

# KẾT QUẢ BAN ĐẦU TRONG VIỆC SỬ DỤNG KỸ THUẬT PCR NHẪM ĐÁNH GIÁ HIỆN TRẠNG CÁC SẢN PHẨM BẮP CHUYỂN GENE TẠI VIỆT NAM

*PREVIOUS RESULTS ON SCREENING GM CORN IN THE IMPORTED PRODUCTS*

*Bùi Minh Trí, Bùi Cách Tuyến*

*Trung tâm phân tích thí nghiệm Hóa Sinh - Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh*

*ĐT/Fax: 08.8972262*

## SUMMARY

*Vietnam has imported a large amount of corn from foreign countries. It is so far not known whether the imported products are transgenic or not? This research used PCR based techniques in screening corn that were imported from different countries during the second half of the year 2002. The obtained results indicated that most of those products are transgenic. Furthermore, it is also noticeable that all analyzed samples were mixture of GM with non-GM corn. A calculation shown that 30-90% of corn imported from China was modified with Invertase gene. The ratio for corn imported from Argentina and the USA were 20% and 10%, respectively. Bt corn was also detected in products imported from Argentina.*

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Bắp là một trong những cây trồng đã thành công trong vấn đề chuyển nạp những gene mới bằng công nghệ tái tổ hợp di truyền. Tính đến năm 2000, đã có trên 10 triệu hecta bắp gieo trồng là bắp chuyển gene. Đối với cây trồng này, các gene được các nhà sản xuất đặc biệt lưu ý là các gene cho phép tạo ra tính đề kháng sâu đục thân [CryIA (b)] và gene tăng cường chuyển hóa đường [Invertase]. Vì các ưu điểm về hiệu quả sản xuất nên bắp chuyển gene thường có giá thành thấp, tính cạnh tranh cao. Do ngành sản xuất bắp trong nước còn chưa đáp ứng nhu cầu xã hội nên chúng ta phải nhập một lượng đáng kể các loại bắp từ nhiều nguồn khác nhau trong đó đặc biệt là từ các nước có trồng bắp chuyển gene. Tuy nhiên do các qui định đối với sản phẩm biến đổi di truyền chưa được ban hành do đó tất cả các sản phẩm nhập khẩu chưa được khai báo hoặc dán nhãn xác định sản phẩm có được biến đổi di truyền hay không? Trong tình hình này, một trong những việc cần ưu tiên tiến hành đó là phải xác định mức độ hiện diện của các sản phẩm cải biến di truyền trên thị trường. Đây thực sự không phải là vấn đề đơn giản, nhưng cần phải bắt tay tiến hành 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 thực hiện nhằm mục đích tìm hiểu hiện trạng và sự tồn tại của các sản phẩm bắp nhập khẩu đặc biệt là nhằm tìm câu trả lời cho sự tồn tại của hai gene cơ bản đó là các gene Invertase và gene CryIA(b).

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Các hoá chất dùng trong chẩn đoán bắp chuyển gen

*Các hoá 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 hoá chất dùng cho phản ứng PCR bao gồm:*

Nước cất 2 lần; PCR buffer; MgCl<sub>2</sub> 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.

Ngoài 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 âm 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 khuếch đại DNA (Kỹ thuật PCR)**

Sản phẩm DNA sau ly trích được trộn chung với hỗn hợp gồm có PCR buffer, MgCl<sub>2</sub>, 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 khuếch 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.
- Tắm 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.

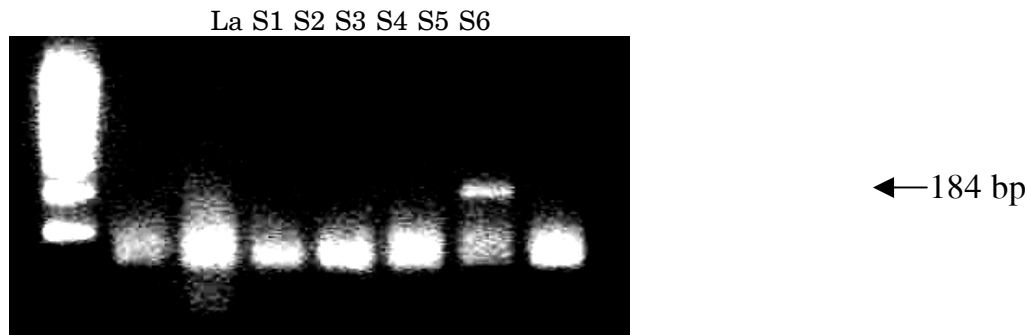
+ Đối với gen CryIA(b), trên màn hình xuất hiện băng có kích thước 184bp.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Từ kết quả thu nhận được trong việc hoàn thiện qui trình chẩn đoán sự xuất hiện của các gen CryIA(b) và Invertase từ một nghiên cứu khác, chúng tôi tiến hành phân tích mẫu thu thập từ các lô bắp nhập khẩu vào Việt Nam để xác định tần số xuất hiện tương đối của bắp có chuyển gen.

### Tần số xuất hiện bắp có chuyển gen CryIA(b)

Chúng tôi tiến hành kiểm tra sự hiện diện của gen CryIA(b) với cặp primer Bt. Như kết quả cho thấy chỉ có một sản phẩm B - AG có xuất xứ từ Argentina có sự xuất hiện của band điện di có kích thước 184 bp (hình 1). Tất cả các sản phẩm còn lại đều không nhận thấy có sự xuất hiện của gen này.



*Ghi chú: La: thang chuẩn 100bp; S1: B-TQ1; S2: B-TQ2;  
S3: B-TQ3; S4: B-TQ4; S5: B-AG; S6: B-Gluter USA.*

**Hình 1** Kết quả điện di xác định sự có mặt của gen CryIA(b) trên các mẫu bắp nhập khẩu vào Việt Nam

Tuy nhiên, chúng tôi chỉ phát hiện được một mẫu trong tổng số 10 mẫu được tiến hành khảo sát đối với sản phẩm B – AG.

### Tần số xuất hiện bắp có chuyển gen Invertase

Với cặp primer chuyên biệt cho gen Invertase (primers Gic) cho thấy các mẫu DNA của 6 lô sản phẩm chuyển gen có xuất hiện băng kích thước 226 bp. Kết quả được thể hiện ở hình 2 và bảng 2.



*Ghi chú: La: thang chuẩn 100bp; S1: B-TQ1; S2: B-TQ2; S3: B-TQ3;  
S4: B-TQ4; S5: B-AG; S6: B-Gluter USA*

**Hình 2.** Kết quả điện di xác định sự có mặt của gen Invertase trên các mẫu bắp nhập khẩu vào Việt Nam

**Bảng 1.** Tần số xuất hiện gen Invertase trên các lô sản phẩm nhập khẩu với cặp primer Gic

| Tên sản phẩm bắp | Số mẫu phân tích | Số mẫu có xuất hiện băng kích thước 226bp | Tỷ lệ phần trăm(%) |
|------------------|------------------|-------------------------------------------|--------------------|
| B – TQ1          | 10               | 8                                         | 80                 |
| B – TQ2          | 10               | 9                                         | 90                 |
| B – TQ3          | 10               | 3                                         | 30                 |
| B – TQ4          | 10               | 5                                         | 50                 |
| B – AG           | 10               | 2                                         | 20                 |
| B – Gluter USA   | 10               | 1                                         | 10                 |

Từ Bảng 1 cho thấy B – TQ2 có tỷ lệ bắp chuyển gen Invertase trong sản phẩm cao nhất (chiếm 90%) và thấp nhất là B – Gluter USA (chiếm 10%). Trong khi đó, bốn sản phẩm bắp chuyển gen còn lại cũng chiếm tỷ lệ từ 30% đến 80%. Như vậy, sản phẩm bắp nhập từ Trung Quốc có tỉ lệ trộn bắp chuyển gen Invertase cao nhất so với các loại bắp có nguồn gốc từ các quốc gia khác.

Tần số xuất hiện bắp có chuyển gen 2 loại gene Invertase và CryIA(b) có thể được trình bày qua bảng 2

**Bảng 2.** Kết quả khảo sát các sản phẩm bắp nhập khẩu vào Việt Nam

| Nguồn gốc sản phẩm | Dạng sản phẩm | Số mẫu DNA phân tích | Kết quả        |               |
|--------------------|---------------|----------------------|----------------|---------------|
|                    |               |                      | Gene Invertase | Gene CryIA(b) |
| Trung Quốc 1       | Hạt           | 10                   | +              | -             |
| Trung Quốc 1       | Hạt           | 10                   | +              | -             |
| Trung Quốc 1       | Hạt           | 10                   | +              | -             |
| Trung Quốc 1       | Hạt           | 10                   | +              | -             |
| Argentina          | Hạt           | 10                   | +              | +             |
| Mỹ                 | Bột           | 10                   | +              | -             |

*Ghi chú: (+): Phát hiện có chuyển gen; (-): Không phát hiện có chuyển gen.*

Từ Bảng 2 chúng tôi nhận thấy rằng các lô sản phẩm bắp thu thập không thuộc một giống nhất định mà là hỗn hợp bao gồm cả bắp chuyển gen và bắp không chuyển gen được trộn lẫn ở các mức độ khác nhau. Trung bình cứ 10 mẫu đem phân tích thì đã phát hiện trên năm mẫu có chuyển gen mà cụ thể là gen Invertase. Đa số sản phẩm bắp nhập từ Trung Quốc đều có sự hiện diện của gen Invertase khá cao.

Phân tích các lô sản phẩm bắp chuyển gen nhập khẩu vào Việt Nam bằng hai cặp primer chuyên biệt (cặp primer Gic và cặp primer Bt) cho hai gen Invertase và gen CryIA(b), chúng tôi ghi nhận được rằng: sản phẩm bắp chuyển gen nhập từ Argentina (B – AG) trộn đồng thời ba loại bắp (bắp chuyển gen Invertase, bắp chuyển gen CryIA(b), và bắp không chuyển gen). Để có kết luận này, chúng tôi đã tiến hành phân tích 10 mẫu trên lô sản phẩm bắp B – AG bằng hai cặp primer Gic và Bt. Với cặp primer Gic, sản phẩm PCR sau khi chụp hình cho thấy có hai mẫu có band kích thước 226bp (có chuyển gen Invertase). Với cặp primer Bt, sản phẩm PCR sau khi chụp hình cho thấy có một mẫu có band kích thước 184bp (có chuyển gen CryIA(b)). Như vậy, còn bảy mẫu không phát hiện có dấu hiệu chuyển gen.

Riêng với các lô sản phẩm bắp B – TQ1, B – TQ2, B – TQ3, B – TQ4 và B – Gluter USA khi thực hiện chu kỳ khuếch đại DNA với cặp primer Bt chuyên biệt cho gen CryIA(b) cho thấy các mẫu DNA trên các lô sản phẩm này không xuất hiện band kích thước 184bp. Như vậy các lô sản phẩm này không có chuyển gen CryIA(b).

## KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

### Kết luận

- Tình trạng nhập khẩu bắp có chuyển gene vào thị trường Việt Nam là phổ biến. Tất cả các mẫu đã thu thập được trong nghiên cứu này đều có dấu hiệu cho thấy đó là các sản phẩm đã được biến đổi di truyền.

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 tỷ lệ hiện diện là: 30-90% đối với bắp có nguồn gốc từ Trung Quốc, 20% đối với bắp có nguồn gốc từ Argentina và 10% đối với loại bột bắp nhập từ Mỹ. Ngoài ra bắp có nguồn gốc từ Argentina còn có dấu hiệu có chuyển gene kháng sâu [cryIA(b)]

- Các sản phẩm bắp nhập khẩu được phân tích đều có sự trộn lẫn giữa bắp chuyển gen và không chuyển gen.

#### **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.

- 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. TENGE, P. SCHUSSLER, E. SETZKE, J. BALLES, and M. SPRENGER – HAUSSELS. *Detection of Genetically Modified Soybean and Maize in Raw and Processed Foodstuffs*. November 2002. <http://www.qiagen.com>)

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

HSU – YANGLIN, LIH – CHING CHIUEH and DANIEL YANG – CHIH SHIH, 2000. *Detection of Genetically Modified Soybeans and Maize by The Polymerase Chain Reaction Method*. Journal of Food and Drugs analysis. No.3 - Vol.8, p. 200-207.

KAREN E. KOCH, JIAN XU and DONALD R. Mc. CARTY, 2000. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. A maize Invertase clone. Maize Genetics Cooperation Newsletter.

LIH – CHING CHIUEH, YEN – LING CHEN, JET – HWAYU, and DANIEL YANG – CHIH SHIH, 2000. *Detection of Four Types of Genetically Modified Maize by Polymerase Chain Reaction and Immuno – Kit Methods*. Journal of Food and Drugs analysis. No.1 - Vol.9, p. 50-57.

XIBING ZHON, 2000. *Development and Assimilate Partitioning in Wildtype and Miniature Phenotype Maize Kernel*. The Pennsylvania State University.