

Chương 3

LIỆU PHÁP GENE

I. GIỚI THIỆU

Hầu hết các thuốc truyền thống hoặc là protein hoặc là những phân tử nhỏ tương tác với protein. Hay nói cách khác chúng hoạt động ở cấp độ protein hơn là tác dụng trên cấp độ gen. với các bệnh nhiễm hoặc ung thư, những thuốc truyền thống như vậy là sự điều trị tốt nhất để điều trị tận gốc. Còn đối với các bệnh di truyền, thuốc truyền thống chỉ có khả năng điều trị triệu chứng, còn những khiếm khuyết cơ bản trên gene thì không có gì thay đổi. một cách tiếp cận khác để điều trị các bệnh như vậy là liệu pháp gene: sử dụng nucleic acids để sửa chữa những trình tự DNA mất chức năng hay ít nhất là sự bù đắp chức năng để phục hồi lại chức năng sinh lý bình thường của tế bào. Gene therapy là một trong những liệu pháp nổi bật và được gọi với cái tên là **gene medicine**, là liệu pháp chuyển acids nucleic vào trong tế bào người. một dạng khác của gene medicine là sử dụng nucleic acid hư là một loại thuốc truyền thống, mặc dù đích tác kích của liệu pháp thường nhắm vào RNA sản xuất bởi những gene bất thường hơn là tác kích vào protein. Một cách thức khác của liệu pháp gene là sử dụng DNA vaccine để biểu hiện các kháng nguyên trong cơ thể, liệu pháp này đang dẫn đầu trong những phương thức điều trị bằng liệu pháp gene.

Về bản chất, khi tiến hành nghiên cứu liệu pháp gene thì cũng phải tiếp cận theo chiều hướng ngược lại, đó là gây các bệnh đột biến di truyền cho động vật để tạo mô hình cho việc nghiên cứu. trong ứng dụng này của kỹ thuật chuyển gen, đột biến mô phỏng bệnh của người được dùng các kỹ thuật phân phối gene trong động vật. Điều này cho phép con người nghiên cứu các khía cạnh sinh lý sinh hóa của bệnh cũng như là nghiên cứu hiệu quả tác dụng của các loại thuốc mới. Nhiều kỹ thuật ứng dụng trong liệu pháp gen và mô hình bệnh đều dựa vào những nguyên tắc giống nhau, mặc dù với những mục đích khác nhau. Những mô hình động vật khác có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nucleic acids hay protein để can thiệp vào sự biểu hiện gene hay hoạt tính protein.

Kỹ thuật chuyển gen phối hợp với liệu pháp tế bào một cách nhanh chóng, sử dụng toàn bộ tế bào lấy từ bệnh nhân hay tế bào lấy từ một nguồn thay thế. Trong khi liệu pháp gene và liệu pháp tế bào là những liệu pháp đầy hứa hẹn, nhưng chúng vẫn gặp một số những trở ngại như vấn đề an toàn khi tác động trên mô hay những vấn đề liên quan đến đạo đức sinh học.

Liệu pháp gene và những vấn đề liên quan đến đạo đức sinh học:

Cả liệu pháp gene trên dòng tế bào sinh dưỡng hay sinh dục đều dấy lên những vấn đề liên quan đến đạo đức sinh học. Một vấn đề thường gặp là sẽ bị lạm dụng. liệu pháp gene không chỉ dùng để điều trị các bệnh mang tính phá hủy (hay loại bỏ bệnh từ một gia đình trong trường hợp sử dụng liệu pháp tế bào sinh dục) mà còn tăng cường những đặc tính có lợi theo sự đánh giá chủ quan và áp chế những đặc tính không có lợi. điều này có thể dẫn đến tạo ra một đứa trẻ được thiết kế, với những đặc điểm được chọn trước bởi cha mẹ chúng. Ở mức độ nghiêm trọng hơn thì liệu pháp gene có thể được sử dụng để thao tác, thiết lập gene cho toàn bộ quần thể. Có những tranh cãi rất mạnh mẽ liên quan đến đạo lý rằng chỉ nên sử dụng liệu pháp gene để điều trị bệnh khi bệnh đó không thể điều trị bằng bất kì cách nào khác, nhưng một vấn đề quan trọng được đặt ra là nếu liệu pháp gene có

thể được dùng để tăng IQ của một đứa trẻ từ 40 lên tới 100, điều này thì được gọi là điều trị bệnh hay tăng cường tiềm năng của gen? và ai sẽ đưa ra những qui định thế nào là chấp nhận được hay không chấp nhận được của việc sử dụng liệu pháp gen. Liệu pháp gen trên dòng tế bào sinh dục có hai vấn đề chính liên quan đến đạo đức sinh học.

1. Sự hạn chế về vấn đề kỹ thuật

Hiệu quả của biểu hiện gene ổn định là không tiên lượng được, vì thế cho dù bệnh cần điều trị có thể hết thì những khiếm khuyết khác được mang vào cũng không thể biết được. Những kết quả tai hại trong thử nghiệm liệu pháp gen điều trị trên dòng tế bào sinh dưỡng để điều trị bệnh SCID gần đây là một ví dụ điển hình về tiềm năng nguy hại mà nó có thể xảy ra tương tự đối với liệu pháp gen trên dòng tế bào mầm sinh dục

2. Không có một tiêu chuẩn đúng đắn để quyết định

Những kết quả riêng biệt từ việc sử dụng liệu pháp gen trên dòng tế bào sinh dục chưa đưa ra được những minh chứng đáng chấp nhận và do đó không có một ý kiến nào để có thể khẳng định rằng những vật liệu di truyền của họ có nên biến đổi hay không.

II. LIỆU PHÁP GENE

Liệu pháp gene được định nghĩa như một chiến thuật sử dụng liệu pháp rong đó tế bào của bệnh nhân được biến đổi về bộ gen nhằm làm nhẹ bớt hay điều trị bệnh. Có một sự phân biệt quan trọng giữa liệu pháp gen trên tế bào sinh dưỡng – sự biến đổi được đưa và bên trong tế bào sinh dưỡng của bệnh nhân, và khái niệm liệu pháp gene trên tế bào dinh dục – những biến đổi về gene được đưa vào tế bào sinh dục và do đó có thể truyền qua các thế hệ sau. Hiện tại chỉ liệu pháp gene trên tế bào sinh dưỡng được chấp nhận. trong khi có những lý do thuyết phục để cho phép sử dụng liệu pháp gene trên tế bào sinh dục trong một vài trường hợp giới hạn (khi cha mẹ chắc chắn sẽ sinh ra con mang bệnh do những khiếm khuyết trong gen của họ sẽ truyền lại cho con cái), ngoài ra những trường hợp khác bị cấm vì những lý do đạo đức sinh học như đã đề cập ở trên.

Có rất nhiều kiểu liệu pháp gen trên tế bào sinh dưỡng đã được đưa ra, và hầu hết những tiếp cận phù hợp phụ thuộc vào bản chất của bệnh.

1. Liệu pháp tăng cường

Điều này phù hợp cho việc điều trị các bệnh liên quan đến rối loạn di truyền gây ra bởi sự hoạt động gen không phù hợp (lấy lại chức năng gen). Mục đích là chuyển một gen mới mà sản phẩm của nó ngăn chặn sự biểu hiện của gen bệnh hay gen bị mất chức năng, hoặc can thiệp vào sự hoạt động của sản phẩm gen

2. Liệu pháp gen thay thế

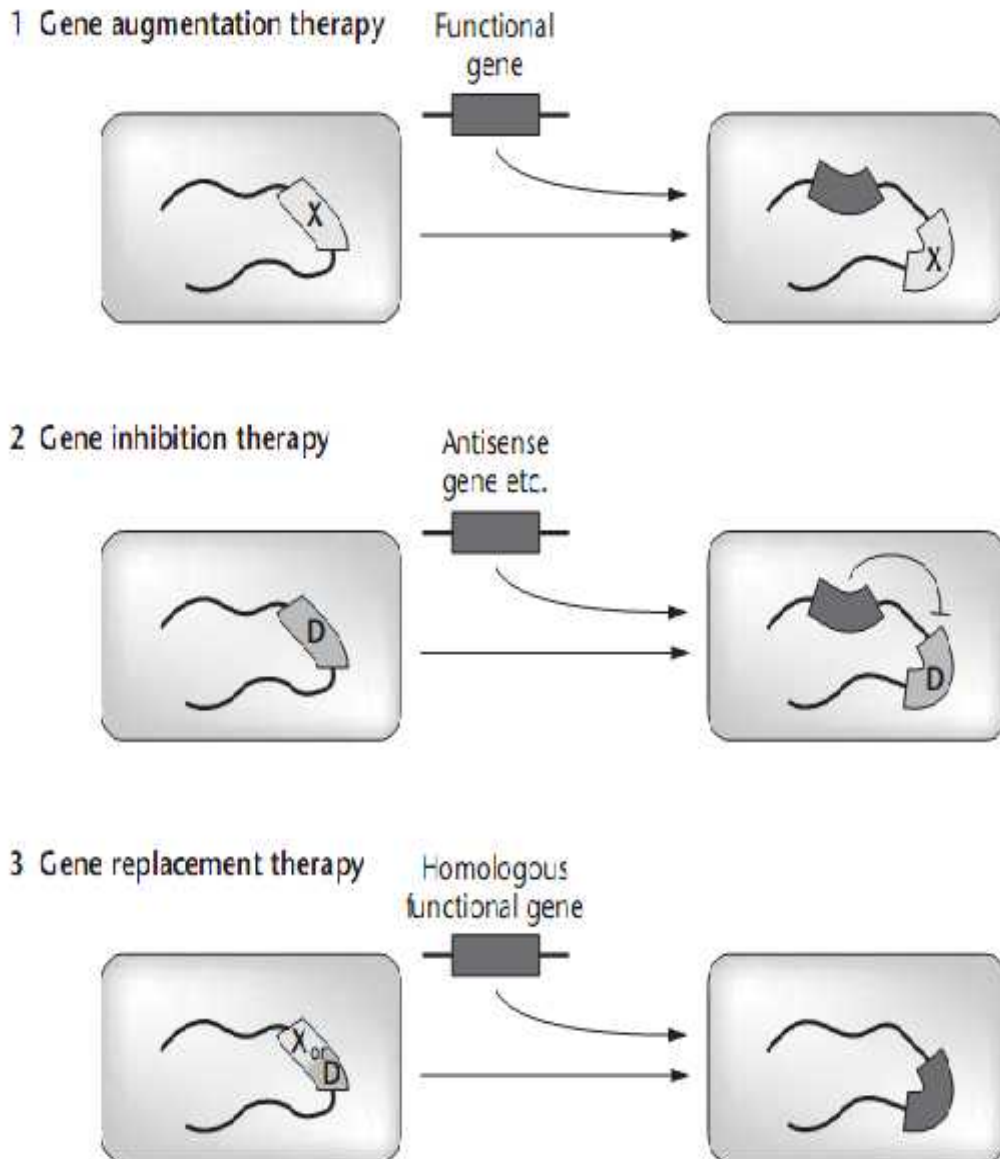
Liệu pháp này chỉ phù hợp cho bệnh liên quan đến rối loạn di truyền (không phải điều trị bệnh nhiễm hoặc ung thư), nhưng có thể được dùng để điều trị các bệnh đã bị mất hay muốn hồi phục lại chức năng.

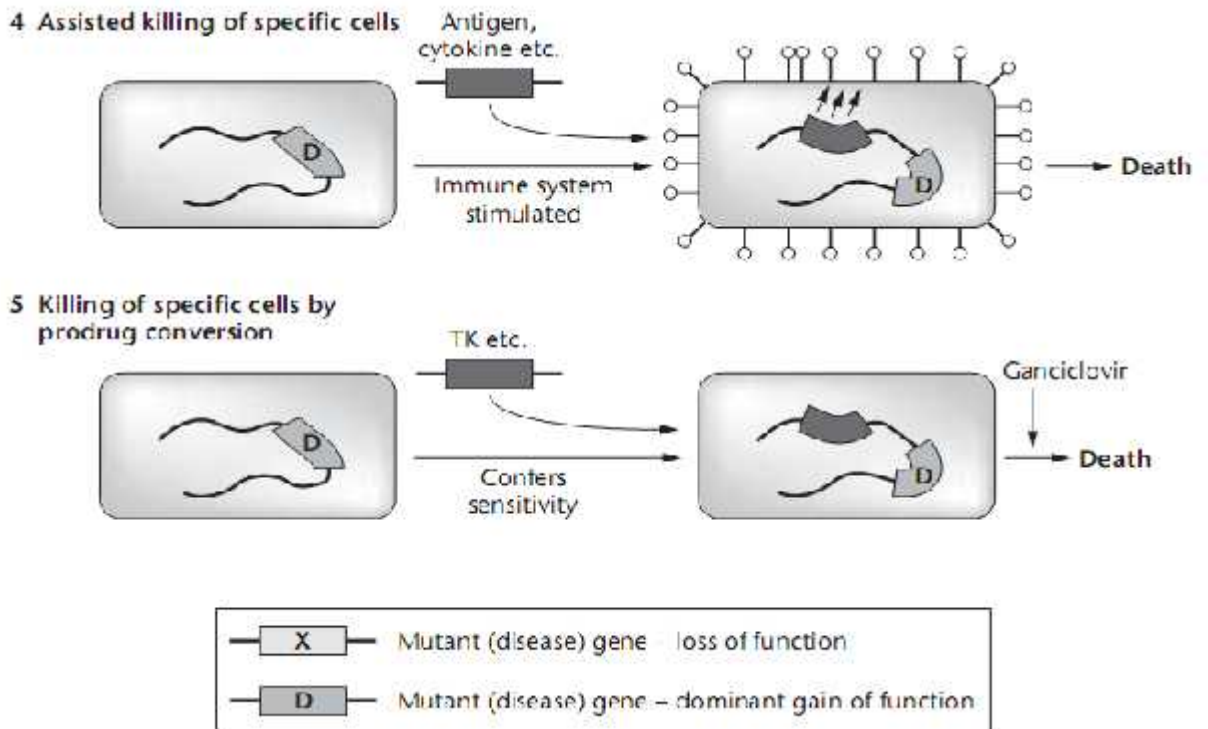
Mục đích là để chuyển một gen bình thường có khả năng tái tổ hợp với gene bệnh để thay thế chúng. Đây là một cách tiềm năng nhất để sửa chữa những khiếm khuyết di truyền, nhưng điều này phụ thuộc vào sự tái tổ hợp tương đồng – tiến trình thường không hiệu quả trong hầu hết các tế bào.

3. Giết các tế bào đích

Điều này phù hợp cho các bệnh như ung thư nhằm loại bỏ một quần thể tế bào nào đó. Mục đích là biểu hiện trong các tế bào như vậy các gen gây độc. Một tiếp cận nữa là sự

biểu hiện của protein làm cho tế bào bị tổn thương để thu hút sự tấn công của hệ thống miễn dịch. Hay sự biểu hiện của một enzymes để chuyển các hợp chất vô hại (tiền thuốc) thành một phân tử độc một enzyme. Do tác dụng gây độc của gen tự sát, chúng phải được chuyển trực tiếp vào loại tế bào đích với độ chính xác cao để tránh các tác dụng phụ

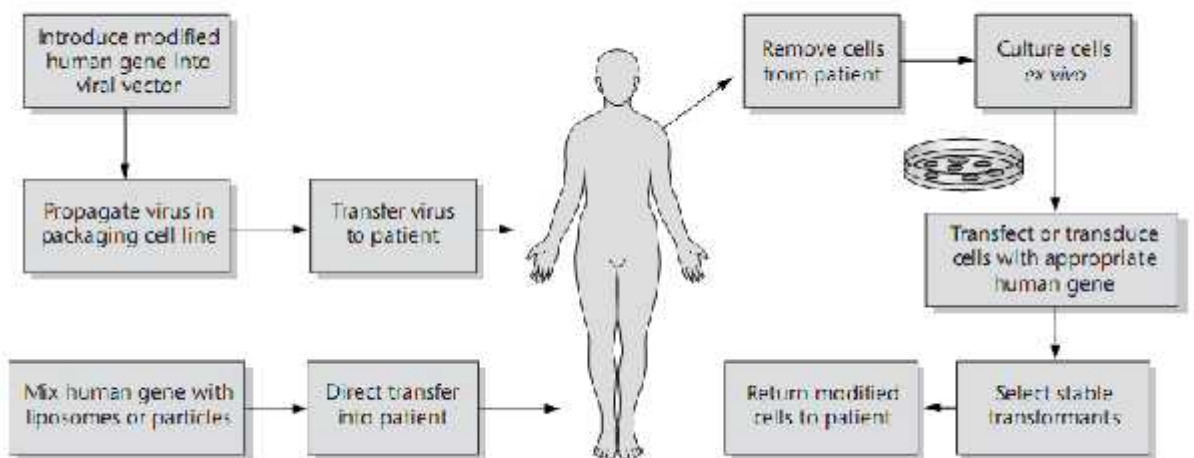




Hình 1: Các cách tiếp cận sử dụng liệu pháp gen khác nhau

III. CHIẾN LƯỢC PHÂN PHỐI GENE

Những bệnh di truyền thường được biểu hiện trong những quần thể tế bào chuyên biệt. đôi khi trong trường hợp của bệnh ung thư, do những đột biến gây bệnh hiện diện chỉ trong quần thể tế bào đó. Đối với những rối loạn di truyền, đột biến thường hiện diện trong tất cả các tế bào nhưng tác động lại giới hạn với những tế bào có gen được biểu hiện (hay ở những tế bào có biểu hiện gen bình thường bị mất). phương pháp lựa chọn cho chuyển DNA trong liệu pháp gen do đó phụ thuộc vào tính khả năng của tế bào tương ứng.



Hình 2: Các chiến lược sử dụng liệu pháp gen

Nếu tế bào có thể lấy ra và nuôi cấy mà không làm hại đến bệnh nhân, sau đó chúng được chuyển gene trong khi nuôi và sau đó chuyển lại vào cơ thể bệnh nhân. Liệu pháp *in*

vivo này có thể ứng dụng để điều trị các rối loạn liên quan đến hệ miễn dịch và máu bởi vì tế bào gốc tạo máu có thể lấy ra, nuôi cấy, và chuyển gen tương đối dễ. Hơn nữa, chúng có thể tồn tại trong thời gian dài khi chuyển ngược lại trong cơ thể bệnh nhân và do đó có thể phát triển lượng lớn tế bào đời con. Liệu pháp gene *ex vivo* cho phép gen đích được kiểm soát cẩn thận trong khi nuôi cấy, vì thế những tế bào được biến đổi di truyền có thể chọn lọc chính xác. Với những tế bào không có khả năng nhận gen chuyển hay những tế bào không thể nuôi cấy hiệu quả, liệu pháp gene liên quan đến chuyển trực tiếp DNA vào trong tế bào trong khi tế bào vẫn còn nằm trong cơ thể. Phương pháp này được gọi là liệu pháp gene *in vivo* và hệ thống phân phối gen phải đòi hỏi vừa hiệu quả và chuyên biệt cho một loại tế bào đích. Chuyển gen trúng đích *in vivo* đặc biệt rất quan trọng khi chuyển các gen gây độc cho tế bào.

IV. CƠ CHẾ PHÂN PHỐI GENE

Hệ thống chuyển gen dùng trong liệu pháp gene là vector virus hoặc nonvirus. Chuyển gen bằng virus hay còn dùng thuật ngữ transduction, liên quan đến sự đóng gói DNA (hoặc RNA) vào trong virus. Chuyển gen xảy ra theo cơ chế xâm nhập thông thường của virus và do đó vừa hiệu quả vừa chọn lọc. Cũng chính vì lý do này chuyển gen sử dụng virus là chiến lược được yêu thích cho liệu pháp gene *in vivo*.

Nhưng một điều quan trọng là virus chính là thực thể gây bệnh do đó bắt buộc phải trải qua bước giảm độc lực của chúng trước khi sử dụng.

Đặc tính của virus dùng cho chuyển gene

Vector virus dùng cho chuyển gene được đánh giá cơ bản dựa trên hiệu quả chuyển gen, khả năng mang DNA ngoại lai, tính an toàn, cơ chế chuyển gen (nằm ngoài tế bào chất hay gắn chèn vào trong bộ gen) cũng như khả năng tồn tại trong cơ thể vật chủ. Không có loại virus nào là thích hợp cho tất cả vật chủ mặc dù những mối quan tâm để thiết kế các loại virus lai ngày càng tăng (virus phối hợp các đặc điểm tốt nhất của các loại virus khác).

Adenovirus

Đây là những virus DNA gây bệnh nhẹ trên các ống hô hấp ví dụ như gây cảm lạnh thông thường. Gen chuyển nằm ngoài nhân và virus có thể xâm nhiễm trên phạm vi rộng kể cả ở các tế bào đang phân chia hay không ở trạng thái phân chia. Ưu điểm: hiệu quả xâm nhiễm cao, khả năng mang một đoạn DNA lớn (lên tới 35kb). Nhược điểm: sự biểu hiện gen không kéo dài, tính an toàn thấp (gây đáp ứng viêm ở nhiều bệnh nhân). Đáp ứng viêm như vậy đã dẫn đến cái chết của một người 18 tuổi trong giai đoạn thử nghiệm phase 1 cho bệnh liên quan đến rối loạn chức năng gan (OTD). Tất cả thử nghiệm liệu pháp gene liên quan đến Adenovirus đã bị tạm ngưng để xác định lại tính an toàn.

Adeno-associated viruses (AAV)

AAV là virus DNA mạch đơn gây ra bệnh nhiễm không triệu chứng. Sự chuyển gene là sự gắn chèn ổn định và virus có thể nhiễm trên phạm vi rộng ở cả tế bào đang phân chia hay ở trạng thái không phân chia. Ưu điểm: an toàn (virus đòi hỏi phải có sự hiện diện của cả adenovirus và herpes virus để sao chép và do đó không có khả năng sao chép một cách tự nhiên), tính ổn định (gắn chèn ổn định vào bộ gen cho phép biểu hiện protein trong thời gian dài). Nhược điểm: khả năng mang gen <5kb. Virus hoang dại có một đặc tính thú vị là nó có thể gắn chèn tại vị trí xác định vào bộ gen người trên NST 19 do đó làm giảm nguy cơ bị đột biến do gắn chèn.

Baculoviruses

Baculovirus là virus DNA thường nhiễm vào côn trùng, nhưng chúng có thể nhiễm vào tế bào người. gen được chuyển vào trong tế bào chất. những báo cáo ban đầu nhận định virus này có thể nhiễm vào tế bào gan nhưng những nghiên cứu sau này chỉ ra rằng chúng có thể nhiễm vào phạm vi tế bào rộng hơn. Ưu điểm: tính an toàn (virus nhiễm vào tế bào động vật nhưng không thể sao chép trong những tế bào này), khả năng mang DNA lạ, virus có hình que nên có thể mang đoạn DNA không giới hạn. Nhược điểm: hiệu quả chuyển gen (virus nhạy cảm với sự bất hoạt qua trung gian bề mặt, mặc dù chiến thuật này đã được phát triển để vượt qua những giới hạn này). Không giống như bốn loại virus vừa kể trên, baculovirus chưa được sử dụng trong thử nghiệm liệu pháp gen.

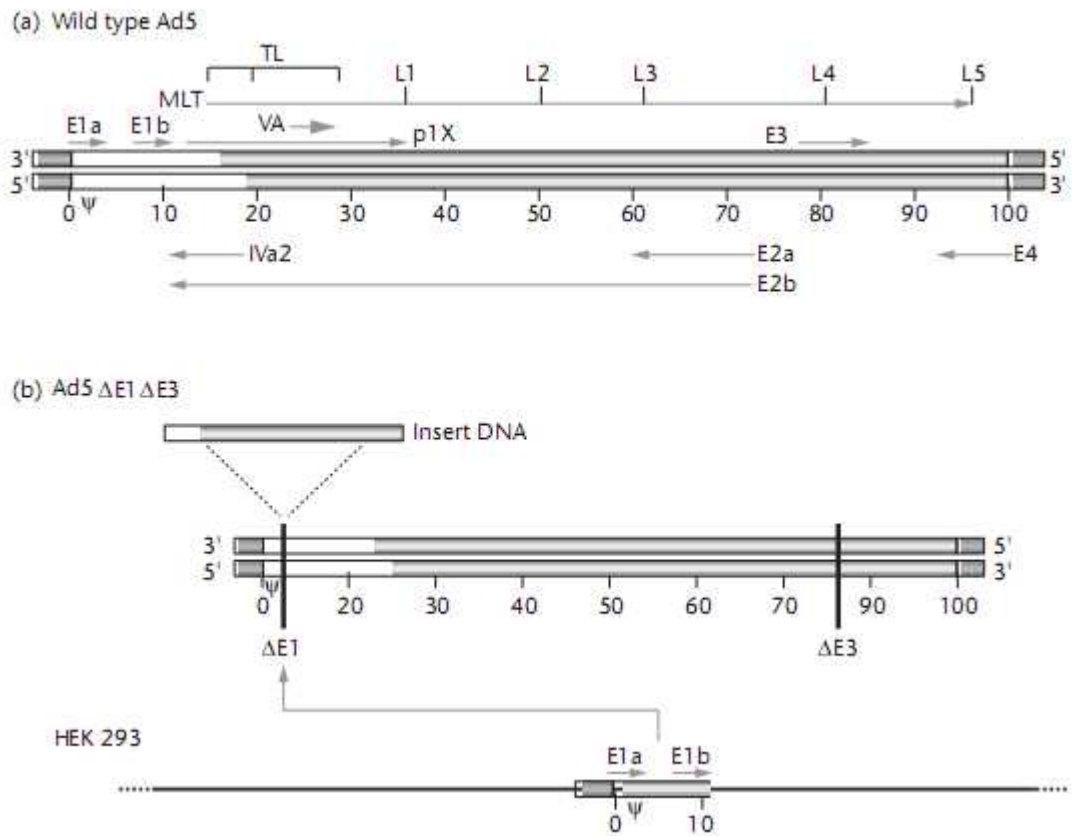
Herpesvirus

Herpes simplex virus (HSV) là một virus DNA đóng vai trò trong việc biểu hiện những đặc tính thần kinh bất thường, điều này khiến nó trở thành ứng cử viên cho liệu pháp gen thần kinh. Gen chuyển nằm ngoài tế bào chất và virus có thể xâm nhiễm các tế bào khác thông qua mạng synapse. Ưu điểm: khả năng mang DNA lạ không giới hạn, khả năng biểu hiện gen ổn định.

Retrovirus

Retrovirus là virus RNA và có enzyme phiên mã ngược tổng hợp DNA. DNA có thể gắn chèn vào genome của vật chủ, kết quả là tạo nên sự biểu hiện gen ổn định. Các retroviruses điển hình ci nhiễm vào tế bào đang trong giai đoạn phân chia, điều này làm chúng thích hợp cho liệu pháp tế bào ung thư. Tuy nhiên vector dựa trên lentivirus (như HIV) có thể nhiễm cả trên tế bào không ở trạng thái đang phân chia. Ưu điểm: năng suất nhân lên rất nhanh, và khả năng xâm nhiễm hiệu quả, biểu hiện gen ổn định. Nhược điểm: khả năng mang đoạn DNA <8Kb, tính an toàn không cao (sự gắn chèn ngẫu nhiên và do đó gây nguy hiểm cho bộ gen vì có thể gây đột biến do gắn chèn). Cơ chế gắn chèn có thể dẫn đến kết quả hoạt hóa các gen lân cận bao gồm cả các oncogene. Một đặc tính không an toàn khác liên quan đến việc sử dụng virus HIV cho cấu trúc của vector, đây là loại virus duy nhất dùng cho liệu pháp gen mà sẽ gây bệnh chết người.

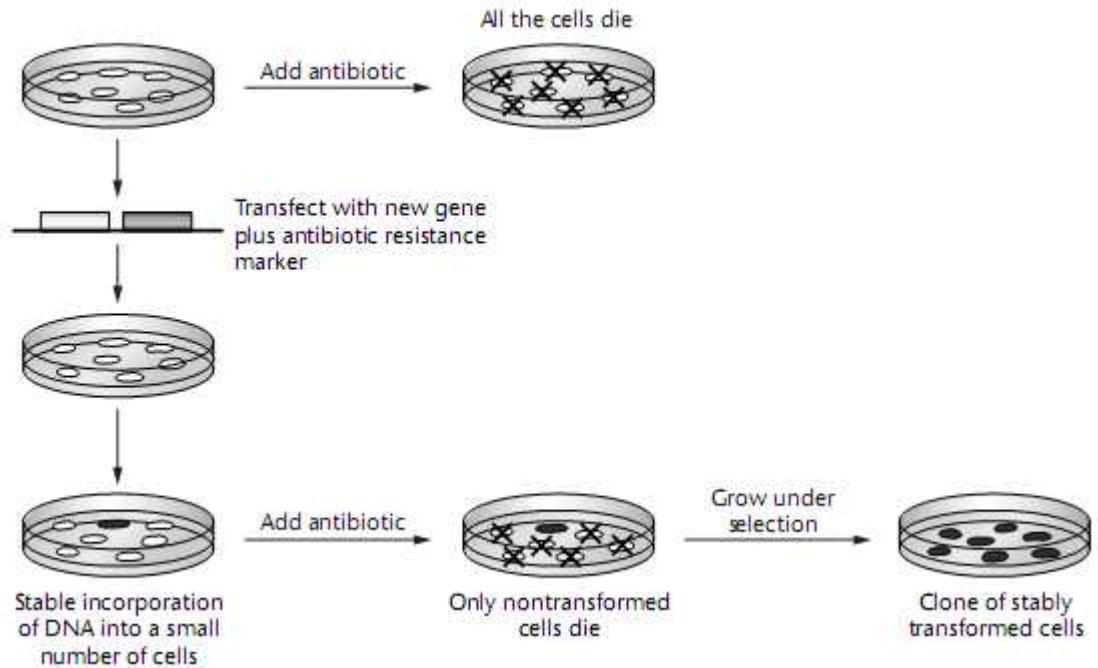
Phương pháp thông thường là loại bỏ những gen thiết yếu và do đó làm cho virus mất khả năng sao chép, cũng là một cách thức để tăng khả năng mang DNA ngoại lai. Để chuẩn bị một lượng lớn các virus như vậy cần phải được cung cấp từ một nguồn thay thế. Có nghĩa là phải sử dụng các helper virus để cung cấp các sản phẩm gen khiếm khuyết nhưng trong hầu hết các trường hợp sử dụng các dòng packing line. Khi DNA được đóng gói, những virus khiếm khuyết có thể được phân lập từ dòng đóng gói. Tiếp theo nó sẽ xâm nhiễm vào tế bào đích để chuyển DNA hay RNA đích nhưng không thể sao chép và gây ra những triệu chứng bệnh. Những đặc điểm an toàn nên được xây dựng trong các dòng đóng gói để làm giảm sự tái tổ hợp giữa các virus khiếm khuyết, và chức năng được hỗ trợ bởi các helper virus, nếu không những virus có độc lực có thể được tạo ra.



Hình 3: a, Sơ đồ bộ gen của adenovirus hoang dại Ad5. b, vector Adenovirus đã loại bỏ vùng E1 và E3 để chèn đoạn DNA mục tiêu.

Phương pháp chuyển gen không sử dụng virus thì được đánh giá là an toàn hơn sử dụng virus, bao gồm **transfections** (tế bào được kích thích để nhận các DNA từ xung quanh chúng) và **direct transfer** (DNA được chuyển vào trong tế bào bằng các phương pháp vật lý như vi tiêm,...). DNA không được đóng gói trong vector virus mà thường hiện diện ở dạng plasmid. Trong một vài trường hợp, plasmid thì không được thiết kế để sao chép trong tế bào người và do đó cách duy nhất giúp cho sự biểu hiện kéo dài và ổn định là gắn chèn vào bộ gen. Đây là một trường hợp hiếm (nhỏ hơn một trong một triệu tế bào được chuyển gen ổn định vì thế những tế bào hiếm hoi này phải được chọn lọc bao gồm những marker gen cho phép tế bào tăng trưởng trong sự hiện diện của những hợp chất như kháng sinh- chất gây độc cho những tế bào không được chuyển gen.

Đối với liệu pháp gen nonvirus *in vivo*, cần thiết phải có vùng khởi sự sao chép của virus trong vector plasmid, cho phép vector tồn tại như một thể sao chép trong tế bào chất của tế bào được chuyển gen. sự tồn tại trong tế bào chất vẫn chưa được xác định và sự biểu hiện của các gen được chuyển do đó bị giới hạn. Đối với sự chuyển gen trực tiếp, DNA thường được bao bọc trong một vài phức hợp mà có thể dung hợp với tế bào đích hay kích thích sự nhập bào bởi endocytosis.



Hình 4: Sử dụng marker chọn lọc để chọn lọc và tăng sinh dòng mục tiêu

Ví dụ như DNA có thể đóng gói trong các hạt lipid hay còn gọi là liposomes, liposome có thể dung hợp với màng tế bào, chuyển vật mang (acid nucleic) vào trong tế bào chất. hiệu quả chuyển gen qua trung gian liposome có thể tăng tác dụng khi lấy liposome từ vỏ ngoài của virus – chứa protein tăng cường sự dung hợp của màng. Những phương tiện như vậy được gọi là **Virosomes**. Không giống như sự chuyển gen thông qua liposome, **lipofection** liên quan đến sự hình thành của phức hợp DNA-Lipid (**lipoplex**)- phức hợp nhập bào thông qua endocytosis. Gần đây nhưng phương tiện chuyển gen dựa trên polimer ion dương (**polyplex**) ngày càng trở nên phổ biến bởi vì các đồng polymer đặc biệt có thể sử dụng để biến đổi đặc tính vật lý của vật liệu chuyển gen. trong một vài trường hợp nó đã minh chứng rằng có thể hình thành những phức hợp có những đặc tính khác nhau ở những nhiệt độ khác nhau, giúp cho phép việc phóng thích DNA được kiểm soát. Nó được sử dụng đặc biệt cho chuyển gen *in vivo* tới những vị trí đặc biệt trong cơ thể - có thể làm nóng lên hay lạnh bớt tại từng vị trí tương ứng. Nói chung, sự phân phối của DNA được đóng gói thì ít hiệu quả hơn sử dụng vector virus. Một số DNA bị phân cắt trong tế bào trước khi nó vào trong nhân. Rất khó khi sử dụng chuyển gen không sử dụng virus để chuyển vào một tế bào chuyên biệt, mặc dù vẫn có thể tạo cặp gắn DNA với một phân tử khác mà nó gắn chuyên biệt trên một loại vector của tế bào đích hay còn gọi là **receptor-mediated endocytosis**.

Có những bằng chứng chứng tỏ rằng có thể chuyển DNA trực tiếp vào một vài mô *in vivo*. Ví dụ như sự tiêm dung dịch DNA vào trong mô cơ kết quả là có gen chuyển trong một vài tế bào, và sự biểu hiện gen kéo dài ổn định trong vài tháng. Để chuyển DNA lên mô, có một phương pháp gọi là **particle bombardment**- phương pháp sử dụng các vật nhỏ bọc DNA và đưa vào mô đích sử dụng áp suất khí cao hay sử dụng dòng điện để tác kích.

V. NGHIÊN CỨU THỰC TIỄN

Trên 500 quy trình liệu pháp gen đã được đưa ra, hơn một nửa trong số đó là ứng dụng điều trị ung thư. Sau đây là một vài trường hợp nghiên cứu mô tả những cách

thức khác nhau sử dụng liệu pháp gen đã ứng dụng trong thực tế và đồng thời cũng đề cập đến những bất cập của liệu pháp. Và cũng cần nhấn mạnh rằng liệu pháp gen vẫn là liệu pháp có tính nguy cơ gây hại cao với kết quả chưa dự đoán hết được.

1. Sử dụng liệu pháp gen *in vivo* tăng cường chức năng điều trị bệnh xơ nang

Khoảng 10% các quy trình liệu pháp gen được đưa ra để điều trị các bệnh theo quy luật di truyền Mendel. Đó là bởi vì sự khiếm khuyết các gen đơn nên dễ dàng sử dụng liệu pháp gen. bệnh xơ nang (CF) là bệnh di truyền do một gen gây ra rất phổ biến trong cộng đồng người Caucasi, với tỉ lệ mắc bệnh là 1/2000. Do sự khiếm khuyết trong CFTR gen dẫn đến sự mất kênh Chloride liên đới với màng tế bào. Ảnh hưởng của bệnh này thường được biểu hiện nhiều trong hệ thống tiêu hóa và tuyến tụy, khi bị mất cân bằng kênh chloride sẽ dẫn đến một lượng lớn chất nhầy được tạo ra. Trong phổi, nó gây hóc khàn khi thở và làm tăng khả năng nhiễm, trong khi đó ở tụy, lớp chất nhầy khóa sự tiết của các enzyme tiêu hóa dẫn đến suy dinh dưỡng. Sự chuyển gen CFTR có chức năng sẽ giúp hồi phục những ảnh hưởng này.

Những thử nghiệm khởi đầu liên quan đến sử dụng adenovirus vector – vector nhiễm tự nhiên vào những tế bào đường hô hấp. Vector được chuyển vào nhờ bình xịt và động tác hít vào, thử nghiệm tiến hành trên một vài bệnh nhân, liều cao của vector gây ra phản ứng viêm. Gần đây sử dụng các vector an toàn hơn như adeno-associated virus hay chuyển gen bằng liposome. Tuy nhiên kết quả thu được không mấy khả quan. Một lý do chính của điều này là những vector chuyển vào không thể xuyên qua lớp nhầy phủ đầy trên phổi của bệnh nhân bị xơ nang.

2. Liệu pháp tăng cường *ex vivo* cho bệnh: thiếu hụt miễn dịch tổ hợp trầm trọng (SCID)

Thử nghiệm đầu tiên đã được diễn ra vào năm 1990 trên một cô bé 4 tuổi bị mắc chứng bệnh suy giảm miễn dịch tổ hợp trầm trọng (SCID). Bệnh có đặc điểm là thiếu tế bào lympho có chức năng (tế bào B và tế bào T), kết quả là bệnh nhân không có khả năng chống chịu với sinh vật nhiễm. SCID có thể gây ra bởi rất nhiều khiếm khuyết nhưng đặc biệt là khiếm khuyết trên gen ADA, gen mã hóa cho enzyme adenosine deaminase. Cách điều trị truyền thống cho ADA-SCID là cấy truyền tủy xương từ người cho tương ứng hoặc là thường xuyên tiêm enzyme ADA tái tổ hợp, khi không được điều trị những đứa trẻ này phải sống trong ôi trường nhân tạo, không chứa vi trùng, do đó chúng được gọi với cái tên là “bubble babies”.

Bệnh liên quan đến ADA có thể sử dụng liệu pháp gen để điều trị do một vài lý do:

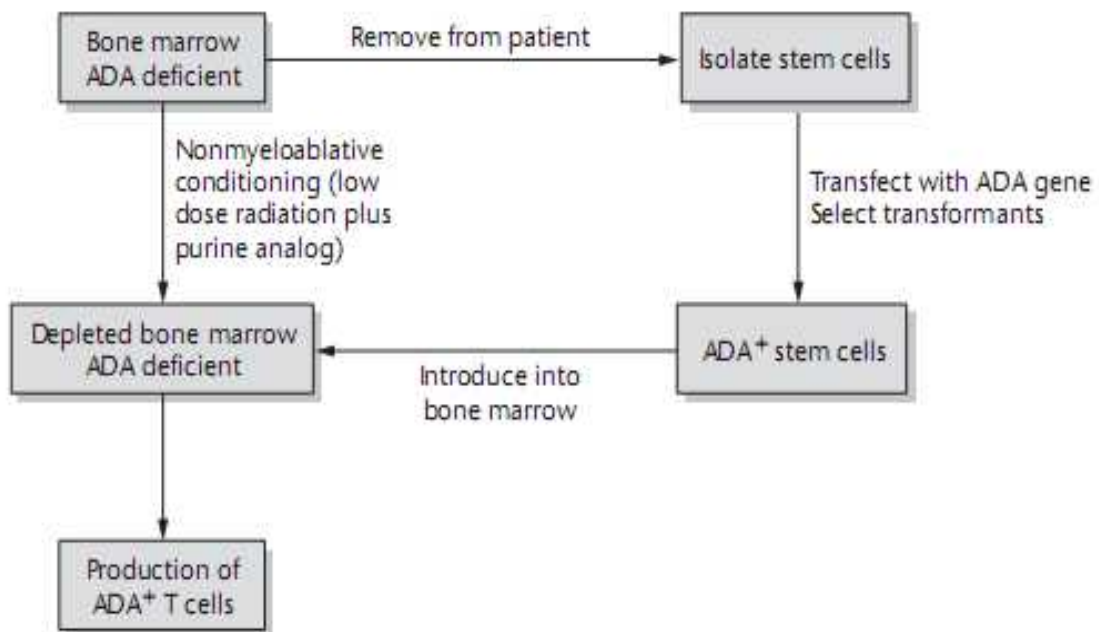
- Bệnh gây ra do mất chức năng của một gen đơn
- Mức độ ADA biến thiên rộng rãi trong quần thể do đó sự kiểm soát chặt chẽ gen chuyển là không cần thiết
- Gen ADA nhỏ và dễ thao tác trong phòng thí nghiệm
- Tế bào đích cho liệu pháp gen là lymphocyte nên dễ dàng lấy ra, nuôi cấy, và chuyển ngược lại cơ thể bệnh nhân
- Những liệu pháp điều trị thay thế thì mắc và đe dọa đến tính mạng.

Một gen ADA có chức năng được chuyển vào trong vector retrovirus và được dùng để chuyển vào tế bào T được nuôi cấy, và tiếp theo đó là chuyển ngược lại vào cơ thể bệnh nhân. Mặc dù đã thu được những thành công bước đầu nhưng hiệu quả của liệu pháp điều trị rất ngắn và bệnh nhân vẫn tiếp tục phụ thuộc vào enzyme ADA cho tới ngày nay. Những thử

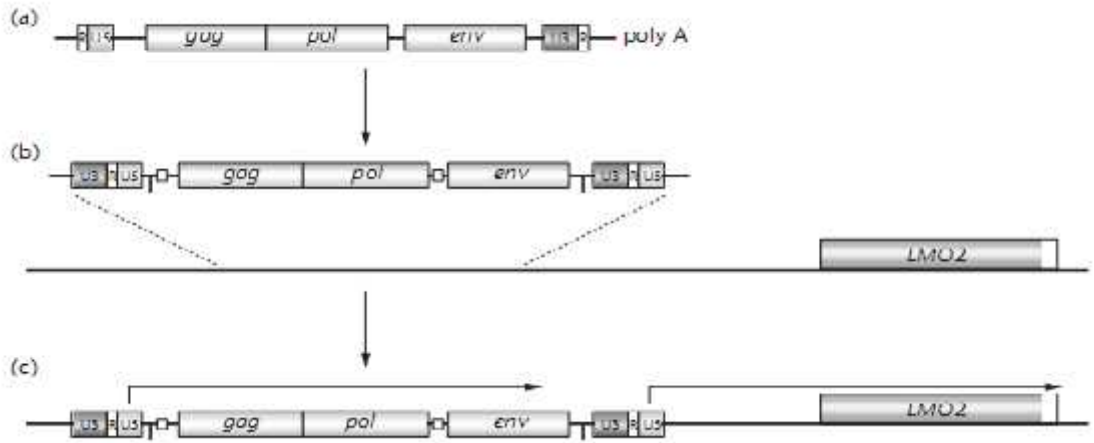
nghiệm xa hơn được tiến hành trên tế bào tủy xương hoặc tế bào máu cuống rốn, chúng được sử dụng như tế bào đích bởi vì những quần thể tế bào này chứa tế bào gốc và sẽ sản sinh ra tế bào lympho trong giai đoạn sống của chúng. Sự biến đổi thực hiện trên những dòng tế bào gốc này đã tạo ra các tế bào sản xuất ADA lâu hơn nhưng vẫn ở mức độ thấp.

Vào năm 2002 có một khám phá trong liệu pháp gene ADA-SCID sử dụng kỹ thuật gọi là **nonmyeloablative conditioning**. Phương pháp này tiến hành hủy tủy xương của bệnh nhân SCID để giúp cho các tế bào gốc đã biến đổi có cơ hội để tăng sinh. Một yếu tố quan trọng khác là những đứa trẻ thử nghiệm liệu pháp này phải chưa từng được điều trị với ADA. Đường như việc xử lý với enzyme trước đó làm nên sự không thành công của phương pháp này.

Bệnh nhân đầu tiên sử dụng liệu pháp mới này là một cô bé 2 tuổi người Palestinian, người chưa bao giờ được điều trị với ADA trước đó. Liệu pháp này mang tính khả thi vì bệnh nhân đã có khả năng sản xuất kháng thể như những đứa trẻ khác, có thể chống lại các bệnh cúm gà. Liệu pháp gen cũng được dùng để điều trị bệnh SCID liên kết với giới tính, gây ra do mất chuỗi gamma của receptor interleukin 2. Cũng giống như ADA-SCID, liệu pháp *in vivo* được thực hiện chuyển gen IL2RG có chức năng vào vector retrovirus sau đó chuyển vào tế bào gốc tạo máu, sau đó chuyển ngược lại cơ thể bệnh nhân. Chín trong mười một bệnh nhân đã được điều trị bằng phương pháp này, nhưng từ khi bắt đầu tiến hành thí nghiệm hai trong số họ đã bị ung thư bạch cầu, có thể là do sự hoạt hóa của một oncogene gần với vị trí gắn chèn của retrovirus. Do đó hiện nay những thử nghiệm liên quan đến sử dụng retrovirus đã bị ngưng lại cho đến khi có những dữ liệu đầy đủ của cá bệnh nhân còn lại.



Hình 5: Liệu pháp gen cho ADA-SCID sử dụng phương pháp nonmyeloablative



Hình 6: Cơ chế dẫn đến ung thư bạch cầu ở bệnh nhân sử dụng liệu pháp gen do sự tái tổ hợp tương đồng liên quan đến retrovirus

Chương 4

MỘT SỐ KỸ THUẬT SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH CHỨC NĂNG BỘ GENE

I. Giới thiệu về lĩnh vực phân tích chức năng bộ gene

Bộ gene là một bộ sưu tập DNA của sinh vật. Phân tích chức năng bộ gene là một lĩnh vực nghiên cứu bao quát bộ gene, nghiên cứu về chức năng DNA (bao gồm những phần mang gene và không mang gene) cũng về nucleic acid và sản phẩm protein được mã hóa bởi DNA.

- Phân tích chức năng bộ gene có thể được ứng dụng để hoàn thành bộ sưu tập DNA (bộ gene), RNA (sản phẩm phiên mã) hay protein (sản phẩm dịch mã) một sinh vật. Việc đánh giá quá trình phiên mã RNA ở những giai đoạn phát triển khác nhau hoặc ở các cơ quan khác nhau trên cơ thể là một ví dụ cho lĩnh vực này.

- Để phân tích chức năng gene cần sử dụng các kỹ thuật quét tần suất cao (high-throughput screening_HTS). Đây là một phương pháp thử nghiệm khoa học sử dụng robot để thực hiện đồng thời thí nghiệm trên hàng loạt mẫu (có thể lên đến hàng ngàn mẫu) thông qua phần mềm vi tính.

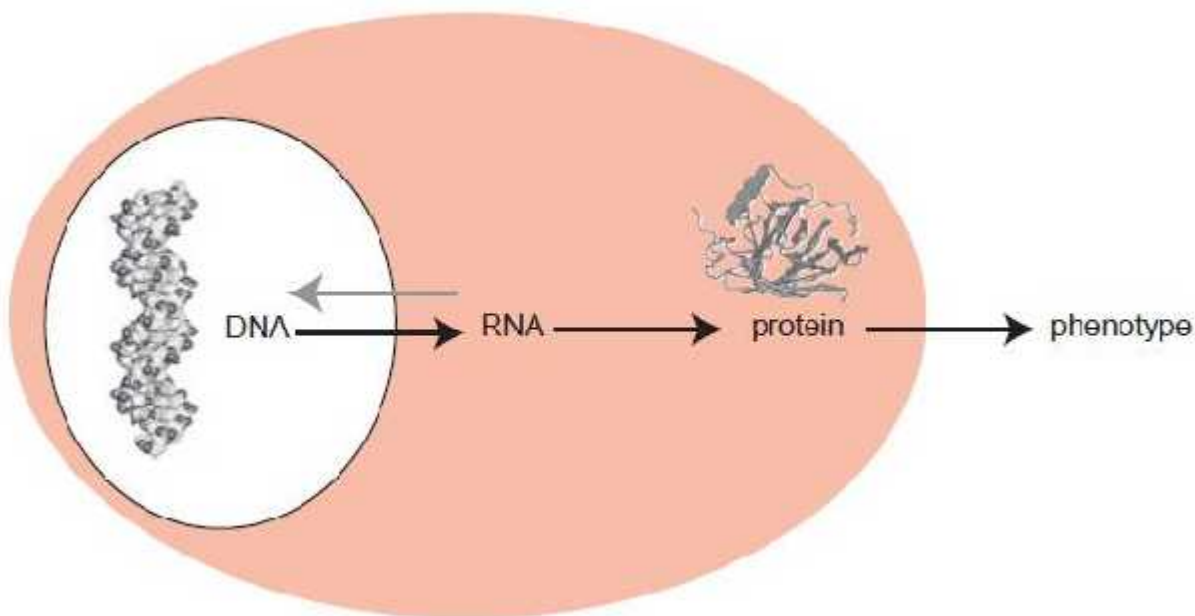
- Một khó khăn trong quá trình phân tích chức năng gene là khó có thể xác định được ảnh hưởng của gene đó lên sự hoạt động của các gene khác trong bộ gene. Ví dụ như ở nấm men *Saccharomyces cerevisiae* thì mỗi gene bị khóa một cách riêng rẽ còn “dây mã hóa” sẽ được đề cập ở phần dưới.

- Khó khăn lớn nhất trong lĩnh vực này là phải hiểu được mối quan hệ giữa kiểu gene và kiểu hình. Việc gắn kết 2 phần này là mục đích cơ bản của phân tích chức năng gene.

Trong tế bào, thông tin bộ gene được thể hiện qua 3 thành phần: DNA, RNA và protein. Các thành phần khác như lipid và các chất chuyển hóa cũng là những thành phần đáng quan tâm, tuy nhiên chúng không chứa thông tin như các thành phần nêu trên. Phạm vi của phân tích chức năng gene bao gồm 2 mức độ:

- (1) Sự biến thể tự nhiên: Gene, RNA và protein thay đổi như thế nào giữa các phần cơ thể hay giữa các giai đoạn phát triển?

- (2) Sự ngừng hoạt động chức năng xảy ra trong tự nhiên và trong nghiên cứu, thí nghiệm. Phạm vi này bao gồm sự mất, thêm, chuyển và hoán vị xảy ra trong toàn bộ bộ gene, trong nhiễm sắc thể hay ở một nucleotide. Khi có mất vật chất di truyền, thường là mất hàng triệu cặp baz và mất đi từ 1 đến hàng tá gene, sẽ dẫn đến việc mất đi một số RNA, protein. Bên cạnh đó, sự tăng thêm vật chất di truyền cũng thường thấy trong tự nhiên, ví dụ như hội chứng Down do có sự tăng thêm 1 nhiễm sắc thể 21. Việc tăng thêm vật chất di truyền kéo theo sự tăng biểu hiện của mRNA và các protein được mã hóa trong nhiễm sắc thể 21. Ngoài ra, còn có thể tăng biểu hiện DNA, RNA hay protein bằng cách chuyển gen.



Hình 1: Phân tích chức năng gene tiến tới phân tích protein tần suất cao. Từ trái sang phải chúng ta có thể xem xét một vài khía cạnh trong 1 tế bào: chức năng liên quan đến DNA, RNA và protein cũng như các khía cạnh cao hơn như tương tác protein, con đường sinh hóa, trao đổi chất tế bào và cuối cùng là kiểu hình của tế bào và của sinh vật. Hai khía cạnh khác mà phân tích chức năng gene nghiên cứu là sự biến động tự nhiên và sự ngừng hoạt động chức năng. Để nghiên cứu về sự biến thể tự nhiên cần so sánh trạng thái của DNA, RNA, protein hoặc các thành phần khác trong tế bào thay đổi theo thời gian và dưới các điều kiện sinh lý khác nhau hoặc sự thay đổi giữa các loại tế bào và các vùng cơ quan trong cơ thể. Sự mất chức năng thường xảy ra trong tự nhiên do có nhiễm sắc thể bất thường: Hội chứng Williams do mất đoạn ở nhiễm sắc thể 7, Hội chứng Down do có thêm 1 nhiễm sắc thể 21.

	DNA	RNA	Protein
Biến thể tự nhiên	SNPs, epigenomivà cs	Phân tích sản phẩm phiên mã (microarray, SAGE)	Định vị protein; tương tác protein – protein; con đường chuyển hóa
- Giữa các giai đoạn			Thay đổi hóa học
- Giữa các cơ quan			Myasthenia gravis
- Giữa các chủng, loài			
Mất chức năng	Knockout gene	RNAi; siRNA	
- Trong thí nghiệm	Động vật chuyển gene	Suy giảm RNA	
- Trong tự nhiên	Hội chứng Williams	không mã hóa trung gian	
	Hội chứng Down		
	Ung thư		
	Biến đổi nhiễm sắc thể		

II. Các nghiên cứu trong phân tích chức năng gene

1. *Mức độ biểu hiện gene*

Nhà sinh học phân tử có thể đánh giá mức độ biểu hiện của một gene bằng cách xác định lượng mRNA được tạo ra từ gene đó thông qua các kỹ thuật như microarray, EST (*expressed sequence tag*), SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), MPSS (*massively parallel signature sequencing*), hay khối phổ (định lượng protein). Tất cả những kỹ thuật trên đều tạo ra những dữ liệu chứa thông tin nhiễu (*noise-prone*) làm việc tính toán, phân tích trở nên phức tạp. Yêu cầu thực tế đó đã cho ra đời một lĩnh vực mới trong sinh học tính toán là phát triển các công cụ thống kê để lọc tín hiệu xác đáng khỏi thông tin nhiễu trong những nghiên cứu biểu hiện gene tần suất cao (*high-throughput gene expression*). Các nghiên cứu này thường dùng để xác định các gene liên quan đến một bệnh lý nhất định, người ta có thể so sánh dữ liệu microarray từ những tế bào bị ung thư với tế bào bình thường để xác định những protein nào được tăng cường hay giảm thiểu do ung thư.

Dữ liệu biểu hiện gene cũng được dùng để nghiên cứu điều hòa gen, người ta có thể so sánh dữ liệu microarray của một sinh vật ở những trạng thái sinh lý khác nhau từ đó kết luận về vai trò của từng gen tham gia vào mỗi trạng thái. Đối với sinh vật đơn bào, ta có thể so sánh các giai đoạn khác nhau của chu kỳ tế bào (*cell cycle*), hay phản ứng của cơ thể ở những điều kiện stress (stress sốc nhiệt, stress đói dinh dưỡng, .v.v.). Người ta cũng có thể áp dụng giải thuật phân nhóm (*clustering algorithms*) đối với những dữ liệu biểu hiện để xác định những nhóm gene đồng biểu hiện, hay đơn vị điều hòa (*regulon*). Những phân tích tiếp theo có thể triển khai theo nhiều hướng, ví dụ phân tích trình tự promoter của những nhóm gene để xác định nhân tố điều hòa chung hoặc sử dụng các công cụ máy tính để dự đoán những promoter liên quan đến cơ chế điều hòa từng nhóm gene (tham khảo [3]).

2. *Nhận diện protein*

Protein microarray và hệ thống khối phổ cao năng (*high throughput mass spectrometry*) có thể cung cấp hình ảnh tổng thể của các protein hiện có trong một mẫu sinh học. Các ứng dụng tin sinh học có liên quan rất nhiều đến việc lý giải các dữ liệu thu được từ những hệ thống này. Đối với protein microarray, những nhà tin sinh học cần chuyên kiểm tra dữ liệu mRNA gắn trên array. Trong khi đó, những vấn đề tin sinh học liên quan đến việc so trùng dữ liệu khối phổ với cơ sở dữ liệu về trình tự protein.

3. *Dự đoán cấu trúc protein*

Dự đoán cấu trúc là một ứng dụng quan trọng nữa của tin sinh học. Có thể dễ dàng xác định trình tự axit amin hay còn gọi là cấu trúc bậc một của protein từ trình tự gene mã hóa cho nó. Nhưng, protein chỉ có chức năng vốn có khi nó cuộn gập thành hình dạng chính xác (nếu điều này xảy ra ta có cấu trúc bậc hai, cấu trúc bậc

ba và cấu trúc bậc bốn). Tuy nhiên, sẽ là vô cùng khó khăn nếu chỉ dự đoán các cấu trúc gấp nếp này từ trình tự axit amin. Một số phương pháp dự đoán cấu trúc bằng máy tính hiện đang phát triển.

Một trong các ý tưởng quan trọng trong nghiên cứu tin sinh học là quan điểm tương đồng. Trong một nhánh genomic của tin sinh học, tính tương đồng được sử dụng để dự đoán cấu trúc của gene: nếu biết trình tự và chức năng của gene A và trình tự này tương đồng với trình tự của gene B chưa biết chức năng thì có thể kết luận là A và B có cùng chức năng. Trong nhánh cấu trúc của tin sinh học, tính tương đồng được dùng để xác định những hợp phần quan trọng trong cấu trúc của protein cũng như tương tác của nó với các protein khác. Với kỹ thuật mô phỏng tính tương đồng (*homology modelling*), thông tin này được dùng để dự đoán cấu trúc của một protein khi đã biết cấu trúc của một protein khác tương đồng với nó. Hiện tại đây là cách dự đoán cấu trúc protein đáng tin cậy nhất.

Một ví dụ là hemoglobin ở người và hemoglobin của các cây họ đậu (*leghemoglobin*) khá tương đồng với nhau. Cả hai đều có vai trò vận chuyển ôxy. Mặc dù trình tự axit amin hoàn toàn khác nhau, cấu trúc của chúng trên thực tế lại đồng nhất cho thấy rằng chúng hầu như có cùng một chức năng.

Các kỹ thuật dự đoán cấu trúc protein khác là protein threading và *de novo* physi và -based modeling.

II. Một số kỹ thuật nghiên cứu chức năng gene tần suất cao

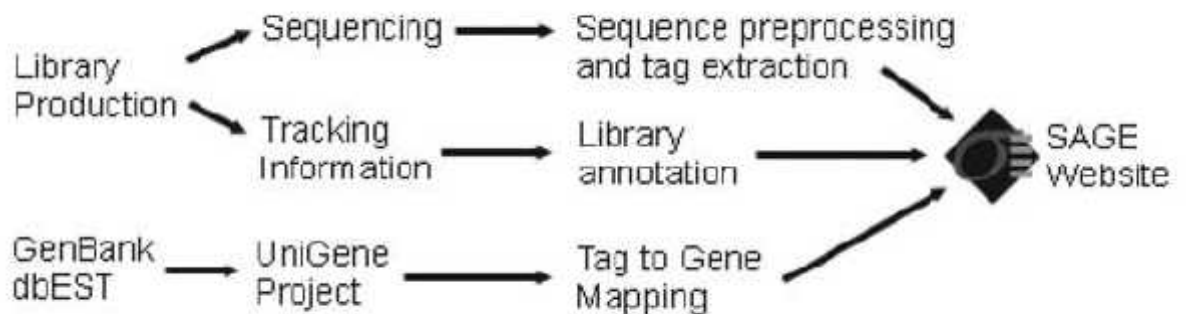
1. Phân tích chuỗi biểu hiện gene (Serial Analysis of Gene Expression _SAGE)

Kỹ thuật SAGE cho phép định lượng sự biểu hiện gene bằng cách đo số lượng RNA phiên mã phân tách từ các mô quan tâm. Những đoạn DNA ngắn dài 9 đến 14bp được tách từ đuôi 3' của sản phẩm phiên mã, được giải trình tự và phân định chức năng gene. Ưu điểm chính của thí nghiệm SAGE là không cần tìm hiểu trước loại mRNA nào để nghiên cứu và đây là một trong những kỹ thuật tần suất cao cho phép làm đồng loạt trên một lượng mẫu lớn. Hơn nữa, người ta cũng đang tiến hành cải tiến kỹ thuật này (Wang, 2007). Có lẽ nhược điểm lớn nhất là việc xây dựng và phân tích thư viện SAGE đòi hỏi các kỹ năng chuyên sâu. Bên cạnh đó, trong thí nghiệm SAGE điển hình thì ½ số đuôi SAGE không gắn vào RNA đích hay gene đích. Từ đó khả năng tái sản xuất sẽ giảm đáng kể.

Quy trình tạo đuôi SAGE được nêu trong hình 2 (Velculescu và cs, 1995). RNA được tách chiết từ nguồn tế bào, mô quan tâm và được biến đổi thành cDNA bằng môi olido(dT) đánh dấu biotin. Một enzyme cắt giới hạn được sử dụng để phân cắt sản phẩm phiên mã nên chỉ có những đoạn ngắn mới được phân tách và liên kết chặt chẽ giữa biotin và avidin cho phép đầu 3' của mỗi sản phẩm phiên mã bám vào hạt streptavidin. Sau đó bổ sung 2 loại linker để cDNA sau này bị cắt bởi một enzyme cắt giới hạn chuyên biệt, giải phóng linker và một đoạn ngắn cDNA (đuôi). Những cái đuôi này được nối vào nhau, tạo dòng và giải trình tự. Kết quả

Thư viện SAGE đã được xây dựng. Mỗi một đuôi (tag) trong một thư viện gần như tương ứng với một gene. Đối với một tag dài 9bp có 4^9 hay 262 144 phiên mã phân biệt (một vị trí tương ứng với một nucleotide bất kỳ). Trên thực tế, tag được sắp xếp lên gene bằng UniGene. Trong một số trường hợp, một tag có thể hiện diện ở nhiều gene và một gen có thể có nhiều hơn một tag (ví dụ quá trình cắt ghép (splicing) sau phiên mã làm cho gene đó có nhiều tag). Tuy nhiên người ta đã chứng minh được rằng số lượng tag trong thư viện SAGE tỷ lệ với số lượng phân tử mRNA trong mẫu sinh học đó.

Thư viện SAGE có thể được lấy từ trang web NCBI, cho phép so sánh sự biểu hiện của bất kỳ mô nào đã được tạo thư viện SAGE (Lash và cs, 2000; Lal và cs, 1999). Trang web bao gồm dữ liệu tag từ thư viện SAGE và dữ liệu chú thích vị trí tag trên gene. Trong một số trường hợp, tag thuộc những nhóm Unigene phức tạp và chỉ một hoặc vài nhóm là đáng tin cậy, các nhóm này được NCBI xác định bằng tiêu chuẩn như dựa vào khả năng tương thích với dữ liệu DNA bộ gene.



Hình 3: Quá trình xây dựng dữ liệu NCBI SAGE

2. Microarray

Kỹ thuật DNA microarray đã trở thành một kỹ thuật mạnh trong việc đo lường số lượng sản phẩm phiên mã mRNA (đo sự biểu hiện gene). Trong khi EST và SAGE cho phép phân tích biểu hiện gene với số lượng lớn thì microarray lại được sử dụng để phân tích sự khác biệt về số lượng mRNA trong các mẫu sinh học khác nhau. Patrick Brown và đồng nghiệp ở Đại học Stanford là người đầu tiên sử dụng phương pháp microarray, sau đó phương pháp này được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu.

Microarray là một bề mặt rắn ví dụ như lame kính hiển vi hay màng nylon, trên đó có gắn DNA đã biết trình tự, được sắp xếp theo hàng. DNA này có thể được lấy từ cDNA hoặc các oligonucleotide. Thường thì DNA (nanogram) được cố định trên bề mặt array. RNA tách chiết từ nguồn quan tâm như dòng tế bào có hoặc không có xử lý với thuốc, mô hoang dại hoặc cơ quan đột biến. Sau đó, RNA (hay mRNA) được chuyển thành cDNA, đánh dấu bằng huỳnh quang hoặc phóng xạ rồi đem lai trên array. Trong quá trình lai, cDNA từ phân tử RNA trong vật liệu sinh học lai chọn lọc với nucleic acid tương ứng với nó trên bề mặt microarray. Sau khi

rửa, hình ảnh phân tích sẽ được thu nhận và phân tích thành những tín hiệu số lượng. Qua quy trình này, kỹ thuật microarray cho phép đo đồng thời sự biểu hiện gene của hàng ngàn gene có trên array.

Thuật ngữ “phân tích chức năng bộ gene” được hiểu là phân tích chức năng của một số lượng lớn gene và microarray là một trong những công cụ trung tâm được sử dụng trong nghiên cứu về lĩnh vực này. Trình tự phân tử trong GenBank ngày càng tăng nhưng chức năng của chúng lại chưa được biết. Phương pháp microarray giúp ta xác định được chức năng của các gene này và ngay cả những gene đáp ứng không tốt trong phương pháp EST (Expressed Sequence Tag). Tuy nhiên, phương pháp này cũng có một số nhược điểm nhất định. Một số ưu điểm và nhược điểm của phương pháp này được nêu ở bảng 1.

Bảng 1: Ưu – nhược điểm của microarray

Ưu điểm	Nhược điểm
<ul style="list-style-type: none"> • Nhanh: một người có thể thu nhận dữ liệu về mức độ phiên mã hơn 20 000 RNA trong 1 tuần • Toàn diện: có thể có định toàn bộ các loại RNA trên một microarray. • Linh hoạt: có thể cố định cả cDNA hoặc oligonucleotide lên microarray, do đó phương pháp này có rất nhiều ứng dụng (đo microRNA, DNA methyl hóa,...) 	<ul style="list-style-type: none"> • Chi phí cao • Protein mới là sản phẩm cuối cùng của quá trình biểu hiện gene, không phải RNA. • Phương pháp quản lý chất lượng không chắc chắn. • Kết quả phụ thuộc vào nhiều yếu tố (ngày tách chiết RNA, người phân tích,...)

Công việc đầu tiên là tách chiết RNA từ mẫu cần phân tích. Phương pháp này có thể áp dụng cho nhiều loại mẫu thuộc nhiều loại sinh vật như vi khuẩn, nấm, người và ngay cả virus. Để phân tích, lượng mẫu ban đầu phải có khối lượng RNA khoảng 1 – 5 µg. Có thể giảm khối lượng mẫu ban đầu bằng cách sử dụng phương pháp khuếch đại RNA hoặc cDNA, tuy nhiên mật độ sau khi khuếch đại không phản ánh đúng mật độ RNA ban đầu.

Có 3 hướng thiết kế thí nghiệm:

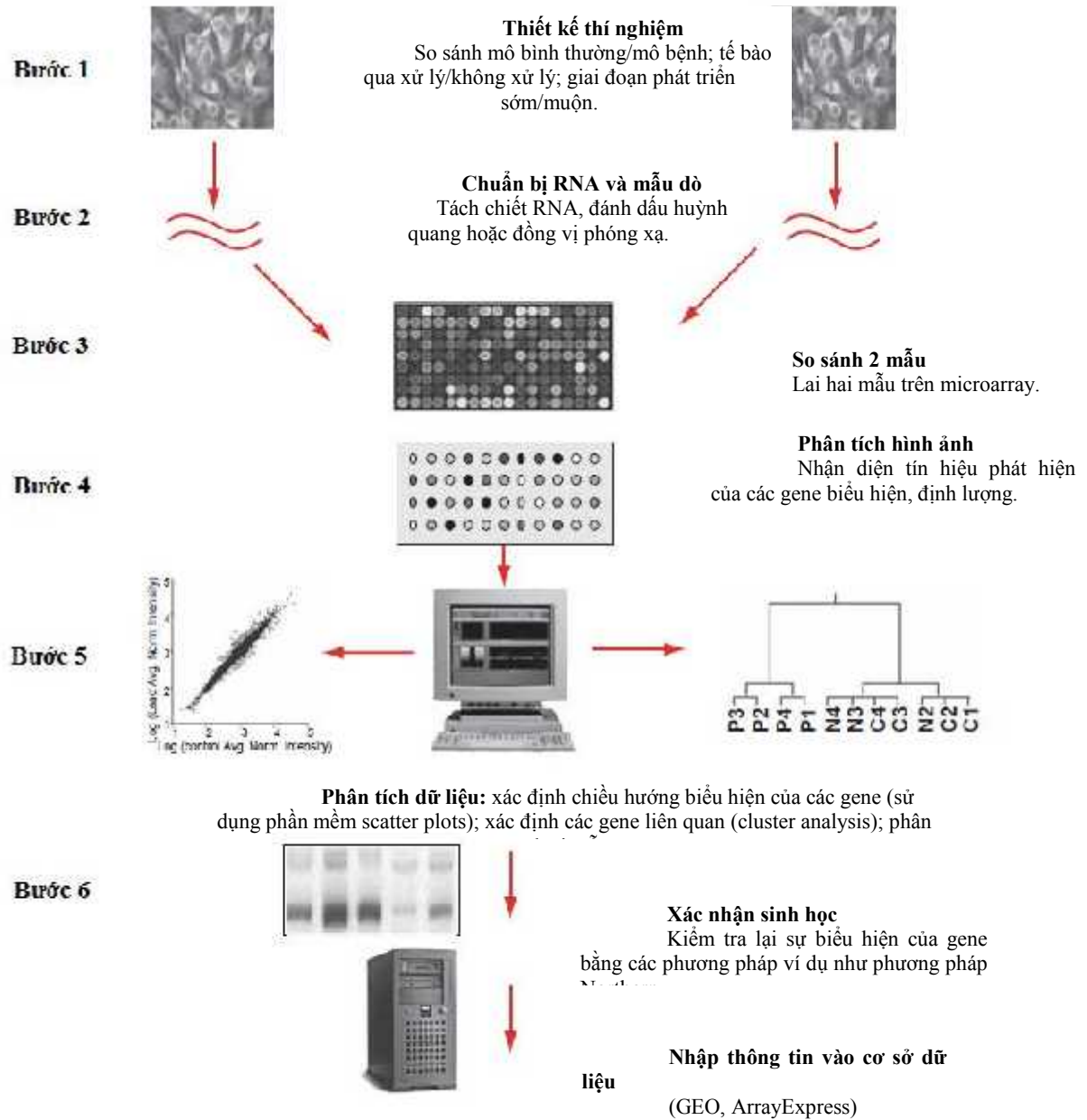
• *So sánh riêng lẻ các mẫu sinh học khác nhau (biological replicates)* (Hình 5.a): ví dụ như dòng tế bào có xử lý thuốc với dòng tế bào không xử lý thuốc .

• *So sánh 2 dòng RNA tách chiết trên cùng một microarray (technical replicates)* (Hình 5.b): RNA của 2 mẫu được tách chiết và đánh dấu bằng phóng xạ hoặc huỳnh quang khác nhau (ví dụ đánh dấu Cy5(đỏ) trên mẫu 1 và Cy3 (xanh) trên mẫu 2). Sau đó, 2 mẫu được trộn lẫn và lai trên cùng một microarray. Nếu gene có biểu hiện ở mẫu 1 (có RNA phiên mã từ gene đó), không biểu hiện ở mẫu 2 thì tại vị trí gene đó có màu đỏ; ngược lại gene biểu hiện ở mẫu 2 và không biểu hiện ở mẫu 1 thì vị trí gene đó có màu xanh. Khi gene biểu hiện ở cả 2 mẫu thì vị trí gene đó có màu vàng (màu trộn của đỏ và xanh). Từ đó tính toán được tỷ lệ biểu hiện

gene ở 2 mẫu. Có thể thiết kế thí nghiệm theo từng cặp mẫu để thu được dữ liệu phân tích bao quát.

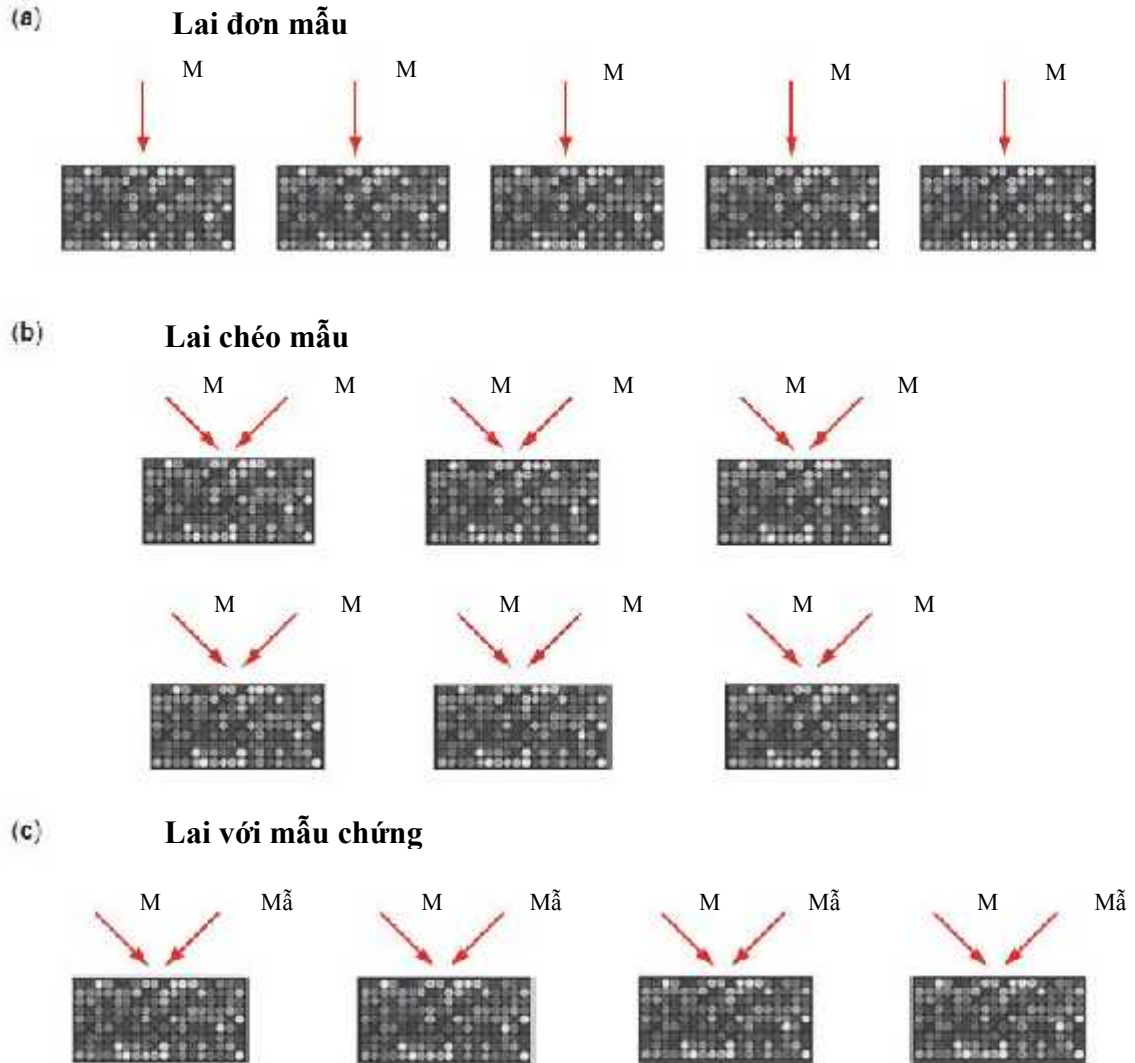
- So sánh dựa trên một mẫu chuẩn (Hình 5.c): Lai lần lượt từng mẫu với mẫu chuẩn rồi so sánh biểu hiện gene dựa vào hình ảnh thu nhận được.

- Quy trình thực hiện gồm 6 bước được tóm tắt như hình 4:



Hình 4: Quy trình thực hiện của phương pháp microarray

So sánh dữ liệu phân tích được với các thí nghiệm liên quan khác.



Hình 5: Các kiểu thiết kế thí nghiệm

Bước 1: Thiết kế thí nghiệm

Bước 2: Chuẩn bị RNA và mẫu dò

Có thể tinh chế RNA từ tế bào hoặc mô bằng các nhân tố như TRIzol (Invitrogen). Trong một số ứng dụng của microarray cần phải tinh chế mRNA từ RNA tổng. Khi so sánh hai mẫu cần tinh chế RNA ở cùng một điều kiện (ngày tách chiết, giai đoạn lấy mẫu,...).

Độ tinh sạch và chất lượng RNA được đánh giá bằng quang phổ (tính tỷ lệ a260/a280) và bằng điện di. Có thể sử dụng thuốc nhuộm huỳnh quang như RiboGreen để đánh giá số lượng. Độ tinh sạch của RNA được kiểm chứng lại bằng phương pháp Northern hoặc PCR. Mẫu RNA có lẫn DNA, rRNA, DNA ty thể, carbohydrate hoặc các đại phân tử khác sẽ làm tăng độ nền, gây sai số trong kết quả phân tích.

Sau khi tách chiết, RNA được dùng để tạo cDNA hoặc mạch bổ sung RNA rồi được đánh dấu bằng huỳnh quang (hoặc phóng xạ) để phát hiện nó trong mẫu.

Bước 3: Lai mẫu đã đánh dấu trên DNA microarray