

## KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU TRONG NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN KHÁNG NGUYÊN *Hemagglutinin* CỦA VIRUS H5N1 VÀO BÈO TẮM *Spirodela polyrrhiza* BẰNG SÚNG BẮN GEN

Phạm Thị Lý Thu, Nguyễn Văn Đồng, Lê Huy Hàm

### SUMMARY

#### Primary results of studies on hemagglutinin antigen transformation of H5N1 virus in duckweed *Spirodela polyrrhiza* by particle bombardment

The development of modern biotechnology has created significant step in the production of vaccines against viral diseases. The study of vaccine production system using transgenic plants is one of the essential research approaches meeting the social demands and has obtained remarkable achievements. Three transgenic lines of *S. polyrrhiza* duckweed were obtained carrying the Hemagglutinin antigen (HA1) of H5N1 virus by applying of particle bombardment transformation method in 20 experiments. The presence of HA1 gene in transgenic duckweed lines were analyzed by PCR and Southern blot. This results will be the scientific basis and starting materials for edible vaccine production in plant systems.

Keywords: Hemagglutinin antigen, *Spirodela polyrrhiza*, particle bombardment, transformation, H5N1 virus

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự phát triển của công nghệ sinh học hiện đại đã tạo ra những bước tiến quan trọng trong sản xuất vaccine chống lại các bệnh do virus. Đối với bệnh truyền nhiễm, vaccine được coi là biện pháp có tính chiến lược, nhằm ngăn chặn lây lan, tạo bảo hộ miễn dịch. Đối với dịch cúm A/H5N1 ở gia cầm, nghiên cứu phát triển vaccine không những ngăn ngừa được bệnh ở gia cầm, mà còn khống chế nguồn truyền lây của loại virus nguy hiểm này sang người (Lê Thanh Hòa và cộng sự 2008). Nghiên cứu sản xuất vaccine bằng hệ thống chuyển gen thực vật là một trong những hướng nghiên cứu mang tính thời sự đáp ứng được đòi hỏi của thực tế nêu trên (Subbarao & Luke, 2007). Trong vòng 15 năm trở lại đây, việc nghiên cứu, phát triển và thử nghiệm hệ thống vaccine thực vật đã thu được những thành tựu đáng kể. Tuy nhiên, hiệu quả chuyển gen phụ thuộc rất lớn vào bản chất cây trồng, đặc tính di

truyền cũng như phương pháp chuyển nạp (Rybicki, 2010).

Với lợi thế sinh sản nhanh, hàm lượng protein lớn (6,8-45%), phân bố rộng rãi trên khắp thế giới của bèo tấm (Landolt, 1986), kết hợp với những ưu điểm của phương pháp chuyển gen vào thực vật bằng súng bắn gen thì các nghiên cứu chuyển gen kháng nguyên của virus H5N1 vào bèo tấm là rất cần thiết.

Trong công trình này, chúng tôi thông báo kết quả bước đầu nghiên cứu chuyển gen kháng nguyên HA1 của virus H5N1 vào bèo tấm *Spirodela polyrrhiza* bằng phương pháp bắn gen.

### II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Vật liệu nghiên cứu

##### a. Vật liệu thực vật

Mẫu bèo tấm *Spirodela polyrrhiza* được thu thập trên đồng ruộng tại địa bàn Hà Nội và được nuôi trong vại sành ở nhà lưới của Viện Di truyền Nông nghiệp. Đây

là một trong những loài phân bố rộng rãi tại Việt Nam và khu vực Châu Á.

*b. Vật liệu di truyền*

Chúng tôi sử dụng DNA plasmid mang các cấu trúc vector biểu hiện như sau: (i) vector p6d35S-UbiHA1 có cấu trúc promoter Ubiquitin + HA1 + NOS terminator; (ii) vector pCAMBIA-HA1 có cấu trúc promoter CAMV35S + HA1 + His<sub>6</sub> tag + NOS terminator do Viện Công nghệ sinh học và Viện Di truyền nông nghiệp thiết kế. Các vector này được nhân dòng trong vi khuẩn *E. coli* chủng DH5 $\alpha$ .

**2. Phương pháp nghiên cứu**

*Phương pháp tách chiết DNA plasmid của vi khuẩn E. coli*

DNA plasmid mang cấu trúc gen p6d35S-UbiHA1/pCAMBIA-HA1 của vi khuẩn *E. coli* được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp Sambrook & Russell (2001).

*Phương pháp chuyển gen HA1 vào bào tằm S. polyrrhiza bằng súng bắn gen*

Hạt vàng mang DNA plasmid p6d35S-UbiHA1/pCAMBIA-HA1 được chuẩn bị theo phương pháp của Sanford và cộng sự (1987).

Sử dụng hệ thống súng bắn gen PS100 của Biorad với các thông số bắn như sau: lượng hạt vàng: 160 $\mu$ g/lần bắn, kích thước hạt vàng: 1.0  $\mu$ m, áp suất khí helium 1350 psi và khoảng cách từ mô đích tới màng nõ là 9 cm.

Mẫu cánh bào *S. polyrrhiza* được nhân trên môi trường H/2 sau 4-5 ngày được lấy ra và xếp kín thành một vòng tròn trên đĩa Petri chứa môi trường H/2 đặc. Mỗi thí nghiệm được thực hiện trên 3 đĩa, lượng bào khoảng 200 mg/đĩa bắn

Sau khi bắn gen 4-5 ngày, các mẫu bào được chọn lọc trên môi trường Hutner (H/2) đặc bổ sung hygromycin nồng độ 5 mg/l.

Sau 3-5 chu kỳ chọn lọc (mỗi chu kỳ 5-7 ngày), các dòng bào sống sót được nhân trên môi trường H/2 nhằm tạo nguồn sinh khối bào đủ cho các phân tích sinh học phân tử (PCR, Southern blot).

**Phương pháp phân tích cây chuyển gen**

*Phương pháp tách chiết DNA tổng số của bào tằm*

Chúng tôi sử dụng phương pháp tách chiết DNA tổng số của Đại học Tổng hợp Bonn (CHLB Đức). Bào *S. polyrrhiza* được nghiền bằng cối (giữ lạnh ở -20 $^{\circ}$ C) cùng với 3 ml đệm chiết. Sau đó mẫu được chuyển vào ống eppendorf và thêm vào 300  $\mu$ l đệm SDS 20%, ủ ở 65 $^{\circ}$ C trong 5 phút. Thêm 2 ml Acetate Kalium và ủ trong 2 phút trên đá sau đó ly tâm 14000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ 4 $^{\circ}$ C. Sau khi ly tâm, chuyển dịch nổi sang ống eppendorf mới và bổ sung Isopropanol (1:1), ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Ly tâm mẫu 14000 vòng/phút trong 20-60 phút ở 4 $^{\circ}$ C. Loại bỏ dịch nổi, thu và rửa tua DNA 2 lần bằng cồn 70%. Tiếp đó hòa tan DNA trong đệm TE, lưu giữ ở -20 $^{\circ}$ C.

*Hóa chất tách chiết:* Đệm chiết DNA (pH 8,0) gồm: 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; 20% SDS; 5 mM Acetate Kalium.

*Phương pháp phân tích PCR*

Xác định sự có mặt của gen chuyển (*HA1*) trong hệ gen thực vật bằng phản ứng PCR sử dụng các mồi đặc trưng. Phản ứng PCR được tiến hành với thể tích phản ứng 20  $\mu$ l (gồm 1 $\mu$ l DNA (50ng/ 1 $\mu$ l), 0,3 $\mu$ l dNTPs (10 mg mỗi loại), 2  $\mu$ l đệm PCR (10X), 2,5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1  $\mu$ l mồi (25pmol), 0,2  $\mu$ l Taq polymerase (Fermentas, Đức). Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR: 94 $^{\circ}$ C/10 phút; (94 $^{\circ}$ C/15s; 55 $^{\circ}$ C/30s; 72 $^{\circ}$ C/60s) x 35 chu kỳ; 72 $^{\circ}$ C/10 phút.

Bảng 1. Trình tự các đoạn mồi sử dụng trong nghiên cứu

Đoạn mồi	Trình tự
T-HA1-for	5'TACCCAGGGGATTTCAATGAC 3'
T-HA1-rev	5'GACACTTGGTGTTCAGTTAC 3'

Sản phẩm khuếch đại của phản ứng PCR được điện di trên gel Agarose 1% ở hiệu điện thế 100 V trong 25-30 phút. Nhuộm DNA bằng Ethidium Bromide và quan sát kết quả dưới đèn UV.

#### Phương pháp lai Southern blot

Phân tích lai Southern blot được thực hiện theo phương pháp của Breitler và cộng sự (2004). 20 µg DNA tổng số của bèo tấm chuyển gen được cắt bằng enzyme giới hạn BamHI và được chạy phân tách trên gel Agarose 0,8% và chuyển lên màng Hybond N-Membran (Amersham, Pharmacia) bởi hệ thống PosiBlotter (Stratagene) sử dụng đệm SSPE 20x (Stratagene).

Một băng DNA có trình tự tương ứng với đoạn mã hóa gen *HAI* được đánh dấu đồng vị phóng xạ với  $\alpha$ -32P-dCTP sử dụng

kit Kit Prime-It II Random (Stratagene) được sử dụng làm mẫu dò. Quá trình lai, rửa màng lai và kiểm tra kết quả lai theo quy trình của Stratagene Kit.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 1. Kết quả thu nhận các dòng bèo tấm *Spirodela polyrrhiza* chuyển gen

Chúng tôi thực hiện 20 thí nghiệm chuyển gen vào bèo tấm *Spirodela polyrrhiza* bằng súng bắn gen với 2 vector mang gen *HAI*, kết quả thu được 07 dòng bèo sống sót sau chọn lọc 6 lần. Tương tự như chuyển gen bằng *A. tumefaciens*, số dòng bèo sống sót sau chọn lọc 4 lần giảm rõ rệt so với chọn lọc 2-3 lần. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Tổng hợp các thí nghiệm chuyển gen vào bèo tấm *Spirodela polyrrhiza* bằng súng bắn gen

Vector chuyển nạp	Số đĩa mẫu cấy chuyển sau chọn lọc						Số dòng sống sót sau chọn lọc
	1 lần	2 lần	3 lần	4 lần	5 lần	6 lần	
p6d35S-UbiHA1	22	22	14	6	5	5	5
pCAMBIA1300-HA1	18	9	3	3	2	2	2

Với việc sử dụng Hygromycin ở nồng độ 5 mg/l làm tác nhân chọn lọc thực vật, những cánh bèo không mang gen sẽ bị chết sau 2-5 lần cấy chuyển. Kết quả ở bảng 2 cũng cho thấy số dòng bèo chuyển gen thu được từ các thí nghiệm bắn gen với vector p6d35S-UbiHA1 nhiều hơn so với các thí nghiệm bắn gen với vector pCAMBIA-HA1. Điều này cho thấy hiệu quả chuyển nạp gen cũng bị ảnh hưởng bởi yếu tố cấu trúc của vector chuyển nạp. Gen *HAI* trong vector p6d35S-UbiHA1 được điều khiển bởi promoter Ubiquitin, các nghiên cứu đã cho

thấy đây là một loại promoter điều khiển biểu hiện gen rất hiệu quả ở các cây một lá mầm chuyển gen. Trong khi đó, promoter CaMV35S điều khiển biểu hiện gen ở hầu hết các loài thực vật, vì thế promoter này không hoàn toàn đặc trưng đối với cây một lá mầm, trong đó có cây bèo tấm.

Các dòng bèo sống sót sau từng chu kỳ chọn lọc sẽ được nhân trên môi trường H/2 đặc bổ sung 10 g/l sucrose để tăng số lượng cá thể. Sau đó, tiếp tục được đưa vào chu kỳ chọn lọc tiếp theo.



Hình 1. Bèo *Spirodela polyrrhiza* chuyển gen sau chọn lọc lần 1 (A), lần 3 (B).

Các dòng bèo sống sót sau 6 chu kỳ chọn lọc sẽ được nhân tạo sinh khối trên môi trường H/2, thời gian 4-6 tuần để tạo nguồn vật liệu cho các bước phân tích tiếp theo.

## 2. Phân tích PCR các dòng bèo *S. polyrrhiza* chuyển gen

Chúng tôi tiến hành tách chiết DNA tổng số từ 7 dòng bèo *S. polyrrhiza*

chuyển gen thu được theo phương pháp của Đại học Tổng hợp Born (CHLB Đức). Các mẫu DNA thu được sau tách chiết được dùng làm khuôn, cặp mồi đặc hiệu được sử dụng cho khuếch đại gen *HAI* có kích thước ~ 600 bp. Sản phẩm khuếch đại của phản ứng PCR được điện di trên gel Agarose 1% để kiểm tra sự có mặt của gen *HAI*.



Hình 2. Kết quả phân tích PCR gen HA1 các dòng bèo *S. polyrrhiza* chuyển gen

Cột M: Thang DNA chuẩn 1kb; (+1); (+2): Đối chứng dương tính (DNA plasmid p6d35S-UbiHA1); (-): DNA tổng số tách từ bèo *S. polyrrhiza* đối chứng (không chuyển gen); H2O: mẫu H2O; Cột 1; 3; 7: Lần lượt là các dòng *S. polyrrhiza* (D2, D5, D6,) chuyển gen có mang gen *HAI*; Cột 2, 4, 5, 6: các dòng *S. polyrrhiza* chuyển gen không mang gen *HAI*

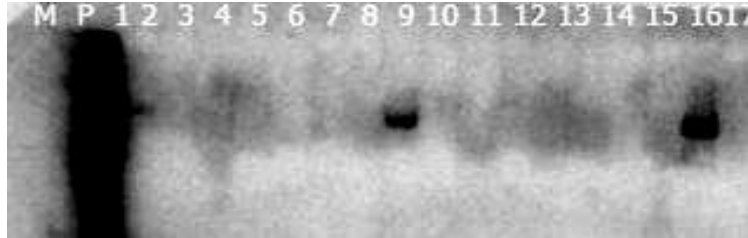
Kết quả điện di các sản phẩm của phản ứng PCR thể hiện ở hình 2 cho thấy

trong số 7 mẫu DNA của bèo tằm chuyển gen được phân tích, có 3 mẫu bèo chuyển gen có xuất hiện vạch DNA tại vị trí có kích thước ~600 bp. Như vậy, từ 7 dòng bèo chuyển gen sống sót sau chọn lọc, chúng tôi đã nhận được 3 dòng với sự có mặt của gen *HAI*, các dòng này có khả năng sinh trưởng bình thường và tạo sinh khối tốt, tương tự như mẫu bèo tằm dạng tự nhiên

### 3. Phân tích Southern blot các dòng bèo *S. polyrrhiza* chuyển gen

Trên cơ sở kết quả phân tích PCR của các cây chuyển gen thu được, chúng tôi đã

sử dụng kỹ thuật lai Southern blot để kiểm tra sự dung nạp của các gen đã chuyển trong hệ gen thực vật. Kết quả phân tích lai DNA của các dòng bèo chuyển gen *HAI* được mô tả trên hình 3.



Hình 3. Kết quả lai DNA của các dòng bèo tằm *S. polyrrhiza* chuyển gen

M: Thang DNA chuẩn 1kb, P: probe, cột 2: mẫu bèo *S. polyrrhiza* chuyển gen dòng D2; cột 9: mẫu bèo *S. polyrrhiza* chuyển gen dòng D5 và cột 16: mẫu bèo *S. polyrrhiza* chuyển gen dòng D6.

Kết quả thu được cho thấy các dòng bèo chuyển gen *S. polyrrhiza* D2, D5 và D6 đều có chứa 1 bản sao nguyên vẹn cấu trúc của gen *HAI*. Các dòng bèo tằm chuyển gen này sẽ được tiếp tục nhân dòng, tạo sinh khối đủ cho các nghiên cứu phân tích protein và đánh giá thử nghiệm trên gia cầm.

### IV. KẾT LUẬN

Áp dụng phương pháp chuyển gen bằng súng bắn gen, bước đầu đã thu nhận được 3 dòng bèo tằm *S. polyrrhiza* mang gen kháng nguyên *HAI* của virus H5N1. Sự có mặt của gen chuyển *HAI* trong các dòng bèo tằm chuyển gen đã được phân tích và đánh giá bằng các phương pháp sinh học phân tử. Các dòng bèo tằm chuyển gen này sẽ là cơ sở khoa học và là nguồn vật liệu ban đầu cho các nghiên cứu sản xuất vaccin đường miệng bằng hệ thống thực vật.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Breitler J.C., Vassal J.M., Catala M.a del C., Meynard D., Marfa V., Mele E., Royer M., Murillo I., San S.B.,

Guiderdoni E. and Messeguer J. (2004). *Bt* rice harbouring *cry* genes controlled by a constitutive or wound-inducible promoter: protection and transgene expression under Mediterranean field conditions. *Plant Biotechnology Journal* 2(5), pp. 417-430.

2. Landolt E. (1986), The family of Lemnaceae - a monographic study. *Vol.1*, Veroff Geobot Inst ETH, Stiftung Rubel, Zurich, Heft 71

3. Lê Thanh Hòa, Đinh Duy Kháng, Phan Văn Chi, Nông Văn Hải, Trương Nam Hải, Phạm Việt Cường, Nguyễn Thị Bích Nga, Lê Trần Bình (2008), “Virus cúm A/H5N1, vấn đề dịch tễ học, tiến hóa, hình thành genotype và tương đồng kháng nguyên - miễn dịch - vaccine”, *Tạp chí Công nghệ sinh học* 6(4A), tr. 529-553.

4. Rybicki E. P. (2010), “Plant-made vaccines for humans and animals”, *Plant Biotechnol J* 8(5), pp. 620-637.

5. Sambrook J., Russell D. (2001), *Molecular cloning, A Laboratory manual*, Cold spring Harbor laboratory press, Third edition, New York

**Người phản biện:**  
**GS. TSKH. Trần Duy Quý**

## ỨNG DỤNG HỆ THỐNG NUÔI CÂY NGẬP CHÌM TẠM THỜI (PLANTIMA®) TRONG VI NHÂN GIỐNG MÍA Ở VIỆT NAM

Cao Anh Dương, Trần Đông Hạ, Đỗ Đức Hạnh

### SUMMARY

#### Application of a temporary immersion system (Plantima®) for micropropagation of sugarcane in Vietnam

In micropropagation, the numbering and quality of the seedlings are highly affected by the shoot multiplication. These experiments we used a temporary immersion system (Plantima®) for shoot multiplication of sugarcane (variety Suphanburi7). The multiplication rate on Suphanburi7 was doubled in comparison with the conventional micro propagation protocol (solid medium). The Basic medium Mutative and Stooge (MS) supplemented with 0.6 mg/l BA, 150 ml/l krypton and 30 g/l sucrose showed the best result for multiplication of the sugarcane shoot. After 20 days culturing we collected the highest number of shoots at the good quality.

Keywords: Sugarcane, *Saccharum* spp., micropropagation, medium, tissue culture, multiplication, temporary immersion system (TIS), Plantima®

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới, mía là một trong những cây trồng có giá trị kinh tế cao đang được chú trọng đầu tư phát triển. Điều kiện khí hậu của nước ta rất thích hợp cho việc trồng mía. Tuy nhiên, với phương pháp nhân giống bằng hom phổ biến hiện nay sẽ không thể sản xuất và cung cấp đủ số lượng lớn giống, với chất lượng đảm bảo trong thời gian ngắn cho nhu cầu cấp thiết của sản xuất.

Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học, công nghệ vi nhân giống đã được ứng dụng thành công trên nhiều cây trồng, trong đó có cây mía. Công nghệ vi nhân giống mía phổ biến hiện nay là nhân giống cây mô trên môi trường thạch. Phương pháp này đã giải quyết được một phần nhu cầu về việc nhân nhanh các giống mía mới. Tuy nhiên, phương pháp này có nhược điểm là chi phí giá thành cây giống cao do thời gian nuôi cây dài, sử dụng nhiều nhân công, độ đồng đều cây giống thấp, khó áp dụng sản xuất theo qui mô công nghiệp lớn.

Hiện nay, ở nhiều nước có ngành công nghệ sinh học phát triển như Braxin, Úc, Cuba,... người ta đã ứng dụng thành công hệ

thống và công nghệ nuôi cấy ngập chìm tạm thời (*Temporary Immersion System* - TIS) trong vi nhân giống mía trên quy mô công nghiệp. Ở nước ta, công nghệ này mới chỉ được ứng dụng ở một số viện, trường, trung tâm nghiên cứu trong vi nhân giống một số loại như dược liệu, hoa, cây cảnh quý,...

Để từng bước áp dụng công nghệ mới này trong nhân nhanh và sản xuất cây giống mía nuôi cấy mô ở nước ta, đẩy nhanh tiến độ sản xuất cây giống cây mô theo quy mô công nghiệp, góp phần khắc phục sự thiếu hụt cây giống cây mô chất lượng cao trong sản xuất hiện nay, chúng tôi đã tiến hành một số thí nghiệm về vi nhân chồi mía giống *Suphanburi7* bằng hệ thống nuôi cấy ngập chìm tạm thời Plantima®, có so sánh với phương pháp nhân chồi truyền thống trên môi trường thạch và thu được một số kết quả bước đầu.

### II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Vật liệu nghiên cứu

##### 1.1. Mẫu cây và giống thí nghiệm

- Mẫu cây thí nghiệm là chồi mía giống *Suphanburi7* khoảng 8 tuần tuổi, được Tổ