

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. 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 cũng còn 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 và sản phẩm không chứa các virus gây bệnh cho người.

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 chích 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 ăn quả quan trọng, được tiêu thụ nhiều, có khả năng và phát triển rộng khắp thế giới, hơn 60 triệu tấn cà chua được sản xuất mỗi năm. Quả cà chua còn 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 oxy 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 có 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, có khả năng biến nạp cao và có những đặc điểm phù hợp để sản xuất các chế phẩm được sinh học, sản xuất “vaccine ăn được” (edible vaccine).

Luận án này hướng tới tạo cây cà chua mang và biểu hiện gen *HBsAg* góp phần phục vụ hướng nghiên cứu trên thế giới như đã nêu 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 T₀ 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.

- Xác định được 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 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 gen *HBsAg* - được điều khiển bởi hai promoter *T7* và promoter *PDS* tạo tác

động tăng hàm lượng protein kháng nguyên HBsAg biểu hiện chuyên biệt 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 thế hệ T₁ bằng phương pháp sinh học định tính và kỹ thuật PCR. Chưa đề cập khảo sát ảnh hưởng của protein HBsAg lên khả năng tạo đáp ứng miễn dịch.

Chương 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Cà chua thuộc họ cà Solanaceae, chi *Lycopersicon* và có tên khoa học là *Lycopersicon esculentum* Mill. Cà chua có những đặc điểm phù hợp để sản xuất các chế phẩm dược sinh học, sản xuất “vaccine ăn được”.

HBV, thuộc chi *Orthohepadnavirus*, họ Hepadnaviridae, có ái lực cao với tế bào gan. Trên DNA của HBV có gen *S* chịu trách nhiệm mã hóa một loại protein cấu thành vỏ virus (protein S) - có khả năng tạo đáp ứng miễn dịch cao và do vậy protein này được quan tâm đặc biệt trong sản xuất vaccine truyền thống và trong nghiên cứu tạo vaccine tái tổ hợp.

Nhiều công trình nghiên cứu ở nước ngoài cho thấy đã 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. Các nghiên cứu trên cũng cho thấy hiệu quả biến nạp gen nói chung và gen

HBsAg nói riêng chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như dòng *A. tumefaciens* sử dụng, tuổi và loại mẫu cấy, môi trường tiền nuôi cấy, môi trường tái sinh, thời gian nhiễm khuẩn, mật độ vi khuẩn, thời gian đồng nuôi cấy, nồng độ hợp chất phenol acetosyringone, giai đoạn tiền chọn lọc và sự biểu hiện của gen tùy thuộc rất lớn vào cấu trúc của gen chuyển đặc biệt là promoter điều khiển.

Chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* được sử dụng chủ yếu trên thế giới hiện nay để tạo cà chua biến đổi gen. Ở luận án, phương pháp này cũng được áp dụng nhưng gen chuyển *HBsAg* được điều khiển bởi hai loại promoter *PDS* và promoter *T7* (điểm mới của luận án).

Chương 2 NỘI DUNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

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 *npIII* 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 TN412 (cà chua bi) (Công ty Trang Nông TP. HCM).

2.2.2 Vi khuẩn: *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 (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).

2.2.3 Plasmid: Sử dụng plasmid pITB-HBsAg ($\approx 16,78$ kb) [do TS. Nguyễn Hữu Tâm (Viện Sinh học Nhiệt đới) thiết kế] mang các gen: *gusA* (promoter T7, terminator T7); *nptII* (promoter *CaMV35S*); *HBsAg* mã hoá protein kháng nguyên bề mặt nhỏ (S) được điều khiển bởi hệ thống [promoter PDS (phytoene desaturase, ≈ 2 kb) + T7 RNA polymerase (2,7 kb)] tạo sự biểu hiện chuyên biệt ở mô quả.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 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*

2.3.1.1 Khảo sát ảnh hưởng của BA, IAA lên sự tái sinh chồi *in vitro* từ lá mầm: Xác định môi trường tái sinh với nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) BA, IAA thích hợp cho tỷ lệ lá mầm tái sinh chồi (%), số chồi tái sinh/mẫu cao nhất đối với giống cà chua TN412.

Thành phần môi trường tái sinh là môi trường MS với vitamin B5, agar 8 g/L, đường saccharose 30 g/L, bổ sung IAA là 0,5 mg/L (nồng độ này không đổi ở các môi trường khảo sát), 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 thực hiện với 30 mẫu cấy. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu một yếu tố hoàn toàn ngẫu nhiên với các nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

2.3.1.2 Ảnh hưởng của kháng sinh kanamycin lên lá mầm, cây con *in vitro*: Xác định nồng độ tối thiểu của kanamycin gây ức chế khả năng tái sinh chồi và gây chết lá mầm, cây con cà chua *in vitro* để áp dụng trong quá

trình chọn lọc những mẫu chuyển gen giả định. Thí nghiệm được bố trí giống như thí nghiệm 2.3.1.1.

2.3.2 Xây dựng quy trình biến nạp gen vào lá mầm cây cà chua TN412 bằng phương pháp dùng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*: Các mẫu lá mầm sử dụng có kích thước 5 mm x 7 mm và được tiên nuôi cấy trên môi trường tái sinh thích hợp (thí nghiệm 2.3.1.1) trong thời gian 2 ngày. Sau đó, cho dịch vi khuẩn (OD_{600} là 0,5) vào ngập lá mầm trong thời gian 20 phút rồi tiến hành nuôi chung mẫu lá mầm với *Agrobacterium tumefaciens* trên môi trường tái sinh có bổ sung acetosyringone nồng độ (100 μ M). Sau 2 ngày nuôi chung, diệt vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, nuôi cấy chọn lọc lá mầm trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh kanamycin 50 mg/L đến khi hình thành mô sẹo, phác thể chồi, chồi chuyển gen hoàn chỉnh.

2.3.3 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

2.3.3.1 Kiểm tra sự biểu hiện định tính của gen kháng kanamycin *nptII*: Chồi lớn (chưa có rễ, cao 1,5 - 3 cm, tái sinh trên môi trường kanamycin có 50 mg/L) và mảnh lá thật (7 x 7 mm, của cây sinh trưởng trên môi trường không chất ĐHST) được nuôi cấy trên các môi trường tương ứng: môi trường MS không chất ĐHST và môi trường tái sinh tốt nhất (BA 2,0 mg/L; IAA 0,5 mg/L) có bổ sung kanamycin 100 mg/L để theo dõi khả năng tăng trưởng (phát triển rễ, thân, lá) và tạo mô sẹo, tái sinh trong 30 ngày; so sánh với đối chứng.

2.3.3.2 Kiểm tra sự hiện diện của các gen *nptII*, *HBsAg* bằng kỹ thuật PCR: Tách chiết DNA tổng số dùng phương pháp CTAB (tham khảo tài liệu của tác giả Fulton và cs. (1995)) và sử dụng cặp mồi chuyên biệt đối với gen *HBsAg* (Srinivas và cs., 2008) và gen *nptII* để khuếch đại đoạn DNA có kích thước tương ứng là 681 bp và 600 bp.

2.3.3.3 Giải trình tự sản phẩm PCR gen *HBsAg* cây cà chua chuyển gen: Sản phẩm PCR gen *HBsAg* 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 (VN DAT Co. Ltd, TP. HCM).

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

2.3.3.5 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 ($\varnothing 3 - 4$ mm) và lát cắt ngang (2 mm) quả chín cây được cho vào ống Eppendorf/đĩa petri, tạo ngập mẫu và để qua đêm trong thuốc thử X-gluc (β -glucuronide).

2.3.3.6 Phân tích Southern blot các dòng cà chua chuyển gen *HBsAg* (theo phương pháp ghi trên bộ kit của công ty GE-healthcare): Mẫu dò là sản phẩm PCR gen *HBsAg* được biến tính hoàn toàn để trở thành sợi đơn và liên kết đôi cộng hóa trị với enzyme có khả năng chịu nhiệt alkaline phosphatase. Sau khi được đánh dấu, mẫu dò được sử dụng để lai với DNA cần khảo sát đã cố định trên màng. Đánh giá kết quả qua ghi nhận băng lai với kích thước mong đợi 5,83 kb.

2.3.3.7 Kiểm tra nhanh sự hiện diện của protein *HBsAg* ở quả cây T_0 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%).

2.3.3.8 Phân tích protein tổng số dùng điện di trên gel polyacrylamide (SDS-PAGE): Tách protein tổng số thực vật dựa theo phương pháp của Zhou và cs. (2008), McCabe và cs. (2008). Tìm hiểu khả năng có thể hiện

diện (ghi nhận bằng mắt thường) của băng protein HBsAg trên bản gel sau điện di và định lượng protein bằng phương pháp Bradford của công ty Bio-Rad.

2.3.3.9 Phân tích Western blot các dòng cà chua chuyển gen *HBsAg*: Theo phương pháp ghi trên bộ kit của công ty GE-healthcare.

2.3.3.10 Kiểm tra hàm lượng protein HBsAg bằng phương pháp ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay): Theo phương pháp “Do it yourself” của Aalto Bio Reagents (2015) và tham khảo tài liệu của tác giả Crowther (2001), Pniewski và cs. (2011).

2.3.4 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 kỹ thuật PCR

2.3.4.1 Kiểm tra khả năng kháng kháng sinh kanamycin của một số cây con thế hệ T₁ bằng phương pháp sinh học định tính: Kiểm tra khả năng nảy mầm của hạt T₀ (cây thế hệ T₁) trên môi trường ½ MS không chất điều hòa sinh trưởng có bổ sung kháng sinh kanamycin 100 mg/L (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 có sự phù hợp hay không phù hợp với tỷ lệ phân ly lý thuyết 3:1 của đơn gen) (tham khảo tài liệu của tác giả Kalenahalli và cs. (2013)).

2.3.4.2 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 T₁: Dùng kỹ thuật PCR đối với các gen *HBsAg*, gen *nptII* - khuếch đại các băng DNA (expected band) theo thứ tự \approx 681 bp, 600 bp (tương tự trường hợp cây T₀).

2.4 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.

Chương 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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: Kết quả ghi nhận ở 42 ngày thí nghiệm được trình bày trong bảng 3.1.

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

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

Kết quả bảng 3.1 cho thấy 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. Nồng độ BA thích hợp phụ thuộc vào giống cà chua nghiên cứu. Ngược lại, nồng độ IAA 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.

Kết luận: 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. Môi trường này sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

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

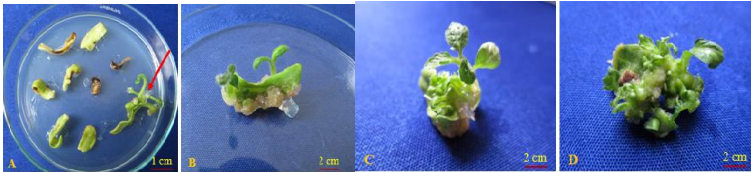
Đối với lá mầm, ghi nhận kết quả ở 28 ngày nuôi mẫu trên môi trường tái sinh tốt nhất có bổ sung kháng sinh kanamycin theo nồng độ tăng dần từ 30, 40, 50, 60, 70 mg/L.

Đối với cây con, ghi nhận kết quả ở 60 ngày sau cấy cây con (tái sinh từ lá mầm, cao khoảng 4 cm) trên môi trường MS không chất ĐHST có bổ sung kháng sinh kanamycin với nồng độ tăng dần: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg/L.

Kết quả cho thấy nồng độ kanamycin tối thiểu gây chết, ức chế khả năng tái sinh chồi từ mẫu lá mầm, ức chế sinh trưởng của cây con là 50 mg/L. Nồng độ này sẽ được sử dụng để chọn lọc chồi chuyển gen từ lá mầm và kiểm tra những cây con tái sinh từ lá mầm sau thí nghiệm biến nạp gen bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

3.2 Xây dựng quy trình biến nạp gen vào lá mầm cây cà chua TN412 bằng phương pháp dùng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*: Các mẫu lá mầm sau xử lý chuyển gen được chọn lọc trên môi trường có nồng độ kanamycin ở ngưỡng gây chết 50 mg/L và được cấy chuyển với chu kỳ 2 – 3 tuần/1 lần. Trong quá trình sàng lọc, dưới áp lực chọn lọc của kháng sinh

kanamycin, nhận thấy những mẫu 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 (hình 3.5). Qua sử dụng 100 mẫu lá mầm cà chua 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 biến nạp gen 3%.



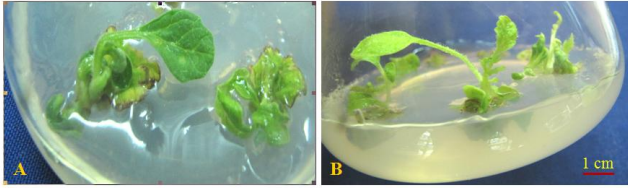
Hình 3.5 Mẫu lá mầm sống sót trên môi trường có kháng sinh kanamycin 50 mg/L hình thành mô sẹo, tái sinh chồi sau 4 lần cấy chuyển sang môi trường chọn lọc - A. Lá mầm sau chuyển gen hình thành mô sẹo và tái sinh chồi ở 45 NSC trên môi trường chọn lọc có bổ sung kháng sinh kanamycin 50 mg/L (vị trí mũi 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.

Sau 3 tháng chọn lọc, những mẫu mô sẹo/ chồi nhỏ sống được cấy chuyển sang môi trường tái sinh tạo cây con.

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 *nptIII*:

Ở giai đoạn 30 ngày sau cấy, các chồi nói trên có khả năng tăng trưởng bình thường, phát triển rễ, thân và lá; tương tự, các mẫu lá thật (từ các chồi tái sinh) có khả năng 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 (hình 3.9).

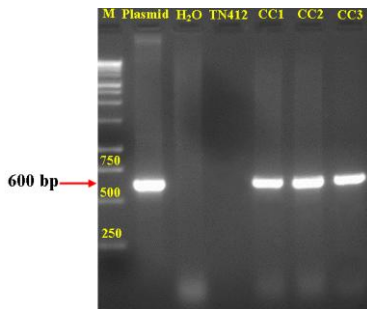


Hình 3.9 Mẫu lá thật cây T_0 tái sinh trên môi trường chứa kháng sinh kanamycin 100 mg/L ở 60 ngày sau cấy - A. Mẫu lá thật của cây T_0 tái sinh tạo chồi nhỏ trên môi trường chứa kanamycin 100 mg/L; B. Chồi nhỏ hình thành từ mẫu lá thật cây T_0 được chuyển sang môi trường chứa kanamycin 100 mg/L

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

3.3.2.1 Kiểm tra PCR gen kháng kanamycin *nptII*

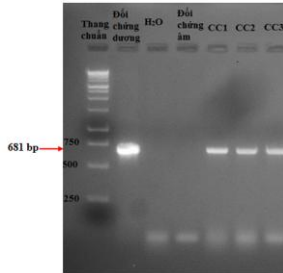
Sản phẩm PCR gen *nptII* của 03 dòng cà chua kháng kanamycin đều có sự hiện diện của đoạn DNA kích thước khoảng 600 bp tương đương với kích thước băng DNA ở đối chứng dương (hình 3.10). Từ kết quả, bước đầu nhận định gen *nptII* đã hợp nhất vào bộ gen của 03 dòng cà chua CC1, CC2, CC3.



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 bi TN 412 in vitro không biến nạp gen. CC1, CC2, CC3: Lá in vitro các dòng cà chua kháng kanamycin

3.3.2.2 Kiểm tra PCR gen *HBsAg*

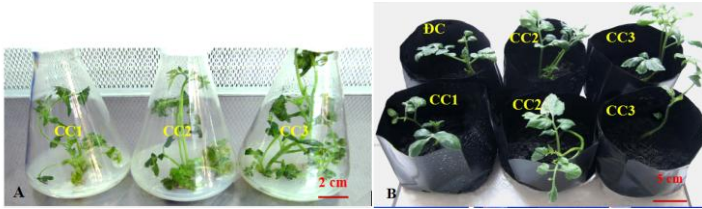


Hình 3.11 Kết quả điện di sản phẩm PCR của gen *HBsAg* ở cây cà chua chuyển gen - Đối chứng dương: Plasmid *pITB-HBsAg* với băng DNA có kích thước 681 bp. Đối chứng âm: Nước cất và lá cà chua bi TN 412 in vitro không biến nạp gen. CC1, CC2, CC3: Lá in vitro 3 dòng cà chua chuyển gen (đã kiểm tra sự hiện 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 đối với gen *HBsAg* (hình 3.11). Điều này cơ bản cho thấy gen *HBsAg* cũng đã hợp nhất vào bộ gen cây.

3.3.3 Giải trình tự sản phẩm PCR gen *HBsAg* của cây cà chua chuyển gen: Kết quả giải trình tự cho thấy giữa trình tự đoạn gen *HBsAg* được khuếch đại từ plasmid *pITB-HBsAg* (mẫu đối chứng) và từ DNA cây cà chua chuyển gen (đã kiểm tra sản phẩm PCR gen *HBsAg* với tín hiệu dương tính) không có sự khác biệt nhau - 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



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)



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, DC [(DC): Đối chứng, CC1, CC2, CC3: Ba dòng chuyển gen]

Chồi của ba dòng cây cà chua kháng kanamycin được cấy trên môi trường ½ MS (với vitamin B5) để tạo cây hoàn chỉnh, nhân *in vitro* và trồng ở vườn ươm (hình 3.12). 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, ra hoa, kết quả cùng thời điểm với cây đối chứng (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

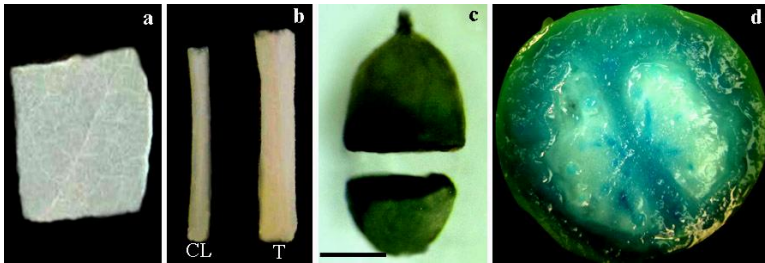
	Tổng số nhánh lá/cây (TB ± SE) (nhánh lá)	Số quả (TB ± SE) (quả)	Chiều cao cây (TB ± SE) (cm)	Số hoa (TB ± SE) (hoa)
ĐC	12,33 ± 0,33	2,33 ± 0,33	130,33 ± 2,60	49,33 ± 4,70
CC1	13,33 ± 0,33	2,66 ± 0,33	137,67 ± 1,20	56,33 ± 4,17
CC2	12,00 ± 1,15	2,33 ± 0,33	133,00 ± 3,60	53,33 ± 5,45
CC3	12,66 ± 1,20	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

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.

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

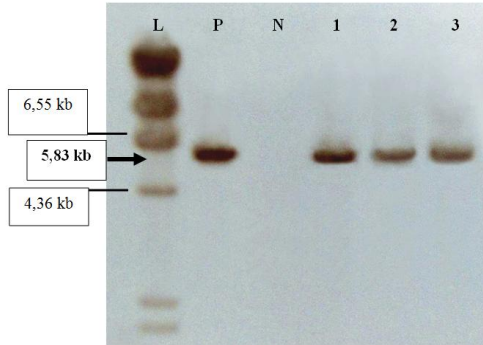
Kết quả cho thấy quả cà chua chín chuyển gen *HBsAg* có màu xanh indigo qua phản ứng với thuốc thử, trong khi quả cà chua không chuyển gen hoàn toàn không có màu xanh này. Điều này chứng tỏ gen *gusA* đã được tích hợp vào bộ gen cây cà chua và được biểu hiện dưới sự điều khiển của promoter *PDS* - biểu hiện chuyên biệt ở quả.



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.

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

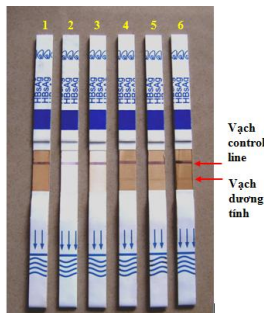
DNA tách từ cây cà chua đối chứng và ba dòng cà chua chuyển gen CC1, CC2, CC3 được xử lý với enzyme giới hạn *NcoI*. Về nguyên tắc, trong phân tích Southern blot, đoạn DNA mang trình tự gen *HBsAg* sẽ bắt cặp với mẫu dò. Kết quả cho thấy ở các dòng chuyển gen đều có băng với kích thước như mong đợi 5,83 kb (hình 3.17). Điều này khẳng định sự gắn ổn định của gen *HBsAg* vào bộ gen cà chua TN412.



Hình 3.17 Kết quả phân tích Southern blot các dòng cà chua chuyển gen [Kết quả kiểm tra đối với 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 T_0 bằng que thử đặc hiệu



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

Kết quả cho thấy ở dịch protein quả có sự 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). Điều này chứng tỏ gen *HBsAg* thiết kế dưới sự điều khiển của promoter *PDS*, tạo biểu hiện đặc trưng ở quả, đã phát huy tác dụng.

3.3.8 Phân tích protein tổng số dùng điện di trên gel polyacrylamide (SDS-PAGE): Kết quả cho thấy các băng của protein tổng số tách biệt rõ rệt trên bề mặt gel sau điện di ở tất cả các trường hợp đối chứng và chuyển gen. Bảng 3.4 cho thấy hàm lượng protein tổng số ở quả chín của các dòng cà chua chuyển gen CC1, CC2, CC3 là tương đương nhau và cũng tương đương với đối chứng, không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng Duncan.

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

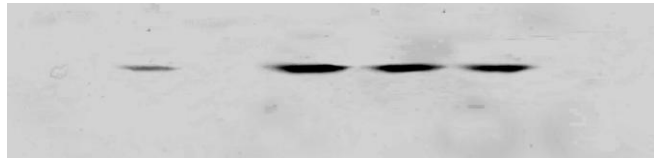
ns: sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức $P \leq 0,05$ theo phân hạng của Duncan

3.3.9 Phân tích Western blot các dòng cà chua chuyển gen *HBsAg*: Kết quả phân tích tín hiệu trên màng (hình 3.20) cho thấy có sự hiện diện của

protein HBsAg trong dung dịch protein tách chiết từ mẫu quả chín các dòng cà chua chuyển gen *HBsAg*.

So với vị trí của protein HBsAg đối chứng tinh khiết [RPN800E (GE Healthcare), ≈ 24 kDa] trên màng, có thể xác định protein HBsAg ở các quả cây chuyển gen cũng có trọng lượng phân tử khoảng 24 kDa và kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của các tác giả Unni (2010), Guan và cs. (2012) và Kalenahalli (2013).

24 kDa →



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; 1, 2, 3: Ba dòng cây chuyển gen *CC1*, *CC2* và *CC3*

3.3.10 Kiểm tra hàm lượng protein HBsAg bằng phương pháp ELISA:

Kết quả định lượng protein HBsAg và tỷ lệ protein HBsAg trên protein tổng số ở các mẫu khảo sát (đối chứng và chuyển gen) được trình bày trong bảng 3.8 dưới đây.

Hàm lượng protein tái tổ hợp HBsAg ở quả cà chua ba dòng cây chuyển gen *HBsAg* chiếm từ 171,32 ng/g trọng lượng tươi (TLT) đến 202,97 ng/g TLT. So với kết quả của tác giả Guan và cs. (2012) (gen *HBsAg* có promoter *CaMV35S*) với mức biểu hiện HBsAg ở quả là 127,54 ng/g TLT thì hàm lượng protein HBsAg ở luận án (gen được điều khiển bởi promoter *PDS*) đạt mức trung bình cao hơn ($\approx 187,1$ ng/g TLT) - chiếm khoảng 0,11% trên protein tổng số.

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.

Kết quả hàm lượng protein HBsAg trong quả cà chua cao như trên, có thể do promoter gen *HBsAg* được cấu trúc trong plasmid chuyển gen là promoter *PDS*, tạo biểu hiện chuyên biệt ở quả, kết hợp với promoter *T7* của thực khuẩn thể làm tăng cường sự biểu hiện của gen chuyển.

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

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

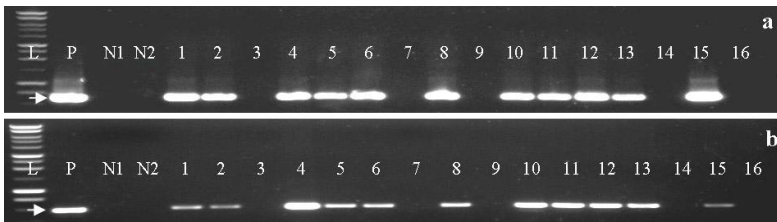
Kết quả cho thấy đa số hạt nảy mầm bình thường; ngược lại, một số nảy mầm rất kém – tương tự hạt cây không chuyển gen trên giấy thấm bão hòa dung dịch kanamycin 100 mg/L. Kết quả tính toán χ^2 (bảng 3.9) cho thấy các trị số χ^2 của các dòng cà chua CC1, CC2, CC3 đều nhỏ hơn 3,841. Vì vậy, giả thuyết dự kiến sự di truyền của gen kháng kanamycin (gen *nptII*) sang thế hệ sau với tỷ lệ xấp xỉ 3:1 là phù hợp với độ tin cậy α (P) = 0,05.

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.

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 ở quả chín của thế hệ T_0 (hạt)	Số hạt nảy mầm (hạt)	Số hạt không nảy mầm (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

3.4.2 Kiểm tra sự di truyền của gen chuyển ở thế hệ T_1 bằng kỹ thuật PCR



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; NI: 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)

Lá của một số cây con thế hệ T_1 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. 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). 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 sang thế hệ sau và phân ly theo tỷ lệ 3:1 (quy luật Mendel).

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 T₀ 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 T₁. 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 T₀, T₁ 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 T₂, T₃ 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.