

Xây dựng quy trình phát hiện gen CpTI (Cowpea Trypsin Inhibitor gene) trong gạo biến đổi gen có nguồn gốc từ Trung Quốc bằng phương pháp Real-time PCR

- Nguyễn Thị Mỹ Linh
- Chu Nguyên Thanh
- Bùi Văn Lệ

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 12 tháng 12 năm 2014, nhận đăng ngày 12 tháng 08 năm 2015)

TÓM TẮT

Việc dán nhãn và xác định nguồn gốc cây trồng biến đổi gen là cần thiết cho việc thương mại và kiểm soát cây trồng trên thế giới và ở Việt Nam. Gen CpTI mã hóa cho nhân tố ức chế trypsin, nguyên nhân dẫn đến tính kháng nhiều loại côn trùng. Do đó CpTI được sử dụng trong nhiều cây trồng chuyển gen đặc biệt là các loại lúa gạo chuyển gen có nguồn gốc từ Trung Quốc. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng quy trình Real-time PCR

nhằm phát hiện gạo chuyển gen CpTI. Quy trình Real-time PCR với cặp mồi CpTI-F và CpTI-R, nồng độ mồi 300 nM, nồng độ SYBR Green I là 0,5X, nhiệt độ bắt cặp là 62 °C cho thấy có thể phát hiện chuyển gen CpTI. Hiệu quả khuếch đại của quy trình đạt 94,6 %, giới hạn phát hiện là 50 bản sao. Bên cạnh đó sản phẩm khuếch đại của gen CpTI cũng được dòng hóa trong plasmid pBluescript để làm chứng dương cho quy trình.

Từ khoá: CpTI (Cowpea Trypsin Inhibitor), Real-time PCR, GMO, chuyển gen, kháng côn trùng

MỞ ĐẦU

Sinh vật biến đổi gen (viết tắt là GMO – Genetically modified organism) là sinh vật có vật liệu di truyền đã được biến đổi, thay thế, thêm vào một hay nhiều gen mà tự nhiên nó không có sẵn, nhằm phục vụ cho ý muốn của con người nhờ công nghệ gen (European Commission, 2001). Việc sử dụng giống cây trồng biến đổi gen trên thế giới hiện nay vẫn còn nhiều tranh cãi; một bên ủng hộ cây trồng chuyển gen vì nó mang lại hiệu quả kinh tế, tạo nên những tính trạng mới mà lai tạo truyền thống không đáp ứng được; một bên phản đối vì lo ngại những rủi ro mà nó có thể gây ra đối với

sức khỏe con người, động vật và đa dạng sinh học. Dù ngày càng có nhiều loại cây trồng biến đổi gen được cấp phép sử dụng (bắt buộc dán nhãn, ghi rõ nguồn gốc) nhưng lúa gạo (*Oryza sativa*) chuyển gen vẫn là loại cây trồng được kiểm soát nghiêm ngặt nhất. Hiện nay vẫn chưa có loại lúa gạo biến đổi gen nào hoàn toàn được chấp nhận sử dụng trên toàn thế giới, tuy nhiên đã phát hiện một số loại lúa gạo biến đổi gen (đặc biệt có nguồn gốc từ Trung Quốc) xuất hiện trên thị trường [13, 15, 16, 23]. Vì vậy, việc phát triển các phương pháp phát hiện lúa gạo biến đổi gen là cần thiết nhằm bảo vệ

quyền lợi người tiêu dùng, phát hiện và ngăn chặn kịp thời các trường hợp lúa gạo biến đổi gen có nguồn gốc từ Trung Quốc xâm nhập vào nước ta, góp phần thực thi luật pháp về phân phối, buôn bán và sử dụng cây trồng biến đổi gen nói chung.

Các tính trạng chủ yếu thường được đưa vào lúa gạo chuyển gen là kháng thuốc diệt cỏ (gen *pat/ bar, epsps*), kháng côn trùng (gen *CryIAb/Ac, Cry3Bb, Cry1F*), tích lũy hoạt chất (gen *gbss, crt1*). Trong đó, các giống lúa chuyển gen kháng côn trùng chiếm đa số, với gen thường được sử dụng là họ gen *Cry*. Gần đây, một gen có khả năng kháng côn trùng khác – gen *CpTI* – đã và đang được các nhà khoa học Trung Quốc tận dụng đưa vào nhiều loại cây trồng, trong đó có lúa. Gen *CpTI* (Cowpea Trypsin Inhibitor gene) được tìm thấy trong cây đậu bò (Cowpea, *Vigna unguiculata*) và một số cây họ đậu khác, được chứng minh có khả năng chống lại một cách hiệu quả nhiều loại côn trùng trên diện rộng, bao gồm bộ cánh vẩy (Lepidoptera), bộ cánh cứng (Coleoptera) và bộ cánh thẳng (Orthoptera) [2, 9]. Gen *CpTI* mã hoá cho CpTI protein - một loại protein thuộc dạng Bowman-Birk gồm hai tiểu phần có khả năng ức chế sự tiêu hoá trypsin của côn trùng, gây thiếu hụt các acid amine thiết yếu, do đó sẽ làm chậm sự phát triển và dẫn đến chúng chết vì đói [10]. Một số loại bông vải và lúa được chuyển gen *CpTI* đang được trồng rộng rãi hoặc trồng thử nghiệm tại Trung Quốc.

Ngoài việc sàng lọc bằng trình tự promoter 35S và terminator Tnos, việc phát hiện chuyên biệt gen *CpTI* bổ sung thêm một phương pháp phát hiện mới, cho kết luận chắc chắn hơn về sự hiện diện của GMOs, đồng thời cho biết gen mục tiêu được chuyển vào đối tượng. Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi xây dựng quy trình phát hiện

gen *CpTI* bằng phương pháp SYBR® Green Real-time PCR, sử dụng gạo chuyển gen *CpTI* - Kefeng6 có nguồn gốc từ Trung Quốc làm chứng dương. Trình tự gen *CpTI* được tải về từ cơ sở dữ liệu NCBI, thiết kế mồi, tối ưu hóa phản ứng Real-time PCR (nhiệt độ bắt cặp, nồng độ mồi và SYBR Green I). Ngoài ra, sản phẩm khuếch đại gen *CpTI* được tạo dòng vào plasmid pBluescript SK(+) và biến nạp vào chủng *E. coli* DH5α để làm plasmid chứng dương. Kết quả cho thấy: chương trình Real-time PCR với nhiệt độ bắt cặp 62 °C, nồng độ mồi 300 nM, nồng độ SYBR Green I là 0,5X cho hiệu quả khuếch đại đạt 94,6 %, giới hạn phát hiện của quy trình là 50 bản sao, thử độ chuyên biệt cho thấy cặp mồi CpTI_F/CpTI_R bắt cặp chuyên biệt với trình tự mục tiêu.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Hạt đậu bò *Vigna unguiculata* dùng tách chiết DNA sử dụng cho việc xây dựng quy trình phát hiện gen *CpTI* là sản phẩm của công ty Hướng Dương Xanh (Hải Phòng). Giống lúa gạo không chuyển gen Nàng Hương, được chọn làm chứng âm, là sản phẩm của Công ty Vinafood. DNA bộ gen gạo chuyển gen Kefeng6 được cho tặng bởi Phòng Thí nghiệm Châu Âu về GMO trong Thực phẩm và Thức ăn chăn nuôi (EURL-GMFF), Ý. Ngoài ra, một số loại vật liệu chuẩn (từ IRMM, Bỉ) của lúa gạo, bắp, đậu nành, khoai tây chuyển gen khác được cung cấp bởi Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng 3 (Bảng 1).

Chủng *E. coli* DH5α và plasmid pBluescript II SK (+) dùng cho tạo dòng được cung cấp từ Bộ môn Di Truyền, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM.

Bảng 1. Một số vật liệu thực vật sử dụng trong nghiên cứu

Tên	Loại	Thành phần gen chuyển	Nguồn gốc
Bt176	Bắp	<i>Cry1Ab, bar, P35S, T35S</i>	IRMM – Bỉ
Mon89788	Đậu nành	<i>epsps, P-FMV, T-E9</i>	
EH92-527	Khoai tây	<i>Gbss, nptII, Pnos, Tnos</i>	
LLRICE62	Lúa gạo	<i>bar, P35S, T35S</i>	AOCS – Mỹ
Kefeng6	Lúa gạo	<i>CpTI, Cry1Ab/Ac, hpt, P35S, Pubi, T35S, Tnos</i>	EUURL-GMFF - Ý
Gạo Nàng Hương	Lúa gạo	-	Vinafood
<i>Vigna unguiculata</i>	Đậu bò	<i>CpTI</i>	Hướng Dương Xanh

Cry1Ab, Cry1Ab/Ac: là các gen mã hóa protein BT kháng côn trùng của *Bacillus thuringiensis*; *epsps*: gen mã hóa 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (kháng thuốc diệt cỏ); *bar*: gen mã hóa phosphinothricin acetyl-transferase (kháng thuốc diệt cỏ); *CpTI*: gen mã hóa Cowpea Trypsin inhibitor (kháng côn trùng); *gbss*: gen mã hóa granule-bound starch synthase; *hpt*: gen kháng hygromycin; *nptII*: gen kháng neomycin; P-35S và T-35S: promoter và terminator của gen 35S của Cauliflower Mosaic Virus; Pnos và Tnos: promoter và terminator của gen nopaline synthase của *Agrobacterium tumefaciens*; P_{act}: promoter của gen *actin* ở lúa; Pubi: promoter của gen *ubiquitin* ở bắp; IRMM: Institute for Reference Materials and Measurements; AOCS: American Oil Chemists' Society; EUURL-GMFF: European Union Reference Laboratory for GMO Food and Feed.

Phương pháp

Tách chiết DNA

Các loại hạt và mẫu rắn được xay nhuyễn thành dạng bột mịn bằng cối xay vô trùng. DNA được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp CTAB như đã mô tả trong Phụ lục A.3.1 của ISO 21571: 2005 [12]. Định lượng và định tính DNA sau khi tách chiết bằng phương pháp quang phổ sử dụng thiết bị Nanodrop 2000c của hãng Thermo Scientific. Độ tinh sạch được xác định thông qua tỷ số A_{260}/A_{280} và A_{260}/A_{230} , DNA được gọi là tinh sạch khi tỷ số $1,8 \leq A_{260}/A_{280} \leq 2,0$ và $A_{260}/A_{230} \geq 2,0$.

Thiết kế môi

Các trình tự gen *CpTI* đã công bố (EU088405, DQ417204, EF541135) được tải về từ ngân hàng gen của NCBI (National Center for Biotechnology Information). Sử dụng phần mềm Bioedit để tìm vùng trình tự chung giữa các trình tự gen này. Vùng trình tự giống nhau được dùng

để thiết kế môi, sử dụng phần mềm Primer3plus với các thông số được cài đặt thích hợp cho môi Real-time PCR. Nhiệt độ nóng chảy, %GC, cấu trúc kẹp tóc, khả năng hình thành dạng dimer của môi được kiểm tra bằng phần mềm Oligo Analyzer Tool. Kiểm tra *in silico* sự đặc hiệu của môi bằng công cụ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Sau khi thiết kế xong, môi được tổng hợp bởi công ty Sigma Aldrich ở nồng độ 100 μ M.

Real-time PCR

Các phản ứng Real-time PCR được thực hiện trên máy Lightcycler96 của hãng Roche. Tổng thể tích mỗi phản ứng 25 μ l gồm đệm phản ứng (buffer) 1X, 200 μ M dNTP, 300 nM môi xuôi và môi ngược mỗi loại, 0,5X SYBR Green I, 1 Unit Prime HS polymerase enzyme (Bionet), 1 – 100 ng DNA mẫu. Chương trình khuếch đại được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Chương trình khuếch đại phản ứng Real-time PCR

Chương trình	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (s)	Số chu kì
--------------	---------------	---------------	-----------

Biến tính		95	600	1
Phản ứng	Biến tính	95	10	40
	Bắt cặp và kéo dài	62	60	
Kết thúc		Phân tích nhiệt độ nóng chảy		1

Trước đó, phản ứng Real-time PCR được tối ưu nhiệt độ bắt cặp từ 55 °C – 66,4 °C (gradient nhiệt độ do máy tự thiết lập), tối ưu nồng độ mỗi từ 100 nM – 500 nM và nồng độ SYBR Green I từ 0,1 X – 0,9 X. Đánh giá kết quả dựa trên cường độ huỳnh quang của đường biểu diễn khuếch đại, giá trị chu kỳ ngưỡng Ct, sự xuất hiện của sản phẩm phụ hay hiện tượng dimer mỗi thông qua biểu đồ phân tích nhiệt độ chảy của sản phẩm (nếu có).

Tạo dòng plasmid chứng dương

Sản phẩm khuếch đại gen *CpTI* được tạo dòng vào plasmid pBluescript SK(+) với mục đích tạo plasmid làm chứng dương cho quy trình Real-time PCR. Để chắc chắn sản phẩm khuếch đại không có vị trí cắt của enzyme giới hạn đang dùng, kiểm tra trình tự trên website <http://www.restrictionmapper.org/>. Trình tự plasmid cũng được tải về từ Vector Database, kiểm tra trên plasmid có hay không vị trí bắt cặp không đặc hiệu của cặp mồi *CpTI* bằng phần mềm Annhyb 3.0. Tiến hành PCR thu nhận trình tự mục tiêu với cặp mồi *CpTI_F/CpTI_R* bằng enzyme *pfu* polymerase để tạo sản phẩm khuếch đại đầu bằng. Đồng thời, plasmid pBluescript được tách chiết và tinh sạch bằng phương pháp SDS-kiểm, đặt phản ứng cắt plasmid bằng enzyme cắt giới hạn *SmaI* để mở vòng plasmid tạo đầu bằng. Thiết lập phản ứng nối giữa plasmid vừa cắt với đoạn DNA mục tiêu bằng enzyme T4 DNA ligase, phản ứng nối được đặt ở 8 °C qua đêm. Toàn bộ sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α khả nạp và trải trên môi trường chọn lọc LB/Ampicilin/Xgal/IPTG, ủ 37 °C trong 16 giờ, thực hiện chứng âm với đĩa trải tế bào *E. coli* DH5α không biến nạp sản phẩm nối. Trên đĩa biến

nạp, các khuẩn lạc màu trắng sẽ được chọn, sàng lọc và kiểm tra bằng PCR khuẩn lạc để thu nhận plasmid tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp thu nhận được sau đó được gửi đi giải trình tự tại công ty Solgenet – Hàn Quốc.

Xác nhận hiệu lực của phương pháp thử

Độ đặc hiệu: Độ đặc hiệu của cặp mồi *CpTI_F/CpTI_R* được khảo sát trên một loạt vật liệu DNA đã biết thành phần gen chuyển (Bảng 1), bao gồm: đậu bò (cowpea), gạo chuyển gen với *CpTI* - Kefeng6, gạo không chuyển gen Nàng Hương, bắp chuyển gen Bt176, khoai tây chuyển gen EH92, đậu nành chuyển gen Mon89788, gạo chuyển gen LL62. Kiểm tra độ đặc hiệu mồi bằng cách so sánh kết quả dự đoán trên lý thuyết với kết quả thực tế thu được khi tiến hành phản ứng Real-time PCR.

Hiệu quả khuếch đại: Thực hiện phản ứng Real-time PCR với một dãy gồm 6 nồng độ pha loãng bậc 4 của DNA gạo chuyển gen Kefeng6. Lặp lại 2 lần ở mỗi nồng độ. Dựng đường tương quan giữa giá trị Ct và nồng độ DNA mục tiêu. Từ giá trị Slope của đường tương quan, hiệu quả khuếch đại của phản ứng tính bằng công thức: $E_x = [10^{(-1/slope)} - 1] \times 100 \%$. Trong đó, E_x là hiệu quả khuếch đại của phản ứng (%); Slope là giá trị độ dốc của đường tương quan giữa giá trị Ct và nồng độ DNA. Hiệu quả khuếch đại có thể chấp nhận được khi giá trị này nằm trong khoảng 90 – 110 %, tương ứng với giá trị slope của đường tương quan nằm trong khoảng -3,6 đến -3,1 và hệ số tương quan $R^2 \geq 0,98$.

Xác định giới hạn khuếch đại (LOD).

Plasmid tái tổ hợp pCpTI được pha loãng về 10 copy/ μ L. Sau đó, từ mẫu pha loãng đó tiến hành tiếp một dãy pha loãng 4; 2; 0,2 copy/ μ L. Lấy 5 μ L mỗi nồng độ cho một phản ứng Real-time PCR. Như vậy dãy nồng độ LOD khảo sát là 50, 20, 10, 1 và 0 copy. Mỗi nồng độ thực hiện lặp lại 10 lần. Ở nồng độ thấp nhất mà cả 10 lần lặp lại đều

KẾT QUẢ

Thiết kế mồi

Từ các trình tự gen *CpTI* được công bố trên cơ sở dữ liệu NCBI, sử dụng phần mềm Bioedit sắp giống cột được một trình tự tương đồng dài 178 bp. Cặp mồi CpTI-F: *CCT GAC TGT GTA CAC GAT CAA TGC* và CpTI-R: *CAT CAT CTT CAT CCC TGG ACT TGC* cho sản phẩm khuếch đại 96 bp. Kết quả kiểm tra các thông số mồi cho thấy cả hai mồi đều có nhiệt độ chảy (T_m) xấp xỉ khoảng 60 °C, sự hiện diện của cấu trúc thứ cấp như cấu trúc kẹp tóc, self-dimer, hetero-dimer không có hoặc rất yếu. Sử dụng công cụ BLAST để kiểm tra sự chuyên biệt mồi trên cơ sở dữ liệu NCBI. Kết quả cho thấy, mồi bắt cặp hoàn toàn chuyên biệt với trình tự gen mục tiêu. Tuy nhiên, kết quả cũng cho thấy có 100 % tương đồng trình tự khuếch đại gen *CpTI* của đậu *Vigna unguiculata* với trình tự của *Phaseolus vulgaris* (đậu cove), 95 % với đậu *Vigna vexillata*, 93 % với *Vigna radiata* (đậu xanh)...Điều này có thể giải thích là do gen *CpTI* có mặt trong một số loài họ đậu có quan hệ gần gũi.

đương tính thì đó là giới hạn phát hiện của phản ứng. Để khẳng định số lượng bản sao trong các dịch pha loãng là tương đối chính xác, khi thực hiện phản ứng ở nồng độ 1 copy phải có ít nhất 1 kết quả âm tính [5].

Xử lý số liệu : Các số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm SPSS 16.0.

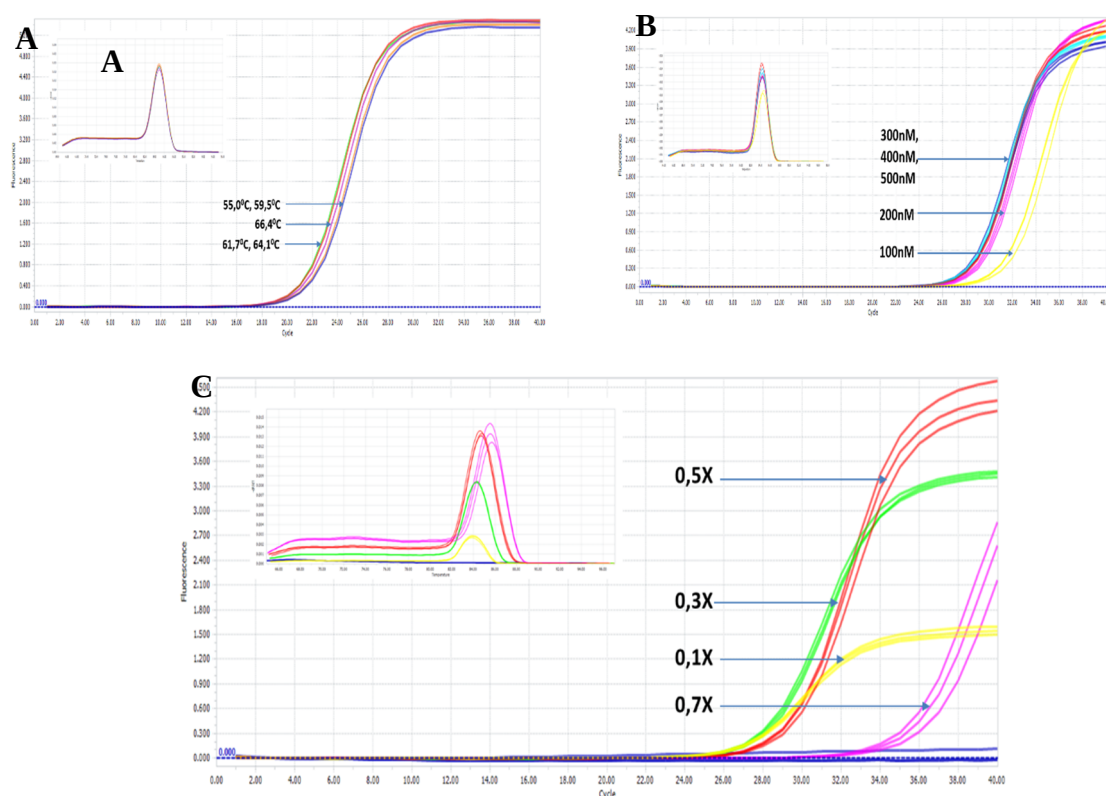
Khảo sát nhiệt độ bắt cặp mồi

Sử dụng nhiệt độ bắt cặp mồi quá thấp có thể dẫn đến sự xuất hiện của các sản phẩm không đặc hiệu, ngược lại, sử dụng nhiệt độ bắt cặp mồi quá cao có thể dẫn đến giảm hiệu quả khuếch đại hoặc hoàn toàn không xảy ra phản ứng [1, 17, 18]. Nhiệt độ bắt cặp của mồi trong một phản ứng PCR thường thấp hơn khoảng 5 °C so với giá trị T_m của mồi. Trong thí nghiệm này, chúng tôi khảo sát nhiệt độ bắt cặp mồi từ 55 °C - 66,4 °C. Kết quả cho thấy, cặp mồi CpTI có khả năng khuếch đại tốt trong khoảng nhiệt độ khảo sát, sản phẩm cho một đỉnh chảy duy nhất, không có sự hình thành sản phẩm không đặc hiệu (Hình 1A).

Dựa vào giá trị C_t (Bảng 3), nhiệt độ tối ưu cho sự bắt cặp mồi CpTI là 61,7 °C, 64,1 °C, tuy nhiên nhiệt độ bắt cặp quá cao sẽ làm giảm hiệu quả khuếch đại nên chúng tôi chọn 62 °C là nhiệt độ bắt cặp sử dụng cho quy trình.

Bảng 3. Giá trị C_t của phản ứng Real-time PCR tương ứng với các nhiệt độ bắt cặp khác nhau

T(°C)	55.0 °C	59,5 °C	61,7 °C	64,1 °C	66,4 °C
Ct	20,62	20,49	20,04	19,94	20,10



Hình 1. Đường cong khuếch đại và biểu đồ phân tích nhiệt độ chảy của phản ứng Real-time PCR ở (A) các nhiệt độ bắt cặp mỗi khác nhau, (B) các nồng độ mỗi khác nhau, (C) các nồng độ SYBR Green I khác nhau

Khảo sát nồng độ mỗi

Nồng độ mỗi thấp sẽ làm giảm khả năng gặp nhau giữa mỗi với DNA mạch khuôn và lượng mỗi không đủ cho phản ứng, do đó sẽ làm giảm hiệu quả khuếch đại. Ngược lại, nồng độ mỗi quá cao sẽ dẫn đến sự bắt cặp không đặc hiệu và hình thành các sản phẩm dimer-primer. Ở thí nghiệm này, chúng tôi khảo sát 5 nồng độ mỗi từ 100 nM – 500 nM. Kết quả được trình bày trong Bảng 4.

Ở nghiệm thức sử dụng nồng độ mỗi là 100 nM và 200 nM, giá trị Ct của phản ứng cao hơn so

với giá trị Ct khi sử dụng nồng độ mỗi 300 nM, 400 nM và 500 nM. Phân tích thống kê cho thấy không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa giá trị Ct ở nồng độ mỗi 300 nM, 400 nM và 500 nM. Vì sử dụng nồng độ mỗi cao có thể làm giảm sự đặc hiệu, hình thành các dimer-primer và vì lý do tiết kiệm chi phí, chúng tôi chọn nồng độ mỗi 300 nM cho phản ứng khuếch đại gen *CpTI*.

Bảng 4. Giá trị Ct của phản ứng Real-time PCR tương ứng với các nồng độ mỗi khác nhau

Nồng độ	100nM	200nM	300nM	400nM	500nM
Ct (Mean $\pm$ SD)	30,31 $\pm$ 0,32 ^a	28,38 $\pm$ 0,19 ^b	27,81 $\pm$ 0,09 ^c	27,65 $\pm$ 0,08 ^c	27,65 $\pm$ 0,16 ^c
<i>a, b, c chỉ sự khác biệt về thống kê với $\alpha=0,05$</i>					

Khảo sát nồng độ SYBR Green I

Nồng độ SYBR Green I tỷ lệ thuận với cường độ huỳnh quang của đường biểu diễn khuếch đại tuy nhiên cũng làm tăng giá trị Ct vì nó ức chế phản ứng. Vì vậy, chúng tôi khảo sát SYBR Green I ở các nồng độ từ 0,1X - 0,9X để tìm ra nồng độ thích hợp.

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy, nồng độ 0,9X ức chế hoàn toàn phản ứng, nồng độ 0,7X cho thấy

có sự ức chế phản ứng mạnh, tín hiệu huỳnh quang tăng lên khi nồng độ SYBR Green I tăng lên từ 0,1X đến 0,5X. Xét về giá trị Ct, mặc dù ở nồng độ 0,5X có Ct trễ hơn khoảng 0,9 chu kỳ so với nồng độ 0,3X nhưng cường độ huỳnh quang của đường biểu diễn khuếch đại ở 0,5X cao hơn, cho tín hiệu rõ hơn và trễ 0,9 chu kỳ có thể chấp nhận được nên chúng tôi chọn 0,5X là nồng độ SYBR Green I sử dụng trong quy trình.

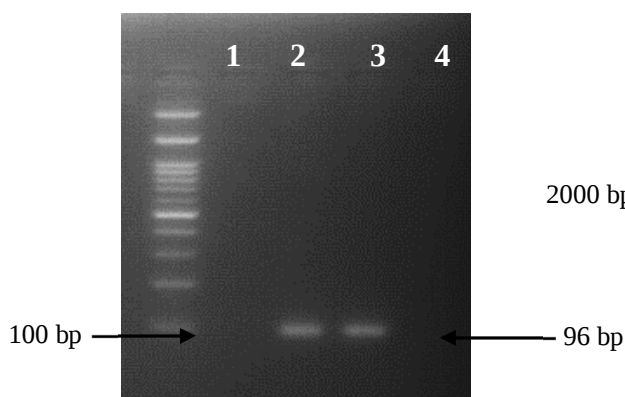
Bảng 5. Giá trị Ct của phản ứng Real-time PCR tương ứng với các nồng độ SYBR Green I khác nhau

Nồng độ	0,1X	0,3X	0,5X	0,7X	0,9X
Ct (Mean $\pm$ SD)	27,47 $\pm$ 0,09 ^a	27,45 $\pm$ 0,12 ^a	28,37 $\pm$ 0,15 ^b	34,73 $\pm$ 0,45 ^c	-
<i>a, b, c chỉ sự khác biệt về mặt thống kê với $\alpha=0,5$</i>					

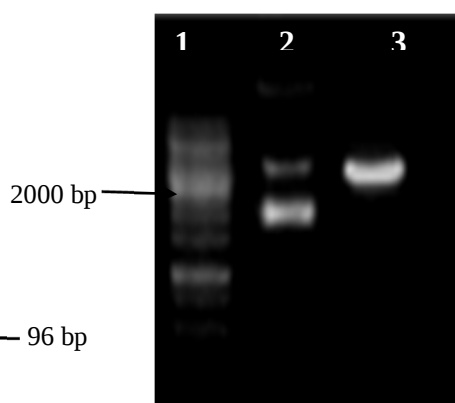
Tạo dòng plasmid chứng dương

Vật liệu DNA gao chuyển gen *CpTI* có giới hạn nên cần thiết để tạo ra plasmid tái tổ hợp mang trình tự *CpTI* dùng làm chứng dương cho quy trình. Đầu tiên, sản phẩm khuếch đại *CpTI* được thu nhận bằng PCR với cặp mồi *CpTI_F/CpTI_R* sử dụng enzyme tạo đầu bằng *pfu* polymerase. Chúng tôi thu được trình tự mong muốn dài 96 bp (Hình 2). Đồng thời, plasmid cũng được tách

chiết, tinh sạch và xử lý với enzyme cắt giới hạn *SmaI* để mở vòng đầu bằng. Kết quả điện di trên gel agarose 1% ở Hình 3 cho thấy chúng tôi đã tách chiết được plasmid nguyên vẹn với đủ 3 dạng cấu hình, trong đó vạch siêu xoắn có hàm lượng cao (giếng 2) và sau khi xử lý plasmid với enzyme *SmaI* plasmid bị cắt thành dạng mạch thẳng cho 1 vạch duy nhất (2691 bp) (giếng 3).



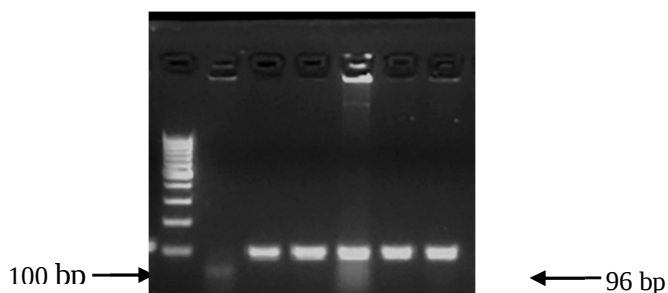
Hình 2. Kết quả thu nhận trình tự mục tiêu CpTI
(1). Thang phân tử lượng DNA 100 bp (G016)
(2). Chứng âm
(3), (4). Sản phẩm khuếch đại gen CpTI



Hình 3. Kết quả xử lý plasmid với enzyme *Sma*I
(1). Thang phân tử lượng DNA 1 kb (Solgent)
(2). Plasmid pBluescript
(3). Plasmid bị thủy giải với enzyme *Sma*I

Sau đó chúng tôi tiến hành phản ứng nối plasmid đã mở vòng với trình tự mục tiêu bằng T4 DNA ligase nhằm tạo plasmid tái tổ hợp pCpTI. Toàn bộ sản phẩm nối được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α , chọn lọc xanh – trắng. Những khuẩn lạc màu trắng được sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi CpTI, kiểm tra kết quả PCR bằng điện di trên gel agarose 3 %. Kết quả Hình 4 cho thấy ở giếng 2 (sản phẩm PCR với plasmid pBluescript – chứng âm) không có vạch tín hiệu chứng tỏ phản ứng diễn ra tốt và không bị ngoại nhiễm. Kết quả PCR khuẩn lạc cho thấy sản phẩm PCR ở các giếng 4, 5, 6, 7 có kích thước tương ứng với kích

thước dự đoán của trình tự CpTI (96 bp). Để chắc chắn, DNA dòng khuẩn lạc nghi ngờ được gửi đi giải trình tự. Kết quả giải trình tự (96 bp): CCT GCA TGT GTA CAC GAT CAA TGC CAG GCA AGT GTC GTT GCC TTG ACG(A) TTG CTG ATT TCT GTT ACA AAC CTT GCA AGT CCA GGG ATG AAG ATG ATG, cho thấy chúng tôi đã thu nhận được dòng vi khuẩn mang plasmid tái tổ hợp mục tiêu (pCpTI) có độ tương đồng 99 % so với trình tự gốc. Plasmid này sẽ được dùng làm chứng dương cho quy trình Real-time PCR sau này.



Hình 4. Kết quả sàng lọc dòng *E. coli* DH5 α mang plasmid tái tổ hợp pCpTI
(1). Thang phân tử lượng DNA 100 bp
(2). Sản phẩm PCR với plasmid pBluescript (chứng âm)
(3). Sản phẩm PCR với DNA bộ gen đậu bò *Vigna unguiculata* (chứng dương)

(4), (5), (6), (7). Sản phẩm PCR từ các khuẩn lạc trắng

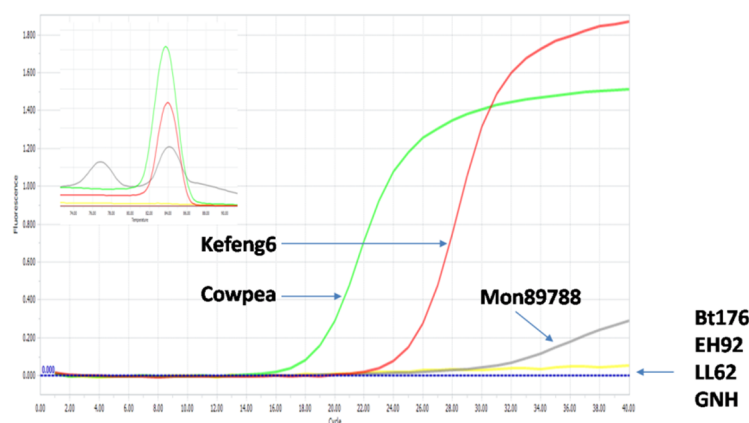
Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu của mỗi được đánh giá bằng cách kiểm tra sự khuếch đại trên các vật liệu có và không chứa trình tự mục tiêu. Phản ứng Real-time PCR được tiến hành trên 8 đối tượng khảo sát (Bảng 1) đã biết trước thành phần gen chuyển. Kết quả thu được từ thực tế và kết quả dự đoán (Bảng 6) giống nhau, chứng tỏ tất cả các mẫu đều khuếch đại chuyên biệt trình tự mục tiêu và không gây hiện tượng dương tính giả. Mỗi CpTI cho kết quả dương tính đối với mẫu đậu nành và gạo chuyển gen Kefeng6 với đỉnh chảy tương ứng là $86,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$, trong khi các mẫu gạo không chuyển gen *CpTI*, mẫu gạo chứng âm (Nàng Hương) cùng với các

mẫu bắp, khoai tây không cho kết quả khuếch đại CpTI. Tuy nhiên, có một trường hợp đáng lưu ý là mẫu CpTI cho sản phẩm khuếch đại đối với mẫu đậu nành Mon89788 dù trong thành phần chuyển gen của nó không có trình tự CpTI. Điều này có thể giải thích do *CpTI* là gen có mặt trong một số họ hàng nhà Đậu. Đậu nành *Vigna unguiculata* còn có 4 phân loài là *Vigna unguiculata* subsp. *cylindrica* (đậu đen), *Vigna unguiculata* subsp. *dekindtiana*, *Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis* (đậu đũa), *Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata* (đậu dài trắng rón nâu) [19]. Do đó cần lưu ý, mỗi CpTI không dùng để phát hiện gen *CpTI* chuyển đối với các nền mẫu là đậu hay có lẫn bột đậu, vì nó có thể gây hiện tượng dương tính giả.

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ đặc hiệu của mỗi CpTI

Tên	Cowpea	Kefeng6	Bt176	Mon89788	EH92	LL62	GNH
Loài	Đậu nành	Gạo	Bắp	Đậu nành	Khoai tây	Gạo	Gạo
Kết quả dự kiến	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Kết quả thực tế	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Tm=86,12	Tm=86,53	-	Tm=86,71	-	-	-

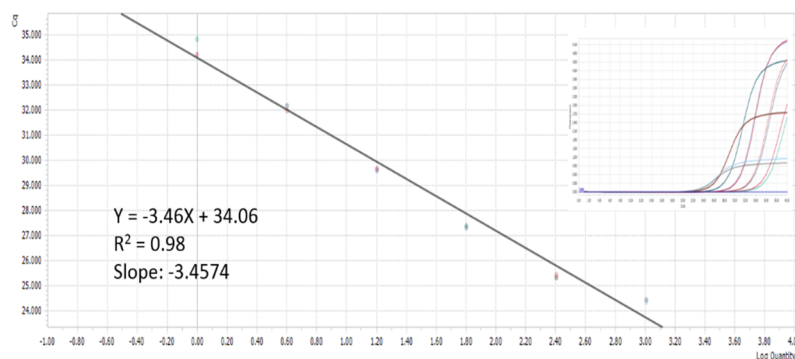
**Hình 5.** Đường cong khuếch đại và Biểu đồ phân tích đỉnh chảy của phản ứng Real-time PCR với mỗi CpTI trên các loại vật liệu thực vật khác nhau

Đánh giá hiệu quả khuếch đại của phản ứng Real-time PCR

Hiệu quả khuếch đại cho biết khả năng khuếch đại DNA mục tiêu của quy trình Real-time PCR có tốt hay không. Hiệu quả khuếch đại của phản ứng đạt 100 % tương ứng với số lượng sản phẩm khuếch đại tăng gấp đôi sau mỗi chu kỳ.

Trong quy trình này, hiệu quả khuếch đại CpTI đạt 94,64 %, được tính toán thông qua giá

trị độ dốc (slope) của đường tương quan giữa C_t và nồng độ DNA (Hình 5). Trong thực tế, hiệu quả khuếch đại khó đạt được 100 %, nó phụ thuộc vào nhiều nhân tố như chiều dài DNA mục tiêu, trình tự môi và bản mẫu, đệm phản ứng, những tạp chất còn lẫn trong mẫu, chu kỳ khuếch đại và enzyme sử dụng. Do đó, hiệu quả khuếch đại 94,64 % là tương đối cao và có thể áp dụng trong thực tế thử nghiệm.



Hình 6. Đường chuẩn trong xác định hiệu quả khuếch đại của quy trình

Xác định giới hạn phát hiện (LOD)

Giới hạn phát hiện là nồng độ hoặc lượng thấp nhất của trình tự gen đích có thể được phát hiện nhưng không nhất thiết được định lượng. LOD tuyệt đối là nồng độ thấp nhất mà ở đó > 95 % số lần lặp lại cho kết quả dương tính. Chúng tôi xác định giới hạn phát hiện ở 0, 1, 10, 20, 50 bản sao, mỗi nồng độ lặp lại 10 lần cho đến khi nồng

độ thấp nhất nào cả 10 lần lặp lại đều dương tính thì đó là giới hạn phát hiện. Kết quả được trình bày trong Bảng 7.

Ở nồng độ 50 bản sao, cả 10 phản ứng lặp lại đều cho kết quả dương tính. Như vậy, giới hạn phát hiện của quy trình là 50 bản sao.

Bảng 7. Kết quả xác định giới hạn phát hiện

Số bản sao	0	1	10	20	50
Số mẫu dương tính	0/10	5/10	6/10	8/10	10/10

THẢO LUẬN

Trung Quốc là quốc gia đông dân, vấn đề an ninh lương thực được quan tâm hàng đầu nên có chủ trương ủng hộ và phát triển mạnh mẽ các loài thực vật biến đổi gen, trong đó có lúa. Việc thương

mại hoá các loại lúa gạo chuyển gen, trong đó có lúa gạo chuyển gen *CpTI*, ở Trung Quốc có thể sẽ diễn ra trong tương lai không xa khi năm 2010 Trung Quốc đã cấp phép trồng hạn chế cho hai giống lúa chuyển gen là Huahui- 1 và Bt-Shanyou- 63 và cho phép thương mại hoá có giới

hạn trong tỉnh Hồ Bắc [3]. Đồng thời ở Trung Quốc vẫn còn đang trồng thử nghiệm khoảng 100 dòng lúa biến đổi gen khác như KMD1, T1c-9, T2A-1, Kefeng6 và Kefeng8 (đều biểu hiện gen *Bt* + *CpTI*) [3, 20]. Điều đó mang đến rủi ro rằng chúng có khả năng được du nhập không tuân thủ quy định vào nước ta trong một tương lai không xa. Cho nên việc xây dựng quy trình phát hiện là cần thiết.

Bên cạnh lúa, gen *CpTI* còn được nghiên cứu và chuyển vào nhiều đối tượng cây trồng khác như thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.), bông vải (*Gossypium hirsutum*), cò dầu Châu Phi (*Elaeis guineensis*), bắp cải (*Brassica oleracea* var. capitata), bông cải (*Brassica oleracea* var. botrytis L.), cải thìa (*Brassicarapa* subsp. *pekinensis*), dâu tây (*Fragaria x ananassa*), bắp (*Zea mays* L.) [6, 7, 8, 11, 14, 21, 22] ... và gen này đã thể hiện khả năng kháng côn trùng rõ rệt. Do đó, ngoài việc áp dụng trên lúa gạo, quy trình còn có thể được phát triển để áp dụng trên nhiều đối tượng khác nhằm phát hiện gen ngoại lai *CpTI*.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xây dựng quy trình phát hiện gen *CpTI* bằng phương pháp SYBR® Green Real-

time PCR với thành phần và chương trình phản ứng đã tối ưu (nhiệt độ bắt cặp 62 °C, nồng độ 300 nM, nồng độ SYBR Green I là 0,5 X), đồng thời tạo dòng plasmid pCpTI dùng làm chứng dương. Hiệu quả khuếch đại của quy trình đạt 94,64 %, giới hạn phát hiện ít nhất là 50 bản sao. Kiểm tra độ đặc hiệu cho thấy lúa gạo chuyển gen với *CpTI* (Kefeng6) cho sản phẩm khuếch đại có $T_m=86\pm1,0$ °C, trong khi lúa gạo không chuyển gen cho kết quả âm tính. Đa số lúa gạo chuyển gen *CpTI* hiện nay đều có nguồn gốc từ Trung Quốc, nên việc phát hiện gen *CpTI* trong các mẫu lúa gạo kiểm tra không những khẳng định có sự hiện diện của GMO mà còn dự đoán được xuất xứ của loại lúa gạo chuyển gen đó.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trung tâm Kiểm định Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng 3 (Quatest 3) và Phòng Thí nghiệm Sinh học phân tử, Bộ Môn Di truyền, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên đã cung cấp hóa chất, thiết bị cũng như các điều kiện thí nghiệm khác để hoàn thành bài báo này. Cảm ơn Phòng thí nghiệm Châu Âu về GMO trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi (EURL – GMFF) đã cung cấp DNA bộ gen gạo chuyển gen Kefeng6.

A real-time PCR method for detection of *CpTI* (Cowpea Trypsin Inhibitor) gene in the genetically modified rice originating from China

- Nguyen Thị My Linh
- Chu Nguyen Thanh
- Bui Văn Le

University Of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Labelling and traceability of genetically modified organisms (GMOs) are necessary for trade and regulation in the world and Vietnam. Cowpea Trypsin Inhibitor (CpTI) gene encodes a trypsin inhibitor which is considered as a suitable candidate for developing insect-resistant transgenic plants, especially transgenic rice lines originating from China. In this study, we established a real-time PCR protocol to detect the CpTI

gene in transgenic rice. The protocol with CpTI-F and CpTI-R primers, 300 nM primers, 0.5 X SYBR Green I, annealing temperature at 62 °C showed the best results. Amplification efficiency is 94.64 % and the limit of detection is 50 copies. Moreover, PCR product of CpTI gene was cloned into pBluescript plasmid using as a positive control.

Keywords: CpTI (Cowpea Trypsin Inhibitor), Real-time PCR, GMO, transgene, insect resistant rice.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bio Rad Real-time PCR Applications Guide (2006).
- [2]. D. Boulter, A.M.R. Gatehouse, V. Hilder, Use of cowpea trypsin inhibitor (CpTI) to protect plants against insect predation, *Biotech*, 7, 489 – 497 (1989).
- [3]. M. Chen, A. Shelton, G.Y. Ye, Insect-resistant genetically modified rice in China: From research to commercialization, *Annual Review of Entomology*, 56, 81 – 101 (2011).
- [4]. X. Deping, X. Qingzhong, D. McElroy, Y. Mawal, V.A. Hilder, R. Wu, Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, CpTI, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests, *Molecular Breeding*, 2, 167 – 173 (1995).
- [5]. European Network of GMO Laboratories (ENGL), Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods (2011).
- [6]. H.J. Fang, D.Li, G.L.Wang, Y.L. Li, Z. Zhen, X. Li, An insect-resistant transgenic cabbage plant with cowpea trypsin inhibitor (CpTI) gene, *Acta Botanica Sinica*, 39, 940 – 945 (1997).
- [7]. J. Graham, R.J. McNicol., K. Greig, Towards genetic based insect resistance in strawberry using the Cowpea trypsin inhibitor gene, *Annals of Applied Biology*, 127, 163 – 173 (1995).
- [8]. S.D. Guo, H. Cui, L. Xia, D. Wu, W. Ni, Z. Zang, B. Zang, Y. Xu, Development of bivalent insect-resistant transgenic cotton plants, *Scientia Agricultura Sinica*, 32, 1 – 7 (1999).
- [9]. V.A. Hilder., A.M.R. Gatehouse., S.E. Sheerman, R.F. Barker, D. Boulter, A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco, *Nature*, 330, 160 – 163 (1987).
- [10]. V.A. Hilder., R.F. Barker., R.A. Samour., A. M.R. Gatehouse, J.A. Gatehouse., D. Boulter, Protein and cDNA sequences of Bowman-Birk protease inhibitors from the cowpea (*Vigna unguiculata* Walp.), *Plant Mol Biol*, 13, 701 – 710 (1989).
- [11]. Ismail, F. S. Lee, R. Abdullah, F.C. Kei, Z. Zainal, N.M Sidik, Molecular and expression analysis of cowpea trypsin inhibitor (CpTI) gene in transgenic *Elaeis guineensis* Jacq leaves, *Australian Journal Crop Science*, 4, 37 – 48 (2010).
- [12]. ISO 21571:2005, Foodstuffs - Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - Nucleic acid extraction, International

- Organization for Standardization, Geneva, (2005).
- [13].R. Köppel, F. Zimmerli, A. Breitenmoser, Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantification of DNA from three transgenic rice species and construction and application of an artificial oligonucleotide as reference molecule, *European Food Research and Technology*, 230, 731 – 736 (2005).
- [14].L. Lingling, J. Lei, S. Ming, L. Liyun, C. Bihao, Study on transformation of cowpea trypsin inhibitor gene into cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis), *African Journal of Biotechnology*, 4, 45 – 49 (2005).
- [15].D. Mäde, C. Degner, L. Grohmann, Detection of genetically modified rice: a construct-specific real-time PCR method based on DNA sequences from transgenic Bt rice, *European Food Research and Technology*, 224, 271 – 278 (2006).
- [16].K Nakamura, H. Akiyama, N. Kawano, T. Kobayashi, K. Yoshimatsu, J. Mano, K. Kitta., K. Ohmori, A. Noguchi, K. Kondo, R. Teshima, Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting rice products contaminated by rice genetically modified with a CpTI-KDEL-T-nos transgenic construct, *Food Chemistry*, 141, 3, 2618 – 2624 (2013).
- [17].E.A. Pestana, S. Belak, A. Diallo, J.R Crowther, G.J. Viljoen, Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics Real-time PCR applications, Springer Dordrecht Heidelberg London (2010).
- [18].Real-time PCR, Real-time PCR, The Taylor & Francis e-Library (2007).
- [19].B.B. Singh, D.R. Mohan, K.E. Dashiell, E. N. Jackai, Advances in Cowpea Research, IITA, Ibadan Nigeria, International Institute of Tropical Agriculture (1997).
- [20].Y. Wang, S. Johnston, The status of GM rice R&D in China, *Nature Biotechnology*, 25, 717 – 718 (2007).
- [21].H. Yu, B. Qu, F. Fu, W Li, Study on CpTI transgenic insect resistant maize with removable selective marker, *Journal of Maize Sciences*, 13, 44 – 46 (2005).
- [22].J. Zhao, H. Xu, Z. Zhu, A. Liang, Transformation of modified cowpea trypsin inhibitor gene and anti-bacterial peptide gene in *Brassica pekinensis* protoplasts mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Euphytica*, 149, 317–326 (2006).
- [23].<http://www.gmfreeze.org/uploads/GMRiceContamination>