

MỤC LỤC

Trang

Mục lục.....	1
Danh mục hình	6
Danh mục bảng	9
Danh mục chữ viết tắt	11
Tóm tắt	12
Mở đầu	16
Chương 1 Tổng quan tài liệu.....	20
1.1 Tổng quan về cây cà chua (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill).....	20
1.1.1 Nguồn gốc và phân loại.....	20
1.1.2 Ý nghĩa kinh tế của cây cà chua.....	21
1.1.3 Dinh dưỡng trong quả cà chua	21
1.1.4 Nghiên cứu về di truyền cây cà chua	23
1.2 Tổng quan về virus viêm gan (Hepatitis B virus - HBV) và vaccine ăn được từ thực vật.....	23
1.2.1 Đại cương về virus viêm gan B (Hepatitis B virus – HBV)	24
1.2.2 Cấu trúc của HBV	25
1.2.2.1. Gen S	26
1.2.2.2. Kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (HBsAg – Hepatitis B surface antigen)	27
1.2.3 Vaccine ăn được từ thực vật.....	30
1.2.3.1 Ưu điểm của vaccine ăn được từ thực vật	30
1.2.3.2 Phương thức sản xuất vaccine ăn được từ thực vật.....	32
1.3 Một số nghiên cứu ở nước ngoài và trong nước về biến nạp gen <i>HBsAg</i> tạo kháng nguyên HBsAg trên thực vật	32
1.3.1 Nghiên cứu ở nước ngoài	32
1.3.1.1 Trên cây cà chua (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	33

1.3.1.2 Trên các cây trồng khác	33
1.3.2 Nghiên cứu trong nước về chuyển gen <i>HBsAg</i>	36
1.4 Các công trình chuyển gen khác trên cây cà chua	36
1.5 Cấu trúc vector dùng trong biến nạp gen trên đối tượng cà chua	42
1.6 Một số yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả biến nạp gen dùng <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ở cây cà chua	44
1.6.1 Dòng (strain) <i>A. tumefaciens</i>	44
1.6.2 Tuổi của mẫu	44
1.6.3 Loại mẫu	45
1.6.4 Môi trường tiền nuôi cấy	45
1.6.5 Môi trường tái sinh	45
1.6.6 Thời gian nhiễm khuẩn	46
1.6.7 Mật độ vi khuẩn	46
1.6.8 Đồng nuôi cấy	46
1.6.9 Phân tử tín hiệu	47
1.6.10 Giai đoạn tiền chọn lọc	47
1.6.11 Nồng độ kháng sinh cefotaxime	47
1.6.12 Ảnh hưởng của promoter lên sự biểu hiện GUS	47
1.7 Chuyển gen gián tiếp nhờ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	47
1.7.1 Ưu điểm của phương pháp chuyển gen nhờ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	47
1.7.2 Cơ chế xâm nhập của <i>Agrobacterium tumefaciens</i> vào tế bào thực vật	48
1.7.2.1 Hình thành một mobile T- DNA copy, T- strand	49
1.7.2.2 Cơ chế di chuyển phức hợp T	50
1.7.2.3 Sự gắn T-DNA	51
1.8 Một số phương pháp tạo thực vật chuyển gen an toàn sinh học không có gen chọn lọc (marker-free)	51
Chương 2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu	53
2.1 Nội dung nghiên cứu	54
2.2 Vật liệu nghiên cứu	54

2.2.1 Vật liệu thực vật	54
2.2.2 Vi khuẩn	54
2.2.3 Plasmid	55
2.2.3.1 Tạo dòng <i>E. coli</i> mang plasmid pITB-HBsAg.....	56
2.2.3.2 Biến nạp plasmid pITB-HBsAg vào <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404.....	56
2.3 Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	56
2.4 Phương pháp nghiên cứu.....	56
2.4.1 Khảo sát ảnh hưởng của BA, IAA lên sự tái sinh chồi <i>in vitro</i> từ lá mầm và ảnh hưởng của kháng sinh kanamycin lên lá mầm, cây con <i>in vitro</i>	56
2.4.1.1 Khảo sát ảnh hưởng của BA, IAA lên sự tái sinh chồi <i>in vitro</i> từ lá mầm ...	56
2.4.1.2 Ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh kanamycin lên lá mầm, cây con <i>in vitro</i>	58
2.4.2 Xây dựng quy trình biến nạp gen vào lá mầm cây cà chua TN412 bằng phương pháp dùng vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	59
2.4.3 Kiểm tra sự hiện diện của các gen biến nạp và sự biểu hiện của chúng bằng phương pháp hóa mô tế bào, sinh học định tính và hóa sinh	61
2.4.3.1 Kiểm tra sự biểu hiện định tính của gen kháng kanamycin <i>nptII</i>	61
2.4.3.2 Kiểm tra sự hiện diện của các gen <i>nptII</i> , <i>HBsAg</i> bằng kỹ thuật PCR.....	61
2.4.3.3 Giải trình tự sản phẩm PCR gen <i>HBsAg</i> của cây cà chua chuyển gen	62
2.4.3.4 Đánh giá cây cà chua chuyển gen <i>HBsAg</i> trong điều kiện vườn ươm ở thế hệ T ₀	62
2.4.3.5 Kiểm tra sự hiện diện và biểu hiện của gen <i>gusA</i> bằng kỹ thuật hóa mô	63
2.4.3.6 Phân tích Southern blot các dòng cà chua chuyển gen <i>HBsAg</i>	64
2.4.3.7 Kiểm tra nhanh sự hiện diện của protein HBsAg ở quả cây T ₀ bằng que thử đặc hiệu	67
2.4.3.8 Phân tích protein tổng số dùng điện di trên gel polyacrylamide (SDS-PAGE) (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis).....	68
2.4.3.9 Phân tích Western blot các dòng cà chua chuyển gen <i>HBsAg</i>	71

2.4.3.10 Kiểm tra hàm lượng protein HBsAg bằng phương pháp ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)	73
2.4.4 Kiểm tra sự di truyền của gen chọn lọc <i>nptII</i> và gen chuyển mục tiêu <i>HBsAg</i> ở thế hệ T_1 bằng phương pháp sinh học định tính và PCR	75
2.4.4.1 Kiểm tra khả năng kháng kháng sinh kanamycin của một số cây con thế hệ T_1 bằng phương pháp sinh học định tính	75
2.4.4.2 Kiểm tra sự hiện diện của gen <i>nptII</i> , gen <i>HBsAg</i> bằng kỹ thuật PCR và tỷ lệ phân ly của gen <i>nptII</i> và gen <i>HBsAg</i> ở thế hệ T_1	76
2.5 Phương pháp xử lý số liệu.....	76
Chương 3 Kết quả và thảo luận	77
3.1 Khảo sát ảnh hưởng của BA, IAA lên sự tái sinh chồi <i>in vitro</i> từ lá mầm và ảnh hưởng của kháng sinh kanamycin lên lá mầm, cây con <i>in vitro</i>	77
3.1.1 Ảnh hưởng của BA, IAA lên sự tái sinh chồi <i>in vitro</i> từ lá mầm	77
3.1.2 Ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh kanamycin lên lá mầm, cây con	80
3.1.2.1 Ảnh hưởng của nồng độ kanamycin lên sự tái sinh của mẫu lá mầm	80
3.1.2.2 Ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh kanamycin lên sự sinh trưởng của cây con	81
3.2 Xây dựng quy trình biến nạp gen vào lá mầm cây cà chua TN412 bằng phương pháp dùng vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	84
3.3 Kiểm tra sự hiện diện của các gen biến nạp và sự biểu hiện của chúng bằng phương pháp hóa mô tế bào, sinh học định tính, hóa sinh.....	91
3.3.1 Kiểm tra sự biểu hiện định tính của gen kháng kanamycin <i>nptII</i>	91
3.3.2 Kiểm tra sự hiện diện của các gen <i>nptII</i> , <i>HBsAg</i> bằng kỹ thuật PCR.....	92
3.3.2.1 Kiểm tra PCR gen kháng kanamycin <i>nptII</i>	92
3.3.2.2 Kiểm tra PCR gen <i>HBsAg</i>	92
3.3.3 Giải trình tự sản phẩm PCR gen <i>HBsAg</i> của cây cà chua chuyển gen	94
3.3.4 Đánh giá cây cà chua chuyển gen <i>HBsAg</i> trong điều kiện vườn ươm ở thế hệ T_0	94
3.3.5 Kiểm tra sự hiện diện và biểu hiện của gen <i>gusA</i> bằng kỹ thuật hóa mô	98

3.3.6 Phân tích Southern blot các dòng cà chua chuyển gen <i>HBsAg</i>	99
3.3.6.1 Tạo mẫu dò lai DNA	99
3.3.6.2 Lai DNA.....	100
3.3.7 Kiểm tra nhanh sự hiện diện của protein HBsAg ở quả cây T ₀ bằng que thử đặc hiệu	102
3.3.8 Phân tích protein tổng số dùng điện di trên gel polyacrylamide (SDS-PAGE)...	103
3.3.9 Phân tích Western blot các dòng cà chua chuyển gen <i>HBsAg</i>	106
3.3.10 Kiểm tra hàm lượng protein HBsAg bằng phương pháp ELISA.....	107
3.4 Kiểm tra sự di truyền của gen chọn lọc <i>nptII</i> và gen chuyển mục tiêu <i>HBsAg</i> ở thế hệ T ₁ bằng phương pháp sinh học định tính và kỹ thuật PCR	110
3.4.1 Đánh giá khả năng kháng kháng sinh kanamycin của một số cây con thế hệ sau bằng phương pháp định tính	110
3.4.2 Phương pháp PCR.....	113
Kết luận và đề nghị	115
Kết luận	115
Đề nghị	116
Danh mục công trình.....	117
Tài liệu tham khảo.....	118
Phụ lục.....	140

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1 Cấu trúc không gian của virus HBV	24
Hình 1.2 Cấu trúc bộ gen của virus HBV	26
Hình 1.3 Ba vùng của gen S (S, <i>pre-S1</i> , <i>pre-S2</i>) và các protein được các gen này mã hóa	29
Hình 1.4 Cấu trúc gen S và kháng nguyên bề mặt (HBsAg)	29
Hình 1.5 Sơ đồ sản xuất vaccine ăn được từ thực vật trên cơ sở xây dựng hệ thống biểu vi ở virus gây nhiễm thực vật và biến nạp di truyền nhờ vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> /bản gen.....	32
Hình 1.6 Cấu trúc gen <i>PDS</i> ở cà chua	43
Hình 1.7 Cơ chế xâm nhập của T-DNA <i>Agrobacterium tumefaciens</i> vào tế bào thực vật	50
Hình 1.8 Các phương pháp tạo cây trồng biến đổi gen không có gen đánh dấu	52
Hình 2.1 Các bước thí nghiệm về biến nạp tạo cây chuyển gen và minh chứng về sự di truyền của gen chuyển.....	53
Hình 2.2 Cấu trúc plasmid pITB-HBsAg.....	55
Hình 2.3 Mẫu lá mầm cà chua <i>in vitro</i> được sử dụng làm nguyên liệu tái sinh chồi	57
Hình 2.4 Sơ đồ đoạn DNA sau khi xử lý bằng enzyme giới hạn <i>NcoI</i>	66
Hình 3.1 Chồi tái sinh từ mẫu lá mầm cà chua trên các môi trường khảo sát có bổ sung nồng độ BA từ 1,25 mg/L đến 2,5 mg/L ở 42 NSC	79
Hình 3.2 Mẫu lá mầm được nuôi cấy trên môi trường tái sinh có nồng độ kháng sinh kanamycin khác nhau ở 28 NSC	81
Hình 3.3 Mẫu cây nuôi cấy trên môi trường có nồng độ kháng sinh kanamycin khác nhau ở 60 NSC	82
Hình 3.4 Mẫu lá mầm ở chu kỳ chọn lọc lần thứ 1 trên môi trường có kanamycin 50 mg/L	84
Hình 3.5 Mẫu lá mầm sống sót trên môi trường có kháng sinh kanamycin 50 mg/L hình thành mô sẹo, tái sinh chồi sau 4 lần cấy chuyển sang môi trường chọn lọc ...	87

Hình 3.6 Trình tự đoạn T-DNA hợp nhất vào bộ gen cây	88
Hình 3.7 Tóm tắt quy trình biến nạp gen <i>HBsAg</i> vào lá mầm giống cà chua TN412 nhờ vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	89
Hình 3.8 Sơ đồ biến nạp gen <i>HBsAg</i> vào lá mầm giống cà chua TN412 nhờ vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	90
Hình 3.9 Mẫu lá thật cây T ₀ tái sinh trên môi trường chứa kháng sinh kanamycin 100 mg/L ở 60 ngày sau cấy chọn lọc.....	91
Hình 3.10 Kết quả điện di sản phẩm PCR của gen <i>nptII</i> ở cây cà chua chuyển gen	92
Hình 3.11 Kết quả điện di sản phẩm PCR của gen <i>HBsAg</i> ở cây cà chua chuyển gen	93
Hình 3.12 Ba dòng cây cà chua chuyển gen T ₀ ở giai đoạn <i>in vitro</i> và giai đoạn tăng trưởng <i>ex vitro</i>	96
Hình 3.13 Ba dòng cây cà chua chuyển gen T ₀ giai đoạn ra hoa, kết quả <i>ex vitro</i>	97
Hình 3.14 Biểu hiện GUS ở một số loại mô của cây cà chua TN412 chuyển gen ...	99
Hình 3.15 Kết quả điện di sản phẩm PCR gen <i>HBsAg</i> nhằm thu mẫu tạo probe ...	100
Hình 3.16 Kết quả điện di gel agarose các mẫu DNA sau cắt bằng enzyme giới hạn phục vụ phân tích Southern blot.....	101
Hình 3.17 Kết quả phân tích Southern blot các dòng cà chua chuyển gen.....	102
Hình 3.18 Kết quả phát hiện nhanh protein <i>HBsAg</i> ở lá và quả cà chua cây T ₀ ...	103
Hình 3.19 Kết quả điện di SDS-PAGE protein các dòng cà chua chuyển gen <i>HBsAg</i>	104
Hình 3.20 Kết quả phân tích Western blot dương tính đối với các dòng cà chua chuyển gen.....	107
Hình 3.21 Sự ức chế nảy mầm của kháng sinh kanamycin trên hạt cà chua không chuyển gen ở 7 NSC	111
Hình 3.22 Sự nảy mầm của hạt cà chua chuyển gen thế hệ T ₀ trên môi trường ½ MS có bổ sung kanamycin 100 mg/L ở 7 NSC	112

Hình 3.23 Cây con từ hạt cà chua chuyển gen <i>HBsAg</i> kháng kanamycin 100 mg/L trồng ở vườn ươm ở 30 NSC.....	113
Hình 3.24 Kết quả kiểm tra PCR gen kháng kanamycin <i>nptII</i> và gen <i>HBsAg</i> ở một số cá thể cây con cà chua thế hệ T_1 của dòng CC1	113

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1 Mối liên quan giữa kiểu huyết thanh (serotype) và kiểu gen (genotype).....	25
Bảng 1.2 Những công trình tạo vaccine ăn được ở cà chua giúp ngăn ngừa một số bệnh	37
Bảng 1.3 Những nghiên cứu chuyển gen ở cà chua cải thiện khả năng kháng bệnh và chống chịu với môi trường bất lợi.....	38
Bảng 1.4 Những công trình chuyển gen ở cà chua gia tăng tính chịu đựng stress phi sinh học	39
Bảng 2.1 Thành phần của resolving gel và stacking gel.....	70
Bảng 3.1 Ảnh hưởng của nồng độ BA lên sự tái sinh chồi từ lá mầm cà chua ở 42 ngày sau cấy (NSC).....	78
Bảng 3.2 Ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh kanamycin lên khả năng tái sinh của lá mầm cà chua và sự sinh trưởng của cây con cà chua.....	82
Bảng 3.3 Tổng số nhánh lá, số hoa, số quả và chiều cao của cây cà chua không chuyển gen (ĐC) và cây cà chua chuyển gen của các dòng CC1, CC2, CC3	95
Bảng 3.4 Hàm lượng protein tổng số của quả các dòng cà chua chuyển gen <i>HBsAg</i>	104
Bảng 3.5 Khoảng cách di chuyển các băng protein trên bản gel của các mẫu khảo sát	105
Bảng 3.6 Trọng lượng phân tử các băng protein ở các mẫu đối chứng và chuyển gen <i>HBsAg</i>	106
Bảng 3.7 Tương quan giữa giá trị OD và các nồng độ protein <i>HBsAg</i> (BF 6015 - Aalto Bio) dùng làm đường chuẩn	108
Bảng 3.8 Hàm lượng và tỷ lệ protein kháng nguyên <i>HBsAg</i> trên protein tổng số trong những mẫu khảo sát.....	108

Bảng 3.9 Kết quả thử nghiệm khả năng kháng kháng sinh của hạt từ quả cà chua chín chuyển gen <i>HBsAg</i> thể hệ T_0 trên môi trường nảy mầm $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung kanamycin 100 mg/L ở 7 NSC	111
---	-----

DANH MỤC CÁC KÝ TỰ VIẾT TẮT

APS	Ammonium persulfate
BA	Benzyl Adenine
bp	Base pairs
BSA	Bovine Serum Albumin
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxyribonucleotide triphosphates
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
HBV	Hepatitis B virus
HBsAg	Hepatitis B surface antigen
HRP	Horseradish peroxidase
IAA	Indole-3-acetic acid
kDa	Kilo Dalton
MS	Murashige and Skoog
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBST	Phosphate Buffer Saline Tween 20
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDS	Phytoene desaturase
pNPP	p-Nitrophenyl Phosphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	Tris Buffered Saline Tween 20

TÓM TẮT

TẠO CÂY CÀ CHUA MANG GEN *HBsAg* BẰNG PHƯƠNG PHÁP

BIẾN NẠP GEN DÙNG VI KHUẨN *Agrobacterium tumefaciens*

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng Công nghệ Gen, Viện Sinh học Nhiệt đới – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và tại Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh. Mục tiêu của luận án là tạo cây cà chua mang gen *HBsAg* mã hóa protein kháng nguyên *HBsAg* phục vụ hướng nghiên cứu tạo vaccine ăn được phòng ngừa bệnh viêm gan siêu vi B trong tương lai. Một hệ thống các nội dung nghiên cứu và phương pháp nghiên cứu phù hợp (nuôi cấy mô, chuyển gen, sinh hóa, sinh học phân tử) đã được triển khai thực hiện nhằm đạt mục tiêu nói trên. Kết quả được tóm tắt dưới đây:

Đã xây dựng hoàn thiện hệ thống tái sinh chồi từ lá mầm 7 ngày tuổi nuôi cấy *in vitro* cho giống cà chua TN412 làm tiền đề cho nghiên cứu biến nạp gen. Tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất, số lượng chồi trên mẫu nhiều nhất được ghi nhận trên môi trường khoáng MS (vitamin B5) có bổ sung BA 2,0 mg/L và IAA 0,5 mg/L. Đã xác định được nồng độ tối thiểu của kháng sinh kanamycin ảnh hưởng đến tái sinh chồi/ gây chết lá mầm và sự sinh trưởng/ gây chết cây con nuôi cấy *in vitro* là 50 mg/L.

Đã xây dựng hoàn chỉnh quy trình biến nạp gen *HBsAg* vào lá mầm nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chứa plasmid pITB-*HBsAg* [gen *HBsAg* được điều khiển bởi promoter *PDS* (phytoene desaturase) tạo biểu hiện đặc trưng ở quả và promoter *T7*] với kết quả tạo được 03 dòng cây chuyển gen. Các bước cơ bản của quy trình bao gồm giai đoạn tiền nuôi cấy lá mầm trên môi trường tái sinh trong 2 ngày; gây nhiễm lá mầm với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 trong 20 phút; nuôi chung lá mầm với vi khuẩn trong 2 ngày; chọn lọc, tái sinh chồi chuyển gen từ lá mầm nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 50 mg/L kanamycin.

Đã kiểm tra sự hiện diện, biểu hiện của gen chuyển ở thể chuyển gen T_0 bằng kỹ thuật PCR, giải trình tự đoạn gen, Southern blot, phương pháp hóa mô tế bào

(GUS assay), sinh học định tính, hóa sinh (ELISA) và Western blot. Protein HBsAg chiếm 0,11% trên tổng số protein hòa tan của quả.

Bằng phương pháp sinh học định tính qua kiểm tra khả năng kháng kháng sinh kanamycin 50 – 100 mg/L và bằng kỹ thuật PCR đã xác định được sự di truyền của gen chọn lọc *nptII* và gen chuyển mục tiêu *HBsAg* ở thế hệ T_1 . Kết quả cũng cho thấy sự phân ly di truyền hai gen nói trên cơ bản phù hợp quy luật Mendel với tỷ lệ 3:1.

Đây là nghiên cứu đầu tiên đề cập tạo cây cà chua mang gen *HBsAg* được điều khiển bởi hai promoter *PDS* (phytoene desaturase) và promoter *T7*. Quy trình chuyển gen ở giống cà chua TN412 có thể được áp dụng trên các giống cà chua khác.

ABSTRACT

PRODUCTION OF TRANSGENIC TOMATO PLANTS CONTAINING *HBsAg* GENE BY *Agrobacterium tumefaciens*

The study was carried out at the Plant Genetic Engineering Laboratory, Institute of Tropical Biology – Vietnam Academy of Science and Technology and the Nong Lam University - Ho Chi Minh City. The objective of this study is to produce transgenic tomato plants containing the *HBsAg* target gene encoding HBsAg antigen with the hope that edible vaccine could be applied for preventing the Hepatitis B virus in the future. A system of research contents and the appropriate methods (tissue culture, genetic transformation, biochemistry, molecular biology) were established in order to get this objective. The results were as follows:

The improved protocol of *in vitro* plant regeneration from 7-day old cotyledons of the TN412 tomato cultivar through culturing them on the MS medium (with B5 vitamins) containing BA and IAA was carried out. The MS medium supplemented with BA (2 mg/L) and IAA (0.5 mg/L) was the most suitable medium for plant regeneration. The kanamycin at the minimal lethal/ inhibitory dose of cotyledon and *in vitro* young plant was also identified (50 mg/L). These protocols were used as basis for the genetic transformation study.

The protocol for genetic transformation via LBA 4404 *Agrobacterium tumefaciens* was established. This strain contains the plasmid pITB-HBsAg harbouring *HBsAg* gene [driven by the *PDS* (phytoene desaturase) fruit-specific promoter and the *T7* promoter], *nptII* kanamycin resistance gene (*CaMV35S* promoter) and *gusA* reporter gene (also driven by the *PDS* and the *T7* promoters). The protocol was composed of the pre-culture of cotyledons on the regeneration medium for 2 days, infection of cotyledons with the *Agrobacterium tumefaciens* for 20 minutes, co-cultivation for 2 days, regeneration of the putative transgenic shoots

on the above regeneration medium with kanamycin (50 mg/L). Through this step-by-step transformation protocol, three transgenic plant lines were obtained.

The presence and the expression of the transgenes in individuals of T₀ generation were confirmed by PCR analyses, sequencing part of the expected *HBsAg* gene, Southern blot, GUS assay, qualitative biology method, ELISA and Western blot. HBsAg antigen level was 0.11% of the total fruit soluble protein.

The kanamycin assay (50 – 100 mg/L) and the PCR technique were used for the inheritance analysis of the *nptII* and the *HBsAg* genes in T₁ generation. The results showed that the inheritance of these genes conform to the expected Mendelian segregation ratio 3:1.

This is the first report on the production of transgenic tomato plants containing the *HBsAg* gene driven both by the *PDS* (phytoene desaturase) promoter and the *T7* promoter. The transformation protocol on TN412 tomato cultivar could be used in the genetic transformation of the other tomato cultivars.

MỞ ĐẦU

Luận án “Tạo cây cà chua mang gen *HBsAg* bằng phương pháp biến nạp gen dùng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*” được thực hiện tại phòng Công nghệ Gen, Phòng Thí nghiệm Trọng điểm phía Nam về Công nghệ Tế bào Thực vật - Viện Sinh học Nhiệt đới.

Tính cấp thiết của luận án

Theo WHO (năm 2010), viêm gan siêu vi B là bệnh về gan thường gặp, nằm trong danh mục mười bệnh dịch gây tử vong cao nhất trên thế giới, số người từng nhiễm virus viêm gan B (Hepatitis B virus) cao, khoảng 2 tỷ người. Ở nước ta, tỷ lệ người mang mầm bệnh viêm gan siêu vi B khá cao, chiếm khoảng 15 - 20% dân số (hơn 12 triệu người). Tình trạng nhiễm này đã gây ra nhiều hậu quả nghiêm trọng. Bệnh này lây lan theo nhiều con đường, trường hợp bệnh mãn tính có thể dẫn đến xơ gan và ung thư gan, thời gian chữa trị kéo dài, hơn nữa chi phí điều trị còn rất cao [5, 6]. Cách tốt nhất là phòng ngừa và một trong các biện pháp phòng ngừa quan trọng là chủng ngừa. Tuy nhiên, chi phí cho chủng ngừa bệnh khá cao nếu tuân thủ theo phác đồ điều trị tiêu chuẩn.

Để tạo điều kiện thuận lợi cho phục vụ tiêm chủng vaccine mở rộng đối với người dân ở các nước nghèo và các nước đang phát triển, các nhà khoa học nhiều nước (Mỹ, Cuba, Đức, Hàn Quốc, Trung Quốc, Tây Ban Nha) đã sản xuất thử nghiệm vaccine tái tổ hợp từ cây trồng chuyển gen. Hướng nghiên cứu sản xuất vaccine này được xem là hướng có tiềm năng vô cùng lớn. Giá thành sản phẩm sẽ thấp hơn rất nhiều so với giá thành các sản phẩm hiện dùng. Vì có thể sản xuất ở quy mô lớn, đơn giản trong khâu tổ chức sản xuất, vận chuyển và bảo quản nguồn vaccine, sản phẩm không chứa các virus gây bệnh cho người [77, 97, 105, 137, 157, 164, 167].

Protein kháng nguyên bề mặt HBsAg, từ gen S của virus viêm gan B (HBV) là thành phần rất quan trọng giúp cho HBV bám dính vào màng tế bào, sau đó đi vào tế bào và huyết tương cá thể bệnh. Huyết tương có chứa HBsAg là nguồn vật

liệu quan trọng để sản xuất thuốc chủng ngừa (ngoài huyết tương, vaccine này còn được sản xuất từ nấm men, tế bào động vật hữu nhũ [36]).

Trên thế giới đã có một số công bố khoa học liên quan đến nghiên cứu chuyển nạp gen *HBsAg* (gen *S*) vào một số cây trồng (thuốc lá, khoai tây, cà chua, chuối), sản xuất sinh khối mô tế bào cây chuyển gen, chiết tách protein tinh khiết và nghiên cứu khả năng đáp ứng miễn dịch ở cơ thể động vật qua tiêm kích protein tinh khiết hoặc/và ăn trực tiếp sản phẩm cây chuyển gen. Một số nghiên cứu nêu trên cho thấy protein kháng nguyên *HBsAg* sử dụng qua đường tiêu hoá có khả năng tạo đáp ứng miễn dịch tốt - mở ra triển vọng nghiên cứu chuyển nạp gen này vào các cây trồng có bộ phận ăn tươi được như quả, lá, thân, củ.

Đối tượng cây trồng được sử dụng trong nghiên cứu này là cà chua. Cà chua là một trong những cây rau quan trọng, được tiêu thụ nhiều [153], có khả năng phát triển rộng khắp thế giới, hơn 60 triệu tấn cà chua được sản xuất mỗi năm. Cà chua cung cấp nhiều vitamin và khoáng chất có lợi cho sức khỏe của con người như sắc tố lycopene và β -carotene. Những chất chống oxi hóa mạnh này làm chậm sự lão hóa, ngăn chặn tế bào ung thư, chống sự hình thành cục máu đông trong thành mạch, ngăn tích lũy cholesterol, phòng ngừa các tai biến của bệnh tim mạch, bệnh béo phì. Cà chua đã đóng góp nhiều cho những tiến bộ trong công nghệ sinh học thực vật vì có chu kỳ sống tương đối ngắn, có thể trồng trong nhà kính [120], có khả năng biến nạp cao [15] và có những đặc điểm phù hợp để sản xuất các chế phẩm được sinh học, sản xuất vaccine ăn được.

Vì vậy, luận án này hướng tới tạo cây cà chua mang và biểu hiện gen *HBsAg*, là kết quả tiền đề phục vụ hướng nghiên cứu trên thế giới hiện nay về tạo protein tái tổ hợp *HBsAg* ở quả cà chua chuyển gen như là “vaccine ăn được” để phòng ngừa bệnh viêm gan siêu vi B.

Mục tiêu của luận án

Tạo được cây cà chua bi TN412 mang gen *HBsAg* bằng phương pháp biến nạp gen dùng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

Yêu cầu của luận án

- Hoàn thiện hệ thống tái sinh chồi *in vitro* từ lá mầm và xác định được nồng độ tối thiểu của kháng sinh kanamycin gây chết lá mầm, cây con cà chua giống TN412 làm tiền đề cho nghiên cứu biến nạp gen.

- Xác định được sự hiện diện, biểu hiện của các gen chuyển ở cây thế hệ T_0 bằng kỹ thuật PCR, giải trình tự đoạn gen và Southern blot, phương pháp hóa mô tế bào, sinh học định tính, hóa sinh và Western blot.

- Xác định được sự di truyền của gen chọn lọc *nptII* và gen chuyển mục tiêu *HBsAg* ở thế hệ T_1 bằng phương pháp sinh học định tính và kỹ thuật PCR.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

Ý nghĩa khoa học: Xác định sự hợp nhất và biểu hiện của gen *HBsAg*, qua điều khiển bởi promoter *T7* - có nguồn gốc từ thực khuẩn thể kết hợp với promoter *PDS* (Phytoene desaturase), ở cây/quả cà chua chuyển gen nhận được thông qua biến nạp gen bằng phương pháp dùng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

Ý nghĩa thực tiễn: Cây cà chua mang gen mã hóa protein kháng nguyên *HBsAg* tạo tiền đề cho nhân giống quy mô lớn phục vụ hướng nghiên cứu tạo “vaccine ăn được” phòng ngừa bệnh viêm gan B.

Tính mới của luận án

Dựa trên các nghiên cứu trước đây về tạo cây cà chua mang gen *HBsAg*, kết quả nghiên cứu nhận được ở đề tài này có tính mới là: Lần đầu tiên tạo được một số dòng cây cà chua TN412 (giống thương mại) mang và biểu hiện gen *HBsAg*, được điều khiển bởi hai promoter *T7* và promoter *PDS*, với kết quả làm tăng sự biểu hiện chuyên biệt protein kháng nguyên *HBsAg* ở quả cà chua.

Giới hạn của luận án

Do gen chỉ thị *gusA* được thiết kế không tạo biểu hiện sớm (dùng như một chỉ thị nhanh), chỉ tạo biểu hiện ở giai đoạn quả nên ở luận án không tiến hành khảo sát chi tiết ảnh hưởng của một số yếu tố đến tần số biến nạp gen như hợp chất phenol acetosyringone, thời gian nuôi chung mô lá mầm với vi khuẩn.

Vì giới hạn về thời gian nên nghiên cứu dừng lại ở giai đoạn kiểm tra sự di truyền của gen mục tiêu (*HBsAg*) ở các cá thể thể hệ T_1 bằng phương pháp sinh học định tính và kỹ thuật PCR. Chưa khảo sát ảnh hưởng của protein *HBsAg* lên khả năng tạo đáp ứng miễn dịch.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Tổng quan về cây cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

1.1.1 Nguồn gốc và phân loại

Cà chua thuộc họ cà Solanaceae, chi *Lycopersicon* (hầu hết các thành viên trong họ có cùng số nhiễm sắc thể là 12) [53], cà chua cùng họ với nhiều loại cây có giá trị kinh tế khác như: khoai tây, thuốc lá, ớt. Trong đó, cà chua có bộ gen đơn bội có kích thước nhỏ nhất là 950 Mb [53].

Chi *Lycopersicon* gồm 12 loài, có 2 chi phụ: chi phụ *Eriopericon* (quả luôn có màu xanh, có sọc tía, có lông, hạt nhỏ) và chi phụ *Eulycopersicon* (quả chín đỏ hoặc vàng, hoa to). Chi phụ thứ hai có 2 loài: *L. esculentum* - là loài cà chua trồng phổ biến và *L. pimpinellifolium* - là loài cà chua bán hoang dại. Loài cà chua *Lycopersicon esculentum* Mill. là loài lớn nhất, các biến chủng và giống của loài này có khả năng thích nghi rộng nên chúng được trồng rộng rãi ở nhiều nơi trên thế giới [129].

Cây cà chua có nguồn gốc ở vùng trung và nam Châu Mỹ. Mêxicô là nước đầu tiên trồng loài cây này. Từ Châu Mỹ, cà chua được các thương gia Bồ Đào Nha và Tây Ban Nha chuyển sang trồng ở Châu Âu và Châu Á [129, 130]. Sau đó, từ Châu Âu, cà chua được chuyển sang Châu Phi nhờ những người thực dân đi khai phá lục địa này. Trước kia, cà chua được cho rằng là cây có độc tố do chúng cùng họ với cây cà độc dược, vì có màu sắc quả đẹp nên cà chua đã được trồng như cây cảnh. Mãi đến năm 1750, cà chua mới được dùng làm thực phẩm ở Anh. Cuối thế kỉ thứ XVIII, cà chua mới bắt đầu được trồng ở các nước thuộc Liên Xô cũ. Ở Mỹ, cà chua được nhập vào từ những năm 1860 và cùng thời gian này cà chua cũng được phát triển ở Pháp. Một số nhà nghiên cứu cho rằng cà chua được du nhập vào Việt Nam từ thời gian thực dân Pháp chiếm đóng [130].

1.1.2 Ý nghĩa kinh tế của cây cà chua

Cà chua là loại cây trồng có giá trị kinh tế cao được trồng rộng rãi trên thế giới. Theo số liệu thống kê của FAO năm 2014 thì diện tích và sản lượng cà chua trên thế giới là 4,83 triệu ha và 162 triệu tấn [32]. Châu Á là khu vực đứng đầu về sản xuất cà chua, thứ đến là châu Âu. Mỹ là nước đứng đầu cả về năng suất và diện tích gieo trồng. Trên thế giới, cà chua được sản xuất đứng thứ hai, sau khoai tây. Trung Quốc có diện tích trồng cà chua lớn nhất thế giới (trên 753 ngàn ha), tiếp theo là Ấn Độ (365 ngàn ha), Anh (300 ngàn ha), Ai Cập (180 ngàn ha), Mỹ (170 ngàn ha) và Anh (140 ngàn ha).

Về năng suất (tấn/ha) đạt cao nhất phải kể đến Mỹ (66,5), tiếp theo là Hà Lan (42,85), Anh (37,76), Ai Cập (35,5), Bỉ (33,33), Trung Quốc (25,62) [4, 9]. Châu Á có diện tích trồng lớn nhưng năng suất còn thấp (23,8 tạ/ha). Năng suất cà chua toàn thế giới khoảng 27,51 tấn/ha. Ở Việt Nam, cà chua được trồng trên 100 năm nay, diện tích trồng trượt hàng năm từ 15 – 17 ngàn ha, sản lượng đạt 280 ngàn tấn, bình quân đầu người 3 kg/năm, mức tiêu thụ cà chua của người Việt Nam hiện nay chỉ bằng 1/5 của người Trung Quốc (16 kg/người/năm) [4, 9]. Cà chua được tiêu thụ lớn nhất ở châu Âu, rồi đến châu Á, Bắc Mỹ và Nam Mỹ.

Cà chua có thể dùng làm quả tươi, xào, nấu, nước giải khát. Cà chua còn là nguyên liệu chế biến thành nhiều sản phẩm như cà chua cô đặc, nước quả, nước sốt, tương cà chua, tương ớt, cà chua đóng hộp.

1.1.3 Dinh dưỡng trong quả cà chua

Cà chua là cây rau ăn quả giàu vitamin, carotene, amino acid, đường và muối khoáng [133, 153]. Theo số liệu của Viện Dinh Dưỡng năm 2007 (bảng phân tích thành phần hóa học của Viện vệ sinh dịch tễ Bộ Y tế), trong 100 g cà chua có 94 g nước, 0,6 g protein, 4,2 g đường, 0,8 g chất xơ, 0,4 g tro, 12 mg canxi, 26 mg photpho, 1,4 mg sắt, các loại vitamin β -carotene (393 μ g/ 100 g), vitamin B1, B2, PP, C (40 mg/ 100 g), vitamin K (7,9 μ g/ 100 g) cung cấp được 20 kcal. Các vitamin, chất khoáng dễ hấp thu giúp cơ thể tăng cường khả năng miễn dịch, phòng chống nhiễm trùng.

Các vitamin trong quả cà chua không bị mất đi trong quá trình chế biến, nấu nướng [119]. Trung bình khi tiêu thụ 230 g cà chua sẽ đáp ứng được 60% nhu cầu hằng ngày về vitamin C đối với người trưởng thành và 85% đối với trẻ em. Hoặc khi tiêu thụ 100 ml nước ép cà chua sẽ đáp ứng được 20% nhu cầu hằng ngày về vitamin A. Cà chua có tác dụng kích thích tiết ra nước bọt, để trợ giúp cho quá trình tiêu hóa của cơ thể được dễ dàng. Tiêu thụ cà chua và những sản phẩm cà chua có thể giảm đáng kể nguy cơ phát triển ung thư ruột, trực tràng và dạ dày [136].

Một số công trình nghiên cứu đã cho thấy, cà chua có tác dụng giảm nguy cơ mắc một số bệnh ung thư [54], giảm nguy cơ ung thư vú, ung thư đại tràng, ung thư vòm họng, đặc biệt là ung thư tiền liệt tuyến ở nam giới [84]. Vì cà chua có chứa lycopene (3.025 $\mu\text{g}/100\text{g}$) và β -carotene - đây là chất có tác dụng chống ôxy hóa rất quan trọng [92], ngăn chặn tế bào ung thư, chống sự hình thành cục máu đông trong thành mạch. Một cuộc khảo sát của các nhà khoa học Đan Mạch trên 220 người đàn ông có tiền sử về bệnh tim mạch và những người đàn ông khỏe mạnh cho thấy, những người có hàm lượng lycopene trong cơ thể cao sẽ ít có nguy cơ mắc các bệnh về tim mạch [86].

Các chất ôxy hóa mạnh được sinh ra qua hoạt động trao đổi chất, chế độ sinh hoạt và chế độ ăn uống sẽ phản ứng với các thành phần của tế bào như lipid, protein, DNA và gây hư hỏng nó. Những hư hỏng này thể hiện vai trò quan trọng trong việc gây ra các bệnh mãn tính [62, 116]. Vì vậy, chế độ ăn giàu trái cây, rau (gồm cà chua) chứa các chất chống ôxy hóa như vitamin E, vitamin C, carotenoid và polyphenol giúp chống ung thư, chống vữa động mạch, giảm nguy cơ mắc bệnh mãn tính [48, 54, 63, 131, 155].

Một số nghiên cứu khoa học cũng đã chứng minh, cà chua có tác dụng giảm huyết áp, giảm lượng cholesterol trong máu, từ đó sẽ ngăn chặn được tình trạng xơ vữa động mạch và các nguy cơ dẫn tới đột quỵ.

Theo y học cổ truyền, ăn cà chua còn có tác dụng mát máu, ổn định gan, giải nhiệt, giải độc, rất thích hợp cho những người bị chảy máu chân răng, người bị cao huyết áp, người có cơ thể nóng nhiệt. Cà chua có tác dụng nâng cao sức khỏe,

phòng ngừa bệnh tật có lợi cho sức khỏe của mọi lứa tuổi. Vì vậy, trong chế độ ăn uống hàng ngày bạn nên sử dụng đều đặn cà chua để chế biến nhiều dạng món ăn.

1.1.4 Nghiên cứu về di truyền cây cà chua

Daniell và cs. (2006) đã cơ bản hoàn thành nghiên cứu giải mã toàn bộ bộ gen lục lạp các loài *Solanum bulbocastanum*, *Solanum lycopersicum* (cà chua) trong đó có phân tích, so sánh trình tự gen hai loài nói trên với một số loài khác cùng trong họ Cà (Solanaceae). Kết quả này là cơ sở giúp các nhà nghiên cứu có thể thiết kế trình tự DNA vùng giáp ranh (flanking region) tương đồng với gen lục lạp ở hai đầu của gen chuyển để chuyển gen vào lục lạp cà chua.

Gần đây, trình tự bộ gen cà chua lai “Heinz 1706” được giải mã, những trình tự này được tập hợp lại thành 91 khung đọc mở, bao gồm 760 megabases (Mb) của gần 900 Mb bộ gen, được xếp ở 12 nhiễm sắc thể cà chua với khoảng 34.727 gen mã hóa protein. Hầu hết các khoảng trống được giới hạn ở vùng gồm các trình tự lặp lại gần tâm động. Khi so sánh những trình tự bị mất hoặc sắp xếp lại với cà chua hoang dại *Solanum pimpinellifolium*, cho thấy rằng hai bộ gen có sự giống nhau cao, chỉ khác biệt 0,6% nucleotide. Giữa cà chua lai và cà chua hoang dại có 60% gen có sự thay đổi đồng nghĩa, chỉ khoảng 40% có sự thay đổi sai nghĩa bao gồm sự thay đổi “stop codon” có vai trò quan trọng cho chức năng gen [125]. Nghiên cứu giải mã những bộ gen này giúp đẩy mạnh những nghiên cứu về di truyền chọn giống thực vật.

1.2 Tổng quan về virus viêm gan (Hepatitis B virus - HBV) và vaccine ăn được từ thực vật

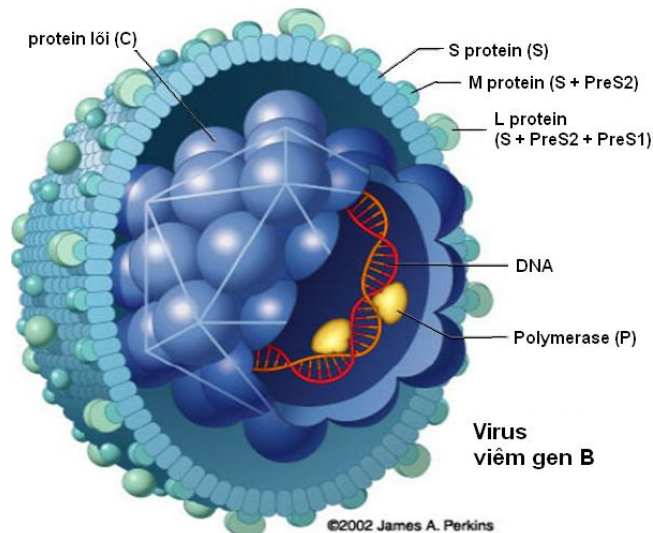
Virus gây viêm gan thuộc chi *Orthohepadnavirus*, họ *Hepadnaviridae*, là những virus có ái lực với tế bào gan. Tế bào đích mà virus hướng tới, xâm nhập, nhân lên và gây tổn thương chủ yếu là tế bào gan. Các virus viêm gan đều có tế bào đích chung là tế bào gan, nhưng chúng có cấu trúc, đường xâm nhập và cơ chế lây truyền khác nhau. Do vậy, cho đến nay, các virus viêm gan chính được chia ra năm loại là A, B, C, D, E [3, 5, 6, 7].

HBV có khả năng tồn tại cao trong điều kiện nhiệt độ khắc nghiệt và ẩm ướt. Chúng có thể tồn tại 15 năm ở -20°C , 24 tháng ở -80°C , 6 tháng ở nhiệt độ trong phòng, và 7 ngày ở 44°C .

1.2.1 Đại cương về virus viêm gan B (Hepatitis B virus – HBV)

Năm 1970, Baruch và cộng sự đã phát hiện kháng nguyên Australia. Sau đó, kháng nguyên Australia được xác định là kháng nguyên bề mặt của hạt virus và năm 1976 được gọi là HBsAg (Hepatitis B surface antigen) [3, 5, 6, 7].

Có hai cách phân loại HBV: kiểu huyết thanh (Serotype) và kiểu gen (Genotype).



Hình 1.1 Cấu trúc không gian của virus HBV [5, 6]

- Kiểu huyết thanh: Có bốn yếu tố mang tính kháng nguyên chính được phân biệt với kháng thể nhờ sự nhận diện các epitope khác nhau được định dạng bởi kháng nguyên bề mặt - HBsAg. Tất cả các subtype này đều chứa yếu tố quyết định 'a', được mã hóa bởi các amino acid từ 124 đến 147. Sự khác biệt giữa các subtype là do yếu tố quyết định d/y và w/r do sự thay đổi từ K thành R tại amino acid 122 và 160. Yếu tố phụ được thêm vào để phân biệt 4 kiểu serotype loại ayw và 2 kiểu adw. Như vậy, hiện có 8 kiểu huyết thanh: adr, ayr, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, adw2, adw4. Còn nếu thêm yếu tố quyết định q+/q- được tìm thấy trong kiểu huyết thanh adr thì HBV có 9 kiểu huyết thanh [141].

- Kiểu gen: Virus có 8 kiểu gene (A-H) dựa vào sự khác nhau trên 8% của toàn bộ bộ gen của HBV hoặc 4% trình tự của SHBs. Kiểu gen của HBV phân bố ở các châu lục và vùng lãnh thổ khác nhau thì khác nhau. Sự khác biệt giữa các gen có ảnh hưởng đến tình trạng bệnh, các biến chứng và khả năng đáp ứng với phương pháp điều trị và vaccine.

Bảng 1.1 Mối liên quan giữa kiểu huyết thanh (serotype) và kiểu gen (genotype) [93]

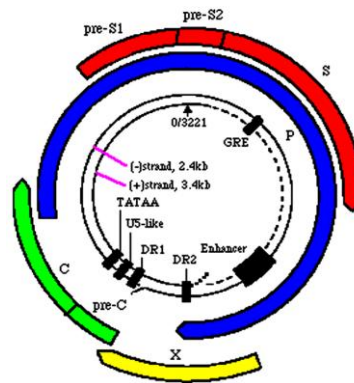
Kiểu gen	Huyết thanh HBV
HBV	
A	ayw1, adw2
B	ayw1, adw2
C	ayr, adr ⁺ , adr ⁻ , adw2
D	ayw2, ayw3
E	ayw4
F	adw4

1.2.2 Cấu trúc của HBV

HBV là virus mang DNA hai sợi không khép kín, có trọng lượng phân tử là 2×10^6 Dalton, được cấu tạo bởi 3200 nucleotid. Vỏ capsid có hình khối đối xứng, kích thước khoảng 27 nm, vỏ ngoài dày khoảng 7 nm được cấu tạo bởi 3 protein cấu trúc: protein lớn, protein trung bình và protein nhỏ; vỏ bao tạo cho virus có hình cầu đường kính 42 nm (đó là hạt Dane).

Hai sợi DNA bộ gen có chiều dài khác nhau: Chuỗi dài nằm ngoài có tính cực âm (-), tạo nên một vòng liên tục có chiều dài cố định 3200 nucleotide và gần như khép kín, mã hóa cho các thông tin di truyền của virus; chuỗi ngắn nằm trong có tính cực dương (+), chiều dài thay đổi từ 50-100% chiều dài bộ gen. DNA của HBV không phải xoắn 2 vòng như các DNA của các virus khác mà chỉ xoắn một

đoạn cuối và xếp thành hình tròn. DNA của HBV không sao chép trực tiếp thành một DNA mới khi vào tế bào gan mà sao chép qua bước tạo ra mRNA dưới tác dụng của RNA polymerase của tế bào gan. mRNA này gọi là tiền genome - pgRNA, chứa toàn bộ thông tin di truyền của virus. Từ pgRNA này sẽ tổng hợp các thành phần của virion, và lúc này thì virion có enzyme reverse transcriptase để sao chép từ mRNA ra DNA của hệ gen (quá trình phiên mã ngược) [3, 5, 6, 7].



Hình 1.2 Cấu trúc bộ gen của HBV [5, 6]

Trên DNA của HBV có 4 đoạn gen (S, C, P, X) tương ứng với 4 khung đọc mở (ORF) nằm gối chồng lên nhau. Các đoạn gen này là vùng mã hóa để tổng hợp các protein của virus như protein bề mặt, protein của lõi, polymerase và protein X. Protein được tổng hợp qua trung gian của các mRNA, có chiều dài thay đổi lần lượt là 2.1 kb, 2.4 kb, 3.5 kb và 0.7 kb. Trong đó: gen *pre-S1*, *pre-S2* và *S*: tổng hợp protein của kháng nguyên bề mặt (HBsAg); gen *pre-C* và *C*: tổng hợp protein của kháng nguyên lõi (HBcAg và HBeAg); gen *X*: tổng hợp protein có tác dụng chuyển hoạt hóa (transactivation); gen *P*: tổng hợp polymerase.

1.2.2.1 Gen S

Gen *S* chia thành 3 vùng khác nhau: *pre-S1*, *pre-S2*, *S*; chịu trách nhiệm mã hóa cho các protein lớp vỏ, tạo ra kháng nguyên bề mặt HBsAg (hình 1.2) [52, 142]. Vùng *S* và *pre-S2* có chiều dài cố định trong khi đó vùng *pre-S1* có chiều dài thay đổi tùy theo từng type khác nhau [12].

Vùng S tổng hợp nên protein S (small) có trọng lượng 24kDa gồm 226 amino acid. Protein này gồm hai thành phần là p24 và Gp27 (glycoprotein), đây là protein chủ yếu vì chiếm đa số [12, 52, 142].

Vùng S và *pre-S2* tổng hợp protein M (medium) có trọng lượng 33 kDa gồm 281 amino acid. Protein này gồm hai loại glycoprotein là Gp33 và Gp36 [52, 142]. Vùng *pre-S2* có vai trò giúp cho virus bám dính và xâm nhập vào trong tế bào gan nhờ liên kết với một loại albumin được trùng hợp trong huyết thanh người. Đồng thời, trên tế bào gan cũng có các thụ thể gắn với albumin trùng hợp trong huyết thanh người pHSA (polymerized human serum albumin). Nếu trên tế bào gan thiếu các thụ thể này thì có thể làm cho tế bào gan có khả năng đề kháng với sự nhiễm HBV [12].

Vùng S, *pre-S1* và *pre-S2* tổng hợp protein L (large) có trọng lượng 39 kDa gồm hai loại protein p39 và Gp42 [52, 142]. Đây là vùng chủ yếu mà các thụ thể trên bề mặt của tế bào gan sẽ liên kết với virus, giúp virus xâm nhập vào trong tế bào.

Cả ba loại protein này hiện diện với số lượng khác nhau trên bề mặt của virion, trong đó protein S chiếm đa số. Protein M chiếm 5 - 10% và protein L chiếm 20% trong vỏ bọc của virion [12].

1.2.2.2. Kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (HBsAg – Hepatitis B surface antigen)

Các kháng nguyên bề mặt lưu hành trong huyết thanh người nhiễm virus. Đa số là các hạt hình cầu đường kính 17 – 25 nm, thường có số lượng khoảng 10^{13} hạt/ 1 ml. Các hạt hình sợi (hoặc hình ống) ít hơn, đường kính 20 nm và nồng độ khoảng 10^{11} hạt/ 1 ml hoặc 1 μ /ml. Huyết thanh của người mang HBV có nồng độ virus thấp chứa khoảng 10^{12} /ml hạt cầu HBs và các sợi HBs rất ít hoặc không có [3, 5, 6].

Các hạt cầu và hạt hình sợi chỉ chứa lipid có nguồn gốc từ nội bào tương của ký chủ và các protein bề mặt của virus nhưng không có nucleocapsid nên không có khả

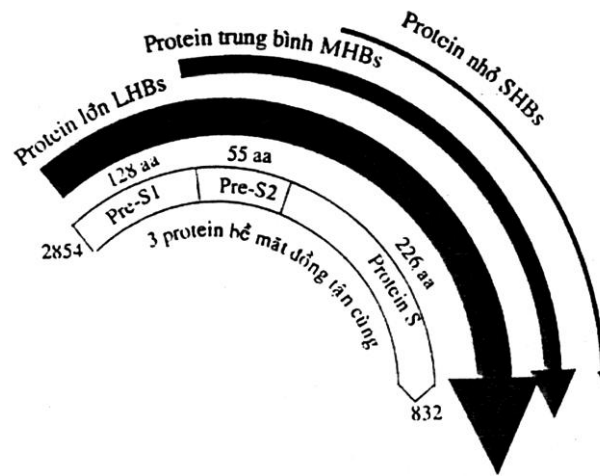
năng gây nhiễm. Các hạt này không chứa hoặc chứa ít protein bề mặt lớn, là protein mang điểm gắn thụ thể. Vì vậy, các hạt virus phụ không gây nhiễm, cũng không có khả năng ngăn trở nhiễm virus [3, 5, 6].

Protein SHBs giống vùng S của MHBs và LHBs. MHBs có một vùng pre-S2 ở phía ngoài. LHBs chứa pre-S2 ở trong và pre-S1 ở ngoài. Vỏ ngoài bao một capsid gồm 240 tiểu đơn vị protein HBc. Các HBc bao bộ gen HBV DNA dài 3,2 kb, enzyme primerase của DNA polymerase gắn kết đồng hóa trị, protein kinase C và protein sốc nhiệt hsc90. Các dạng sợi HBs có các protein tương tự như vỏ ngoài virion. Các hạt cầu chứa ít LHBs. Các hạt HBs chứa lượng nhỏ lipid có nguồn gốc từ lưới nội bào tương của ký chủ nằm giữa các tiểu đơn vị protein. Bên trong LHBs, các vùng pre S kết hợp với protein sốc nhiệt hsc70.

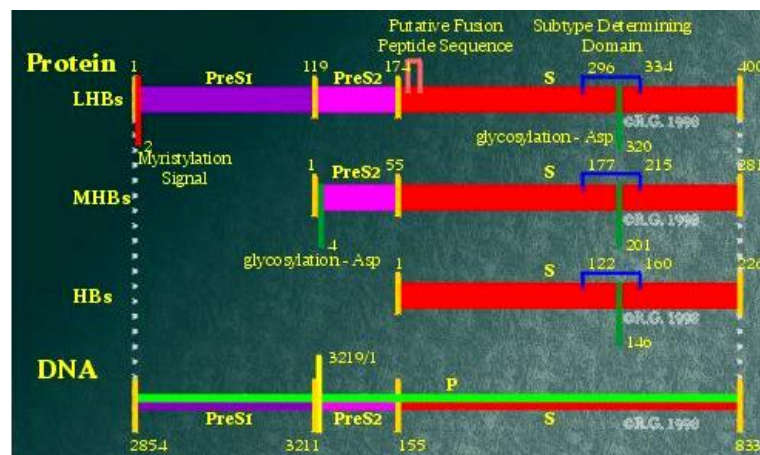
Các sợi HBs chứa 3 polypeptid HBs khác nhau: protein lớn nhất (LHBs), protein trung bình (MHBs), protein nhỏ (SHBs). SHBs là thành phần nhiều nhất và MHBs là ít nhất trong tất cả 3 hạt protein vỏ của HBV. LHBs thường nhiều hơn MHBs trong virion và trong các sợi, nhưng ít gặp trong hạt hình cầu HBs. Thành phần LHBs có thể xác định hình thái của hạt HBs, trong khi thành phần SHBs và MHBs không làm thay đổi hình thái đáng kể. Nếu quá trình đọc mã bắt đầu từ vùng *pre-S1* và tiếp tục đến hết vùng S sẽ tổng hợp protein LHBs. Cũng thế, sự tổng hợp protein M và protein S lần lượt bắt đầu từ vùng *pre-S2* và S. Cả ba protein cấu tạo nên HBsAg [3, 5, 6].

Protein nhỏ (SHBs): SHBs chỉ chứa vùng S, trước đây được xem như là kháng nguyên Au, rất kỵ nước, có thể bị glycosyl hóa ở asp 146. Hai dạng có và không glycosyl đều hiện diện ở người mang HBV mãn, chứa một biểu vị (epitope) có tính kháng nguyên cao, phân tích biểu vị có thể xác định kiểu phụ HBV ở người mang [3, 5, 6].

Các kiểu SHBs phụ: SHBs có các kiểu phụ đã được xác định bằng các kháng thể. Quyết định a chung ở tất cả các chủng phân lập HBs có tính sinh kháng nguyên mạnh nhất. Các quyết định kiểu phụ khác là d hoặc y và w hoặc r. Tại vị trí 122, quyết định d có một lysine, y có một arginine.



Hình 1.3 Ba vùng của gen S (S, pre-S1, pre-S2) và các protein được các gen này mã hóa [5, 6]



Hình 1.4 Cấu trúc gen S và kháng nguyên bề mặt (HBsAg) [5, 6]

Cũng thế, tại vị trí 160, quyết định w có một lysine, r có một arginine. Hơn nữa, w lại phân chia thành w1 đến w4. Một alen kiểu phụ khác đã được xác định có isoleucine hoặc threonine ở vị trí 126 của SHBs. Gần đây, việc xác định chuỗi mã DNA của gen SHBs đã xác định được nhiều kiểu phụ. Ít nhất 7 kiểu gen xếp từ A đến G, khác biệt hơn 8 % trong chuỗi mã protein. Do quyết định a chung trong tất cả kiểu phụ SHBs có tính sinh miễn dịch mạnh, nên khi dùng SHBs làm thuốc chủng ngừa, có thể gây bảo vệ chéo. Việc xác định kiểu phụ chỉ có ích lợi dịch tễ,

tuy cũng có một vài kháng thể trung hòa chuyên biệt kiểu phụ, như đa số các virus khác [3, 5, 6].

1.2.3 Vaccine ăn được từ thực vật

Đối với loại vaccine ăn được, vào giữa những năm 80, Roy Cutiss III và Guy Gardinau (USA) đề xuất ý tưởng chuyển gen DNA ngoại lai của virus, vi khuẩn vào thực vật. Năm 1992 nhà thực vật học Boyce Thompson ở New-York có ý tưởng làm vaccine tự nhiên cho người qua việc ăn các thực phẩm chuyển gen. Sau đó, nhiều thành công khác về vaccine thực vật cũng được công bố trên nhiều loài cây khác nhau như thuốc lá, rau diếp, cà chua, khoai tây, chuối. Số lượng các nghiên cứu về vaccine ăn được gia tăng đã chứng tỏ đây là một hướng nghiên cứu đúng đắn và đầy triển vọng nhằm nâng cao giá trị của cây trồng biến đổi gen trong việc ngăn chặn sự lây lan của các bệnh truyền nhiễm ở người và động vật, cũng như mở rộng quy mô và phạm vi phân phối vaccine tới mọi nơi trên thế giới.

1.2.3.1 Ưu điểm của vaccine ăn được từ thực vật

Trong số các loại protein định hướng sản xuất từ đối tượng thực vật có một số loại được nghiên cứu theo hướng dùng làm vaccine ăn được. Việc sản xuất protein vaccine từ thực vật, trong đó có vaccine ăn được, có một số ưu điểm như sau:

- Tính ổn định cao, dễ bảo quản và sử dụng: Các kháng nguyên biểu hiện trong thực vật ổn định ngay ở nhiệt độ phòng hoặc đông ruộng do được sản xuất và bao bọc bởi các mô thực vật mà cụ thể định vị trong lưới nội chất, thể Golgi hoặc bề mặt tế bào. Đây cũng chính là những vị trí lý tưởng cho việc biểu hiện kháng nguyên. Nhờ tính ổn định này, các kháng nguyên trở nên dễ dàng bảo quản và sử dụng (ngay trong thực vật) mà không cần giữ lạnh như các vaccine dùng để tiêm. Thông thường, ngay sau khi tinh sạch, vaccine tiêm được đông khô và vận chuyển từ nơi sản xuất đến nơi tiêu thụ thông qua “the cold chain”, một chuỗi bảo quản lạnh ở quy mô quốc tế, quốc gia và khu vực hết sức phức tạp và tốn kém. Trái lại, nếu sản xuất vaccine ăn được thì chỉ cần vận chuyển và sử dụng ngay bộ phận thực vật chứa vaccine đó [20, 104, 158].

- Ăn được: Nếu vaccine qua đường miệng dùng ở dạng tinh sạch sẽ dễ dàng bị đường ruột phân hủy. Trái lại, vaccine trong thực vật được chính mô thực vật bao bọc, hạn chế được sự phá hủy đó và ổn định, bền vững trong cơ thể [104]. Vaccine này có thể ăn tươi (quả, lá) hoặc nấu chín (hạt, củ). Nhiều nghiên cứu cho thấy, các kháng nguyên vaccine được biểu hiện hiệu quả ở rau diếp (lá), khoai tây (củ), cà chua (quả) và ngô (hạt). Xử lý nhiệt (khoai tây, hạt cải dầu và hạt ngũ cốc) chỉ có tính khả thi khi kháng nguyên không biến tính ở nhiệt độ cao, ví dụ nấu chín khoai tây chứa vaccine trong 3 phút làm giảm 50% thành phần vaccine đó. Hiện nay, có thể ứng dụng công nghệ chế biến thực phẩm đơn giản để tạo thành bột (cà chua) tránh được hiện tượng thối nhũn hoặc làm khô hạt ngũ cốc cho phép bảo quản lâu dài (trên 1 năm) mà không ảnh hưởng đến hoạt tính của vaccine. Để tăng tính hiệu quả của vaccine ăn được, những nghiên cứu theo hướng bảo vệ các kháng nguyên trong hệ thống tiêu hóa được tăng cường. Chủ yếu là nhờ vào thành tế bào thực vật như những "cái túi giấy cellulose" nhỏ không bị tiêu hủy trong đường tiêu hóa của người và động vật không ăn cỏ.

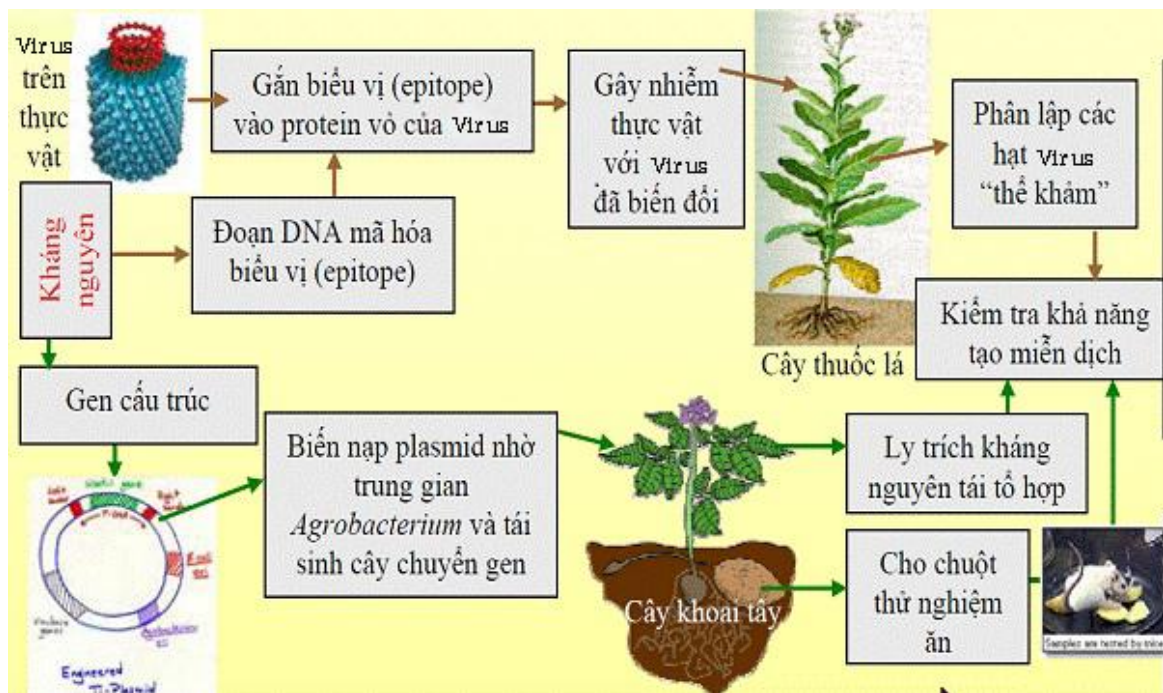
- An toàn: Vì vaccine được sản xuất trong thực vật là vaccine dưới đơn vị sử dụng gen mã hóa cho một phần protein vỏ virus mà không cần đến virus sống như vaccine giảm độc lực hay virus chết như vaccine bất hoạt. Do đó, vaccine này không trở lại thành virus gây bệnh cho người và động vật, đồng thời cũng tránh được nguy cơ nhiễm mầm bệnh tiềm tàng từ vaccine được sản xuất từ hệ thống động vật có vú [20, 104, 107].

- Vaccine ăn được kích thích sản xuất kháng thể của hệ thống thể dịch hiệu quả hơn vaccine tiêm: Hầu hết các vi sinh vật gây bệnh đều xâm nhập vào cơ thể qua bề mặt nhầy trong đường tiêu hóa, hô hấp và đường tiết niệu. Những con đường này đều thuộc hệ thống miễn dịch thể dịch, nơi tập trung những mô có khả năng đáp ứng miễn dịch lớn nhất của cơ thể và là hàng rào bảo vệ đầu tiên chống lại những vi sinh vật đó. Đây cũng chính là vị trí tác động hiệu quả nhất của các vaccine ăn được từ thực vật [104].

1.2.3.2 Phương thức sản xuất vaccine ăn được từ thực vật

- Biến nạp bền vững: toàn bộ gen cấu trúc của kháng nguyên được gắn vào vector thực vật, sau đó vector được biến nạp vào tế bào thực vật thông qua trung gian là *Agrobacterium tumefaciens* (hoặc bằng súng bắn gen – gene gun) (hình 1.5). Cây chuyển gen được dùng để ly trích kháng nguyên tái tổ hợp hoặc cho chuột ăn trực tiếp các mô thực vật (lá, củ) để đánh giá khả năng tạo miễn dịch [25, 178].

- Hệ thống biểu hiện biểu vị (epitope): Các đoạn DNA có tính kháng nguyên được gắn vào gen mã hóa protein vỏ của virus gây bệnh trên thực vật. Sau khi gây nhiễm trên thực vật, virus tái tổ hợp sẽ nhân đôi và phát tán trong hầu hết các mô thực vật. Các virus có biểu hiện biểu vị ngoại lai trên bề mặt được tinh sạch và kiểm tra khả năng tạo đáp ứng miễn dịch [25, 178].



Hình 1.5 Sơ đồ sản xuất vaccine ăn được từ thực vật trên cơ sở xây dựng hệ thống biểu vị ở virus gây nhiễm thực vật và biến nạp di truyền nhờ vi khuẩn *Agrobacterium*/bắn gen [104]

1.3 Một số nghiên cứu ở nước ngoài và trong nước về biến nạp gen *HBsAg* tạo kháng nguyên *HBsAg* trên thực vật

1.3.1 Nghiên cứu ở nước ngoài

1.3.1.1 Trên cây cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Cùng với những nghiên cứu của các nhà khoa học trước đó, Mason và cs. (1992, 1994); Gao và cs. (2003) đã biến nạp thành công gen mã hóa kháng nguyên bề mặt hepatitis B (HBsAg) liên kết với promoter *CaMV35S* vào cây cà chua nhờ *Agrobacterium tumefaciens*. Protein HBsAg cũng được phát hiện ở lá và quả cà chua chuyển gen bằng phân tích ELISA.

Sau đó, Srinivas và cs. (2008) đã thay đổi cấu trúc của vector: Gen 's' của virus hepatitis B được dòng hóa với tín hiệu HER (sử dụng C-terminal ER) và promoter *ubiquitin* của *Arabidopsis* hoặc promoter *EFE* (ethylene-forming enzyme). Kết quả là mức biểu hiện gen *HBsAg* cao ở cây con trồng trong điều kiện *in vitro* khi sử dụng promoter *EFE*. Ngoài ra kháng thể đơn dòng tạo ra cao hơn khi gen 's' được biểu hiện với C-terminal ER. Nhưng hạn chế ở nghiên cứu này là mức biểu hiện *HBsAg* thấp ở quả cà chua chuyển gen, do đó có thể gia tăng mức biểu hiện gen chuyển bằng cách sử dụng promoter mạnh hơn - promoter *E8* - biểu hiện chuyên biệt ở quả.

Tương tự, Baesi và cs. (2011), Li và cs. (2011) cũng biến nạp thành công gen *HBsAg* vào lá mầm cà chua nhờ *Agrobacterium tumefaciens*. Các dòng cây chuyển gen đã được kiểm tra sự hiện diện và biểu hiện gen *HBsAg* bằng phương pháp PCR, dot blotting, ELISA. Quả cà chua được cho chuột ăn, kết quả cho thấy có sự đáp ứng miễn dịch (oral immunization).

Như vậy, những kết quả nghiên cứu này cho thấy rằng có thể sản xuất vaccine rẻ tiền từ những phần ăn được của cây trồng phục vụ như hệ thống vaccine cho người và động vật vừa đơn giản và hiệu quả cao.

1.3.1.2 Trên các cây trồng khác

Cây khoai tây (Solanum tuberosum)

Mason và cs. (2002) đã tạo thành công khoai tây chứa protein HBsAg. Sau đó tiến hành thử nghiệm trên người đã tiêm vaccine tái tổ hợp sản xuất từ nấm men. Kết quả kích thích khả năng miễn dịch ở người.

Sau đó, Joung và cs. (2004) đã chuyển gen tạo protein bề mặt S và pre-S2 sử dụng promoter cấu trúc đôi (double) gồm promoter *CaMV35S* và promoter *patatin* tạo biểu hiện đặc trưng ở củ (tuber-specific).

Kết quả cho thấy, mức biểu hiện protein kháng nguyên S và pre-S2 cao nhất khi sử dụng promoter *patatin*. Các miếng khoai tây (không nấu chín) được cho chuột ăn. Kết quả cho thấy chuột có đáp ứng miễn dịch sau 3 lần ăn (5 g/lần, ăn cách tuần) và được tiêm bổ sung 0,5 µg vaccine sản xuất từ nấm men.

Một số tác giả khác như Domansky và cs. (1995), Ehsani và cs. (1997), Sunil Kumar và cs. (2005) cũng đã nghiên cứu chuyển nạp thành công gen mã hóa protein vỏ HBV vào đối tượng cây trồng này.

Cây chuối (Musa acuminata)

Một trong các loại cây trồng được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm đặc biệt khi thực hiện nghiên cứu chuyển gen *HBsAg* là cây chuối. Vì tương tự như cây cà chua, quả có thể được ăn trực tiếp, không cần nấu chín (protein không bị hư hỏng). Các tác giả May và cs. (1995), Sunil Kumar và cs. (2005) đã chuyển nạp thành công gen nói trên. Tương tự, Renuga và cs. (2010, 2014) cũng chuyển nạp thành công gen mã hóa tiểu đơn vị B toxin dịch tả (*CT-B*) và protein được ghi nhận ở sản phẩm quả qua một số phân tích, kiểm tra.

Cây dưa chuột (Cucumis sativus cv 'Swarnamukhi')

Unni và cs. (2010) cũng chuyển thành công gen tạo kháng nguyên bề mặt hepatitis B trên đối tượng này. Nhưng lượng kháng nguyên trong cây chuyển gen thấp, tác giả đề nghị thêm tín hiệu SEKDEL (tín hiệu giữ lại mạng lưới nội chất) để gia tăng tích lũy protein kháng nguyên trong cơ quan chuyên biệt.

Cây rau diếp (Lactuca sativa L.)

Qua bước đầu thử nghiệm lâm sàng Kapusta và cs. (1999) cho rằng protein *HBsAg* đã kích thích tạo anti-*HBsAg* IgG ở người.

Nghiên cứu của Pniewski và cs. (2011) có điểm mới so với những nghiên cứu trước là có thể tạo sự miễn dịch bằng đường miệng với lượng nhỏ kháng nguyên

HBsAg biểu hiện ở mô rau diếp kháng thuốc diệt cỏ được làm lạnh khô. Mô được làm lạnh khô (lyophilized) này chuyển thành dạng viên, lượng kháng nguyên S-HBsAg được bảo quản ít nhất một năm ở nhiệt độ phòng. Hệ thống chọn lọc dựa vào gen *bar* kháng mạnh với glufosinate, có thể giảm tỉ lệ biến nạp nhưng bảo đảm khả năng tái sinh cao của dòng biến nạp khi so sánh với gen chọn lọc kháng kanamycin. Rau diếp kháng glufosinate thích hợp để điều hòa an toàn GMO và yêu cầu sức khỏe, bởi vì không có gen chọn lọc kháng kháng sinh.

Cây thuốc lá (Nicotiana tabacum L.)

Cây thuốc lá là đối tượng thường được các nhà khoa học quan tâm trước tiên trong nghiên cứu vì thuốc lá là cây mô hình – có đáp ứng rất tốt trong nghiên cứu nuôi cấy phát sinh hình thái và chuyển nạp gen. Gen *HBsAg* lần đầu tiên được chuyển nạp và biểu hiện thành công trên cây thuốc lá [97]. Protein tinh khiết chiết tách từ cây thuốc lá chuyển gen tạo đáp ứng miễn dịch tương tự như vaccine được sản xuất từ nấm men [165]. Nuôi cấy thu sinh khối tế bào huyền phù cây thuốc lá mang gen này cũng được ghi nhận (theo hướng thu nhận sinh khối chứa protein tái tổ hợp quy mô phòng thí nghiệm) [159].

Mặt khác, thuốc lá là cây không ăn được nhưng có năng suất sinh khối lá rất lớn nên các nghiên cứu được xác định theo hướng chủ yếu là tạo cây chuyển gen, thu sinh khối lá, chiết tách protein tinh khiết với lượng lớn làm bộ sinh phẩm dùng chẩn đoán và làm vaccine.

Ngoài ra, gen tạo kháng thể (anti-HBsAg) cũng đã được chuyển nạp thành công vào cây thuốc lá và được chiết tách với quy mô lớn - dùng 100 - 200 kg lá [171]. Tương tự, kháng thể sản xuất từ cây thuốc lá cũng được nghiên cứu bởi Ramírez và cs. (2003). Đây là hướng nghiên cứu tạo kháng thể đơn dòng từ cây trồng thay vì nghiên cứu tạo kháng thể từ động vật.

Năm 2012, Pniewski đã thành công chuyển gen *M-HBsAg* hoặc *L-HBsAg* và gen kháng thuốc diệt cỏ glufosinate vào thuốc lá. Kháng nguyên gồm domain S, pre-S1 và pre-S2 được kết hợp lại thành hình thức VLPs (virus-like particles). Kết

quả M-HBsAg được tổng hợp nhiều hơn so với L-HBsAg. Điều này có thể do kháng nguyên bề mặt trung bình thì bền hơn trong tế bào thực vật giống như hệ thống biểu hiện tái tổ hợp.

1.3.2 Nghiên cứu trong nước về chuyển gen *HBsAg*

Tại Viện Sinh học Nhiệt đới (Phòng thí nghiệm trọng điểm phía Nam về công nghệ tế bào thực vật), bước đầu gen *HBsAg* đã được sử dụng để chuyển vào cây cà chua (giống F₁) và thuốc lá (2007). Trên cơ sở đó, ở luận án này, nội dung nghiên cứu được triển khai rộng và sâu hơn trên giống thuần TN412 và kết quả đã được công bố trên Tạp chí Công nghệ Sinh học (2011) và Tạp chí Khoa học và Phát triển (2014). Chưa ghi nhận được công trình công bố của các Viện nghiên cứu và trường đại học khác về nghiên cứu chuyển gen *HBsAg* vào cây trồng.

1.4 Các công trình chuyển gen khác trên cây cà chua

Virus hợp bào hô hấp (RSV) là một trong những mầm bệnh nguy hiểm ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ. Gen tạo protein dung hợp (F) RSV được biểu hiện trong quả cà chua chín dưới sự kiểm soát của promoter *E8* - biểu hiện chuyên biệt ở quả. Với quả cà chua chuyển gen chín miễn dịch bằng đường miệng (oral) ở chuột cảm ứng tạo kháng thể đặc biệt ở huyết thanh và màng nhầy RSV-F. Tỉ lệ globulin miễn dịch được tạo ra trong phản ứng miễn dịch cho thấy rằng tế bào T-helper loại 1 được cảm ứng [140].

Nghiên cứu của Jani và cs. (2002) đã phát triển vaccine ăn được từ cà chua chống lại dịch tả. Toxin dịch tả được tiết từ *Vibrio cholerae* bao gồm tiểu đơn vị A và B. Sau đó gắn vào receptor G_{M1}-ganglioside. Cây cà chua được biến nạp với gen mã hóa tiểu đơn vị toxin B dịch tả (*ctxB*) cùng với tín hiệu màng nội chất dưới sự kiểm soát promoter *CaMV 35S* nhờ *Agrobacterium tumefaciens*. Phân tích PCR và Southern blot kiểm tra sự có mặt của gen *ctxB* ở cây cà chua chuyển gen. Phân tích miễn dịch của protein được chiết từ cây chứng tỏ có mặt tiểu đơn vị toxin dịch tả B (CTB) giống như CTB tinh chế từ *V. cholerae*. Cả lá và quả cà chua biểu hiện CTB

mức cao tương ứng 0,02 và 0,04% protein tổng số. ELISA G_{M1} chứng tỏ CTB được tạo ra từ cây gấc đặc biệt với thể nhận (receptor) G_{M1}-ganglioside.

Ngoài những công trình nghiên cứu trên, cà chua còn được sử dụng tạo vaccine ăn được đối với một số bệnh khác như trong bảng 1.2. Bên cạnh những nghiên cứu phát triển vaccine ăn được từ cà chua thì những nghiên cứu để tăng khả năng kháng bệnh, tăng khả năng chống chịu của cà chua với môi trường cũng được quan tâm (bảng 1.3).

Bảng 1.2. Những công trình tạo vaccine ăn được ở cà chua giúp ngăn ngừa một số bệnh

Gen chuyển tạo protein	Bệnh	Tác giả
Kháng nguyên PfCP-2.9	Sốt rét	Kantor và cs. (2013)
β - amyloid (A β)	Alzheimer (AD)	Youm và cs. (2008)
Interleukin (IL-12)	Lao phổi	Elías-López và cs. (2008)
β -secretase (BACE1)	Tăng phản ứng miễn dịch	Kim và cs. (2012)
F protein	Virus hợp bào hô hấp	Sandhu và cs. (2000)
Protein dung hợp F1-V	Bệnh dịch	Alvarez và cs. (2005)
P1-2A3C, polyprotein cấu trúc, P1-2A và protease, 3C từ FMDV	Tay chân miệng	Pan và cs. (2008)
hIgA_2A1	Tiêu chảy do <i>rotavirus</i>	Juárez và cs. (2012)
Peptide tái tổ hợp CTB-UA	Dạ dày do <i>Helicobacter Pylori</i>	Li và cs. (2013)
Proinsulin	Tiểu đường	Soltanmohammadi và cs. (2014)

Khare và cs. (2010) đã đưa gen mannitol-1-phosphate dehydrogenase (*mtlD*) của vi khuẩn dưới sự kiểm soát promoter *CaMV 35S* vào cây cà chua nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Cây cà chua chuyển gen thể hiện tính kháng stress phi sinh học. Trong phòng lạnh với stress nhiệt độ (4⁰C), cây chuyển gen sống sót trên

48 h, trong khi những cây không chuyển gen thì không có khả năng sống sót và chết dần dần. Cây chuyển gen có khả năng chịu stress lạnh chứng tỏ có sự giảm đáng kể trong phóng thích chất điện phân và tăng peroxide hóa lipid được kiểm tra bằng đo thành phần malondialdehyde (MDA). Dưới điều kiện lạnh, cây chuyển gen cũng tăng đáng kể hoạt động enzyme chống oxi hóa so với cây không chuyển gen. Kiểm tra tính kháng khô hạn và mặn cũng phát hiện cây chuyển gen có tính kháng cao hơn với stress phi sinh học so với cây không chuyển gen.

Bảng 1.3 Những nghiên cứu chuyển gen ở cà chua cải thiện khả năng kháng bệnh và chống chịu với môi trường bất lợi

Gen chuyển	Biểu hiện	Tác giả
Gen (CP) mã hóa protein vỏ virus xoăn lá cà chua (TLCV)	Chống bệnh xoăn lá cà chua	Raj và cs. (2005)
<i>AmiRs</i> (artificial micro RNAs)	Làm im lặng sự phiên mã <i>AV2/AV1</i> của virus (tạo protein vỏ), chống bệnh xoăn lá cà chua ở New Delhi	Vu và cs. (2013)
<i>Cry2Ab</i>	Làm chết ấu trùng của <i>Helicoverpa armigera</i> và <i>Phthorimaea operculella</i> khi chúng ăn cây chuyển gen này	Saker và cs. (2011)
<i>ech42</i> (endochitinase)	Kháng nấm (như <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Verticillium dahliae</i>)	Shah và cs. (2010)

Những stress phi sinh học đặc biệt là độ mặn và khô hạn là những yếu tố ảnh hưởng chủ yếu đến sự sinh trưởng và sinh sản cây trồng. Trong thử nghiệm để phát

triển cà chua có khả năng chịu đựng mặn và khô hạn, một đoạn DNA chứa gen *osmotin* thuốc lá được kiểm soát bởi promoter 35S chuyển vào cà chua *Solanum lycopersicum* nhờ *Agrobacterium tumefaciens*. Dòng biến nạp được đánh giá khả năng chịu đựng stress độ mặn và khô hạn bằng phân tích sinh lý ở thế hệ T₁ và T₂. Sự gắn kết và biểu hiện của gen *osmotin* ở cây chuyển gen T₁ được kiểm tra lại bằng lai Southern blot, RT-PCR và Northern blot. Thế hệ con T₁ từ những cây chuyển gen và không chuyển gen được thử nghiệm tính chịu mặn và khô bằng cách để vào mức stress NaCl khác nhau và không cung cấp nước. Kết quả từ những kiểm tra sinh lý học khác nhau chứng tỏ rằng ở cây chuyển gen mang gen *osmotin* tăng tính chịu đựng stress mặn và khô khi so sánh với cây hoang dại. Ở dòng chuyển gen chứng tỏ lượng nước cao hơn đáng kể, lượng chlorophyll, lượng proline và chiều rộng lá hơn cây hoang dại dưới điều kiện stress. Những nghiên cứu hiện nay chứng tỏ rằng sự biểu hiện quá mức của gen *osmotin* tăng cường chịu đựng stress mặn và khô ở cây cà chua chuyển gen [55].

Ngoài những công trình nghiên cứu trên, sự gia tăng tính chịu stress phi sinh học ở cà chua còn được ghi nhận ở một số công trình như trong bảng 1.4.

Bảng 1.4 Những công trình chuyển gen ở cà chua gia tăng tính chịu đựng stress phi sinh học

Gen chuyển	Biểu hiện	Tác giả
<i>SpMPK1</i> , <i>SpMPK2</i> , <i>SpMPK3</i> (mitogen-activated protein kinases)	Tăng cường chống chịu khô hạn	Li và cs. (2013)
<i>SIAREB</i>	Tăng khả năng chịu mặn	Hsieh và cs. (2010)
<i>ATHB-7</i> (<i>Arabidopsis thaliana</i> homeodomain-leucine zipper class I genes)	Chống chịu khô hạn với việc giảm mật độ và kích thước khí khổng.	Mishra và cs. (2012)
<i>MdVHA-B</i> (subunit B of the V-ATPase form apple)	Chống chịu với stress khô hạn, giảm malondialdehyde (MDA),	Hu và cs. (2012)

	tăng mức proline tự do và hoạt động H ⁺ ATPase.	
<i>BcZAT12</i>	Chống chịu khô hạn	Rai và cs. (2013)
<i>ATHB-7</i>	Chống chịu khô hạn	Mishra và cs. (2012)
<i>Gly I, Gly II (Glyoxalase I, Glyoxalase II genes)</i>	Chịu mặn	Álvarez- Viveros và cs. (2013)
<i>PtADC</i>	Chống chịu stress khô hạn	Wang và cs. (2011)
<i>AT-CBF1</i> (điều khiển bởi promoter cảm ứng RD29A)	Chống chịu lạnh và có kiểu hình bình thường	Singh và cs. (2011)
<i>SAMDC</i>	Tăng tổng hợp polyamine và tăng chống chịu nhiệt độ cao	Cheng và cs. (2009)
<i>cAPX</i> (cytosolic ascorbate peroxidase)	Chịu nhiệt độ cao	Wang và cs. (2006)

Để đơn giản phương pháp chuyển gen nhờ *Agrobacterium tumefaciens*, những thông số ảnh hưởng đến hiệu quả tái sinh và hiệu quả chuyển gen trên cà chua được khảo sát. Yasmeeen và cs. (2009), Jabeen và cs. (2009): đã phát triển một hệ thống cải tiến biến nạp và những điều kiện tốt để chuyển gen thành công nhờ *Agrobacterium tumefaciens* như tuổi của mẫu cấy, loại mẫu cấy, thời gian mẫu được nhiễm với *Agrobacterium tumefaciens*, thời gian đồng nuôi cấy, môi trường đồng nuôi cấy, thời gian tiên chọn lọc.

Tương tự, Sharma và cs. (2009), Chaudhry và cs. (2010), Afroz và cs. (2011) cũng khảo sát những điều kiện như thời gian tiên nuôi cấy mẫu với acetosyringone, lượng acetosyringone trong môi trường nuôi cấy, môi trường tái sinh chồi và tiên chọn lọc sau nuôi chung không có tác nhân chọn lọc, mật độ vi khuẩn, nồng độ benzyl amino purine (BAP), zeatin và indole acetic acid (IAA).

Như vậy, để tạo ra những cây cà chua chuyển gen cần phát triển hệ thống tái sinh và phương pháp biến nạp hiệu quả nhờ *Agrobacterium tumefaciens*. Việc sử dụng promoter khác nhau cũng ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen ở cây cà chua chuyển gen.

Krasnyanski và cs. (2001): sử dụng hai promoter khác nhau, *CaMV 35S* với trình tự không dịch mã đầu 5' từ alfalfa mosaic virus RNA4 và promoter chuyên biệt ở quả chín *E8*. Cả hai promoter đều bắt nguồn từ vector pB1121, được sử dụng trong chuyển gen cà chua. Lai Southern blot xác nhận khả năng gắn gen *uidA* vào bộ gen cà chua. Cả mô lá và quả của cây chuyển gen mang gen *uidA* dưới sự kiểm soát của *CaMV 35S/AMV* thể hiện hoạt động GUS, trong khi không có sự biểu hiện nào được quan sát ở mô lá của cây chuyển gen mang gen *uidA* dưới sự kiểm soát (điều khiển) promoter *E8*. Tất cả quả từ những cây cà chua chuyển gen ở hai cách thiết kế thể hiện sự biểu hiện gen *uidA*. Tuy nhiên khi gen này được điều khiển bởi *CaMV 35S/AMV*, mức hoạt động của GUS thì cao đáng kể hơn khi được điều khiển bởi promoter chuyên biệt ở quả chín *E8*.

Ngoài những công trình chuyển gen vào nhân như đã nêu trên, hiện nay, trên thế giới và trong nước đang rất quan tâm đến công nghệ chuyển gen vào lục lạp cà chua với các ưu điểm như hạn chế quá trình phát tán gen, gen chuyển được gắn vào vị trí chính xác theo nguyên tắc tái tổ hợp tương đồng giữa gen vector và gen lục lạp, không có hiện tượng im lặng gen và protein được tạo ra ở dòng chuyển gen lục lạp cao lên đến 46% protein tổng số [10, 11]. Ở Viện Sinh học Nhiệt đới, Nguyễn Thị Thanh và cs. (2009, 2012) đã nghiên cứu chuyển nạp gen *HIV-1 p24* vào lục lạp thể cây cà chua (*Solanum lycopersicum*) cùng với gen chọn lọc *aadA* kháng spectinomycin và streptomycin được thực hiện bằng cách bắn gen vào lá thật và lá mầm. Phân tích PCR gen *aadA* và gen *HIV-1 p24* cho thấy có sự có mặt của băng DNA khuếch đại tương ứng 250 bp, 700 bp trong các dòng cà chua chuyển gen. Kỹ thuật Southern blot phân tích gen *HIV-1 p24* tái tổ hợp trong bộ gen lục lạp thể cây cà chua ở dạng không đồng nhất (heteroplasmic) vì cho hai băng DNA khuếch đại tương ứng 5,8 kb của lục lạp thể chuyển gen và 3,5 kb của lục lạp thể không chuyển gen.

Hướng nghiên cứu chuyển gen vào lục lạp tạo protein kháng nguyên dùng làm “vaccine ăn được” là vấn đề cần được quan tâm do các ưu điểm như đã nêu trên đặc biệt tạo được lượng lớn protein.

1.5 Cấu trúc vector dùng trong biến nạp gen trên đối tượng cà chua

Promoter: thường sử dụng promoter *CaMV 35S* tạo sự biểu hiện tạm thời (transient) và ổn định (stable) của gen chuyển trong cây chuyển gen. Gen chuyển được biểu hiện ở tất cả các mô, không phụ thuộc vào giai đoạn phát triển của cây và vị trí mô trên cây [166].

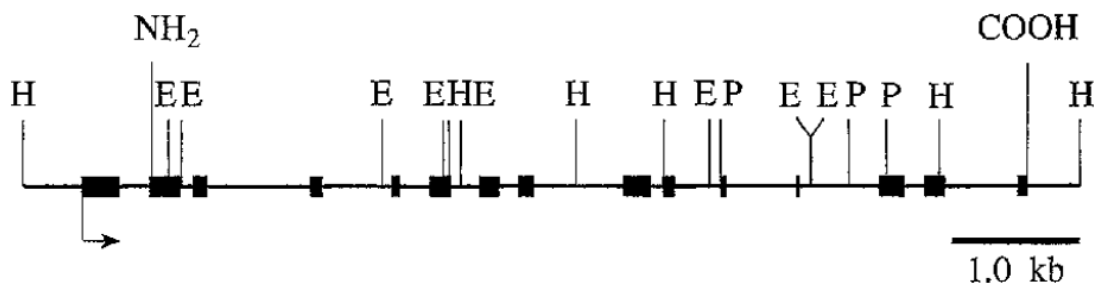
Chiều dài của promoter 35S được mô tả bởi Odell và cs. (1985) là đoạn trình tự nucleotide từ -941 đến +9 và có hiệu quả biểu hiện tương tự khi so sánh với đoạn trình tự nucleotide từ -343. Promoter bao gồm upstream -343 dẫn đến sự biểu hiện cao của cây chuyển gen [44]. Hai domain chủ yếu, domain A và domain B, được xác định là quan trọng cho kiểm soát sự biểu hiện gen [21]. Domain A (từ -90 đến +8) bao gồm vùng promoter rất nhỏ (-46 đến +8) và domain A1 một trình tự hoạt hóa nằm giữa đoạn nucleotide từ -90 đến -46 và gắn với trình tự *asf-1*. Domain B (từ trình tự nucleotide -343 đến -90) gồm 5 subdomain, B1 đến B5. Sự kết hợp khác nhau của subdomain B và domain A dẫn đến sự biểu hiện GUS khác nhau ở giai đoạn sớm và trưởng thành trong sự phát triển thực vật [22].

Ngoài ra có thể sử dụng promoter chuyên biệt trên quả chín: promoter E-4, E-8 và 2A11 [166]. Trong trình tự của promoter E-8 chứa “hộp” TATA, CAAT và CCAAT. Yếu tố *cis* có liên quan đến sự phát triển và sự chín của quả. Yếu tố phản ứng với ethylen (ERE) là một motif gồm 8 bp ATTTCAAA ở trình tự -834 đến -841 và -991 đến -997. Promoter này biểu hiện gen chuyển không chỉ ở cơ quan chuyên biệt mà còn ở loài thực vật chuyên biệt (ví dụ: khi chuyển gen *HBsAg* và promoter E8 vào thuốc lá; gen chuyển không biểu hiện ở mô lá, hoa và hạt [65]. Nhưng khi được chuyển vào cà chua, gen chuyển được biểu hiện ở quả cà chua chín; còn ở hoa và quả non cũng có sự biểu hiện với hàm lượng ít) [181].

Promoter chuyên biệt ở quả khởi động gen liên quan sự chín của quả, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, được mô tả và phân lập từ tảo

[19]. Vùng trình tự nucleotide từ -1966 đến -1159 từ vị trí bắt đầu phiên mã có thể điều khiển sự biểu hiện gen chỉ thị *GUS* liên quan sự chín trong quả cà chua [19]. Promoter chứa một motif chịu trách nhiệm trong phản ứng với ethylene. Trong cà chua chuyển gen, promoter ACC oxidase điều khiển sự biểu hiện chuyên biệt gen chuyển ở quả cà chua chín và gen chuyển không hoạt động ở bất kì mô khác và quả xanh [144].

Promoter *PDS* ở cà chua là một đơn gen nằm trên nhiễm sắc thể số 3, bao gồm 15 exon xen kẽ 14 intron, một trong những intron này nằm ở vùng 5' không dịch mã. Theo sự sắp xếp intron - exon thể hiện ở hình 1.6, sự phiên mã bắt đầu tại nucleotide +561, trình tự hộp “TATA” nằm trước (upstream) vị trí này. Có thể promoter này cùng với trình tự upstream có liên quan đến sự điều hòa phiên mã *PDS* trong suốt quá trình chín của quả. Gen chuyển được điều khiển bởi promoter *PDS* chứa trình tự từ -1530 đến +564 (bao gồm yếu tố *cis* và vùng 5' không dịch mã) cần thiết cho sự biểu hiện cao của gen chuyển và những gen liên quan đến sự hình thành sắc lạp [30, 95].



Hình 1.6 Cấu trúc gen *PDS* ở cà chua [95]

H: Hind III; *E*: Eco RI; *P*: Pst I; hộp tô đen (■): exon; NH_2 và $COOH$: đuôi amino và carboxy của protein; mũi tên (↘): bắt đầu cDNA

PDS là một trong những enzyme quan trọng nhất và cần thiết trong con đường sinh tổng hợp carotenoid, xúc tác chuyển đổi phytoene thành ζ -carotene. Gen *PDS* được biểu hiện cao nhất ở quả chín và thấp nhất ở lá. Sự gia tăng biểu hiện gen *PDS* liên quan đến sự tích lũy lycopene và carotenoid [162].

Gen chọn lọc: Gen chọn lọc giúp phân biệt giữa mô được chuyển nạp gen và mô không chuyển gen. Thực vật không có gen kháng kháng sinh tự nhiên. Mô được biến nạp gen chứa gen chọn lọc nên sống sót trên môi trường chọn lọc chứa kháng sinh, trong khi đó những tế bào không được biến nạp gen không có gen kháng kháng sinh sẽ chết trên môi trường chọn lọc. Gen kháng kháng sinh thường được sử dụng là gen kháng hygromycin, kanamycin (sử dụng ở thực vật); gen kháng gentamycin, rifampicin (sử dụng ở vi khuẩn).

Gen chỉ thị *gusA* (*uidA*): gen intron-*gusA* không biểu hiện hoạt động GUS ở tế bào *Agrobacterium tumefaciens* nhưng khi được chuyển vào tế bào thực vật gen này sẽ tạo enzyme glucuronidase – khi phản ứng với cơ chất glucuronide sẽ cho sản phẩm có màu xanh chàm indigo đặc trưng [15, 110].

1.6 Một số yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả biến nạp gen dùng *Agrobacterium tumefaciens* ở cây cà chua

Cà chua là một trong những cây rau ăn quả quan trọng trên thế giới và có sinh khối quả cao. Vì vậy, cây này được chọn lọc trong nghiên cứu, nó có thể được sử dụng trong nông nghiệp phân tử để nâng cao khả năng sản xuất protein tái tổ hợp như sản xuất vaccine với nhiều thuận lợi như rẻ tiền, an toàn sinh học, sản xuất rộng, dễ phân phối [20, 104, 107, 158, 159].

Hiệu quả biến nạp gen thay đổi chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố chủ yếu:

1.6.1 Dòng (strain) *A. tumefaciens*: Hiệu quả biến nạp sẽ thay đổi khi sử dụng dòng *A. tumefaciens* khác nhau. Trong 3 dòng *A. tumefaciens* (LBA4404, EHA105 và C58), dòng *A. tumefaciens* LBA4404 được chứng minh phù hợp nhất và sử dụng trong hầu hết thí nghiệm biến nạp gen [20, 58, 60, 65, 89, 94, 122, 133, 152].

1.6.2 Tuổi của mẫu: Mẫu được lấy từ hạt nảy mầm 1 tuần tuổi cho kết quả tốt nhất, mẫu 2 tuần tuổi cho tỷ lệ chồi biến nạp và tái sinh ít hơn so với 1 tuần tuổi, trong khi mẫu 3 tuần tuổi cho tỷ lệ chồi biến nạp và tái sinh thấp nhất. Như vậy, tuổi của mẫu ảnh hưởng đến sự biến nạp cũng như hiệu quả tái sinh. Gia tăng tuổi của mẫu dẫn đến giảm đáng kể khả năng tái sinh cũng như chồi được biến nạp có thể do sự xơ cứng mô thực vật [180].

1.6.3 Loại mẫu: Các loại mẫu khác nhau như mô phân sinh ngọn, trụ lá mầm, lá mầm ảnh hưởng đến tần số biến nạp cũng như hiệu quả tái sinh. Schutze và Weiczorrek cho rằng trụ lá mầm không hiệu quả bằng lá mầm trong sự tái sinh chồi chuyển gen. Các nghiên cứu trên thế giới về biến nạp gen ở cây cà chua cũng sử dụng lá mầm nhiều hơn trụ lá mầm và lá thật. Vì khi khảo sát về thời gian hình thành mô sẹo, thời gian hình thành chồi và hiệu quả tái sinh chồi thì lá mầm có biểu hiện tốt hơn (có hiệu quả tái sinh chồi cao nhất; thời gian hình thành mô sẹo, chồi sớm nhất; số lượng chồi hình thành trên một mẫu lá mầm nhiều nhất) [115, 42]. Tuy nhiên, sự chọn lựa loại mẫu phù hợp tùy thuộc vào kiểu gen khác nhau [180].

1.6.4 Môi trường tiền nuôi cấy: Môi trường MS + Zeatin 1 mg/L + IAA 0,5 mg/L: tỷ lệ chồi tái sinh cao hơn khi so sánh với môi trường MS. Môi trường tiền nuôi cấy ảnh hưởng đến tỷ lệ tạo chồi và sự biến nạp. Điều này chứng tỏ thành phần môi trường tiền nuôi cấy tăng cường sự tái sinh cũng như sự biến nạp. Ngoài ra, thời gian tiền nuôi cấy cũng ảnh hưởng đến hiệu quả biến nạp gen. Thời gian này được ghi nhận ở các công trình nghiên cứu trên thế giới tốt nhất là 48 giờ [20, 55, 89, 111, 132, 180].

1.6.5 Môi trường tái sinh: Môi trường tái sinh và biến nạp tốt nhất với nồng độ BA 1,0 mg/L, nồng độ BA 1,5 mg/L tỷ lệ tái sinh và biến nạp ít hơn. Sự tái sinh và biến nạp cao nhất được thu nhận ở Kinetin 2 mg/L + IAA 0,8 mg/L; Zeatin 1 mg/L + IAA 0,5 mg/L (đây cũng là môi trường tạo rễ tốt) [180]. Nồng độ Zeatin có thể thay đổi (0,5 mg/L hoặc 2 mg/L) cũng cho kết quả cao tùy thuộc vào kiểu gen khác nhau. Trong môi trường tái sinh có bổ sung zeatin, chồi hình thành trực tiếp, nhưng khi trong môi trường tái sinh có bổ sung BA thì chồi được hình thành gián tiếp thông qua giai đoạn hình thành mô sẹo [115].

Như vậy, đã có khá nhiều kết quả nghiên cứu trên thế giới về xây dựng hệ thống tái sinh *in vitro* trên cây cà chua, tuy nhiên có thể nhận thấy việc xác định môi trường nuôi cấy thích hợp nhất (bao gồm thành phần khoáng, chất điều hòa sinh trưởng) có khác nhau tùy yếu tố giống (kiểu gen của cây - plant genotype) kể cả một số yếu tố khác như tuổi/trạng thái sinh lý của mẫu nuôi cấy. Do vậy, nội dung

của luận án cần khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố nói trên đến khả năng tái sinh cây *in vitro* trên đối tượng giống cụ thể sử dụng trong nghiên cứu.

Xét ở khía cạnh nghiên cứu chuyển gen, tần số biến nạp gen cũng chịu ảnh hưởng lớn bởi kiểu gen (giống) sử dụng. Do vậy, nghiên cứu tái sinh *in vitro* trước đó tạo cơ sở cho nghiên cứu biến nạp gen và đề tài mang tính mới khi sử dụng giống cà chua chưa được nghiên cứu biến nạp gen nói chung và gen *HBsAg* nói riêng trên thế giới cũng như ở trong nước. Trên thế giới, chưa ghi nhận được công trình công bố tạo protein kháng nguyên *HBsAg* qua điều khiển bởi hai promoter *PDS* và *T7* ở cà chua.

1.6.6 Thời gian nhiễm khuẩn: Khi gia tăng thời gian nhiễm khuẩn thì tần số biến nạp cũng gia tăng. Thời gian nhiễm khuẩn ngắn không có lợi cho sự biến nạp. Tuy nhiên với thời gian nhiễm khuẩn quá dài dẫn đến sự sinh trưởng quá mức của *Agrobacterium* và có hại đến mẫu [89].

1.6.7 Mật độ vi khuẩn: Tỷ lệ mẫu chết có mối quan hệ với mật độ vi khuẩn. Tần số biến nạp được gia tăng khi mật độ vi khuẩn tăng nhưng trong giới hạn vì mật độ *Agrobacterium tumefaciens* cao hơn có thể dẫn đến phản ứng quá nhạy cảm (hypersensitive) của mẫu. Vì vậy, mật độ vi khuẩn thích hợp (khác nhau tùy theo dòng *A. tumefaciens* sử dụng trong thí nghiệm biến nạp gen) sẽ phát huy hiệu quả biến nạp và giảm sự sinh trưởng quá mức của *Agrobacterium tumefaciens* [89, 111, 179].

1.6.8 Đồng nuôi cấy (co-cultivation): Trong giai đoạn đồng nuôi cấy, vi khuẩn bám vào mẫu, xảy ra sự chuyển và gắn kết đoạn T-DNA vào bộ gen tế bào thực vật, giai đoạn này có thể nhanh hơn khi bổ sung vài thành phần vào môi trường đồng nuôi cấy. Những kết quả thí nghiệm chứng tỏ thời gian đồng nuôi cấy cho sự biểu hiện của gen chỉ thị (ví dụ *GUS*) cao nhất là 2 ngày vì nếu thời gian dài hơn (3 ngày) có thể gây ra sự sinh trưởng quá mức của *A. tumefaciens* dẫn đến làm hư hỏng tế bào thực vật và tần số chuyển gen thấp. Còn nếu thời gian ngắn thì có thể ngăn sự gia tăng tế bào *A. tumefaciens*, giảm hoạt động vùng vir của nó và tần số chuyển gen thấp [20, 65, 89, 132, 180].

1.6.9 Phân tử tín hiệu: Các phân tử này làm nhiệm vụ cảm ứng gen *vir* của vi khuẩn như nồng độ hợp chất phenol acetosyringone (As). As được chứng minh gia tăng sự biến nạp nhờ *Agrobacterium tumefaciens* ở các loài thực vật [89]. Nồng độ As gia tăng hiệu quả biến nạp ở cà chua từ 100 -200 $\mu\text{M/L}$, tùy chủng vi khuẩn sử dụng (ví dụ 200 $\mu\text{M/L}$ As đối với dòng *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, 100 $\mu\text{M/L}$ As đối với dòng *Agrobacterium rhizogene* DCAR-2).

1.6.10 Giai đoạn tiền chọn lọc: Sau khi đồng nuôi cấy, giai đoạn tiền chọn lọc rất quan trọng. Không có callus hoặc sự sinh trưởng chồi được ghi nhận khi tiến hành chọn lọc ngay sau khi đồng nuôi cấy. Môi trường chọn lọc chứa cefotaxime 500 mg/L, cho phép sự phân chia tế bào và hình thành callus trước khi chọn lọc, dẫn đến tái sinh chồi từ mẫu tốt hơn. Khoảng thời gian này tốt nhất là 7 ngày, nếu thời gian này kéo dài hơn nữa, tỷ lệ mẫu được chọn cao hơn nhưng hiệu quả biến nạp thấp hơn, có thể do sự sinh trưởng của những tế bào không được biến nạp trong quá trình tiền chọn lọc.

1.6.11 Nồng độ kháng sinh cefotaxime: Ở nồng độ thích hợp, cefotaxime dùng kiểm soát sự sinh trưởng quá mức của vi khuẩn và không ảnh hưởng đến sự hình thành callus và sự tái sinh là 500 mg/L. Liều quá cao dẫn đến mẫu chết và không có sự hình thành callus và sự tái sinh [20].

1.6.12 Ảnh hưởng của promoter lên sự biểu hiện GUS: Dựa trên phân tích hóa mô GUS, hoạt động GUS được phát hiện ở lá, thân, hoa và rễ của cây chuyển gen, ở đó gen chuyển được khởi động bởi CaMV 35S/AMV. Không có sự nhuộm màu GUS được quan sát ở cây không chuyển gen hay bất kỳ mô sinh dưỡng và mô cánh hoa của cây chuyển gen mang gen chuyển được khởi động bởi promoter *E8*. Phát hiện này cho thấy rằng *E8* là một promoter chuyên biệt quả và không cho phép biểu hiện gen ở bất kỳ mô sinh dưỡng và hoa [65, 181].

1.7 Chuyển gen gián tiếp nhờ *Agrobacterium tumefaciens*

1.7.1 Ưu điểm của phương pháp chuyển gen nhờ *Agrobacterium tumefaciens*

Sự chuyển DNA nhờ *A. tumefaciens* là một phương pháp biến nạp thực vật tự nhiên và phương pháp này được sử dụng nhiều để tạo cà chua biến đổi gen biểu

hiện protein khác nhau như protein beta amyloid trong vaccine chống bệnh Alzheimer. Sử dụng *A. tumefaciens* có một số thuận lợi so với phương pháp chuyển gen khác như: ít tốn công sức, chi phí, dễ thực hiện, không đòi hỏi thiết bị tinh vi, có hiệu quả biến nạp và khả năng gen chuyển được gắn vào bộ gen của thực vật cao [15, 16, 64, 81, 126]. Phương pháp chuyển gen này giúp tái sinh mô, cây chuyển gen một cách nhanh chóng khi so sánh với các phương pháp chuyển gen trực tiếp khác [114] và cũng cho phép chuyển một đoạn lớn DNA vào tế bào thực vật với vị trí chính xác, ít xảy ra sự sắp xếp lại đoạn DNA được chuyển [15, 33, 81, 145, 150]. Số lượng bản sao gen chuyển được gắn vào bộ gen tế bào nhận ít hơn so với phương pháp bắn gen [61, 64, 66, 81, 85, 150, 169] và gen chuyển được biểu hiện ổn định qua các thế hệ con theo tỉ lệ phân ly của Mendel [33, 150, 111], ít có sự im lặng gen chuyển [64] .

1.7.2 Cơ chế xâm nhập của *Agrobacterium tumefaciens* vào tế bào thực vật [103]

Trong giai đoạn đầu tiên, sự gắn kết giữa *Agrobacterium* và tế bào cây bị thương được kiểm soát bởi hai loci “virulence” của vi khuẩn (*chvA* và *chvB*) định vị trên nhiễm sắc thể của vi khuẩn, không có trên Ti plasmid. Gen *chvA* và *chvB* chỉ có thể được kết gắn khi *Agrobacterium* ở gần các tế bào cây bị thương. Những tế bào cây bị thương tiết ra những phân tử có tính chất tín hiệu, làm cho gen ở trong vùng *vir* của Ti plasmid trở nên hoạt động. Đó là những hợp chất phenol như: acetosyringone (AS) và α - hydroacetosyringone (OH-AS). Ngoài ra, monosaccharide, như glucose và galactose, cũng được chứng minh gây sự kích hoạt gen *vir*, khi acetosyringone không có hoặc có với lượng ít [2].

Để bắt đầu con đường truyền tín hiệu, hợp chất phenol thực vật tương tác với *virA*. Sự tương tác này có thể trực tiếp hoặc gián tiếp thông qua hai protein được mã hóa do gen trên nhiễm sắc thể, P10 và P21; trước tiên P10, P21 gắn với tín hiệu hợp chất phenol và sau đó truyền đến *virA*. Trái lại, sự cảm ứng gen *vir* bởi đường luôn xảy ra gián tiếp thông qua protein gắn với galactose/ glucose được mã hóa từ gen nhiễm sắc thể, *ChvE*, tương tác với *virA* và truyền tín hiệu [168, 172].

1.7.2.1 Hình thành một mobile T- DNA copy, T- strand

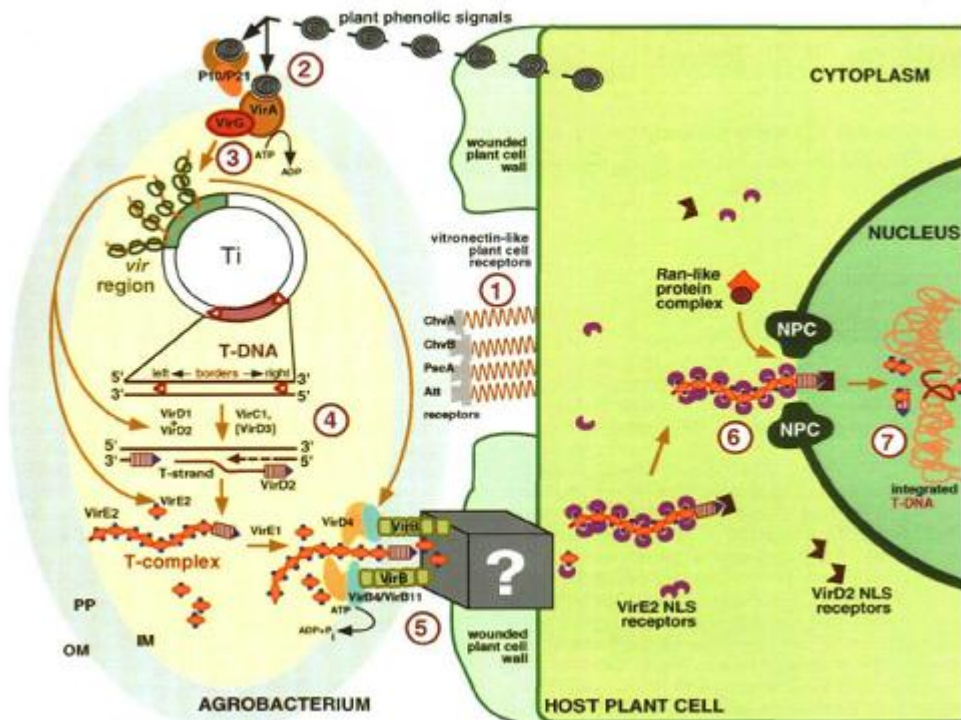
Sự biểu hiện gen *vir* dẫn đến hình thành một bản sao T-DNA sợi đơn, sau đó chuyển vào trong tế bào chủ. Ti plasmid khác nhau có thể mang số lượng và kích thước T-DNA khác nhau. Ví dụ Ti plasmid nopaline chứa một T- DNA (single) khoảng 22-kb trong khi Ti plasmid octopine mang 3 T-DNA ngắn hơn 13, 1,5 và 7,8 kb mà được chuyển một cách độc lập với nhau.

Sự hình thành T- DNA bắt đầu ở RB T-DNA, tiếp tục theo hướng 5' đến 3' và kết thúc ở LB. Phức hợp protein VirD2 và VirD1 có chức năng như endonuclease, gắn vào Ti plasmid siêu xoắn tại bờ T-DNA, giải phóng và tạo khe (nick) trên sợi antisense T-DNA giữa base thứ 3 và thứ 4 của bờ T-DNA. Khi VirD2 và VirD1 bị giới hạn, sự tạo thành sợi T có thể được tăng cường bởi protein khác, VirC1. Sau phản ứng tạo khe, VirD2 gắn đầu kết thúc 5' của sợi T và bộc lộ đầu 5' của sợi antisense tại khe bờ trái. Kết quả T- strand sau đó bị giải phóng trong khi cơ chế tổng hợp DNA vi khuẩn sửa chữa gap (chỗ trống) giữa bờ trái và phải của sợi antisense. VirD2 gắn với khe bờ trái trên Ti plasmid có thể sau đó hàn gắn nick này, khôi phục lại Ti plasmid nguyên vẹn. Phân tử VirD2 vẫn gắn với T-strand trong suốt quá trình nó vào tế bào thực vật như tín hiệu di chuyển và bảo vệ nó. VirD1 không còn gắn với T-strand có thể bị giới hạn khe bờ T-DNA [45, 177].

Để thuận lợi cho quá trình này, phân tử T-strand phải được ngăn khỏi sự bắt cặp trở lại với sợi sense. Vì vậy, T-DNA mới tạo ra hoặc sẽ được di chuyển vào trong tế bào chủ thực vật đồng thời với sự tháo ra (unwinding) hoặc giống như hệ thống sao chép DNA prokaryote, được bảo vệ bởi protein gắn DNA sợi đơn (SSB). T-DNA tích lũy trong *A. tumefaciens* cảm ứng gen *vir*, ngay cả khi không có tế bào nhận thực vật. VirE2 đã được chứng minh gắn với ssDNA. VirE2 đóng gói ssDNA thành sợi hình trụ, rỗng. Nhiều phân tích những sợi này cho thấy rằng một sợi T đặc biệt nopaline 22 kb sẽ chứa 1176 phân tử VirE2 và có đường kính vòng ngoài 12,6 nm. Vì vậy, VirE2 được cho là vỏ sợi T [172].

1.7.2.2 Cơ chế di chuyển phức hợp T

Sự vận chuyển phức hợp T xảy ra bởi hệ thống secretion type IV [29, 69]. Hệ thống type IV thường chứa trên 12 protein, hình thành hai thành phần chức năng: một filamentous pilus và một phức hợp vận chuyển để đưa cơ chất qua màng tế bào. Trong *A. tumefaciens* hệ thống vận chuyển type IV được tập hợp từ những protein được mã hóa bởi gene *vir D4* và operon *virB* với 11 khung đọc mở [172].



Hình 1.7 Cơ chế xâm nhập của T-DNA *Agrobacterium tumefaciens* vào tế bào thực vật [168]

Thành phần pilus của hệ thống vận chuyển phức hợp T đã được quan sát trên bề mặt tế bào *A. tumefaciens* cảm ứng *vir*. Về mặt cấu trúc, virulence pilus này hầu như bao gồm hai protein, VirB2 và VirB5. Về mặt chức năng, pilus VirB được cho rằng tiếp xúc (sense contact) với tế bào nhận thực vật và chuyển thông tin này đến phức hợp vận chuyển để bắt đầu chuyển (export) phức hợp T.

Phức hợp vận chuyển thì bao gồm protein VirB khác nhau và VirD4. Trong cấu trúc này, VirB1 được cho rằng sử dụng trong hoạt động transglycosylase để

phá hủy peptidoglycan vi khuẩn để chuẩn bị vị trí cho phức hợp vận chuyển trong vỏ vi khuẩn [168].

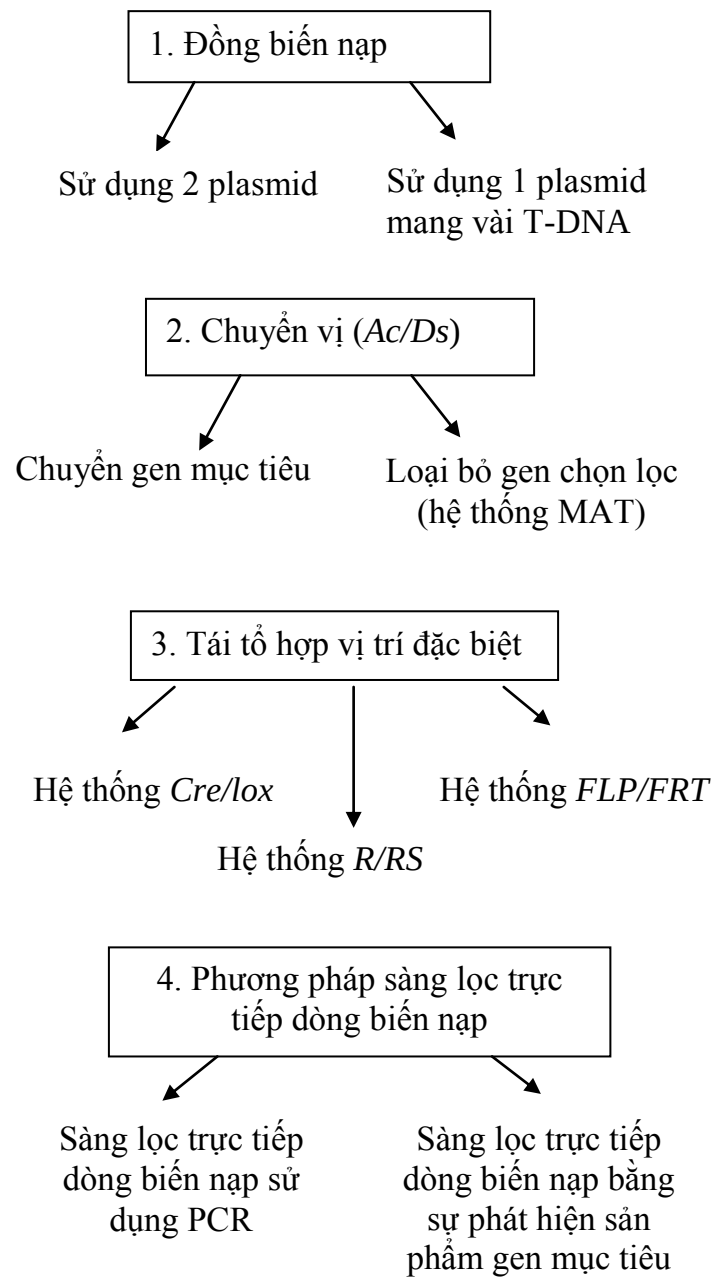
1.7.2.3 Sự gắn T-DNA

Ngay khi vào trong nhân, phức hợp T gắn vào nhiễm sắc thể thực vật. Bởi vì T-DNA không mã hóa enzyme cần cho hoạt động gắn chèn, protein VirD2 và VirE2 và/ hoặc những nhân tố trong nhân tế bào chủ thực hiện hoạt động này. Bên cạnh hoạt động ligase, VirD2 chứa hai motif trình tự amino acid liên quan đến quá trình gắn C- terminal ω domain để hoạt động integrase [168]

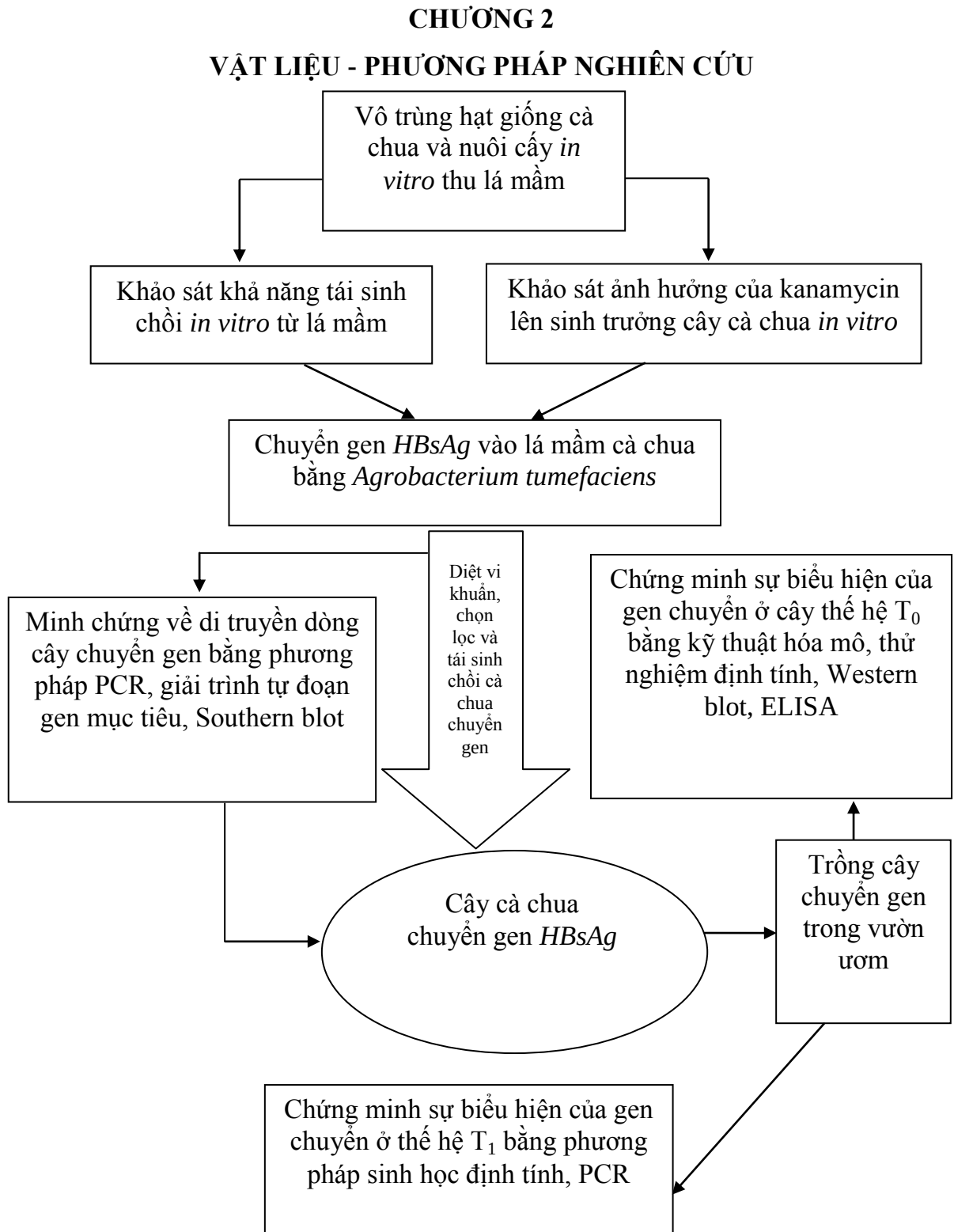
1.8 Một số phương pháp tạo thực vật chuyển gen an toàn sinh học không có gen chọn lọc (marker-free) [135]

Phương pháp truyền thống để sàng lọc tế bào và cây chuyển gen phải dựa vào sự biểu hiện gen chọn lọc kháng kháng sinh hoặc thuốc diệt cỏ hoặc gen chỉ thị. Gen chọn lọc được sử dụng phổ biến nhất là gen kháng kháng sinh (gen *nptII*, *hpt*), sản phẩm của những gen này cho phép cây hoặc tế bào được biến nạp sinh trưởng trên môi trường chọn lọc. Tuy nhiên, sau khi chọn lọc, sự có mặt của gen đánh dấu (marker) trong cây được biến nạp trở nên không hữu ích và ảnh hưởng của gen này có thể không tiên đoán được hoặc có tiềm năng rất nguy hiểm. Bởi vì sự thụ tinh chéo, sự chuyển gen theo chiều ngang (horizontal), sự lan truyền không kiểm soát của gen chọn lọc trong quần thể thực vật trong tự nhiên có thể xảy ra. Có thể sự chuyển gen kháng kháng sinh theo chiều ngang đến động vật và vi sinh vật trong ruột người và sự chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ theo chiều dọc đến cỏ được xem như vấn đề chính về an toàn sinh học cây trồng biến đổi gen.

Hiện nay vấn đề được đặt ra là phát triển kỹ thuật để tạo ra cây chuyển gen không có “genetic waste” như gen chọn lọc hoặc gen chỉ thị. Để loại bỏ những gen này ra khỏi cây trồng, nhiều phương pháp mới được đưa ra để tạo cây trồng biến đổi gen không có gen đánh dấu (gen chọn lọc, gen chỉ thị) (hình 1.8) như: đồng biến nạp gen đánh dấu và gen mục tiêu, sử dụng yếu tố chuyển vị, áp dụng sự tái tổ hợp vị trí đặc biệt để loại bỏ gen đánh dấu khỏi bộ gen cây trồng chuyển gen, phương pháp sàng lọc trực tiếp dòng biến nạp [34, 56, 82, 91, 100, 112, 134, 148, 156].



Hình 1.8 Các phương pháp tạo cây trồng biến đổi gen không có gen đánh dấu [134]



Hình 2.1 Các bước thí nghiệm về biến nạp tạo cây chuyển gen và minh chứng về sự di truyền của gen chuyển

2.1 Nội dung nghiên cứu

2.1.1 Khảo sát ảnh hưởng của BA, IAA lên sự tái sinh chồi *in vitro* từ lá mầm và ảnh hưởng của kháng sinh kanamycin lên lá mầm, cây con *in vitro* cà chua giống TN 412.

2.1.2 Xây dựng quy trình biến nạp gen vào lá mầm cây cà chua TN412 bằng phương pháp dùng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

2.1.3 Kiểm tra sự hiện diện của các gen biến nạp (bằng PCR, giải trình tự đoạn gen và Southern blot) và sự biểu hiện của chúng bằng phương pháp hóa mô tế bào (GUS assay), sinh học định tính, hóa sinh (ELISA) và Western blot.

2.1.4 Kiểm tra sự di truyền của gen chọn lọc *nptII* và gen chuyển mục tiêu *HBsAg* ở thế hệ T₁ bằng phương pháp sinh học định tính và PCR.

2.2 Vật liệu nghiên cứu

2.2.1 Vật liệu thực vật: Hạt cà chua TN 412 (cà chua bi) (Công ty Trang Nông TP. HCM).

Giống cà chua TN 412 là giống sinh trưởng hữu hạn, thời vụ gieo trồng vào tháng 1-3 và tháng 6-12, thời gian thu hoạch 70 - 75 ngày sau khi trồng.

Điều kiện thí nghiệm: Các thí nghiệm thực hiện trên thực vật được đặt trong điều kiện ánh sáng từ 2.500 - 3.000 lux, thời gian chiếu sáng là 10 giờ/ngày, nhiệt độ từ 24 - 26°C, độ ẩm từ 60 - 65%.

2.2.2 Vi khuẩn

Chủng vi khuẩn (do phòng Công nghệ Gen, Phòng Thí nghiệm Trọng điểm phía Nam về Công nghệ Tế bào Thực vật - Viện Sinh học Nhiệt đới cung cấp):

- *Escherichia coli* (*E. coli*) *DH5-α* - chủng vi khuẩn có khả năng nhận bản plasmid rất cao nhằm thu nhận một lượng lớn plasmid pITB-HBsAg để biến nạp vào *Agrobacterium tumefaciens*.

- *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404: biến nạp plasmid pITB-HBsAg vào bộ gen cà chua TN412. Chủng vi khuẩn này được sử dụng phổ biến nhất ở các công trình đã công bố cho hiệu quả biến nạp cao [58, 60, 65, 89, 94, 122, 133, 152, 109].

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn

- Môi trường LB (Luria- Bertani) lỏng (phụ lục 1): Dùng trong nuôi cấy *E. coli* hoặc *Agrobacterium tumefaciens*.

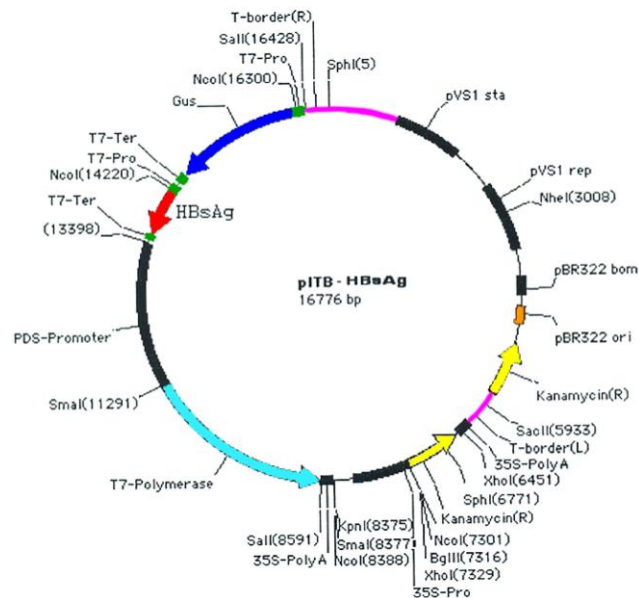
- Môi trường AB (Chilton và cs., 1974) lỏng (phụ lục 1): Dùng trong nuôi cấy *Agrobacterium tumefaciens*.

- Môi trường LB hoặc AB bổ sung kháng sinh: Dùng trong nuôi cấy *E. coli* hoặc *Agrobacterium tumefaciens*. Nồng độ kháng sinh Kanamycin (Km) sử dụng trong nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* là 100 µg/mL và *Agrobacterium tumefaciens* là 50 µg/mL.

Điều kiện nuôi cấy vi khuẩn: Nhiệt độ nuôi cấy *E. coli* là 37⁰C, nhiệt độ nuôi cấy *Agrobacterium tumefaciens* là 28⁰C. Nuôi cấy trong môi trường lỏng, lắc ở tốc độ 250 vòng/phút.

2.2.3 Plasmid

Sử dụng plasmid pITB-HBsAg (≈ 16,78 kb) (Hình 2.2) [do TS. Nguyễn Hữu Tâm (Viện Sinh học Nhiệt đới) thiết kế] mang các gen: Gen *HBsAg* tạo protein HBsAg (promoter *T7*, terminator *T7*; ≈ 0,7 kb), gen chỉ thị *gusA* (promoter *T7*, terminator *T7*), gen kháng kanamycin *nptII* (promoter *CaMV35S*).



Hình 2.2 Cấu trúc plasmid pITB-HBsAg

Gen *HBsAg* mã hoá protein kháng nguyên bề mặt nhỏ (S) và gen *gusA* được điều khiển bởi hệ thống [promoter *PDS* (phytoene desaturase, ≈ 2 kb) + *T7 RNA polymerase* (2,7 kb)] tạo sự biểu hiện cao và chuyên biệt ở mô quả.

Chọn lọc cây chuyển gen dựa vào: Gen kháng kháng sinh kanamycin, gen chỉ thị *gusA* (đổi màu thuốc thử X-gluc).

2.2.3.1 Tạo dòng *E. coli* mang plasmid pITB-HBsAg (Xem phụ lục 2)

2.2.3.2 Biện nạp plasmid pITB-HBsAg vào *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 (Xem phụ lục 3)

2.3 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các nội dung nghiên cứu được thực hiện từ năm 2011 đến năm 2014 tại phòng Công nghệ Gen, Phòng Thí nghiệm Trọng điểm phía Nam về Công nghệ Tế bào Thực vật - Viện Sinh học Nhiệt đới.

2.4 Phương pháp nghiên cứu

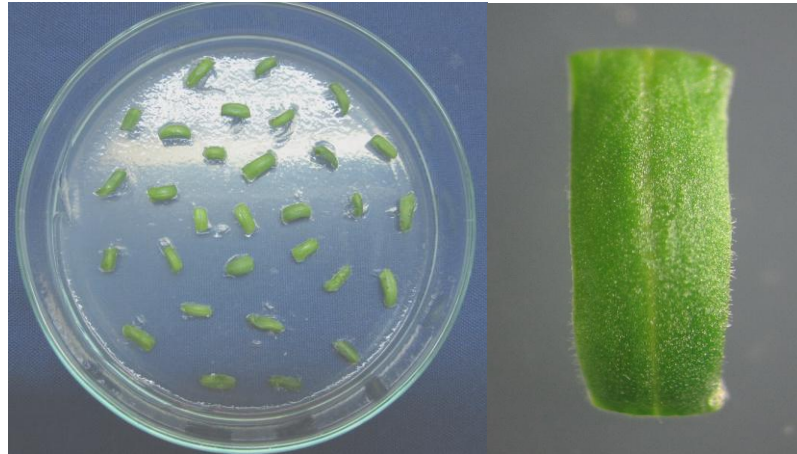
2.4.1 Khảo sát ảnh hưởng của BA, IAA lên sự tái sinh chồi *in vitro* từ lá mầm và ảnh hưởng của kháng sinh kanamycin lên lá mầm, cây con *in vitro*

2.4.1.1 Khảo sát ảnh hưởng của BA, IAA lên sự tái sinh chồi *in vitro* từ lá mầm

Với mỗi giống cà chua khác nhau thì môi trường tái sinh *in vitro* cũng hoàn toàn khác nhau. Vì vậy để hiệu quả biến nạp gen ở giống cà chua TN412 cao cần khảo sát và tìm ra môi trường tái sinh thích hợp nhất cho tỷ lệ lá mầm tái sinh, số chồi trên mẫu tái sinh cao nhất đối với giống cà chua này.

Phương pháp thực hiện

Hạt cà chua được khử trùng với cồn 70% (v/v) khoảng 1 - 2 phút, rồi rửa lại bằng nước cất vô trùng 1 - 2 lần. Sau đó, hạt cà chua này tiếp tục được khử trùng bằng dung dịch Sodium hypochlorite (với nồng độ 4% - v/v) trong thời gian từ 10 - 15 phút và rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3 - 4 lần. Cuối cùng cho hạt vào đĩa petri có giấy thấm, rồi tiến hành cấy hạt vào bình tam giác chứa môi trường khoáng cơ bản $\frac{1}{2}$ MS (phụ lục môi trường 1) để hạt nảy mầm, mỗi bình 20 hạt.



Hình 2.3 Mẫu lá mầm cà chua *in vitro* được sử dụng làm nguyên liệu tái sinh chồi

Lá mầm cà chua *in vitro* 7 - 10 ngày tuổi được sử dụng làm nguyên liệu tái sinh. Lá mầm được cắt bỏ phần cuống lá (sao cho không dính mô phân sinh chồi ở cuống) và phần đầu lá, đoạn sử dụng có kích thước 5 mm x 7 mm. Sau đó, mặt dưới (back-up) của mẫu lá mầm được đặt tiếp xúc với môi trường tái sinh (hình 2.3).

Phương pháp thí nghiệm

Dựa vào kết quả khảo sát tỷ lệ tái sinh ở một số công trình nghiên cứu đã công bố của các tác giả Sharma và cs. (2009); Afroz và cs. (2011); Goel và cs. (2010); Krasnyanski và cs. (2001); Yasmeen (2009); Raj và cs. (2005); Wu và cs. (2011); Roy và cs. (2006); Gupta và cs. (2013); Baesi và cs. (2011); Srinivas và cs. (2008); Soltanmohammadi và cs. (2014), thành phần môi trường tái sinh được xây dựng ở luận án này là môi trường khoáng cơ bản MS với vitamin B5, agar 8 g/L, đường saccharose 30 g/L, bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BA và IAA với ngưỡng nhất định. Nồng độ của IAA được sử dụng trong các môi trường tái sinh khảo sát là 0,5 mg/L, nồng độ BA thay đổi lần lượt là 1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50 mg/L.

Mỗi môi trường tái sinh khảo sát (thí nghiệm thức) thực hiện với 30 mẫu cấy, mỗi đĩa petri cấy 6 mẫu. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu một yếu tố hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD- Complete Randomized Design) với các thí nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Không bố trí thí nghiệm thức đối chứng (BA 0 mg/L, IAA 0 mg/L) (vì theo

nhiều tài liệu lá mầm cây trồng nói chung và cà chua nói riêng không đáp ứng với nuôi cấy ở môi trường có tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng này).

Chỉ tiêu theo dõi: Quan sát bằng mắt thường mẫu lá mầm tái sinh *in vitro*/ tổng số lá mầm đã cấy và số chồi hoàn chỉnh/ mẫu lá mầm tái sinh ở thời điểm 42 ngày sau cấy (NSC). Từ kết quả này, chọn ra môi trường tái sinh thích hợp cho thí nghiệm chuyển gen tiếp theo.

2.4.1.2 Ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh kanamycin lên lá mầm, cây con *in vitro*

Tính kháng kanamycin của lá mầm ở mỗi giống cà chua là khác nhau. Do đó, với giống cà chua TN412 này cần phải khảo sát ảnh hưởng của kháng sinh kanamycin lên khả năng tái sinh chồi của mẫu lá mầm, nhằm xác định nồng độ tối thiểu của kanamycin gây ức chế khả năng tái sinh chồi và gây chết lá mầm để áp dụng trong quá trình chọn lọc sơ bộ những mẫu chuyển gen giả định.

Phương pháp thực hiện

- Các mẫu lá mầm nuôi cấy trên môi trường tái sinh thích hợp (đã khảo sát ở thí nghiệm 2.4.1.1) có bổ sung kháng sinh kanamycin với nồng độ tăng dần: 30, 40, 50, 60, 70 mg/L.

- Cây con tái sinh từ lá mầm cà chua, cao khoảng 4 - 5 cm được cấy lên môi trường MS không chất điều hòa sinh trưởng có bổ sung kháng sinh kanamycin với nồng độ tăng dần: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg/L.

Phương pháp thí nghiệm

- Mỗi nghiệm thức 30 mẫu lá mầm. Thí nghiệm được bố trí giống như thí nghiệm 2.4.1.1 với đối chứng là mẫu lá mầm được nuôi cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh kanamycin.

- Mỗi nghiệm thức 30 cây (mỗi bình tam giác cấy 3 cây). Thí nghiệm được bố trí giống như thí nghiệm 2.4.1.1 với đối chứng là cây con được cấy trên môi trường MS không chất điều hòa sinh trưởng, không bổ sung kháng sinh kanamycin.

Chỉ tiêu theo dõi

- Quan sát bằng mắt thường số lá mầm có khả năng tái sinh ở 14 ngày, 28 ngày sau nuôi cấy, tính tỷ lệ mẫu lá mầm chết (lá có biểu hiện vàng, ngừng tăng trưởng), chọn ra nồng độ kanamycin tối thiểu gây chết 100% lá mầm để tiến hành chọn lọc mẫu chuyển gen *HBsAg*.

- Theo dõi sự sinh trưởng cây con trong 60 ngày, tính tỷ lệ mẫu chết, suy ra nồng độ kanamycin tối thiểu gây chết cây con, ảnh hưởng đến sự sinh trưởng cây cà chua để tiến hành chọn lọc cây chuyển gen *HBsAg*.

2.4.2 Xây dựng quy trình biến nạp gen vào lá mầm cây cà chua TN 412 bằng phương pháp dùng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Phương pháp thí nghiệm

Thời gian cho một đợt thí nghiệm từ lúc chuẩn bị vật liệu cho đến khi bắt đầu chọn lọc mẫu trên môi trường có bổ sung kháng sinh kanamycin là 11 - 12 ngày. Sau đó, cứ 2 tuần lại tiến hành cấy chuyển cho đến khi thu được cây chuyển gen. Mỗi đợt thí nghiệm được tiến hành với 100 mẫu lá mầm được xử lý với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, mỗi đĩa petri cấy 25 mẫu. Đối chứng (ĐC) không xử lý với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

Phương pháp thực hiện

Chuẩn bị dịch vi khuẩn

Vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 chứa plasmid mới mang gen tạo HBsAg được cấy chuyển và nuôi trong đĩa petri chứa môi trường LB - Km đặc ở 28⁰C trong 2 ngày. Dùng que cấy chuyển một khuẩn lạc *Agrobacterium tumefaciens* từ đĩa petri nói trên sang bình tam giác chứa môi trường AB lỏng. Lắc 250 vòng/phút qua đêm (khoảng 16 giờ) ở 28⁰C. Sau khoảng thời gian này, vi khuẩn ở pha log. Pha loãng 25 mL dịch vi khuẩn với 10 - 15 mL môi trường AB lỏng (LB lỏng) mới. Lắc thêm khoảng 3 - 4 giờ ở 28⁰C để có được dịch vi khuẩn lây nhiễm với mẫu lá mầm. Mật độ *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 được sử dụng biến nạp gen là: OD₆₀₀ = 0,5. Mật độ này được các tác giả chứng minh là nồng độ thích hợp nhất cho tần số biến nạp cao [60; 65, 89, 152].

Chuẩn bị lá mầm cà chua

Các mẫu lá mầm được chuẩn bị như ở thí nghiệm 2.4.1.1 (cắt bỏ phần cuống lá và phần đầu lá, đoạn sử dụng có kích thước 5 mm x 7 mm) và tiền nuôi cấy (pre-culture) trên môi trường tái sinh thích hợp trong thời gian 2 ngày (48 giờ).

Nuôi chung mẫu lá mầm với *Agrobacterium tumefaciens*

Cho mẫu lá mầm đã qua thời gian tiền nuôi cấy vào đĩa petri, sau đó cho dịch vi khuẩn vào ngập lá mầm. Để thời gian khoảng 20 phút. Sau đó, gắp các mẫu lá mầm đặt vào đĩa petri có giấy thấm, thấm ráo dịch vi khuẩn và cấy các mẫu vào môi trường tái sinh có bổ sung acetosyringone nồng độ (100 μ M). Tiến hành nuôi chung (co-cultivation) mẫu lá mầm với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* trong thời gian 2 ngày, ở điều kiện sáng.

Diệt vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Sau 2 ngày nuôi chung, tiến hành rửa mẫu cấy. Gắp những mẫu lá mầm đã ủ chung với vi khuẩn cho vào nước cất vô trùng, lắc nhẹ. Sau đó lại tiếp tục lắc mẫu trong nước cất vô trùng có bổ sung kháng sinh diệt khuẩn cefotaxime 500 mg/L trong 20 - 30 phút. Sau đó rửa lại bằng nước cất 1 - 2 lần. Gắp các mẫu cấy vào đĩa petri có giấy thấm. Cấy các mẫu vào môi trường tái sinh có cefotaxime 500 mg/L nhưng không có tác nhân chọn lọc kanamycin, trong 4 ngày.

Chọn lọc và tái sinh cây cà chua chuyển gen

Chuyển những mẫu cấy sang môi trường tái sinh có bổ sung kanamycin nồng độ 50 mg/L (ngưỡng tối thiểu gây chết mẫu lá mầm) và cefotaxime 500 mg/L, thời gian nuôi 15 ngày. Sau đó, tiếp tục cấy chuyển sang môi trường mới (vẫn môi trường tái sinh bổ sung kanamycin 50 mg/L và cefotaxime 500 mg/L) với chu kỳ 15 - 20 ngày. Cường độ và thời gian chiếu sáng, nhiệt độ và độ ẩm phòng (như trên).

Chỉ tiêu theo dõi

Theo dõi diễn biến của các mẫu cấy, cây chuyển mô sẹo/phác thể chồi hình thành mới (từ vết cắt mẫu lá mầm) trên môi trường có kanamycin 50 mg/L (thực hiện 4 chu kỳ chọn lọc, 15 – 20 ngày/chu kỳ) đến khi hình thành chồi lớn/cây con.

2.4.3 Kiểm tra sự hiện diện của các gen biến nạp và sự biểu hiện của chúng bằng phương pháp hóa mô tế bào, sinh học định tính và hóa sinh

Phương pháp thực hiện và chỉ tiêu theo dõi

2.4.3.1 Kiểm tra sự biểu hiện định tính của gen kháng kanamycin *nptII*

Thực hiện hai cách sau để kiểm tra các cây nhận được:

- Cấy chồi/cây con (chưa có rễ, cao 1,5 - 3 cm, tái sinh trên môi trường kanamycin có 50 mg/L) sang môi trường MS không chất điều hòa sinh trưởng có bổ sung kanamycin 100 mg/L để theo dõi khả năng sinh trưởng (phát triển rễ, thân, lá) trong thời gian 30 ngày; so sánh với đối chứng.

- Cấy mảnh lá thật (7 x 7 mm, của cây sinh trưởng trên môi trường không chất điều hòa sinh trưởng) trên môi trường tái sinh tốt nhất (BA 2,0 mg/L; IAA 0,5 mg/L) có kanamycin 100 mg/L để theo dõi khả năng tạo mô sẹo và tái sinh trong 30 ngày; so sánh với đối chứng.

2.4.3.2 Kiểm tra sự hiện diện của các gen *nptII*, *HBsAg* bằng kỹ thuật PCR

Tách chiết DNA (Xem phụ lục 4)

Hóa chất PCR

GoTag[®] Flexi DNA polymerase (M829B - Promega), 5X Green GoTag[®] Flexi buffer (M891A - Promega), AccuTaq[™] LA DNA polymerase (D5553 - Sigma), AccuTaq[™] LA 10X buffer (B0174 - Sigma), DMSO (Sigma), dNTPs (Sigma), MgCl₂ (Promega), nước không có nuclease (UltraPure[™] Distilled Water – 10977, Invitrogen).

Các cặp mồi chuyên biệt

- Mồi gen *HBsAg* (tham khảo theo công trình của Srinivas và cs, 2008)

Primer 1: HBV(F): 5' - TAC TGG ATC CAC CATGGA GAA CAT CAA CA - 3'

Primer 2: HBV(R): 5' - TCT AGA GCT CTT AAA TGT ATA CCC AGA AGA CAA AAG AA - 3'

- Môi gen *nptII*

Môi 1 (F): 5' – GCACA ACAGA CAATC - 3' 15bp

Môi 2 (R): 5' – CCGCC AAGCT CTTCA - 3' 15bp

Thang DNA chuẩn 1kb (Promega, Biolabs, Mỹ), dung dịch đệm TAE (10X stock): 48,4 g Tris base, 3,7 g EDTA disodium salt, 11,4 mL glacial acetic acid (17,4 M). Thêm nước cất vừa đủ 1 lít, chỉnh pH 8,2, Agarose (Bio-Rad, Mỹ).

Chương trình nhiệt của phản ứng PCR

- Gen *nptII*: 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; khuếch đại đoạn DNA có kích thước 600 bp.

- Gen *HBsAg* (Gao và cs, 2003): chương trình nhiệt: 94°C: 1 phút; 35 chu kỳ (94°C: 1 phút, 55°C: 1 phút, 72°C: 1 phút); 72°C: 10 phút; khuếch đại đoạn DNA có kích thước 681 bp.

Các thành phần cho một phản ứng PCR (phụ lục 5). Ghi nhận các băng DNA được khuếch đại của hai gen trên bản gel.

2.4.3.3 Giải trình tự sản phẩm PCR gen *HBsAg* của cây cà chua chuyển gen

Qua kết quả PCR gen *HBsAg* dương tính, lấy sản phẩm PCR đem giải trình tự. Trình tự DNA khuếch đại được giải trình tự theo phương pháp Sanger nhờ thiết bị giải trình tự DNA tự động ABI 3300 (Applied Biosystem) được thực hiện tại Công ty Phát Triển Công Nghệ Ứng Dụng Việt Nam (VNDAT Co. Ltd, TP. HCM).

Quy trình tổng quát các bước tiến hành giải trình tự DNA: Chuẩn bị mạch khuôn DNA cần giải trình tự, chạy phản ứng PCR giải trình tự, tinh sạch sản phẩm phản ứng PCR giải trình tự, thực hiện quá trình điện di và phân tích trình tự nhờ thiết bị giải trình tự DNA, thu kết quả giải trình tự.

2.4.3.4 Đánh giá cây cà chua chuyển gen *HBsAg* trong điều kiện vườn ươm ở thế hệ T₀

Các dòng cà chua chuyển gen được trồng ở vườn ươm tại Viện Sinh học Nhiệt đới đến khi ra hoa kết quả. Dùng quả để kiểm tra sự hiện diện của protein HBV.

Để cây trồng thích nghi dần từ điều kiện *in vitro* sang điều kiện *ex vitro* cần qua một số giai đoạn sau:

Đầu tiên, thay nắp cao su ở bình tam giác có cây cà chua chuyển gen bằng giấy đã khử trùng và đem đặt ở ngoài sáng tự nhiên giúp những cây cà chua chuyển gen này quen dần với điều kiện môi trường bên ngoài (khoảng 10 ngày). Sau đó, rửa sạch agar dính ở phần gốc của cây cà chua *in vitro* và trồng trong đất sạch của công ty Tribat (công ty Công nghệ Sinh học Sài Gòn Xanh), đặt trong tủ nuôi (phytotron) Versatile Environmental Test Chamber (Model: MLR-351H, Sanyo – Nhật Bản) cài đặt các thông số: 26⁰C, 6 bóng đèn huỳnh quang 40W (19.200 lux), ẩm độ 90% trong hai ngày đầu. Sau đó điều chỉnh ẩm độ xuống còn 70-80% và nuôi trong thời gian hai tuần.

Tiếp theo, cây được chuyển sang chậu lớn kích thước 22 cm x 15 cm, chứa đất sạch trộn với xơ dừa và phân trùn của Xí nghiệp Thanh An, công ty cây xanh Thành Phố Hồ Chí Minh, theo tỷ lệ thích hợp (1:1:1, v/v/v). Cây được đặt trong vườn ươm có che lưới nylon và lưới che nắng phục vụ cho trồng cây biến đổi gen (tại phòng Công nghệ Gen - Viện Sinh học Nhiệt đới), cường độ ánh sáng 30.000 – 50.000 lux, có hệ thống thông thoáng khí, với nhiệt độ 29⁰C±3, độ ẩm không khí khoảng 70%, tưới nước đủ ẩm 2 lần/ ngày, trong thời gian khoảng một tuần.

Chuyển cây ra trồng ở vườn ươm, cây cà chua sinh trưởng và phát triển bình thường trong điều kiện tự nhiên, tưới nước đủ ẩm hằng ngày khoảng 2 lần. Mỗi dòng cây cà chua chuyển gen T₀ (30 cây) được bố trí trồng ở khu vực riêng biệt để tránh xảy ra giao phấn chéo giữa các cây khác dòng phục vụ cho các thí nghiệm theo dõi sự di truyền của gen chuyển ở thế hệ T₁. Theo dõi, lấy mẫu tùy loại, tùy giai đoạn dùng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.4.3.5 Kiểm tra sự hiện diện và biểu hiện của gen *gusA* bằng kỹ thuật hóa mô (Jefferson và cs, 1987)

Mảnh lá (6 x 6 mm), đoạn cuống lá và thân cây *in vitro* (≈ 1 cm), quả non cắt ngang (Ø 3 - 4 mm) và lát cắt ngang (2 mm) quả chín của cây cà chua chuyển gen được cho vào ống Eppendorf hoặc đĩa petri, tạo ngậm mẫu bằng thuốc thử X-gluc

(β -glucuronide). Ủ ở 37°C qua đêm trong tủ ẩm để tạo biểu hiện GUS. Rửa mẫu nhiều lần bằng cồn 96° cho đến khi mất hết điệp lục tố/sắc tố, chỉ còn lại màu xanh chàm đặc trưng (indigo) (trường hợp chuyển gen) hoặc màu trắng trong hơi ngả vàng (đối chứng âm tính).

2.4.3.6 Phân tích Southern blot các dòng cà chua chuyển gen *HBsAg* [50]

Tách chiết DNA [46] (phụ lục 4)

Hóa chất

Điện di gel agarose

Agarose (A 9539 – 10 g Sigma, Mỹ), Low DNA Mass ladder (Invitrogen, Mỹ), DNA Molecular Weight Marker II (Roche, Đức).

Blotting

- Dung dịch biến tính (Denaturation solution): 43,83 g NaCl + 10 g NaOH hòa tan trong 500 mL nước cất.

- Dung dịch trung tính (Neutralisation solution): 87,65 g NaCl + 39,4 g Tris HCl hòa tan trong 400 mL nước, chỉnh pH 7,5 (bằng NaOH bột). Lên thể tích 500 mL.

- 20X SSC: 175,32 g NaCl + 88,23 g Sodium citrate hòa tan trong 800 mL nước cất, chỉnh pH 7. Lên thể tích 1000 mL.

Dung dịch lai

Thêm NaCl vào dung dịch lai để có nồng độ 0,5 M. Thêm tác nhân block để nồng độ cuối cùng 4% (w/v). Tốt nhất thêm tác nhân block từ từ vào dung dịch trong khi khuấy đều. Tiếp tục khuấy đều ở nhiệt độ phòng trong 1 - 2 giờ bằng dụng cụ khuấy từ. Buffer này có thể sử dụng liền hoặc trữ ở - 15°C đến - 30°C.

Dung dịch rửa 1

Urea 120 g	2 M
SDS 1 g	0,1% (w/v)
0,5 M Na phosphate pH 7.0 100 mL	50 mM

NaCl 8,7 g	150 mM
1,0 M MgCl ₂ 1 mL	1 mM
Blocking reagent 2 g	0.2% (w/v)
Dung dịch rửa 1 có thể trữ trên 1 tuần ở nhiệt độ 2 - 8 ⁰ C.	

Dung dịch rửa 2 - 20 x stock

Tris base 121 g	1 M
NaCl 112 g	2 M

pH = 10,0; pha thành 1 lít với nước. Có thể trữ trên 4 tháng ở nhiệt độ 2 - 8⁰C.

Dung dịch rửa 2 - pha loãng khi rửa

Pha loãng stock 1:20 và thêm 2 mL/L 1 M MgCl₂ để có nồng độ cuối cùng 2 mM Magnesium trong dung dịch.

Phương pháp thực hiện

Chuẩn bị đối chứng dương

Rã đông *E. coli*, cấy chuyên, lắc qua đêm ở 37⁰C. Ly trích DNA plasmid bằng kit mini của QIAGEN. Đo nồng độ DNA. Cắt DNA plasmid bằng enzyme cắt giới hạn. Điện di: 90 V/1,5 giờ cho vạch vàng xuống đáy gel. Thường dùng gel low melting (có thể dùng gel thường). Cắt băng DNA: xác định chính xác band cần lấy dựa trên kích thước. Ly trích DNA làm chứng dương bằng kit của QIAGEN.

Chuẩn bị probe và ladder

- Probe sử dụng là sản phẩm PCR của gen *HBsAg* với cặp mồi đặc hiệu cho gen này (tham khảo theo công trình của Srinivas và cs., 2008), primer 1: HBV(F): 5' - TAC TGG ATC CAC CATGGA GAA CAT CAA CA - 3' và primer 2: HBV(R): 5' - TCT AGA GCT CTT AAA TGT ATA CCC AGA AGA CAA AAG AA - 3' cho kích thước đoạn khuếch đại là 681 bp.

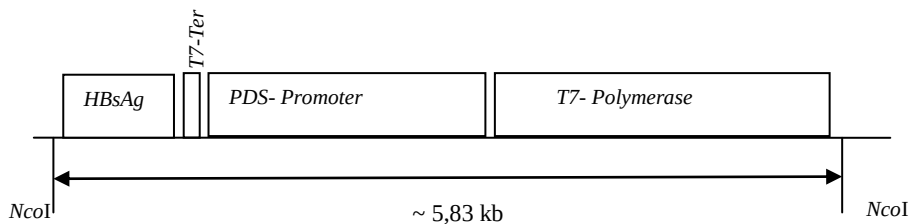
- PCR sử dụng buffer không màu, lưu ý bổ sung dung dịch MgCl₂. Đo nồng độ DNA sản phẩm PCR. Pha loãng để đạt nồng độ DNA 10 ng/μL. Tạo probe theo kit RPN3680C, 2006.

Chuẩn bị probe đánh dấu

Biến tính DNA (10 ng/ μ L, 10 μ L) trong nước sôi 95°C khoảng thời gian 5 phút. Làm lạnh trong đá (trong 5 phút). Ly tâm thời gian ngắn (30 giây). Thêm dung dịch phản ứng (10 μ L) và trộn đều. Thêm tác nhân đánh dấu (2 μ L) và trộn đều. Thêm cross-linker (đã pha loãng 10 μ L) trộn và ly tâm thời gian ngắn. Ủ ở 37°C trong 30 phút. Probe đánh dấu có thể sử dụng ngay hoặc trữ trong đá [hoặc trong glycerol 50% (v/v)].

Chuẩn bị mẫu và chạy điện di

- Cho 10 μ g DNA của mỗi dòng được chuyển nạp gen và đối chứng âm (cây không được chuyển nạp gen) ủ với enzyme giới hạn *Nco*I ở 37°C trong 4 - 5 giờ.



Hình 2.4 Sơ đồ đoạn DNA sau khi xử lý bằng enzyme giới hạn *Nco*I

Đoạn DNA nhận được có chứa gen *HBsAg* + *T7* terminator + promoter *PDS* + *T7* RNA polymerase có kích thước khoảng 5,83 kb (hình 2.4).

- Chạy mẫu DNA trên 0,8% agarose (A 9539-10g Sigma), điện di mẫu ở 20 volt qua đêm cùng với thang chuẩn DNA Molecular Weight Marker II. Chụp ảnh bản gel bằng máy chụp Gel-Documentation.

Chuyển DNA từ gel lên màng

Ngâm gel trong dung dịch biến tính trong 15 phút, lắc nhẹ trong khi ngâm gel. Lặp lại hai lần bước này. Rửa gel bằng nước cất. Trung hoà gel trong dung dịch trung hòa trong 15 phút, lắc nhẹ trong khi ngâm gel. Lặp lại hai lần bước này. Đổ dung dịch 20X SSC vào khay có tấm kính thủy tinh đặt trên thành khay. Dùng giấy thấm 51B phủ lên tấm kính và hai đầu giấy nhúng vào dung dịch 20X SSC. Để gel

vào trên giấy thấm, phủ màng Nylon (REF 11 417 240 001, Roche) trên miếng gel sao cho không có bọt khí. Đặt tiếp 3 miếng giấy thấm 3MM (đã thấm ướt bằng dung dịch 20X SSC) có kích thước bằng miếng gel lên trên màng. Phủ một chồng giấy thấm lên phía trên. Đặt một vật nặng lên trên cùng (một chồng giấy khoảng 0,5 kg) và để qua đêm.

Lai mẫu

DNA được gắn trên màng bằng cách xử lý màng trong máy UVP TL – 2000 Ultra violet Translynker với thời gian 30 giây mỗi mặt. Chuẩn bị dung dịch lai AlkPhos Direct (thêm NaCl/block). Tiền lai màng lai (15 phút ở 55⁰C), 0,125 - 0,25 mL buffer/ cm² màng lai. Thêm probe đánh dấu (5-10 ng/mL buffer). Lai qua đêm ở 55⁰C, lắc nhẹ.

Rửa mẫu sau khi lai

Làm nóng dung dịch rửa 1 ở 55⁰C. Đặt màng lai trong dung dịch rửa 1: 1 - 2 mL/cm². Rửa 2 lần, mỗi lần 10 phút, lắc nhẹ ở 55⁰C. Chuẩn bị dung dịch rửa 2. Rửa màng lai trong 1 - 2 mL/cm² ở nhiệt độ phòng 2 lần, mỗi lần 5 phút, lắc nhẹ.

Phát hiện với tác nhân CDP-Star

Rút hết dung dịch rửa còn thừa khỏi màng lai. Cho tác nhân phát hiện CDP-Star (sử dụng 30 - 40 µL/cm²). Để 2 - 5 phút ở nhiệt độ phòng. Phủ màng lai với SaranWrap. Hiện phim bằng Amersham HyperfilmTM ECL (GE Healthcare, Mỹ) với thời gian khác nhau.

Phát hiện bằng cơ chất ECF

Chuẩn bị cơ chất ECF. Rút hết dung dịch rửa còn thừa khỏi màng lai. Cho cơ chất ECF (sử dụng khoảng 25 µL/cm²). Để 1 phút ở nhiệt độ phòng. Bọc kín màng lai trong túi phát hiện. Scan màng lai bằng dụng cụ fluorescent scanning.

2.4.3.7 Kiểm tra nhanh sự hiện diện của protein HBsAg ở quả cây T₀ bằng que thử đặc hiệu

Dùng que thử phát hiện protein HBsAg của công ty Clinotech Diagnostics (Canada) có độ nhạy và độ chính xác cao (99,9%). Ghi nhận sự hiện diện của vạch

dương tính (test line) bên dưới vạch đối chứng (control line). Ở thử nghiệm này, ngoài protein quả, protein lá cây chuyển gen cũng được sử dụng.

2.4.3.8 Phân tích protein tổng số dùng điện di trên gel polyacrylamide (SDS-PAGE) (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) [23]

Tách chiết protein

Phương pháp thực hiện [102, 184]

Tách protein tổng số thực vật dựa theo phương pháp của Zhou và cs., 2008.

- Pha dung dịch tách chiết: 50 mM HEPES-KOH pH 7,5, 10 mM KAc, 5 mM MgAc, 1 mM EDTA, 2 mM PMSF, 1% β -mercaptoethanol.
- Cân 300 mg mẫu tươi bỏ vào Eppendorf 2 mL và nghiền trong nitrogen lỏng. Thêm vào 1 mL dung dịch tách chiết, ủ ở 4°C trong 20 phút.
- Ly tâm mẫu ở 14.000 vòng/phút trong 20 phút. Hút lấy phần dịch trong cho vào tube mới. Lập lại bước này một lần nữa.
- Chia dịch tách chiết protein thành mỗi 100 μ L trong các Eppendorf và bảo quản ở - 20°C.

Định lượng protein bằng phương pháp Bradford [24]

Hóa chất

Dung dịch BSA 10 mg/mL chuẩn (Promega, Mỹ), 1x Dye Reagent: Bình 1 lít thuốc nhuộm (Bio-Rad, Mỹ).

Phương pháp Bradford

Chọn phương cách dùng cuvette 1 mL để đo OD. Lấy bình thuốc thử ra khỏi nơi bảo quản 4°C, để ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Lắc đều trước khi sử dụng. Pha các nồng độ BSA chuẩn từ 2 mg/mL, 1,5 mg/mL, 1 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL. Lấy 20 μ L các nồng độ BSA cho vào mỗi Eppendorf và thêm 1 mL thuốc nhuộm.

Chuẩn bị mẫu blank là nước cất với thuốc nhuộm. Chuẩn bị các mẫu protein khảo sát: lấy 10 μ L dịch protein, thêm 10 μ L nước cất và 1 mL thuốc nhuộm. Đo các mẫu ở bước sóng 595 nm bằng máy Biomate 5 (Thermo, Mỹ).

Xây dựng đồ thị đường chuẩn. Dựa vào phương trình $C = k \times A$, hệ số pha loãng 5 lần, nồng độ protein tổng của các mẫu được tính theo phương trình trên từ giá trị OD đo được với đơn vị mg protein/ g mẫu tươi. Số liệu lặp lại 3 lần đo OD được xử lý bằng phần mềm SPSS 16.

Hóa chất khác

- Dung dịch 30% acrylamide/Bis 29:1 (Bio-Rad). TEMED (T9281 - Sigma).
- Dung dịch SDS 10%: Hòa 10 g SDS vào nước cất để dung dịch đạt 100 mL.
- Dung dịch Tris HCl 1,5 M pH 8,8: Hòa tan 18,165 g Tris base vào 80 mL nước cất, chỉnh đến pH 8,8 bằng HCl đậm đặc, thêm nước cất đến 100 mL.
- Dung dịch Tris HCl 0,5 M pH 6,8: Hòa tan 6,055 g Tris base vào 80 mL nước cất, chỉnh đến pH 6,8 bằng HCl, thêm nước cất đến 100 mL.
- Dung dịch APS 10%: cân 100mg APS, pha trong 1 mL nước cất 2 lần.
- Dung dịch nạp mẫu 5X: 0,25 M Tris HCl pH 6,8, 30% glycerol, 10% SDS, 0,02% bromophenol blue. Thêm 5% β -mecarptoethanol vào trước khi dùng.
- Full-range Rainbow Molecular Weight Marker RPN800E (GE Healthcare).
- Dung dịch đệm chạy điện di protein 10X: 248 mM Tris base (30,03 g), 1,92 M glycine (144 g), 1% SDS (10 g) trong nước cất thành 1 lít. Không chỉnh pH, lọc hoặc loại bọt khí. Pha loãng thành dung dịch 1X để chạy điện di.
- Dung dịch nhuộm protein trên gel: Bio SafeTM Coomassie (Bio-Rad, Mỹ).

Phương pháp thực hiện

Chuẩn bị Resolving gel

Lắp 2 miếng kính vào khuôn để chuẩn bị đổ gel. Pha dung dịch đổ lớp Resolving gel 12% theo bảng 2.1, trộn đều. Dùng micropipette cho gel vào khuôn (khoảng 3,5 mL cho một gel). Lớp gel thứ 1 được đổ cách miệng khuôn khoảng 3

cm. Sau đó cho vào một lớp nước cất 2 lần để quá trình polymer hóa xảy ra. Đợi gel đông trong 30 phút.

Bảng 2.1 Thành phần của resolving gel và stacking gel

Thành phần	Resolving gel 12% (lớp gel ở dưới)	Stacking gel 4% (lớp gel ở trên)
30% (w/v) Acrylamide-Bis	4 mL	0,65 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 mL	-
0.5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	1,25 mL
10% (w/v) SDS	100 μ L	50 μ L
Nước cất 2 lần	3,4 mL	3,05 mL
TEMED	10 μ L	5 μ L
Ammonium persulphate	100 μ L	50 μ L

Chuẩn bị Stacking gel

Pha dung dịch đổ lớp Stacking gel 4% theo bảng 2.1. Đổ lớp nước cất ra hết, dùng giấy thấm khô và đổ Stacking gel vào khuôn cho đến khi đầy miệng khuôn. Đặt lược vào khuôn và đợi gel đông trong 30 phút.

Chạy điện di

- Lắp gel vào buồng điện di Mini Protean 3 (Bio-Rad) và đổ dung dịch chạy điện di protein 1X vào (đổ khoảng 2/3 bể).

- Chuẩn bị mẫu: Hút 15 μ L protein khảo sát trộn với 15 μ L dung dịch nạp mẫu 5X, đun nóng ở 95°C trong 4 phút. Cho mẫu vào giếng theo thứ tự nhất định.

- Đậy nắp khung và cắm điện, chạy điện di ở 90 volt trong 1 giờ 45 phút.

Nhuộm gel

Gel được lấy ra khỏi khuôn, cắt bỏ lớp gel trên, và rửa 3 lần với nước cất trong vòng 10 phút. Sau đó gel được nhuộm với thuốc nhuộm Bio Safe Coomassie trong

1 tiếng. Đổ bỏ thuốc nhuộm và rửa với nước cho đến khi nền gel trong suốt. Quan sát kết quả bằng mắt thường.

Xác định trọng lượng phân tử của protein

- Đo khoảng cách di chuyển của các band protein từ gel phân tách tới các band protein và khoảng cách di chuyển từ gel phân tách tới vạch màu cuối cùng.

- Tính giá trị Rf:

$$R_f = \frac{\text{Khoảng cách di chuyển của protein}}{\text{Khoảng cách di chuyển của vạch màu bromophenol blue}}$$

- Vẽ biểu đồ $\log_{10}$ các giá trị trọng lượng phân tử của các protein chuẩn và các giá trị Rf của chúng. Trọng lượng phân tử của các vạch protein chưa biết trọng lượng phân tử có thể xác định dựa vào giá trị Rf của chúng thông qua phương pháp ngoại suy từ đồ thị.

2.4.3.9 Phân tích Western blot các dòng cà chua chuyển gen *HBsAg* [49, 51]

Tách chiết protein tổng số (như đã nêu)

Hóa chất

- Dung dịch 1X PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 , 0,24 g KH_2PO_4 thêm nước cất vừa đủ 1 lít, pH 7,4 (chỉnh bằng HCl đậm đặc).

- Dung dịch PBST: PBS có 0,1% Tween 20.

- Dung dịch đệm chuyển protein qua màng 1X: 2,91 g Tris base, 1,465 g glycine, 100 mL methanol, thêm nước cất đến 500 mL.

- Dung dịch cố định: PBST có 5% sữa không béo Marvel.

- Kháng thể đa dòng HBsAg (SAB4700767, Sigma)

- Kháng thể đơn dòng có gắn HRP (PA1-73087, ThermoFisher ScientificTM)

- Màng Amersham Hybond-P (PVDF) (RPN2020P-GE Healthcare, Anh)

- ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (PRPN 2132-GE Healthcare, Anh).

Phương pháp thực hiện

- Dung dịch chuyển protein qua màng được pha mới cho mỗi lần sử dụng. Nên pha khi đang chạy điện di protein.

- Cắt bỏ phần stacking gel và chuyển gel vào trong hộp có chứa dung dịch chuyển protein. Lắc nhẹ 20 phút ở nhiệt độ phòng để loại muối và SDS. Đồng thời, cắt màng Hybond-P (RPN2020P – GE Healthcare) có kích thước bằng miếng gel và làm ướt màng trước bằng methanol, tráng qua nước cất rồi ngâm trong dung dịch chuyển protein. Sáu miếng giấy thấm 3MM cũng được cắt bằng miếng gel cũng được làm ướt bằng dung dịch chuyển protein.

- Chuyển protein từ gel sang màng bằng thiết bị semi-dry blotter (Apelex). Để vào chính giữa 3 miếng giấy thấm 3MM, cho 3 mL dung dịch chuyển protein lên trên, tiếp theo đặt màng Hybond-P lên trên 3 miếng giấy thấm. Dùng ống nghiệm lăn cho hết bọt khí. Cần thận đặt miếng gel lên trên màng sao cho không có bọt khí. Cuối cùng đặt 3 miếng giấy thấm 3MM lên trên cùng. Cho 3 mL dung dịch chuyển protein lên giấy thấm.

- Gắn máy semi-dry blotter vào nguồn điện và chạy trong 1 giờ với cường độ dòng điện 120 mA (3 mA cho 1 cm² màng).

- Ngâm, lắc nhẹ màng trong dung dịch cố định 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa nhanh màng với dung dịch PBST, ngâm lắc màng hai lần, mỗi lần 5 phút với dung dịch PBST.

- Ngâm lắc nhẹ màng trong dung dịch kháng thể thứ nhất (SAB4700767, Sigma pha trong dung dịch cố định theo tỷ lệ 1:500) trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa màng bằng PBST, tráng nhanh 1 lần và ngâm lắc nhẹ màng 15 phút 2 lần.

- Ngâm lắc nhẹ màng với dung dịch kháng thể thứ hai (PA1-73087, ThermoFisher Scientific TM pha trong dung dịch cố định theo tỷ lệ 1:200) trong 2

giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa màng bằng PBST, tráng nhanh 1 lần và ngâm lắc nhẹ màng 15 phút 2 lần. Sau đó, rửa màng bằng PBS 5 phút, rồi 5 phút với nước cất để loại bỏ Tween 20.

- Thêm 5 mL dung dịch phát hiện (ECL-Plus detection solution), lắc đều trong 5 phút. Lấy màng ra, đặt giữa hai miếng giấy kiếng, vuốt nhẹ cho hết bọt khí. Hiện phim bằng Amersham HyperfilmTM ECL (GE Healthcare).

2.4.3.10 Kiểm tra hàm lượng protein HBsAg bằng phương pháp ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) [13, 31]

Tách chiết protein tổng số (như đã nêu)

Hóa chất

- Dung dịch đệm (Coating buffer): 100 mM NaHCO₃ pH 8,5.
- Dung dịch 1 x TBS: 144 mM NaCl, 25 mM Tris base, thêm nước cất vừa đủ 1 lít, pH 7,5 (chỉnh bằng HCl đậm đặc).
- Dung dịch rửa - TBST: dung dịch 1 x TBS, 0,05% Tween 20 (Sigma).
- Dung dịch 1 x PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ thêm nước cất vừa đủ 1 lít, pH 7,4 (chỉnh bằng HCl đậm đặc).
- Dung dịch cố định: PBS có 2,5% BSA (A7906 – Sigma).
- Kháng thể thứ nhất: Kháng thể đa dòng, SAB4700767 (Sigma).
- Kháng thể thứ hai: Kháng thể đơn dòng có gắn biotin, PA1-73088 (ThermoFisher ScientificTM).
- Protein chuẩn: Protein tái tổ hợp HBsAg BF 6015 - Aalto Bio Reagents (Ireland).
- Streptavidin-Alkaline Phosphatase (mã số 1089 161 – Boehringer Mannheim).
- Cơ chất Sigma FastTM pNPP (mã số N1891-5Set – Sigma, Mỹ).

- Dung dịch ngừng phản ứng: NaOH 1M
- Đĩa COSTAR màu trắng 96 giếng (mã số 3797 – Corning Incorporated, Mỹ).

Phương pháp ELISA sandwich [118]

Ngày thứ nhất:

- Pha hóa chất, chuẩn bị dụng cụ cần thiết.
- Coating đĩa: Cho 50 μL SAB4700767 vào trong 4,95 mL dung dịch coating, sau đó cho vào mỗi giếng 100 μL . Bọc đĩa bằng giấy paraffin để tránh bay hơi và ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng.

Ngày thứ hai:

- Dùng máy ImmunoWash Model 1575 (BioRad, Mỹ) rửa đĩa bằng dung dịch 1X TBST ba lần, mỗi lần 200 μL . Cho 200 μL dung dịch cố định vào mỗi giếng, bọc đĩa bằng giấy paraffin và ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng.
- Chuẩn bị đường chuẩn protein tái tổ hợp HBsAg BF 6015 ở các nồng độ 3,0; 1,5; 0,75; 0,375; 0,1875; 0,09375; 0 ng/mL bằng cách pha protein HBsAg trong dung dịch cố định 2,5% BSA/PBS. Chuẩn bị mẫu khảo sát bằng cách pha loãng mẫu trong dung dịch cố định 2,5% BSA/PBS theo tỷ lệ 1:100.
- Rửa đĩa bằng dung dịch 1X TBST 3 lần, mỗi lần 200 μL . Cho 100 μL các nồng độ HBsAg chuẩn và 100 μL mẫu protein khảo sát vào mỗi giếng. Bọc đĩa bằng giấy paraffin để tránh bay hơi và ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng.

Ngày thứ ba:

- Chuẩn bị kháng thể thứ hai: Thêm 50 μL dung dịch stock biotinylated antibody conjugate (PA1-73088) vào trong 4950 μL 2,5% BSA/PBS đạt tỷ lệ (1:100).
- Rửa đĩa bằng dung dịch 1X TBST 6 lần, mỗi lần 200 μL . Cho 100 μL dung dịch kháng thể thứ hai đã chuẩn bị vào mỗi giếng và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng.

- Rửa đĩa bằng dung dịch 1X TBST 6 lần, mỗi lần 200 μ L. Pha loãng 10 μ L stock Streptavidin-AP trong 5 mL dung dịch 2,5% BSA/PBS. Cho vào mỗi giếng 100 μ L vào ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

- Rửa đĩa bằng dung dịch 1X TBST 6 lần, mỗi lần 200 μ L. Cho 100 μ L dung dịch pNPP (1 viên 5 mg pha trong 5 mL nước cất) vào mỗi giếng theo một thứ tự nhất định. Ủ trong tối khoảng 10 phút. Cho vào 100 μ L dịch ngừng phản ứng NaOH 1 M mỗi giếng cũng theo thứ tự như khi cho dung dịch pNPP.

- Đọc kết quả bằng máy Benchmark Plus – microplate spectrophotometer (Bio-Rad, Mỹ).

2.4.4 Kiểm tra sự di truyền của gen chọn lọc *nptII* và gen chuyển mục tiêu *HBsAg* ở thế hệ T_1 bằng phương pháp sinh học định tính và PCR

2.4.4.1 Kiểm tra khả năng kháng kháng sinh kanamycin của một số cây con thế hệ T_1 bằng phương pháp sinh học định tính

Phương pháp thí nghiệm

Lấy ngẫu nhiên 40 hạt/dòng cà chua chuyển gen cây T_0 và gieo nảy mầm trên giá thể giấy thấm bão hòa dung dịch 100 mg/L kanamycin để đánh giá định tính khả năng kháng kanamycin.

Phương pháp thực hiện và chỉ tiêu theo dõi

Sau giai đoạn khử trùng bên ngoài quả cà chua 3 dòng cây T_0 bằng dung dịch Sodium hypochlorite 50% (v/v); bỏ quả thu hạt, rửa nước loại bỏ lớp nhầy xung quanh hạt và gieo hạt trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS không chất ĐHST có bổ sung kháng sinh kanamycin 100 mg/L. Kiểm tra khả năng nảy mầm của những hạt T_0 này (cây thế hệ T_1) sau 7 ngày và xác định tỷ lệ phân ly di truyền đối với gen kháng kanamycin *nptII* (dùng tiêu chuẩn khi bình phương χ^2 để kiểm định sự phù hợp hay không phù hợp với tỷ lệ phân ly lý thuyết 3:1 của đơn gen)

$$\chi^2 = \sum (\text{số liệu thực tế} - \text{số liệu dự kiến})^2 / \text{số liệu dự kiến} \quad [75]$$

2.4.4.2 Kiểm tra sự hiện diện của gen *nptII*, gen *HBsAg* bằng kỹ thuật PCR và tỷ lệ phân ly của gen *nptII* và gen *HBsAg* ở thế hệ T_1

Phương pháp thí nghiệm

Lấy ngẫu nhiên mẫu lá (2 lần lặp lại) của 16 cá thể từ 01 dòng cây T_1 để tách chiết DNA cho PCR dùng đánh giá có sự hiện diện của hai gen ở thế hệ này hay không.

Phương pháp thực hiện và chỉ tiêu theo dõi

Dùng kỹ thuật PCR đối với các gen *HBsAg*, gen kháng kanamycin *nptII* - khuếch đại các băng DNA mong đợi (expected band) theo thứ tự ≈ 681 bp, 600 bp (tương tự trường hợp cây T_0). Sau chạy điện di trên gel, ghi nhận sự hiện diện của các băng DNA khuếch đại mong đợi ở các cá thể T_1 và bước đầu đánh giá sự liên kết di truyền của hai gen *nptII* và *HBsAg* qua so sánh kết quả khuếch đại thể hiện trên 2 bản gel. Cũng ghi nhận sự tương quan về tỷ lệ phân ly giữa kết quả thể hiện trên bản gel và kết quả sau đánh giá định tính khả năng kháng kanamycin.

2.5 Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm thống kê SPSS 16 để đánh giá kết quả thí nghiệm trên bảng kết quả ANOVA một yếu tố hoàn toàn ngẫu nhiên và kiểm tra mức độ khác biệt giữa các nghiệm thức theo trắc nghiệm Duncan.

Các số liệu là tỉ lệ phần trăm biến động từ 0 – 100% được chuyển đổi sang dạng $\text{Arcsin}\sqrt{x}$, nếu giá trị x là 0% sẽ được thay thế bởi $1/4n$ với n là số mẫu dựa trên để tính phần trăm, nếu x là 100% sẽ được thay thế bởi $1 - 1/4n$ [57].

CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Qua xây dựng, triển khai thực hiện các nội dung nghiên cứu nhằm đạt mục tiêu như đã trình bày trong phần mở đầu trên đối tượng cà chua TN412, đã thu được các kết quả và chúng được trình bày dưới đây.

3.1 Khảo sát ảnh hưởng của BA, IAA lên sự tái sinh chồi *in vitro* từ lá mầm và ảnh hưởng của kháng sinh kanamycin lên lá mầm, cây con *in vitro*

3.1.1 Ảnh hưởng của BA, IAA lên sự tái sinh chồi *in vitro* từ lá mầm

Những kết quả khảo sát tái sinh chồi từ lá mầm nuôi cấy *in vitro* đã được công bố [15, 55, 89, 180]. Theo các tác giả El-Siddig và cs. (2009), Sharma và cs. (2009), Ammara và cs. (2014) và Gerszberg và cs. (2015), mẫu lá mầm được chứng minh có hiệu quả tái sinh và biến nạp cao hơn trụ lá mầm. Do vậy, ở thí nghiệm này, vật liệu lá mầm và các chất điều hòa sinh trưởng (được sử dụng nhiều nhất trong các công trình đã công bố ở trên) là BA và IAA cũng được sử dụng cho nghiên cứu. Nồng độ IAA được sử dụng trong các môi trường tái sinh khảo sát là 0,5 mg/L, nồng độ BA từ 1,25 mg/L đến 2,5 mg/L.

Kết quả bảng 3.1 cho thấy ở môi trường BA 2,0 mg/L, tỷ lệ mẫu tái sinh cao nhất là 87,40% và ở môi trường BA 1,25 mg/L, tỷ lệ mẫu tái sinh thấp nhất là 59,26%. Ở môi trường có nồng độ BA tăng dần từ 1,25 mg/L đến 2,0 mg/L, tỷ lệ mẫu lá mầm tái sinh cũng tăng dần (từ 59,26% đến 87,40%). Ở môi trường có nồng độ BA 2,25 mg/L và 2,5 mg/L tỷ lệ tái sinh giảm dần (đến 75,18%).

Về số chồi hình thành trên một mẫu lá mầm tái sinh, số chồi cao nhất ở môi trường BA 2,0 mg/L với trung bình 3,55 chồi trên một mẫu tái sinh, số chồi trên mẫu tái sinh ít nhất ở môi trường có BA 1,25 mg/L (1,49 chồi). Số chồi trên một mẫu tái sinh tăng dần ở môi trường có nồng độ BA từ 1,25 mg/L đến 2 mg/L (từ 1,49 đến 3,55 chồi) và giảm dần ở môi trường có nồng độ BA 2,25 mg/L và 2,5 mg/L (giảm đến 2,84).

Như vậy, tỷ lệ mẫu lá mầm tái sinh và số chồi hình thành trên một mẫu lá mầm tái sinh tăng theo nồng độ BA (từ 1,25 mg/L đến 2,0 mg/L) và đạt cao nhất ở

nồng độ BA 2,0 mg/L. Sau đó, nếu tăng nồng độ BA (2,25 mg/L và 2,50 mg/L) thì tỷ lệ mẫu lá mầm tái sinh và số chồi hình thành trên một mẫu lá mầm tái sinh giảm [kết quả này cũng được ghi nhận ở nghiên cứu của Yasmeen và cs. (2009); Ishag và cs. (2009)]. Ở môi trường khoáng cơ bản MS, vitamin B5 kết hợp với IAA 0,5 mg/L và BA 2,0 mg/L được xem là môi trường tái sinh tốt nhất với tỷ lệ mẫu tái sinh cao nhất, số chồi trên một mẫu tái sinh nhiều nhất. Trong môi trường tái sinh này, mô sẹo được hình thành nhiều tại vị trí vết cắt tiếp xúc với môi trường, thường ở đầu cuống lá mầm, ít hình thành ở mép lá, giữa lá, kích thước khối sẹo lớn do vậy số lượng chồi có khả năng tái sinh nhiều.

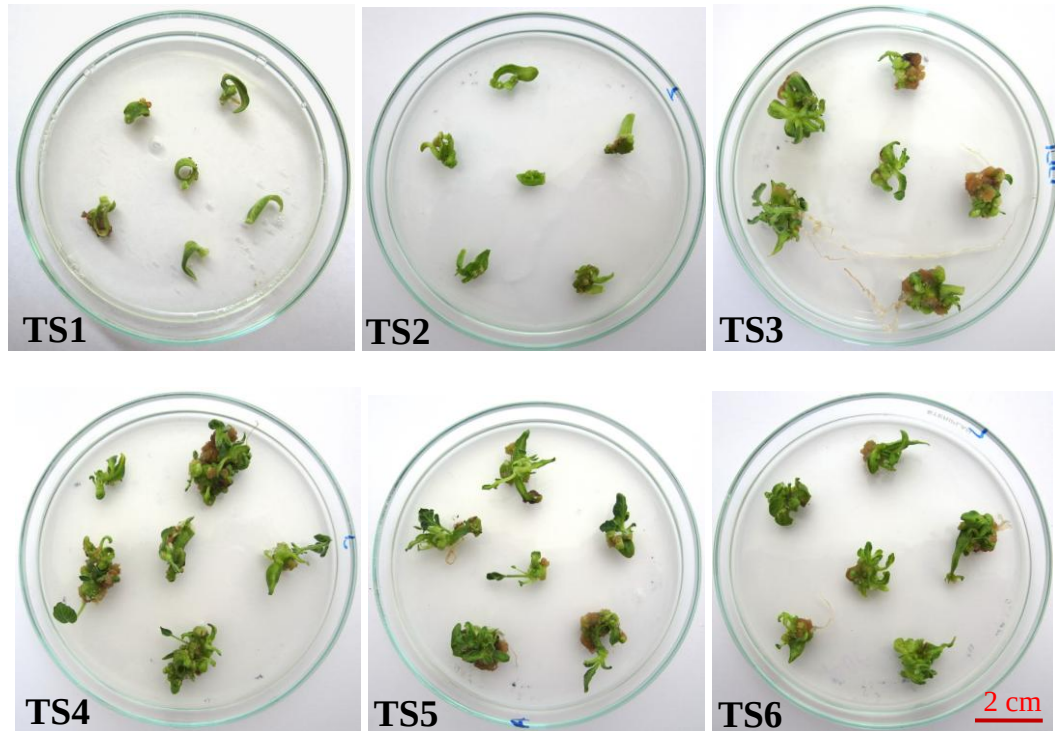
Bảng 3.1 Ảnh hưởng của nồng độ BA lên sự tái sinh chồi từ lá mầm cà chua ở 42 ngày sau cấy (NSC)

Nồng độ BA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu lá mầm tái sinh (TB $\pm$ SE) (%)	Số chồi hoàn chỉnh/ mẫu tái sinh (TB $\pm$ SE) (chồi)
1,25	59,26 $\pm$ 1,61 e	1,49 $\pm$ 0,10 e
1,50	67,41 $\pm$ 0,97 d	2,09 $\pm$ 0,06 d
1,75	79,63 $\pm$ 0,74 b	2,73 $\pm$ 0,06 c
2,00	87,40 $\pm$ 0,97 a	3,55 $\pm$ 0,06 a
2,25	82,22 $\pm$ 1,69 b	3,09 $\pm$ 0,08 b
2,50	75,18 $\pm$ 1,61 c	2,84 $\pm$ 0,03 c
CV (%)	3,05	4,91

Ghi chú: Các số có chữ cái khác nhau trong cùng một cột thì sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức $P \leq 0,05$ theo phân hạng của Duncan.

Theo các nghiên cứu trên thế giới, trong môi trường tái sinh, cytokinin BA có vai trò quan trọng trong thúc đẩy tái sinh chồi từ lá mầm nuôi cấy *in vitro*. Tuy nhiên nồng độ thích hợp phụ thuộc vào giống cà chua nghiên cứu [83]. Ngược lại, nồng độ IAA áp dụng lại ít thay đổi qua ghi nhận ở các công trình của Roy và cs. (2006), Yasmeen (2009), Goel và cs. (2010) - đều sử dụng nồng độ IAA là 0,5 mg/L. Ở công trình của Sharma và cs. (2009); Zhang và cs. (2012); Raj và cs.

(2005), nồng độ IAA sử dụng là 0,1 mg/L. Tuy chỉ cần một lượng nhỏ nhưng IAA không thể thiếu trong môi trường tái sinh lá mầm. Khi môi trường tái sinh chỉ có mặt BA, không có IAA thì hiệu quả tái sinh, biến nạp giảm [146].



Hình 3.1 Chồi tái sinh từ mẫu lá mầm cà chua trên các môi trường khảo sát có bổ sung nồng độ BA từ 1,25 mg/L đến 2,5 mg/L ở 42 NSC - TS1: nồng độ BA 1,25 mg/L; TS2: nồng độ BA 1,5 mg/L; TS3: nồng độ BA 1,75 mg/L; TS4: nồng độ BA 2,0 mg/L; TS5: nồng độ BA 2,25 mg/L; TS6: nồng độ BA 2,5 mg/L

Ngoài ra, một số tác giả khác bổ sung thêm cytokinin TDZ vào môi trường tái sinh giúp gia tăng số lượng chồi tái sinh / mẫu lá mầm [83]. Điều này có thể do khi có mặt cả hai loại cytokinin trong môi trường tái sinh sẽ có tác động cộng hợp lên sự biệt hóa tế bào ở lá mầm cà chua. Nhưng tác dụng của TDZ lên sự tái sinh chồi từ lá mầm cũng có mặt hạn chế. Nếu sử dụng TDZ liên tục trong khoảng thời gian từ 5 - 6 tuần thì chồi có biểu hiện ngắn và không tăng kích thước do tác dụng ức chế của TDZ lên sự kéo dài chồi. Do đó, để khắc phục vấn đề này, khi chồi hình thành và có kích thước khoảng 3 - 5 mm thì chồi sẽ được chuyển sang môi trường

có IAA và BA giúp tăng kích thước chồi. Ngoài chất điều hòa sinh trưởng BA thì zeatin cũng được sử dụng trong môi trường tái sinh lá mầm ở một số nghiên cứu của các tác giả Sharma và cs. (2009); Mandaokar và cs. (2000). Zeatin cũng giúp tăng hiệu quả biến nạp gen ở lá mầm cà chua nhưng zeatin phải được sử dụng cùng với IAA bởi vì nếu trong môi trường tái sinh không có IAA thì một số mô sẹo mặc dù xanh và khỏe nhưng vẫn thể hiện sự chậm sinh trưởng, không biệt hóa thành chồi trong thời gian 6 tháng cấy truyền trên môi trường mới (theo chu kỳ 15 ngày/lần) [146]. Zeatin thường được sử dụng để tái sinh chồi từ trụ lá mầm cà chua, có tác dụng tăng cường sự biệt hóa tế bào [140, 180]. Đối với sự tái sinh lá mầm cà chua, BA được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu trên thế giới, giúp tăng cường hình thành chồi [42] và tỷ lệ tái sinh lá mầm có thể lên tới 92% [14]. Theo lý thuyết về tính toàn năng của tế bào, các tế bào thực vật bậc cao có khả năng tái sinh cơ quan và hình thành cây con hoàn chỉnh trong điều kiện nuôi cấy thích hợp. Trong môi trường tái sinh, BA kết hợp với IAA sẽ giúp tế bào phân chia, tăng tỷ lệ tái sinh lá mầm và nồng độ BA thích hợp nhất là 2,0 mg/L, không vượt quá 3,0 mg/L bởi vì khi nồng độ BA cao thì phần trăm mẫu tái sinh và biến nạp giảm, mẫu sẽ tạo quá nhiều mô sẹo và khả năng phát sinh chồi không hiệu quả [70].

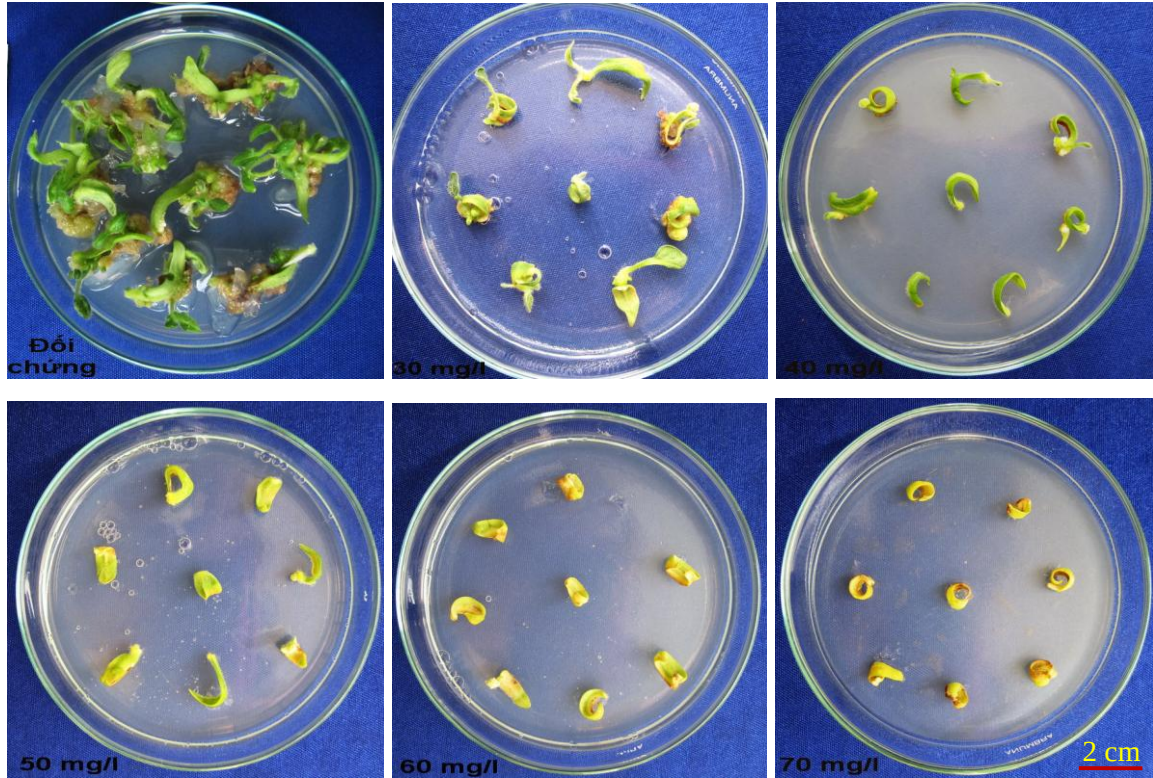
3.1.2 Ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh kanamycin lên lá mầm, cây con

3.1.2.1 Ảnh hưởng của nồng độ kanamycin lên sự tái sinh của mẫu lá mầm

Kết quả phần trăm tái sinh chồi ở 28 ngày sau cấy từ mẫu lá mầm nuôi cấy trên môi trường tái sinh tốt nhất [ghi nhận ở thí nghiệm 3.1.1 (môi trường MS + vitamin B5 + IAA 0,5 mg/L + BA 2,0 mg/L) có bổ sung kanamycin theo nồng độ tăng dần từ 30, 40, 50, 60, 70 mg/L được trình bày ở bảng 3.2, hình 3.2.

Ở nồng độ kháng sinh kanamycin 30 – 40 mg/L, mô sẹo hình thành nhưng lượng mô sẹo không nhiều, số chồi ít, tỷ lệ lá mầm tái sinh cũng giảm. Ở nồng độ kanamycin 50 mg/L mẫu lá mầm có biểu hiện chết, không có khả năng tái sinh, lá ngả màu vàng. Kết quả này phù hợp với kết quả của một số công trình công bố trước đây [16, 55, 89, 140, 146, 180]. Ở các nồng độ 60 mg/L và 70 mg/L, lá teo lại, ngả màu vàng và đen, không xuất hiện mô sẹo ở vết cắt tiếp xúc với môi trường,

mẫu bị chết do ảnh hưởng của kanamycin. Trong khi đó, mẫu đối chứng trên môi trường tái sinh không có chứa kháng sinh vẫn phát triển, tái sinh tốt, số lượng mô sẹo nhiều, số lượng chồi có khả năng tái sinh nhiều (hình 3.2).



Hình 3.2 Mẫu lá mầm được nuôi cấy trên môi trường tái sinh có nồng độ kháng sinh kanamycin khác nhau ở 28 NSC (Các hình nhỏ từ trái sang phải và từ trên xuống dưới: Đối chứng, mẫu lá mầm trên môi trường có 30, 40, 50, 60, 70 mg/L kanamycin, theo thứ tự)

Như vậy, nồng độ kanamycin tối thiểu gây chết, ức chế khả năng tái sinh mẫu lá mầm là 50 mg/L. Nồng độ này sẽ được sử dụng để chọn lọc chồi chuyển gen từ lá mầm sau thí nghiệm biến nạp gen bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

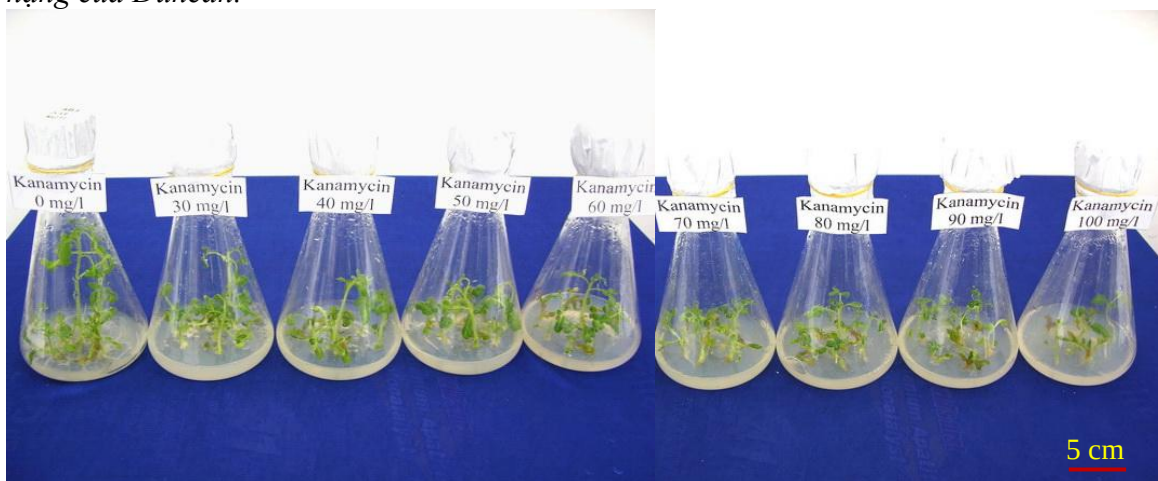
3.1.2.2 Ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh kanamycin lên sự sinh trưởng của cây con

Kết quả về sự tác động của kanamycin ở 60 ngày sau cấy lên cây nuôi cấy trên môi trường MS không chất điều hòa sinh trưởng, bổ sung kanamycin theo nồng độ tăng dần từ 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg/L được trình bày ở bảng 3.2, hình 3.3.

Bảng 3.2 Ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh kanamycin lên khả năng tái sinh của lá mầm cà chua và sự sinh trưởng của cây con cà chua

Nồng độ kanamycin (mg/L)	Tỷ lệ lá mầm tái sinh (TB $\pm$ SE) (%) ở thời điểm 28 NSC	Tỷ lệ cây con sinh trưởng (TB $\pm$ SE) (%) ở thời điểm 60 NSC
0	99,17 a	99,17 a
30	41,58 $\pm$ 1,54 b	43,29 $\pm$ 0,56 b
40	27,58 $\pm$ 0,94 c	28,43 $\pm$ 0,96 c
50	0,83 d	0,83 d
60	0,83 d	0,83 d
70	0,83 d	0,83 d
80	-	0,83 d
90	-	0,83 d
100	-	0,83 d
CV (%)	4,49	3,30

Ghi chú: số liệu phần trăm được chuyển sang dạng $\arcsin\sqrt{x}$. Các số có chữ cái khác nhau trong cùng một cột thì sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức $P \leq 0,05$ theo phân hạng của Duncan.



Hình 3.3 Mẫu cây nuôi cấy trên môi trường có nồng độ kháng sinh kanamycin khác nhau ở 60 NSC

Ở các nồng độ kháng sinh kanamycin 30 – 40 mg/L, cây con cũng tăng chiều cao, tăng số lá và rễ nhưng không nhiều, lá bắt đầu có biểu hiện hơi vàng, cây giảm

khả năng sinh trưởng. Ở các nồng độ kanamycin 50 mg/L và 60 mg/L, cây con có biểu hiện chết, lá ngả màu vàng đậm, cây không tăng trưởng. Kết quả này phù hợp với kết quả của một số công trình công bố trước đây [55, 89, 180]. Ở các nồng độ kanamycin 70 - 100 mg/L, thân cây teo lại và trắng; lá ngả màu vàng đen, cây bị chết, hoàn toàn không còn khả năng sinh trưởng do ảnh hưởng của kanamycin. Trong khi đó, mẫu đối chứng trên môi trường MS không chất điều hòa sinh trưởng phát triển tốt, cây tăng chiều cao, số lá và rễ phát triển nhiều.

Như vậy, tương tự như trường hợp nuôi cấy lá mầm, nồng độ kanamycin tối thiểu gây chết, ức chế khả năng sinh trưởng của cây con là 50 mg/L. Nồng độ này sẽ được sử dụng để kiểm tra những cây con tái sinh từ lá mầm sau khi biến nạp gen bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

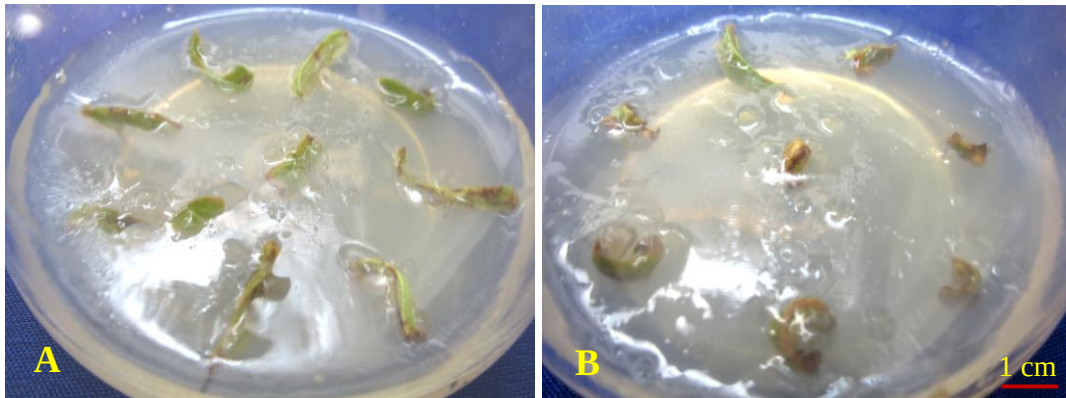
Nồng độ kanamycin được sử dụng để chọn lọc lá mầm, cây cà chua chuyển gen sẽ khác nhau tùy thuộc vào giống sử dụng. Mỗi giống có khả năng kháng kháng sinh kanamycin khác nhau như trong nghiên cứu của Gupta và cs. (2013) - các tác giả này sử dụng nồng độ kanamycin 30 mg/L để chọn lọc lá mầm giống cà chua “Pusa Ruby” (Ấn Độ), nhưng đối với giống cà chua khác như trong công trình nghiên cứu của Raj và cs. (2005); Mandaokar và cs. (2000); He và cs. (2008); Chetty và cs. (2013) thì nồng độ kanamycin được sử dụng tối đa là 100 mg/L. Trong những nghiên cứu trên, nồng độ kanamycin sử dụng ban đầu để chọn lọc thường cao nhưng đến giai đoạn nuôi chồi tái sinh tạo cây con hoàn chỉnh (trên môi trường 1/2 MS) thì lượng kanamycin bổ sung vào môi trường cần giảm xuống thấp hơn (50 mg/L) do nếu nồng độ kanamycin cao (100 mg/L) thì chồi sẽ không tạo rễ [116].

Ngoài ra, khi chọn lọc trên môi trường có kháng sinh trong thời gian dài, các tế bào có thể có khả năng thay đổi đặc tính sinh lý và hình thành tính kháng, có khả năng sống trên môi trường có kháng sinh nhưng không phải là thể nhận được gen kháng kanamycin (gen *nptII*) - gọi là hiện tượng “escape”. Chetty và cs. (2013) đã chứng minh hiện tượng “escape” này với tỷ lệ thấp. Vì vậy, tính kháng kanamycin

được quy định bởi gen *nptII* được xem là tiêu chuẩn chọn lọc hiệu quả trong nghiên cứu chuyển gen vào cà chua.

3.2 Xây dựng quy trình biến nạp gen vào lá mầm cây cà chua TN412 bằng phương pháp dùng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Lá mầm cây cà chua *in vitro* 7 ngày tuổi được sử dụng trong thí nghiệm biến nạp gen dùng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.



Hình 3.4 Mẫu lá mầm ở chu kỳ chọn lọc lần thứ 1 trên môi trường có kanamycin 50 mg/L - A. Mẫu lá mầm 7 ngày tuổi sau xử lý chuyển gen được chọn lọc trên môi trường bổ sung Kanamycin 50 mg/L; B. Mẫu lá mầm 2 tuần tuổi sau xử lý chuyển gen được chọn lọc trên môi trường bổ sung Kanamycin 50 mg/L có biểu hiện tái và đen

Thực tế thử nghiệm dùng mẫu lá mầm nhiều ngày tuổi hơn (hơn 7 ngày tuổi) đã ảnh hưởng rất xấu đến khả năng tái sinh và biến nạp có thể do tuổi sinh lý của mô không phù hợp (số liệu cá nhân). Khi tăng độ tuổi của mẫu (2 – 3 tuần) nhận thấy chỉ qua lần chọn lọc đầu tiên với kháng sinh kanamycin, mẫu đã có biểu hiện tái (mất màu xanh diệp lục) và đen, mất khả năng tái sinh (hình 3.4B). Ghi nhận trên phù hợp với kết quả công bố của các tác giả Yasmeen (2009), Krasnyanski và cs. (2001) và Soltanmohammadi và cs. (2014) - các tác giả này không sử dụng lá mầm hơn 7 ngày tuổi trong thí nghiệm biến nạp gen.

Thực tế nghiên cứu đề tài cho thấy lá mầm trước khi được dùng cho thí nghiệm biến nạp gen cần được trải qua giai đoạn ‘tiền nuôi cấy’ 2 ngày; giai đoạn tiền nuôi cấy này giúp tăng cường sự tái sinh và khả năng biến nạp gen. Kết quả nghiên cứu phù hợp với kết quả của các tác giả Raj và cs. (2005), Sharma và cs.

(2009), Yasmeen (2009), Afroz và cs. (2011), Goel và cs. (2010), Baesi và cs. (2011), Ammara và cs. (2014), Li và cs. (2013); Soltanmohammadi và cs. (2014). Như vậy, thời gian tiền nuôi cấy tốt nhất là 2 ngày và trong môi trường tiền nuôi cấy có bổ sung cytokinin (BA).

Các mẫu lá mầm này được cắt bỏ phần đầu lá và sử dụng đoạn giữa lá mầm (có kích thước 5 mm x 7 mm), vì đoạn lá mầm này đã được chứng minh là phần mô có đáp ứng tích cực đối với tái sinh chồi – tỷ lệ tạo chồi cao nhất [16, 26, 146, 152, 183]. Ngoài ra, ở thí nghiệm biến nạp gen, việc tạo vết cắt/vết thương trước nuôi chung giúp tăng khả năng tiếp cận của vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* vào tế bào mô lá mầm [15].

Sau khâu gây nhiễm vi khuẩn cho mô lá mầm trong thời gian 20 - 30 phút, lá mầm được nuôi chung (đồng nuôi cấy) (co-cultivation) với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chứa plasmid pITB-HBsAg. Trong môi trường nuôi chung có bổ sung acetosyringone nồng độ 100 μ M; theo nhiều tài liệu, acetosyringone là phân tử tín hiệu giúp vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* tương tác với cơ thể thực vật, gây kích hoạt gen *vir*, bắt đầu con đường truyền tín hiệu, hình thành sợi T-DNA, di chuyển phức hợp T-DNA vào nhân và gắn vào nhiễm sắc thể tế bào thực vật [88].

Giai đoạn nuôi chung ở luận án được thực hiện trong điều kiện sáng (2 - 3 ngày, ở 25⁰C). Theo một số tác giả, thời gian nuôi chung không được quá ngắn hoặc quá dài vì nếu quá ngắn sẽ không đủ thời gian hình thành mật độ vi khuẩn cần thiết để tạo ảnh hưởng biến nạp tích cực. Nếu quá dài có thể dẫn đến sự tăng trưởng vượt mức (overgrowth) cần thiết của vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* dẫn đến tổn hại tế bào, giảm khả năng sống và tái sinh. Đồng thời, gây nhiều khó khăn trong giai đoạn rửa mẫu, mẫu sau rửa dễ bị tái nhiễm và do vậy làm giảm tần số biến nạp. Thời gian đồng nuôi cấy tốt nhất để có thể kiểm soát sự sinh trưởng của vi khuẩn là 2 ngày đã được chứng minh ở các công trình công bố của các tác giả Krasnyanski và cs. (2001), Opabode (2006), Yasmeen (2009), Baesi và cs. (2011); Li và cs. (2011), Li và cs. (2013), Afroz và cs. (2011), Ammara và cs. (2014) và Soltanmohammadi và cs. (2014).

Sau thời gian nuôi chung (đồng nuôi cấy), mẫu được rửa và cấy lên môi trường ‘tiền chọn lọc’ (pre-selection) (môi trường tái sinh tốt nhất đã khảo sát ở thí nghiệm 3.1.1, môi trường MS + vitamin B5 + IAA 0,5 mg/L + BA 2,0 mg/L, không có chất kháng sinh kanamycin) trong thời gian 4 ngày. Thời gian tiền chọn lọc này rất quan trọng, giúp cho mô lá mầm hồi phục, có khả năng phân chia, hình thành mô sẹo trước khi tiến hành chọn lọc. Nghiên cứu của Afroz và cs. (2011) chứng minh rằng lá mầm không hình thành mô sẹo, hình thành chồi khi tiến hành chọn lọc ngay mà không qua giai đoạn tiền chọn lọc. Tuy nhiên giai đoạn tiền chọn lọc này không được quá dài, đặc biệt ở thí nghiệm dùng kháng sinh chọn lọc là kanamycin, sẽ dễ dẫn đến hiện tượng “escapes”, không nhận được thể chuyển gen.

Sau đó, mẫu lá mầm được chuyển sang môi trường chọn lọc có nồng độ kanamycin 50 mg/L ở ngưỡng gây chết như thí nghiệm ở 3.1.2.1. Mẫu được cấy chuyển sang môi trường chọn lọc có kháng sinh theo chu kỳ 2 – 3 tuần/1 lần. Trong quá trình chọn lọc, dưới áp lực chọn lọc của kháng sinh kanamycin, những mẫu mô lá mầm không chuyển gen (không nhận được gen kháng kanamycin) sẽ không có khả năng tái sinh, dần dần bị hóa nâu, đen và chết. Ngược lại, những mẫu mô lá mầm nhận được gen chuyển (có gen kháng kanamycin) có màu xanh, tăng kích thước, hình thành mô sẹo, lượng mô sẹo tăng dần và hình thành chồi nhỏ sau đó (hình 3.5).

Sau 3 tháng chọn lọc, những mẫu mô sẹo/ chồi nhỏ sống sót được cấy chuyển sang môi trường tái sinh tạo cây con (hình 3.5). Tiếp theo, lá được cắt để tiến hành thí nghiệm kiểm tra sự hiện diện và biểu hiện của gen chuyển bằng phương pháp PCR. Với 100 mẫu lá mầm cà chua qua thực hiện biến nạp gen với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* đã thu được ba dòng chuyển gen (CC1, CC2 có 03 chồi hoàn chỉnh, CC3 có 05 chồi hoàn chỉnh, có thân mọc lên cao 1-2 cm), tần số đạt khoảng 3%. Tần số này thấp hơn so với nghiên cứu của Afroz và cs. (2011) (sử dụng chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA101, tần số biến nạp gen 4,5 – 42,12%).

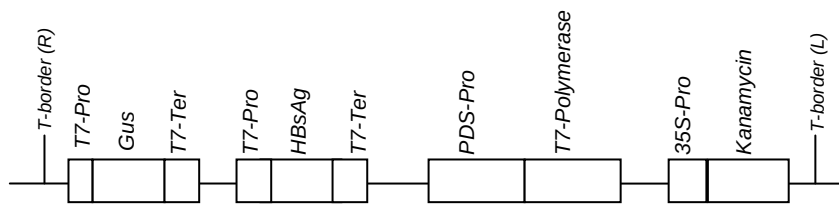


Hình 3.5 Mẫu lá mầm sống sót trên môi trường có kháng sinh kanamycin 50 mg/L hình thành mô sẹo, tái sinh chồi sau 4 lần cấy chuyển sang môi trường chọn lọc
A. Lá mầm sau chuyển gen hình thành mô sẹo và tái sinh chồi ở 45 NSC trên môi trường chọn lọc có bổ sung kháng sinh kanamycin 50 mg/L (vị trí mũi tên); B, C, D. 3 dòng chồi cà chua chuyển gen HBsAg CC1, CC2, CC3 sống trên môi trường có kháng sinh kanamycin 50 mg/L sau 4 chu kỳ chọn lọc.

Theo một số tài liệu tham khảo, điều này có thể do ảnh hưởng của nhiều yếu tố như chủng vi khuẩn khác nhau, mật độ vi khuẩn, tuổi sinh lý của mẫu, thời gian đồng nuôi cấy, môi trường tái sinh chồi và nhất là kiểu gen cây (genotype) khác nhau [20, 58, 60, 65, 89, 94, 111, 115, 122, 132, 133, 152, 179, 180].

Ngoài ra, tần số biến nạp gen thấp còn có thể do hai nguyên nhân sau: Đối với phương pháp biến nạp gen dùng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, trình tự T-DNA dài có thể có hạn chế nhất định sự hợp nhất gen chuyển (DNA integration) vào bộ gen cây. Ở luận án này, trình tự T-DNA bao gồm khá nhiều gen (gen chỉ thị

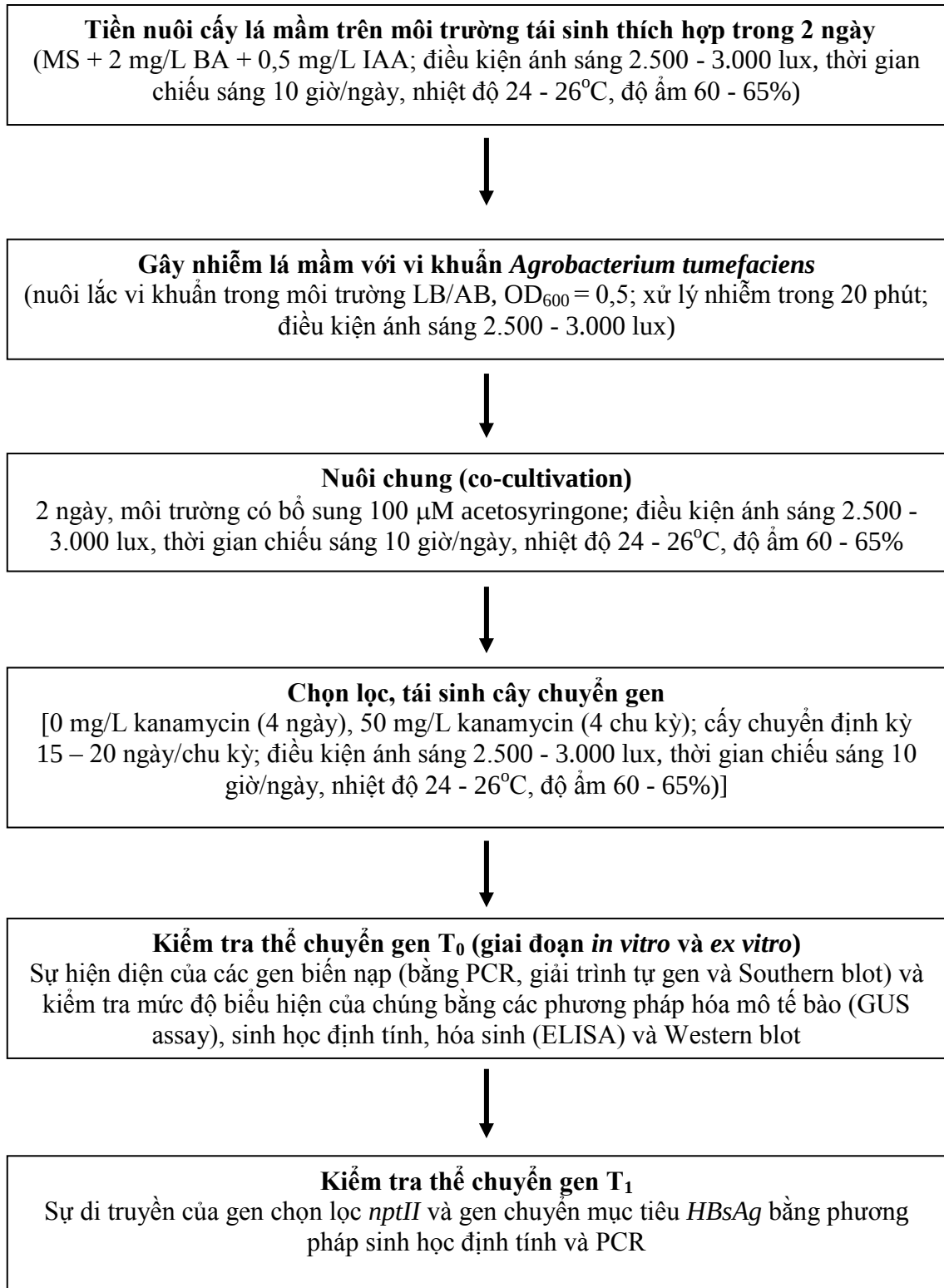
gusA, gen chọn lọc *nptII*, nhất là gen *HBsAg* lại được điều khiển bởi 2 loại promoter khác nhau) nên có kích thước lớn 10,49 kb (hình 3.6), có thể gây ảnh hưởng nhất định đến tần số biến nạp gen. Những mẫu lá mầm sau xử lý chuyển gen được nuôi cấy trên môi trường có áp lực chọn lọc của kháng sinh trong thời gian dài có thể làm tăng sự hình thành cơ chế methyl hóa DNA - ảnh hưởng đến quá trình phiên mã và dịch mã, gen chuyển có thể bị im lặng hoặc giảm sự biểu hiện và tỷ lệ gen im lặng có thể từ 30 - 60% [133].



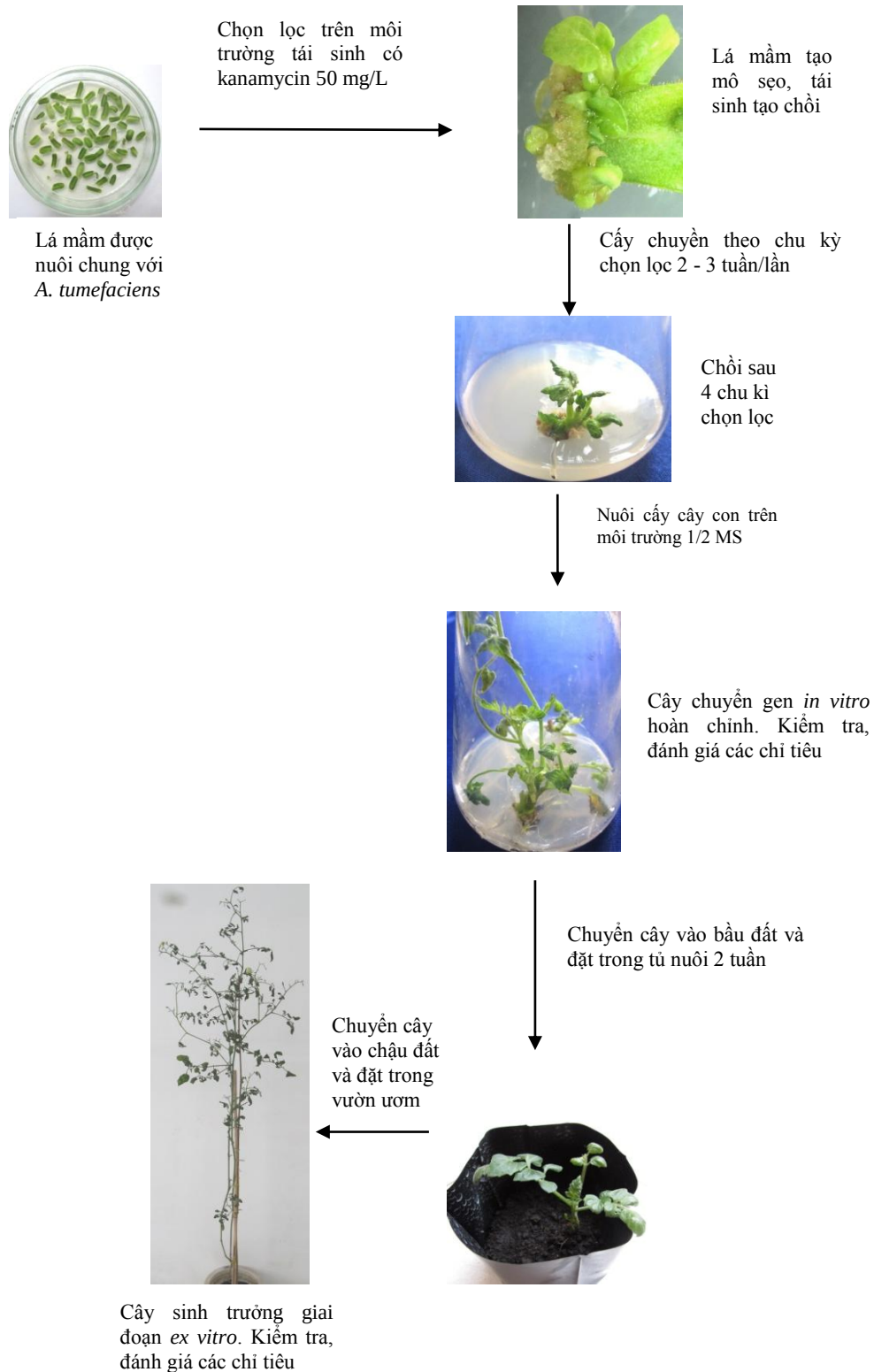
Hình 3.6 Trình tự đoạn T-DNA hợp nhất vào bộ gen cây

[Gen *HBsAg* (promoter *T7*, terminator *T7*; $\approx 0,7$ kb) và gen chỉ thị *gusA* (promoter *T7*, terminator *T7*) được điều khiển bởi hệ thống [promoter *PDS* (phytoene desaturase, ≈ 2 kb) + *T7* RNA polymerase (2,7 kb)]; gen kháng kanamycin *nptII* (promoter *CaMV35S*)].

Như vậy, từ những kết quả thí nghiệm chuyển gen ở trên, đề xuất quy trình chuyển gen *HBsAg* vào lá mầm cà chua TN 412 bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* (phụ lục 8).



Hình 3.7 Tóm tắt quy trình biến nạp gen *HBsAg* vào lá mầm giống cà chua TN412 nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*



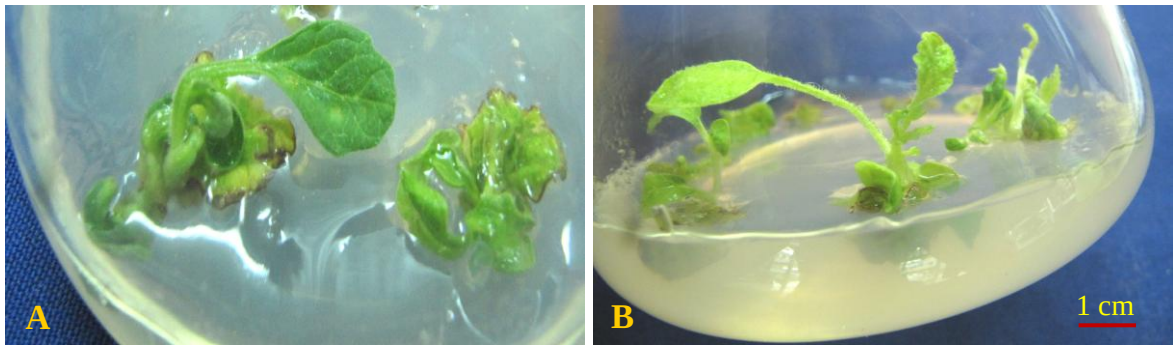
Hình 3.8 Sơ đồ biến nạp gen *HBsAg* vào lá mầm giống cà chua TN412 nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

3.3 Kiểm tra sự hiện diện của các gen biến nạp và sự biểu hiện của chúng bằng phương pháp hóa mô tế bào, sinh học định tính, hóa sinh

3.3.1 Kiểm tra sự biểu hiện định tính của gen kháng kanamycin *nptII*

Các chồi tái sinh (chưa có rễ, cao 1,5 – 3 cm) trên môi trường chứa kanamycin 50 mg/L được cấy chuyển sang môi trường chứa 100 mg/L kanamycin. Ở giai đoạn 30 ngày sau cấy, kết quả cho thấy các chồi có khả năng sinh trưởng bình thường, phát triển rễ, thân và lá. Ngược lại, các chồi đối chứng không chuyển gen trên môi trường chứa kanamycin ở nồng độ này thì không có khả năng sinh trưởng bình thường, có biểu hiện tái và chết.

Các mảnh lá thật được nuôi cấy trên môi trường tái sinh chứa kanamycin 100 mg/L. Kết quả cho thấy các mẫu lá tạo mô sẹo và tái sinh bình thường trên môi trường (BA 2,0 mg/L; IAA 0,5 mg/L) có bổ sung kanamycin 100 mg/L ở 30 ngày sau cấy và tiếp tục phát triển sau khi được tách ra và cấy chuyển sang môi trường có bổ sung 100 mg/L kanamycin (hình 3.9); ngược lại, mảnh lá đối chứng chết do hoại tử (necrosis).



Hình 3.9 Mẫu lá thật cây T_0 tái sinh trên môi trường chứa kháng sinh kanamycin 100 mg/L ở 60 ngày sau cấy chọn lọc - A. Mẫu lá thật của cây T_0 tái sinh tạo chồi nhỏ trên môi trường chứa kanamycin 100 mg/L; B. Chồi nhỏ hình thành từ mẫu lá thật cây T_0 được chuyển sang môi trường chứa kanamycin 100 mg/L

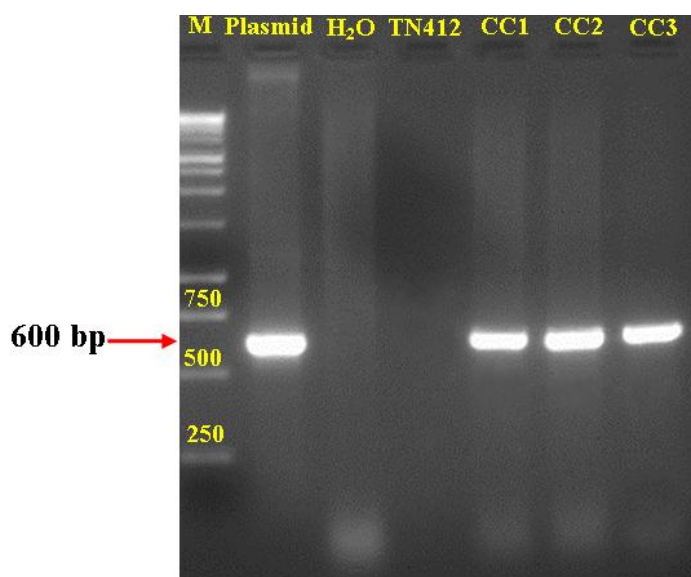
Các thử nghiệm nêu trên nhằm loại bỏ các thể chồi nhỏ có thể sống sót trên môi trường có kháng sinh do đã thay đổi phản ứng sinh lý để thích nghi [88] và xác định tính kháng đối với kanamycin của thể tái sinh trước khi thực hiện PCR.

3.3.2 Kiểm tra sự hiện diện của các gen *nptII*, *HBsAg* bằng kỹ thuật PCR

DNA lá tổng số của các dòng cà chua *in vitro* kháng kanamycin được tách chiết và tinh sạch dùng cho phân tích PCR. Plasmid pITB-HBsAg được dùng làm đối chứng dương, nước cất và lá cà chua *in vitro* không chuyển gen làm đối chứng âm và dùng thang DNA chuẩn 1kb (Promega) để xác định kích thước băng DNA khuếch đại.

3.3.2.1 Kiểm tra PCR gen kháng kanamycin *nptII*

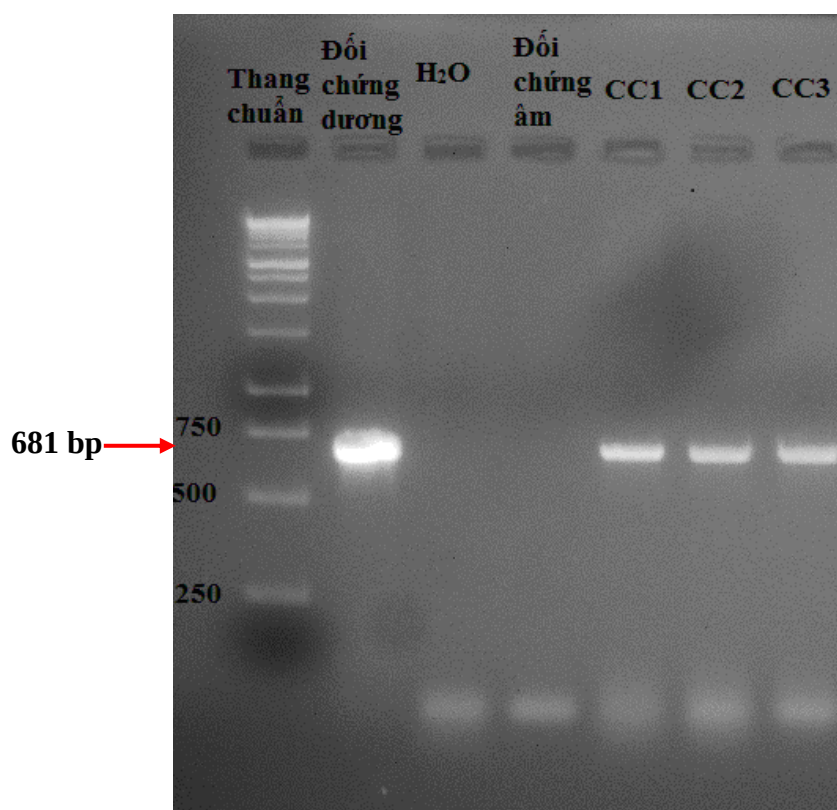
Kết quả điện di trên gel agarose sản phẩm PCR với môi đặc trưng của gen này cho thấy có sự hiện diện của đoạn DNA kích thước khoảng 600 bp tương đương với kích thước băng DNA ở đối chứng dương. Ngược lại, không có sự hiện diện của băng DNA này ở các trường hợp đối chứng âm (hình 3.10). Điều này bước đầu nhận định gen *nptII* đã hợp nhất vào bộ gen của 03 dòng cà chua CC1, CC2, CC3.



Hình 3.10 Kết quả điện di sản phẩm PCR của gen *nptII* ở cây cà chua chuyển gen
M: Thang chuẩn 1 kb (Promega); Đối chứng dương: Plasmid pITB-HBsAg; Đối chứng âm: Nước cất và lá cà chua TN 412 *in vitro* không biến nạp gen; CC1, CC2, CC3: Lá *in vitro* dòng cà chua kháng kanamycin

3.3.2.2 Kiểm tra PCR gen *HBsAg*

Các dòng cà chua đã qua kiểm tra sự hiện diện của gen *nptII* tiếp tục được kiểm tra sự hiện diện của gen *HBsAg* bằng PCR với cặp môi đặc hiệu của gen này.



Hình 3.11 Kết quả điện di sản phẩm PCR của gen *HBsAg* ở cây cà chua chuyển gen *Đối chứng dương*: Plasmid *pITB-HBsAg* với băng DNA có kích thước 681bp; *Đối chứng âm*: Nước cất và lá cà chua bị TN 412 *in vitro* không biến nạp gen; CC1, CC2, CC3: Lá *in vitro* dòng cà chua chuyển gen (đã kiểm tra sự hiện diện của gen *nptII*); Thang DNA chuẩn 1 kb (Promega)

Kết quả điện di trên gel agarose sản phẩm PCR của gen *HBsAg* cho thấy ở trường hợp 03 dòng cà chua (đã mang gen *nptII*) đều có xuất hiện băng DNA với kích thước mong đợi 681 bp của gen *HBsAg* (hình 3.11). Các tác giả Marcondes (2008), Elkholy (2009), Li (2011), Kalenahalli (2013) và Pniewski (2011) cũng sử dụng kỹ thuật PCR để kiểm tra sự hiện diện của gen *HBsAg* ở các dòng cây chuyển gen nhận được qua nghiên cứu. Ở các trường hợp đối chứng âm - nước cất và lá cà chua *in vitro* không chuyển gen đều không xuất hiện băng DNA kích thước 681 bp này. Điều này cơ bản cho thấy gen *HBsAg* cũng đã hợp nhất vào bộ gen cây.

Để kiểm tra các gen chuyển đã được gắn ổn định vào bộ gen cà chua và biểu hiện thành những sản phẩm mong muốn thì những dòng cà chua này cần tiếp tục

được kiểm tra bằng thử GUS ở mô quả, phân tích Southern blot, phân tích Western blot ở thế hệ T_0 .

3.3.3 Giải trình tự sản phẩm PCR gen *HBsAg* của cây cà chua chuyển gen

Sau khi kiểm tra sản phẩm PCR gen *HBsAg* từ cây với kết quả dương tính, sản phẩm này tiếp tục được sử dụng để giải trình tự đoạn gen *HBsAg* được khuếch đại bằng thiết bị giải trình tự DNA tự động ABI 3300 (Applied Biosystem).

Trình tự đoạn gen *HBsAg* được khuếch đại từ plasmid pITB-*HBsAg* được sử dụng làm mẫu đối chứng dương, ký hiệu là PC. Trình tự đoạn gen *HBsAg* được khuếch đại từ DNA của 03 dòng cây cà chua chuyển gen được ký hiệu là 1, 2, 3.

Kết quả giải trình tự các mẫu PC và 1, 2, 3 (phụ lục 9) cho thấy trình tự đoạn gen *HBsAg* được khuếch đại ở cây cà chua chuyển gen có sự tương đồng cao với trình tự đoạn gen *HBsAg* được khuếch đại từ plasmid vì giữa mẫu PC và mẫu 1, 2, 3 chỉ sai khác từ 1 đến 2 nucleotide trên tổng số 660 nucleotide được giải trình tự (sai khác ở vị trí đầu hoặc cuối đoạn trình tự, ở nucleotide thứ 16 hoặc 19 hoặc 665).

Như vậy, kết quả giải trình tự cho thấy giữa mẫu đối chứng và chuyển gen gần như không có sự khác biệt giúp khẳng định thêm gen mục tiêu *HBsAg* đã cơ bản được chuyển vào bộ gen của cây cà chua với độ chính xác cao.

3.3.4 Đánh giá cây cà chua chuyển gen *HBsAg* trong điều kiện vườn ươm ở thế hệ T_0

Ba dòng cà chua chuyển gen *HBsAg* (hình 3.12 A) sau giai đoạn kiểm tra định tính khả năng kháng kanamycin và kiểm tra PCR gen *nptII*, *HBsAg* với kết quả dương tính, chúng được nhân vô tính bằng kỹ thuật cắt đoạn (cutting) *in vitro* nhằm đạt đủ số cá thể phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo. Chúng được nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS (với vitamin B5) đạt kích thước theo yêu cầu (khoảng 8 cm) và sau đó được đem trồng trong bầu đất, chậu đất (hình 3.12 B, C, D) ở vườn ươm.

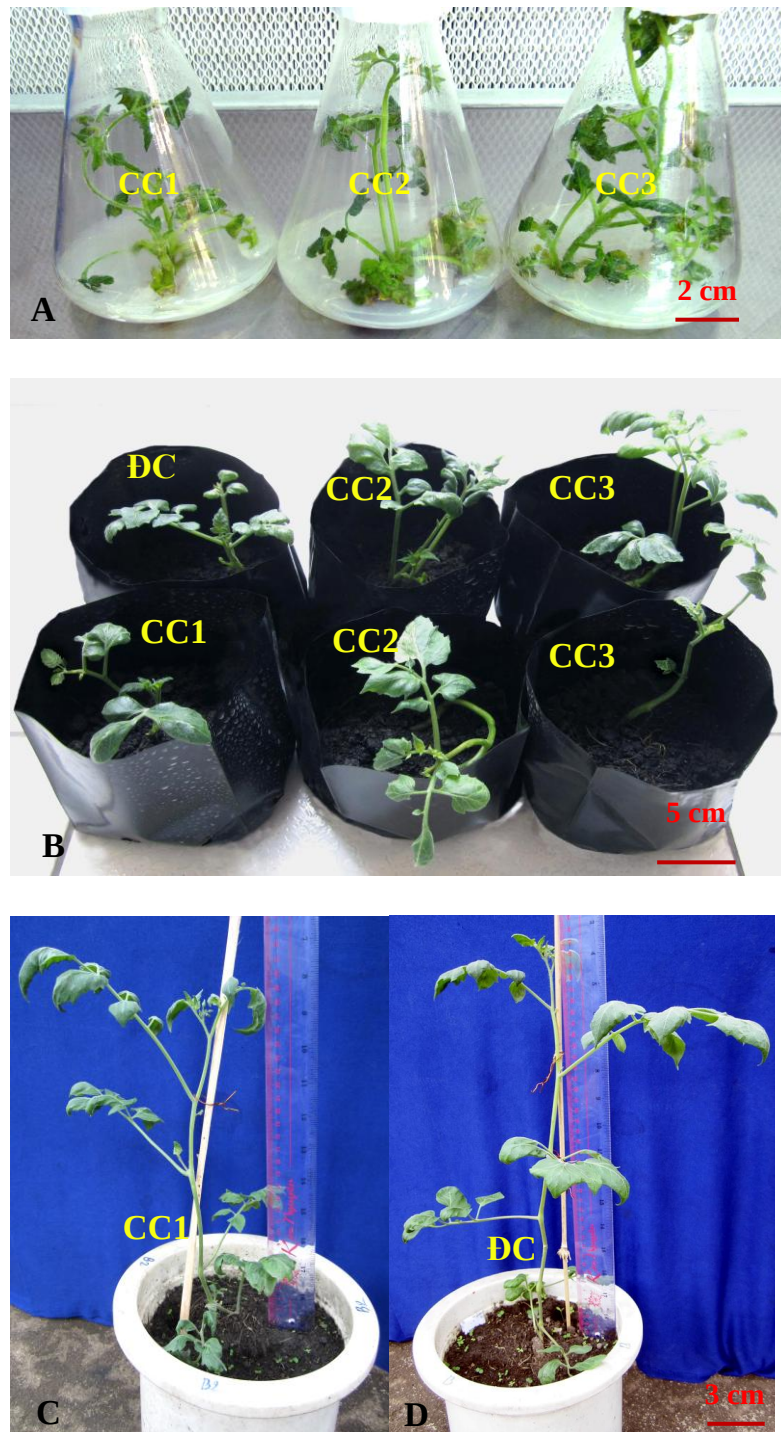
Các dòng cây cà chua chuyển gen này được trồng ở khu riêng biệt (để các cây cùng dòng tự thụ phấn, tránh xảy ra sự giao phấn giữa các dòng). Các cây cà chua này có kiểu hình bình thường, tiếp tục chăm sóc cây chuyển gen cho đến khi ra hoa, kết quả (hình 3.13).

Bảng 3.3 Tổng số nhánh lá, số hoa, số quả và chiều cao của cây cà chua không chuyển gen (ĐC) và cây cà chua chuyển gen của các dòng CC1, CC2, CC3

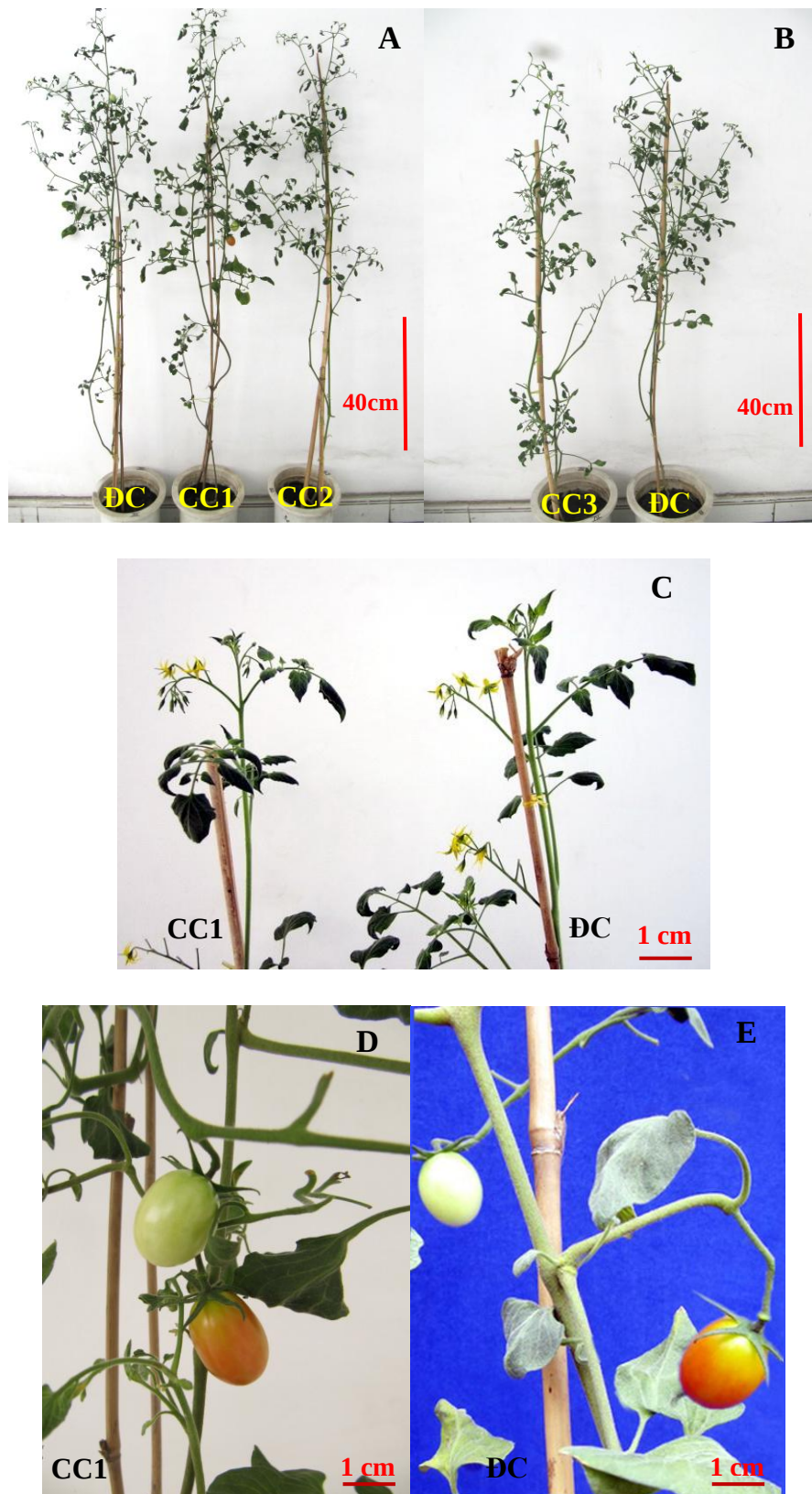
	Tổng số nhánh lá/cây (TB ± SE) (nhánh lá)	Số quả (TB ± SE) (quả)	Chiều cao cây (TB ± SE) (cm)	Số hoa (TB ± SE) (hoa)
ĐC	12,33 ± 0,33	2,33 ± 0,33	130,33 ± 2,60	49,33 ± 4,70
CC1	13,33 ± 0,33	2,66 ± 0,33	137,67 ± 1,20	56,33 ± 4,17
CC2	12,00 ± 1,15	2,33 ± 0,33	133,00 ± 3,60	53,33 ± 5,45
CC3	12,66 ± 1,20	2,66 ± 0,33	130,33 ± 4,37	48,33 ± 7,53
CV (%)	11,92	23,09	4,14	18,76
Mức ý nghĩa	ns	ns	ns	ns

ns: sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức $P \leq 0,05$ theo phân hạng của Duncan

Các cây của ba dòng cà chua chuyển gen đều đã ra hoa, kết quả bình thường, cùng thời điểm với cây đối chứng (hình 3.13). Xét một số đặc điểm về kiểu hình như chiều cao cây, tổng số nhánh lá trên cây, số hoa, số quả thì giữa cây cà chua không chuyển gen TN412 và ba dòng cây cà chua chuyển gen CC1, CC2, CC3 không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng Duncan (bảng 3.3), chỉ có vài thay đổi nhỏ về hình thái lá. Theo kết quả nghiên cứu của Guan và cs. (2012), Salyaev và cs. (2007), lá cây đối chứng có màu xanh nhạt, có răng cưa nhưng ở cây chuyển gen, lá có màu xanh đậm, ít răng cưa, hơi cong, ít phân thùy và số lá chết ít hơn so với lá cây đối chứng.



Hình 3.12 Ba dòng cây cà chua chuyển gen T_0 ở giai đoạn *in vitro* và giai đoạn tăng trưởng *ex vitro* - A. Ba dòng cây chuyển gen *in vitro* trên môi trường 1/2 MS; B. Cây con giai đoạn bầu đất sau 30 ngày chuyển ra vườn ươm (cao khoảng 9 - 10 cm); C, D. Cây con dòng CC1, DC giai đoạn chậu đất. (DC): Đối chứng, CC1, CC2, CC3: Ba dòng cây chuyển gen



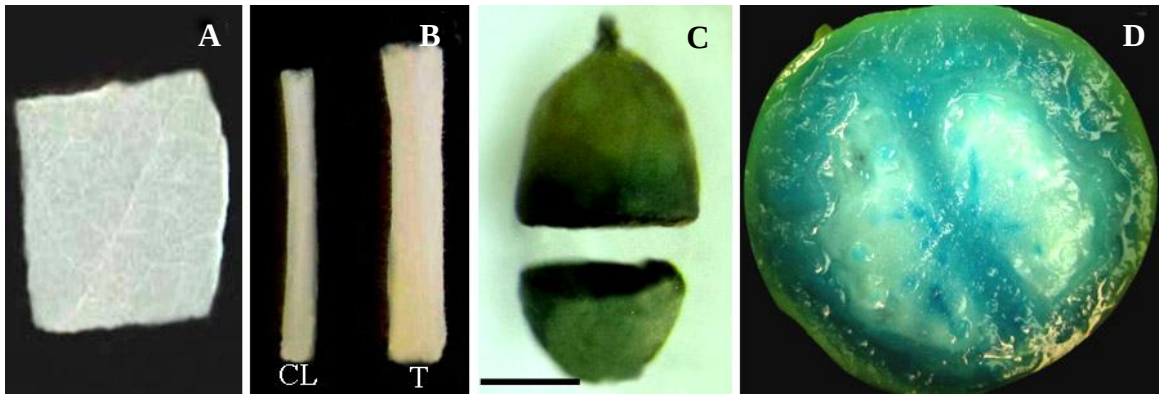
Hình 3.13 Ba dòng cây cà chua chuyển gen T_0 giai đoạn ra hoa, kết quả *ex vitro* - A, B. Ba dòng cây cà chua CC1, CC2, CC3 ở giai đoạn ra hoa, kết quả; C, D, E. Cận cảnh

giai đoạn ra hoa, kết quả của dòng cây CC1, ĐC [(ĐC): Đối chứng, CC1, CC2, CC3: Ba dòng chuyển gen]

Cây chuyển gen ở thế hệ T_0 và T_1 sinh trưởng và phát triển bình thường, có chiều cao, số lượng hoa giống như cây không chuyển gen. Trong cùng điều kiện trồng ở vườn ươm thì giữa cây cà chua không chuyển gen và cây chuyển gen, sự khác biệt cũng không nhiều, chỉ khoảng từ 0 - 14 % [58, 60]. Sự khác biệt xuất hiện ở cây chuyển gen liên quan đến sự biến nạp gen mục tiêu và vị trí gắn của gen chuyển vào bộ gen của cây dẫn đến những thay đổi trong quá trình phiên mã, dịch mã DNA và quá trình chuyển hóa trong cây. Cũng theo nghiên cứu của Guan và cs. (2011, 2012), khi biến nạp gen vào lá mầm cà chua thì 80% cây chuyển gen có bộ gen lưỡng bội, còn 20% cây chuyển gen sẽ có những thay đổi trong bộ nhiễm sắc thể. Số lượng lục lạp cũng gia tăng và một số thay đổi về chất lượng quả như hàm lượng lycopene, lượng đường, tinh bột nhưng những thay đổi này giữa quả chuyển gen và không chuyển gen không đáng kể. Ở luận án này, không tiến hành nghiên cứu những phân tích về đặc điểm tế bào học của cây như quan sát bộ nhiễm sắc thể, số lượng lục lạp và đặc điểm khí khổng. Như vậy, về hình thái bên ngoài giữa cây cà chua không chuyển gen và cây cà chua chuyển gen cơ bản không có sự khác biệt nhau. Quả của những dòng cà chua này được thu nhận để tiến hành thí nghiệm kiểm tra sự biểu hiện gen *HBsAg* dưới sự điều khiển của promoter *T7* và promoter *PDS* - tạo biểu hiện cao và chuyên biệt ở quả.

3.3.5 Kiểm tra sự hiện diện và biểu hiện của gen *gusA* bằng kỹ thuật hóa mô

Các loại mẫu đem nhuộm của ba dòng cà chua *HBsAg* và quả cà chua chín không chuyển gen (đối chứng) sau khi thu nhận từ vườn ươm được cắt lát và nhuộm với thuốc thử X-gluc. Kết quả cho thấy biểu hiện GUS âm tính ở mô lá, mô cuống lá và mô thân cây *in vitro* (hình 3.14), quả cà chua chín chuyển gen *HBsAg* có màu xanh qua phản ứng với thuốc thử, trong khi quả cà chua không chuyển gen hoàn toàn không có màu xanh này. Điều này chứng tỏ gen *gus* đã được tích hợp vào bộ gen cà chua và được biểu hiện dưới sự điều khiển của promoter *PDS* - biểu hiện chuyên biệt ở quả chín.



Hình 3.14 Biểu hiện GUS ở một số loại mô của cây cà chua TN412 chuyển gen

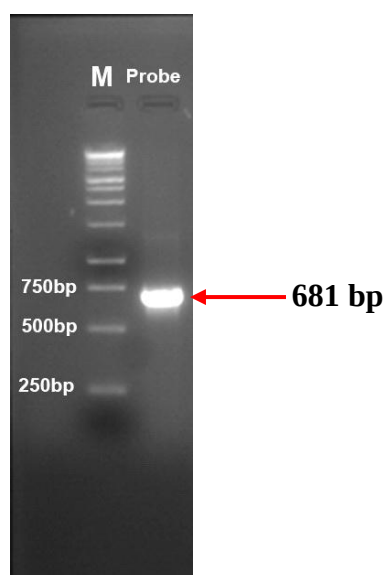
A. Biểu hiện GUS âm tính ở mô lá cây *in vitro*; B. Biểu hiện GUS âm tính ở mô cuống lá (CL) và thân (T) cây *in vitro*; C. Biểu hiện GUS dương tính ở mô quả non (thanh ngang 2 mm); D. Biểu hiện GUS dương tính ở mô quả chín

Gen *gus* biểu hiện thấp ở giai đoạn quả xanh nhưng biểu hiện mạnh ở giai đoạn quả chín (thể hiện qua màu xanh khi nhuộm với thuốc thử X-gluc). Sự biểu hiện của gen chuyển được điều khiển bởi promoter *PDS* có liên quan chặt chẽ với sự biệt hóa của sắc lạp ở quả cà chua. Giả thuyết rằng, những nhân tố (hay phân tử) liên quan đến sự hình thành sắc lạp được tổng hợp trong quá trình chín của quả và cũng hoạt hóa promoter *PDS*. Ở những cơ quan không có sắc lạp, mức độ biểu hiện của promoter *PDS* rất thấp và nhân tố này không được tìm thấy [30]. Ở lá, cuống lá và thân có biểu hiện GUS âm tính khi nhuộm với thuốc thử X-gluc nhưng khi gen *gus* được điều khiển bởi promoter 35S thì có biểu hiện GUS mạnh ở những cơ quan này [30]. Kỹ thuật hóa mô này tiện lợi, nhanh và được sử dụng rộng rãi ở nhiều loài thực vật để phát hiện gen chuyển được gắn vào bộ gen cây và biểu hiện [89].

3.3.6 Phân tích Southern blot các dòng cà chua chuyển gen *HBsAg*

3.3.6.1 Tạo mẫu dò lai DNA

Plasmid mang gen *HBsAg*, sau khi được tách chiết từ vi khuẩn *E. coli*, được sử dụng cho phân tích PCR với cặp mồi đặc hiệu đối với gen *HBsAg* để thu sản phẩm khuếch đại dùng tạo mẫu dò cho kỹ thuật lai DNA. Kiểm tra sản phẩm PCR bằng cách điện di trên gel agarose (hình 3.15).



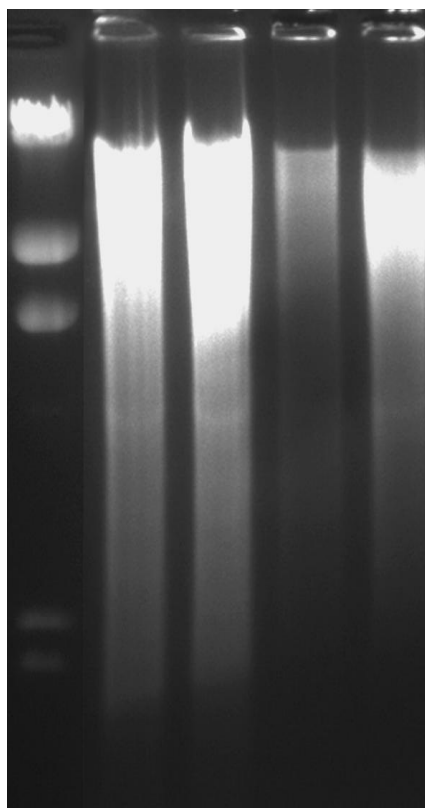
Hình 3.15 Kết quả điện di sản phẩm PCR gen *HBsAg* nhằm thu mẫu tạo probe - *M*: Thang chuẩn 1kb (Promega); *Probe*: sản phẩm PCR gen *HBsAg*

3.3.6.2 Lai DNA

DNA tách từ cây cà chua đối chứng và ba dòng cà chua chuyển gen CC1, CC2, CC3 sau khi xử lý với enzyme giới hạn *NcoI* được cho vào giếng gel agarose để điện di qua đêm cùng với thang chuẩn. Kết quả cắt DNA (digestion) được quan sát bằng ánh sáng tử ngoại của thiết bị Gel Documentation (hình 3.16). Các mẫu DNA nhận thấy đã được cắt tốt bởi enzyme *NcoI* thể hiện qua ghi nhận các vệt sáng trải đều (smear) trên gel. Dựa vào sơ đồ plasmid pITB-*HBsAg*, dự đoán DNA cây chuyển gen, sau cắt bởi enzyme *NcoI*, sẽ tạo trình tự mang gen *HBsAg* có kích thước 5,83 kb.

Về nguyên tắc, trong phân tích Southern blot, đoạn DNA cây mang trình tự gen *HBsAg* sẽ bắt cặp với mẫu dò. Kết quả cho thấy ở các dòng chuyển gen đều có băng với kích thước như mong đợi 5,83 kb, ở đối chứng không ghi nhận được băng này và số bản sao (copy) của gen hợp nhất vào bộ gen cây ở cả ba dòng khác nhau (independent event) đều rất đơn giản (hình 3.17). Trên thế giới và trong nước, Southern blot là phương pháp chuẩn mực và nhất thiết phải được sử dụng trong nghiên cứu biến nạp gen. Do vậy, ở luận án phương pháp này cũng đã được dùng để xác định sự hợp nhất của gen chuyển vào bộ gen cây.

M TN412 CC1 CC2 CC3

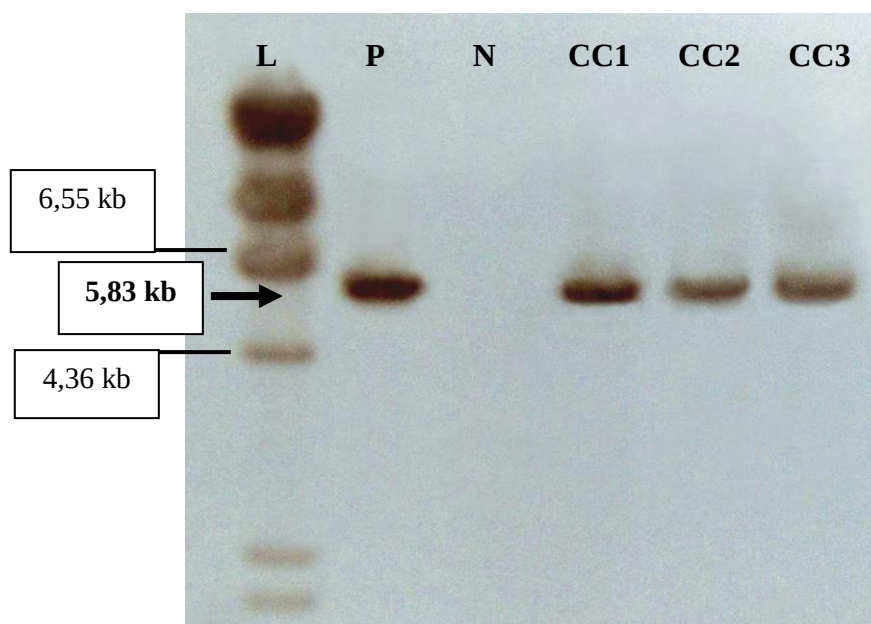


Hình 3.16 Kết quả điện di gel agarose các mẫu DNA sau cắt bằng enzyme giới hạn phục vụ phân tích Southern blot - M: DNA molecular weight marker II; TN412: Lá cà chua đối chứng không chuyển gen; CC1, CC2, CC3: Lá các dòng cà chua chuyển gen HBsAg

Kết quả trên khẳng định sự gắn ổn định của gen HBsAg vào bộ gen cà chua TN412. Theo một số tài liệu, ở phương pháp chuyển gen dùng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, có một hoặc ít bản sao của gen chuyển gắn trên nhiễm sắc thể bộ gen thực vật và sự sắp xếp lại của gen chuyển cũng ít xảy ra. Gen chuyển ổn định về cấu trúc và biểu hiện [83] so với phương pháp chuyển gen trực tiếp như bắn gen [15].

Ở luận án, kết quả lai Southern blot (hình 3.17) cho thấy phù hợp với các kết quả chung trên thế giới ở điểm không có các băng DNA lai có kích thước lớn hoặc nhỏ hơn 5,83 kb. Như vậy, sự hoạt động gen chuyển HBsAg sẽ ổn định theo thời gian (theo cá nhân). Trong cây chuyển gen, nếu có nhiều bản sao của gen chuyển ở

một hoặc vài vị trí trên nhiễm sắc thể sẽ dễ dẫn đến hiện tượng im lặng gen, ảnh hưởng đến sự ổn định và hàm lượng biểu hiện của gen chuyển [15].



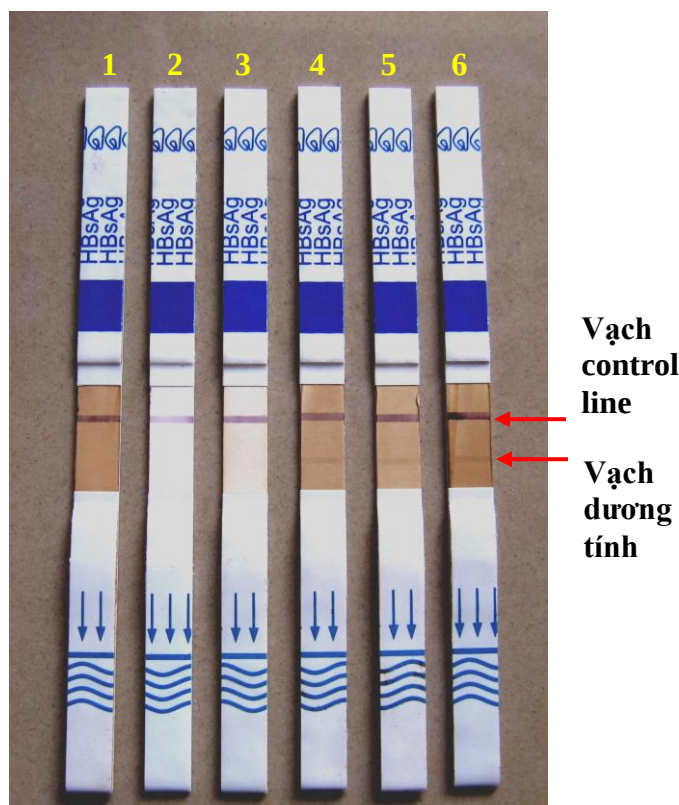
Hình 3.17 Kết quả phân tích Southern blot các dòng cà chua chuyển gen

Các dòng CC1, CC2, CC3 đều dương tính - với trình tự DNA lai mong đợi 5,83 kb (vị trí mũi tên); L: Thang DNA chuẩn λ /HindIII; P: ĐC dương – plasmid; N: ĐC âm - cây không chuyển gen; 1, 2, 3: Ba dòng cây cà chua chuyển gen CC1, CC2, CC3

3.3.7 Kiểm tra nhanh sự hiện diện của protein HBsAg ở quả cây T₀ bằng que thử đặc hiệu

Sau sử dụng que thử đối với dịch protein chiết tách từ lá và quả cà chua chín chuyển gen *HBsAg*, kết quả cho thấy ở trường hợp dịch protein quả thấy xuất hiện vạch dương tính (test line). Ngược lại, không thấy xuất hiện vạch này ở trường hợp protein lá, chỉ có một vạch control line (hình 3.18). Kết quả phát hiện này có độ nhạy, độ đặc hiệu và độ chính xác rất cao (99,9%). Như vậy, kết quả chứng tỏ gen *HBsAg* dưới sự điều khiển của promoter *PDS* tạo biểu hiện đặc trưng ở quả đã phát huy tác dụng. Trên thế giới, que thử là vật liệu được quan tâm sử dụng nhiều đặc biệt khi phải kiểm tra protein của số lượng lớn cá thể như ở trường hợp quần thể sau phân ly di truyền do yếu tố chính xác, nhanh và đơn giản của kỹ thuật. Theo một số tác giả, trình tự gen mã hóa *PDS* có vai trò rất quan trọng ở cà chua; sự điều hòa phiên mã trình tự gen mã hóa *PDS* liên quan chặt với promoter chịu trách nhiệm

kiểm soát sự hình thành carotenoid ở cà chua và lượng carotenoid này gia tăng đáng kể ở giai đoạn quả chín [95]. Do vậy, có thể ghi nhận lượng mRNA PDS được tăng lên gấp 10 lần ở quả giai đoạn này [95].



Hình 3.18 Kết quả phát hiện nhanh protein HBsAg ở lá và quả cà chua cây T_0

1: Mẫu quả cà chua đối chứng; 2: Nước cất; 3: Mẫu lá dòng cây chuyển gen T_0 CC1; 4, 5, 6: Mẫu quả cà chua cây chuyển gen T_0 của các dòng CC1, CC2, CC3

3.3.8 Phân tích protein tổng số dùng điện di trên gel polyacrylamide (SDS-PAGE)

Hàm lượng protein tổng trong các mẫu khảo sát

Protein sau khi được tách chiết từ quả cà chua chín, tiến hành xác định nồng độ protein bằng phương pháp Bradford và đo OD bằng máy Biomate 5 (Thermo) với đường chuẩn là các nồng độ BSA từ 0 $\mu\text{g/mL}$ đến 50 $\mu\text{g/mL}$ (phụ lục 10). Dựa vào đường chuẩn, tính ra nồng độ protein tổng tan trong dịch tách chiết (bảng 3.4).

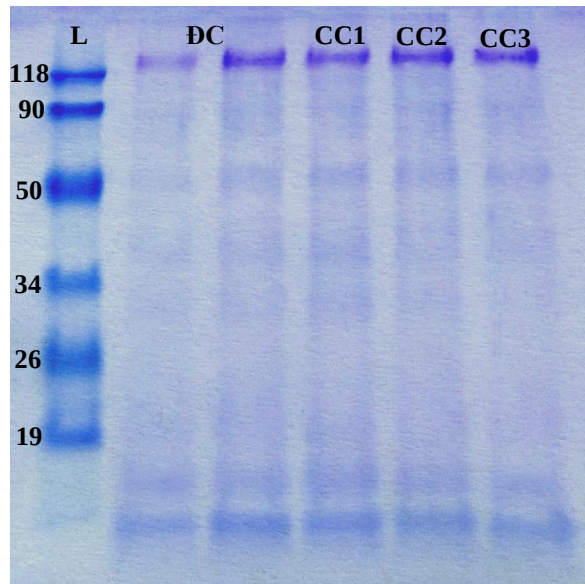
Từ bảng 3.4, hàm lượng protein tổng số ở quả chín của các dòng cà chua chuyển gen CC1, CC2, CC3 là tương đương nhau, không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng Duncan (phụ lục 10).

Bảng 3.4 Hàm lượng protein tổng số của quả các dòng cà chua chuyển gen *HBsAg*

Mẫu	Hàm lượng protein tổng số ($\mu\text{g/g}$) (TB $\pm$ SE)
Đối chứng	173,06 $\pm$ 2,75
CC1	169,14 $\pm$ 4,57
CC2	160,80 $\pm$ 9,59
CC3	155,74 $\pm$ 4,97
CV(%)	6,33
Mức ý nghĩa	ns

ns: sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức $P \leq 0,05$ theo phân hạng của Duncan

Điện di SDS-PAGE protein được tách từ quả chín 03 dòng cà chua chuyển gen, cùng với protein quả cà chua chín không chuyển gen làm đối chứng âm. Sau khi nhuộm gel bằng dung dịch Coomassie Brilliant Blue, những băng protein hiển thị xếp dọc theo đường chạy (lane) với trọng lượng phân tử khác nhau được ghi nhận ở hình 3.19.



Hình 3.19 Kết quả điện di SDS-PAGE protein các dòng cà chua chuyển gen *HBsAg*
 - L: Thang protein chuẩn; DC: Cây không chuyển gen; 1, 2, 3: Ba dòng cây chuyển gen CC1, CC2 và CC3

Nhìn chung, các mẫu protein của các dòng cà chua chuyển gen và đối chứng không có sự khác biệt nhiều, các băng của protein tổng phân tách rõ rệt trên bề mặt bản gel. Qua hình 3.19, không nhận thấy được sự hiện diện của băng protein HBsAg có kích thước khoảng 24 kDa, có thể do lượng protein này trong quả chưa đạt yêu cầu về hàm lượng để có thể nhận biết được trên bản gel. Điều này sẽ được kiểm chứng ở kết quả Western blot.

Dựa vào trọng lượng phân tử của các băng protein trong thang chuẩn, xây dựng đường chuẩn trọng lượng phân tử protein (phụ lục 10). Tiến hành xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính tương quan giữa giá trị Rf và Log của các protein trong thang chuẩn bằng phần mềm Excel:

$$Y = -1,4537x + 5,1633$$

Trong đó: Y = Log trọng lượng phân tử protein

X = Rf tỷ số giữa khoảng cách di chuyển của protein và khoảng cách di chuyển của phẩm màu bromophenol blue

$$Y = \text{Log MW} \Rightarrow \text{MW} = 10^Y$$

Bảng 3.5 Khoảng cách di chuyển các băng protein trên bản gel của các mẫu khảo sát

Rf M1 (cm)	Rf M2 (cm)	Rf M3 (cm)	Rf M4 (cm)
0,080	0,080	0,080	0,080
0,096	0,096	0,096	0,096
0,129	0,129	0,129	0,129
0,209	0,209	0,209	0,209
0,242	0,242	0,242	0,242
0,306	0,306	0,306	0,306
0,514	0,514	0,515	0,515
0,693	0,661	0,677	0,693
0,790	0,725	0,725	0,724

Từ phương trình hồi quy tuyến tính dùng phương pháp ngoại suy để tính và cho kết quả ở bảng 3.5 và 3.6.

Bảng 3.6 Trọng lượng phân tử các băng protein ở các mẫu đối chứng và chuyển gen *HBsAg*

Mw 1 (Dal)	Mw 2(Dal)	Mw 3 (Dal)	Mw 4 (Dal)
111430,479	111430,479	111430,479	111430,479
105619,668	105619,668	105619,668	105619,668
94574,205	94574,205	94574,205	94574,205
72356,358	72356,358	72356,358	72356,358
64789,495	64789,495	64789,495	64789,495
52295,919	52295,919	52295,919	52295,919
26067,429	26067,429	25980,320	25980,320
14318,116	15936,917	15105,847	14318,116
10348,490	12863,744	12863,744	12906,877

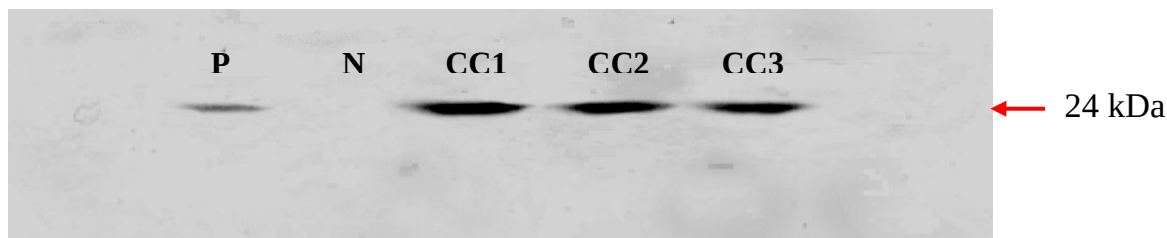
Rf: khoảng cách di chuyển; *Mw*: trọng lượng phân tử; *M1*: mẫu đối chứng cà chua *TN412*; *M2*, *M3*, *M4*: ba dòng cà chua chuyển gen *HBsAg* *CC1*, *CC2* và *CC3*

3.3.9 Phân tích Western blot các dòng cà chua chuyển gen *HBsAg*

Ngoài sử dụng kỹ thuật SDS-PAGE (kết quả không phát hiện được protein *HBsAg*), kỹ thuật Western blot cũng được thực hiện và là kỹ thuật tối cần thiết để kiểm tra sự hiện diện của protein này. Kết quả phân tích Western blot (hình 3.20) cho thấy mẫu protein ở quả chín các dòng cà chua chuyển gen *CC1*, *CC2*, *CC3* đều có tín hiệu trên phim - thể hiện sự biểu hiện của gen *HBsAg*. Sự bắt cặp kháng nguyên *HBsAg* với kháng thể đa dòng *HBsAg* (SAB4700767 – Sigma Aldrich) trong Western blot là sự bắt cặp đặc hiệu.

Kết quả (hình 3.20) cho thấy có các băng protein (tách chiết từ mẫu quả chín) ở cả ba dòng *CC1*, *CC2* và *CC3*. So với trọng lượng phân tử của protein chuẩn (đã được biết là 24 kDa, RPN800E – GE Healthcare), có thể xác định được các protein ở 03 dòng chuyển gen cũng có trọng lượng phân tử 24 kDa và kết quả này phù hợp

với kết quả nghiên cứu của các tác giả Unni (2010); Guan (2012), Kalenahalli (2013) và Nair (2013).



Hình 3.20 Kết quả phân tích Western blot dương tính đối với các dòng cà chua chuyển gen - P: Protein HBsAg tinh khiết - 10 ng; N: Cây không chuyển gen; CC1, CC2 và CC3: Ba dòng cây cà chua chuyển gen HBsAg

Hình 3.20 cũng cho thấy không có các băng protein HBsAg có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 24 kDa. Điều này chứng tỏ gen chuyển HBsAg tích hợp và biểu hiện ổn định ở bộ gen cây (theo cá nhân). Độ đậm băng protein của ba dòng cà chua chuyển gen CC1, CC2, CC3 trong hình 3.20 cho thấy mức biểu hiện protein tái tổ hợp giữa các dòng chuyển gen này không có sự khác biệt nhiều tuy gen HBsAg được gắn vào những vị trí khác nhau trên các nhiễm sắc thể khác nhau của ba dòng cây chuyển gen (independent events). Sự biểu hiện khá đồng đều của gen HBsAg là do sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* - phương pháp biến nạp được quan tâm sử dụng rất nhiều trong thời gian gần đây. So với phương pháp bắn gen (biolistic method), phương pháp này tạo số bản sao của gen ít. Sự biểu hiện của protein tiết đặc biệt những protein có cầu nối disulfide trong tế bào chất của tế bào thường rất thấp [156] do sự thoái hóa hoặc bị mất sự ổn định trong điều kiện môi trường tế bào chất. Vì vậy, ở nhiều loài thực vật, đã không thành công trong việc tạo lượng protein HBsAg cao như mong muốn. Lượng protein HBsAg ở luận án được tiếp tục xác định qua phân tích bằng ELISA.

3.3.10 Kiểm tra hàm lượng protein HBsAg bằng phương pháp ELISA

Dung dịch protein được phân tích bằng ELISA Sandwich để xác định hàm lượng protein HBsAg trong quả dựa theo một số tài liệu [31, 102, 118]. Cuối quá trình thực hiện, đọc kết quả bằng máy Benchmark Plus – microplate spectrophotometer (BioRad, USA) nối với máy tính. Kết quả được xử lý dùng phần

mềm tin học và dựa trên đường chuẩn các nồng độ kháng nguyên protein HBsAg (BF 6015 - Aalto Bio) để tính ra nồng độ protein HBsAg có trong các mẫu khảo sát. Kết hợp với kết quả tính nồng độ protein tổng số, suy ra tỷ lệ protein HBsAg có trong protein tổng số của mỗi mẫu khảo sát.

Bảng 3.7 Tương quan giữa giá trị OD và các nồng độ protein HBsAg (BF 6015 - Aalto Bio) dùng làm đường chuẩn

HBsAg (ng/ml)	0	0,09375	0,1875	0,375	0,75	1,5	3,0
OD	0	0,149	0,203	0,499	1,146	1,734	3,211

Từ kết quả OD trong bảng 3.7, dựng đồ thị đường chuẩn protein HBsAg (phụ lục 10) với phương trình $y = 1,065x + 0,092$, tính ra nồng độ protein HBsAg trong những mẫu khảo sát. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.8.

Kết quả cho thấy chỉ số OD của mẫu quả cà chua đối chứng không chuyển gen trong bảng 3.8 bằng 0.

Bảng 3.8 Hàm lượng và tỷ lệ protein kháng nguyên HBsAg trên protein tổng số trong những mẫu khảo sát

Mẫu	Hàm lượng protein HBsAg (ng/g) (TB±SE)	Tỷ lệ protein HBsAg/ protein tổng số (%)
Đối chứng	0	0
CC1	202,97 ± 5,49 a	0,12
CC2	186,99 ± 6,08 ab	0,11
CC3	171,32 ± 5,47 b	0,11
CV (%)	5,26	-

Ghi chú: Các số có chữ cái khác nhau trong cùng một cột thì sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức $P \leq 0,05$ theo phân hạng của Duncan.

Đây là kết quả được xem là chính xác bởi vì theo nguyên tắc của ELISA Sandwich, protein kháng nguyên được bắt cặp bởi kháng thể đặc hiệu thứ nhất (SAB4700767 – Sigma, USA) và được phát hiện bằng kháng thể đơn dòng đặc hiệu thứ hai (PA1-73088 - ThermoFisher ScientificTM, USA). Do đó, tất cả những protein không phải HBsAg không thể bắt cặp với kháng thể đặc hiệu thứ nhất và bị

loại bỏ qua những lần rửa đĩa. Vì vậy, mẫu dùng phân tích ELISA Sandwich không cần phải tinh sạch trước.

Từ kết quả ELISA định lượng protein HBsAg và kết quả định lượng protein tổng số bằng phương pháp Bradford tính ra tỷ lệ hàm lượng protein HBsAg trên protein tổng - trình bày trong bảng 3.8.

Quả cà chua ở ba dòng cây chuyển gen *HBsAg* tạo protein tái tổ hợp chiếm khoảng từ 171,32 ng/g trọng lượng tươi (TLT) đến 202,97 ng/g TLT. So với kết quả của tác giả như Guan và cs. (2012) khi sử dụng promoter *CaMV35S* với mức biểu hiện HBsAg ở quả là 127,54 ng/g TLT, thì lượng protein HBsAg nhận được ở luận án đối với gen được điều khiển bởi promoter *PDS* cao hơn - chiếm khoảng 0,11% trong protein tổng số. Trong nghiên cứu của Sindhu và cs. (2010), lượng protein tái tổ hợp trong cây chuyển gen có thể dao động từ 0,002 đến 0,8% trong protein tổng số, phụ thuộc vào promoter tạo biểu hiện gen và giống cây (genotype) được biến nạp. Rukavtsova và cs. (2009) sử dụng promoter *CaMV35S*, protein HBsAg trong cây chuyển gen chiếm khoảng 0,01 - 0,05% trong protein tổng số. Gao và cs. (2003) cho rằng lượng protein HBsAg/TSP trong cây chuyển gen chiếm tỷ lệ 0,001% hoặc khoảng 0,005% protein HBsAg/TSP trong nghiên cứu của Guan và cs. (2012).

Ở luận án, kết quả lượng protein HBsAg trong quả cà chua cao có thể là do promoter được sử dụng trong plasmid chuyển gen là promoter *PDS* - biểu hiện chuyên biệt ở quả, với sự kết hợp của promoter *T7* của thực khuẩn thể làm tăng cường sự biểu hiện của gen chuyển. Ở giai đoạn tạo quả, promoter *PDS* điều khiển hoạt động gen *T7 polymerase* tạo sản phẩm và sản phẩm này kích hoạt gen *HBsAg* và gen *gus*. Gen *PDS* được biểu hiện cao ở quả khi bắt đầu chuyển sang màu cam đặc biệt cao nhất ở quả chín (màu đỏ). Mức biểu hiện cao của gen này dẫn đến sự hoạt động mạnh của những enzyme để chuyển đổi phytoene thành ζ -carotene và lycopene ở quả. Gen *PDS* này cũng được ứng dụng kết hợp với gen khác để biến nạp gen tạo cây trồng với lượng lycopene cao. Ở nghiên cứu của Srinivas và cs. (2008), khi sử dụng promoter khác - promoter EFE của chuối, lượng protein HBsAg thu được ở quả cà chua của các dòng chuyển gen thì thấp hơn lượng protein HBsAg

ở lá khoảng 3 - 4 lần, có thể do promoter này chỉ có khả năng tạo biểu hiện protein HBsAg cao ở lá.

Sở dĩ hàm lượng protein ở quả cà chua xanh hay ở lá cà chua không được kiểm tra vì mục tiêu của luận án là chú trọng bộ phận ăn được (quả chín hoàn toàn) trong việc tạo vaccine ăn được. Ở quả cà chua chín đỏ hoàn toàn, hàm lượng β -carotene và lycopene cao nhất so với ở giai đoạn quả xanh, có thể nhiều hơn từ 1,9 đến 3,3 lần. Hơn nữa, ở giai đoạn quả chín đỏ, hàm lượng đường (glucose, fructose), TSS (Total Soluble Solid), Titratable acid cũng cao nhất [38, 108, 121, 163, 173]. Ngoài ra, trong quả xanh còn chứa một lượng khá nhiều chất độc tomatine, lượng chất này giảm dần theo mức độ chín của quả và biến mất hoàn toàn khi quả chín đỏ. Do đó không nên sử dụng quả xanh để ăn vì có thể gây nhức đầu, chóng mặt, buồn nôn [8]. Vì vậy, sự biểu hiện gen *HBsAg* chỉ được kiểm tra đối với quả chín.

Tóm lại, qua tham khảo tài liệu và thực tế đề tài, để gia tăng sự biểu hiện gen chuyển trong cây có thể sử dụng tín hiệu SEKDEL (biểu hiện mạng lưới nội chất), sử dụng các loại promoter mạnh (như promoter *E8*, *T7*), promoter tạo biểu hiện ở bộ phận đặc trưng như *PDS* kết hợp promoter *T7* trong nghiên cứu này.

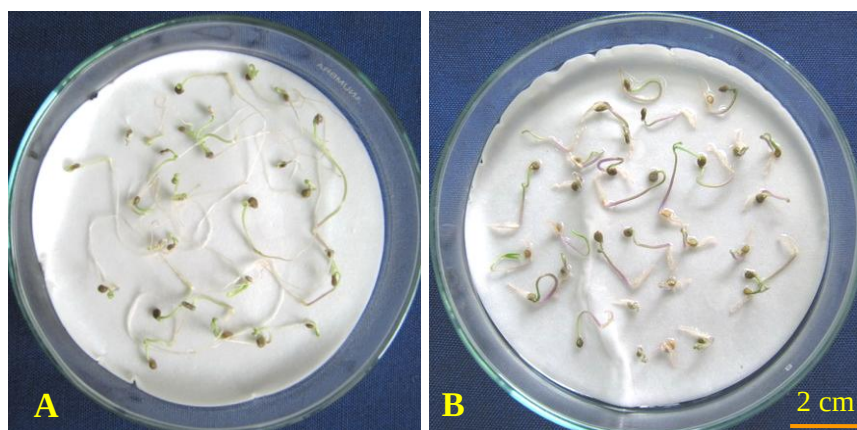
3.4 Kiểm tra sự di truyền của gen chọn lọc *nptII* và gen chuyển mục tiêu *HBsAg* ở thế hệ T_1 bằng phương pháp sinh học định tính và kỹ thuật PCR

Các cây của những dòng chuyển gen CC1, CC2, CC3 và cây đối chứng không chuyển gen được trồng ngoài vườn ươm đến khi ra hoa, tạo quả chín và thu nhận hạt để tiến hành một số thí nghiệm kiểm tra thế hệ chuyển gen T_1 .

3.4.1 Đánh giá khả năng kháng kháng sinh kanamycin của một số cây con thế hệ sau bằng phương pháp định tính

Trước hết, hạt cà chua không chuyển gen (25 hạt) được gieo trên giá thể giấy thấm bão hòa dung dịch 100 mg/L kanamycin. Sau 7 ngày, nhận thấy ở điều kiện không có kanamycin, hạt nảy mầm bình thường, thân cây mầm màu xanh, cao từ 1,5 đến 2 cm, rễ dài trung bình vài cm, màu trắng. Ở điều kiện có kanamycin, hạt nảy mầm rất kém, thân ngắn, cong, có sắc tố tím, chiều cao trung bình cây mầm

dưới 1 cm; rễ hơi hồng, ngắn, có nhiều lông hút, dài 5 - 7 mm (hình 3.21). Nếu xử lý kanamycin từ 200 – 300 mg/L, hạt nảy mầm rất yếu – mầm còi cọc, sinh tổng hợp diệp lục tố bị suy thoái dẫn đến lá mầm bị trắng, cây mầm chết sau đó (số liệu cá nhân).



Hình 3.21 Sự ức chế nảy mầm của kháng sinh kanamycin trên hạt cà chua không chuyển gen ở 7 NSC - A. Hạt nảy mầm trên giá thể giấy thấm nước không có kanamycin; B. Hạt nảy mầm trên giá thể giấy thấm nước có kanamycin 100 mg/L

Sau thử nghiệm trên, hạt từ quả cà chua chín chuyển gen *HBsAg* thế hệ T_0 sau khử trùng được nuôi cấy trên môi trường nảy mầm $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung kháng sinh kanamycin 100 mg/L để tìm hiểu khả năng kháng kanamycin.

Bảng 3.9 Kết quả thử nghiệm khả năng kháng kháng sinh của hạt từ quả cà chua chín chuyển gen *HBsAg* thế hệ T_0 trên môi trường nảy mầm $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung kanamycin 100 mg/L ở 7 NSC

Dòng cà chua	Số lượng hạt thử nghiệm (hạt)	Số hạt nảy mầm tốt (hạt)	Số hạt nảy mầm kém (hạt)	χ^2	C (α , n)
CC1	40	28	12	0,53	3,841
CC2	40	31	9	0,13	3,841
CC3	40	29	11	0,13	3,841

Kết quả cho thấy đa số hạt nảy mầm bình thường. Ngược lại, một số nảy mầm rất kém (hình 3.22) – tương tự hạt cây không chuyển gen trên giấy thấm bão hòa dung dịch kanamycin 100 mg/L. Trong thử nghiệm này, bậc tự do n là 1 và trị số xác suất $C\alpha(p) = 0,05$. Tra trong bảng phân bố giá trị χ^2 của Pearson với $C(\alpha, n)$ là 3,841. So với kết quả tính toán (bảng 3.9) cho thấy các trị số χ^2 của các dòng cà chua CC1, CC2, CC3 đều nhỏ hơn 3,841. Vì vậy, giả thuyết dự kiến sự di truyền gen kháng kanamycin (gen *nptII*) theo tỷ lệ 3:1 là phù hợp với độ tin cậy $C\alpha(p) = 0,05$.



Hình 3.22 Sự nảy mầm của hạt cà chua chuyển gen thế hệ T_0 trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung kanamycin 100 mg/L ở 7 NSC

Điều này chứng tỏ gen chuyển được gắn vào một vị trí (locus) trên nhiễm sắc thể bộ gen thực vật và được di truyền theo kiểu đơn gen [15]. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của tác giả Kalenahalli và cs. (2013) và Nair và cs. (2013) qua kiểm tra khả năng nảy mầm của hạt cây T_0 (40 hạt) đối với mỗi dòng cà chua chuyển gen trên môi trường chứa kháng sinh kanamycin 100 mg/L để phân tích sự di truyền của gen *HBsAg* – cũng tuân theo quy luật di truyền của Mendel (phân ly theo tỷ lệ 3:1).

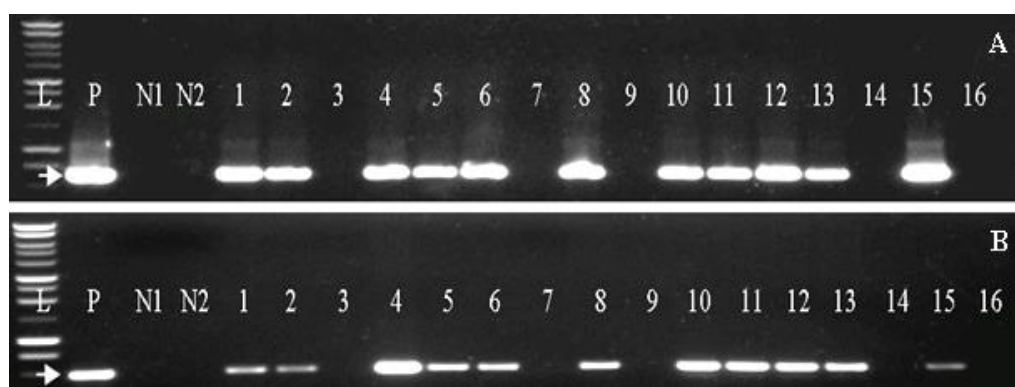
Các cây mầm này sau đó được đưa ra trồng ở bầu đất (hình 3.23) để tiếp tục nghiên cứu, số còn lại được tiếp tục nuôi cấy giữ dòng dài hạn trong điều kiện *in vitro*.



Hình 3.23 Cây con từ hạt cà chua chuyển gen *HBsAg* kháng kanamycin 100 mg/L trồng ở vườn ươm ở 30 NSC

3.4.2 Phương pháp PCR

Lá của một số cây con thế hệ T_1 (16 cá thể) của 01 dòng chuyển gen *HBsAg* (CC1) và đối chứng không chuyển gen được thu nhận để tiến hành tách chiết DNA và phân tích PCR các gen *HBsAg*, gen *nptII* với cặp mồi đặc hiệu cho từng gen.



Hình 3.24 Kết quả kiểm tra PCR gen kháng kanamycin *nptII* và gen *HBsAg* ở một số cá thể cây con cà chua thế hệ T_1 của dòng CC1

A. Kiểm tra PCR gen *nptII* dương tính với băng DNA 600 bp (vị trí mũi tên) (L: Thang DNA chuẩn 1 kb; 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 681 bp (vị trí mũi tên) (L: Thang DNA chuẩn 1 kb; 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)

Kết quả điện di sản phẩm PCR gen *HBsAg* và gen *nptII* cho thấy có băng DNA có kích thước 681 bp và băng 600 bp tương ứng với kích thước băng DNA được khuếch đại từ plasmid mang gen *HBsAg* và gen *nptII* (đối chứng dương). Ở đối chứng âm - nước cất và lá cà chua không chuyển gen không xuất hiện băng DNA kích thước này (hình 3.24). Kết quả ở hình 3.24 bước đầu cho thấy có sự di truyền liên kết giữa gen *HBsAg* và gen *nptII*. Kết quả kiểm tra PCR này cùng với kết quả tính toán các trị số χ^2 của các dòng cà chua chuyển gen ở thế hệ T_0 (bảng 3.9) minh chứng gen chuyển *HBsAg* đã di truyền cho thế hệ con và phân ly theo quy luật Mendel với tỷ lệ 3:1.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu về nuôi cấy mô, biến nạp gen, kiểm tra thể biến nạp và sự di truyền của các gen biến nạp trên giống cà chua TN412, luận án cho phép rút ra một số kết luận như sau:

1. Đã xây dựng hoàn thiện hệ thống tái sinh chồi từ lá mầm nuôi cấy *in vitro* cho giống cà chua TN412 làm tiền đề cho nghiên cứu biến nạp gen. Tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất, số lượng chồi trên mẫu nhiều nhất được ghi nhận trên môi trường khoáng MS (vitamin B5) có bổ sung BA 2,0 mg/L và IAA 0,5 mg/L. Đã xác định được nồng độ tối thiểu của kháng sinh kanamycin ảnh hưởng đến tái sinh chồi/ gây chết lá mầm và sự sinh trưởng/ gây chết cây con nuôi cấy *in vitro* là 50 mg/L.

2. Đã xây dựng hoàn chỉnh quy trình biến nạp gen *HBsAg* vào lá mầm nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang plasmid pITB-*HBsAg* với kết quả tạo được 03 dòng cà chua chuyển gen. Các bước cơ bản của quy trình này bao gồm giai đoạn tiền nuôi cấy lá mầm trên môi trường tái sinh trong 2 ngày; gây nhiễm lá mầm với dòng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 trong 20 phút; nuôi chung lá mầm với vi khuẩn trong 2 ngày; chọn lọc, tái sinh chồi chuyển gen từ lá mầm nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 50 mg/L kanamycin.

3. Đã kiểm tra sự hiện diện, biểu hiện của gen chuyển ở thể chuyển gen T_0 bằng kỹ thuật PCR, giải trình tự đoạn gen, Southern blot, phương pháp hóa mô tế bào (GUS assay), sinh học định tính, hóa sinh (ELISA) và Western blot. Protein *HBsAg* chiếm 0,11% trên tổng số protein hòa tan của quả.

4. Bằng phương pháp sinh học định tính qua kiểm tra khả năng kháng kháng sinh kanamycin 50 – 100 mg/L và bằng kỹ thuật PCR đã xác định được sự di truyền của gen chọn lọc *nptII* và gen chuyển mục tiêu *HBsAg* ở thế hệ T_1 . Bước đầu ghi

nhận có sự phân ly di truyền hai gen nói trên cơ bản phù hợp quy luật Mendel với tỷ lệ 3:1.

Đề nghị

Cần tiến hành khảo sát chi tiết ảnh hưởng của các thông số đến tần số biến nạp gen như hợp chất phenol acetosyringone với các nồng độ khác nhau, thời gian (số ngày) nuôi chung mô với vi khuẩn.

Cần tiếp tục giữ các dòng cây T_0 , T_1 ở điều kiện *in vitro* và theo dõi sự di truyền, biểu hiện ổn định của các gen chuyển đặc biệt là gen mục tiêu *HBsAg* ở các thế hệ sau T_2 , T_3 nhằm thu nhận dòng thuần phục vụ cho các triển khai tiếp theo về định hướng nghiên cứu tạo “vaccine ăn được” phòng ngừa bệnh viêm gan B.

Cần tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của protein *HBsAg* lên khả năng tạo đáp ứng miễn dịch trên động vật mô hình cũng như tiến tới các khảo nghiệm lâm sàng theo đúng quy trình sản xuất vaccine trong y học.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ

1. Nguyễn Thị Phương Nam, Trương Thiện Trí, Nguyễn Hữu Hổ, Lê Tấn Đức, Bùi Minh Trí, Nguyễn Hữu Tâm, 2011. Một số kết quả nghiên cứu chuyển gen *HBsAg* mã hóa protein vỏ virus viêm gan B vào cây cà chua. Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 9(4B): 817-823.
2. Nguyễn Thị Phương Nam, Trần Thị Ngọc Hà, Lê Hoàn Hảo, Lê Tấn Đức, Phạm Đức Trí, Phan Tường Lộc, Nguyễn Hữu Tâm, Bùi Minh Trí, Nguyễn Hữu Hổ, 2014. Nghiên cứu biến nạp gen *HBsAg* trên một số giống cà chua bi (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 12(7): 1005-1014.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu Tiếng Việt

1. Lê Trần Bình, Cao Huyền Trang, 2005. Nghiên cứu phát triển sản xuất vaccine ăn được trong thực vật. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2: 133 – 142.
2. Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang, 2004. *Di truyền phân tử*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, TP. HCM.
3. Lê Huy Chính, 2003. *Vi sinh y học*. Nhà xuất bản Y học.
4. Tạ Thu Cúc, 2005. *Giáo trình kỹ thuật trồng rau*. Nhà xuất bản Hà Nội.
5. Bùi Đại, 2002. *Viêm gan B và D*. Nhà xuất bản Y học.
6. Châu Hữu Hầu, 2001. *Tìm hiểu viêm gan virus B*. Nhà xuất bản Y học.
7. Châu Hữu Hầu, 2006. *Viêm gan virus C*. Nhà xuất bản Y học.
8. Nguyễn Hồng Minh, 2000. *Chọn giống cà chua*. Nhà xuất bản Giáo dục.
9. Chu Thị Thom, 2005. *Trồng cà chua quanh năm*. Nhà xuất bản Lao động, Hà Nội.
10. Phạm Đức Trí, Nguyễn Thị Thanh, 2009. Nghiên cứu hoàn thiện thống nuôi cấy mô định hướng việc chuyển gen vào plastid cà chua (*Solanum lycopersicon* L.). *Kỷ yếu HN QG về Sinh vật biến đổi gen và quản lý an toàn sinh học*. Nhà xuất bản Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, 183-188.
11. Phạm Đức Trí, Nguyễn Thị Thanh và Nguyễn Hữu Hổ, 2012. Chuyển nạp gen *HIV1 p24* vào lập thể cây cà chua (*Solanum lycopersicum* L.) bằng phương pháp bắn gen. *Tạp chí Sinh học* 34(3SE): 242-248.
12. Trường Đại Học Y Dược TP. Hồ Chí Minh, Bộ môn nội, 2000. *Viêm gan siêu vi B từ cấu trúc siêu vi đến điều trị*. Nhà xuất bản Đà Nẵng.

Tài liệu tiếng Anh

13. Aalto. “Do-It-Yourself” (DIY) ELISA for HIV-1-p24 Antigen. Aalto Bio Reagents Ltd. Ireland.

14. Abu-El-Heba G.A., Hussein G.M and Abdalla N.A, 2008. A rapid and efficient tomato regeneration and transformation system. *Agriculture and Forestry Research* 1/2 (58): 103-110.
15. Afroz A., Chaudhry Z., Rashid U., Ali G.M., Nazir F., Iqbal J., Khan M.R., 2011. Enhanced resistance against bacterial wilt in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) lines expressing the *Xa21* gene. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104: 227- 237.
16. Ammara U., Al-Maskri A.Y., Khan A.J and Al-Sadi A.M., 2014. Enhanced somatic embryogenesis and *Agrobacterium* mediated transformation of three cultivars of tomato by exogenous application of putrescine. *International Journal of Agriculture and Biology* 16(1): 81-88.
17. Alvare M.L., Pinyerd H.L., Crisantes J.D., Rigano M.M., Pinkhasov J., Walmsley A.M., Mason H.S. and Cardineau G.A., 2005. Plant-made subunit vaccine against pneumonic and bubonic plague is orally immunogenic in mice. *Vaccine* 24(14): 2477-2490.
18. Álvarez-Viveros M.F., Inostroza-Blancheteau C., Timmermann T., González M. and Arce-Johnson P., 2013. Overexpression of *GlyI* and *GlyII* genes in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) plants confers salt tolerance by decreasing oxidative stress. *Mol. Biol. Rep.* 4: 3281-3290.
19. Atkinson R.G., Bolitho K.M., Wright M.A., Iturriagagoitia-Bueno T., Reid S.J. and Ross G.S., 1998. Apple ACC-oxidase and polygalacturonase: ripening-specific gene expression and promoter analysis in transgenic tomato. *Plant Molecular Biology* 38: 449-460.
20. Baesi M., NabatiAhmadi D., Rajabi-Memari H., Siahpoosh M.R., Abdollahi M. R., Jaberolansar N., 2011. Cloning and transformation of Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) gene to tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 6(1): 32-41.

21. Benfey P.N and Chua N.H., 1989. Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244: 174-181.
22. Benfey P.N., Ren L. and Chua N.H., 1990a. Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains. *EMBO Journal* 9: 1685-1696.
23. Bio-Rad, Mini-Protein[®] Tetra cell – Instruction manual, Bio-Rad Laboratories, Inc.
24. Bio-Rad, Quick Start[™] Bradford Protein Assay – Instruction manual, Bio-Rad Laboratories, Inc.
25. Cañizares M.C., Nicholson L. and Lomonossoff G.P., 2005. Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunology and Cell Biology* 83: 263-270.
26. Chaudhry Z. and Rashid H., 2010. An improved *Agrobacterium* mediated transformation in tomato using hygromycin as a selective agent. *African Journal of Biotechnology* 9(13): 1882-1891.
27. Cheng L., Zou Y., Ding S., Zhang J., Yu X., Cao J. and Lu G., 2009. Polyamine accumulation in transgenic tomato enhances the tolerance to high temperature stress. *J. Integr. Plant Biol.* 5: 489-499.
28. Chetty V.J., Ceballos N., Garcia D., Narváez-Vásquez J., Lopez W. and Orozco-Cárdenas M.L., 2013. Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Plant Cell Rep.* 32: 239-247.
29. Christie P.J., 2004. Type IV secretion: The *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim. Biophys Acta.* 1694: 219-234.
30. Corona V., Aracri B., Kosturkova G., Bartley G.E., Pitto L., Giorgetti L., Scolnik P.A and Giuliano G., 1996. Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development. *The Plant Journal* 9(4): 505-512.

31. Crowther John R., 2001. *The ELISA Guidebook*. Humana Press Inc: 1-448.
32. Dagade S.B., Dhaduk L.K., Hariprasanna K., Mehata D.R., Bhatt V.M. and Barad A.V., 2015. Parent offspring relations of nutritional quality traits in 8x8 partial diallel cross of fresh tomatoes. *International Journal of applied Biology and Pharmaceutical Technology* 6(2): 45-55.
33. Dai S., Zheng P., Marmey P., Zhang S., Tian W., Chen S., Beachy R. and Fauquet C., 2001. Comparative analysis of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol. Breed* 7: 25-33.
34. Daley M., Knauf V.C., Summerfelt K.R. and Turner J.C., 1998. Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 17: 489-496.
35. Daniell H., Lee S.B., Grevich J., Saski C., Quesada-Vargas T., Guda C., Tomkins J. and Jansen R.K., 2006. Complete chloroplast genome sequences of *Solanum bulbocastanum*, *Solanum lycopersicum* and comparative analyses with other Solanaceae genomes. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1503-1516.
36. Diminsky D., Schirmbech R., Reimann J., Barenholz Y., 1997. Comparison between hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles derived from mammalian cells (CHO) and yeast cells (*Hansenula polymorpha*): composition, structure and immunogenecity. *Vaccine* 15(6): 637-647.
37. Domansky N., Ehsani P., Salmanian A.H., Medvedeva T., 1995. Organ-specific expression of the hepatitis B surface antigen in potato. *Biotechnol. Lett.* 17: 863-866.

38. Duma M., Alsina I., Dubova L. and Erdberga I., 2015. Chemical composition of tomatoes depending on the stage of ripening. *Chemine Technologija* 1(66): 24-28.
39. Ehsani P., Khabiri A., Domansky N., 1997. Polypeptide of hepatitis B surface antigen in transgenic potato. *Gene* 190: 107-111.
40. Elías-López A.L., Marquina B., Gutiérrez-Ortega A., Aguilar D., Gomez-Lim M. and Hernández-Pando R., 2008. Transgenic tomato expressing interleukin-12 has a therapeutic effect in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 154: 123-133.
41. Elkholy S.F., Ismail R.M., Bahieldin A., Sadik A.S. and Madkour M.A., 2009. Expression of Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) gene in transgenic banana (*Musa* sp.). *Arab J. Biotech.* 12(2): 291-302.
42. El-Siddig M.A., El-Hussein A.A., Siddig M.A.M., Elballa M.M.A. and Saker M.M., 2009. *Agrobacterium*- mediated transformation and *in vitro* regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants cv. castlerock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 7(1): 11-17.
43. Enten J., Yee B., 1998. "Green Fluorescent Protein (GFP)", Cellular Analysis Business Center, Beckman, Inc, Miami, FL 33196.
44. Fang R.X., Nagy F., Sivasubramaniam S. and Chua N.H., 1989. Multiple *cis* regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants. *Plant Cell* 1: 141-150.
45. Filichkin S.A. and Gelvin S.B., 1993. Formation of a putative relaxation intermediate during T-DNA processing directed by the *Agrobacterium tumefaciens* VirD1, D2 endonuclease. *Mol. Microbiol.* 8: 915-926.
46. Fulton T.M., Chunwongse J. and Tanksley S.D., 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other *Herbaceous* plants. *Plant Mol. Biology Reporter* 13(3): 207-209.

47. Gao Y., Ma Y., Li M., Cheng T., Li S-W., Zhang J., Xia N-S., 2003. Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing HBsAg. *World Journal of Gastroenterology* 9(5): 996-1002.
48. Gaziano J.M., Manson J.E., Branch L.G., Colditz G.A., Willett W.C. and Buring J.E., 1995. A prospective study of consumption of carotenoids in fruits and vegetables and decreased cardiovascular mortality in the elderly. *Ann Epidemiol* 5: 255-60.
49. GE Healthcare, Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system – Product Booklet. GE Healthcare UK Limited.
50. GE Healthcare, Amersham gene images alkphos direct labelling and detection system – Product Booklet. GE Healthcare UK Limited.
51. GE Healthcare, Western blotting – Principles and Methods. GE Healthcare Bio-Science AB.
52. Gerlich W.H. and Bruss V., 1992. Functions of hepatitis B virus proteins and molecular targets for protective immunity. In *Hepatitis B Vaccines in Clinical Practice* (Ed. R.W. Ellis). Marcel Dekker, Taylor & Francis CRC Press: Boca Raton, pp. 41-82.
53. Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K., Kowalczyk T and Kononowicz A.K., 2015. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 120: 881-902.
54. Giovannucci E., 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 317-31.
55. Goel D., Singh A.K., Yadav V., Babbar S.B., Bansal K.C., 2010. Overexpression of osmotin gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Protoplasma* 245: 133-141.

56. Goldsbrough A.P., Lastrella C.N. and Yoder J.I., 1993. Transposition- mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomatoes. *Biotechnology* 11: 1286-1292.
57. Gomes K.A. and Arturo A.G., 1984. *Statistical procedures for agriculture research*. 2nd Edition. John Wiley and Sons, Inc., 306-308.
58. Guan Z.J., Guo B., Hao H.Y., Huo Y.L. and Wei Y.H., 2011. Morphological and physiological characteristics of transgenic cherry tomato mutant with *HBsAg* gene. *Russian Journal of Genetics* 47(8): 923-930.
59. Guan Z.J., Guo B., Hao H.Y., Huo Y.L., Dai J.K and Wei Y.H., 2012. Expression of hepatitis B surface antigen (*HBsAg*) gene in transgenic cherry tomato. *African Journal of Biotechnology* 11(28): 7186-7192.
60. Gupta B. and Rajam M.V., 2013. Marker-free transgenic tomato with engineered mannitol accumulation confers tolerance to multiple abiotic stresses. *Cell Dev. Biol.* 2(2): 1-11.
61. Hadi M.Z., McMullen M.D. and Finer J.J., 1996. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Reports* 15: 500-505.
62. Halliwell B., 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence. *Lancet* 344: 721-4.
63. Halliwell B., Murcia M.A., Chirico S. and Aruoma O.I., 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 7-20.
64. Harwood W.A., Bartlett J., Alves S., Perry M., Smedley M., Leyland N. and Snape J.W., 2009. Barley transformation using *Agrobacterium*-mediated techniques. In *Methods in Molecular Biology*, Transgenic Wheat, Barley and Oats (Eds. H. D. Jones & P. R. Shewry), Vol 478, Chapter 9, pp. 137-147.

65. He Z.M., Jiang X.L., Qi Y. and Luo D.Q., 2008. Assessment of the utility of the tomato fruit-specific E8 promoter for driving vaccine antigen expression. *Genetica* 133: 207-214.
66. Hiei Y., Ohta S., Komari T. and Kumashiro T., 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6: 271-282.
67. Hsieh T.H., Li C.W., Su R.C., Cheng C.P., Tsai Y.C. and Chan M.T., 2010. A tomato bZIP transcription factor, S1AREB, is involved in water deficit and salt stress response. *Planta* 231: 1459-1473.
68. Hu D.G., Wang S.H., Luo H., Ma Q.J., Yao Y.X., You C.X and Hao Y.J., 2012. Overexpression of *MdVHA-B*, *V-ATPase* gene from apple. confers tolerance to drought in transgenic tomato. *Sci. Hortic.* 145: 94-101.
69. Hwang H.H. and Gelvin S.B., 2004. Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *Plant Cell* 16: 3148-3167.
70. Ishag S., Osman M.G. and Khalafalla M.M., 2009. Effects of growth regulators, explant and genotype on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* c.v. Omdurman). *Int. J. Sustain. Crop Prod.* 4(6): 7-13.
71. Jabeen N., Mirza B., Chaudhary Z., Rashid H., Gulfraz M., 2009. Study of the factors affecting *Agrobacterium* mediated gene transformation in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. riogrande using rice chitinase (*cht-3*) gene. *Pak. J. Bot.* 41(5): 2605-2614.
72. Jani D., Meena L. S., Singh Y., Sharma A.K., Tyagi A.K., 2002. Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. *Transgenic Research* 11: 447-454.

73. Joung Y.H., Youn J.W., Jeon J.H., Lee B.C., Ryu C.J., Hong H.J., Kim H.C., Joung H., Kim H.S., 2004. Expression of the hepatitis B surface S and preS2 antigens in tubers of *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Rep.* 22: 925-930.
74. Juárez P., Presa S., Espí J., Pineda B., Antón M.T., Moreno V., Buesa J., Granell A. and Orzaez D., 2012. Neutralizing antibodies against rotavirus produced in transgenically labelled purple tomatoes. *Plant Biotechnol. J.* 3: 341-352.
75. Kalenahalli Y.N., Raghavendra G. and Hanumanthegowda R.P., 2013. Stability and inheritance analysis of transgenic Tobacco expressing Hepatitis B surface antigen. *Australian Journal of Crop Science* 7(7): 1010-1015.
76. Kantor M., Sestras R. and Chowdhury K., 2013. Transgenic tomato plants expressing the antigen gene PfCP-2.9 of *Plasmodium falciparum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 1: 73-79.
77. Kapusta J., 1999. A plant-derived vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J.* 13: 1796-1799.
78. Kapusta J., 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.
79. Khare N., Goyary D., Singh N.K., Shah P., Rathore M., Anandhan S., Sharma D., Arif M., Ahmed Z., 2010. Transgenic tomato cv. Pusa Uphar expressing a bacterial mannitol-1-phosphate dehydrogenase gene confers abiotic stress tolerance. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 103: 267-277.
80. Kim H.S., Youma J.W., Moona K.B., Ha J.H., Kim Y.H., Joung H. and Jeon J.H., 2012. Expression analysis of human β -secretase in transgenic tomato fruits. *Protein Expr. Purif.* 82: 125-131.

81. Kohli A., Twyman R.M., Abranches R., Wegel E., Stoger E. and Christou P., 2003. Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Mol. Biol.* 52: 247-258.
82. Komari T., Hiei Y., Saito Y., Murai N. and Kumashiro T., 1996. Vectors carrying two separate T-DNA for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.* 10: 165-174.
83. Krasnyanski S.F., Sandhu J., Domier L.L., Buetow D.E., Korban S.S., 2001. Effect of an enhanced CaMV 35S promoter and a fruit- specific promoter on *uid* gene expression in transgenic tomato plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol – Plant* 37: 427-433.
84. Kucuk O., 2001. Phase II randomized clinical trial of lycopene supplementation before radical prostatectomy. *Cancer Epidemiol. Biom. Prev.* 10: 861-868.
85. Kumar K.K., Maruthasalam S., Loganathan M., Sudhakar D. and Balasubramanian P., 2005. An improved *Agrobacterium*- mediated transformation protocol for recalcitrant elite indica rice cultivars. *Plant Molecular Biology Reporter* 23: 67-73.
86. La Vecchia C., 1997. Mediterranean epidemiological evidence on tomatoes and the prevention of digestive tract cancers. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 218: 125-8.
87. Lal P., Ramachandran V.G., Goyal R. and Sharma R., 2007. Edible vaccines: Current status and future. *Indian J. Med. Microbiol.* 25: 93-102.
88. Li C., Yan J.M., Li Y.Z., Zhang Z.C., Wang Q.L. and Liang Y., 2013. Silencing the *SpMPK1*, *SpMPK2* and *SpMPK3* genes in tomato reduces abscisic acid-mediated drought tolerance. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 21983-21996.

89. Li T., Sun J.K., Lu Z.H., Liu Q., 2011. Transformation of *HBsAg* (Hepatitis B Surface Antigen) gene into tomato mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 47(2): 69-77.
90. Li X., Wang X., Guo L., Xing Y. and Xi T., 2013. Expression of epitope vaccine CTB-UA against *Helicobacter pylori* in transgenic tomato. *Biotechnology Frontier* 2(2): 12-19.
91. Ma B.G., Duan X.Y., Niu J.X., Ma C., Hao Q.N., Zhang L.X and Zhang H.P., 2009. Expression of stilbene synthase gene in transgenic tomato using salicylic acid-inducible *Cre/loxP* recombination system with self-excision of selectable marker. *Biotechnol. Lett.* 31: 163-169.
92. Mackinnon E.S., 2010. The role of the carotenoid lycopene as an antioxidant to decrease osteoporosis risk in women: clinical and *in vitro* studies. Institute of Medical Science University of Toronto, 261 pages.
93. Mahtab M.A., Rahman S., Khan M. and Karim F., 2008. Hepatitis B virus genotypes: an overview. *Hepatobiliary Pancreat Disease International* 7(5): 457-464.
94. Mandaokar A.D., Goyal R.K., Shukla A., Bisaria S., Bhalla R., Reddy V.S., Chaurasia A., Sharma R.P., Altosaar I., Kumar P.A., 2000. Transgenic tomato plants resistant to fruit borer (*Helicoverpa armigera* Hubner). *Crop Protection* 19: 307-312.
95. Mann V., Pesker I. and Hirschberg J., 1994. Cloning and characterization of the gene for phytoene desaturase (*PDS*) from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Molecular Biology* 24: 429-434.
96. Marcondes J. and Hansen E., 2008. Transgenic lettuce seedlings carrying hepatitis B virus antigen HBsAg. *Brazilian J. Infect. Dis.* 12: 469-471.
97. Mason H.S., Lam D.M.K., Arntzen C.J., 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 11745-11749.

98. Mason H.S., Lam O.Y., Froberg C.A., Lam D.M., 1994. The expression of Hepatitis B surface antigen in transgenic tomato fruit, *Advances in Scientific Research*.
99. Mason H.S., Wazecha H., Mor T. and Arntzen C.J., 2002. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol. Med.* 8: 324-329.
100. Masterson R.V., Furtek D.B., Grevelding C. and Schell J., 1989. A maize *Ds* transposable element containing a dihydrofolate reductase gene transposes in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet* 219: 461-466.
101. May G.D., Afza R., Mason H.S., Wiecko A., Novak F.J. and Arntzen C.J., 1995. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotechnology* 13: 486-492.
102. McCabe M.S., Klaas M., Gonzalez-Rabade N., Poage M., Badillo-Corona J.A., Zhou F., Karcher D., Bock R., Gray J.C., Dix P.J., 2008. Plastid transformation of high-biomass tobacco variety Maryland Mammoth for production of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) p24 antigen. *Plant Biotechnology Journal* 6: 914-929.
103. McCullen C.A., Binns A.N., 2006. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Rev. Cell Dev. Biol.* 22, pp. 101-127.
104. Mei H., Tao S.U., Yuan-Gang Z.U., Zhi-Gang A.N., 2006. Research advances on transgenic plant vaccines. *Acta Genetica Sinica* 33 (4): 285-293.
105. Mercenier A., Wiedermann U., Breiteneder H., 2001. Edible genetically modified microorganisms and plants for improved health. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 510-515.
106. Mishra K.B., Iannacone R., Petrozza A., Mishra A., Armentano N., La Vecchia G., Trtilek M., Cellini F. and Nedbal L., 2012. Engineering drought tolerance

- in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission. *Plant Sci.* 182: 79-86.
107. Moffat A.S., 1995. Exploring transgenic plants as a new vaccine source. *Science* 268: 658-60.
 108. Moneruzzaman K.M., Hossain A.B.M.S., Sani W. and Saifuddin M., 2008. Effect of stages of maturity and ripening conditions on the biochemical characteristics of tomato. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4(4): 336-344.
 109. Nair A.V., Narasimhamurthy Y.K. and Gowda P.H.R., 2013. Characterization of T₂ tobacco plants expressing the Hepatitis B gene for molecular and morphological characters. *AsPac J.Mol. Biol. Biotechnol* 21(2): 50-58.
 110. Ohta S., Mita S., Hattori T. and Nakamura K., 1990. Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequences. *Plant Cell Physiol.* 31: 805-813.
 111. Opabode J.T., 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 1: 12-20.
 112. Ow D.W., 2002. Recombinase – directed plant transformation for the post-genomic era. *Plant Mol. Biol.* 48: 183-200.
 113. Pan L., Zhang Y., Wang Y., Wang B., Fang Y., Jiang S., Lv J., Wang W., Sun Y. and Xie Q., 2008. Foliar extracts from transgenic tomato plants expressing the structural polyprotein, P1-2A and protease, 3C, from foot-and-mouth disease virus elicit a protective response in guinea pigs. *Vet. Immunol Immunopathol* 121: 83-90.
 114. Paramesh H., Fakrudin B., Kuruvinashetti M.S., 2010. Genetic transformation of a local variety of tomato using *gus* gene: an efficient genetic transformation protocol for tomato. *J. Agr. Technol.* 6(1): 87-97.

115. Pawar B.D., Jadhav A.S., Kale A.A., Chimote V.P and Pawar S.V., 2012. Zeatin induced direct *in vitro* shoot regeneration in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *An International Quarterly Journal of Life Sciences* 7(2): 247-250.
116. Pincemail J., 1995. Free radicals and antioxidants in human disease. In *Favier AE* (Eds. J. Cadet, B. Kalyanaraman, M. Fontecave & J. L. Pierre). Analysis of free radicals in biological systems. Basel. Birkhäuser Verlag, pp. 83-98.
117. Pniewski T., Kapusta J., Bociąg P., Kostrzak A., Fedorowicz-Stronska O., Czyz M., Gdula M., Krajewski P., Wolko B. and Plucienniczak A., 2012. Plant expression, lyophilisation and storage of HBV medium and large surface antigens for a prototype oral vaccine formulation. *Plant Cell Rep.* 31: 585-595.
118. Pniewski T., Kapusta J., Bociąg P., Wojciechowicz J., Kostrzak A., Gdula M., Fedorowicz-Stronska O., Wójcik P., Otta H., Samardakiewicz S., Wolko B. and Plucienniczak A., 2011. Low-dose oral immunization with lyophilized tissue of herbicide-resistant lettuce expressing hepatitis B surface antigen for prototype plant-derived vaccine tablet formulation. *J. Appl. Genetics* 52: 125-136.
119. Preedy V.R. and Watson R.R., 2008. *Tomatoes and tomato products: nutritional, medicinal and therapeutic properties*. Science Publishers, Enfield.
120. Qiu D., Diretto G., Tavaraza R., Giuliano G., 2006. Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. *Sci. Hortic.* 112: 172-75.
121. Radzevičius A., Karklelienė R., Viškelis P. and Bobinas Č., 2009. Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit quality and physiological parameters at

- different ripening stages of; Lithuanian cultivars. *Agronomy Research* 7(2): 712-718.
122. Raj S. K., Singh R., Pandey S. K., Singh B. P., 2005. *Agrobacterium*- mediated tomato transformation and regeneration of transgenic lines expressing *Tomato leaf curl virus* coat protein gene for resistance against TLCV infection. *Current Science* 88(10): 1674: 1679.
 123. Rai A.C., Singh M. and Shah K., 2013. Engineering drought tolerant tomato plants over-expressing *BcZAT12* gene encoding a C₂H₂ zinc finger transcription factor. *Phytochemistry* 85: 44-50.
 124. Ramírez N., 2003. Expression and characterization of an anti-(hepatitis B surface antigen) glycosylated mouse antibody in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants and its use in the immunopurification of its target antigen. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38: 223-230.
 125. Ranjan A., Ichihashi Y. and Sinha N.R., 2012. The tomato genome: implications for plant breeding, genomics and evolution. *Genome Biology* 13: 167.
 126. Rao A.Q., Bakhsh A., Kiani S., Shahzad K., Shahid A.A., Husnain T. and Riazuddin S., 2009. The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances* 27: 753-763.
 127. Renuga G., Saravanan R., Thandapani A.B. and Arumugam K.R., 2010. Expression of Cholera toxin B subunit in banana callus culture. *J. Pharm. Sci. & Res.* 2(1): 26-33.
 128. Renuga G., Thandapani A.B. and Arul A.K.J., 2014. Transgenic banana callus derived recombinant cholera toxin B subunit-as potential vaccines. *Int. J. Curr. Sci.* 10: 61-68.

129. Rick C.M., 1975. Tomato: *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae). In *Evolution of Crops* (ed. N.W. Simmonds). New York: Longman, pp. 268-273.
130. Rick C.M., 1978. The tomato. *Scientific American* 257(8): 76-87.
131. Rimm E.B., Stampfer M.J., Ascherio A., Giovannucci E., Colditz G.A. and Willett W.C., 1993. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N. Engl. J. Med.* 328: 1450-6.
132. Roy R., Purty R.S., Agrawal V., Gupta S.C., 2006. Promoterless *gus* gene shows leaky β - glucuronidase activity during transformation of tomato with *bspA* gene for drought tolerance. *Biologia Plantarum* 50(3): 352-358.
133. Rukavtsova E.B., Abramikhina T.V., Shulga N.Y., Bykov V.A., Buryanov Y.I., 2007. Tissue specific expression of hepatitis B virus surface antigen in transgenic plant cells and tissue culture. *Russ. J. Plant Physiol.* 54(6): 770-75.
134. Rukavtsova E.B., Chebotareva E.N., Rudenko N.V. and Buryanov Y.I., 2011. Immunogenicity of biologically safe potato tubers synthesizing Hepatitis B surface antigen. *Dokl. Biol. Sci.* 437: 110-112.
135. Rukavtsova E.B., Lebedeva A.A., Zakharchenko N.S. and Buryanov Y.I., 2013. The ways to produce biologically safe marker-free transgenic plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 60(1): 14-26.
136. Sainju U.M., Dris R. and Singh B., 2003. Mineral nutrition of tomato. *Agricultural Research Station, Fort Valley State University, Fort Valley, Georgia 31088, USA.*
137. Sakakibara K.Y., Saito K., 2006. Genetically modified plants for the promotion of human health. *Biotechnol. Lett.* 28: 1983-1991.
138. Saker M.M., Salama H.S., Salama M., El-Banna A. and AbdelGhany N.M., 2011. Production of transgenic tomato plants expressing *Cry2Ab* gene for the

- control of some lepidopterous insects endemic in Egypt. *J. Genet Eng. Biotechnol.* 9: 149-155.
139. Salyaev R.K., Rekoslavskaya N.I., Stolbikov A.S., Hammond R.W. and Shchelkunov S.N., 2007. Synthesis of Hepatitis B Virus Surface Antigen in tomato plants transgenic for the preS2-S gene. *Doklady Biochem. Biophys.* 416: 290-293.
 140. Sandhu J. S., Krasnyanski S. F., Domier L. L., Korban S. S., Osadjan M. D., Buetow D. E., 2000. Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Research* 9: 127-135.
 141. Schaefer S., 2005. Hepatistis B virus: significane of genotypes. *Journal of Viral Hepatitis* 12: 111-124.
 142. Seeger C., Mason W.S., 2000. Hepatistis B Virus Biology. *Microbiology and Molecular Biology Review*, pp. 51-68.
 143. Shah M.R., Mukherjee P.K. and Eapen S., 2010. Expression of a fungal endochitinase gene in transgenic tomato and tobacco results in enhanced tolerance to fungal pathogens. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 1: 39-51.
 144. Shah S.H., Jan S.A., Ahmad N., Khan S.U., Kumar T., Iqbal A., Nasir F., Noman M., Uzma and Ali A., 2015. Use of different promoters in transgenic plant development: current challenges and future perspectives. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 15(4): 664-675.
 145. Shantha S.L., Padma, Bhat S.G., Sunil K.C. and Ragavendra R.B., 2012. Genetic manipulation of tomato (*Lycopersicon esculentum*) using *wga* gene through *Agrobacterium*-mediated transformation. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology* 8(1): 36-43.

146. Sharma M.K., Solanke A.U., Jani D., Singh Y. and Sharma A.K., 2009. A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato. *J. Biosci.* 34(3): 423- 433.
147. Sheng J. and Citovsky V., 1996. *Agrobacterium*-Plant cell DNA transfort: have virulence proteins, will travel. *The Plant Cell* 8: 1699-1710.
148. Shmit F., Oakeley E.J. and Jost J.P., 1997. Antibiotics induce genome-wide hypermethylation in cultured *Nicotiana tabacum* plants. *J. Biol. Chem.* 272: 1534-1540.
149. Singh S., Rathore M., Goyar D., Singh R.K., Anandhan S., Sharma D.K. and Ahmed Z., 2011. Induced ectopic expression of At-CBF1 in marker-free transgenic tomatoes confers enhanced chilling tolerance. *Plant Cell Rep.* 30: 1019-1028.
150. Smith R.H. and Hood E.H., 1995. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. *Crop Sci.* 35: 301-309.
151. Smith M.L., Richter L., Arntzen C.J., Shuler M.L., Mason H.S., 2003. Structural characterization of plant-derived hepatitis B surface antigen employed in oral immunization studies. *Vaccine* 21: 4011-4021.
152. Soltanmohammadi B., Jalali-Javaran M., Rajabi-Memari H. and Mohebodini M., 2014. Cloning, transformation and expression of *proinsulin* gene in tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.). *Nat. Pharm. Prod.* 9(1): 9-15.
153. Srinivas L., Sunil Kumar G.B., Ganapathi R.T., Revathi C.J. and Bapat V.A., 2008. Transient and stable expression of hepatitis B surface antigen in tomato. *Plant Biotechnol. Rep.* 2: 1-6.
154. Srivastava V., Ariza-Nieto M. and Wilson A.J., 2004. Cre-mediated site-specific gene integration for consistent transgene expression in rice. *Plant Biotechnol. J.* 2: 169-179.

155. Steinmetz K.A. and Potter J.D., 1996. Vegetables, fruits and cancer prevention: a review. *J. Am. Diet Assoc.* 96: 1027-39.
156. Streatfield S.J., 2005. Oral hepatitis B vaccine candidates produced and delivered in plant material. *Immunol. Cell Biol.* 83: 257-262.
157. Sunil Kumar G.B., Ganapathi T.R., Bapat V.A., 2004. Edible vaccines: current status and future prospect. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 10: 37-47.
158. Sunil Kumar G.B., Ganapathi T.R., Bapat V.A., 2007. Production of hepatitis B surface antigen in recombinant plant systems: An Update. *Biotechnol. Prog.* 23: 532-39.
159. Sunil Kumar G.B., Ganapathi T.R., Revathi C.J., Prasad K.S.N., Bapat V.A., 2003. Expression of hepatitis B surface antigen in tobacco cell suspension cultures. *Prot. Exp. Purif.* 32: 10-17.
160. Sunil Kumar G.B., Ganapathi T.R., Revathi C.J., Srinivas L., Bapat V.A., 2005. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. *Planta* 222: 484-493.
161. Sunil Kumar G.B., Ganapathi T.R., Srinivas L., Revathi C.J., Bapat V.A., 2006. Expression of hepatitis B surface antigen in potato hairy roots. *Plant Science*.
162. Supathaweewat K. and Klanrit P., 2013. cDNA cloning and expression analyses of phytoene synthase 1, phytoene desaturase and ζ -carotene desaturase genes from *Solanum lycopersicum* KKU-T34003. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 35(5): 517-527.
163. Teka T.A., 2013. Analysis of the effect of maturity stage on the postharvest biochemical quality characteristics of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Int. Res. J. Pharm. App. Sci.* 3(5): 180-186.

164. Teli N.P., Timko M.P., 2004. Recent developments in use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 125-145.
165. Thanavala Y., Yang Y.F., Lyons P., Mason H.S., Arntzen C.J., 1995. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 3358-3361.
166. Tiwari S., Verma P.C., Singh P.K. and Tuli R., 2009. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnology Advances* 27: 449-467.
167. Tripurani S.K., Reddy N.S., Sambasiva Rao K.R.S., 2003. Green revolution vaccines, edible vaccines. *African Journal of Biotechnology* 2(12): 679-683.
168. Tzfira T. and Citovsky V., 2000. "From Host Recognition To T-DNA Integration: The Function Of Bacterial And Plant Genes In The *Agrobacterium*- Plant Cell Interaction". *Molecular Plant Pathology*, pp. 201-212.
169. Tyagi H., Rajasubramaniam S. and Dasgupta I., 2007. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of popular indica rice variety ADT39. *Current Science* 93: 678-683.
170. Unni S.C. and Soniya E.V., 2010. Transgenic *Cucumis sativus* expressing the hepatitis B surface antigen. *a*, 28: 627-634.
171. Valdés, R., 2003. Hepatitis B surface antigen immunopurification using a plant-derived specific antibody produced in large scale. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 310: 742-747.
172. Vergunst A.C., Schrammeijer B., den Dulk-Ras A., de Vlaam C.M.T., Regensburg-Tuink T.J. and Hooykaas P.J.J., 2000. VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* 290: 979-982.

173. Viskelis P., Jankauskiene J. and Bobinaite R., 2008. Content of carotenoids and physical properties of tomatoes harvested at different ripening stages. *Foodbalt* : 166-170.
174. Vu T., Choudhury N.R. and Mukherjee S.K., 2013. Transgenic tomato plants expressing artificial microRNAs for silencing the pre-coat and coat proteins of a begomovirus, Tomato leaf curl New Delhi virus, show tolerance to virus infection. *Virus Res.* 172: 35-45.
175. Wang Y., Wisniewski M., Meilan R., Cui M. and Fuchigami L., 2006. Transgenic tomato (*Lycopersicum esculentum*) overexpressing *cAPX* exhibits enhanced tolerance to UV-B and heat stress. *J. Appl. Hortic.* 2: 87-90.
176. Wang B.Q., Zhang Q.F., Liu J.H and Li G.H., 2011. Overexpression of *PtADC* confers enhanced dehydration and drought tolerance in transgenic tobacco and tomato: effect on ROS elimination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413: 10-16.
177. Ward E. and Barnes W., 1988. VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of T-strand DNA. *Science* 242: 927-930.
178. Warzecha H. and Mason H.S., 2003. Benefits and risks of antibody and vaccine production in transgenic plants. *Journal of Plant Physiology* 160: 755-764.
179. Wu Z., Sun S., Wang F. and Guo D., 2011. Establishment of regeneration and transformation system of *Lycopersicon esculentum* Micro tom. *Br. Biotechnol. J.* 1(3): 53-60.
180. Yasmeen A., 2009. An improved protocol for the regeneration and transformation of tomato (cv Rio Grande). *Acta Physiol Plant* 31: 1271-1277.

181. Yavari D., Mohammadi S.A. and Ullah E.D., 2014. Isolation and cloning of fruit-specific *E8* promoter from local small fruit tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and analysis its transient expression. *International Journal of Biosciences* 5(4): 117-124.
182. Youm J.W., Jeon J.H., Kim H., Kim Y.H.K., Ko K., Joung H. and Kim H.S., 2008. Transgenic tomatoes expressing human beta-amyloid for use as a vaccine against Alzheimer's disease. *Biotechnol. Lett.* 30: 1839-1845.
183. Zhang W., Hou L., Zhao H. and Li M., 2012. Factors affecting regeneration of tomato cotyledons. *Biosci. Methods* 4: 27-33.
184. Zhou F., Badillo-Corona J.A., Karcher D., Gonzalez-Rabade N., Piepenburg K., Borchers A.M., Maloney A.P., Kavanagh T.A., Gray J.C. and Bock R., 2008. High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. *Plant Biotechnology Journal* 6: 897-913.

PHỤ LỤC 1

Thành phần muối khoáng cơ bản của môi trường MS, 1962 (Murashige và Skoog)

*** Đa lượng (g/L)**

KNO ₃	1,9
NH ₄ NO ₃	1,65
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,44
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37
KH ₂ PO ₄	0,17

*** Vi lượng (mg/L)**

Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025

*** Vitamins B5 (mg/L)**

Myo-Inositol	100
Nicotinic acid	1
Pyridoxine HCl	1
Thiamine HCl	10

Môi trường ½ MS

1/2 Khoáng đa lượng, 1/2 khoáng vi lượng, đường saccarose 15 g/L, 1/2 vitamin B5

Hóa chất trong phản ứng thử Gus:

- Dung dịch stock X – gluc 0,02 M

* X – gluc

70 mg

* DMSO	2 mL
* Nước	8 mL
• Dung dịch thử X – gluc	
* Stock X – gluc	5 mL
* Dung dịch đệm Na_3PO_4 (pH=7)	10 mL
* EDTA 0,25 ml (pH=7)	4 mL
* Triton 100 10%	1 mL

Môi trường LB (Luria – Bertani):

Môi trường lỏng

- Bacto yeast extract	5 g
- Bacto tryptone	10 g
- NaCl	10 g
- Nước cất	đến 1000 mL

(pH đưa về 7,0 với khoảng 0,4 mL NaOH 5N)

Môi trường AB × 20 (Chilton và cs., 1974)

* Dung dịch đệm: (g/L)

- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	78,6
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	23

* Dung dịch muối AB:

* KCl	3
* NH_4Cl	20
* $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6
* $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2
* $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
* pH = 7	

PHỤ LỤC 2

Tạo dòng *E. coli* mang plasmid pITB-HBsAg

Phương pháp tạo *E. coli* có khả năng biến nạp

1. Cấy một khuẩn lạc vi khuẩn *E. coli* dòng DH5 α vào trong 10 mL môi trường LB và ủ lắc qua đêm (16 giờ) ở 37°C.
2. Pha loãng dịch nuôi cấy để qua đêm trên theo tỉ lệ 1:100 trong dung dịch LB (0,5 mL cho 50 mL) và tiếp tục ủ lắc ở 37°C cho đến khi OD₅₉₅ đạt tới 0,45-0,55. Mất khoảng 3 giờ để vi khuẩn đạt độ đục này.
3. Ly tâm lạnh 2500 vòng/phút trong 10 phút để làm lắng tế bào vi khuẩn.
4. Đổ bỏ phần môi trường và hòa cặn vi khuẩn nhẹ nhàng trong dung dịch CaCl₂ 0,1 M đặt trong đá lạnh. Ủ lạnh ít nhất 30 phút.
5. Ly tâm lạnh 2500 vòng/ phút trong 10 phút để làm lắng vi khuẩn.
6. Hòa tan vi khuẩn rất nhẹ nhàng vào 100 μ L dung dịch CaCl₂/ glycerol 0.1 M/12,5% v/v, rồi phân ra thành 200 μ L vào các ống Eppendorf 1,5 mL đã được ủ lạnh trước. Có thể dùng ngay hoặc giữ ở -80°C.

Phương pháp biến nạp plasmid pITB-HBsAg vào vi khuẩn *E. coli*

1. Cho 1 μ L (10 ng) dung dịch plasmid vào 200 μ L của dịch competent cell, ủ trong đá khoảng 20 phút.
2. Tác động nhiệt ở 42°C khoảng 90 giây.
3. Đặt lại trong đá khoảng 2 phút.
4. Cho 1 mL môi trường LB không có kháng sinh. Nuôi lắc ở 37°C trong 1 giờ.
5. Ly tâm vi khuẩn trong 1 phút và loại bỏ nước trong (chỉ chừa lại một ít dịch phía dưới).
6. Trải dịch vi khuẩn trong môi trường LB thạch có kháng sinh tương ứng Kanamycin 50 mg/L, giữ qua đêm ở 37°C.

Kiểm tra kết quả biến nạp và sơ chọn các dòng *E. coli* DH5 α mang plasmid pITB-HBsAg

1. Sau khi ủ ở 37°C trong khoảng 16 giờ, tiến hành kiểm tra kết quả biến nạp bằng cách quan sát sự phát triển của khuẩn lạc trên đĩa biến nạp và đĩa đối chứng.

2. Chọn các khuẩn lạc *E. coli DH5α* lớn và rời rạc, lấy một ít sinh khối cấy vào mỗi bình tam giác chứa 10 mL môi trường LB-Km lỏng.

3. Ủ lắc ở 37°C trong khoảng 16 giờ. Quan sát sự tăng trưởng của các dòng đã chọn trong môi trường LB-Km và chọn dòng tăng trưởng mạnh nhất thông qua độ đục (đo OD). Sử dụng dòng *E. coli DH5α* này cho các thí nghiệm kế tiếp.

Tách chiết plasmid từ các dòng *E. coli DH5α* biến nạp (Phương pháp SDS-kiểm)

Mục đích: Thu nhận một lượng lớn vector tạo dòng, chuẩn bị cho việc biến nạp vào *Agrobacterium tumefaciens*.

Nguyên tắc: Phương pháp SDS-kiểm dựa trên sự biến tính DNA và khả năng phục hồi nhanh của DNA plasmid so với DNA genome của vi khuẩn.

SDS làm biến tính các protein của tế bào, qua đó giúp cho DNA cũng được bảo vệ khỏi sự phân cắt của DNase. Đồng thời, nồng độ NaOH cao khiến DNA tổng bị biến tính.

Khi được trung hòa bằng KOAc ở môi trường trung tính, DNA plasmid nhỏ gọn nên nhanh chóng phục hồi cấu trúc ban đầu trong khi DNA genome có kích thước lớn, cồng kềnh vẫn ở trạng thái biến tính không tan.

Sau khi ly tâm phân đoạn, DNA plasmid sẽ được thu nhận trong phần dịch nổi phía trên. DNA plasmid sẽ được tinh chế bằng phenol, chloroform và rửa dưới tác dụng của ethanol 99% rồi hòa tan lại trong TE.

Thực hiện:

1. Cấy một khuẩn lạc *E. coli* mang plasmid pITB-HBsAg giả định vào mỗi bình tam giác chứa 10 mL môi trường LB-Km lỏng. Ủ lắc qua đêm ở 37°C.

2. Cho 1,5 mL dịch nuôi cấy vào trong ống Eppendorf và ly tâm 10.000 vòng trong 1 phút ở 4°C. Hút bỏ dịch môi trường phía trên. Thêm tiếp 1,5 mL dịch nuôi cấy, lặp lại như trên.

3. Huyền phù hóa sinh khối thu được trong 200 μ L dung dịch GTE lạnh. Vortex kỹ để đảm bảo đã huyền phù tốt tất cả sinh khối.
4. Thêm 400 μ L dung dịch tẩy SDS-kiềm, trộn hỗn hợp bằng cách đảo ống Eppendorf vài lần. Giữ mẫu trong đá không quá 5 phút.
5. Thêm 300 μ L dung dịch trung hòa KOAc lạnh, nhẹ nhàng trộn hỗn hợp bằng cách đảo ống Eppendorf trong khoảng 10 giây. Ủ trong đá khoảng 5 phút.
6. Ly tâm mẫu 14.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Chuyển dịch trong phía trên sang ống Eppendorf mới, bỏ cặn.
7. Cho vào mỗi ống Eppendorf 500 μ L phenol bão hòa trong TE, vortex đều, ly tâm 14.000 vòng/phút trong 5 phút.
8. Thêm 300 μ L dung dịch trung hòa KOAc lạnh, nhẹ nhàng trộn hỗn hợp bằng cách đảo ống Eppendorf trong khoảng 10 giây. Ủ trong đá khoảng 5 phút.
9. Ly tâm mẫu 14.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Chuyển dịch trong phía trên sang ống Eppendorf mới, bỏ cặn.
10. Cho vào mỗi ống Eppendorf 500 μ L phenol bão hòa trong TE, vortex đều, ly tâm 14.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Thu dịch nổi vào ống Eppendorf mới.
11. Thêm vào 500 μ L chloroform, lắc đều, ly tâm 14.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Thu dịch nổi vào ống Eppendorf mới.
12. Tủa DNA bằng 0,8 mL ethanol 99% lạnh. Để mẫu trong đá (khoảng 4°C) khoảng 5 phút.
13. Ly tâm 14.000 vòng /phút trong 10 phút ở 4°C. Loại bỏ tất cả dịch nổi, thu tủa.
14. Rửa tủa bằng 0,8 mL ethanol 70%, ly tâm 10.000 vòng trong 1 phút và loại bỏ dịch nổi. Để khô ở nhiệt độ phòng khoảng 5-10 phút.
15. Hòa tủa vào 20 μ L TE. Xử lý bằng 2 μ L RNase (2mg/mL) ở 37°C khoảng 20 phút.
16. Bảo quản ở -20°C.

Kiểm tra plasmid thu được sau tách chiết bằng phản ứng cắt giới hạn và kỹ thuật điện di

Mục đích: Nhận biết plasmid pITB-HBsAg qua phản ứng cắt giới hạn.

Nguyên tắc: Trong cấu trúc plasmid pITB-HBsAg có vị trí cắt của enzyme giới hạn *Hind* III nên khi bị cắt bởi enzyme này, plasmid sẽ mở vòng tạo nên một đoạn DNA mạch thẳng với kích thước bằng với kích thước của plasmid pITB-HBsAg.

Kiểm tra phản ứng cắt giới hạn bằng cách cho chạy điện di sản phẩm trên gel agarose cùng với thang chuẩn.

Thực hiện:

*** Thiết lập hệ thống cắt DNA plasmid với enzyme *Hind* III**

- Đặt 1 μg DNA plasmid vào ống Eppendorf và cho nước vào để thể tích là 18 μL .
- Thêm 2 μL dung dịch đậm 10X của enzyme giới hạn *Hind* III.
- Thêm 1-2 đơn vị enzyme giới hạn *Hind* III và trộn đều hỗn hợp.
- Ủ phản ứng ở 37°C trong 4-16 giờ.

*** Điện di sản phẩm cắt giới hạn trên gel agarose**

- Cho 1 g agarose vào 120 mL dung dịch TAE đun nóng chảy.
- Để nguội đến 60°C , cho thêm 12 μL ethidium bromide (mang găng tay khi tiếp xúc với chất này).
- Đổ vào khuôn đã cài sẵn lược để tạo giếng, chờ dung dịch đông và nguội hoàn toàn.
- Cho dung dịch đậm TAE vào ngáp bản gel, nhẹ nhàng rút lược ra.
- Cho hỗn hợp DNA và dung dịch tải vào các giếng. Cắm điện cực, chạy ở khoảng 60 volt trong 2-3 giờ.
- Sử dụng thang chuẩn λ - *Hind* III.
- Xem bản gel dưới đèn cực tím.

PHỤ LỤC 3

Biến nạp plasmid pITB-HBsAg vào *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404

Quy trình tạo *A. tumefaciens* khả biến

1. Nuôi cấy chủng *A. tumefaciens* trong 5 mL môi trường LB có chứa kháng sinh Kanamycin tương ứng (hệ thống binary vector). Lắc qua đêm (12- 14 giờ) ở 28°C khoảng 250 vòng/phút.
2. Cho 2 mL dịch nuôi cấy qua đêm vào 50 mL môi trường LB có kháng sinh tương ứng lắc khoảng 4 giờ cho đến khi OD₆₀₀ khoảng bằng 1.
3. Ly tâm 50 mL dịch nuôi cấy ở 3000 vòng trong 15 phút. Loại bỏ nước trong phía trên.
4. Hòa tan vi khuẩn trong 1 mL CaCl₂ 10 mM lạnh (giữ dịch trong đá).
5. Phân ra 100 µL vào các ống Eppendorf đã được ủ lạnh trước. Làm lạnh nhanh chóng và bảo quản trong tủ - 80°C.

Quy trình chuyển plasmid vào *A. tumefaciens* khả biến

1. Đặt 1 µL (10 ng) dung dịch plasmid vào 200 µL của dịch competent cell.
2. Tác động nhiệt bằng cách cho ống Eppendorf chứa dịch vi khuẩn vào trong nitơ lỏng khoảng 90 giây.
3. Đặt lại dịch vi khuẩn trong bồn nước 37°C khoảng 5 phút.
4. Cho 1 mL môi trường LB không có kháng sinh và nuôi lắc (khoảng 50 rpm) ở 28°C trong 2- 4 giờ.
5. Ly tâm vi khuẩn trong 2 phút và loại bỏ nước trong, hòa tan dịch trong 100 µL môi trường LB mới.
6. Trãi dịch vi khuẩn trong môi trường LB thạch có kháng sinh tương ứng, giữ ở 28°C trong 2 ngày.

Kiểm tra sự biểu hiện của gen chỉ thị *lacZ* trong vi khuẩn

Mục đích: Kiểm tra sự biểu hiện của gen chỉ thị *lacZ*, qua đó nhận biết được kết quả biến nạp plasmid pITB-HBsAg vào *E. coli*/ *A. tumefaciens*.

Trong trường hợp có thực hiện việc cấu trúc lại plasmid trong *E. coli* (gắn xen gen đích), thí nghiệm này còn cho phép phát hiện vector tái tổ hợp.

Nguyên tắc: Vi khuẩn mang plasmid pITB-HBsAg có gen *lacZ*. Nếu gen này được biểu hiện thì trong môi trường có IPTG và X-gal, β -galactosidase sẽ phân cắt X-gal tạo thành hợp chất có màu xanh. Do đó các khuẩn lạc biến nạp plasmid pITB-HBsAg sẽ có màu xanh.

Thực hiện:

Thí nghiệm này được tiến hành trên *A. tumefaciens*. Nếu muốn khảo sát trên *E. coli*, thực hiện tương tự.

- Chuẩn bị các đĩa Petri ϕ 90 mm chứa môi trường LB-Km đặc.
- Cho vào mỗi đĩa 30 μ L X-gal 20 mg/mL và 30 μ L IPTG 25 mg/mL. Dùng que dàn đều hỗn hợp trên bề mặt thạch. Ủ qua đêm cho hóa chất thấm vào thạch.
- Cho vào mỗi đĩa Petri nói trên 10 μ L dịch huyền phù của *A. tumefaciens* LBA4404 đã qua biến nạp. Dùng que dàn đều dịch khuẩn trên bề mặt thạch. Ủ ở 28°C.
- Sau 2 ngày, quan sát màu sắc của các khuẩn lạc.

Tách chiết plasmid từ các dòng *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 biến nạp plasmid pITB-HBsAg và kiểm tra plasmid thu được sau tách chiết bằng phản ứng cắt giới hạn và kỹ thuật điện di.

Phân tích PCR để xác định sự hiện diện của gen *HBsAg* trong plasmid mới

Các plasmid pITB-HBsAg sau khi được tách chiết từ vi khuẩn *E. coli*/*Agrobacterium tumefaciens* sẽ được kiểm tra sự hiện diện của gen mục tiêu (gen *HBsAg*) bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen mục tiêu.

Trình tự primer:

+ Primer 1: HBV(F): 5' - TAC TGG ATC CAC CATGGA GAA CAT CAA CA - 3'

+ Primer 2: HBV(R): 5' - TCT AGA GCT CTT AAA TGT ATA CCC AGA AGA CAA AAG AA - 3'

Thí nghiệm được tiến hành với mẫu đối chứng dương là plasmid pITB-HBsAg chuẩn.

Kích thước đoạn gen *HBsAg* được khuếch đại là 681 bp.

Hỗn hợp các thành phần của phản ứng PCR như sau:

- dNTPs: 5 μ L (nồng độ đạt 2 mM cho mỗi loại dNTP).
- Buffer PCR 10X: 5 μ L.
- Primer 1: 2 μ L (nồng độ từ 50 -100 ng).
- Primer 2: 2 μ L (nồng độ từ 50 – 100 ng).
- Mẫu DNA: 5 μ L (thay đổi tùy theo nồng độ DNA).
- *Taq* polymerase: 0,5 μ L.
- Nước cất: thêm vào cho đủ thể tích 50 μ L.

Trộn nhẹ đều rồi nhỏ một giọt dầu lên bề mặt dung dịch để giữ dung dịch không bay hơi trong quá trình phản ứng.

Đặt ống vào máy và cho chạy theo chương trình định sẵn.

- Bắt đầu tách chuỗi DNA: 94 $^{\circ}$ C/ 10 phút.
- Lặp lại 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ như sau:

Tách chuỗi DNA: 94 $^{\circ}$ C/ 1 phút.

Bắt cặp mồi: 55 $^{\circ}$ C/ 1 phút

Kéo dài chuỗi DNA: 72 $^{\circ}$ C/ 1 phút.

- Hoàn tất phản ứng: 72 $^{\circ}$ C/ 10 phút
- Giữ mẫu ở 4 $^{\circ}$ C cho đến khi lấy mẫu ra khỏi máy.

Khi kết thúc phản ứng, hút bỏ lớp dầu và sử dụng phần dịch bên dưới để điện di.

DNA, dNTPs, primers, PCR 10X buffer cần được bảo quản ở -20 $^{\circ}$ C. Khi sử dụng phải luôn giữ các chất trên trong đá bào. Riêng *Taq* polymerase vẫn giữ ở -20 $^{\circ}$ C, sau khi lấy xong trữ ngay ở -20 $^{\circ}$ C. Các chất này sẽ bị giảm tác dụng khi để ở nhiệt độ phòng.

PHỤ LỤC 4

Tách chiết DNA thực vật [46]

Mục đích: Thu nhận một lượng DNA vừa đủ cho phân tích PCR

Hóa chất:

Buffer tách chiết DNA (EB): 0.35 M sorbitol, 0.1 M tris-base, 5 mM EDTA, pH 7.5.

Buffer lysis nuclei (LB): 0.2 M tris, 0.05 M EDTA, 2 M NaCl, 2% CTAB Sarkosyl 5 % w/v.

Microprep buffer: 2.5 phần EB, 2.5 phần LB, 1 phần 5% Sarkosyl, thêm 0.3 đến 0.5g sodium bisulfite (NaHSO_3)/ 100 mL buffer trước khi sử dụng.

Nguyên tắc: Chất tẩy Sarkosyl phá vỡ màng tế bào và màng nhân, giải phóng DNA đồng thời phân hủy các protein liên kết với DNA.

Dung dịch phenol/chloroform làm tủa protein. Sau ly tâm, acid nucleic hòa tan trong pha nước sẽ được thu nhận lại.

Isopropanol làm tủa acid nucleic, giúp thu nhận acid nucleic dưới dạng cô đặc. Hơn nữa, các acid nucleic trọng lượng phân tử thấp không bị tủa trong isopropanol nên có thể loại chúng ra.

Acid nucleic được thu nhận lại bằng ly tâm. Cặn tủa được rửa trong ethanol 70% để loại bỏ dấu vết các muối và isopropanol còn dính trên mẫu. RNase giúp phân hủy các RNA trong mẫu.

Thực hiện:

- Cho 100 mg mẫu lá cà chua vào ống Eppendorf 1.5 mL.
- Chuẩn bị microprep buffer, giữ ở nhiệt độ phòng.
- Thêm 200 μL buffer vào ống và nghiền nát mẫu lá bằng dụng cụ nghiền.
- Thêm 550 μL buffer và vortex nhẹ hoặc đảo bằng tay.
- Ủ ở 65°C trong bồn nước trong thời gian 30-120 phút.
- Cho thêm vào đầy ống với chloroform : isoamyl (24:1), trộn đều.
- Ly tâm ống ở 10.000 vòng/phút trong 5 phút.
- Thu nhận phần dịch nổi vào ống Eppendorf mới.
- Thêm 2/3 hoặc 1 lần lượng isopropanol lạnh vào mỗi ống, đảo ống nhẹ cho đến khi thấy kết tủa DNA.
- Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút, đổ isopropanol ra và rửa sợi DNA với ethanol 70%.

- Để khô mẫu bằng cách úp ống lên giấy thấm khoảng 1 giờ và hòa tan kết tủa trong 40 μ L TE ở 65⁰C trong 15 phút.

- Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút, trữ lạnh ở 4⁰C và dùng trong vòng 1 tuần hoặc bảo quản ở -20⁰C sử dụng lâu hơn.

PHỤ LỤC 5

Nguyên lý kỹ thuật PCR [2]

Tất cả các DNA polymerase khi hoạt động tổng hợp một mạch DNA mới từ mạch khuôn đều cần đến sự hiện diện của những đoạn mồi chuyên biệt. Mồi là những đoạn DNA ngắn có khả năng bắt cặp bổ sung với một đầu của mạch khuôn, DNA polymerase sẽ nối dài mồi để tạo thành mạch mới. Thật vậy, nếu cung cấp 2 mồi chuyên biệt bắt cặp bổ sung với 2 đầu của một trình tự DNA sẽ tổng hợp được đoạn DNA nằm giữa 2 mồi. Điều đó có nghĩa là để khuếch đại một trình tự DNA thì phải có các thông tin tối thiểu về trình tự đó đủ để tạo các mồi bổ sung chuyên biệt gồm một mồi xuôi và một mồi ngược so với chiều phiên mã của gen.

- Thực nghiệm: phản ứng PCR là một chuỗi nhiều chu kỳ nối tiếp nhau. Mỗi chu kỳ gồm 3 bước:

+ Bước 1. Trong một dung dịch phản ứng phải bao gồm các thành phần cần thiết của sự sao chép, phân tử DNA được biến tính ở nhiệt độ cao hơn T_m của phân tử, thường là 94⁰C - 95⁰C trong vòng 30 giây đến 1 phút. Đây là giai đoạn biến tính.

+ Bước 2. Nhiệt độ được hạ thấp (thấp hơn T_m của các mồi) cho phép các mồi bắt cặp với khuôn, trong thực nghiệm nhiệt độ này dao động trong khoảng 40⁰C - 70⁰C tùy thuộc T_m của mồi sử dụng và kéo dài từ 30 giây-1 phút. Đây là giai đoạn lai.

+ Bước 3. Nhiệt độ được tăng lên đến 72⁰C giúp cho DNA polymerase chịu nhiệt hoạt động tổng hợp tốt nhất. Thời gian tùy thuộc vào độ dài của trình tự DNA cần khuếch đại khoảng từ 30 giây cho đến nhiều phút. Đây là giai đoạn tổng hợp hay kéo dài.

Một chu kỳ PCR gồm 3 bước trên sẽ được lặp đi lặp lại nhiều lần và mỗi lần lại làm tăng gấp đôi lượng mẫu của lần trước đó. Đây là sự khuếch đại theo cấp số nhân; theo tính toán sau 30 chu kỳ sự khuếch đại sẽ là 10^6 so với số lượng bản mẫu ban đầu.

Các thành phần cho một phản ứng PCR

- Mồi 1 (10 pmol)	1 μ L
- Mồi 2 (10 pmol)	1 μ L
- dNTPs (10 mM)	1 μ L
- Dung dịch $MgCl_2$ (25 mM)	2 μ L
- GoTaq 5X buffer	5 μ L
- GoTaq polymerase	0,2 μ L
- Nước không có nuclease	13,8 μ L
- DNA	1 μ L

Tổng số: 25 μ L

Sản phẩm PCR được chạy điện di trên gel agarose 1,0 % bằng bộ điện di Bio-Rad với thang chuẩn 1kb Promega. Xem kết quả, chụp hình gel bằng máy Gel Documentation.

Nguyên lý chung của phương pháp Southern blot [50]

Phương pháp Southern blot sử dụng kỹ thuật đánh dấu trực tiếp mẫu dò DNA bằng alkaline phosphatase và sử dụng kết hợp với sự phát hiện bằng phát quang với CDP-Star hoặc ECF để nghiên cứu DNA của bộ gen. Kiểm tra kết quả chuyển gen hoặc kiểm tra sự có mặt của một gen nào đó trong bộ gen của tế bào dựa trên sự bắt cặp bổ sung của mẫu dò DNA với đoạn DNA có chứa trình tự bổ sung với mẫu dò đó.

Phương pháp Southern blot sử dụng kỹ thuật đánh dấu trực tiếp mẫu dò DNA với enzyme có khả năng chịu nhiệt đặc biệt AlkPhos và hệ thống phát hiện dựa trên sự phát quang bằng phản ứng hóa học với hợp chất dioxetane ($C_2O_2H_4$). Mẫu dò được biến tính hoàn toàn để trở thành sợi đơn và liên kết đôi cộng hóa trị với enzyme. Khi được đánh dấu, mẫu dò được sử dụng để lai với DNA cố định trên màng.

Trong giai đoạn phát hiện có thể sử dụng một trong các cách sau:

- Tác nhân phát hiện sự phát quang CDP-StarTM sử dụng môi-gắn alkaline phosphatase để xúc tác phân giải cơ chất ổn định dioxetane. Chúng sẽ cho vệt sáng nhanh trong thời gian ngắn, có thể cho kết quả nhanh hơn những hệ thống dioxetane khác.

- Cơ chất phát quang ECFTM có thể được sử dụng kết hợp với dụng cụ quét phát huỳnh quang.

- Trình tự DNA lai với mẫu dò gắn AlkPhos có thể phát hiện bằng tác nhân tạo màu NBT/BCIP. Hệ thống phát hiện tín hiệu này mạnh hơn không đòi hỏi độ nhạy cao.

Phương pháp dùng mẫu dò đánh dấu trực tiếp AlkPhos này có nhiều ưu điểm hơn phương pháp dùng mẫu dò phóng xạ vì:

- Tránh phải dùng phóng xạ, gây nguy hiểm cho người sử dụng.
- Dễ chuẩn bị mẫu dò.
- Kéo dài thời gian lưu giữ và có thể tái sử dụng mẫu dò nhiều lần

Nguyên lý của phương pháp định lượng protein tổng [24]

Đây là phương pháp định lượng protein dựa vào sự kết hợp giữa thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue G-250 với protein. Trong môi trường acid thuốc nhuộm tồn tại ở dạng cation (màu đỏ), đo được ở bước sóng 470 nm. Tuy nhiên, khi kết hợp với protein, nó chuyển sang dạng anion (màu xanh lục), đo được ở bước sóng 595nm. Nồng độ protein khảo sát sẽ được xác định dựa trên đường chuẩn các

nồng độ BSA đã biết trước. Thường sử dụng globulin hoặc albumin máu bò làm protein chuẩn. Phép đo rất tiện vì chỉ sử dụng một loại chất. Màu xuất hiện trong gần 2 phút và ổn định trong gần 1 giờ. Độ nhạy của phương pháp cao (1-20 μg), đôi khi nhạy hơn cả phương pháp Lowry, phương pháp Bradford cũng cho kết quả khác biệt với các loại protein khác nhau. Độ hấp thụ (mật độ quang) đo được tỷ lệ thuận với nồng độ protein.

Nguyên lý của phương pháp SDS-PAGE [23]

SDS-PAGE là kỹ thuật điện di protein trên gel polyacrylamide. Trong kỹ thuật này, protein được xử lý với SDS và β -mecarptoethanol để trở thành những protein cấu trúc bậc 1 mang điện tích âm. Dưới tác động của dòng điện, tốc độ di chuyển của các phân tử protein về cực dương phụ thuộc kích thước của chúng. Protein có kích thước lớn sẽ di chuyển chậm hơn protein có kích thước nhỏ.

Phương pháp này nhằm đưa protein về cùng vạch xuất phát và sẽ giúp protein phân tách tốt. Phương pháp này gel điện di gồm hai lớp – gel gom (Stacking gel 4%) và gel phân tách (Resolving gel 12%).

Nguyên lý của kỹ thuật Western blot [49, 51]

Protein sau khi đã phân tách, chuyển lên màng sẽ được định vị và phát hiện bằng kháng thể đặc hiệu. Thông thường, một kháng thể đặc hiệu thứ nhất không đánh dấu được dùng để bắt cặp với protein mục tiêu. Tiếp theo, kháng thể đặc hiệu thứ hai đã được đánh dấu sẽ bắt trực tiếp lên kháng thể thứ nhất tại vị trí nhất định. Enzyme gắn trên kháng thể thứ hai vừa có vai trò tác dụng với cơ chất để phát quang mà còn có vai trò tăng cường tín hiệu phát quang. Tín hiệu nhận trên phim là cơ sở kết luận định tính và định lượng protein mục tiêu.

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA [31]

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) hay EIA (Enzyme Immuno Assay) là một kỹ thuật sinh hóa để phát hiện kháng thể hay kháng nguyên trong mẫu xét nghiệm. Nguyên lý của ELISA chính là dựa vào tính đặc hiệu kháng nguyên - kháng thể và gồm các bước cơ bản như sau:

- Kháng thể đặc hiệu thứ nhất được gắn trên một bề mặt rắn.
- Kháng nguyên chưa biết sẽ được phủ lên và bắt cặp kháng thể thứ nhất.
- Ủ với kháng thể đặc hiệu thứ hai. Kháng thể này được gắn kết với enzyme.
- Thêm vào một cơ chất. Enzyme sẽ biến đổi cơ chất này và tạo tín hiệu có thể xác định được.

Đối với các ELISA phát quang, ánh sáng sẽ được phát ra từ phức kháng thể kháng nguyên. Nồng độ hiện diện của phức hợp kháng thể-kháng nguyên sẽ quyết định cường độ sáng phát ra. Với nguyên lý này, ELISA giúp xác định sự có mặt hay không có mặt cũng như nồng độ kháng nguyên trong mẫu nghiên cứu.

PHỤ LỤC 6

Tỉ lệ tái sinh *in vitro* từ lá mầm cà chua

ONEWAY TLTS BY BA
/STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY
/MISSING ANALYSIS

/POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).

Oneway

Notes

Output Created		03-Aug-2015 10:07:01
Comments		
Input	Data	C:\Users\bioanalyzer\Desktop\TLTS -CC.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	18
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.

Syntax	ONEWAY TLTS BY BA /STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).	
Resources	Processor Time	00:00:00.202
	Elapsed Time	00:00:00.207

Descriptives

TLTS										
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between- Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
1.25 mg/l		3	59.2600	2.79344	1.61279	52.3207	66.1993	56.67	62.22	
1.50 mg/l		3	67.4100	1.69555	.97893	63.1980	71.6220	65.56	68.89	
1.75 mg/l		3	79.6300	1.28172	.74000	76.4460	82.8140	78.89	81.11	
2.00 mg/l		3	87.4000	1.69231	.97705	83.1961	91.6039	85.55	88.87	
2.25 mg/l		3	82.2200	2.93678	1.69555	74.9246	89.5154	78.89	84.44	
2.50 mg/l		3	75.1833	2.79808	1.61547	68.2325	82.1341	72.22	77.78	
Total		18	75.1839	9.88407	2.32970	70.2687	80.0991	56.67	88.87	
Model	Fixed Effects			2.29633	.54125	74.0046	76.3632			
	Random Effects				4.21312	64.3537	86.0141			104.74463

Test of Homogeneity of Variances

TLTS

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.722	5	12	.619

ANOVA

TLTS						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups		1597.535	5	319.507	60.591	.000
Within Groups		63.278	12	5.273		
Total		1660.813	17			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TLTS

			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
	(I) BA	(J) BA				Lower Bound	Upper Bound
LSD	1.25 mg/l	1.50 mg/l	-8.15000 [*]	1.87495	.001	-12.2352	-4.0648
		1.75 mg/l	-20.37000 [*]	1.87495	.000	-24.4552	-16.2848
		2.00 mg/l	-28.14000 [*]	1.87495	.000	-32.2252	-24.0548
		2.25 mg/l	-22.96000 [*]	1.87495	.000	-27.0452	-18.8748
		2.50 mg/l	-15.92333 [*]	1.87495	.000	-20.0085	-11.8382
	1.50 mg/l	1.25 mg/l	8.15000 [*]	1.87495	.001	4.0648	12.2352
		1.75 mg/l	-12.22000 [*]	1.87495	.000	-16.3052	-8.1348
		2.00 mg/l	-19.99000 [*]	1.87495	.000	-24.0752	-15.9048
		2.25 mg/l	-14.81000 [*]	1.87495	.000	-18.8952	-10.7248
		2.50 mg/l	-7.77333 [*]	1.87495	.001	-11.8585	-3.6882
	1.75 mg/l	1.25 mg/l	20.37000 [*]	1.87495	.000	16.2848	24.4552
		1.50 mg/l	12.22000 [*]	1.87495	.000	8.1348	16.3052
		2.00 mg/l	-7.77000 [*]	1.87495	.001	-11.8552	-3.6848
		2.25 mg/l	-2.59000	1.87495	.192	-6.6752	1.4952
		2.50 mg/l	4.44667 [*]	1.87495	.035	.3615	8.5318
	2.00 mg/l	1.25 mg/l	28.14000 [*]	1.87495	.000	24.0548	32.2252
		1.50 mg/l	19.99000 [*]	1.87495	.000	15.9048	24.0752
		1.75 mg/l	7.77000 [*]	1.87495	.001	3.6848	11.8552
		2.25 mg/l	5.18000 [*]	1.87495	.017	1.0948	9.2652
		2.50 mg/l	12.21667 [*]	1.87495	.000	8.1315	16.3018
	2.25 mg/l	1.25 mg/l	22.96000 [*]	1.87495	.000	18.8748	27.0452
		1.50 mg/l	14.81000 [*]	1.87495	.000	10.7248	18.8952
		1.75 mg/l	2.59000	1.87495	.192	-1.4952	6.6752
		2.00 mg/l	-5.18000 [*]	1.87495	.017	-9.2652	-1.0948
		2.50 mg/l	7.03667 [*]	1.87495	.003	2.9515	11.1218
	2.50 mg/l	1.25 mg/l	15.92333 [*]	1.87495	.000	11.8382	20.0085

1.50 mg/l	7.77333*	1.87495	.001	3.6882	11.8585
1.75 mg/l	-4.44667*	1.87495	.035	-8.5318	-.3615
2.00 mg/l	-12.21667*	1.87495	.000	-16.3018	-8.1315
2.25 mg/l	-7.03667*	1.87495	.003	-11.1218	-2.9515

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

TLTS

BA	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Duncan ^a 1.25 mg/l	3	59.2600				
1.50 mg/l	3		67.4100			
2.50 mg/l	3			75.1833		
1.75 mg/l	3				79.6300	
2.25 mg/l	3				82.2200	
2.00 mg/l	3					87.4000
Sig.		1.000	1.000	1.000	.192	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Số chồi hình thành trên mẫu lá mầm tái sinh

ONEWAY SC BY BA
/STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY
/MISSING ANALYSIS

/POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).

Oneway

Notes

Output Created	02-Aug-2015 16:02:01	
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	18

Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax		ONEWAY SC BY BA /STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).
Resources	Processor Time	00:00:00.172
	Elapsed Time	00:00:00.125

[DataSet0]

Descriptives										
SC										
						95% Confidence Interval for Mean				
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum	Between- Component Variance
1.25 mg/l		3	1.4933	.18610	.10745	1.0310	1.9556	1.32	1.69	
1.50 mg/l		3	2.0967	.11676	.06741	1.8066	2.3867	1.97	2.20	
1.75 mg/l		3	2.7300	.11136	.06429	2.4534	3.0066	2.61	2.83	
2.00 mg/l		3	3.5500	.11136	.06429	3.2734	3.8266	3.45	3.67	
2.25 mg/l		3	3.0967	.15535	.08969	2.7108	3.4826	2.97	3.27	
2.50 mg/l		3	2.8467	.05859	.03383	2.7011	2.9922	2.78	2.89	
Total		18	2.6356	.69846	.16463	2.2882	2.9829	1.32	3.67	
Model	Fixed Effects			.12951	.03053	2.5690	2.7021			
	Random Effects				.29986	1.8648	3.4064			.53389

Test of Homogeneity of Variances

SC

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.762	5	12	.594

ANOVA

SC					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.092	5	1.618	96.495	.000
Within Groups	.201	12	.017		
Total	8.293	17			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: SC

			Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
	(I) BA	(J) BA				Lower Bound	Upper Bound
LSD	1.25 mg/l	1.50 mg/l	-.60333 [*]	.10574	.000	-.8337	-.3729
		1.75 mg/l	-1.23667 [*]	.10574	.000	-1.4671	-1.0063
		2.00 mg/l	-2.05667 [*]	.10574	.000	-2.2871	-1.8263
		2.25 mg/l	-1.60333 [*]	.10574	.000	-1.8337	-1.3729
		2.50 mg/l	-1.35333 [*]	.10574	.000	-1.5837	-1.1229
	1.50 mg/l	1.25 mg/l	.60333 [*]	.10574	.000	.3729	.8337
		1.75 mg/l	-.63333 [*]	.10574	.000	-.8637	-.4029
		2.00 mg/l	-1.45333 [*]	.10574	.000	-1.6837	-1.2229
		2.25 mg/l	-1.00000 [*]	.10574	.000	-1.2304	-.7696
		2.50 mg/l	-.75000 [*]	.10574	.000	-.9804	-.5196
	1.75 mg/l	1.25 mg/l	1.23667 [*]	.10574	.000	1.0063	1.4671
		1.50 mg/l	.63333 [*]	.10574	.000	.4029	.8637
		2.00 mg/l	-.82000 [*]	.10574	.000	-1.0504	-.5896
		2.25 mg/l	-.36667 [*]	.10574	.005	-.5971	-.1363
		2.50 mg/l	-.11667	.10574	.292	-.3471	.1137
	2.00 mg/l	1.25 mg/l	2.05667 [*]	.10574	.000	1.8263	2.2871
		1.50 mg/l	1.45333 [*]	.10574	.000	1.2229	1.6837

	1.75 mg/l	.82000*	.10574	.000	.5896	1.0504
	2.25 mg/l	.45333*	.10574	.001	.2229	.6837
	2.50 mg/l	.70333*	.10574	.000	.4729	.9337
2.25 mg/l	1.25 mg/l	1.60333*	.10574	.000	1.3729	1.8337
	1.50 mg/l	1.00000*	.10574	.000	.7696	1.2304
	1.75 mg/l	.36667*	.10574	.005	.1363	.5971
	2.00 mg/l	-.45333*	.10574	.001	-.6837	-.2229
	2.50 mg/l	.25000*	.10574	.036	.0196	.4804
2.50 mg/l	1.25 mg/l	1.35333*	.10574	.000	1.1229	1.5837
	1.50 mg/l	.75000*	.10574	.000	.5196	.9804
	1.75 mg/l	.11667	.10574	.292	-.1137	.3471
	2.00 mg/l	-.70333*	.10574	.000	-.9337	-.4729
	2.25 mg/l	-.25000*	.10574	.036	-.4804	-.0196

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

SC

BA	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Duncan ^a 1.25 mg/l	3	1.4933				
1.50 mg/l	3		2.0967			
1.75 mg/l	3			2.7300		
2.50 mg/l	3			2.8467		
2.25 mg/l	3				3.0967	
2.00 mg/l	3					3.5500
Sig.		1.000	1.000	.292	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PHỤ LỤC 7

Tỷ lệ lá mầm tái sinh trên môi trường kanamycin

ONEWAY Lamam BY Kanamycin
/STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY
/MISSING ANALYSIS

/POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).

Oneway

Notes

Output Created		21-Feb-2016 23:49:06
Comments		
Input	Data	C:\Users\Dell5470\Desktop\Ban be\Chinam\chuyendoilamam.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	27
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax		ONEWAY Lamam BY Kanamycin /STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).
Resources	Processor Time	00:00:00.109
	Elapsed Time	00:00:00.074

Descriptives

Lamam											
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance	
						Lower Bound	Upper Bound				
0 mg/l		3	99.1700	.00000	.00000	99.1700	99.1700	99.17	99.17		
30 mg/l		3	41.5831	2.67713	1.54564	34.9328	48.2335	38.58	43.72		
40 mg/l		3	27.5867	1.63175	.94209	23.5333	31.6402	25.75	28.88		

50 mg/l	3	.8300	.00000	.00000	.8300	.8300	.83	.83
60 mg/l	3	.8300	.00000	.00000	.8300	.8300	.83	.83
70 mg/l	3	.8300	.00000	.00000	.8300	.8300	.83	.83
Total	18	28.4716	36.30675	8.55758	10.4167	46.5266	.83	99.17
Model	Fixed							
	Effect		1.27995	.30169	27.8143	29.1290		
	s							
	Rand							
	om							
	Effect			15.77248	-12.0728	69.0161		1492.08056
	s							

Test of Homogeneity of Variances

Lamam

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.578	5	12	.001

ANOVA

Lamam

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22389.400	5	4477.880	2.733E3	.000
Within Groups	19.659	12	1.638		
Total	22409.059	17			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Lamam

(I)	(J)	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
Kanamycin	Kanamycin	Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound
LSD 0 mg/l	30 mg/l	57.58686*	1.04507	.000	55.3098	59.8639
	40 mg/l	71.58325*	1.04507	.000	69.3062	73.8603
	50 mg/l	98.34000*	1.04507	.000	96.0630	100.6170
	60 mg/l	98.34000*	1.04507	.000	96.0630	100.6170
	70 mg/l	98.34000*	1.04507	.000	96.0630	100.6170

30 mg/l	0 mg/l	-57.58686*	1.04507	.000	-59.8639	-55.3098
	40 mg/l	13.99639*	1.04507	.000	11.7194	16.2734
	50 mg/l	40.75314*	1.04507	.000	38.4761	43.0302
	60 mg/l	40.75314*	1.04507	.000	38.4761	43.0302
	70 mg/l	40.75314*	1.04507	.000	38.4761	43.0302
40 mg/l	0 mg/l	-71.58325*	1.04507	.000	-73.8603	-69.3062
	30 mg/l	-13.99639*	1.04507	.000	-16.2734	-11.7194
	50 mg/l	26.75675*	1.04507	.000	24.4797	29.0338
	60 mg/l	26.75675*	1.04507	.000	24.4797	29.0338
	70 mg/l	26.75675*	1.04507	.000	24.4797	29.0338
50 mg/l	0 mg/l	-98.34000*	1.04507	.000	-100.6170	-96.0630
	30 mg/l	-40.75314*	1.04507	.000	-43.0302	-38.4761
	40 mg/l	-26.75675*	1.04507	.000	-29.0338	-24.4797
	60 mg/l	.00000	1.04507	1.000	-2.2770	2.2770
	70 mg/l	.00000	1.04507	1.000	-2.2770	2.2770
60 mg/l	0 mg/l	-98.34000*	1.04507	.000	-100.6170	-96.0630
	30 mg/l	-40.75314*	1.04507	.000	-43.0302	-38.4761
	40 mg/l	-26.75675*	1.04507	.000	-29.0338	-24.4797
	50 mg/l	.00000	1.04507	1.000	-2.2770	2.2770
	70 mg/l	.00000	1.04507	1.000	-2.2770	2.2770
70 mg/l	0 mg/l	-98.34000*	1.04507	.000	-100.6170	-96.0630
	30 mg/l	-40.75314*	1.04507	.000	-43.0302	-38.4761
	40 mg/l	-26.75675*	1.04507	.000	-29.0338	-24.4797
	50 mg/l	.00000	1.04507	1.000	-2.2770	2.2770
	60 mg/l	.00000	1.04507	1.000	-2.2770	2.2770

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

Lamam

Kanamycin	N	Subset for alpha = 0.05
-----------	---	-------------------------

			1	2	3	4
Duncan ^a	50 mg/l	3	.8300			
	60 mg/l	3	.8300			
	70 mg/l	3	.8300			
	40 mg/l	3		27.5867		
	30 mg/l	3			41.5831	
	0 mg/l	3				99.1700
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Tỉ lệ cây con sống trên môi trường có bổ sung kanamycin

ONEWAY Caycon BY Kanamycin
 /STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY
 /MISSING ANALYSIS

/POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).

Oneway

Notes

Output Created		19-Feb-2016 04:00:29
Comments		
Input	Data	C:\Users\Dell5470\Desktop\Ban be\chuyendoicaycon.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	27
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.

Syntax	ONEWAY Caycon BY Kanamycin /STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).		
Resources	Processor Time	00:00:00.093	
	Elapsed Time	00:00:00.079	

Descriptives

Caycon										
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
0 mg/l		3	99.1700	.00000	.00000	99.1700	99.1700	99.17	99.17	
30 mg/l		3	43.2966	.97308	.56181	40.8793	45.7139	42.45	44.36	
40 mg/l		3	28.4325	1.67543	.96731	24.2705	32.5945	27.35	30.36	
50 mg/l		3	.8300	.00000	.00000	.8300	.8300	.83	.83	
60 mg/l		3	.8300	.00000	.00000	.8300	.8300	.83	.83	
70 mg/l		3	.8300	.00000	.00000	.8300	.8300	.83	.83	
80 mg/l		3	.8300	.00000	.00000	.8300	.8300	.83	.83	
90 mg/l		3	.8300	.00000	.00000	.8300	.8300	.83	.83	
100 mg/l		3	.8300	.00000	.00000	.8300	.8300	.83	.83	
Total		27	19.5421	32.38104	6.23173	6.7326	32.3516	.83	99.17	
Model	Fixed Effects			.64584	.12429	19.2810	19.8032			
	Random Effects				11.23287	-6.3609	45.4452			1135.45763

Test of Homogeneity of Variances

Caycon

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
------------------	-----	-----	------

Test of Homogeneity of Variances

Caycon

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
11.140	8	18	.000

ANOVA

Caycon

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27254.320	8	3406.790	8.168E3	.000
Within Groups	7.508	18	.417		
Total	27261.828	26			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Caycon

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LSD 0 mg/l	Kanamycin 30 mg/l	55.87341*	.52732	.000	54.7655	56.9813
	40 mg/l	70.73753*	.52732	.000	69.6297	71.8454
	50 mg/l	98.34000*	.52732	.000	97.2321	99.4479
	60 mg/l	98.34000*	.52732	.000	97.2321	99.4479
	70 mg/l	98.34000*	.52732	.000	97.2321	99.4479
	80 mg/l	98.34000*	.52732	.000	97.2321	99.4479
	90 mg/l	98.34000*	.52732	.000	97.2321	99.4479
	100 mg/l	98.34000*	.52732	.000	97.2321	99.4479
30 mg/l	0 mg/l	-55.87341*	.52732	.000	-56.9813	-54.7655
	40 mg/l	14.86412*	.52732	.000	13.7563	15.9720
	50 mg/l	42.46659*	.52732	.000	41.3587	43.5745
	60 mg/l	42.46659*	.52732	.000	41.3587	43.5745
	70 mg/l	42.46659*	.52732	.000	41.3587	43.5745
	80 mg/l	42.46659*	.52732	.000	41.3587	43.5745

	90 mg/l	42.46659*	.52732	.000	41.3587	43.5745
	100 mg/l	42.46659*	.52732	.000	41.3587	43.5745
40 mg/l	0 mg/l	-70.73753*	.52732	.000	-71.8454	-69.6297
	30 mg/l	-14.86412*	.52732	.000	-15.9720	-13.7563
	50 mg/l	27.60247*	.52732	.000	26.4946	28.7103
	60 mg/l	27.60247*	.52732	.000	26.4946	28.7103
	70 mg/l	27.60247*	.52732	.000	26.4946	28.7103
	80 mg/l	27.60247*	.52732	.000	26.4946	28.7103
	90 mg/l	27.60247*	.52732	.000	26.4946	28.7103
	100 mg/l	27.60247*	.52732	.000	26.4946	28.7103
50 mg/l	0 mg/l	-98.34000*	.52732	.000	-99.4479	-97.2321
	30 mg/l	-42.46659*	.52732	.000	-43.5745	-41.3587
	40 mg/l	-27.60247*	.52732	.000	-28.7103	-26.4946
	60 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	70 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	80 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	90 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	100 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
60 mg/l	0 mg/l	-98.34000*	.52732	.000	-99.4479	-97.2321
	30 mg/l	-42.46659*	.52732	.000	-43.5745	-41.3587
	40 mg/l	-27.60247*	.52732	.000	-28.7103	-26.4946
	50 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	70 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	80 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	90 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	100 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
70 mg/l	0 mg/l	-98.34000*	.52732	.000	-99.4479	-97.2321
	30 mg/l	-42.46659*	.52732	.000	-43.5745	-41.3587
	40 mg/l	-27.60247*	.52732	.000	-28.7103	-26.4946
	50 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	60 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079

	80 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	90 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	100 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
80 mg/l	0 mg/l	-98.34000*	.52732	.000	-99.4479	-97.2321
	30 mg/l	-42.46659*	.52732	.000	-43.5745	-41.3587
	40 mg/l	-27.60247*	.52732	.000	-28.7103	-26.4946
	50 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	60 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	70 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	90 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	100 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
90 mg/l	0 mg/l	-98.34000*	.52732	.000	-99.4479	-97.2321
	30 mg/l	-42.46659*	.52732	.000	-43.5745	-41.3587
	40 mg/l	-27.60247*	.52732	.000	-28.7103	-26.4946
	50 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	60 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	70 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	80 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	100 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
100 mg/l	0 mg/l	-98.34000*	.52732	.000	-99.4479	-97.2321
	30 mg/l	-42.46659*	.52732	.000	-43.5745	-41.3587
	40 mg/l	-27.60247*	.52732	.000	-28.7103	-26.4946
	50 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	60 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	70 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	80 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079
	90 mg/l	.00000	.52732	1.000	-1.1079	1.1079

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

Caycon					
Kanamycin	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan ^a 50 mg/l	3	.8300			
60 mg/l	3	.8300			
70 mg/l	3	.8300			
80 mg/l	3	.8300			
90 mg/l	3	.8300			
100 mg/l	3	.8300			
40 mg/l	3		28.4325		
30 mg/l	3			43.2966	
0 mg/l	3				99.1700
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

PHỤ LỤC 8

Quy trình chuyển gen *HBsAg* vào lá mầm cà chua TN 412 bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

1. Chuẩn bị mẫu lá mầm

Hạt cà chua được khử trùng với cồn 70% (v/v) khoảng 1 - 2 phút, rồi rửa lại bằng nước cất vô trùng 1 - 2 lần. Sau đó, hạt cà chua này tiếp tục được khử trùng bằng dung dịch Sodium hypochlorite (với nồng độ 4% - v/v) trong thời gian từ 10 - 15 phút và rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3 - 4 lần. Cuối cùng cho hạt vào đĩa petri có giấy thấm, rồi tiến hành cấy hạt vào bình tam giác chứa môi trường khoáng cơ bản $\frac{1}{2}$ MS để hạt nảy mầm, mỗi bình 20 hạt, điều kiện ánh sáng 2.500 - 3.000 lux, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, nhiệt độ 24 - 26°C, độ ẩm 60 - 65%.

Lá mầm cà chua *in vitro* 7 ngày tuổi được cắt bỏ phần cuống lá (sao cho không dính mô phân sinh chồi ở cuống) và phần đầu lá, đoạn sử dụng có kích thước 5 mm x 7 mm. Sau đó, mặt dưới (back-up) của mẫu lá mầm được đặt tiếp xúc với môi trường tái sinh tốt nhất (môi trường khoáng cơ bản MS, vitamin B5 kết hợp với IAA 0,5 mg/L và BA 2,0 mg/L) trong thời gian 2 ngày (48 giờ), điều kiện ánh sáng 2.500 - 3.000 lux, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, nhiệt độ 24 - 26°C, độ ẩm 60 - 65%.

2. Chuẩn bị dịch vi khuẩn

Vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 chứa plasmid mới mang gen tạo HBsAg được cấy chuyển và nuôi trong đĩa petri chứa môi trường LB - Km đặc ở 28°C trong 2 ngày. Dùng que cấy chuyển 1 khuẩn lạc *Agrobacterium tumefaciens* từ đĩa petri nói trên sang bình tam giác chứa môi trường AB lỏng. Lắc 250 vòng/phút qua đêm (khoảng 16 giờ) ở 28°C. Pha loãng 25 mL dịch vi khuẩn với 10 - 15 mL môi trường AB lỏng (LB lỏng) mới. Lắc thêm khoảng 3 - 4 giờ ở 28°C để có được dịch vi khuẩn lây nhiễm với mẫu lá mầm. Mật độ *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 được sử dụng biến nạp gen là: OD₆₀₀ = 0,5.

3. Nuôi chung mẫu lá mầm với *Agrobacterium tumefaciens*

Cho mẫu lá mầm đã qua thời gian tiền nuôi cấy vào đĩa petri, sau đó cho dịch vi khuẩn vào ngập lá mầm. Để thời gian khoảng 20 phút, điều kiện ánh sáng 2.500 - 3.000 lux. Sau đó, gấp các mẫu lá mầm đặt vào đĩa petri có giấy thấm, thấm ráo dịch vi khuẩn và cấy các mẫu vào môi trường tái sinh có bổ sung acetosyringone nồng độ (100 µM). Tiến hành nuôi chung (co-cultivation) mẫu lá mầm với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* trong thời gian 2 ngày, điều kiện ánh sáng 2.500 - 3.000 lux, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, nhiệt độ 25°C, độ ẩm 60 - 65%.

4. Chọn lọc, tái sinh cây chuyển gen

Sau thời gian nuôi chung, mẫu được rửa và cấy lên môi trường ‘tiền chọn lọc’ (pre-selection) (môi trường MS + vitamin B5 + IAA 0,5 mg/L + BA 2,0 mg/L, không có chất kháng sinh kanamycin) trong thời gian 4 ngày. Sau đó, mẫu lá mầm được chuyển sang môi trường chọn lọc có nồng độ kanamycin 50 mg/L ở ngưỡng

gây chết, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, nhiệt độ 24 - 26°C, độ ẩm 60 - 65% và được cấy chuyển (sang môi trường chọn lọc có kháng sinh) theo chu kỳ 2 – 3 tuần/1 lần. Mô sẹo được hình thành tại vị trí vết cắt tiếp xúc với môi trường và hình thành chồi nhỏ (có thân mọc lên cao 1-2 cm). Sau 3 tháng chọn lọc, những mẫu mô sẹo/chồi nhỏ sống sót được cấy chuyển sang môi trường tái sinh tạo cây con. Cây cà chua *in vitro* đặt trong tủ nuôi (phytotron) Versatile Environmental Test Chamber (Model: MLR-351H, Sanyo – Nhật Bản) trong thời gian hai tuần, sau đó chuyển cây ra trồng ở vườn ươm trong điều kiện tự nhiên, tưới nước đủ ẩm hằng ngày khoảng 2 lần.

5. Kiểm tra thể chuyển gen T_0 (giai đoạn *in vitro* và *ex vitro*)

Sự hiện diện của các gen biến nạp (bằng PCR, giải trình tự gen và Southern blot) và kiểm tra mức độ biểu hiện của chúng bằng các phương pháp hóa mô tế bào (GUS assay), sinh học định tính, hóa sinh (ELISA) và Western blot.

6. Kiểm tra thể chuyển gen T_1

Sự di truyền của gen chọn lọc *nptII* và gen chuyển mục tiêu *HBsAg* bằng phương pháp sinh học định tính và PCR.

PHỤ LỤC 9

Chiều cao cây

ONEWAY Chieucao BY Dong
/STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY
/MISSING ANALYSIS

/POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).

Oneway

Notes

Output Created	19-Feb-2016 03:31:47	
Comments		
Input	Data	C:\Users\Dell5470\Desktop\Ban be\Chinam\thongkemoi_chinam\thongkemoi _chinam.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>

Missing Value Handling	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	27
	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax	ONEWAY Chieucao BY Dong /STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).	
Resources	Processor Time	00:00:00.032
	Elapsed Time	00:00:00.014

Descriptives

Chieucao										
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
DC		3	1.3033E2	4.50925	2.60342	119.1317	141.5349	126.00	135.00	
CC1		3	1.3767E2	2.08167	1.20185	132.4955	142.8378	136.00	140.00	
CC2		3	1.3300E2	6.24500	3.60555	117.4866	148.5134	126.00	138.00	
CC3		3	1.3033E2	7.57188	4.37163	111.5237	149.1429	125.00	139.00	
Total		12	1.3283E2	5.63807	1.62757	129.2511	136.4156	125.00	140.00	
Model	Fixed Effects			5.50000	1.58771	129.1721	136.4946			
	Random Effects				1.72938	127.3297	138.3370			1.87963

Test of Homogeneity of Variances

Chieucao

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.023	3	8	.189

ANOVA

Chieucao					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	107.667	3	35.889	1.186	.374
Within Groups	242.000	8	30.250		
Total	349.667	11			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable:Chieucao

	(I)		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
	Dong	(J) Dong				Lower Bound	Upper Bound
LSD	DC	CC1	-7.33333	4.49073	.141	-17.6890	3.0223
		CC2	-2.66667	4.49073	.569	-13.0223	7.6890
		CC3	.00000	4.49073	1.000	-10.3556	10.3556
	CC1	DC	7.33333	4.49073	.141	-3.0223	17.6890
		CC2	4.66667	4.49073	.329	-5.6890	15.0223
		CC3	7.33333	4.49073	.141	-3.0223	17.6890
	CC2	DC	2.66667	4.49073	.569	-7.6890	13.0223
		CC1	-4.66667	4.49073	.329	-15.0223	5.6890
		CC3	2.66667	4.49073	.569	-7.6890	13.0223
	CC3	DC	.00000	4.49073	1.000	-10.3556	10.3556
		CC1	-7.33333	4.49073	.141	-17.6890	3.0223
		CC2	-2.66667	4.49073	.569	-13.0223	7.6890

Homogeneous Subsets

Chieucao

		N	Subset for alpha = 0.05
Dong			1
Duncan ^a	DC	3	130.3333
	CC3	3	130.3333

CC2	3	133.0000
CC1	3	137.6667
Sig.		.163

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Số hoa của cây

ONEWAY Sohoa BY Dong

/STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY

/MISSING ANALYSIS

/POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).

Oneway

Notes

Output Created		19-Feb-2016 03:19:18
Comments		
Input	Data	C:\Users\De115470\Desktop\Ban be\Chinam\thongkemoi_chinam\thongkemoi _chinam.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	27
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax		ONEWAY Sohoa BY Dong /STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).
Resources	Processor Time	00:00:00.015
	Elapsed Time	00:00:00.014

Descriptives										
Sohoa										
						95% Confidence Interval for Mean				
						Lower Bound	Upper Bound			
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error			Minimum	Maximum	Between-Component Variance
DC		3	49.3333	8.14453	4.70225	29.1012	69.5655	40.00	55.00	
CC1		3	56.3333	7.23418	4.17665	38.3626	74.3040	48.00	61.00	
CC2		3	53.3333	9.45163	5.45690	29.8542	76.8125	46.00	64.00	
CC3		3	48.3333	13.05118	7.53510	15.9124	80.7543	38.00	63.00	
Total		12	51.8333	8.94258	2.58150	46.1515	57.5152	38.00	64.00	
Model	Fixed Effects			9.72540	2.80748	45.3593	58.3074			
	Random Effects				2.80748 ^a	42.8987 ^a	60.7680 ^a			-17.86111

a. Warning: Between-component variance is negative. It was replaced by 0.0 in computing this random effects measure.

Test of Homogeneity of Variances

Sohoa

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.754	3	8	.550

ANOVA

Sohoa

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	123.000	3	41.000	.433	.735
Within Groups	756.667	8	94.583		
Total	879.667	11			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable:Sohoa

(I)	(J)	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
-----	-----	------	------------	------	-------------------------

	Dong	Dong	Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound
LSD	DC	CC1	-7.00000	7.94075	.404	-25.3114	11.3114
		CC2	-4.00000	7.94075	.628	-22.3114	14.3114
		CC3	1.00000	7.94075	.903	-17.3114	19.3114
	CC1	DC	7.00000	7.94075	.404	-11.3114	25.3114
		CC2	3.00000	7.94075	.715	-15.3114	21.3114
		CC3	8.00000	7.94075	.343	-10.3114	26.3114
	CC2	DC	4.00000	7.94075	.628	-14.3114	22.3114
		CC1	-3.00000	7.94075	.715	-21.3114	15.3114
		CC3	5.00000	7.94075	.546	-13.3114	23.3114
	CC3	DC	-1.00000	7.94075	.903	-19.3114	17.3114
		CC1	-8.00000	7.94075	.343	-26.3114	10.3114
		CC2	-5.00000	7.94075	.546	-23.3114	13.3114

Homogeneous Subsets

Sohoa

		N	Subset for alpha = 0.05
Dong			1
Duncan ^a	CC3	3	48.3333
	DC	3	49.3333
	CC2	3	53.3333
	CC1	3	56.3333
	Sig.		.370

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Tổng số nhánh lá

ONEWAY Sonhanhla BY Dong
/STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY
/MISSING ANALYSIS

/POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).

Oneway

Notes

Output Created		19-Feb-2016 03:32:32
Comments		
Input	Data	C:\Users\Dell5470\Desktop\Ban be\Chinam\thongkemoi_chinam\thongkemoi _chinam.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	27
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax	ONEWAY Sonhanhla BY Dong /STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).	
Resources	Processor Time	00:00:00.032
	Elapsed Time	00:00:00.014

Descriptives

Sonhanhla											
						95% Confidence Interval for Mean				Between-Component Variance	
						Lower Bound	Upper Bound				
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error			Minimum	Maximum		
DC		3	12.3333	.57735	.33333	10.8991	13.7676	12.00	13.00		
CC1		3	13.3333	.57735	.33333	11.8991	14.7676	13.00	14.00		
CC2		3	12.0000	2.00000	1.15470	7.0317	16.9683	10.00	14.00		
CC3		3	12.6667	2.08167	1.20185	7.4955	17.8378	11.00	15.00		

Total		12	12.5833	1.37895	.39807	11.7072	13.4595	10.00	15.00	
Model	Fixed			1.50000	.43301	11.5848	13.5819			
	Effects									
	Random				.43301 ^a	11.2053 ^a	13.9614 ^a			
	Effects									-.42593

a. Warning: Between-component variance is negative. It was replaced by 0.0 in computing this random effects measure.

Test of Homogeneity of Variances

Sonhanhla

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.942	3	8	.202

ANOVA

Sonhanhla					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.917	3	.972	.432	.736
Within Groups	18.000	8	2.250		
Total	20.917	11			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Sonhanhla

	(I)	Dong (J) Dong	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	DC	CC1	-1.00000	1.22474	.438	-3.8243	1.8243
		CC2	.33333	1.22474	.792	-2.4909	3.1576
		CC3	-.33333	1.22474	.792	-3.1576	2.4909
	CC1	DC	1.00000	1.22474	.438	-1.8243	3.8243
		CC2	1.33333	1.22474	.308	-1.4909	4.1576
		CC3	.66667	1.22474	.601	-2.1576	3.4909
	CC2	DC	-.33333	1.22474	.792	-3.1576	2.4909
		CC1	-1.33333	1.22474	.308	-4.1576	1.4909

	CC3	-.66667	1.22474	.601	-3.4909	2.1576
CC3	DC	.33333	1.22474	.792	-2.4909	3.1576
	CC1	-.66667	1.22474	.601	-3.4909	2.1576
	CC2	.66667	1.22474	.601	-2.1576	3.4909

Homogeneous Subsets

Sonhanhla			
		N	Subset for alpha =
			0.05
Dong			1
Duncan ^a	CC2	3	12.0000
	DC	3	12.3333
	CC3	3	12.6667
	CC1	3	13.3333
	Sig.		.335

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Số quả của cây

ONEWAY Soqua BY Dong
/STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY
/MISSING ANALYSIS

/POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).

Oneway

Notes

Output Created	19-Feb-2016 03:31:04
Comments	
Input	Data
	C:\Users\Dell5470\Desktop\Ban be\Chinam\thongkemoi_chinam\thongkemoi _chinam.sav

	Active Dataset	DataSet1	
	Filter	<none>	
	Weight	<none>	
	Split File	<none>	
	N of Rows in Working Data File		27
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.	
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.	
Syntax		ONEWAY Soqua BY Dong /STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).	
Resources	Processor Time		00:00:00.031
	Elapsed Time		00:00:00.011

Descriptives

Soqua										
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
DC		3	2.3333	.57735	.33333	.8991	3.7676	2.00	3.00	
CC1		3	2.6667	.57735	.33333	1.2324	4.1009	2.00	3.00	
CC2		3	2.3333	.57735	.33333	.8991	3.7676	2.00	3.00	
CC3		3	2.6667	.57735	.33333	1.2324	4.1009	2.00	3.00	
Total		12	2.5000	.52223	.15076	2.1682	2.8318	2.00	3.00	
Model	Fixed Effects			.57735	.16667	2.1157	2.8843			
	Random Effects				.16667 ^a	1.9696 ^a	3.0304 ^a			-.07407

a. Warning: Between-component variance is negative. It was replaced by 0.0 in computing this random effects measure.

Test of Homogeneity of Variances

Soqua

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.000	3	8	1.000

ANOVA

Soqua					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.333	3	.111	.333	.802
Within Groups	2.667	8	.333		
Total	3.000	11			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Soqua

			Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	(I) Dong	(J) Dong	Difference (I-J)				
		CC1	-.33333	.47140	.500	-1.4204	.7537
		CC2	.00000	.47140	1.000	-1.0871	1.0871
		CC3	-.33333	.47140	.500	-1.4204	.7537
	CC1	DC	.33333	.47140	.500	-.7537	1.4204
		CC2	.33333	.47140	.500	-.7537	1.4204
		CC3	.00000	.47140	1.000	-1.0871	1.0871
	CC2	DC	.00000	.47140	1.000	-1.0871	1.0871
		CC1	-.33333	.47140	.500	-1.4204	.7537
		CC3	-.33333	.47140	.500	-1.4204	.7537
	CC3	DC	.33333	.47140	.500	-.7537	1.4204
		CC1	.00000	.47140	1.000	-1.0871	1.0871
		CC2	.33333	.47140	.500	-.7537	1.4204

Homogeneous Subsets

Soqua

		Subset for alpha =
		0.05
Dong	N	1

Duncan ^a	DC	3	2.3333
	CC2	3	2.3333
	CC1	3	2.6667
	CC3	3	2.6667
	Sig.		.523

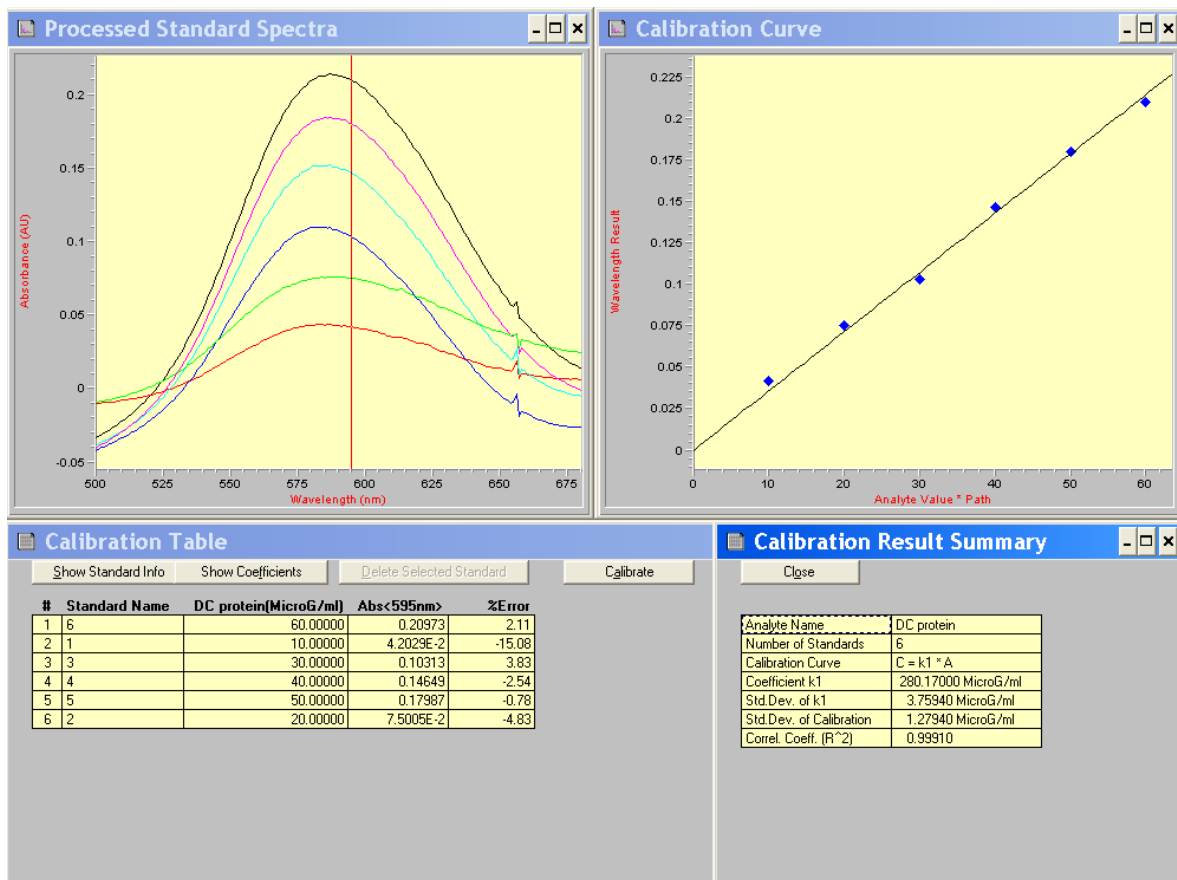
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Kết quả giải trình tự mẫu PC (từ plasmid) và mẫu 1, 2, 3 (từ các dòng cà chua chuyển gen C1, C2, C3)

PHỤ LỤC 10

Đồ thị đường chuẩn tương quan giữa các nồng độ protein BSA và giá trị OD đo ở bước sóng 595 nm



Lượng protein tổng của các dòng chuyển gen HBsAg

ONEWAY protein BY dòng
 /STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY
 /MISSING ANALYSIS

/POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).

Oneway

Notes

Output Created	21-Aug-2015 14:40:52	
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	12
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.

Syntax	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
		ONEWAY protein BY dong
		/STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY
		/MISSING ANALYSIS
Resources		/POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).
	Processor Time	00:00:00.000
	Elapsed Time	00:00:00.000

Descriptives

protein										
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
0		3	1.7306E2	4.77908	2.75920	161.1881	184.9319	169.92	178.56	
1		3	1.6914E2	7.92776	4.57709	149.4457	188.8330	161.66	177.45	
2		3	1.6080E2	16.61154	9.59067	119.5347	202.0653	146.65	179.09	
3		3	1.5574E2	8.62374	4.97892	134.3208	177.1659	147.27	164.51	
Total		12	1.6469E2	11.39014	3.28805	157.4487	171.9226	146.65	179.09	
Model	Fixed Effects			10.44032	3.01386	157.7357	171.6356			
	Random Effects				3.92671	152.1891	177.1822			25.3427

Test of Homogeneity of Variances

protein			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.734	3	8	.237

ANOVA

protein					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	555.085	3	185.028	1.698	.244
Within Groups	872.002	8	109.000		
Total	1427.087	11			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable:protein

			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
	(I) dong	(J) dong				Lower Bound	Upper Bound
LSD	0	1	3.92067	8.52448	.658	-15.7368	23.5782
		2	12.26000	8.52448	.188	-7.3975	31.9175
		3	17.31667	8.52448	.077	-2.3408	36.9742
	1	0	-3.92067	8.52448	.658	-23.5782	15.7368
		2	8.33933	8.52448	.357	-11.3182	27.9968
		3	13.39600	8.52448	.155	-6.2615	33.0535
	2	0	-12.26000	8.52448	.188	-31.9175	7.3975
		1	-8.33933	8.52448	.357	-27.9968	11.3182
		3	5.05667	8.52448	.569	-14.6008	24.7142
	3	0	-17.31667	8.52448	.077	-36.9742	2.3408
		1	-13.39600	8.52448	.155	-33.0535	6.2615
		2	-5.05667	8.52448	.569	-24.7142	14.6008

Homogeneous Subsets

protein		
dong	N	Subset for alpha = 0.05
		1
Duncan ^a	3	155.7433
	2	160.8000

1	3	169.1393
0	3	173.0600
Sig.		.093

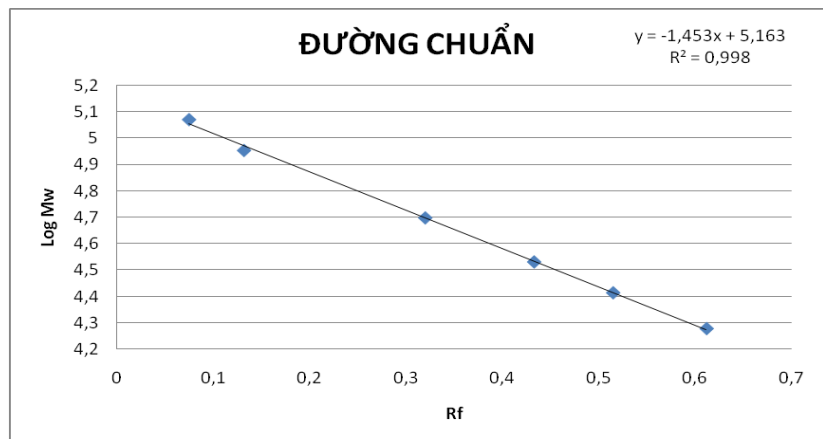
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

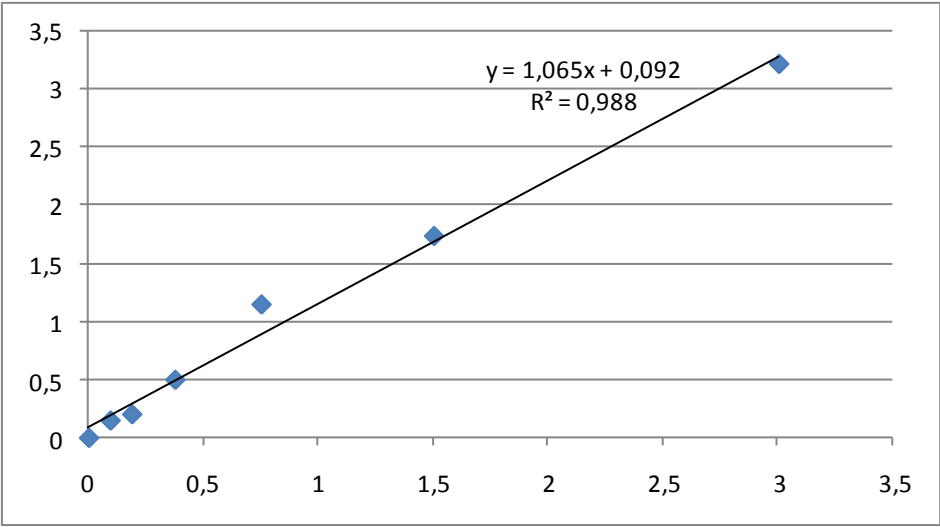
Trọng lượng phân tử của các băng protein trong thang chuẩn

Rf (cm)	Trọng lượng phân tử (Dal)	Log Mw
0,075	118,000	5,071
0,132	90,000	4,954
0,320	50,000	4,698
0,433	34,000	4,531
0,515	26,000	4,414
0,612	19,000	4,278

Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa Log (trọng lượng phân tử) của protein trong thang chuẩn với Rf



Đường chuẩn protein HBsAg (BF 6015 - Aalto Bio)



Lượng kháng nguyên HBsAg trong những mẫu khảo sát

```
ONEWAY HBsAg BY Dong
/STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY
/MISSING ANALYSIS

/POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).
```

Oneway

Notes		
Output Created		16-Aug-2015 11:09:30
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	10
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.

Syntax	ONEWAY HBsAg BY Dong /STATISTICS DESCRIPTIVES EFFECTS HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=DUNCAN LSD ALPHA(0.05).			
Resources	Processor Time	00:00:00.015		
	Elapsed Time	00:00:00.016		

Descriptives

HBsAg										
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between- Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
1		3	2.0297E2	9.51600	5.49407	179.3321	226.6102	194.00	212.95	
2		3	1.8699E2	10.54422	6.08771	160.7961	213.1827	175.98	197.00	
3		3	1.7132E2	9.48032	5.47347	147.7700	194.8709	162.00	180.95	
Total		9	1.8709E2	16.14746	5.38249	174.6816	199.5057	162.00	212.95	
Model	Fixed			9.85920	3.28640	179.0522	195.1352			
	Effects									
	Random				9.13692	147.7807	226.4067			218.04885
	Effects									

Test of Homogeneity of Variances

HBsAg			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.025	2	6	.976

ANOVA

HBsAg						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups		1502.701	2	751.350	7.730	.022
Within Groups		583.223	6	97.204		
Total		2085.923	8			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: HBsAg

	(I) Dong	(J) Dong	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1	2	15.98174	8.05000	.094	-3.7159	35.6794
		3	31.65072*	8.05000	.008	11.9531	51.3484
	2	1	-15.98174	8.05000	.094	-35.6794	3.7159
		3	15.66898	8.05000	.100	-4.0287	35.3666
	3	1	-31.65072*	8.05000	.008	-51.3484	-11.9531
		2	-15.66898	8.05000	.100	-35.3666	4.0287

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

HBsAg			
Dong	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Duncan ^a	3	171.3204	
	2	186.9894	186.9894
	1		202.9712
	Sig.	.100	.094

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Đồ thị tỷ lệ hàm lượng protein HBsAg/ protein tổng số

