy nhất thuộc nhóm *ADR1* của phân họ *RNL* chưa được phát hiện trong các nghiên cứu trước (chỉ bao gồm các gen thuộc phân họ *CNL*) [17, 29]. Bên cạnh đó, chỉ có 66/97 gen *NBS-LRR* hoàn chỉnh, ít hơn so với con số 100% gen theo nghiên cứu của Chang và cs (2020) [29] định vị trên 11 NST của hệ gen *M. acuminata* V2.0. Sự khác biệt trên do nghiên cứu này sử dụng dữ liệu trình tự hệ gen đầy đủ (bao gồm 11 NST giả định cùng các scaffold chưa được lắp ráp hoàn thiện) và áp dụng ngưỡng chính xác cao (e-value 1e-20) cho các phân tích so sánh trình tự, do đó đã loại bỏ nhiều gen ứng viên có mức độ tương đồng trình tự thấp. Trong khi đó, nghiên cứu của Chang và cs (2020) [29] chỉ khai thác thông tin dự đoán protein đã được chú giải trên các NST giả định hệ gen *M. acuminata* V2.0. Như vậy, nghiên cứu này đã bổ sung thông tin về số lượng cũng như thành phần của họ gen *NBS-LRR* ở chuối *M. acuminata*.

Các protein *NBS-LRR* ở *M. acuminata* có sự đa dạng về trình tự và cấu trúc. Phân tích phân loại kết hợp với số lượng và tổ chức của 20 motif bảo thủ được xác định bởi công cụ MEME đã phân 97 protein *NBS-LRR* thành 7 phân nhóm. Vùng NBS là dấu hiệu đặc trưng cho toàn bộ protein của 7 phân nhóm. Tuy nhiên, so với các phân nhóm còn lại, các protein của phân nhóm I, IV và VI có sự biến động rất rõ ràng về số lượng và cấu trúc các motif bảo thủ của vùng NBS, nhất là các motif bảo thủ tương đồng với vùng NBS tham chiếu trong Pfam (hình 2 và bảng 2). Nếu coi vùng NBS là tiêu chuẩn để dự đoán chức năng của các gen *NBS-LRR* thì điều này là chỉ dấu cho thấy các protein thuộc phân nhóm I, IV và VI ở trong hệ gen chuối hoặc là kết quả của sự thanh lọc các gen dư thừa, hoặc thể hiện sự chuyên biệt hóa cấu trúc của các gen này trong quá trình tiến hóa hệ gen chuối [8]. Các nghiên cứu sâu hơn về biểu hiện gen sẽ giúp làm sáng tỏ giả thuyết này.

Quá trình nhân lên và phân tán của họ gen kháng *NBS-LRR* trong hệ gen không chỉ giúp duy trì số lượng gen kháng cho quá trình biến đổi liên tục đáp ứng mô hình “gen đối gen”, đảm bảo tính kháng của thực vật trước sự tác động không ngừng của tác nhân gây bệnh, mà còn là dấu hiệu quan trọng của sự vận động, tiến hóa của hệ gen thực vật. Thông qua đánh giá mức độ tương đồng và tính toán tỷ số Ka/Ks của các gen *NBS-LRR*, thời điểm phát sinh và phân tán các cặp gen *NBS-LRR* lặp xa nhất có thể ước tính là khoảng 36,23 triệu năm trước, phù hợp với thời điểm tiến hóa phát sinh của chi *Musa* (~50 triệu năm trước) [30]. Bên cạnh đó, 16/26 cặp gen lặp có thời gian phát sinh gần hơn, ước tính trong khoảng 5 triệu năm trước và hầu hết trong quá trình thanh lọc (bảng 3). Đây là minh chứng cho quá trình chọn lọc diễn ra liên tục trong thời gian dài nhằm duy trì tính bảo thủ cấu trúc của gen *NBS-LRR* trong tiến hóa hệ gen chuối. Bên cạnh đó, việc chỉ có 2 cặp gen lặp có thời gian phân kỳ gần đây và đang trong quá trình chọn lọc thích nghi có thể

là chỉ dấu cho số ít những đột biến mới phát sinh và có lợi cho cây chuối. Kết quả này cũng đồng thời phản ánh thực tế vốn gen cây chuối bị thu hẹp do lịch sử hàng nghìn năm thuần hóa và chọn lọc của con người.

Có đến 31/97 gen *NBS-LRR* chưa được định vị trên các NST do thông tin hệ gen *M. acuminata* V2.0 chưa hoàn chỉnh. Do đó, kết quả xác định gen, mô tả cấu trúc protein và đánh giá chiều hướng chọn lọc của các gen *NBS-LRR* trong nghiên cứu này chưa phản ánh đầy đủ nhất bức tranh tiến hóa của họ gen này trong hệ gen chuối. Việc hoàn thiện hệ gen lắp ráp của chuối (*M. acuminata* V4.0) trong thời gian tới [31] sẽ tạo cơ hội cho các phân tích đầy đủ hơn về họ gen này. Mặc dù vậy, các kết quả đạt được đã góp phần làm sáng tỏ những khía cạnh liên quan đến họ gen *NBS-LRR*, tạo nền tảng cho các nghiên cứu khai thác ứng dụng trong chọn tạo và cải thiện tính kháng sâu bệnh ở chuối.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, 97 gen *NBS-LRR* của chuối *M. acuminata* đã được xác định và chia vào 7 phân nhóm đa dạng về số lượng và cấu trúc các motif bảo thủ đại diện cho các vùng chức năng đặc trưng của họ gen *NBS-LRR*. Mô hình tiến hóa các gen *NBS-LRR* cho thấy, quá trình thanh lọc các gen lặp đóng vai trò chủ đạo trong tiến hóa hệ gen chuối, góp phần duy trì sự bảo thủ cấu trúc của họ gen *NBS-LRR*. Kết quả của nghiên cứu này là nguồn thông tin hữu ích cho các nghiên cứu đánh giá biểu hiện gen kháng, phát triển chỉ thị phân tử phục vụ chọn tạo và cải thiện tính kháng sâu bệnh hại chuối bằng chỉ thị phân tử.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài “Nghiên cứu xác định gen tiềm năng kháng bệnh hại trên cây chuối (*Musa* spp.) thông qua phân tích tin sinh học” do Viện Khoa học và Nông nghiệp Việt Nam tài trợ. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.R. Bentham, et al. (2020), “A molecular roadmap to the plant immune system”, *Journal of Biological Chemistry*, **295**(44), pp.14916-14935.
- [2] A. Corrion, B. Day (2015), *Pathogen Resistance Signalling in Plants*, John Wiley & Sons.
- [3] H.H. Flor (1942), “Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*”, *Phytopathology*, **32**, pp.653-669.
- [4] Z.Q. Shao, et al. (2019), “Revisiting the origin of plant *NBS-LRR* genes”, *Trends in Plant Science*, **24**(1), pp.9-12.
- [5] E.J. Andersen, et al. (2018), “Disease resistance mechanisms in plants”, *Genes*, **9**(7), DOI: 10.3390/genes9070339.
- [6] Z. Wu, et al. (2019), “Differential regulation of TNL-mediated immune signaling by redundant helper CNLs”, *New Phytologist*, **222**(2), pp.938-953.
- [7] V. Pandolfi, et al. (2017), “Resistance (R) genes: applications and prospects for plant biotechnology and breeding”, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **18**(4), pp.323-334.
- [8] Z.Q. Shao, et al. (2016), “Large-scale analyses of angiosperm nucleotide binding site - Leucine rich repeat genes reveal three anciently diverged classes with distinct evolutionary patterns”, *Plant Physiology*, **170**(4), pp.2095-2109.
- [9] F. Zheng, et al. (2016), “Molecular phylogeny and dynamic evolution of disease resistance genes in the legume family”, *BMC Genomics*, **17**, DOI 10.1186/s12864-016-2736-9.

- [10] H. Wei, et al. (2020), “Genomic organization and comparative phylogenetic analysis of *NBS-LRR* resistance gene family in *Solanum pimpinellifolium* and *Arabidopsis thaliana*”, *Evolutionary Bioinformatics*, **16**, pp.1-13.
- [11] P. Li, et al. (2016), “RGAugury: a pipeline for genome-wide prediction of resistance gene analogs (RGAs) in plants”, *BMC Genomics*, **17**(1), DOI 10.1186/s12864-016-3197-x.
- [12] B.W. Porter, et al. (2009), “Genome-wide analysis of *Carica papaya* reveals a small NBS resistance gene family”, *Molecular Genetics and Genomics*, **281**(6), pp.609-626.
- [13] P. Arya, et al. (2014), “Genome-wide identification and expression analysis of NBS - encoding genes in *Malus x Domestica* and expansion of NBS genes family in Rosaceae”, *PLOS ONE*, **9**(9), DOI: 10.1371/journal.pone.0107987.
- [14] H. Mizuno, et al. (2020), “Evolutionary dynamics and impacts of chromosome regions carrying R-gene clusters in rice”, *Sci. Rep.*, **10**(1), DOI: 10.1038/s41598-020-57729-w.
- [15] M. Busche, et al. (2020), “Genome sequencing of *Musa acuminata* dwarf Cavendish reveals a duplication of a large segment of chromosome 2”, *G3: Genes - Genomes - Genetics*, **10**(1), pp.37-42.
- [16] X. Perrier, et al. (2011), “Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(28), pp.11311-11318.
- [17] G. Martin, et al. (2016), “Improvement of the banana “*Musa acuminata*” reference sequence using NGS data and semi-automated bioinformatics methods”, *BMC Genomics*, **17**(1), DOI 10.1186/s12864-016-2579-4.
- [18] V. Solovyev, et al. (2006), “Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters”, *Genome Biology*, **7**(1), DOI:10.1186/gb-2006-7-s1-s10.
- [19] M. Delorenzi, T. Speed (2002), “An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions”, *Bioinformatics*, **18**(4), pp.617-625.
- [20] V. Offord, D. Werling (2013), “LRRfinder2.0: a webserver for the prediction of leucine-rich repeats”, *Innate Immun.*, **19**(4), pp.398-402.
- [21] T.L. Bailey, et al. (2009), “MEME suite: tools for motif discovery and searching”, *Nucleic Acids Research*, **37**, pp.W202-W208.
- [22] C. Chen, et al. (2020), “TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data”, *Molecular Plant*, **13**(8), pp.1194-1202.
- [23] M.E. Schranz, et al. (2006), “The ABC’s of comparative genomics in the Brassicaceae: building blocks of crucifer genomes”, *Trends Plant Sci.*, **11**(11), pp.535-542.
- [24] Z. Yang, J.P. Bielawski (2020), “Statistical methods for detecting molecular adaptation”, *Trends Ecol. Evol.*, **15**(12), pp.496-503.
- [25] Z. Wang, et al. (2019), “*Musa balbisiana* genome reveals subgenome evolution and functional divergence”, *Nature Plants*, **5**(8), pp.810-821.
- [26] T.P. Frazier, et al. (2016), “Identification, characterization, and gene expression analysis of nucleotide binding site (NB)-type resistance gene homologues in switchgrass”, *BMC Genomics*, **17**(1), DOI 10.1186/s12864-016-3201-5.
- [27] R. Lozano, et al. (2015), “Identification and distribution of the *NBS-LRR* gene family in the Cassava genome”, *BMC Genomics*, **16**, DOI: 10.1186/s12864-015-1554-9.
- [28] G.F. Ejigu, J. Jung (2020), “Review on the computational genome annotation of sequences obtained by next generation sequencing”, *Biology*, **9**(9), DOI: 10.3390/biology9090295.
- [29] W. Chang, et al. (2020), “*NBS-LRR* gene family in banana (*Musa acuminata*): genome-wide identification and responses to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1 and tropical race 4”, *European Journal of Plant Pathology*, **157**, pp.549-563.
- [30] P. Christelova, et al. (2011), “A multi gene sequence-based phylogeny of the Musaceae (banana) family”, *BMC Evol. Biol.*, **11**, DOI: 10.1186/1471-2148-11-103.
- [31] C. Belser, et al. (2021), “Telomere-to-telomere gapless chromosomes of banana using nanopore sequencing”, *Commun. Biol.*, **4**, DOI: 10.1038/s42003-021-02559-3.

Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Sơn đậu căn (*Sophora tonkinensis* Gagnep) thông qua nuôi cấy đốt thân

Nguyễn Thị Lại^{1*}, Nguyễn Thị Bình¹, Phạm Anh Đức¹, Phạm Hương Sơn¹, Lương Thúy Hằng¹,
Nguyễn Minh Nam¹, Nguyễn Thị Ngọc Bích¹, Đinh Thu Linh²

¹Viện Ứng dụng Công nghệ

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 11/10/2021; ngày chuyển phản biện 15/10/2021; ngày nhận phản biện 11/11/2021; ngày chấp nhận đăng 16/11/2021

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, các tác giả trình bày kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Sơn đậu căn thông qua nuôi cấy đốt thân. Kết quả cho thấy, trên môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 0,75 mg/l TDZ thích hợp nhất cho tái sinh chồi Sơn đậu căn *in vitro* từ mẫu ban đầu. Môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 0,75 mg/l TDZ, 0,5 mg/l IBA, 2,0 g/l peptone, 30 g/l dịch nghiền cà rốt, pH 5,5 là thích hợp nhất cho nhân nhanh chồi *in vitro* (20,60 chồi/mẫu, chiều cao 3,75 cm/chồi và 4,6 lá/chồi sau 8 tuần nuôi cấy). Tỷ lệ chồi ra rễ cao nhất, chất lượng bộ rễ tốt nhất trên môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,0 mg/l α NAA. Hỗn hợp đất mùn + bột xơ dừa (tỷ lệ 70:30) được xác định là giá thể phù hợp nhất cho sinh trưởng của cây con trong vườn ươm, sau 10 tuần nuôi trồng, tỷ lệ sống đạt 92%, chiều cao cây đạt 10,3 cm, cho 7,2 lá/cây và 4,3 rễ mới/cây.

Từ khóa: cây thuốc, đốt thân, giá thể, nhân giống, Sơn đậu căn.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Sơn đậu căn thuộc họ Đậu (Fabaceae), là loài cây dược liệu quý và có giá trị kinh tế cao, mọc rải rác trên các sườn núi đá vôi thuộc vùng nhiệt đới nóng ẩm phía Nam Trung Quốc và Bắc Việt Nam.

Trong cây Sơn đậu căn có chứa hơn 150 thành phần hóa học, bao gồm alkaloid, flavonoid, polysaccharid, triterpenoid, phenol, matrine, oxymatrine... [1]. Sơn đậu căn có tác dụng điều trị bệnh chàm, viêm cổ tử cung, nhiễm trùng họng cấp tính, đau họng, kiết lỵ cấp tính và xuất huyết đường tiêu hóa [2], điều trị viêm gan B, vàng da, rối loạn nhịp tim, chống khối u, bảo vệ gan, chống viêm, tăng cường miễn dịch, chống loạn nhịp tim, bổ máu, tác dụng hạ huyết áp... [3], chống ung thư biểu mô vòm họng, gan, dạ dày, phổi và bệnh bạch cầu [4].

Do nhu cầu sử dụng dược liệu tăng mạnh trong thời gian gần đây nên loài Sơn đậu căn đã bị khai thác mạnh. Mặt khác, tỷ lệ nảy mầm từ hạt trong tự nhiên thấp và vùng phân bố của Sơn đậu căn bị tàn phá nghiêm trọng nên loài cây này đang trong tình trạng gần như tuyệt chủng và được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam (phần II - Thực vật, 2007) [5]. Vì vậy, việc nghiên cứu nhân nhanh giống dược liệu quý Sơn đậu căn sẽ giúp tạo được nguồn cây giống với số lượng lớn trong một thời gian ngắn và sạch bệnh, đồng đều, ổn định về mặt di truyền, giá cả phù hợp là vấn đề rất cần thiết. Cho đến nay, các nghiên cứu về nhân giống Sơn đậu căn chủ yếu

từ gieo hạt và giâm hom, nuôi cấy từ đỉnh sinh trưởng, đốt thân vẫn còn rất hạn chế. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Sơn đậu căn thông qua phương pháp nuôi cấy đốt thân nhằm góp phần bảo tồn và phát triển loài dược liệu quý của Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Cành Sơn đậu căn khỏe mạnh, sạch bệnh được thu thập từ huyện Trùng Khánh, tỉnh Cao Bằng ở độ cao khoảng 1.000 m trở lên so với mặt nước biển.

Các thí nghiệm được thực hiện tại Trung tâm Ươm tạo Công nghệ và Doanh nghiệp KH&CN, Viện Ứng dụng Công nghệ từ tháng 2/2020 đến tháng 8/2021.

Phương pháp

Khử trùng: đoạn thân bánh tẻ chứa mắt ngủ có kích thước khoảng 2 cm, sau khi cắt từ cây mẹ được rửa sạch bằng nước xà phòng, sau đó khử trùng bằng dung dịch NaOCl 3% trong 15 phút và rửa lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng. Mẫu được cấy trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) bổ sung 30 g/l sucrose, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, pH 5,5. Các chồi hình thành từ đốt thân được dùng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.

Tái sinh chồi từ đốt thân: mẫu vô trùng được chuyển

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

Study on *in vitro* propagation of *Sophora tonkinensis* Gagnep through stem node culture

Thi Lai Nguyen^{1*}, Thi Binh Nguyen¹, Anh Duc Pham¹,
Huong Son Pham¹, Thuy Hang Luong¹,
Minh Nam Nguyen¹, Thi Ngoc Bich Nguyen¹, Thu Linh Dinh²

¹National Center for Technological Progress

²Faculty of Biology, University of Science, VNU, Hanoi

Received 11 October 2021; accepted 16 November 2021

Abstract:

In the present study, authors propagated *Sophora tonkinensis* Gagnep plants using stem nodal culture. The results indicated that on MS medium supplemented with 30 g/l sucrose, 5.5 g/l agar, 200 ml/l coconut water, 1 g/l activated charcoal, 0.75 mg/l TDZ shoots proliferated from stem segments have the best count and height of shoots. The most appropriate medium for multiplication of shoots was the MS medium supplemented with 30 g/l sucrose, 5.5 g/l agar, 200 ml/l coconut water, 1 g/l activated charcoal, 0.75 mg/l TDZ, 0.5 mg/l IBA, 2.0 g/l peptone, 30 g/l carrot puree, pH 5.5 with the results of 20.60 shoots/explant, shoot height of 3.75 cm and 4.6 leaves/shoot after 8 weeks of culture. Root formation of shoots carried out on the MS medium supplemented with 30 g/l sucrose, 5.5 g/l agar, 200 ml/l coconut water, 1 g/l activated charcoal, 1.0 mg/l α NAA gave the best result. In the nursery, a mixture of humus + coconut fiber powder (70:30 ratio) was regarded as the best substrate due to the high survival rate of plantlets (92%) and healthy plantlets (10.30 cm high with 7.2 leaves and 4.3 new roots/a plantlet) at 10 weeks after planting.

Keywords: medicinal plant, propagation, *Sophora tonkinensis* Gagnep, stem node, substrate.

Classification number: 4.6

sang nuôi cấy trên môi trường MS có 30 g/l sucrose, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, bổ sung BA (0,5-3,0 mg/l) và TDZ với các nồng độ khác nhau (0,25-1,5 mg/l) để thăm dò khả năng tái sinh chồi.

Nhân nhanh chồi: các chồi hình thành từ đốt thân được cấy trên môi trường cơ bản MS có 30 g/l sucrose, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, bổ sung 0,75 mg/l TDZ + IBA (0-1,0 mg/l) + 2 g/l petone; 0,75 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA + 2 g/l petone + dịch nghiền cà rốt (0-40 g/l) để thăm dò khả năng nhân chồi.

Tạo rễ từ chồi *in vitro*: các chồi Sơn đậu căn *in vitro* có 2-3 lá, chiều cao 2-3 cm, chồi khỏe chưa có rễ được tách ra và cấy sang môi trường ra rễ có bổ sung α NAA ở các nồng độ 0, 0,5, 1,0, 1,5 và 2 mg/l, 30 g/l sucrose, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, pH 5,5 để khảo sát khả năng hình thành rễ.

Chuyển cây con *in vitro* trồng ngoài điều kiện tự nhiên: các cây con tái sinh hoàn chỉnh đạt chiều cao 5-7 cm, có 2-3 lá và 3-5 rễ, để bình cây ra ngoài vườn ươm 3 ngày. Cây con được rửa hết thạch, rải đều trên khay sạch để trong 1 giờ, rồi trồng vào chậu nhựa mềm kích thước 6x10 cm trên các giá thể: đất sạch Tribat, mùn cưa, đất mùn + bột xơ dừa (tỷ lệ 70:30), đất mùn + mùn cưa (tỷ lệ 50:50), sau trồng 2 tuần phun phân bón MK 30:10:5 liều lượng 0,5 g/l/lần/tuần để khảo sát khả năng sinh trưởng của cây *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm.

Theo dõi, đánh giá các chỉ tiêu: mỗi công thức thí nghiệm cấy 30 mẫu, sau 8 tuần nuôi cấy tiến hành thu thập số liệu, chỉ tiêu theo dõi là số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), chiều cao cây (cm), số lá (lá), số rễ (rễ), chiều dài rễ (cm). Ở giai đoạn vườn ươm, tỷ lệ sống (%), chiều cao cây (cm), số lá (lá) và số rễ mới (rễ) được đánh giá sau 10 tuần nuôi trồng.

Điều kiện nuôi cấy: thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 2.500 lux, nhiệt độ 25±2°C và độ ẩm không khí 70-80%. Trồng cây trong nhà lưới có mái che mưa và che lưới đen, độ che sáng >70%, tưới phun sương đều 2 lần/ngày.

Xử lý số liệu: sử dụng các phương pháp thống kê sinh học để phân tích các số liệu thí nghiệm bằng phần mềm Excel 2010 và IRRISTAT5.0.

Kết quả và bàn luận

Ảnh hưởng của BA đến khả năng tái sinh chồi từ đốt thân

Khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi từ các đốt thân cây Sơn đậu căn sau 8 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA đến khả năng tái sinh chồi.

Nồng độ BA (mg/l)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
0 (Đ/C)	0,50 ^f	1,25 ^e
0,5	1,10 ^e	1,75 ^c
1,0	1,70 ^d	1,90 ^{bc}
1,5	1,90 ^{bc}	2,01 ^b
2,0	2,80^a	2,37^a
2,5	2,02 ^b	1,45 ^d
3,0	1,82 ^{cd}	1,20 ^e
<i>LSD</i> _{0,05}	0,14	0,11
<i>CV</i> (%)	4,5	3,8

Đ/C: đối chứng; trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả bảng 1 cho thấy, khi bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy đã có tác dụng tích cực lên sự tái sinh và sinh trưởng chồi, tuy nhiên nồng độ BA khác nhau thì có sự ảnh hưởng khác nhau. Ở nồng độ 2,0 mg/l BA cho thấy, chồi cây sinh trưởng tốt nhất, số chồi tái sinh là 2,8 chồi/mẫu, chiều cao cây đạt 2,37 cm. Khi tăng nồng độ BA lên 2,5 mg/l, số chồi/mẫu, chiều cao chồi giảm rõ rệt và có biểu hiện biến dị ở nồng độ 3,0 mg/l BA. Điều này có thể giải thích BA cao có tác dụng ức chế sự hình thành chồi.

Ảnh hưởng của TDZ đến khả năng tái sinh chồi

Bảng 2. Ảnh hưởng của TDZ đến khả năng tái sinh chồi.

Nồng độ TDZ (mg/l)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
0 (Đ/C)	0,60 ^c	1,25 ^d	Chồi bé, có màu xanh
0,25	1,60 ^b	1,67 ^b	Chồi bình thường, có màu xanh
0,5	2,00 ^b	1,92 ^a	Chồi bình thường, có màu xanh
0,75	3,10^a	2,01^a	Chồi khỏe, có màu xanh đậm
1,0	2,30 ^{ab}	1,98 ^a	Chồi yếu, có màu nâu đen
1,25	2,10 ^b	1,42 ^c	Chồi yếu, có màu nâu đen
1,5	1,50 ^b	1,15 ^d	Chồi yếu, có màu nâu đen và chết
<i>LSD</i> _{0,05}	0,88	0,10	
<i>CV</i> (%)	2,6	3,1	

Kết quả bảng 2 cho thấy, TDZ ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng phát sinh hình thái và tái sinh chồi Sơn đậu căn. Ở nồng độ 0,75 mg/l TDZ, số lượng chồi trên mẫu đạt được tương đối cao (3,10 chồi/mẫu), chiều cao chồi đạt 2,01 cm, chồi khỏe, có màu xanh đậm. Khi tăng nồng độ TDZ lên 1,0 mg/l, số chồi/mẫu giảm xuống đáng kể, đồng thời mẫu có hiện tượng chuyển sang màu nâu đen. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Dương Tấn Nhựt (2011) [6] khi cho rằng, TDZ là chất có hoạt tính cytokinin và cũng có hoạt tính auxin nên khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ cao thường ức chế sự tái sinh, dẫn đến hiện tượng mẫu chuyển sang màu nâu đen hoặc chết.

Ảnh hưởng của TDZ và IBA tới khả năng nhân nhanh chồi

Kết quả khảo sát các nồng độ IBA kết hợp với TDZ về khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi từ đốt thân cây Sơn đậu căn sau 8 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 3. Kết quả cho thấy, khi kết hợp giữa IBA và TDZ có sự thúc đẩy tái sinh chồi, số lượng và chiều cao chồi lớn hơn khi sử dụng TDZ riêng lẻ.

Bảng 3. Kết quả ảnh hưởng của tổ hợp TDZ + IBA đến khả năng nhân nhanh chồi (sau 8 tuần nuôi cấy).

Công thức thí nghiệm	Chất kích thích sinh trưởng (mg/l)		Số chồi (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
	TDZ	IBA				
CT1 (Đ/C)	0,75	0,0	3,4 ^d	2,02 ^d	3,5 ^b	Chồi nhỏ, lá bé
CT2	0,75	0,25	8,3 ^b	2,63 ^b	3,6 ^{ab}	Chồi bình thường, lá bé
CT3	0,75	0,50	12,5^a	3,10^a	3,9^a	Chồi to, khỏe, lá màu xanh
CT4	0,75	0,75	7,2 ^c	2,40 ^d	3,1 ^c	Chồi bình thường, lá bé
CT5	0,75	1,00	3,0 ^e	1,95 ^d	2,4 ^d	Chồi nhỏ, lá cong, vàng nhạt
<i>LSD</i> _{0,05}			0,65	0,21	0,35	
<i>CV</i> (%)			4,9	4,7	4,8	

Kết quả bảng 3 cho thấy, khi bổ sung IBA với nồng độ 0,25-1,0 mg/l, kết hợp với 0,75 mg/l TDZ vào môi trường nuôi cấy đã cải thiện số chồi Sơn đậu căn từ 3,0 đến 12,5 chồi/mẫu sau 8 tuần nuôi cấy. Số chồi tăng dần khi tăng nồng độ IBA từ 0,25 đến 0,5 mg/l. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ IBA lên 0,75 mg/l đã ức chế khả năng nhân chồi. Điều này cho thấy, khi nồng độ IBA thấp sẽ kích thích sự sinh trưởng của chồi cây, còn ở nồng độ cao sẽ ức chế sự sinh trưởng chồi, làm chồi sinh trưởng chậm, chồi nhỏ, lá cong và vàng nhạt. Số chồi đạt cao nhất là 12,5, chiều cao chồi 3,1 cm và số lá đạt 3,9 khi bổ sung 0,5 mg/l IBA vào môi trường nuôi cấy.

Ảnh hưởng của dịch nghiền cà rốt đến khả năng nhân nhanh chồi

Bảng 4. Kết quả ảnh hưởng của dịch nghiền cà rốt đến khả năng nhân nhanh chồi (sau 8 tuần nuôi cấy).

Hàm lượng dịch nghiền cà rốt (g/l)	Số chồi (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
0	12,5 ^c	3,12 ^c	3,8 ^c	Chồi to, khỏe, lá xanh
10	13,8 ^{bc}	3,20 ^b	4,0 ^{bc}	Chồi to, khỏe, lá xanh
20	16,0 ^b	3,36 ^b	4,2 ^b	Chồi to, khỏe, lá to màu xanh
30	20,60^a	3,75^a	4,6^a	Chồi to khỏe, lá to màu xanh đậm
40	15,3 ^{bc}	3,31 ^b	3,7 ^c	Chồi bình thường, lá màu xanh nhạt
<i>LSD</i> _{0,05}	3,38	0,26	0,30	
<i>CV</i> (%)	5,0	4,3	4,0	

Kết quả bảng 4 cho thấy, dịch nghiền cà rốt có tác dụng tốt đối với quá trình hình thành và sinh trưởng của chồi Sơn đậu căn. Các hàm lượng dịch nghiền cà rốt khác nhau, sự hình thành và sinh trưởng chồi cây cũng khác nhau, dịch nghiền cà rốt ở nồng độ 30 g/l bổ sung vào môi trường nuôi cấy cho kết quả tốt nhất (20,6 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt

3,75 cm, 4,6 lá/chồi). Điều này có thể giải thích do trong cả rễ có chứa các nhóm chất cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của cây như: protein 0,9%, chất béo 0,2%, carbohydrate 10,6%, Ca 80 mg/100 g, Fe 2,2 mg/100 g, P 53 mg/100 g, cytokinin, vitamin, axit amin và sterol [7]. Tuy nhiên, khi bổ sung hàm lượng dịch nghiền cà rốt tăng lên 40 g/l thì sự hình thành và sinh trưởng của chồi có xu hướng giảm dần, chồi sinh trưởng chậm và lá màu xanh nhạt. Như vậy, hàm lượng 30 g/l là thích hợp nhất cho giai đoạn nhân nhanh chồi *in vitro* Sơn đậu căn.

Ảnh hưởng của α NAA đến khả năng tạo rễ cây con *in vitro*

Rễ đóng vai trò hấp thu nước và chất dinh dưỡng từ môi trường nuôi cấy đưa lên lá để thực hiện hoạt động quang hợp và tổng hợp các chất hữu cơ. Do đó, số lượng và chất lượng rễ ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất cây trồng. Auxin thường được sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật nhằm kích thích sự phân chia tế bào và hình thành rễ. Khả năng tái sinh rễ *in vitro* của các chồi Sơn đậu căn sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung các nồng độ α NAA được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của α NAA đến khả năng tạo rễ cây con *in vitro* (sau 8 tuần nuôi cấy).

Nồng độ α NAA (mg/l)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Số rễ (rễ)	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng rễ
0 (Đ/C)	3,60 ^d	4,5 ^d	0,00 ^d	0,00 ^e	Không xuất hiện rễ
0,5	6,23 ^b	5,4 ^{bc}	3,80 ^b	2,70 ^c	Rễ khỏe và nhiều lông hút
1,0	6,86 ^a	6,5 ^a	5,80 ^a	3,65 ^a	Rễ khỏe, to và trắng, nhiều rễ phụ
1,5	6,16 ^{bc}	5,8 ^b	3,60 ^b	3,02 ^b	Đầu rễ trắng và đều
2,0	5,10 ^c	5,0 ^{cd}	2,40 ^c	2,33 ^d	Rễ mảnh, đầu rễ có màu nâu
LSD _{0,05}	0,43	0,56	0,26	0,22	
CV%	4,2	5,0	4,5	4,9	

Kết quả bảng 5 cho thấy, các chồi Sơn đậu căn hoàn toàn không tạo rễ trên môi trường MS không bổ sung α NAA. Tại nồng độ 1,0 mg/l α NAA bổ sung vào môi trường nuôi cấy sau 8 tuần theo dõi cây đạt các chỉ tiêu sinh trưởng tốt nhất, chiều cao cây đạt 6,86 cm, số lá đạt 6,5, số rễ 5,80 và chiều dài rễ đạt 3,65 cm, chất lượng rễ rất tốt, màu trắng, khỏe, to và nhiều rễ phụ thuận lợi cho cây sinh trưởng và phát triển ở giai đoạn vườn ươm. Khi tiếp tục tăng nồng độ α NAA từ 1,5 đến 2 mg/l có sự ức chế kéo dài và giảm số lượng rễ tạo thành, rễ mảnh, đầu rễ có màu nâu. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Zhao và cs (2004) [8] khi sử dụng α NAA ở nồng độ 5,37 μ M cho quá trình ra rễ *in vitro* loài *Sophora flavescens*.

Ảnh hưởng của các loại giá thể đến tỷ lệ sống của cây con *in vitro*

Sau khi cảm ứng tạo rễ để tạo cây hoàn chỉnh, cây con *in vitro* được chuyển ra vườn ươm và theo dõi sau 10 tuần.

Bảng 6. Ảnh hưởng của các loại giá thể đến tỷ lệ sống của cây con *in vitro* (sau 10 tuần nuôi trồng).

Công thức	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Số rễ mới xuất hiện (rễ)	Chất lượng cây
CT1	70,0 ^c	7,62 ^c	6,40 ^b	2,5 ^c	Cây còi, lá màu xanh nhạt
CT2	78,0 ^b	8,21 ^b	6,60 ^{ab}	3,3 ^{bc}	Cây bình thường, lá màu xanh
CT3	92,0 ^a	10,30 ^a	7,20 ^a	4,3 ^a	Cây cứng khỏe, mập, lá to màu xanh đậm
CT4	89,0 ^a	9,43 ^a	6,80 ^{ab}	3,9 ^{ab}	Cây khỏe, lá màu xanh
LSD _{0,05}	6,09	1,15	0,71	0,84	
CV (%)	6,7	6,5	5,3	5,2	

Ghi chú: CT1: đất sạch Tribat; CT2: mùn cưa; CT3: đất mùn + bột xơ dừa (tỷ lệ 70:30); CT4: mùn cưa + đất mùn (tỷ lệ 50:50).

Kết quả bảng 6 cho thấy, khả năng thích nghi của cây Sơn đậu căn nuôi cấy mô khi đưa ra vườn ươm tương đối cao, tỷ lệ sống đạt 70-92% tùy thuộc vào loại giá thể. Trong đó, giá thể đất mùn + bột xơ dừa (tỷ lệ 70:30), phun phân bón MK 30:10:5 hàm lượng 0,5 g/l/lần/tuần cho tỷ lệ cây sống cao nhất (92%), chiều cao cây đạt 10,30 cm, với 7,20 lá/cây và số rễ mới xuất hiện là 4,3. Về hình thái, cây cứng khỏe, bộ lá phát triển tốt, lá to màu xanh đậm, rễ mập khỏe và hình thành nhiều rễ mới. Giá thể bột xơ dừa nhẹ, thoát nước tốt đã giúp hệ rễ phát triển mạnh, kết hợp với đất mùn được hình thành do quá trình tích lũy và phân giải không hoàn toàn trong điều kiện yếm khí xác thực vật, giàu chất khoáng và tươi xốp phù hợp cho cây Sơn đậu căn sinh trưởng. Tiếp đến là giá thể đất mùn cưa + đất mùn cũng cho tỷ lệ sống đạt khá cao (89,0%). Còn giá thể mùn cưa thoát nước nhanh, nên cây dễ héo, riêng giá thể đất sạch Tribat do giữ nước cao, gây độ chặt cho giá thể, nên khi tưới nước lâu ngày dễ bị nén chặt xuống gây bí rễ.

Như vậy, giá thể đất mùn + bột xơ dừa (tỷ lệ 70:30) và kết hợp phun phân bón MK 30:10:5 hàm lượng 0,5 g/l/lần/tuần thích hợp chuyển cây con Sơn đậu căn ra giai đoạn vườn ươm.

Kết luận

Môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 0,75 mg/l TDZ là phù hợp nhất cho tái sinh chồi Sơn đậu căn *in vitro* từ mẫu ban đầu sau 8 tuần theo dõi.

Trên môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 0,75 mg/l TDZ, 0,5 mg/l IBA, 2,0 g/l peptone, 30 g/l dịch nghiền cà rốt, pH 5,5 là thích hợp nhất cho nhân nhanh *in vitro* cây Sơn đậu căn, cho 20,60 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt 3,75 cm, với 4,6 lá/chồi sau 8 tuần theo dõi.

Môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 1,0 mg/l α NAA, pH 5,5

thích hợp nhất cho sự hình thành rễ *in vitro* của cây Sơn đậu căn, chiều cao cây đạt 6,86 cm, số lá đạt 6,5, số rễ đạt 5,80 và chiều dài rễ đạt 3,65 cm sau 8 tuần theo dõi.

Hỗn hợp đất mùn + bột xơ dừa (tỷ lệ 70:30) được xác định là giá thể phù hợp nhất cho sinh trưởng của cây con trong vườn ươm với tỷ lệ sống đạt 92%, chiều cao cây đạt 10,3 cm, 7,2 lá/cây và 4,3 rễ mới/cây sau 10 tuần nuôi trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Z.P. Chen, et al. (2018), “Research progress on extraction and biological activity of effective components of *Sophora tonkinensis* Gagnep”, *Applied Chemical Industry*, **47**, pp.1237-1240.
- [2] L.N. Zheng, et al. (2011), “Research progress on chemical compositions of *Sophora tonkinensis* radix et rhizoma related to its efficacy and toxicity”, *Food Drug*, **13**, pp.205-209.
- [3] Y. Zhang, Z.X. Dong, L.Y. Jin (2013), “Arsenic trioxide-induced hERG K⁺ channel deficiency can be rescued by matrine and oxymatrine through up-regulating transcription factor Sp1 expression”, *Biochem. Pharmacol.*, **85**, pp.59-68.
- [4] Shuo Wang, et al. (2021), “Chloroform extract from *Sophora Tonkinensis* Gagnep. inhibit proliferation, migration, invasion and promote apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells by silencing the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway”, *Journal of Ethnopharmacology*, **271**, pp.1-13.
- [5] Bộ Khoa học và Công nghệ - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007), *Sách Đỏ Việt Nam, Phần II*, Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, tr.257.
- [6] Dương Tấn Nhựt (2011), *Công nghệ Sinh học thực vật: Nghiên cứu cơ bản và ứng dụng*, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [7] Meutia Zahara, et al. (2017), “The effects of different media, sucrose concentrations and natural additives on plantlet growth of *Phalaenopsis* hybrid pink”, *Food/Feed Science and Technology*, **60**, pp.1-15.
- [8] D.L. Zhao, et al. (2004), “*In vitro* micropropagation of a medicinal plant species *sophora flavescens*”, *Biologia Plantarum*, **47(1)**, pp.117-120.

Nghiên cứu đặc điểm của gen chalcone isomerase phân lập từ cây sắn dây (*Pueraria montana* var. *lobata*)

Trần Thị Bích Ngọc¹, Nguyễn Tiến Dũng², Huỳnh Thị Thu Huệ^{3,4*}

¹Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng

³Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

⁴Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

Ngày nhận bài 16/8/2021; ngày chuyển phản biện 20/8/2021; ngày nhận phản biện 20/9/2021; ngày chấp nhận đăng 24/9/2021

Tóm tắt:

Chalcone isomerase (CHI) được biết là enzyme quan trọng tham gia vào quá trình sinh tổng hợp các hoạt chất như flavonoid, isoflavonoid và anthocyanin. Enzyme này đã được nghiên cứu ở một số loài thực vật họ đậu, tuy nhiên ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào công bố về gen mã hóa CHI của cây sắn dây *Pueraria montana* var. *lobata* (*P. lobata*). Nghiên cứu này được thực hiện nhằm cung cấp thông tin, đặc điểm về gen mã hóa CHI thông qua việc nhân gen bằng RT-PCR, giải trình tự nucleotide, so sánh phân tích đặc điểm vùng chức năng trên trình tự gen và amino acid. Kết quả giải trình tự gen CHI bằng phương pháp Sanger cho thấy, vùng CDS có chiều dài 672 bp mã hóa cho 224 amino acid. So sánh trình tự nucleotide và amino acid giữa gen CHI của *P. lobata* và gen tham chiếu cùng loài (D63577.1) cho thấy mức độ tương đồng là 99,7%. 2 thay đổi nucleotide trên gen CHI làm thay đổi amino acid nhưng không nằm trong vị trí hoạt động bảo thủ của enzyme. Các vị trí hoạt động là một số amino acid bảo thủ (như liên quan đến liên kết hydro hoặc trung tâm liên kết cơ chất) cũng hiện diện trong gen CHI của *P. lobata*. Sử dụng SWISS-MODEL xây dựng mô hình cấu trúc protein cho thấy, protein CHI của *P. lobata* tương thích gần nhất với protein này của *Medicago sativa* - đã được xác định cấu trúc, với các vùng cấu trúc xoắn α và phiến gấp β hoàn toàn tương đồng.

Từ khóa: chalcone isomerase, flavonoid, gen CHI, *P. lobata*.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Sắn dây là cây thuốc nam được dùng để chữa bệnh trong y dược cổ truyền ở châu Á [1], với bộ phận sử dụng chính là rễ, có tác dụng chữa cảm sốt, say rượu, kiết lỵ cấp tính cùng những lợi ích tiềm năng trong chữa bệnh tiểu đường và tim mạch... [2-5]. Hiện nay, việc sử dụng *P. lobata* làm nguyên liệu thực phẩm, thực phẩm chức năng và trong mỹ phẩm khá phổ biến [6], do nó là một nguồn chất từ thực vật có tác dụng chống oxy hóa, đường hóa protein và các hoạt động tái tạo da [7]. Các chất chuyển hóa thứ cấp được sử dụng để cải thiện sức khỏe con người như giảm mức cholesterol và ngăn ngừa một số bệnh ung thư [1]. Ngoài ra, Ahn và cs (2019) [8] còn quan tâm đến tác động phụ thuộc của genistein có trong rễ cây *P. lobata* lên sự kích hoạt mạng lưới nội chất và tác dụng chống tăng sinh qua con đường apoptosis chứ không phải mạng lưới nội chất trong tế bào ung thư vú MCF-7.

Gen CHI mã hóa enzyme CHI ở nhiều loài thực vật tham gia vào quá trình chuyển hóa theo con đường phenylpropanoid

để tạo ra flavonoid và isoflavonoid. Trong con đường tổng hợp đó, CHI (E.C.5.5.1.6) xúc tác sự tạo vòng của chalcone (4, 2', 4', 6'-tetrahydroxychalcone) và 6'-deoxychalcone (4, 2', 4'-trihydroxychalcone) để tạo thành (2S)-naringenin (5, 7, 4'-trihydroxyflavanone) và (2S)-5-deoxyflavanone (7, 4'-dihydroxyflavanone), đây là một bước quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp flavonoid [9].

Đã có nhiều nghiên cứu về gen mã hóa CHI, một họ gồm 4 loại protein CHI, CHI loại I chuyển chalcone naringenin thành naringenin phổ biến trong giới thực vật [10, 11], trong khi CHI loại II điển hình được biết là “đặc hiệu” cho cây họ đậu [12]. Do đó, việc nghiên cứu đầy đủ các đặc tính của gen CHI được tiến hành trên nhiều loài thực vật như một số cây thuộc họ đậu, ngô, *Arabidopsis* và *Petunia hybrid*... [13-17]. Gần đây, gen CHI từ đậu tương cũng đã được nghiên cứu và biểu hiện tăng cường trong các cây đậu tương và thổ nhàn sâm chuyển gen nhằm tăng cường hàm lượng daidzein và genistein hoặc flavonoid tổng số [18, 19]. Đối với cây *P. lobata*, một nhóm các sản phẩm phenol tự nhiên đã được nghiên cứu do có hàm lượng cao và tầm quan trọng của nó

*Tác giả liên hệ: Email: hueigr76@gmail.com

Characterisation of chalcone isomerase gene isolated from *Pueraria montana* var. *lobata* plant

Thi Bich Ngoc Tran¹,
Tien Dung Nguyen², Thi Thu Hue Huynh^{3, 4*}

¹Vietnam National University of Agriculture

²Regional Research and Development Institute

³Institute of Genome Research, VAST

⁴Graduate University of Science and Technology, VAST

Received 16 August 2021; accepted 24 September 2021

Abstract:

Chalcone isomerase (CHI) is well-known as an important enzyme in the biosynthetic pathways such as flavonoid, isoflavonoid, and anthocyanin biosynthesis. The enzyme was investigated in some kinds of plants in Fabaceae but no research was conducted about the *CHI* gene of *Pueraria montana* var. *lobata* (*P. lobata*) in Vietnam. In order to provide more information and characterisation of the gene, our study isolated the *CHI* gene by RT-PCR and Sanger sequencing. The sequence of the *CHI* gene was analysed with nucleotide and deduced amino acid sequences to find the main domains. A full-length CDS of *CHI* gene from *P. lobata* is 672 bp encoded 224 amino acids. By using bioinformatic tools to compare, the isolated gene shared 99.7% homology with the same species reference (code D63577.1). Two different nucleotides in the gene were altered the amino acids in the protein, but the differences have not happened in active sites. Additionally, the conserved amino acids related to active catalysis of a hydrogen bond network also appeared in the *P. lobata* *CHI* gene. SWISS-MODEL was used to build the complete protein modeling showing that *P. lobata* CHI protein was the most similar with CHI of *Medicago sativa* - was defined structure in which all alpha-helix and beta-helix were completely homologies.

Keywords: chalcone isomerase, *CHI* gene, flavonoid, *P. lobata*.

Classification number: 4.6

[20, 1]. Nghiên cứu của Korsangruang và cs (2010) [21] cho thấy, sự biểu hiện của CHI ở rễ cao nhất so với các bộ phận khác của cây. Ngoài ra, 2 nghiên cứu nhân dòng và biểu hiện của gen *CHI1* và *CHI2* phân lập từ *P. lobata*, trong đó, gen *CHI1* được đưa vào vector pET-3d đã được Terao và cs (1996) [22] biểu hiện thành công ở *E. coli*. Gen *CHI2* được xác định trình tự và đưa vào vector pDEST17 để biểu hiện ở *E. coli* [19]. Tuy nhiên, số lượng các nghiên cứu công bố về gen *CHI* của cây *P. lobata* trên thế giới vẫn còn hạn chế. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nhân gen và xác định trình tự đoạn gen *CHI* ở cây sắn dây nhằm mục đích phân tích sự đa hình và đặc điểm vùng chức năng trên gen *CHI*, phục vụ nghiên cứu ứng dụng gen mã hóa enzyme CHI trong các nghiên cứu sau này.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Các mẫu củ cây sắn dây *P. lobata* 1 năm tuổi được thu thập tại huyện Phú Bình, tỉnh Thái Nguyên. Việc định danh về hình thái do Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật thực hiện và Viện Nghiên cứu Hệ gen định danh bằng chỉ thị phân tử (kết quả không đưa vào nghiên cứu này). Sau khi thu và làm sạch, mẫu được đưa vào dung dịch bảo quản RNA và lưu giữ trong -80°C.

Phương pháp

Tách chiết RNA tổng số: RNA tổng số được tách chiết bằng phương pháp sử dụng Trizol và loại bỏ những tạp chất (lipid, protein, hợp chất thứ cấp...) bằng chloroform, kết tủa RNA bằng isopropanol lạnh. RNA tổng số được hòa tan trong nước đã được xử lý DEPC, sau đó xác định nồng độ RNA bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 260 nm [22].

Khuếch đại gen *CHI* bằng phương pháp RT-PCR: để chuẩn bị cho phản ứng RT-PCR, RNA tinh sạch được sử dụng làm khuôn để tổng hợp cDNA bằng cách sử dụng bộ KIT Revert Aid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher KIT). Sự khuếch đại gen *CHI* của *P. lobata* được thực hiện với 1 cặp mồi 5'-AAAGAGTGTTTGAGAATGGCG-3' và 5'-ATCACTTTCCTCAACTCAGAC-3', được thiết kế dựa vào trình tự tham chiếu trên NCBI (D63577.1). Tổng thể tích phản ứng RT-PCR là 25 µl bao gồm 1 U Tag Dream polymerase, 10X buffer Tag polymerase, 10 mM dNTPs, 10X cDNA template, 10 µM primer và nước tinh sạch. Chu kỳ nhiệt được thiết kế như sau: biến tính ở 94°C trong 3 phút; 30 chu kỳ (94°C trong 1 phút, 58°C trong 30 phút, 72°C trong 45 giây), sau đó kéo dài 72°C trong 5 phút và giữ ở 4°C. Sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 0,8% để kiểm tra sự có mặt của đoạn gen với kích

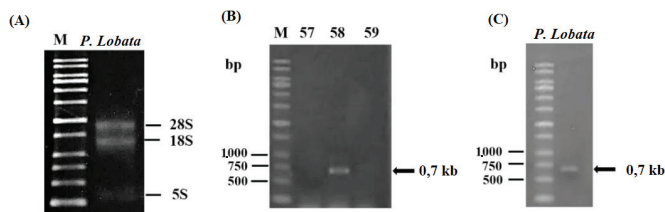
thuốc dự kiến 700 bp.

Giải trình tự DNA bằng phương pháp Sanger: trước khi xác định trình tự với bộ kit Big Dye Terminator (ABI Foster City, Mỹ) trên hệ thống Applied Biosystems™ 3500, các sản phẩm khuếch đại đã được tinh sạch bằng bộ kit OMEGA Biotek. Các trình tự nucleotide sau đó được phân tích, chỉnh sửa và so sánh bằng phần mềm BioEdit, BLAST. Protein được dự đoán nằm trong vùng bảo thủ và motif của từng trình tự amino acid được dự đoán bằng phần mềm của NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) và phần mềm dự đoán motif (<https://www.genome.jp/tools/motif/>). Phần mềm SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) được sử dụng để xây dựng mô hình cấu trúc protein.

Kết quả và bàn luận

Khuếch đại gen *CHI* từ *P. lobata* bằng RT-PCR

RNA tổng số (hình 1A) sử dụng làm khuôn cho tổng hợp cDNA và khuếch đại gen *CHI* bằng RT-PCR thực hiện theo mô tả của Sambrook và Russell (2001) [23], 3 nhiệt độ gắn mỗi khác nhau đã được thực hiện. Cuối cùng, sản phẩm PCR được tinh sạch và điện di trên gel agarose 0,8% nhằm kiểm tra chất lượng và độ đặc hiệu (hình 1). RNA tổng số có chất lượng rõ, nét và đáp ứng yêu cầu cho tổng hợp cDNA (hình 1A).

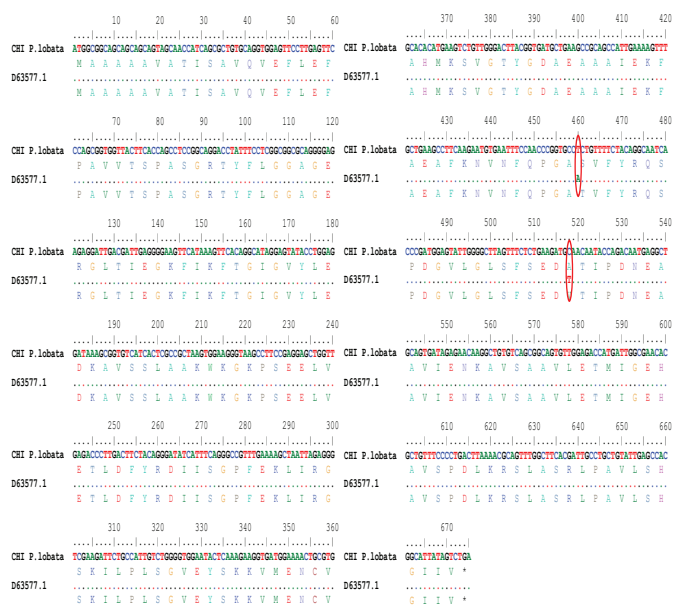


Hình 1. Hình ảnh điện di gen *CHI* của *P. lobata* trên gel agarose. M: marker 1 kb (InTron); (A) Kết quả của quá trình tách chiết RNA toàn phần; (B) Kết quả phản ứng RT-PCR gen *CHI* của *P. lobata* ở các nhiệt độ khác nhau (57, 58 và 59°C); (C) Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR.

Kết quả trong hình 1B cho thấy, sản phẩm PCR ở mẫu nghiên cứu thu được bằng DNA rõ ràng, với kích thước khoảng 0,7 kb phù hợp với kích thước tính toán lý thuyết, xuất hiện ở nhiệt độ gắn mỗi tốt nhất 58° và không có ở nhiệt độ khác (57 hoặc 59°C). Ngoài ra, tất cả các đoạn môi còn dư lại đều được loại bỏ để tạo ra sản phẩm tinh sạch tốt và chất lượng cao, đảm bảo trình tự DNA có thể được xác định chính xác (hình 1C). Như vậy, gen *CHI* của *P. lobata* được khuếch đại thành công với kích thước đúng theo tính toán.

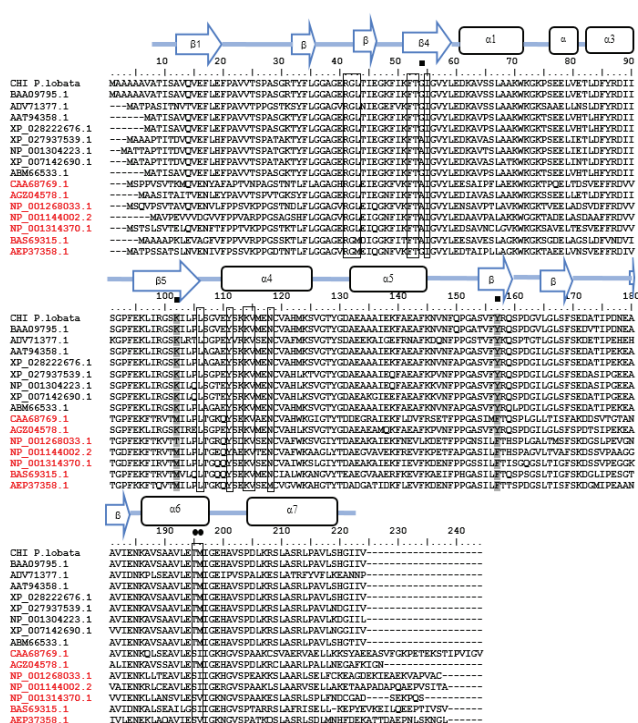
Phân tích trình tự nucleotide của gen *CHI* phân lập từ *P. lobata*

Kết quả giải trình tự DNA bằng phương pháp Sanger thể hiện đoạn gen phân lập được là ORF hoàn chỉnh mã hóa gen *CHI* của *P. lobata*. Trình tự này có kích thước 674 bp, mã hóa cho 224 amino acid. Với 99,7% là hệ số tương đồng giữa gen *CHI* của *P. lobata* và trình tự tham chiếu D63577.1 được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm BLAST, có 2 vị trí nucleotide sai khác dẫn đến sai khác 2 vị trí amino acid là T (460), C (518) (hình 2) được quan sát thấy ở gen *CHI* của *P. Lobata*, trong khi trên trình tự tham chiếu tương ứng là A (460) và T (518). Ở trình tự amino acid suy diễn, vị trí serin (154), alanine (173) trong gen *CHI* ở mẫu nghiên cứu và ở trình tự tham chiếu (D63577.1) tương ứng là threonine (154), valine (173). Những sự khác nhau này có thể cho thấy sự đa hình của gen *CHI* của *P. lobata* ở Việt Nam so với trình tự tham chiếu, do không làm thay đổi khung đọc cũng như số lượng amino acid ở protein suy diễn.



Hình 2. Sự sắp xếp theo cặp của gen *CHI* phân lập từ *P. lobata* trong nghiên cứu và gen tham chiếu trên NCBI (D63577.1). Các vòng tròn màu đỏ đại diện cho các nucleotide khác nhau tạo ra các amino acid khác nhau.

Trình tự amino acid suy diễn từ gen *CHI* của *P. lobata* được so sánh với trình tự của 8 loài trong họ *Fabaceae* và những loài khác đã được công bố trình tự CDS bằng cách sử dụng phần mềm BLAST và BioEdit (hình 3). Sau đó, các trình tự amino acid suy diễn được dự đoán những vị trí thuộc vùng bảo thủ bằng công cụ Conserved Domains của NCBI.



Hình 3. So sánh trình tự amino acid suy diễn từ gen *CHI* của *P. lobata* và protein CHI của các loài trong họ *Fabaceae* cùng các loài khác. BAA09795.1 (*P. lobata*), ADV71377.1 (*P. lobata*), AAT94358.1 (*Glycine max*), XP_028222676.1 (*G. soja*), XP_027937539.1 (*Vigna unguiculata*), NP_001304223.1 (*V. radiata*), XP_007142690.1 (*Phaseolus vulgaris*), ABM66533.1 (*Glycyrrhiza uralensis*), CAA68769.1 (*Petunia hybrida*), AGZ04578.1 (*Medicago sativa*), NP_001268033.1 (*Vitis vinifera*), NP_001144002.2 (*Zea mays*), NP_001314370.1 (*Gossypium hirsutum*), BAS69315.1 (*Lilium speciosum*), AEP37358.1 (*Chrysomelid morifolium*) từ cơ sở dữ liệu NCBI; khoảng vùng chữ nhật hiển thị những amino acid liên kết (2S)-naringenin trong phức hợp CHI-(2S)-naringenin; các amino acid của trung tâm liên kết hydro được biểu thị hình chữ nhật tô màu đen; các vị trí hoạt động chính được ghi nhận bằng các chấm màu đen; trình tự CHI của họ *Fabaceae* có tên màu đỏ, trình tự các loài không thuộc họ *Fabaceae* có tên màu đen.

Khi phân tích các vùng chức năng liên quan trong cấu trúc của CHI nhận thấy, vai trò của các liên kết hydro là một yếu tố quan trọng với chức năng xúc tác của enzyme này [23], có nhiều amino acid bảo thủ đã được đề cập trong các công bố trước đây là các vị trí hoạt động trong CHI của Alfalfa, bao gồm vị trí hoạt động nằm trên chuỗi β 3a (Arg-36, Gly-37, Leu-38), β 3b (Phe-47, Thr-48, Ile-50), α 4 (Tyr-106, Lys-109, Val-110, Asn-113), Thr-190 và Met-191 [9]. Các vị trí amino acid quan trọng này đều có ở trình tự amino acid suy diễn của gen *CHI* trong nghiên cứu này tại các vị trí hoạt động nằm trên chuỗi β 3a (Arg-41, Gly-42, Leu-43), β 3b (Phe-52, Thr-53, Ile-55), α 4 (Tyr-111, Lys-114, Val-115, Asn-118), α 6 (Thr-195, Met-196) và những biến đổi amino acid trong trình tự của gen *CHI* trong nghiên cứu này đều không nằm ở những vị trí hoạt động (hình 3).

Đáng chú ý, tất cả các trình tự CHI loại II trong họ *Fabaceae* thường có Thr-190 và Met-191 ghi nhận tính bảo thủ cao cho phép enzyme tạo ra một liên kết không chỉ với naringenin-chalcone mà còn liên kết hiệu quả với 6'-deoxychalcone. 2 vị trí này của *P. lobata* cũng là Thr-195 và Met-196. Tuy nhiên, ở một số loài, việc thay thế chúng bằng các gốc Ser và Ile là để tăng liên kết với vòng trihydroxy của chất nền liên kết, có thể bị ảnh hưởng bởi liên kết 6'-deoxychalcone [12] (hình 3).

Tạo mô hình cấu trúc protein 3 chiều của CHI *P. lobata*



Hình 4. Cấu trúc 3 chiều của gen *CHI* từ *P. lobata*. Hình chữ nhật thể hiện chuỗi xoắn alpha, mũi tên biểu thị chuỗi xoắn beta. Màu xanh lam đậm trên vùng trình tự cho biết độ tin cậy cao nhất, tiếp theo là màu xanh lam nhạt hơn và màu đỏ.

Như thể hiện trong hình 4, mô hình protein 3 chiều suy diễn từ trình tự gen *CHI* của *P. lobata* điển hình được xác định qua SWISS-MODEL. Chuỗi đơn của 224 amino acid được xử lý bằng phương pháp tinh thể học tia X, với độ đồng nhất của trình tự từng cặp là 80,93% và độ phân giải cao 2,4 Å với cấu trúc chalcone - flavonone isomerase 1 của *Medicago sativa* trong dữ liệu. Việc xây dựng protein được suy diễn dựa trên mô hình tương đồng cấu trúc và được đánh giá bằng cách sử dụng Global Model Quality Estimate (GMQE) giá trị từ 0 đến 1 và điểm Quaternary Structure Quality Estimate (QSQE) ở khoảng 0 (hoặc >-4) (bảng 1). Nói chung, điểm GMQE cao là 0,86 và với 0,96 độ bao phủ cho thấy, độ tin cậy và chính xác cao của kết quả mô hình hóa cấu trúc. Giá trị QMEAN (-0,2) được tính toán cho thấy, sự nhất quán tốt giữa cấu trúc mô hình và thực nghiệm có kích thước tương tự.

Bảng 1. Các thông số chất lượng mô hình hóa.

Mẫu	Độ tương đồng	Dạng chuỗi	Phương pháp	Độ bao phủ	GMQE	QMEAN	Mô tả
6cjo.1.A	80,93%	đơn	X-ray 2.4Å ^a	0,96	0,86	-0,2	Chalcone - flavonone isomerase 1. Cấu trúc tinh thể của Chalcone - flavonone isomerase từ <i>M. sativa</i> với đột biến G95S.

Qua phân tích so sánh trình tự nucleotide và amino acid của gen *CHI* đã phân lập cho thấy, đoạn gen có đầy đủ các vị trí hoạt động quan trọng cần có của *CHI* và với dự đoán cấu trúc 3 chiều nhận thấy, các vùng cấu trúc xoắn α và phiến gấp β hoàn toàn tương đồng với các vùng cấu trúc

đã được chỉ ra ở enzyme CHI1 của *M. sativa*. 2 sự thay đổi nucleotide trên trình tự gen làm thay đổi amino acid nhưng không nằm trong trung tâm hoạt động của enzyme. Tầm quan trọng và khả năng ứng dụng của các gen thuộc họ *CHI* đã được chứng minh trong nghiên cứu chuyển gen *GmCHI* vào cây thảo nhân sâm của Thi Nhu Trang Vu và cs (2018) [19] khi biểu hiện tăng cường nhờ promoter CaMV35S đã làm tăng sự tích lũy flavonoid ở cây chuyển gen lên 7 lần, hay nghiên cứu của Huu Quan Nguyen và cs (2020) [18] trên cây đậu tương chuyển gen *GmCH1A* cho thấy, cây chuyển gen đã có hàm lượng daidzein và genistein tăng lên một cách đáng kể. Do đó, việc dự đoán này rất có ý nghĩa cho định hướng nghiên cứu ứng dụng gen *CHI* và enzyme CHI trong các nghiên cứu tiếp theo.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, gen *CHI* từ cây sắn dây đã được phân lập và xác định trình tự với chiều dài trên 700 bp, trong đó vùng CDS mã hóa cho 224 amino acid, có 2 vị trí sai khác về nucleotide và amino acid so với gen tham chiếu (D635771.1). Gen mã hóa *CHI* của *P. lobata* chứa các vùng chức năng chính và bảo thủ cao giúp duy trì cấu trúc và chức năng của nó tương tự như gen của nhiều loài trong họ và tương đồng cao với CHI1. Kết quả bước đầu phân tích đặc điểm gen *CHI* ở cây sắn dây của Việt Nam giúp định hướng trong nghiên cứu ứng dụng gen *CHI* và enzyme CHI trong các nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] X. Wang, et al. (2019), "Identification of Three (Iso) flavonoid Glucosyltransferases from *Pueraria lobata*", *Front Plant Sci.*, **10**, DOI: 10.3389/fpls.2019.00028.

[2] K.H. Wong, et al. (2011), "Kudzu root: traditional uses and potential medicinal benefits in diabetes and cardiovascular diseases", *J. Ethnopharmacol.*, **134**, pp.584-607.

[3] Z. Zhang, et al. (2013), "*Radix puerariae*: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use", *J. Clin. Pharmacol.*, **53**, pp.787-811.

[4] S.C. Mun, G.S. Mun (2015), "Dynamics of phytoestrogen, isoflavonoids, and its isolation from stems of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi growing in Democratic People's Republic of Korea", *J. Food Drug Anal.*, **23**, pp.538-544.

[5] X.Z. He, et al. (2011), "A genomic approach to isoflavone biosynthesis in kudzu (*Pueraria lobata*)", *Planta*, **233**, pp.843-855.

[6] W. Cherdshewasart, et al. (2008), "Determination of the estrogenic activity of wild phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* by MCF-7 proliferation assay", *J. Reprod Dev.*, **54**, pp.63-67.

[7] D. Tungmunthum, et al. (2020), "A promising view of Kudzu plant, *Pueraria montana* var. *lobata* (Willd.) sanjappa & pradeep: flavonoid phytochemical compounds, taxonomic data, traditional uses and potential biological activities for future cosmetic application", *Cosmetics*, **7**, DOI: 10.3390/cosmetics7010012.

[8] S.Y. Ahn, et al. (2019), "Dual effects of isoflavonoids from *Pueraria lobata* roots on estrogenic activity and anti-proliferation of MCF-7 human breast carcinoma cells", *Bioorg. Chem.*, **83**, pp.135-144.

[9] J.M. Jez, et al. (2000), "Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase", *Nat. Struct. Biol.*, **7**, pp.786-791.

[10] L. Ralston, et al. (2005), "Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and II chalcone isomerases", *Plant Physiol.*, **137**, pp.1375-1388.

[11] N. Shimada, et al. (2003), "A cluster of genes encodes the two types of chalcone isomerase involved in the biosynthesis of general flavonoids and legume-specific 5-deoxy(iso)flavonoids in *Lotus japonicus*", *Plant Physiol.*, **131**, pp.941-951.

[12] A.X. Cheng, et al. (2017), "Identification of chalcone isomerase in the basal land plants reveals an ancient evolution of enzymatic cyclization activity for synthesis of flavonoids", *New Phytol.*, **217**, pp.909-924.

[13] A.J. Van Tunen, et al. (1988), "Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes", *EMBO J.*, **7**, pp.1257-1263.

[14] E.R. Blyden, et al. (1991), "Sequence analysis of a chalcone isomerase cDNA of *Phaseolus vulgaris* L.", *Plant Mol. Biol.*, **16**, pp.167-169.

[15] E. Grotewold, T. Peterson (1994), "Isolation and characterization of a maize gene encoding chalcone flavanone isomerase", *Mol. Gen. Genet.*, **242**, pp.1-8.

[16] M. Dastmalchi, S. Dhaubhadel (2015), "Soybean chalcone isomerase: evolution of the fold, and the differential expression and localization of the gene family", *Planta*, **241**, pp.507-523.

[17] W. Jiang, et al. (2015), "Role of a chalcone isomerase-like protein in flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*", *J. Exp. Bot.*, **66**, pp.7165-7179.

[18] Huu Quan Nguyen, et al. (2020), "Overexpressing *GmCH1A* increases the isoflavone content of transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, **56**, pp.842-850.

[19] Thi Nhu Trang Vu, et al. (2018), "Overexpression of the *Glycine max* chalcone isomerase (*GmCHI*) gene in transgenic *Talinum paniculatum* plants", *Turk J. of Bot.*, **42**, pp.551-558.

[20] W. Cherdshewasart, et al. (2007), "Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**, pp.428-434.

[21] S. Korsangruang, et al. (2010), "Cloning of gene encoding chalcone isomerase (CHI) from *P. candollei* and expression of genes involved isoflavonoid biosynthesis pathway in seedling plants", *Planta Med.*, **76**, DOI: 1055/s-0030-1264316.

[22] Y. Terai, et al. (1996), "Cloning of chalcone-flavanone isomerase cDNA from *Pueraria lobata* and its overexpression in *Escherichia coli*", *Protein Expr. Purif.*, **8**, pp.183-190.

[23] J. Sambrook, D.W. Russell (2001), *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor.

TỔNG MỤC LỤC 2021

TT	Tác giả	Tên bài	Số	Trang
Khoa học Tự nhiên				
1	Phạm Đức Quang, Bành Quốc Tuấn, Vũ Thanh Tùng, Lê Quang Thái, Nguyễn Quốc Đạt	Ghi nhận hình ảnh cắt lớp 3 chiều sử dụng hiệu ứng dịch chuyển pha Doppler với nguồn sáng phổ rộng.	1	1
2	Nguyễn Ngọc Anh, Nguyễn Xuân Hải, Nguyễn Quang Hưng, Lê Tấn Phúc, Phạm Đình Khang	Các tham số mật độ mức cập nhật của hạt nhân ^{153}Sm trong mẫu khí Fermi dịch chuyển ngược.	1	6
3	Lưu Đàm Ngọc Anh, Nguyễn Hải Đăng, Bùi Văn Hường, Ninh Khắc Bản, Nguyễn Chi Mai, Lưu Đàm Cư	Đa dạng thành phần loài cây tỉnh dầu khu vực Tây Nguyên và hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định, kháng viêm của tinh dầu Giỏi chanh (<i>Magnolia citrata</i> Noot. & Chalermglin) và Mật hương (<i>Hedyosmum orientale</i> Merr. & Chun).	1	11
4	Hà Quang Anh, Lý Việt Hùng, Đào Văn Chi	Nghiên cứu phương pháp xác định hệ số phát tán CH_4 trong khai thác than lộ thiên ở vùng Quảng Ninh.	1	16
5	Ngô Thanh Thủy, Nguyễn Quốc Chương, Đỗ Minh Truyền, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Xuân Việt, Huỳnh Xuân Tín	Ứng dụng BIM lập mô hình thông tin công trình cầu vượt đảm bảo liên hợp bê tông cốt thép tại ngã tư 550, tỉnh Bình Dương.	1	22
6	Luyện Quốc Vương, Bùi Văn Dân, Nguyễn Trọng Nghĩa, Hoàng Thị Hiền, Hồ Trường Giang, Trần Trung, Trần Thanh Bình, Chu Văn Tuấn	Nghiên cứu hình thái bề mặt của màng polyaniline ảnh hưởng đến hiệu suất cảm biến khí NH_3 ở nhiệt độ phòng.	3	1
7	Phạm Bảo Ngọc, Nguyễn Giảng, Lê Văn Toàn, Lê Xuân Cường, Nguyễn Minh Hiệp, Vũ Ngọc Bích Đào, Trần Thị Tâm, Lê Văn Thức, Lê Thị Thùy Linh, Lê Thị Bích Thy, Hán Huỳnh Điện, Nguyễn Trọng Hoàng Phong	Nghiên cứu khả năng hấp phụ các ion kim loại Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} của vật liệu copolyme điều chế bằng kỹ thuật ghép bức xạ γCo^{60} .	3	6
8	Phùng Thị Tuyền, Ma Minh Nguyệt, Phạm Thanh Hà, Nguyễn Như Ngọc	Hoạt tính chống oxy hóa, đối kháng của cao chiết từ lá và thành phần tinh dầu loài Bưởi bung (<i>Acronychia pedunculata</i> (L.) Miq.).	3	12
9	Cao Thị Thúy Hằng, Võ Mai Như Hiếu, Phạm Đức Thịnh, Nguyễn Ngọc Linh, Nguyễn Đình Thuất, Trần Thị Thanh Vân	Khảo sát điều kiện lên men của chủng vi khuẩn biển <i>Bacillus velezensis</i> AlgSm1 để thu nhận alginate lyase.	3	19
10	Vũ Văn Long, Trần Văn Dũng	Phân lập và đánh giá khả năng phân hủy lá mía của các dòng vi khuẩn trong đất phèn trồng mía ở Đồng bằng sông Cửu Long.	3	24
11	Nguyễn Hùng Mạnh, Lại Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Hồng Mai, Nguyễn Thị Phương Trang, Nguyễn Văn Sinh	Xác định đặc điểm vùng gen <i>rbcL</i> và <i>trnH-psbA</i> của phân loài Vân sam Phan Xi Păng (<i>Abies delavayi</i> subsp. <i>fansipanensis</i> (Q.P. Xiang) Rurhforth) ở Việt Nam.	3	28
12	Phạm Đình Đạt, Phạm Tiến Thành	Thiết kế nền tảng Biosensing quang học dựa trên cấu trúc nano điện môi - kim loại - điện môi.	6	1
13	Phạm Trung Hiếu, Trần Đại Lâm, Phạm Thị Năm, Vũ Đình Hoàng, Nguyễn Hồng Tuyền, Trịnh Thị Hồng, Lê Đăng Quang	Thành phần hóa học và hoạt tính <i>in vitro</i> kháng nấm <i>Colletotrichum</i> spp. gây bệnh thán thư trên cây trồng của dầu nghệ (<i>Curcuma longa</i> L.).	6	6
14	Bùi Thị Thu Trang, Chu Sỹ Huân, Mai Văn Trịnh, Đinh Thái Hưng	Đánh giá độ nhạy các thông số và hiệu chỉnh mô hình DNDC phục vụ tính toán phát thải khí nhà kính từ hoạt động canh tác lúa nước.	6	11
15	Nguyễn Đình Vương, Tăng Đức Thắng	Nghiên cứu lan truyền khối nước mang mầm bệnh trong hệ thống nuôi trồng thủy sản ven biển.	6	18
16	Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Thị Uyên	Nhân dòng, biểu hiện và tinh sạch chaperone AcrH của vi khuẩn <i>Aeromonas hydrophila</i> sử dụng vật chủ <i>Escherichia coli</i> .	6	23
17	Phùng Thị Việt Bắc, Phạm Bá Lịch, Đinh Văn An	Nghiên cứu ảnh hưởng của vật liệu để $\alpha\text{-SiO}_2$ đến khả năng hấp phụ khí CO của graphene bằng tính toán mô phỏng lý thuyết phiếm hàm mật độ.	8	1
18	Nguyễn Trọng Hùng, Lê Bá Thuận, Nguyễn Thanh Thủy	Nghiên cứu florua hóa dysproxi oxit bằng tác nhân amoni biflorua điều chế muối dysproxi florua.	8	9
19	Bùi Quang Trí, Huỳnh Thị Thu Hương, Phạm Uyên Thi, Dương Thị Bích Chi, Phan Thị Luân, Lê Thị Thanh Tâm, Trần Thị Hải, Lê Văn Sơn, Nguyễn Văn Mười, Đặng Đức Nhân	Nghiên cứu thành phần đồng vị của nước mưa khu vực thành phố Long Khánh, miền Đông Nam Bộ.	8	14
20	Bùi Hồng Quang	Nghiên cứu hình thái hạt phấn của họ Nhài (Oleaceae Hoffmanns. & Link) ở Việt Nam.	8	19
21	Huỳnh Thị Thu Huệ, Đào Quang Hà, Lê Hồng Diệp, Nguyễn Đăng Tôn	Đánh giá khả năng phân loại của hai chỉ thị <i>rbcL</i> và <i>trnL</i> với một số mẫu Bách bộ (<i>Siemoneaceae</i>) thu tại phía Bắc Việt Nam.	8	25
22	Nguyễn Đắc Tú, Hà Phương Thư, Bùi Thị Văn Khánh, Phạm Hồng Nam, Nguyễn Xuân Phúc, Lâm Khánh, Hoàng Thị Mỹ Nhung	Đánh giá độc tính và khả năng tăng tín hiệu tương phản ảnh MRI của vật liệu nano từ Fe_3O_4 @PLA-PEG trên mô hình in vitro.	8	30
23	Đặng Hoàng Anh Tuấn, Nguyễn Minh Thắng	Ứng dụng mô hình học sâu trong xác định các giai đoạn sinh trưởng của cây dưa lưới trồng trong nhà màng.	11	1
24	Nguyễn Trọng Nghĩa, Nguyễn Thị Bích Ngọc, Trần Hồng Nhung, Nguyễn Đức Toàn, Nghiêm Thị Hà Liên, Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Thanh Thủy, Lê Trà My, Đào Huyền Quyen, Nguyễn Minh Hiền	Phát triển hệ kinh hiển vi huỳnh quang siêu phân giải ứng dụng trong nghiên cứu vi-rút.	11	6
25	Phạm Kim Ngân, Lê Minh Kha, Trương Thị Thanh Tuyền, Huỳnh Thị Kim Tuyền, Nguyễn Văn Hoàng, Trần Văn Mẫn, Lê Mỹ Loan Phụng	Khảo sát tính chất hoá lý và điện hoá của các hệ điện giải nồng độ cao với muối LiBF_4 ứng dụng cho pin sạc Li-ion điện thế cao 5 V.	11	12
26	Vũ Thị Duyên, Lăng Thế Anh, Phạm Thị Kim Trang, Phạm Hùng Việt, Michael Berg	Sự biến đổi nồng độ asen trong nước ngầm dọc theo một mặt cắt ở làng Vạn Phúc, Hà Nội.	11	17
27	Trần Hoài Lê, Vũ Đức Thảo, Huỳnh Trung Hải, Hoàng Thị Liên	Khảo sát sơ bộ sự có mặt của các hợp chất PFOS và PFOA trong nước và trầm tích sông Cầu.	11	23
28	Hoàng Quốc Nam, Nguyễn Thị Thủy, Lưu Thế Anh, Nguyễn Ngọc Thành, Nguyễn Đức Thành	Đánh giá thích hợp đất đai trong điều kiện biến đổi khí hậu và nước biển dâng tại tỉnh Thái Bình bằng mô hình tích hợp GIS-ALES.	11	28
29	Nguyễn Thúy Hằng, Phạm Thị Bé, Nguyễn Thị Kim Giang, Nguyễn Hoàng Hào, Nguyễn Hồng Anh, Nguyễn Thị Thu Hà	Nghiên cứu lý thuyết khả năng hấp phụ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid trên carbon hoạt tính biến tính bởi Fe và Ag.	11 ĐB	2
30	Đỗ Văn Mạnh, Đặng Thị Thơm, Lê Xuân Thanh Thảo, Nguyễn Duy Thành, Huỳnh Đức Long, Nguyễn Thị Linh, Đoàn Thị Thùy Linh, Vũ Đình Ngo, Dương Hồng Anh, Phạm Hùng Việt	Phân tích đặc tính của rác thải vi nhựa trong trầm tích bãi biển vùng duyên hải Việt Nam: Nghiên cứu ban đầu tại Đà Nẵng.	11 ĐB	7
31	Nguyễn Thị Bích Việt, Nguyễn Bích Ngân, Trần Thị Thêu, Vũ Thị Diệu	Nghiên cứu xác định chỉ số COD, TOC theo phương pháp đo quang vùng tử ngoại và ứng dụng theo dõi quá trình phân huỷ potassium hydrogen phthalate bằng hệ oxy hoá $\text{H}_2\text{O}_2\text{-HCO}_3^-$.	11 ĐB	14
32	Vũ Thị Duyên, Trần Thị Mai, Phạm Thị Kim Trang, Vi Mai Lan, Đào Mạnh Phú, Phạm Hùng Việt, Dieke Postma	Sự phân bố theo không gian của asen trong nước dưới đất ở khu vực tây bắc Hà Nội.	11 ĐB	19
33	Nguyễn Thúy Ngọc, Trương Thị Kim, Phan Thị Lan Anh, Phùng Thị Vi	Mức độ ô nhiễm Bisphenol A trong nước mặt của hệ thống sông hồ thuộc trung tâm thành phố Hà Nội.	11 ĐB	24
Khoa học Kỹ thuật và Công nghệ				
34	Hoàng Mai Quyền, Vũ Thị Thu Nga, Nguyễn Mạnh Quân, Severine Le Roy	Mô hình hóa cơ chế dẫn điện của vật liệu polyetylen mật độ thấp bằng phương pháp phân tử hữu hạn.	1	27
35	Bùi Văn Biên, Bành Tiến Long, Phạm Đức An, Nguyễn Đức Toàn	Một phương pháp hiệu quả cho quá trình quét bề mặt phản xạ sử dụng Kinect v2.	1	34
36	Nguyễn Huỳnh Quốc Huy, Huỳnh Đại Phú, Lê Văn Thắng, Lâm Đại Phong, Đỗ Thị Ngọc Anh, Nguyễn Thái Hòa, Phạm Trung Kiên	Tổng hợp bột gốm sinh học β -TCP bằng phản ứng hai giai đoạn (thủy nhiệt và nung) định hướng ứng dụng làm vật liệu tái tạo xương.	1	39
37	Ngô Đại Hùng, Trần Quốc Tuấn, Nguyễn Thị Nhật Hằng, Ngô Đại Nghiệp, Võ Thanh Sang	Khảo sát điều kiện thu nhận axit gamma-aminobutyric từ dịch cám gạo bằng <i>Lactobacillus</i> .	1	42
38	Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Thế Hữu, Trịnh Thị Hải, Bùi Thị Thu Trang	Nghiên cứu chế tạo và một số tính chất của sợi polyvinylidene fluoride bằng phương pháp phun kéo sợi điện trường.	1	49

39	Nguyễn Thị Bích Thủy, Ngô Kế Thế, Trần Vĩnh Diệu, Nguyễn Nhị Trự, Nguyễn Văn Lâm, Trần Thị Lý, Ngô Thị Hồng Quế, Lê Nho Thiện, Lê Xuân Quang, Trần Thanh Hà, Nguyễn Mạnh Hà, Vũ Trung Hiếu, Lưu Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Mỹ Trang, Nguyễn Mạnh Hùng	Nghiên cứu phân tán nanoclay I30E vào nhựa epoxy và nhựa đường.	1	55
40	Nguyễn Thị Lai, Phạm Hương Sơn, Nguyễn Thị Bình, Lê Thị Khánh Vân, Phạm Anh Đức	Nghiên cứu lựa chọn bao bì và thời gian bảo quản bột giàu protein từ lòng trắng trứng vịt muối.	1	60
41	Lưu Trần Hữu Tín, Hồ Đức Duy	Phát triển phương pháp xác định tổn hao ứng suất trước trong vùng neo cáp sử dụng đáp ứng trở kháng và mạng no-ron nhân tạo.	3	33
42	Ngô Trí Thường, Hoàng Văn Hải	Nghiên cứu khả năng kháng uốn của bê tông siêu tính năng gia cố cốt sợi thép dưới tác dụng của tải trọng động.	3	40
43	Phạm Đình Khang, Đinh Tiến Hùng, Đinh Kim Chiến, Cao Văn Hiệp, Nguyễn Xuân Hải, Nguyễn Ngọc Anh	Chế tạo đầu đo nhấp nháy CsI(Tl) ghép nối quang đi ốt ghi đo bức xạ gamma.	3	46
44	Phạm Hồng Tuấn, Nguyễn Xuân Thành, Nguyễn Thành Hợp	Nghiên cứu công nghệ mài bóng quang học gương cầu vật liệu thép hợp kim.	3	50
45	Cao Văn Sơn, Lê Thị Quỳnh Hoa, Đỗ Thị Thu Nguyệt, Đỗ Thanh Tú	Nghiên cứu công nghệ sản xuất giấy chống thấm dầu mỡ, ứng dụng làm bao gói thực phẩm dạng khô.	3	55
46	Hà Lan Anh, Phạm Đức Khuê, Mai Đình Kiên, Nguyễn Thị Tươi, Vũ Hoài, Võ Thị Anh	Xác định mức độ pha trộn đường của cây C4 trong nước hoa quả trên cơ sở thành phần đồng vị cacbon 13 ($\delta^{13}\text{C}$) trong đường.	3	60
47	Hà Mạnh Hùng	So sánh hiệu quả của các thuật toán metaheuristic cho bài toán tối ưu khung thép sử dụng phân tích phi tuyến.	6	28
48	Nguyễn Văn Nam, Vũ Đức Sỹ, Phạm Huy Khang	Mặt đường hấp thụ khí thải và đề xuất áp dụng tại Việt Nam.	6	33
49	Nguyễn Huy Vương, Phạm Tuấn, Nguyễn Thành Công, Trần Văn Quang, Đinh Văn Thúc	Ứng dụng giải pháp giếng thu nước mặt thay thế hình thức lấy nước truyền thống tại các tỉnh miền núi phía Bắc.	6	37
50	Trương Đức Hoan, Ngô Thúy Phương, Đinh Đức Mạnh, Đặng Thanh Tùng, Đào Thị Kim Thoa, Vũ Xuân Hoàn	Nghiên cứu ảnh hưởng của tính chất nguyên liệu đến quá trình tạo hạt xúc tác cracking dạng công nghiệp bằng công nghệ sấy phun.	6	41
51	Bùi Thị Hằng, Trần Văn Đáng, Nguyễn Văn Quy	Tổng hợp vật liệu Fe ₃ O ₄ kích thước nanomet ứng dụng làm điện cực âm pin sạc lại.	6	45
52	Bùi Thị Thu Hiền, Nguyễn Thanh Bình, Phạm Thị Diễm, Bùi Thị Minh Nguyệt, Đào Văn Hào, Lê Xuân Quế, Trương Vĩnh Thành	Nghiên cứu xây dựng công thức tạo sản phẩm bột nêm dinh dưỡng từ bột đậm thủy phân phụ phẩm cá tra.	6	50
53	Đoàn Thị Bắc, Tạ Thu Hằng, Nguyễn Đức Bình Minh, Nguyễn Thị Hoàng Lan, Trần Thu Trang	Nghiên cứu sấy măng bằng công nghệ sấy bơm nhiệt Sasaki.	6	57
54	Phan Thị Phương Thảo, Giang Trung Khoa, Vũ Hồng Sơn	Ảnh hưởng của một số thông số trong quá trình trích ly đến khả năng kháng oxy hóa của dầu hạt chè (<i>Camellia sinensis</i> O. Kuntze).	6	63
55	Hoàng Anh Tuấn, Đinh Văn Chiến	Phân tích cơ sở hạ tầng và nguồn nhân lực công nghệ xạ trị tại Việt Nam.	6	68
56	Hà Mạnh Hùng, Trương Việt Hùng, Nguyễn Minh Phương	Ứng dụng giải thuật toán Rao tối ưu khung thép sử dụng phân tích phi tuyến tính phi đàn hồi.	8	35
57	Nguyễn Quang Phúc, Vũ Văn Thắng	Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng và xác định giá trị mô đun đàn hồi (E_m), hệ số lóp (α) của một số loại BTN chặt nóng ở Việt Nam.	8	40
58	Nguyễn Kim Minh, Trần Nguyễn Tiến	Ứng dụng phương pháp vi sóng tổng hợp nhanh lớp hạt và màng lọc ZIF-8 để phân tách hỗn hợp khí propylene/propane.	8	44
59	Lê Thị Ngọc Hân, Võ Thị Ngọc Diệp, Trịnh Thị Tuyết Hoa, Nguyễn Văn Thành	Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. có khả năng sinh tổng hợp protease từ các sản phẩm đậu nành lên men.	8	49
60	Trương Huỳnh Anh Vũ, Nguyễn Hoàng Khuê Tú, Chu Văn Hải, Huỳnh Yên Hà	Thực trạng và đặc điểm kháng kháng sinh của <i>Salmonella</i> spp. phân lập từ sản phẩm thịt tươi sống tại TP Hồ Chí Minh.	8	55
61	Phan Thanh Tâm, Houangsa Honglikith	Nghiên cứu bổ sung whey protein để cải thiện chất lượng xúc xích nhũ tương.	8	60
62	Nguyễn Thị Thảo, Đỗ Xuân Trường	Nghiên cứu thực nghiệm tính chất tinh dầu hồi trên tháp chưng luyện chân không gián đoạn.	11	34
63	Nguyễn Minh Hiếu, Lê Bình Dương, Mai Anh Tuấn, Nguyễn Thị Bình, Bùi Thị Thanh Phương, Phạm Hương Sơn, Nguyễn Thị Lai	Một số đặc điểm của purpurin-18 tổng hợp từ chlorophyll a tách chiết từ tảo <i>Spirulina</i> .	11	40
64	Phạm Văn Doanh, Nguyễn Bình Minh, Trần Thị Việt Nga	Ứng dụng bùn hạt hiếu khí trên mô hình công nghệ (SBR) để xử lý nước thải có tải trọng hữu cơ thấp.	11	44
65	Mai Thị Đàm Linh, Đỗ Thị Quỳnh, Nguyễn Thị Thanh Mai, Phạm Thanh Hiền, Trần Văn Tuấn	Nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp lipid của hai chủng nấm men <i>Rhodospiridium toruloides</i> VTCC 20689 và VTCC 20765.	11	48
66	Đoàn Thị Kiều Tiên, Đỗ Thị Tuyết Nhung, Lê Trí Ân, Trần Hoàng Hiệp, Huỳnh Thị Ngọc Mi, Nguyễn Ngọc Thạnh, Huỳnh Xuân Phong	Phân lập và tuyển chọn nấm men có khả năng lên men rượu từ trái mãng cầu xiêm <i>Annona muricata</i> .	11	53
67	Nguyễn Mạnh Huy, Trần Thị Hà, Vũ Minh Tuấn, Nguyễn Thanh Đàm, Dương Hồng Anh, Phạm Hùng Việt	Nghiên cứu phát triển quy trình xác định dư lượng glyphosat bằng phương pháp điện di mao quản và ứng dụng trong phân tích một số loại đồ uống.	11	58
68	Nguyễn Thanh Đàm, Nguyễn Thị Phúc, Vũ Minh Tuấn	Phát triển phần mềm tính nồng độ trong hệ đệm hỗ trợ chuẩn bị dung dịch điện ly nền trong phân tích bằng phương pháp điện di mao quản.	11 ĐB	29
69	Nguyễn Minh Tuấn, Nguyễn Thị Mơ, Phùng Thị Lan, Nguyễn Văn Tiến, Nguyễn Hoàng Hào, Lê Minh Cầm, Nguyễn Ngọc Hà	Nghiên cứu tổng hợp hệ vật liệu hấp phụ - xúc tác quang g-C ₃ N ₄ /diatomit ứng dụng xử lý chất màu hữu cơ Rhodamine B.	11 ĐB	35
70	Mai Hùng Thanh Tùng, Đoàn Thị Hồng Ngọc, Nguyễn Ngọc Kim Tuyền, Đỗ Minh Thế, Cao Văn Hoàng, Nguyễn Thị Diệu Cầm	Tổng hợp vật liệu lai ghép dạng Z g-C ₃ N ₄ /V ₂ O ₅ có hoạt tính quang xúc tác cao trong vùng ánh sáng nhìn thấy.	11 ĐB	42
71	Đinh Thị Hiền, Phan Thị Mai Hương, Nguyễn Đức Mạnh, Nguyễn Lưu Tùng Quân	Cảm biến huỳnh quang độ nhạy cao để phát hiện ion Al ³⁺ dựa trên phức chất Eu(III)- β -dixeton.	11 ĐB	47
72	Nguyễn Mạnh Huy, Dương Hồng Anh, Phạm Hùng Việt	Tối ưu hóa quy trình phân tích đồng thời phenol và một số dẫn xuất clophenol bằng phương pháp điện di mao quản sử dụng detector huỳnh quang.	11 ĐB	51
73	Đào Thế Nam, Vũ Minh Thành, Đoàn Tuấn Anh, Vũ Thị Thao	Nghiên cứu khả năng chuyển pha của hắc ín than đá và sản phẩm cacbon hóa từ chúng dưới tác dụng của nhiệt, ứng dụng trong chế tạo vật liệu cacbon tổ hợp.	11 ĐB	56
74	Hoàng Thị Hương Thảo, Trương Thị Bình Giang, Nguyễn Thị Ngọc Bích, Dương Tuấn Hưng, Vũ Đức Lợi	Tổng hợp CuFe trên nền điện cực Cu định hướng làm xúc tác cho hoạt tính cao cho phản ứng khử nitrat bằng phương pháp điện hóa.	11 ĐB	60
75	Trần Vũ Thắng, Hoàng Thị Phương, Dương Ngô Vù, Đào Thị Phương Hồng	Nghiên cứu ảnh hưởng của các thành phần đến tính chất của hạt nhựa compound chống cháy trên cơ sở polyetylen.	11 ĐB	66
76	Nguyễn Thanh Đàm, Nguyễn Cảnh Việt, Phùng Thị Vi, Tạ Thị Thảo, Dương Hồng Anh, Jean-Luc Vasel, Phạm Hùng Việt	Nghiên cứu phát triển thiết bị đánh giá độ ổn định của phân bón hữu cơ dựa trên phương pháp xác định lượng oxy tiêu thụ theo nguyên tắc đo áp suất.	11 ĐB	70
77	Trần Thị Thu Phương, Đinh Mỹ Ngọc Trâm, Phạm Thị Yến Nhi, Nguyễn Vũ Ngọc Mai, Nguyễn Thị Thanh Bình, Lê Thị Cẩm Nhung, Cao Văn Hoàng, Nguyễn Thị Diệu Cầm	Tổng hợp vật liệu xúc tác quang WO ₃ /Ag ₃ VO ₄ ứng dụng xử lý kháng sinh amoxicillin trong môi trường nước.	11 ĐB	75
78	Vũ Xuân Minh, Phạm Thị Lan, Lê Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Tuấn Dung	Chế tạo composít xốp trên cơ sở alginate để cải thiện khả năng hấp phụ Ni(II).	11 ĐB	80
Khoa học Y - Dược				
79	Trần Thị Thu Huyền, Nguyễn Thị Lan Dung, Nguyễn Thùy Trang, Nguyễn Văn Ninh, Hồ Anh Sơn, Hoàng Văn Tổng	Nghiên cứu phát hiện đột biến kháng artemisinin trên gen <i>K13</i> ở ký sinh trùng sốt rét <i>Plasmodium falciparum</i> .	2	1
80	Nguyễn Thị Thu Thảo, Nguyễn Thu Thúy, Vương Vũ Việt Hà, Trần Huy Thịnh, Nguyễn Việt Tiến, Trần Văn Khánh	Đa hình đơn nucleotide rs1799794 của gen XRCC3 trên bệnh nhân ung thư vú.	2	5
81	Đào Việt Hằng, Lê Quang Hưng, Nguyễn Phúc Bình, Nguyễn Mạnh Hùng, Mạnh Xuân Huy, Nguyễn Hồng Anh, Vũ Hải	Đánh giá độ chính xác và khả năng ứng dụng của phần mềm hỗ trợ khoan đường Z tự động sử dụng thuật toán trí tuệ nhân tạo.	2	10

82	Nguyễn Thị Thanh Hoa, Đậu Quang Liêu, Nguyễn Đăng Tôn, Nguyễn Hải Hà, Trần Ngọc Ánh	Phát hiện đột biến gen <i>UGT1A1</i> gây hội chứng Gilbert ở bệnh nhân Việt Nam.	2	16
83	Đặng Minh Thành, Lê Văn Trinh, Đỗ Quang Huy, Trần Thị Hằng, Cao Lê Trâm Anh, Đặng Thị Tùng Loan, Phan Lữ Chính Nhân, Phạm Văn Phúc, Ai Xuan Le Holterman, Nguyễn Văn Thuận, Lê Minh Huy, Trương Hải Nhung	Đánh giá sự biểu hiện của các gen tự thực (autophagy) trong quá trình hoạt hóa <i>in vitro</i> của các tế bào hình sao từ gan chuột.	2	21
84	Lê Nguyễn Trọng Nhân, Nguyễn Thu Thủy, Nguyễn Quý Linh, Trần Văn Khánh, Trần Huy Thịnh, Tạ Thành Văn, Nguyễn Việt Tiến	Mối liên quan giữa đa hình rs1801321 gen RAD51 và nguy cơ mắc ung thư buồng trứng.	5	1
85	Nguyễn Thị Thu Hiền, Phạm Thị Minh Châu	Đánh giá chỉ số độ sâu tiền phòng và chiều dài trục nhân cầu trên mắt cận thị cao.	5	6
86	Vũ Thanh Quang, Hà Ngọc Khoản, Bùi Thanh Rin, Nguyễn Trung Dũng, Phạm Tuấn Linh, Nguyễn Thị Hải Yến, Đoàn Thị Thu Hiền	Xây dựng quy trình phân tích kiểm tra chất lượng được chất phóng xạ ¹⁸ F-Choline.	5	10
87	Hoàng Giang, Trịnh Hồng Sơn, Lê Thị Kim Nhung, Ngô Thị Huyền, Vũ Thị Hồng Vân, Trần Đức Hùng, Nguyễn Dương Hùng, Hoàng Văn Thông, Trần Tuấn Anh, Nguyễn Văn Thành, Nguyễn Thành Đạt, Vũ Tá Nam, Nguyễn Hữu Sâm, Hà Trung Chính	Nghiên cứu đặc điểm người bệnh chạy thận nhân tạo tại 26 bệnh viện của Hà Nội năm 2020.	5	17
88	Nguyễn Thị Hoàng, Trịnh Như Thủy, Vòng Bính Long	Khảo sát khả năng kháng ung thư <i>in vitro</i> của doxorubicin bao trong hạt nano oxy hóa khử nhạy pH.	5	22
89	Nguyễn Thị Thịnh, Nguyễn Cửu Khoa	Thẩm định quy trình xác định đồng thời Zidovudin và Lamivudin trên hệ chất mang nano dendrimer G3.0-F127@AZT/3TC bằng phương pháp HPLC-PDA.	5	29
90	Đặng Duy Phương, Nguyễn Minh Hà, Đỗ Đoàn Lợi, Trần Huy Thịnh	Phát hiện đột biến mới D252N trên gen SCN5A ở bệnh nhân hội chứng Brugada.	7	1
91	Hoàng Thị Hải, Hoàng Thị Ngọc Lan, Vũ Thị Hà, Nguyễn Thị Sim, Hồ Khánh Dung, Đoàn Thị Kim Phương	Báo cáo ca bệnh khảm trisomy một phần nhiễm sắc thể số 9.	7	7
92	Đào Trần Tiến, Vũ Trường Khanh, Phí Thị Thùy Ngân, Nguyễn Công Long, Nguyễn Thế Phương, Nguyễn Hoài Nam, Bùi Quang Thạch, Hoàng Nam	Nhận xét thói quen ăn uống, làm sàng ở bệnh nhân viêm teo niêm mạc dạ dày.	7	11
93	Vũ Tuấn Anh, Nguyễn Tuấn Thanh Hào	Biến đổi nồng độ VEGF thủy dịch do tiêm Bevacizumab nội nhãn trong điều trị bệnh vông mạc dãi tháo đường tăng sinh biến chứng.	7	17
94	Vũ Thị Kim Oanh, Bùi Thu Hà, Đinh Ngọc Thức, Lê Nguyễn Thành	Phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất từ loài <i>Adinandra poilanei</i> Gagnep.	7	22
95	Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Hiền, Trương Thị Chiên, Phan Xuân Bình Minh, Nguyễn Thị Thanh Mai, Hoàng Quốc Chính, Vũ Xuân Tạo	Đánh giá thành phần hóa học và một số hoạt tính sinh học của tinh dầu cây Bạc hà (<i>Mentha arvensis</i> L.) trồng tại Việt Nam.	7	26
96	Nguyễn Minh Tuấn, Nguyễn Thị Lê Thủy, Thương 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	Nghiên cứu chế tạo mẫu chuẩn RNA bền với nucleases dùng trong định lượng virút viêm gan C.	7	31
97	Trần Thị Hằng, Trịnh Thị Thu Hiền, Nguyễn Văn Chính, Đoàn An Sơn, Hà Văn Phú, Trần Thị Thanh Huyền, Dương Công Nguyên	Đặc điểm xét nghiệm đông máu thường quy và ROTEM ở bệnh nhân đa chấn thương tại thời điểm nhập viện.	9	1
98	Nguyễn Xuân Hậu, Nguyễn Thị Phương Anh, Lê Văn Quảng	Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và tình trạng di căn của ung thư tuyến giáp thể nang.	9	6
99	Lê Thị Phương, Đào Nguyễn Hà Linh, Nguyễn Minh Ngọc, Trần Huy Thịnh, Trần Văn Khánh	Phát hiện đột biến gen <i>RBI</i> trên mẫu mô u nguyên bào vồng mạc tại miền Bắc Việt Nam năm 2020.	9	10
100	Tạ Thị Thu Hằng, Nguyễn Bảo Kim, Lê Đăng Huy, Bùi Thanh Tùng	Sàng lọc các hợp chất tương tự nucleotide và nucleoside ức chế enzym RNA-dependent RNA polymerase của SARS-CoV-2 bằng phương pháp docking phân tử nhằm điều trị bệnh COVID-19.	9	14
101	Nguyễn Linh Chi, Ngô Thị Tường Châu, Nguyễn Đình Tào, Nguyễn Ngọc Diệp	Đánh giá chất lượng phối các giai đoạn khi nuôi cấy trong môi trường nồng độ oxy thấp.	9	22
102	Nguyễn Trung Hiếu, Nguyễn Phước Đạt, Nguyễn Thị Ngọc Quyên, Trần Lê Trúc Hà, Quan Quốc Đăng, Nguyễn Hoàng Chương	Nghiên cứu hoạt tính kháng <i>Escherichia coli</i> sinh enzyme β -lactamase phổ rộng (ESBL) của chủng xạ khuẩn <i>Streptomyces</i> sp. SS473 phân lập từ thực vật.	9	26
103	Nguyễn Đăng Quân, Nguyễn Thị Thanh Thảo, Phạm Nguyễn Thanh Thủy, Lê Thị Thuý Hằng, Trần Công Duy Long, Đinh Minh Hiệp	Đánh giá khả năng sử dụng Des- γ carboxy prothrombin huyết thanh trong chẩn đoán ung thư biểu mô tế bào gan.	9	33
104	Nguyễn Thị Hồng Đức, Võ Quốc Ánh	Vận chuyển thuốc qua da bằng kỹ thuật điện di ion: ưu, nhược điểm và phát hiện mới từ những nghiên cứu.	9	39
105	Nguyễn Phương Anh, Nguyễn Thùy Dương, Nông Văn Hải	Phát hiện đột biến mất đoạn lớn trên gen <i>EDA</i> gây loạn sản ngoại bì ở gia đình bệnh nhân Việt Nam bằng giải trình tự hệ gen mã hoá.	12	1
106	Hoàng Kim Lâm, Tạ Anh Tuấn, Nguyễn Thị Hồng Yến, Phạm Thu Nga, Phạm Văn Thắng	Bệnh lý nền ở trẻ viêm phổi nặng dai dẳng tại Khoa Điều trị tích cực, Bệnh viện Nhi Trung ương.	12	5
107	Võ Thị Thuý Quỳnh, Trần Thị Phương Thảo, Nguyễn Việt Phương, Phạm Văn Dũng, Nguyễn Linh Toàn, Hoàng Văn Tổng	Đánh giá mức độ biểu hiện của gen <i>SOC1</i> trên bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan liên quan đến nhiễm virus viêm gan B.	12	10
108	Nguyễn Thị Huyền, Hoàng Thị Hải, Đào Thị Trang, Hoàng Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thị Duyên, Nguyễn Ngân Hà, Vũ Thị Hà, Đoàn Thị Kim Phương	Báo cáo một số trường hợp khảm nhiễm sắc thể trong chẩn đoán trước sinh và so sánh kết quả tương ứng sau sinh.	12	15
109	Trần Thị Mai Hưng, Dương Thị Hồng, Lương Minh Tân, Lê Thị Trang, Phạm Duy Thái, Hồ Hoàng Dung, Nguyễn Thị Lan Phương, Nguyễn Thị Minh, Khương Thị Tâm, Đặng Đức Anh, Trần Huy Hoàng	Tỷ lệ <i>Escherichia coli</i> mang gen mã hóa sinh ESBL ở bệnh nhân mắc một số bệnh thông thường đến khám tại tuyến y tế cơ sở ở một số tỉnh, thành phố của Việt Nam.	12	19
110	Lê Thị Xoan, Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Văn Hiệp, Phạm Thị Nguyệt Hằng, Nguyễn Văn Tài	Tác dụng hạ sốt của cao chiết Bàng biển, Bạch đầu ông và Tiết dê trên mô hình thỏ gây sốt bằng lipopolysaccharid.	12	25
111	Nguyễn Phúc Khánh Nhi, Trần Phương Hà, Hoàng Lê Tuấn Anh, Đinh Thị Quý Thủy, Lê Bích Hương, Võ Thị Mỹ Dung, Nguyễn Hải Phong, Lê Cảnh Việt Cường	Phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất từ phần trên mặt đất cây Cà đại hoa trắng (<i>Solanum torum</i> Swartz.) ở Thừa Thiên - Huế.	12	30
Khoa học Nông nghiệp				
112	Trần Ngọc Sơn, Võ Công Thành, Võ Lan Hương, Đặng Thị Yến Nhi, Trần Thị Thủy Dương, Nguyễn Lam Đình, Từ Thị Diễm My	Nghiên cứu khả năng chịu hạn liên quan đến hình thái rễ và cấu trúc khí khổng của 12 giống lúa mùa (<i>Oryza sativa</i> L.) trong điều kiện hạn nhân tạo.	2	27
113	Đinh Thị Hiền, Phạm Trung Hiếu, Trần Đại Lâm, Lê Thế Tâm, Vũ Thị Thoa, Nguyễn Thị Phương Thảo, Lê Đăng Quang	Nghiên cứu ảnh hưởng của tích hợp vi khuẩn endophyte <i>Bacillus subtilis</i> GB03 với vật liệu nano silica đến sự phát triển của cây dưa lưới (<i>Cucumis melo</i>).	2	33
114	Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Thị Bích Thủy, Vũ Thị Khánh Linh, Nguyễn Duy Trinh, Trần Thu Hà	Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sinh trưởng hệ sợi của nấm <i>Phellinus linteus</i> .	2	39
115	Trịnh Xuân Hoạt, Lưu Thị Xuyên, Trần Lê Bích Hồng, Lê Xuân Vi, Lê Thị Tuyết Nhung	Đặc điểm sinh học, sinh thái và phòng chống loài rệp sáp giả <i>Rastrococcus chinensis</i> (Hemiptera: Pseudococcidae) hại cây bích tím (<i>Morinda officinalis</i> How.).	2	44
116	Nguyễn Thị Hạnh, Phan Thị Vân, Phạm Thị Yến, Lê Thị Mỹ, Trương Thị Mỹ Hạnh	Khả năng kháng khuẩn và phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm thẻ chân trắng (<i>Penaeus vannamei</i>) của tỏi (<i>Allium sativum</i>) lên men.	2	49
117	Phạm Thị Mai, Lê Thị Như, Stefan Jouannic, Không Ngân Giang	Chọn lọc các cá thể F ₂ đồng hợp tự mang <i>QTL9</i> liên quan đến cấu trúc bông lúa bằng chỉ thị phân tử CAPS.	2	55
118	Nguyễn Thị Ngọc Lan, Phutthakone Vaciaxa, Nguyễn Thành Chung, Nguyễn Hữu Quân, Phạm Thị Thanh Nhân, Vũ Thị Thu Thủy, Chu Hoàng Mậu	Đặc điểm và sự phát sinh của phân họ gen <i>DREB</i> ở đậu tương [<i>Glycine max</i> (L.) Meril].	2	60
119	Ngô Chí Nam, Phan Khánh Linh, Hồ Lê Thị	Nghiên cứu tính ức chế thực vật của 6 loài cây họ cúc (Asteraceae) và định lượng hàm lượng phenolic và flavonoid tổng.	5	35
120	Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Hiền, Trần Bình Minh, Nguyễn Thị Thùy Linh, Hoàng Thị Văn Anh, Thái Hạnh Dung, Trần Văn Tuấn, Vũ Xuân Tạo	Nghiên cứu hoạt tính kháng nấm gây bệnh trên cam của chủng xạ khuẩn XK1 phân lập từ đất trồng cam.	5	41

121	Phạm Thủy Linh, Nguyễn Quý Khiêm, Đặng Đình Tứ, Nguyễn Trọng Thiện, Lê Ngọc Tân, Đào Thị Bích Loan, Vũ Quốc Dũng, Lê Văn Hùng, Nguyễn Thị Thu Hiền, Nguyễn Duy Trang	Đánh giá khả năng sản xuất của ba tổ hợp lai gà bố mẹ.	5	46
122	Lê Tuấn Anh, Trần Thị Hân, Phạm Thị Thúy Hoài, Hà Văn Bắc	Đa dạng thực vật cho lâm sản ngoài gỗ tại Khu bảo tồn thiên nhiên Đakrông, tỉnh Quảng Trị.	5	51
123	Lê Thị Hồng Ánh, Dương Hồng Quân, Bùi Huy Chích, Hoàng Ngọc Cương, Lâm Thế Hải, Trần Quốc Đàm, Đặng Xuân Cường, Nguyễn Thị Thảo Minh, Lê Hoàng Phương, Đặng Văn Hải, Hoàng Thái Hà	Nghiên cứu tối ưu hóa công nghệ sấy cá lóc <i>Channa maculata</i> bằng phương pháp sấy phối hợp bom nhiệt và bức xạ hồng ngoại.	5	55
124	Nguyễn Vũ Phong, Hà Thị Trúc Mai, Đặng Lê Trâm, Nguyễn Thế Phương, Nguyễn Thị Ngọc Loan	Chuyển cấu trúc microRNA vào cây đậu nành (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) hạn chế sự ký sinh của tuyến trùng <i>Meloidogyne incognita</i> .	5	60
125	Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Minh Thành, Nguyễn Hoàng Thông, Trần Hoàng Gia Linh, Lê Hoàng Khôi Nguyên, Nguyễn Hồng Lộc	Đánh giá đa dạng di truyền các quần thể cá Tra (<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>) bằng 20 chỉ thị phân tử microsatellite mới phát triển.	7	37
126	Trương Thị Mỹ Hạnh, Phan Thị Vân, Lê Thị Mây, Nguyễn Hữu Nghĩa, Võ Văn Nha, Nguyễn Đình Xuân Quý, Đặng Thị Lụa	Yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh Streptococcosis ở cá rô phi (<i>Oreochromis</i> sp.) nuôi nước ngọt.	7	42
127	Nguyễn Tiến Dũng, Triệu Bích Huệ, Nguyễn Xuân Vũ	Xác định các yếu tố điều hòa hoạt động (CRE) của gen <i>RMP1</i> và <i>RMP2</i> liên quan đến biểu hiện chuyên biệt ở hạt phân lúa.	7	48
128	Nguyễn Tiến Long, Lê Thị Thu Hằng, Trần Thị Triều Hà, Dương Thanh Thúy, Lê Như Cương	Nghiên cứu tạo nguồn vật liệu khởi đầu trong nhân giống <i>in vitro</i> cây hoa Dạ yến thảo (<i>Petunia hybrida</i> L.).	7	53
129	Nguyễn Đức Bách, Phí Thị Cẩm Miện, Kim Anh Tuấn, Nguyễn Thị Hiền, Vũ Lê Diệu Hương	Nghiên cứu ứng dụng đèn LEDs để kéo dài thời gian nuôi tảo xoắn <i>Spirulina</i> (<i>Arthrospira platensis</i>) ở miền Bắc Việt Nam.	7	57
130	Nguyễn Vũ Phong, Vũ Trung Nguyên, Trần Kiên, Hà Thị Trúc Mai	Đặc điểm hệ nấm nội cộng sinh rễ cây hồ tiêu (<i>Piper nigrum</i> L.) ở một số tỉnh phía Nam.	9	44
131	Vũ Tuấn Nam, Chu Đức Hà, Lê Tiến Dũng	Các phương pháp chẩn đoán bệnh virus trên cà chua (<i>Solanum lycopersicum</i>).	9	48
132	Lê Doãn Dũng, Đặng Thị Yến, Vũ Thị Hương, Nguyễn Thị Hồng Ngọc, Phan Thị Thùy Dương, Phạm Bảo Huyền Linh, Quách Tú Mỹ	Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng trong quá trình sản xuất bột dinh dưỡng ăn liền từ ốc gai <i>Indothais lacera</i> (Born, 1778).	9	54
133	Trương Phước Thiên Hoàng, Đỗ Huỳnh Dân, Võ Trần Quốc Thắng, Nguyễn Phú Hòa	Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn chuyển hóa nitrite từ bùn đáy của vùng nuôi tôm hùm ở vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên.	9	59
134	Trần Thu Hà, Trịnh Thị Mỹ Ngọc, Nguyễn Duy Trinh, Nguyễn Văn Giang	Ảnh hưởng của vật liệu bao gói đến chất lượng của nấm sò (<i>Pleurotus sajio caju</i>) trong quá trình bảo quản.	12	34
135	Phan Khánh Linh, Phòng Ngọc Hải Triều, Nguyễn Lê Văn, Hồ Lê Thi	Tính đối kháng thực vật và định lượng một số chất đối kháng trong cây cỏ đậu (<i>Arachis pintoi</i>).	12	41
136	Nguyễn Minh Thành, Trần Thị Hải Yến, Võ Thị Minh Thư, Lê Thị Hồng Thắm, Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Thành Luân, Nguyễn Việt Tuấn	Phân tích hệ gen phiên mã của tôm sú cái (<i>Penaeus monodon</i>) ở Việt Nam liên quan đến tính trạng sinh sản bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới.	12	47
137	Trần Đức Trung, Tạ Hồng Linh	Phân tích <i>in-silico</i> xác định và mô tả họ gen kháng <i>NBS-LRR</i> ở chuối <i>Musa acuminata</i> .	12	52
138	Nguyễn Thị Lái, Nguyễn Thị Bình, Phạm Anh Đức, Phạm Hương Sơn, Lương Thúy Hằng, Nguyễn Minh Nam, Nguyễn Thị Ngọc Bích, Đinh Thu Linh	Nghiên cứu nhân giống <i>in vitro</i> cây Sơn đậu căn (<i>Sophora tonkinensis</i> Gagnep) thông qua nuôi cấy đốt thân.	12	59
139	Trần Thị Bích Ngọc, Huỳnh Thị Thu Huệ	Nghiên cứu đặc điểm của gen chalcone isomerase phân lập từ cây sắn dây (<i>Pueraria montana</i> var. <i>lobata</i>).	12	64
Khoa học Xã hội và Nhân văn				
140	Nguyễn Thị Minh Hương	Các yếu tố ảnh hưởng đến quyết định chọn trường đại học của học sinh THPT trên địa bàn tỉnh Quảng Ngãi.	4	1
141	Trần Thị Thu Hương, Phạm Tiến Mạnh	Nâng cao hiệu quả hoạt động của doanh nghiệp ngành dệt may Việt Nam trong bối cảnh Hiệp định EVFTA.	4	8
142	Nguyễn Vũ Minh, Changsoo Lee	Thiết lập hệ thống cơ sở dữ liệu bảo hiểm: Kinh nghiệm của Hàn Quốc và đề xuất cho Việt Nam.	4	13
143	Nguyễn Thị Kim Hoa, Mai Linh, Nguyễn Trung Hải	Thực hiện quyền an sinh xã hội về nhập học, bảo lưu và miễn giảm học phí cho người dân thông qua hoạt động công tác xã hội chuyên nghiệp.	4	17
144	Nguyễn Sơn	Bảo đảm quyền công dân trong hoạt động của các cơ quan hành chính nhà nước ở Việt Nam.	4	23
145	Vũ Đặng Phúc, Nguyễn Thị Thanh Nga	Kiểm soát chính quyền địa phương trên thế giới và giá trị tham khảo cho Việt Nam.	4	29
146	Nguyễn Ngọc Hồng Dương	Nhượng quyền thương mại của doanh nghiệp nước ngoài theo quy định của pháp luật Việt Nam.	4	34
147	Trịnh Thị Hải Yến, Tạ Đức Bình	Đề xuất bộ chỉ số đánh giá hiệu quả môi trường của việc sử dụng đất ven biển theo hướng phát triển bền vững.	4	40
148	Đỗ Thị Ngọc Bích, Nguyễn Cao Đơn, Nguyễn Bảo Hoàng	Đánh giá việc thực hiện mục tiêu phát triển bền vững về nước sạch và vệ sinh (SDG6) cho lưu vực sông Srepok.	4	44
149	Lê Tùng Sơn, Thạch Thị Hoàng Yến, Trần Văn Hồng	Quyền tiếp cận thông tin KH&CN trong hoạt động nghiên cứu khoa học và đổi mới ở Việt Nam.	4	50
150	Đỗ Thị Cẩm Vân	Tương tác thể loại trong tiểu thuyết lịch sử Việt Nam đương đại.	4	56
151	Nguyễn Đăng Dũng	Tự chủ trong các đơn vị sự nghiệp khoa học và công nghệ ở Việt Nam.	4	60
152	Vũ Anh Pháp, Lê Thành Phiêu, Bùi Chúc Ly	Hiệu quả sản xuất lúa gạo theo hướng VietGAP tại Đồng bằng sông Cửu Long.	10	1
153	Nguyễn Tiến Dũng, Võ Trọng Thức, Lê Thị Hoa Sen, Lê Văn Nam, Nguyễn Văn Thành, Hoàng Gia Hùng	Đánh giá tiềm năng sản xuất và tiêu thụ lúa hữu cơ của các hợp tác xã nông nghiệp tại Thừa Thiên - Huế.	10	5
154	Phạm Thị Thùy Linh, Nguyễn Mạnh Cường	Hệ thống rào cản kỹ thuật trong thương mại thủy sản của thị trường Nhật Bản - Các giải pháp ứng phó của Việt Nam.	10	12
155	Ao Thu Hoài, Nguyễn Thị Bích Hiền, Lê Minh Quốc, Tiêu Đình Tú, Thạch Hoàng Liên Sơn	Các yếu tố ảnh hưởng đến hành vi tiêu dùng xanh của thế hệ Z Việt Nam.	10	19
156	Bùi Văn Dương, Nguyễn Hữu Quy, Võ Thị Trúc Đào	Tác động của công nghệ blockchain đến hệ thống thông tin kế toán.	10	24
157	Vũ Anh Tuấn, Nguyễn Đình Vĩnh Mẫn	Hiệu quả tiềm năng của chương trình đào tạo nâng cao khả năng nhận biết và xử lý các tình huống nguy hiểm trên đường cho người điều khiển mô tô, xe gắn máy.	10	29
158	Bùi Tuấn Thành, Vũ Đức Đàm Quang	Hoàn thiện pháp luật khoa học và công nghệ ở Việt Nam hiện nay.	10	34
159	Hoàng Lan Phương	Thế chấp tài sản trí tuệ - Những khía cạnh pháp lý và thực tiễn thi hành.	10	41
160	Lê Tùng Sơn, Trần Văn Tiến	Xung đột giữa quyền tiếp cận thông tin KH&CN với bảo hộ quyền tác giả tiếp cận dưới góc độ pháp luật.	10	46
161	Lâm Thị Kho	Nâng cao chất lượng nguồn nhân lực các dân tộc thiểu số đáp ứng yêu cầu phát triển bền vững vùng Tây Nam Bộ.	10	52
162	Nguyễn Thị Kim Tiến	Đầu án văn hóa Thăng Long qua tiểu thuyết <i>Đàn đáy</i> của Trần Thu Hằng.	10	56
163	Đặng Thị Đông	Những thành tựu giáo dục của Việt Nam thời Lý - Trần: Nhìn từ góc độ lấy Phật giáo làm quốc giáo trên nền tảng giáo dục Tam giáo đồng nguyên.	10	61

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 12 - December 2021

Phát hiện đột biến mất đoạn lớn trên gen *EDA* gây loạn sản ngoại bì ở gia đình bệnh nhân Việt Nam bằng giải trình tự hệ gen mã hóa.

Nguyễn Phương Anh, Nguyễn Thùy Dương, Nông Văn Hải

Bệnh lý nền ở trẻ viêm phổi nặng dai dẳng tại Khoa Điều trị tích cực, Bệnh viện Nhi Trung ương.

Hoàng Kim Lâm, Tạ Anh Tuấn, Nguyễn Thị Hồng Yến, Phạm Thu Nga, Phạm Văn Thắng

Đánh giá mức độ biểu hiện của gen *SOCS1* trên bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan liên quan đến nhiễm virus viêm gan B.

Võ Thị Thủy Quỳnh, Trần Thị Phương Thảo, Nguyễn Việt Phương, Phạm Văn Dũng, Nguyễn Linh Toàn, Hoàng Văn Tổng

Báo cáo một số trường hợp khảm nhiễm sắc thể trong chẩn đoán trước sinh và so sánh kết quả tương ứng sau sinh.

Nguyễn Thị Huyền, Hoàng Thị Hải, Đào Thị Trang, Hoàng Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thị Duyên, Nguyễn Ngân Hà, Vũ Thị Hà, Đoàn Thị Kim Phượng

Tỷ lệ *Escherichia coli* mang gen mã hóa sinh ESBL ở bệnh nhân mắc một số bệnh thông thường đến khám tại tuyến y tế cơ sở ở một số tỉnh, thành phố của Việt Nam.

Trần Thị Mai Hưng, Dương Thị Hồng, Lương Minh Tân, Lê Thị Trang, Phạm Duy Thái, Hồ Hoàng Dung, Nguyễn Thị Lan Phương, Nguyễn Thị Minh, Khuong Thị Tâm, Đặng Đức Anh, Trần Huy Hoàng

Tác dụng hạ sốt của cao chiết Bàng biển, Bạch đầu ông và Tiết dê trên mô hình thỏ gây sốt bằng lipopolysaccharid.

Lê Thị Xoan, Nguyễn Thị Phương, Nguyễn Văn Hiệp, Phạm Thị Nguyệt Hằng, Nguyễn Văn Tài

Phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất từ phần trên mặt đất cây Cà dại hoa trắng (*Solanum torvum* Swartz.) ở Thừa Thiên - Huế.

Nguyễn Phúc Khánh Nhi, Trần Phương Hà, Hoàng Lê Tuấn Anh, Đinh Thị Quý Thủy, Lê Bích Hương, Võ Thị Mỹ Dung, Nguyễn Hải Phong, Lê Cảnh Việt Cường

Ảnh hưởng của vật liệu bao gói đến chất lượng của nấm sò (*Pleurotus sajjo caju*) trong quá trình bảo quản.

Trần Thu Hà, Trịnh Thị Mỹ Ngọc, Nguyễn Duy Trinh, Nguyễn Văn Giang

Tính đối kháng thực vật và định lượng một số chất đối kháng trong cây cỏ đậu (*Arachis pintoi*).

Phan Khánh Linh, Phòng Ngọc Hải Triều, Nguyễn Lê Văn, Hồ Lệ Thi

Phân tích hệ gen phiên mã của tôm sú cái (*Penaeus monodon*) ở Việt Nam liên quan đến tình trạng sinh sản bằng kỹ thuật giải trình tự gen thế hệ mới.

Nguyễn Minh Thành, Trần Thị Hải Yến, Võ Thị Minh Thư, Lê Thị Hồng Thắm, Nguyễn Văn Sáng, Nguyễn Thành Luân, Nguyễn Việt Tuấn

Phân tích *in-silico* xác định và mô tả họ gen kháng *NBS-LRR* ở chuối *Musa acuminata*.

Trần Đức Trung, Tạ Hồng Linh

Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Sơn đậu căn (*Sophora tonkinensis* Gagnep) thông qua nuôi cấy đốt thân.

Nguyễn Thị Lai, Nguyễn Thị Bình, Phạm Anh Đức, Phạm Hương Sơn, Lương Thúy Hằng, Nguyễn Minh Nam, Nguyễn Thị Ngọc Bích, Đinh Thu Linh

Nghiên cứu đặc điểm của gen chalcone isomerase phân lập từ cây sắn dây (*Pueraria montana* var. *lobata*).

Trần Thị Bích Ngọc, Nguyễn Tiến Dũng, Huỳnh Thị Thu Huệ

Tổng mục lục 2021.

1 Whole exome sequencing revealed a large deletion in *EDA* of a Vietnamese patient with hypohidrotic ectodermal Dysplasia.

Phuong Anh Nguyen, Thuy Duong Nguyen, Van Hai Nong

5 Underlying causes of persistent pneumonia in children at the Intensive Care Unit, Vietnam National Children's Hospital.

Kim Lam Hoang, Anh Tuan Ta, Thi Hong Yen Nguyen, Thu Nga Pham, Van Thang Pham

10 Association of *SOCS1* mRNA expression with hepatitis B virus infection-related hepatocellular carcinoma.

Thi Thuy Quynh Vo, Thi Phuong Thao Tran, Viet Phuong Nguyen, Van Dung Pham, Linh Toan Nguyen, Van Tong Hoang

15 Report of some cases with chromosomal mosaicism in prenatal diagnosis and the corresponding results after birth.

Thi Huyen Nguyen, Thi Hai Hoang, Thi Trang Dao, Thi Ngoc Lan Hoang, Thi Duyen Nguyen, Ngan Ha Nguyen, Thi Ha Vu, Thi Kim Phuong Doan

19 Prevalence of *Escherichia coli* carrying a gene encoding ESBLs in patients with common infectious diseases visiting primary health care centres in some provinces and cities of Vietnam.

Thi Mai Hung Tran, Thi Hong Duong, Minh Tan Luong, Thi Trang Le, Duy Thai Pham, Hoang Dung Ho, Thi Lan Phuong Nguyen, Thi Minh Nguyen, Thi Tam Khuong, Duc Anh Dang, Huy Hoang Tran

25 Antipyretic activity of *Calotropis gigantea*, *Vernonia cinerea*, and *Cissampelos pareira* extracts on lipopolysaccharide-induced pyrexia in rabbits.

Thi Xoan Le, Thi Phuong Nguyen, Van Hiep Nguyen, Thi Nguyet Hang Pham, Van Tai Nguyen

30 Isolation and structure determination of some compounds from the aerial parts of *Solanum torvum* Swartz. collected in Thua Thien - Hue.

Phuc Khanh Nhi Nguyen, Phuong Ha Tran, Le Tuan Anh Hoang, Thi Quy Thuy Dinh, Bich Huong La, Thi My Dung Vo, Hai Phong Nguyen, Canh Viet Cuong Le

34 Effect of packaging materials on the quality of oyster mushrooms (*Pleurotus sajjo caju*) during storage.

Thu Ha Tran, Thi My Ngoc Trinh, Duy Trinh Nguyen, Van Giang Nguyen

41 Allelopathy and allelochemical quantitative analysis in Pinto peanut (*Arachis pintoi*).

Khanh Linh Phan, Ngoc Hai Trieu Phong, Le Van Nguyen, Le Thi Ho

47 Transcriptome analyses of female black tiger shrimps (*Penaeus monodon*) for reproductive trait using RNA-sequencing approach.

Minh Thanh Nguyen, Thi Hai Yen Tran, Thi Minh Thu Vo, Thi Hong Tham Le, Van Sang Nguyen, Thanh Luan Nguyen, Viet Tuan Nguyen

52 *In-silico* genome-wide identification and characterisation of *NBS-LRR* gene family in banana *Musa acuminata*.

Duc Trung Tran, Hong Linh Ta

59 Study on *in vitro* propagation of *Sophora tonkinensis* Gagnep through stem node culture.

Thi Lai Nguyen, Thi Binh Nguyen, Anh Duc Pham, Huong Son Pham, Thuy Hang Luong, Minh Nam Nguyen, Thi Ngoc Bích Nguyen, Thu Linh Dinh

64 Characterisation of chalcone isomerase gene isolated from *Pueraria montana* var. *lobata* plant.

Thi Bích Ngọc Trần, Tiến Dũng Nguyễn, Thi Thu Huệ Huỳnh

69 Table of contents in 2021.