

XÂY DỰNG QUI TRÌNH CHẨN ĐOÁN BẮP CÓ CHUYỀN CÁC GENE KHÁNG SÂU (CryIA [b]) VÀ GENE TĂNG CƯỜNG CHUYỀN HÓA ĐƯỜNG (Invertase) BẰNG KỸ THUẬT PCR

OPPTIMIZING PCR PROTOCOLS FOR DETECTIONS OF CRYIA(B)
AND INVERTASE GENES IN MAIZE.

Bùi Minh Trí, Bùi Cách Tuyến

Trung tâm Phân tích Thí nghiệm Hóa Sinh, Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh
Tel / Fax: 8972262

SUMMARY

Diagnostic techniques for GMO is a tough issue and that has never reported before in Vietnam. This research attempted to establish applicable protocols for the diagnosis of GM corn based on PCR techniques. The research succeeded in setting up DNA attraction protocols for different types of corn samples. Ingredients of PCR mixtures and temperature regimes were also optimized for detection of CryIA(b) and Invertase genes in GM corn.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Công nghệ tạo ra các giống cây trồng chuyển gen không ngừng phát triển và đang có xu hướng lan rộng trên quy mô toàn cầu. Tuy nhiên dư luận cũng vẫn còn hoài nghi về mặt trái của chúng đặc biệt là các nguy cơ có thể làm hủy hoại môi trường sinh thái tự nhiên và mức độ an toàn của các sản phẩm này đối với sức khỏe con người. Trong xu thế toàn cầu hóa, khi mà mọi hàng rào ngăn cách đều dần được dỡ bỏ, chắc chắn chúng ta không thể tránh khỏi tầm ảnh hưởng của các sản phẩm nông sản biến đổi di truyền. Chính vì điều này, chúng ta phải luôn sẵn sàng, một mặt tiếp nhận sự tồn tại của các thực phẩm chuyển gen, mặt khác có những quy chế, chính sách để ngăn ngừa và hạn chế những rủi ro mà các sản phẩm này có thể gây ra. Một trong những điều kiện quan trọng để có thể làm được điều đó là cần phải xây dựng được các kỹ thuật tiêu chuẩn để chẩn đoán và phân biệt chính xác giữa sản phẩm biến đổi di truyền và sản phẩm truyền thống tương ứng. Đây thực sự không phải là vấn đề đơn giản, nhưng cần phải bắt tay vào bởi vì nếu chậm trễ mọi rủi ro đều có thể xảy ra mà cái giá phải trả là toàn xã hội sẽ phải gánh chịu. Đề tài này đã được tiến hành nhằm mục đích xây dựng phương pháp chẩn đoán hai gen thường có tần số xuất hiện cao đối với bắp đó là gene Invertase và gene CryIA(b) bằng kỹ thuật PCR. Các kết quả nhận được của đề tài này có thể làm cơ sở cho việc chẩn đoán nhanh sản phẩm bắp chuyển gen nhập khẩu vào Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Các hóa chất dùng trong chẩn đoán bắp chuyển gen

Các hóa chất dùng để tách chiết DNA bao gồm:

DNA extract buffer và sarkosyl 10%; NaCl 5M; CTAB 10%; Chloroform/isoamyl alcohol (24:1); Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1); Isopropanol; Ethanol (70%) vaa2 TE 1X.

Các hóa chất dùng cho phản ứng PCR bao gồm:

Nước cất 2 lần ; PCR buffer; MgCl₂ dNTP's; Taq DNA polymerase; Primer Gic và Primers Bt.

Các hóa chất dùng cho điện di và đọc kết quả bao gồm:

TAE 0,5%; Gel agarose 2%; Loading dye 6X; Ethidium bromide.

Ngoại trừ các primers do công ty Genset (Singapore) tổng hợp và cung cấp, tất cả các hóa chất khác đều do công ty Promega (Mỹ) sản xuất và cung cấp.

Trang thiết bị chính được sử dụng bao gồm:

Máy nhân bản DNA (Biorad – Mỹ); Máy điện di (Cosmo Bio Co. - Nhật) và Máy chụp ảnh gel có màn hình (Biorad – Mỹ).

Phương pháp lấy mẫu

Tất cả mẫu tiến hành nghiên cứu đều là các sản phẩm bắp nhập khẩu trong năm 2002 qua đường cảng Sài gòn.

- Đối với mẫu bột: cân 0,5gr bột bắp/mẫu và tiến hành trên 10 mẫu.

- Đối với mẫu hạt: mỗi sản phẩm bắp lấy ngẫu nhiên 10 hạt (trung bình khoảng 0,3 – 0,4gr/hạt).

- Mỗi mẫu được đem ly trích để lấy DNA.
- Mỗi mẫu được lặp lại hai lần khi phân tích.

Phương pháp tiến hành chẩn đoán bắp chuyển gen

Tách chiết DNA

DNA được ly trích theo quy trình:

- Bước 1: cân 0,5gr bột bắp hoặc lấy một hạt.
- Bước 2: nghiền mẫu hạt với 3 ml dịch trích DNA (trong 3ml dịch trích DNA đó gồm 2,7ml DNA extract buffer và 0,3ml sakosyl 10%).
- Bước 3: lấy phần dịch nghiền cho vào eppendorf 1,5ml và đem ủ ở 55°C trong một giờ.
- Bước 4: ly tâm ở 6000 vòng trong 10 phút ở nhiệt độ 10°C.
- Bước 5: hút phần dịch lỏng phía trên sang một eppendorf khác 800μl rồi cho 100μl NaCl 5M và 100μl CTAB/NaCl (CTAB 10% với 0,7 M NaCl). Đem ủ ở 65°C trong 10 phút.
- Bước 6: cho tiếp 600μl chloroform/Isoamyl alcohol (24:1), trộn đều và ly tâm 12000 vòng trong 10 phút ở 10°C.
- Bước 7: hút 800μl sang một eppendorf mới và tiếp tục cho 600μl phenol/chloroform/Isoamyl alcohol (24:25:1), trộn đều và ly tâm ở 12000 vòng trong 10 phút ở 10°C.
- Bước 8: hút 600μl sang một eppendorf mới, cho vào 360μl Isopropanol, trộn đều và đem ly tâm (hay có thể ủ ở nhiệt độ âm 20°C trong 30 phút rồi đem ly tâm) (giai đoạn này gọi là giai đoạn ly tâm để ngưng kết DNA). Ly tâm ở tốc độ 15000 vòng trong thời gian 15 phút ở 10°C (nếu không đem ủ ấm 20°C trong 30 phút thì ly tâm ở 4°C).
- Bước 9: ly tâm xong, lấy ra đổ nhẹ nhàng phần nước phía trên và giữ lại phần cặn phía dưới, để cho khô và rửa lại bằng ethanol 70%. Sau khi rửa xong, cho 100μl TE 1X vào để làm hòa tan DNA. Sau đó giữ lạnh ở -20°C để sử dụng cho các phản ứng PCR.

Phương pháp khuyếch đại DNA (Kỹ thuật PCR)

Sản phẩm DNA sau ly trích được trộn chung với hỗn hợp gồm có PCR buffer, MgCl₂, dNTP's, Taq DNA polymerase (5U/μl), nước cất, primer xuôi (forward primer) và primer ngược (reverse primer). Hỗn hợp này được dùng để thực hiện chương trình khuyếch đại DNA trên các máy điều nhiệt (máy PCR).

Điện di DNA trên gel agarose

- Cho 0,5gr agarose vào 50ml dung dịch TAE 0,5X (nồng độ 2%).
- Đun sôi hỗn hợp trên khoảng 1,5 phút trong lò Viba.
- Để nguội ở nhiệt độ phòng.
- Đổ gel vào bể điện di (đặt lược tạo giếng trước khi đổ gel).
- Để nguội cho gel cứng hoàn toàn, cẩn thận rút lược ra khỏi gel, cho dung dịch TAE 0,5X vào bể điện di sao cho ngập gel khoảng 1 đến 1,5cm.
- Trộn 5μl sản phẩm PCR với 2μl loading dye 6X và cho hỗn hợp vào các giếng của gel. Vận hành máy điện di trong 30 phút.

Nhuộm gel và đọc kết quả

- Sau khi điện di ngâm tấm gel trong hỗn hợp ethidium bromide 1μg/ml và TAE 0,5X trong 15 phút.
- Tấm gel sau khi nhuộm, dưới tia UV, ethidium bromide liên kết với DNA sẽ phát sáng.
 - + Đối với gen Invertase, trên màn hình xuất hiện băng có kích thước 226bp.
 - + Đối với gen CryIA(b), trên màn hình xuất hiện băng có kích thước 184bp.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hoàn thiện quy trình ly trích DNA của các mẫu bắp chuyển gen

Tách chiết DNA là bước quan trọng đầu tiên để có một phép phân tích PCR thành công. Theo đúng như quy trình tách chiết đã nêu, chúng tôi nhận thấy có thể thu nhận được DNA đảm bảo cho phản ứng PCR. Khi thử nghiệm trên 10 mẫu hạt bắp, kết quả cho thấy dung dịch DNA thu được của cả 10 mẫu đều có độ tinh sạch tương đối cao với tỷ lệ OD₂₆₀/OD₂₈₀ khoảng 1,8 đến 2,0. Khi ly trích DNA trên các loại mẫu khác như mẫu bắp bột chế biến, mẫu lá cũng đều nhận được các kết quả

tương tự. Như vậy, kết quả trên có thể cho thấy rằng quy trình như đã thực hiện cho phép thành công không chỉ trên mẫu hạt, mẫu bột dinh dưỡng mà cả trên mẫu thực vật sống.

Thử nghiệm, phân tích và hoàn thiện thành phần hóa chất của phản ứng PCR

Để chẩn đoán một sản phẩm chuyển gen thành công thì công việc tìm ra thành phần hóa chất tối ưu cho một phản ứng PCR rất cần thiết, nó ảnh hưởng rất rõ đến sản phẩm PCR nói riêng và đến thành công trong chẩn đoán nói chung.

Chúng tôi đã tiến hành đem DNA đã ly trích pha với hỗn hợp gồm: PCR buffer, MgCl₂, dNTP's, Taq DNA polymerase, nước cất, primer xuôi và primer ngược. Thành phần hỗn hợp cho một phản ứng PCR được trình bày qua bảng 1.

Bảng 1. Thành phần hóa chất cho một phản ứng PCR.

Thành phần	Dung dịch gốc	Thể tích sử dụng (μl)	Nồng độ Sau cùng	Ghi chú
H ₂ O cất		17		
PCR buffer	10X	2,5	1X	
MgCl ₂	2,5mM	2,0	200μM	
dNTP's	10mM	0,5	200μM	
Taq DNA polymerase	5U/μl	0,15	0,75U	
Primer xuôi	6,25μM	0,5;1;1,5;2(*)	0,17; 0,25; 0,38; 0,5μM	
Primer ngược	6,25μM	0,5;1;1,5;2(*)	0,17; 0,25; 0,38; 0,5μM	
Khuôn mẫu		2		Tùy theo nồng độ DNA

(*) Ghi chú: thành phần thay đổi tùy theo mỗi nghiệm thức.

Thành phần hóa chất trong bảng 1 được tiến hành chạy PCR với 60 mẫu đã ly trích DNA. Kết quả thu được đối với hai cặp primer Gic, Bt rất rõ ràng với việc tạo ra các sản phẩm PCR như mong muốn. Tuy nhiên, có sự khác biệt về độ rõ nét khi thay đổi hàm lượng các primer. Chúng tôi nhận thấy rằng khi sử dụng các primer ở liều lượng 1μl thì cho các band điện di trên gel rõ nhất. Do đó liều lượng này được sử dụng để tiếp tục khảo sát tìm ra chế độ nhiệt thích hợp.

Thử nghiệm, phân tích và hoàn thiện quy trình nhiệt cho phản ứng PCR để tìm ra các gen thông dụng đối với bắp nhập khẩu

Thử nghiệm, phân tích và hoàn thiện quy trình nhiệt trong việc tìm ra gen CryIA(b)

Đối với cặp primer Bt, chúng tôi tiến hành thử nghiệm quy trình nhiệt như trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Thử nghiệm các chế độ nhiệt cho chu kỳ khuyếch đại DNA với cặp primer Bt

Chu kỳ	Nhiệt độ (°C)	Thời gian(giây)	Số lần lặp lại
1	94	300	1
	94	20	
2	63, 65, 67(*)	40	40
	72	60	
3	72	180	1
4	4	∞	1

(*) Ghi chú: Nhiệt độ thay đổi tùy theo các nghiệm thức.

Kết quả thử nghiệm các chế độ nhiệt từ bảng 2 mà chúng tôi đã ghi nhận có sự khác biệt về kết quả chạy PCR giữa các nhiệt độ đối với cặp primer Bt và kết quả này được thể hiện ở hình 1



Ghi chú: La: thang chuẩn 100bp; T1: 63⁰C; T2: 65⁰C; T3: 67⁰C

Hình 1. Kết quả gel điện di các sản phẩm PCR sử dụng primer Bt hoạt động ở các chế độ nhiệt khác nhau.

Từ hình 1 chúng tôi nhận thấy rằng chỉ với nhiệt độ 65⁰C thì đoạn gen CryIA(b) được khuyếch đại thành band điện di có kích thước 184bp. Kết quả thu được cũng tương tự với kết quả của Hsu – Yanglin và cộng tác viên (2000) trong việc phát hiện ra gen CryIA(b) với cặp primer tương tự. Điều này có thể khẳng định rằng: gen CryIA(b) đã hiện diện trong các lô sản phẩm bắp chuyển gen.

Như vậy, trong ba chế độ nhiệt thử nghiệm thì 65⁰C là nhiệt độ thích hợp nhất cho chương trình PCR để phát hiện gen CryIA(b). Nhiệt độ 63⁰C và 67⁰C không phù hợp để gắn kết nucleotide vào sợi đơn DNA nên không hình thành được sản phẩm trên band điện di.

Thử nghiệm, phân tích và hoàn thiện quy trình nhiệt trong việc tìm ra gen Invertase

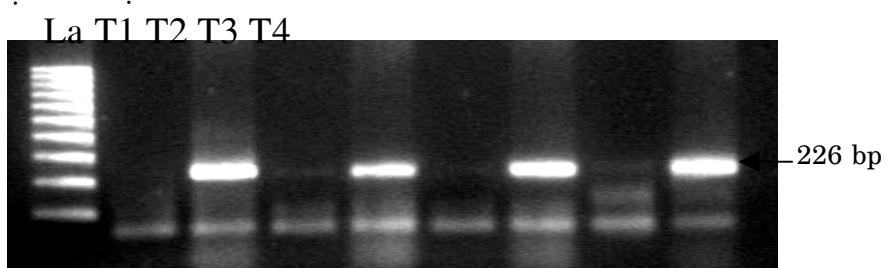
Quá trình hoàn thiện quy trình nhiệt cho một phản ứng PCR đối với cặp primer Gic được trình bày qua bảng 3.

Bảng 3. Thử nghiệm các chế độ nhiệt cho chu kỳ khuyếch đại DNA với cặp primer Gic

Chu kỳ	Nhiệt độ (⁰ C)	Thời gian(phút)	Số lần lặp lại
1	94	4	
	62,63,64,65 (*)	1	1
	72	2	
2	94	1	
	62,63,64,65 (*)	1	30
	72	2	
3	72	10	1
4	4	∞	1

(*) Ghi chú: Nhiệt độ thay đổi tùy theo các nghiệm thức

Kết quả khảo sát được thể hiện ở hình 2.



Ghi chú: La: thang chuẩn 100bp; T1: 62⁰C; T2: 63⁰C; T3: 64⁰C; T4: 65⁰C

Hình 2. Kết quả gel điện di các sản phẩm PCR sử dụng primer Gic hoạt động ở các chế độ nhiệt khác nhau

Từ hình 2, chúng tôi nhận thấy khi hỗn hợp phản ứng PCR được làm mát nhanh ở khoảng nhiệt độ biến động từ 62⁰C đến 65⁰C thì sản phẩm PCR sau khi chụp hình thể hiện band có kích thước 226bp trên cả bốn nhiệt độ (62⁰C, 63⁰C, 64⁰C và 65⁰C). Như vậy, để chẩn đoán gen Invertase, có thể sử dụng quy trình nhiệt ở bảng 3 với một trong bốn nhiệt độ trên làm quy trình chẩn đoán sản phẩm bắp chuyển gen Invertase với cặp primer Gic.

Kết quả thu được từ việc khuyếch đại gen Invertase bởi cặp primer Gic với kích thước của band điện di là 226bp đã phù hợp với kết quả của Hsu – Yanglin và cộng tác viên (2000).

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Kết luận

- Sử dụng kỹ thuật PCR đã cho phép chẩn đoán sự xuất hiện của gen Invertase và gen CryIA(b) với các thành phần hóa chất và chu trình nhiệt cụ thể đối với từng cặp primer đã được tìm ra.
- Với primer Gic chuyên biệt cho gen Invertase, tất cả các lô sản phẩm được phân tích đều xuất hiện band kích thước 226bp trên gel điện di
- Với primer Bt chuyên biệt cho gen cryIA(b), mẫu có dấu hiệu chuyển gene sẽ xuất hiện band kích thước 226bp trên gel điện di

Một số đề xuất

- Tiếp tục thử nghiệm với số mẫu lớn hơn trên nhiều lô sản phẩm bắp nhập khẩu vào Việt Nam để có thêm cơ sở đánh giá hiện trạng các sản phẩm bắp chuyển gen.
- Sử dụng phương pháp chẩn đoán gen đã xây dựng để xác định sự có mặt của gen lạ trên nhiều đối tượng khác.
- Nhà nước ta cần ban hành luật an toàn sinh học để có thể quản lý tốt sản phẩm biến đổi di truyền.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả cảm ơn sự tham gia phần thao tác trong phòng của Kỹ sư Huỳnh Văn Biết và sinh viên Hồ Bích Liên

TÀI LIỆU THAM KHẢO

C. TENGEL, P. SCHUSSLER, E. SETZKE, J. BALLES, and M. SPRENGER – HAUSSELS. *Detection of Genetically Modified Soybean and Maize in Raw and Processed Foodstuffs*. November 2002. <www. qiaen. com>.

DAVID E. GAREIN, 1995. *Electrophoretic Methods*.

HSU – YANGLIN, LIH – CHING CHIUEH, AND DANIEL YANG – CHIH SHIH, “*Detection of Genetically Modified Soybeans and Maize by The Polymerase Chain Reaction Method*”, 2000. <E – mail: clc 1025 @nlfd. gov. tw>.

KAREN E. KOCH, JIAN XU and DONALD R. MCCARTY. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 2000.

LIH – CHING CHIUEH, YEN – LING CHEN, JET – HWAYU, and DANIEL YANG – CHIH SHIH. *Detection of Four Types of Genetically Modified Maize by Polymerase Chain Reaction and Immuno – Kit Methods*. 2000. <E – mail: clc 1025 @nlfd. gov. tw>.

XIBING ZHON. *Development and Assimilate Partitioning in Wildtype and Miniature Phenotype Maize Kernel*. 2000.