

BIẾN NẠP GEN *HbsAg* TRÊN MỘT SỐ GIỐNG CÀ CHUA BI (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Nguyễn Thị Phương Nam¹, Trần Thị Ngọc Hà¹, Lê Hoàn Hảo¹, Lê Tấn Đức¹, Phạm Đức Trí¹,
Phan Tường Lộc¹, Nguyễn Hữu Tâm¹, Bùi Minh Trí², Nguyễn Hữu Hồ^{1*}

¹*Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,*

²*Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh*

Email*: nguyenhuuho@itb.ac.vn

Ngày gửi bài: 27.07.2014

Ngày chấp nhận: 24.09.2014

TÓM TẮT

Nội dung bài này đề cập một số kết quả nghiên cứu về biến nạp di truyền tạo cây mang gen *HBsAg* mã hóa protein vỏ virus viêm gan B trên một số giống cà chua bi như TN 412 và TN 84 phục vụ định hướng dài hạn tạo vaccin từ thực vật. Kết quả nghiên cứu tái sinh chồi từ lá mầm hai giống góp phần tạo tiền đề cho nghiên cứu biến nạp gen. Lá mầm hai giống (7 ngày tuổi) được gây nhiễm và nuôi chung với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang gen *HBsAg* (promoter PDS + T7), gen *nptII* kháng kanamycin và gen *gusA*. Sau 2 ngày nuôi chung mô với vi khuẩn, lá mầm được rửa sạch vi khuẩn và nuôi cấy chọn lọc trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l IAA, 2 mg/l BA, 500 mg/l cefotaxime và 30 - 50 mg/l kanamycin. Qua ít nhất bốn lần cấy chuyển (15 - 20 ngày/lần) trên môi trường chọn lọc, nhiều dòng cây chuyển gen ở cả hai giống đã được thu nhận; các dòng cây chuyển gen đã được kiểm tra sự hiện diện và biểu hiện của các gen chuyển bằng kỹ thuật PCR, kỹ thuật hóa mô tế bào GUS, kỹ thuật PCR, Southern blot và Western blot. Một số cá thể T₁ của một dòng cây chuyển gen T₀ đã được kiểm tra sự hiện diện và biểu hiện của gen *nptII* bằng thử nghiệm định tính *in vitro* khả năng kháng kanamycin và bằng kỹ thuật PCR; tương tự, gen *HBsAg* ở cá thể T₁ cũng đã được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, cà chua bi (*Lycopersicon esculentum* Mill.), chuyển gen, gen *HbsAg*, lá mầm.

Genetic Transformation of Some Cherry Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Cultivars with The *HbsAg* Gene**Abstract**

The present paper reported the results on the genetic transformation of two cherry tomato cultivars, TN412 (pureline) and TN TN48 (F₁ hybrid) with the *HBsAg* for long-term objective of producing the plant edible vaccine against Hepatitis B virus. Shoots regenerated from cotyledons served as materials for transformation experiments. The 7-day old cotyledons of tomato seedlings were infected and co-cultivated for 2 days with the *Agrobacterium tumefaciens* strain carrying the *HBsAg* gene [driven by the PDS (phytoene desaturase) and T7 promoters], kanamycin resistance gene *nptII* and *gusA* reporter gene. Two days after co-cultivation, the cotyledons were washed with cefotaxime solution and cultured on the MS medium containing + 0.5 mg/l IAA + 2 mg/l BA + 500 mg/l cefotaxime and 30 - 50 mg/l kanamycin for selection of transformants. Through at least 04 rounds of selection (15 - 20 days/round), various kanamycin resistant (K^R) lines were obtained in both cultivars and they were confirmed for the presence and expression of transgenes by the GUS assay, by the PCR and Southern blot and western blot analyses. Several T₁ individuals from T₀ line were evaluated for presence and expression of the *nptII* gene by the *in vitro* K^R assay and by the PCR analysis. The presence of the *HBsAg* gene in the T₁ individuals also was carried out by the PCR technique.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cotyledon, genetic transformation, *HBsAg* gene.

1. MỞ ĐẦU

Cà chua bi (*Lycopersicon esculentum* Mill.) là nhóm các giống cà chua, quả nhỏ được dùng ăn tươi, đã và đang được trồng nhiều trên thế giới và trong nước. Cà chua bi chứa các thành phần dinh dưỡng tương tự như ở loại cà chua quả to. Việc đầu tư nghiên cứu chọn giống cà chua bi trên thế giới đã đạt được nhiều thành tựu trong lai tạo, sản xuất giống thương mại F_1 nhưng chưa ghi nhận nhiều công bố trong lĩnh vực tạo dòng/giống biến đổi gen. Ở nghiên cứu này, hai giống cà chua bi sử dụng đều là giống có ý nghĩa kinh tế, trong đó TN412 là giống thuần nhằm theo dõi sự di truyền của gen chuyển và TN84 là giống lai F_1 nên có thể nhân giống cây chuyển gen bằng phương pháp nhân vô tính.

Trong đáp ứng miễn dịch đối với virus viêm gan B, protein kháng nguyên bề mặt (surface antigen) nhỏ (S) đóng vai trò chủ yếu; do vậy, gen tạo protein này đã được phân lập, dòng hóa và được sử dụng trong biến nạp di truyền trên một số đối tượng cây trồng quan trọng như thuốc lá (Mason et al., 1992; Thanavala et al., 1995; Sunil Kumar et al., 2003), chuối (May et al., 1995; Sunil Kumar et al., 2005), cải xà lách (Kapusta et al., 1999), khoai tây (Richter et al., 2000; Joung et al., 2004) và cà chua quả to (Arntzen et al., 2000), cherry tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.) (Gao et al., 2003), cà chua bi dạng hoang dại (wild cherry tomato, *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) (Guo et al., 2012) nhằm tạo vaccin từ thực vật nói chung và vaccin ăn được (edible) nói riêng.

Theo các công bố nêu trên, kết quả nghiên cứu còn có mặt hạn chế là lượng protein (sản phẩm của gen chuyển) trong cây chuyển gen còn chưa cao (do chủ yếu dùng promoter CaMV35S) nên trong nghiên cứu này, hệ thống sao chép T7 của thực khuẩn thể (bao gồm promoter T7 + gen mã hóa RNA polymerase + terminator T7) được sử dụng - vấn đề gây được sự quan tâm đặc biệt chỉ trong vài năm gần đây do chúng tạo biểu hiện rất cao ở đối tượng thực vật (Huu Tam et al., 2004), kết hợp với promoter PDS (phytoene

desaturase) tạo sự biểu hiện chuyên biệt ở quả nhằm mục đích làm tăng hàm lượng protein kháng nguyên HbsAg.

Nội dung bài viết trình bày kết quả nghiên cứu chuyển gen mục tiêu *HBsAg* vào hai giống cà chua bi TN412 và TN84 bằng phương pháp dùng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và sử dụng kết hợp hai loại promoter nói trên để chuyển gen *HBsAg* vào đối tượng cây trồng này. Đây là kết quả nghiên cứu đầu tiên ở trong nước về biến nạp gen trên giống cà chua bi thương mại TN412.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Giống cà chua

Sử dụng hai giống cà chua bi TN412 (thuần) và TN84 (F_1) (công ty Trang Nông, Thành phố Hồ Chí Minh).

2.2. Khử trùng hạt

Hạt được khử trùng bằng dung dịch hypochlorite Na (nước Javel) 50% (v/v) trong 5 phút, rửa sạch bằng nước cất và được cấy trên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) không chất điều hòa sinh trưởng (môi trường MSO). Lá mầm cây *in vitro* 7 ngày tuổi của hai giống nói trên được sử dụng làm vật liệu xây dựng hệ thống tái sinh và chuyển gen.

2.3. Xây dựng hệ thống tái sinh

Như đã nêu, sử dụng mẫu lá mầm *in vitro* 7 ngày tuổi cho nghiên cứu tái sinh; dùng môi trường MS [vitamin B5 (Gamborg, 1968)] có bổ sung 0,5 mg/l IAA và 0,5 - 3 mg/l BA, 9 g/l agar. Cấy lá mầm sát mặt môi trường sao cho mặt trên lá (adaxial) hướng lên, cuống lá cắm nhẹ vào môi trường.

Điều kiện nuôi: Cường độ ánh sáng ≈ 3.000 lux, 9 giờ chiếu sáng/ngày, nhiệt độ 25 - 28°C. Tỷ lệ tái sinh (%) và trung bình số chồi tái sinh/mẫu được ghi nhận sau 6 tuần nuôi cấy. Thí nghiệm nhằm mục đích xác định được môi trường tái sinh tốt nhất dùng cho nghiên cứu biến nạp gen. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu

và 500 mg/l cefotaxime, thời gian 15 - 20 ngày; sau đó, cấy chuyển mô sẹo/phác thể chồi (hình thành từ vết cắt lá mầm) sang môi trường TS4 có 50 mg/l kanamycin và 500 mg/l cefotaxime (thực hiện 3 chu kỳ chọn lọc, 15 - 20 ngày/chu kỳ) đến khi hình thành chồi.

2.5. Kiểm tra sự hiện diện và biểu hiện của gen chuyển

2.5.1. Thử GUS

Ủ mô lá, cuống lá, thân cây *in vitro*, mô thịt quả non và chín (cắt ngang) trong thuốc thử GUS ở 37°C (tủ ẩm) trong 24 giờ (Jefferson et al., 1987).

2.5.2. Kiểm tra sự biểu hiện định tính của gen kháng kanamycin *nptII* ở dòng cây T_0 và T_1

Đối với cây T_0 : Cấy chồi/cụm chồi (cao 1 - 1,5cm) và chồi to (cao khoảng 3cm) nhận được trên môi trường tái sinh có kanamycin sang môi trường MSO có 50 mg/l kanamycin để theo dõi khả năng tăng trưởng (phát triển thân, lá và tạo rễ) trong thời gian 1 tháng. Đối với các cá thể T_1 : Khử trùng, gieo và nuôi cấy hạt T_1 (từ cây T_0) trên môi trường MSO đến khi tạo cây có lá thật. Nuôi cấy các mảnh lá thật (0,5 x 1cm) trên môi trường TS4 có 50 - 100 mg/l kanamycin. Ghi nhận khả năng kháng kanamycin của các cá thể trong thời gian 1 - 1,5 tháng.

2.5.3. Kỹ thuật tách DNA lá dùng kiểm tra PCR

Sử dụng kỹ thuật tách DNA bằng phương pháp dùng Cetyltrimethyl ammonium bromide - CTAB (Dellaporta et al., 1983).

2.5.4. Kiểm tra PCR gen chuyển đối với dòng cây T_0 và một số cá thể T_1

Sự hiện diện của gen *nptII*, gen *HBsAg* được kiểm tra dùng các cặp mồi đặc hiệu. Mồi gen *nptII*: Ka(F): 5'-ACA CGC TGA AAT CAC CAG TCT C-3', Ka(R): 5'-CTC GTC CTG CAG TTC ATT C-3'; khuếch đại đoạn DNA 600bp; chương trình nhiệt: 94°C: 5 phút; 35 chu kỳ (94°C: 1 phút, 55°C: 1 phút, 72°C: 2 phút); 72°C: 7 phút. Mồi gen *HBsAg*: HBV(F): 5'-ATG GAG AAC ACA ACA-3', HBV(R): 5'-GGA TCC TTT

TGC GGA AGC CCA- 3'; khuếch đại đoạn DNA 480bp; chương trình nhiệt: 94°C: 10 phút; 40 chu kỳ (94°C: 50 giây, 45°C: 45 giây, 72°C: 50 giây); 72°C: 7 phút.

2.5.5. Trồng các dòng cây chuyển gen T_0 ở vườn ươm

Cây con *in vitro* đạt chiều cao 7 - 8cm được đem trồng ở vườn ươm. Giá thể trồng bao gồm đất sạch + phân chuồng hoai trộn chung với tỷ lệ 3:1. Ở giai đoạn 10 ngày đầu, cây cần được che nhằm tránh ánh sáng trực tiếp; sau đó cây được đem ra để ngoài ánh sáng tự nhiên trong vườn ươm đến khi ra hoa, kết quả và chín đỏ (sau khoảng > 2 tháng đến < 3 tháng). Hạt quả chín đỏ được rửa sạch, bảo quản ở 4°C dùng cho nghiên cứu tiếp theo (thế hệ T_1).

2.5.6. Kiểm tra Southern blot

Các bước kỹ thuật được thực hiện theo tài liệu của Datta et al., (1997). Thu các lá xanh tốt (10 lá) của các dòng cây cà chua TN412 1,5 tháng tuổi trồng ở nhà lưới để làm thí nghiệm. Thực hiện tách chiết DNA, cắt bằng enzyme giới hạn *NcoI* và thực hiện các bước theo thứ tự của kỹ thuật. Sử dụng bộ kit "ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems" của GE Healthcare, Amersham (UK) (2012). Probe là trình tự DNA plasmid có biên là hai điểm cắt bởi enzyme *NcoI* ở vị trí 8388 và 14220.

2.5.7. Tách protein tổng số mô thịt quả

Theo tài liệu của Datta et al., (1997)

2.5.8. Kiểm tra nhanh sự hiện diện của protein *HBsAg* trong mô thịt quả cây chuyển gen

Dùng que thử ELISA đặc hiệu của công ty Clinotech Diagnostics (Canada).

2.5.9. Kiểm tra Western blot

Kỹ thuật sử dụng để chiết tách protein từ quả (≈ 10 g) của cây trồng ở nhà lưới được dựa theo tài liệu của Datta et al., (1997). Protein *HBsAg* được phát hiện theo phương pháp chung của Ausubel et al., (1987). Sử dụng protein kháng nguyên *HBsAg* tinh khiết và kháng thể đặc hiệu *HBsAb* của công ty Sigma-Aldrich (Mỹ).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xây dựng hệ thống tái sinh

Sau 6 tuần thí nghiệm tái sinh chồi từ lá mầm giống cà chua TN412 nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng IAA (0,5 mg/l) và BA (0,5 - 3 mg/l), kết quả ở bảng 1 cho thấy, nói chung, tỷ lệ tái sinh tăng dần từ 29,44% đến 68,33% tương ứng với sự gia tăng của nồng độ BA từ 0,5 mg/l đến 1,5 mg/l; tỷ lệ tái sinh chồi đạt cao nhất 88,33% ở nghiệm thức TS4 (có 2 mg/l BA) (Hình 2d). Khi nồng độ BA cao hơn 2 mg/l, tỷ lệ tái sinh lại giảm (Hình 2 e,f). Sự gia tăng trung bình số chồi tái sinh trên một mẫu cũng theo chiều hướng tương tự như ở trường hợp trên, đạt cao nhất 3,48 chồi ở nghiệm thức TS4 và giảm khi nồng độ BA cao hơn 2 mg/l.

Trên môi trường tái sinh tối ưu cho giống TN412, đối với giống cà chua TN84, tỷ lệ tái sinh chồi và trung bình số chồi tái sinh/ mẫu lá mầm cao hơn, lần lượt là 91,24% và 3,63 chồi. Như vậy, môi trường trên đã tạo tỷ lệ tái sinh và trung bình số chồi/ mẫu ở hai giống cà chua nói trên theo chúng tôi là rất tốt và môi trường TS4 được sử dụng trong nghiên cứu biến nạp gen ở giai đoạn tiếp theo. Các số liệu đầy đủ về tỷ lệ tái sinh ở các nghiệm thức đối với giống TN84 cũng như thảo luận, so sánh kết quả tái sinh trên hai giống cà chua này với các kết quả nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước sẽ được trình bày ở một báo cáo khác.

3.2. Chuyển gen

Các lá mầm được cắt cẩn thận khỏi cây mầm 7 ngày tuổi, được nuôi 2 ngày (pre-culture) trên môi trường TS4. Ở giai đoạn này, lá mầm tăng về kích thước, trở nên cứng cáp sẵn sàng cho khâu gây nhiễm với vi khuẩn. Cách xử lý, nuôi chung với vi khuẩn, quy trình chọn lọc được áp dụng chung cho cả hai giống cà chua.

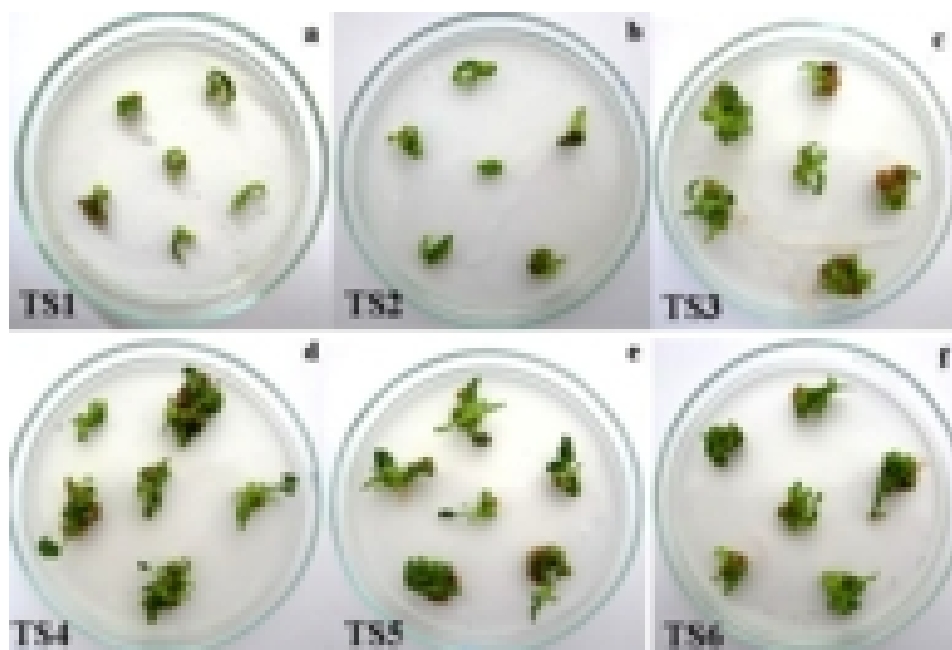
Quá trình nghiên cứu cho thấy hai giống cà chua bi trên khá mẫn cảm với kháng sinh kanamycin so với một số giống cà chua quả to (số liệu cá nhân); do vậy, sau khi nuôi chung, lá mầm của chúng được nuôi cấy trên môi trường không có kanamycin trong 4 ngày trước khi chịu sự chọn lọc bởi kanamycin tăng dần từ 30 mg/l ở lần chọn lọc đầu tiên đến 50 mg/l ở các lần chọn lọc tiếp theo.

Trên môi trường có 30 mg/l kanamycin, sau 2 tuần, đa số các lá mầm trở nên nâu dần; ngược lại, ở một số lá mầm có sự hình thành cụm mô trắng hoặc trắng điểm xanh ở vị trí gốc lá mầm, đôi khi có sự hình thành phác thể lá. Từ tuần thứ 3 trở đi, có thể có chồi nhỏ hình thành trên các cụm mô này. Các mô sẹo/chồi nhỏ được tiếp tục nuôi cấy chọn lọc trên môi trường có 50 mg/l kanamycin thêm 3 chu kỳ chọn lọc tiếp tục đến khi nhận được chồi tăng trưởng tốt. Ở giai đoạn bắt đầu sử dụng 50 mg/l kanamycin có một số mô sẹo/chồi nhỏ không phát triển tiếp tục; mô sẹo hóa nâu, lá chồi úa vàng và chết nhưng một số ít cụm mô/ chồi vẫn tiếp tục tăng sinh về mặt kích thước hình thành các chồi lớn hơn (Hình 3a,b) và đây là biểu hiện cho thấy chúng có thể là các cá thể đã mang gen chuyển.

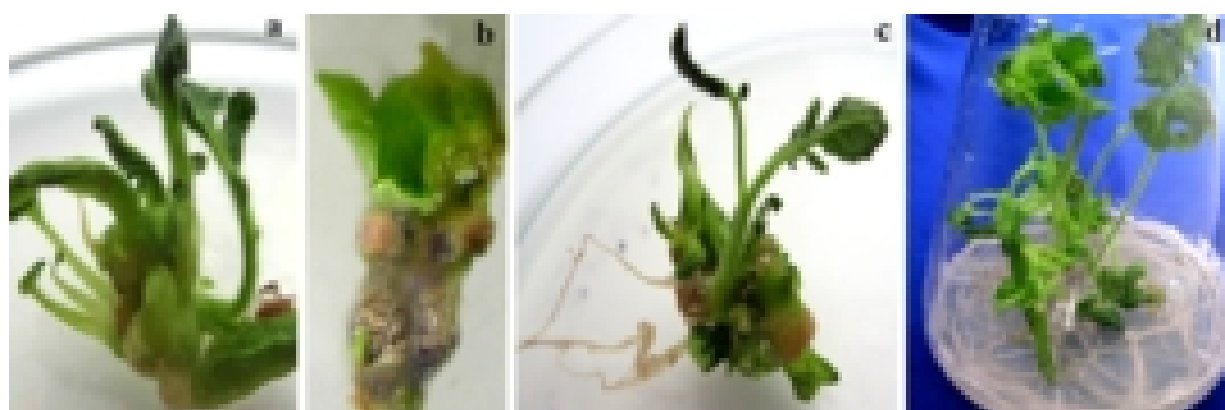
Bảng 1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến tỷ lệ tái sinh chồi từ lá mầm cà chua TN412 nuôi cấy trên các môi trường MS + IAA (0,5 mg/l) + BA (0,5 - 3 mg/l), sau 6 tuần

Nghiệm thức	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)		Tỷ lệ lá mầm tái sinh chồi (%)	Trung bình số chồi tái sinh/mẫu lá mầm
	IAA	BA		
TS1	0,5	0,5	29,44 e	0,57 f
TS2	0,5	1,0	45,55 d	1,15 e
TS3	0,5	1,5	68,33 c	2,09 d
TS4	0,5	2,0	88,33 a	3,48 a
TS5	0,5	2,5	78,33 b	2,84 b
TS6	3,0	0,5	73,33 bc	2,53 c

Chú thích: Trong mỗi cột có ít nhất một ký tự giống nhau thì sự khác nhau không có ý nghĩa bởi sự phân hạng của Duncan



Hình 2. Kết quả tái sinh chồi từ lá mầm cà chua TN412 ở các nghiệm thức khác nhau (TS1 - TS6), sau 6 tuần nuôi cấy



Hình 3. Tái sinh chồi và nuôi chồi, cây cà chua trên môi trường có kanamycin

Ghi chú: a. Chồi tái sinh từ lá mầm cà chua TN412 trên môi trường có 50 mg/l kanamycin; b. Chồi tái sinh từ lá mầm cà chua TN84 trên môi trường có 50 mg/l kanamycin; c. Chồi cà chua TN412 tạo rễ trên môi trường có 50 mg/l kanamycin; d. Cây cà chua TN412 phát triển, tạo rễ tốt trên môi trường có 50 mg/l kanamycin

3.3. Kiểm tra thể chuyển gen

3.3.1. Kiểm tra định tính sự biểu hiện của gen *nptII* ở cây chuyển gen thế hệ T_0 và T_1

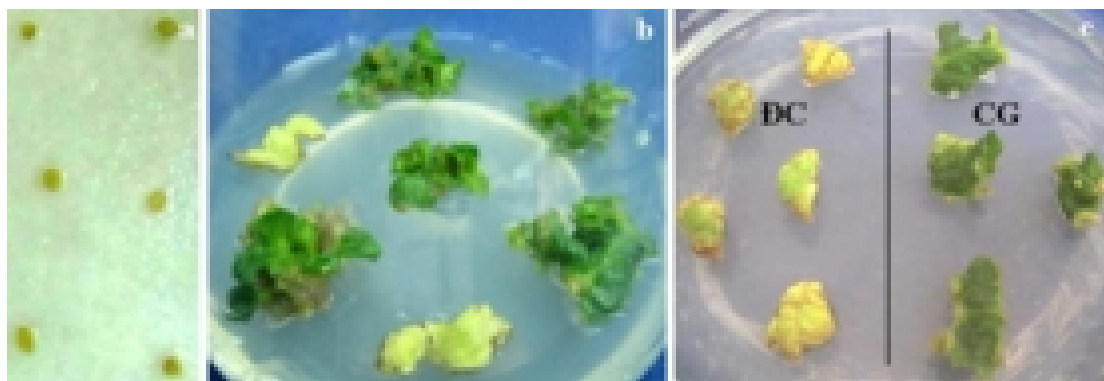
Khi chồi tái sinh (thế hệ T_0) cao 1 - 3cm, chúng được cấy chuyển sang môi trường MSO có 50 mg/l kanamycin để theo dõi sự tăng trưởng. Kết quả cho thấy một số dòng tăng trưởng và ra rễ tốt trên môi trường này tạo cây

lớn với đầy đủ rễ thân lá (Hình 3c,d); ngược lại; chồi đối chứng bị vàng lá, không tạo rễ và chết sau đó. Các cây lớn được đem ra trồng ở nhà lưới (Hình 4a) đến khi ra hoa (Hình 4b), kết quả (Hình 4c,d). Chỉ có các dòng cà chua TN412 được trồng ở nhà lưới để tiếp tục nghiên cứu sự di truyền của các gen chuyển. Hạt của chúng được gieo *in vitro* (Hình 5a) phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 4. Cây cà chua TN412 chuyển gen giai đoạn ra hoa, kết quả trong nhà lưới

Ghi chú: a. Cây con giai đoạn nhà lưới; b. Cây giai đoạn ra hoa (ĐC: Đối chứng, CG: Chuyển gen); c, d. Quả cà chua chuyển gen giai đoạn xanh và chín đỏ



Hình 5. Kết quả thử nghiệm tính kháng kanamycin của các cá thể cà chua TN412 chuyển gen thế hệ T_1 dùng mảnh lá nuôi cấy trên môi trường có bổ sung kanamycin

Ghi chú: a. Gieo in vitro hạt T_1 trên giấy thấm nước; b. Biểu hiện tính kháng phân biệt đối với kanamycin của một số cá thể T_1 sau 1,5 tháng nuôi cấy mảnh lá trên môi trường có 50 mg/l kanamycin; c. Biểu hiện tính kháng cao đối với kanamycin của cá thể chuyển gen T_1 sau 1 tháng nuôi cấy mảnh lá trên môi trường có 100 mg/l kanamycin (ĐC: Đối chứng - mất diệp lục tố; CG: Chuyển gen)

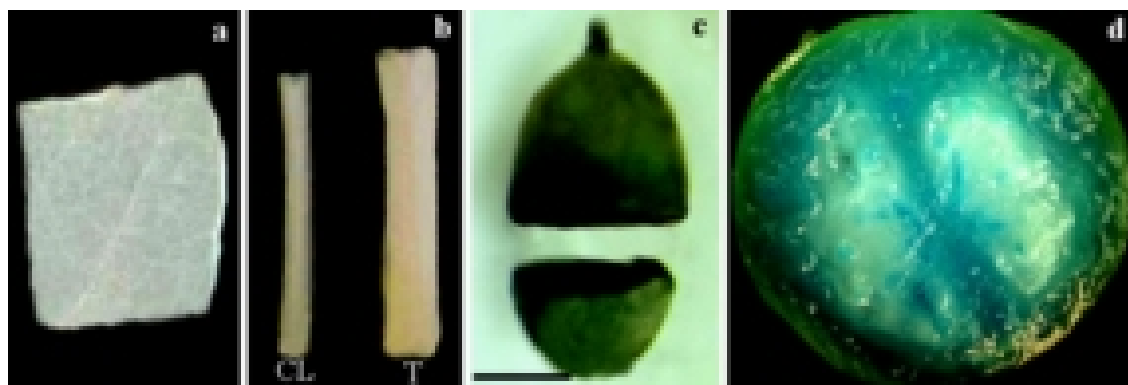
Qua thử nghiệm nuôi cấy mảnh lá của một số cá thể cà chua TN412 thế hệ T_1 (từ một dòng cây chuyển gen T_0) trên môi trường TS4 có 50 mg/l kanamycin, kết quả cho thấy một số ít mảnh lá chết vàng còn đa số các mảnh còn lại có tăng trưởng và tái sinh chồi mới bình thường (Hình 5b). Khả năng kháng kanamycin của các cá thể này rất cao - vẫn có thể sống trên môi trường có 100 mg/l kanamycin (Hình 5c).

3.3.2. Kiểm tra sự biểu hiện của gen chỉ thị *gusA*

Kết quả thử nghiệm GUS đối với mô thịt lá, mô cuống lá, mô thân, mô quả non và quả chín TN412 cho thấy biểu hiện GUS ở các loại mô lá,

cuống và thân là âm tính (Hình 6a,b); ngược lại, biểu hiện GUS ở mô quả là dương tính - có màu xanh chàm đặc trưng (Hình 6c,d). Điều này do gen *gusA* (và gen *HBsAg*) được cấu trúc với promoter PDS (chỉ tạo biểu hiện ở mô quả) nên thử GUS đã cho kết quả như dự kiến. Ở nghiên cứu này tuy chưa có so sánh sự biểu hiện của gen *gusA* điều khiển bởi promoter T7 với một số promoter khác nhưng kết quả thử GUS cho thấy màu xanh chàm (indigo) biểu hiện rất đậm. Kết quả này phù hợp với công bố của Huu Tam Nguyen et al., (2004) về sự biểu hiện rất cao của gen *gusA* trên mô cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) được điều khiển bởi promoter T7 so với promoter khác như CaMV35S.

Biến nạp gen HbsAg trên một số giống cà chua bi (*Lycopersicon esculentum* Mill.)



Hình 6. Biểu hiện GUS ở một số loại mô của cây cà chua TN412 chuyển gen.

Ghi chú: a. Biểu hiện GUS âm tính ở mô lá cây in vitro; b. Biểu hiện GUS âm tính ở mô cuống lá (CL) và thân (T) cây in vitro; c. Biểu hiện GUS dương tính ở mô quả non (thanh ngang 2mm); d. Biểu hiện GUS dương tính ở mô quả chín

3.3.3. Kiểm tra PCR các gen chuyển ở cây T_0 và cây T_1

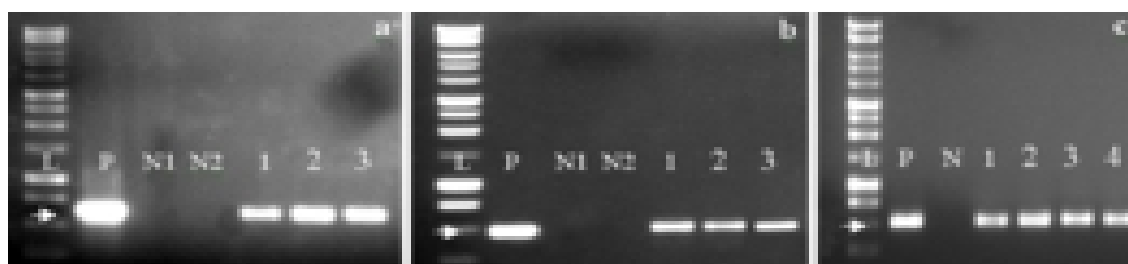
Kết quả kiểm tra PCR các gen *nptII* và gen *HbsAg* ở các dòng cây T_0 hai giống TN412 và TN84 cho thấy có sự hiện diện của các băng DNA được khuếch đại tương ứng là 600bp và 480bp (Hình 7a,b,c). Như vậy, cơ bản các gen chuyển đã được hợp nhất vào bộ gen của cây. Do đã có thử nghiệm GUS nên phân tích PCR gen *gusA* đã không được thực hiện.

Tương tự, kiểm tra PCR hai gen *nptII*, *HbsAg* cho thấy có sự phân ly tính trạng ở thế hệ sau (T_1) biểu hiện qua kết quả có cả dương tính và âm tính (Hình 8a,b). Qua kết hợp kết quả kiểm tra định tính sự biểu hiện của gen *nptII* dùng phương pháp nuôi cấy mảnh lá trên

môi trường có kanamycin và kết quả PCR gen *nptII* và gen *HbsAg* ở một số các cá thể T_1 , bước đầu nhận thấy hai gen *nptII*, *HbsAg* liên kết chặt (do cùng định vị trong vùng bờ trái-bờ phải của T-DNA), cùng di truyền sang thế hệ sau và có sự phân ly theo quy luật Mendel với tỷ lệ 3:1 [$P(\chi^2_{TN}) > 0,05$].

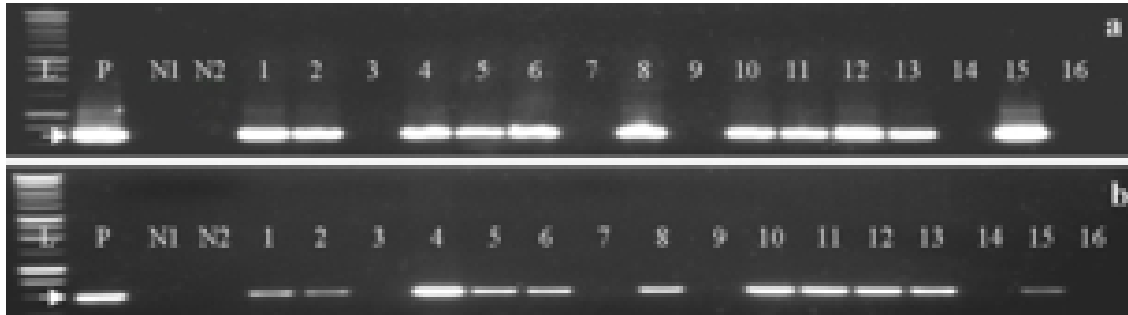
3.3.4. Kiểm tra nhanh protein HBsAg, kiểm tra Southern blot và Western blot

Các thí nghiệm này chỉ được thực hiện trên giống cà chua chuyển gen TN412. Kết quả dùng que thử (Clinotech Diagnostics) để phát hiện protein kháng nguyên HBsAg ở quả cho thấy có sự xuất hiện của vạch chứng dương (test line) bên dưới vạch chứng âm (control line); ngược lại,



Hình 7. Kết quả kiểm tra PCR một số gen biến nạp ở các dòng cà chua chuyển gen TN412 và TN84

Ghi chú: a. Kết quả PCR gen *nptII* dương tính với băng DNA 600 bp (vị trí mũi tên) ở giống TN412 (L: Thang DNA chuẩn 1kb; P: ĐC dương - plasmid; N1: ĐC âm - nước cất; N2: ĐC âm - cây không chuyển gen; 1, 2, 3: Cây chuyển gen); b. Kết quả PCR gen *HbsAg* dương tính với băng DNA 480bp (vị trí mũi tên) ở giống TN412 (L: Thang DNA chuẩn 1 kb; P: ĐC dương - plasmid; N1: ĐC âm - nước cất; N2: ĐC âm - cây không chuyển gen; 1, 2, 3: Cây chuyển gen); c. Kết quả PCR gen *HbsAg* dương tính với băng DNA 480bp (vị trí mũi tên) ở giống TN84 (L: Thang DNA chuẩn 1 kb; P: ĐC dương - plasmid; N: ĐC âm - cây không chuyển gen; 1, 2, 3, 4: Cây chuyển gen)



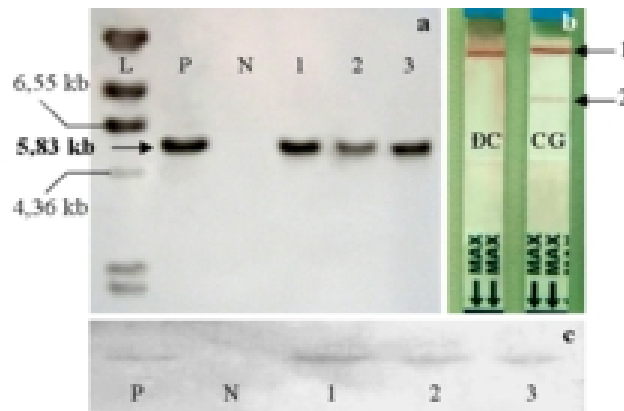
Hình 8. Kết quả kiểm tra PCR gen kháng kanamycin *nptII* và gen *HBsAg* ở một số cá thể cây cà chua T_1 giống TN412

Ghi chú: a. Kiểm tra PCR gen *nptII* dương tính với băng DNA 600 bp (vị trí mũi tên) (L: Thang DNA chuẩn 1kb; P: ĐC dương - plasmid; N1: ĐC âm - nước cất; N2: ĐC âm - cây không chuyển gen; 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 15: Các cá thể T_1 mang gen chuyển; 3, 7, 9, 14, 16: Các cá thể T_1 không mang gen chuyển); b. Kiểm tra PCR gen *HBsAg* dương tính với băng DNA 480bp (vị trí mũi tên) (L: Thang DNA chuẩn 1kb; P: ĐC dương - plasmid; N1, N2: ĐC âm - như trên; 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 15: Các cá thể T_1 mang gen chuyển; 3, 7, 9, 14, 16: Các cá thể T_1 không mang gen chuyển)

ở trường hợp đối chứng không có vạch này (Hình 9b). Được biết độ nhạy của que thử đến 99,8% và có thể phát hiện tất cả các subtype của virus như *adr*, *adw*, *ayr* và *ayw*. Không thấy vạch chứng dương đối với kiểm tra protein tách từ thân và lá (tài liệu cá nhân).

Ở thí nghiệm Southern blot, kết quả cho thấy có sự hiện diện của băng DNA kích thước 5,83 kb đúng như dự kiến ở các dòng cà chua chuyển gen; ngược lại, không có băng này ở trường hợp đối chứng (Hình 9a). Ở kiểm tra

Western blot, cũng ghi nhận được trên màng băng protein ở các dòng cà chua chuyển gen ngang với vị trí của protein kháng nguyên tinh khiết (Hình 9c). Bước đầu kiểm tra protein HBsAg cho thấy hàm lượng protein ở quả cao hơn so với công bố trước đây của Gao et al., (2003) khi dùng promoter CaMV35S (số liệu cá nhân). Guo et al., (2012) cũng đã nghiên cứu biến nạp gen *HBsAg* trên cây cà chua bi nhưng không dùng promoter tạo biểu hiện đặc trưng ở quả.



Hình 9. Kết quả phân tích Southern blot và kiểm tra protein HBsAg đối với các dòng cà chua TN412 chuyển gen

Ghi chú: a. Kết quả lai Southern dương tính với trình tự DNA lai mong đợi 5, 83kb (vị trí mũi tên) (L: Thang DNA chuẩn λ -HindIII; P: ĐC dương - plasmid; N: ĐC âm - cây không chuyển gen; 1, 2, 3: Các dòng chuyển gen); b. Kiểm tra protein dương tính bằng que thử Clinotech Diagnostics (1: Vạch chứng âm; 2: Vạch chứng dương; DC: Đối chứng; CG: Chuyển gen); c. Kết quả phân tích Western blot dương tính đối với các dòng cà chua chuyển gen (P: Protein HBsAg tinh khiết - 10ng; N: Cây không chuyển gen; 1, 2, 3: Các dòng chuyển gen)

Qua nghiên cứu, đã nhận được 03 dòng cây chuyển gen đối với giống cà chua TN412 (tần số chuyển gen đạt khoảng 1%) và 04 dòng cây chuyển gen đối với giống cà chua TN84 (tần số chuyển gen đạt khoảng 1,5%).

4. KẾT LUẬN

Trên hai giống cà chua bi TN412 và TN84, qua sử dụng phương pháp chuyển gen bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 chứa plasmid pITB-HBsAg, lần đầu tiên đã thu nhận được một số dòng cây mang gen mục tiêu *HBsAg* (điều khiển bởi hai promoter PDS và T7) mã hoá protein kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B. Các dòng nói trên đã được kiểm tra sự hiện diện và biểu hiện của các gen chuyển bằng một số phương pháp sinh học định tính như kiểm tra sự biểu hiện của gen *nptII* ở cây chuyển gen thế hệ T_0 và T_1 , kiểm tra hóa mô tế bào GUS và phương pháp sinh học phân tử như kiểm tra PCR các gen chuyển ở cây T_0 và cây T_1 , kiểm tra nhanh protein HBsAg, Southern blot và Western blot.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả chân thành cảm ơn Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tài trợ cho nghiên cứu này. Công trình được thực hiện tại Phòng thí nghiệm trọng điểm phía Nam về công nghệ tế bào thực vật - Viện Sinh học nhiệt đới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arntzen CJ, Lam DMK (2000). Vaccines expressed in plants. US patent # 6,136,320.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1987). Current Protocols in Molecular Biology, New York (USA), Green Publishing.
- Datta SK, Torrizo LB, Tu J, Oliva NP, Datta K (1997). Production and Molecular Evaluation of Transgenic Rice Plants. *IRRI Discussion Paper Series*, (21).
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1(4): 19-21.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50(1): 151-158.
- Gao Y, Ma Y, Li M, Cheng T, Li SW, Zhang J, Xia NS (2003). Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing HBsAg. *World journal of Gastroenterology* 9(5): 996-1002.
- Guo B, Chen Q, Guan ZJ, Tao GR, Xu LL, Hao HY, Wei YH (2012). Expression of *HbsAg* in tomatoes resulted in abnormal shoot regeneration *in vitro*. *Pak. J. Bot.* 44(4): 1413-1418.
- Huu Tam Nguyen, Leelavathi S, Reddy VS (2004). Bacteriophage T7 RNA polymerase-directed, inducible and tissue-specific over-expression of foreign genes in transgenic plants. *Plant Biotechnology Journal* 2: 301-310.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan BW (1987). GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO* 6: 3901-3907.
- Joung YH, Youm JW, Jeon JH, Lee BC, Ryu, Hong HJ, Kim HC, Joung H, Kim HS (2004). Expression of the hepatitis B surface S and preS2 antigens in tubers of *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Rep.* 22: 925-930.
- Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Podkowinski J, Pniewski T, Lisowa O, Berbezy P, Helias D, Biesiadka J, Femiak I, Letellier M, Yusibov V, Plucienniczak A, Koprowski H, Legocki AB (1999). Biotechnological approaches to making vaccine in plants. *Plant Biotechnology and In vitro Biology in the 21st Century*, A. Altman et al. (eds.), Kluwer Academic Publishers, pp. 571-574.
- Mason HS, Lam DMK, Arntzen CJ (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 11745-11749.
- May GD, Afza R, Mason HS, Wiecko A, Novak FJ, Arntzen CJ (1995). Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotechnology*, 13: 486-492.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS (2000). Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nature Biotechnology*, 18: 1167-1171.
- Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Prasad KSN, Bapat VA (2003). Expression of hepatitis B surface antigen in tobacco cell suspension cultures. *Prot. Exp. Purif.* 32: 10-17.
- Sunil Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Srinivas L, Bapat VA (2005). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. *Planta*, 222: 484-493.
- Thanavala Y, Yang YF, Lyons P, Mason HS, Arntzen CJ (1995). Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 3358-3361.