

XÂY DỰNG QUY TRÌNH PHÁT HIỆN NHANH NGŌ CHỨA GEN *CryIAb* DỰA TRÊN KỸ THUẬT LAMP

Hồ Viết Thế^{1*}, Trần Thị Mỹ Hạnh², Nguyễn Thị An¹,
Ngô Thị Kim Anh¹, Nguyễn Thị Hương¹, Lê Ngọc Giàu¹

¹Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Công nghệ TP. Hồ Chí Minh (HUTECH)

*Email: thehv@hufi.edu.vn

Ngày nhận bài: 26/11/2019; Ngày chấp nhận đăng: 21/02/2020

TÓM TẮT

Việt Nam đã cho phép trồng ngô biến đổi gen có chứa gen *CryIAb* để tăng khả năng kháng sâu đục thân. Tuy nhiên, vẫn còn nhiều ý kiến tranh cãi về mức độ an toàn của loại cây trồng mới này, vì vậy đã có nhiều phương pháp sử dụng để phát hiện sự hiện diện của gen *CryIAb* trong cây ngô. Các phương pháp hiện tại phần lớn đều phụ thuộc nhiều vào trang thiết bị phòng thí nghiệm và khó thực hiện ngoài thực địa. Gần đây, kỹ thuật khuếch đại DNA đẳng nhiệt LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) đã được sử dụng để phát hiện nhanh các đối tượng gây bệnh trên người và vật nuôi một cách nhanh chóng, với độ chính xác cao và ít yêu cầu về trang thiết bị đắt tiền. Trong nghiên cứu này, quy trình phát hiện ngô biến đổi gen bằng kỹ thuật LAMP đã được xây dựng thành công thông qua khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới phản ứng. Kết quả cho thấy nồng độ phù hợp của các môi FIP/BIP và F3/B3 là 0,4 μ M với nhiệt độ phản ứng phù hợp ở 60 °C. Ngoài ra, qua khảo sát về ngưỡng phát hiện của phương pháp LAMP so với phương pháp Realtime PCR cũng cho thấy độ nhạy của phản ứng LAMP cao hơn phản ứng Realtime PCR. Ngoài ra, khi sử dụng thuốc nhuộm HNB ở nồng độ 80 μ M, có thể phân biệt được giữa ngô không chuyển gen và ngô chứa gen *CryIAb*. Kết quả này là tiền đề để thiết kế KIT phát hiện ngô biến đổi gen ngoài thực địa.

Từ khóa: Biến đổi gen, CryIAb, LAMP, ngô, Realtime PCR.

1. MỞ ĐẦU

Trên thế giới, các cây lương thực như lúa, ngô biến đổi gen hay các cây công nghiệp như đậu nành, bông biến đổi gen được trồng phổ biến với diện tích lớn [1], các cây trồng được thương mại hóa nhiều ở các nước có nền nông nghiệp phát triển như Mỹ, Brazil, Argentina, Canada, Ấn Độ [2]. Năm 2018, cây trồng biến đổi gen đã được trồng ở 26 quốc gia với diện tích 191,7 triệu ha, tăng khoảng 113 lần so với năm 1996 [2]. Tháng 3 năm 2015, Cục Trồng trọt, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã cho phép sản xuất thương mại 3 giống ngô biến đổi gen, điều này đã giúp Việt Nam trở thành quốc gia thứ 29 trên thế giới thương mại hóa cây trồng sử dụng công nghệ sinh học [3]. Từ năm 2015, nước ta có 3 giống ngô biến đổi gen được trồng ngoài đồng ruộng: thứ nhất chứa gen *CryIAb* kháng sâu đục thân, giống thứ hai chứa gen *GA21* kháng thuốc diệt cỏ phổ rộng glyphosate, và giống thứ ba chứa đồng thời cả 2 gen *CryIAb* và *GA21* nên có khả năng kháng sâu đục thân và thuốc diệt cỏ ở các vùng trên cả nước. Ngày 18/3/2015, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã chính thức công nhận ba giống ngô biến đổi gen của Công ty Syngenta để trồng phổ biến ở nước ta bao gồm: NK66 Bt, NK66 GT và NK66 Bt/GT. Trong đó, giống NK66 Bt và NK66 Bt/GT mang gen *CryIAb* có khả năng phòng trừ sâu đục thân cao, có khả năng kháng sâu ở tất cả các bộ phận

của cây. Giống NK66 GT và giống NK66 Bt/GT mang gen mã hóa enzyme EPSP synthase có khả năng chống chịu cao đối với thuốc trừ cỏ glyphosate nên mang lại hiệu quả trừ cỏ rõ rệt khi sử dụng loại thuốc diệt cỏ này. Cả 3 giống ngô biến đổi gen này đều cho năng suất cao hơn so với giống nền đối chứng và chất lượng sản phẩm cũng tốt hơn thông qua việc sản phẩm ít bị hư hại do sâu đục thân gây ra [23]. Hiện nay, giống ngô chứa gen *CryIAb* được sử dụng phổ biến hơn do có khả năng giảm nhu cầu sử dụng thuốc diệt sâu bộ cánh vảy. Khi chuyển vào cây, gen *CryIAb* sẽ tạo ra tinh thể protein CryIAb, nhưng tinh thể này sẽ tạo thành độc tính khi vào trong hệ tiêu hóa của côn trùng, trong khi đó protein này đã được chứng minh an toàn đối với người và các động vật khác.

Mặc dù các giống ngô chuyển gen đem lại hiệu quả lớn về năng suất và chất lượng sản phẩm, nhưng trên thế giới nói chung và nước ta nói riêng vẫn có những ý kiến trái chiều về giống ngô này. Những tranh cãi về mức độ an toàn thực phẩm, ảnh hưởng tới môi trường và những vấn đề liên quan đến đạo đức đối với loại cây trồng này diễn ra ở nhiều nơi, điều này dẫn tới hơn 50 nước trên thế giới yêu cầu phải dán nhãn sản phẩm có chứa thành phần từ sinh vật biến đổi gen [4]. Theo Trung tâm Thông tin Phát triển Nông nghiệp Nông thôn, qua khảo sát của Trung tâm Tiêu chuẩn và Đo lường chất lượng (Quatest 3) năm 2010, có 111/323 (chiếm gần 34,4%) mẫu nông sản và thực phẩm thu thập ở 17 chợ dương tính với dạng promoter 35S hoặc dạng terminator NOS - một dạng chỉ thị của sản phẩm biến đổi gen. Trong đó, có 45 mẫu ngô, 29 mẫu đậu nành, 10 mẫu cà chua, 15 mẫu khoai tây [5]. Nhiều trẻ em ở Mỹ và châu Âu được chẩn đoán bị dị ứng khi ăn đậu phộng và nhiều thực phẩm biến đổi gen khác. Một số gen được đưa vào cây trồng tạo ra protein gây dị ứng. Do đó, nhiều quốc gia đã yêu cầu dán nhãn trên bao bì đối với các thực phẩm có nguyên liệu từ sinh vật biến đổi gen để người tiêu dùng và nhà sản xuất có quyền lựa chọn [6].

Hiện tại, có nhiều phương pháp phát hiện nguyên liệu thực phẩm có chứa thành phần biến đổi gen như PCR (polymerase chain reaction), Realtime PCR, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) [7, 8]. Tuy nhiên, các phương pháp này có nhược điểm phụ thuộc quá nhiều vào các thiết bị hiện đại đắt tiền và chỉ phân tích được ở trong phòng thí nghiệm. Yêu cầu thực tế cần phát triển một phương pháp phát hiện nguyên liệu thực phẩm biến đổi gen có tính di động cao để có thể xác định ở trên cánh đồng hoặc từ chợ, siêu thị... Từ năm 2000, Notomi và cộng sự đã nghiên cứu thành công kỹ thuật LAMP (loop mediated isothermal amplification), có thể phát hiện đoạn DNA đặc hiệu chính xác, nhanh chóng, đơn giản có thể thu nhận kết quả ngay tại hiện trường [9]. Kỹ thuật này đã được sử dụng thành công để phát hiện các loại sinh vật gây bệnh ở nhiều nơi trên thế giới và ở Việt Nam [10-12]. Nghiên cứu này đã bước đầu xây dựng quy trình phát hiện ngô biến đổi gen bằng kỹ thuật LAMP thông qua sự hiện diện của gen *CryIAb*. Đây là tiền đề để có thể phát triển bộ KIT nhằm giúp việc kiểm tra, xác định sự hiện diện của cây trồng biến đổi gen ngoài đồng ruộng hoặc các sản phẩm biến đổi gen từ thực phẩm trên thị trường.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Giống ngô NK66 BT/GT mang gen *CryIAb* kháng sâu bộ cánh vảy được sử dụng làm đối chứng dương, trong khi đó giống ngô NK66 không chứa gen được sử dụng làm đối chứng âm. Cả 2 giống ngô này đều do Công ty TNHH Syngenta Việt Nam cung cấp.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Ly trích DNA

Mẫu ngô NK66 BT/GT được sử dụng tách chiết DNA bằng quy trình của Bùi Minh Trí và Bùi Cách Tuyến [13]. Để tăng hiệu quả của quá trình, quy trình ly trích đã được thay đổi thời

gian ủ mẫu với đệm ly trích DNA và SDS 10% từ 1 giờ thành 24 giờ. Sau khi ly trích, DNA được định tính bằng phương pháp điện di với điện thế 110V trong 20 phút sau đó phân tích hình ảnh với máy chụp gel Quantum - ST4 3000 (Montreal-Biotech, Canada) dưới tia cực tím và định lượng bằng phương pháp đo mật độ quang với định lượng bằng phương pháp đo quang phổ (Optima SP-3000, Nhật Bản) ở bước sóng 260 nm và 280 nm.

2.2.2. Thiết kế môi và tối ưu phản ứng LAMP

Môi LAMP được thiết kế dựa trên trình tự gen *Cry1Ab* mục tiêu ở ngân hàng gen với số hiệu X54939 [14] bằng chương trình với Explorer version 4.0 (<https://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/>) với các thông số mặc định. Sau khi thu được các bộ môi, phản ứng LAMP được tối ưu hóa bằng việc khảo sát nồng độ môi phù hợp cho phản ứng thông qua thay đổi tỷ lệ các môi F3/B3 và FIP/BIP lần lượt là 0,2; 0,4; 0,6 và 0,8 μM ; nhiệt độ tối ưu cho phản ứng LAMP được khảo sát từ 60 °C đến 65 °C. Tổng thể tích của phản ứng LAMP 25 μL bao gồm: môi F3/B3, FIP/BIP; 15 μL Isothermal Master Mix 1X (Optigen, Anh); 1 μL DNA (40 ng/ μL).

2.2.3. Xác định ngưỡng phát hiện

Thành phần phản ứng LAMP bao gồm: môi F3/B3, FIP/BIP 0,4 μM ; 15 μL Isothermal Master Mixes (Optigen, Anh); 1 μL DNA ở các nồng độ lần lượt như sau: 1: 400 ng/ μL ; 2: 100 ng/ μL ; 3: 25 ng/ μL ; 4: 6,25 ng/ μL ; 5: 1,56 ng/ μL ; 6: 0,4 ng/ μL ; 7: 0,1 ng/ μL ; 8: 0,025 ng/ μL sau đó thêm nước loại ion cho tới 25 μL . Hỗn hợp được ủ ở 60 °C trong 60 phút. Các hỗn hợp phản ứng được ủ ở 65 °C trong 60 phút trong máy PCR (SureCycler 8800 Thermal Cycler-Agilent, Mỹ). Cuối cùng, kết quả phản ứng LAMP được nhận biết bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5% và nhận biết trực tiếp bằng thuốc nhuộm GelRedTM.

Tiếp theo, kỹ thuật Realtime PCR được sử dụng để so sánh ngưỡng phát hiện, thành phần hóa phản ứng như sau: môi xuôi và môi ngược 25 μM , 12,5 μL GoTaq qPCR Master Mix 2X (Promega, Mỹ); DNA chuẩn có chứa gen mục tiêu (Công ty Khoa Thương, TP. Hồ Chí Minh) được pha loãng và bổ sung vào các phản ứng với các nồng độ cuối ở các phản ứng như sau 1: 400 ng/ μL ; 2: 100 ng/ μL ; 3: 25 ng/ μL ; 4: 6,25 ng/ μL ; 5: 1,56 ng/ μL ; 6: 0,4 ng/ μL ; 7: 0,1 ng/ μL ; 8: 0,025 ng/ μL , sau đó thêm nước loại ion cho tới 25 μL . Trình tự môi cho phản ứng: môi xuôi CGCTCCAAGCCAGTGTT; môi ngược CCCATTGTTTCGAGTCC theo quy trình của Rahman và cộng sự [15]. Phản ứng được thực hiện với chu kỳ nhiệt: biến tính ban đầu ở 95 °C trong 2 phút, tiếp sau đó là 40 chu kỳ bắt đầu với biến tính ở 95 °C trong 15 giây, bắt cặp và kéo dài ở 60 °C trong 60 giây trong máy Realtime PCR Mx3005P (Agilent, Mỹ). Độ chuyên biệt của sản phẩm được xác định qua phân tích đường cong nóng chảy của sản phẩm.

Bảng 1. Trình tự môi cho phản ứng LAMP

Tên môi	Trình tự môi (5' – 3')
F-1	AGTTGCTGTA CTGTGCGCGGA
B-1	TGTCCGTGTACGTTCAAGCAGC
FIP-1	AGAGAGTGGGAAGCCGATCCTACTAACCCAGCTCTCCG
BIP-1	AGCTCTGCAATCGCACAAACCCGTTTCCACCCCTAAGC
F-2	TCTCGCCTTG GCAACTAAGGAA
B-2	AATGTGCCACCCAGGCAAGG
FIP-2	CCAGCAACTTTCCGTTCTTGACGGAACAGAGTTCGCT
BIP-2	AGGTACAAGGCAAGGCCTTGCAAGGCACTCGTAGTAG

F-3	TGTGTCAAAGACGAGTCGCTCA
B-3	CCAGGTGCTGGGTTCGTTCT
FIP-3	TGCCTGAGTAACCCAGAAGTGTGGCGAACGCATTGAAAC
BIP-3	CCAGGTAGAGTTACCCTACGAAGGACCACGTTTAACTCGT
F-4	TTGTCGCGGAACTGGTGTCTG
B-4	TGTCCGTGTACGTTCAAGCAGC
FIP-4	GTGGGAAGCCGATCCTACTAGCTCTCCGCGAGGAAAT
BIP-4	CTCTGCAATCGCACAAACCCGTTTCCACCCCTAAGCTACG

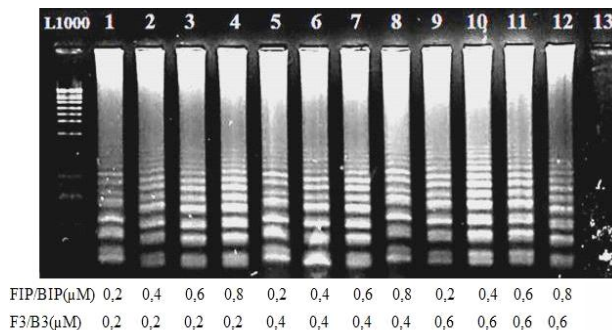
2.2.4. Thử nghiệm khả năng phát hiện trực tiếp của phản ứng LAMP

Phản ứng LAMP được thực hiện với máy PCR (SureCycler 8800 Thermal Cycler-Agilent, Mỹ) ở 60 °C trong 1 giờ với tổng thể tích phản ứng là 13 µL theo như tỷ lệ các thành phần phản ứng sau đây: 0,5 µL mỗi loại môi (FIP/BIP/F3/B3) với nồng độ 0,4 µM; 7,5 µL Isothermal Master Mixes (Optigen, Anh); 1 µL DNA mẫu nồng độ 0,1 ng/µL và 2,5 µL nước cất dùng cho phản ứng PCR. Sau khi phản ứng hoàn thành, tiếp tục bổ sung HNB (hydroxyl-naphthol-blue) (Sigma-Aldrid, Mỹ) ở các nồng độ 20 µM, 40 µM, 80 µM, và 160 µM để xác định nồng độ thuốc nhuộm phù hợp cho việc phát hiện điện của gen *CryIAb* bằng mắt thường.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định nồng độ của môi

Sau khi sử dụng phần mềm Primer explorer để thiết kế LAMP môi cho gen *CryIAb*, kết quả thu được 4 bộ môi có các thông số kỹ thuật tốt nhất (Bảng 1). Qua sàng lọc ban đầu, bộ môi thứ 4 cho hiệu quả phản ứng tốt nhất và bộ môi này được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Trong phản ứng LAMP, việc tối ưu hóa nồng độ môi có vai trò rất quan trọng, các môi trong phản ứng LAMP không hoạt động riêng lẻ như phản ứng PCR mà chúng kết hợp với nhau để bắt cặp với DNA mục tiêu và khuếch đại tạo thành các bản sao của DNA. Vì vậy, việc xác định lượng môi bổ sung vào phản ứng hay tỷ lệ giữa các môi với nhau là quan trọng. Do đó, tiến hành khảo sát và chọn nồng độ tối ưu của các môi. Kết quả điện di được thể hiện ở Hình 1.



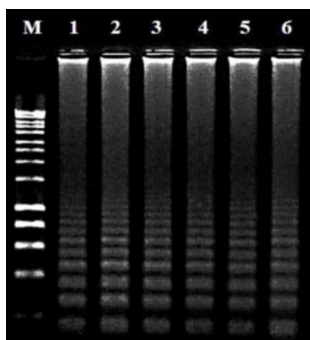
Hình 1. Kết quả khảo sát nồng độ 2 cặp môi F3/B3 và FIP/BIP cho gen *CryIAb* (13: Đối chứng âm)

Kết quả điện di sản phẩm phản ứng LAMP trong việc khảo sát nồng độ 2 cặp môi F3/B3, FIP/BIP cho thấy, tất cả các nghiệm thức đều có kết quả. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu về nồng độ của các môi trong kỹ thuật LAMP được công bố trước đây của Zhou và cộng sự [16]. Kết quả này cũng cho thấy, phản ứng LAMP có thể hoạt động tốt ở nồng độ thấp hơn

so với ở một số nghiên cứu gần đây [10, 17]. Với kết quả đạt được ở thí nghiệm này, nồng độ môi *FIP/BIP*: 0,4 μ M, *F3/B3*: 0,4 μ M (giếng số 6) được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Tối ưu nhiệt độ bắt cặp cho phản ứng LAMP

Sau khi xác định được nồng độ các cặp môi phù hợp, thí nghiệm tiếp theo được thực hiện để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ tới phản ứng LAMP. Kết quả cho điện di sản phẩm LAMP xuất hiện các băng vạch rõ và đều (Hình 2).

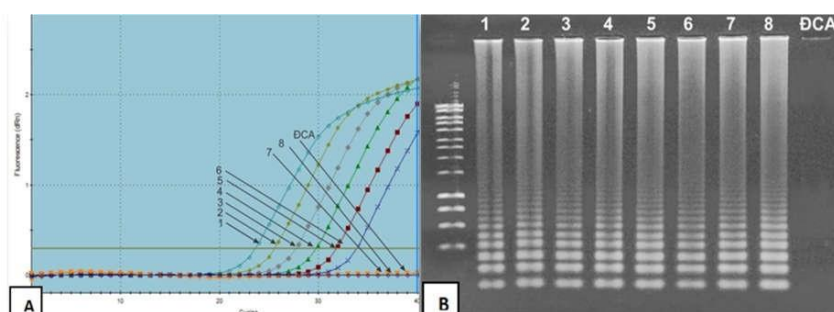


Hình 2. Kết quả khảo sát nhiệt độ phản ứng LAMP của bộ môi 4 (M: thang chuẩn DNA 1000 bp; từ 1 đến 6: nhiệt độ từ 60 °C đến 65 °C)

Sau khi thực hiện phản ứng LAMP với nhiệt độ dao động từ 60 °C đến 65 °C, các mẫu thử nghiệm đều xuất hiện các band vạch đặc trưng và không có sự khác nhau quá lớn giữa các nhiệt độ phản ứng. Có thể kết luận rằng nhiệt độ tối ưu để thực hiện phản ứng LAMP là khoảng nhiệt độ từ 60 °C đến 65 °C. Kết quả thu được có sự tương đồng khi so sánh với kết quả nghiên cứu trước của Zhen và cộng sự về khảo sát phản ứng LAMP với nhiệt độ tối ưu (61 °C, 63 °C, 65 °C) [17].

3.3. So sánh ngưỡng phát hiện của LAMP với Realtime PCR

Sau khi xác định được cặp môi phù hợp, thí nghiệm tiếp theo được tiến hành để so sánh ngưỡng phát hiện của phương pháp LAMP so với phương pháp Realtime PCR. Kết quả được thể hiện ở Hình 3.



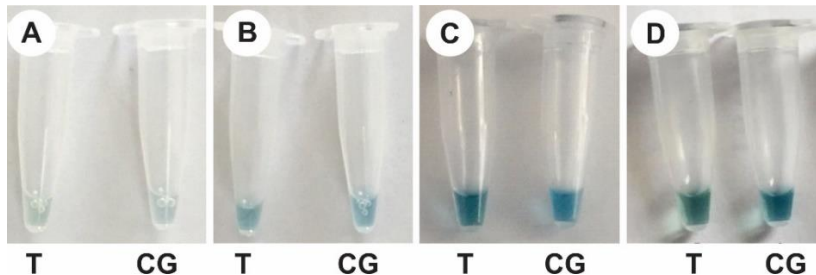
Hình 3. So sánh ngưỡng phát hiện bằng Realtime PCR (A) và LAMP (B) (Nồng độ DNA: 1: 400 ng/ μ L; 2: 100 ng/ μ L; 3: 25 ng/ μ L; 4: 6,25 ng/ μ L; 5: 1,56 ng/ μ L; 6: 0,4 ng/ μ L; 7: 0,1 ng/ μ L; 8: 0,025 ng/ μ L)

Kết quả điện di sản phẩm phản ứng LAMP cho thấy, phương pháp LAMP cho kết quả phản ứng từ mức độ pha loãng cao nhất (400 ng/ μ L) đến mức độ pha loãng thấp nhất (0,025 ng/ μ L). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Zahradnik và cộng sự khi sử dụng kỹ thuật LAMP để xác định ngô biến đổi gen thông qua sự hiện diện của promoter 35S [18]. Ngoài ra, nghiên cứu của Ghosh và cộng sự tại Ấn Độ cho thấy, LAMP có khả năng phát hiện gen mục tiêu ở

nằm bệnh ở mức 10 fg DNA trong một phản ứng [21]. Trong khi đó, ở phản ứng Realtime PCR, sản phẩm khuếch đại chỉ xuất hiện ở bậc pha loãng thứ 6 (0,4 ng/μL), ở các bậc pha loãng thấp hơn (6: 0,1 ng/μL và 6: 0,025 ng/μL) không thấy có sự xuất hiện của đường cong khuếch đại của sản phẩm mục tiêu. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đây của nhóm tác giả ở Iran khi sử dụng Realtime-PCR để phát hiện gen *cp4-epsps*, khi nhận thấy rằng giới hạn phát hiện của Realtime-PCR đối với gen mục tiêu ở mức 0,4 ng/μL [22]. Như vậy, đối với cùng lượng DNA mẫu, phản ứng LAMP có độ nhạy trong việc khuếch đại đoạn DNA đặc trưng tốt hơn phản ứng Realtime PCR. Qua thí nghiệm này có thể kết luận rằng phương pháp LAMP có độ nhạy cao hơn Realtime PCR ít nhất 16 lần. Ngoài ra, nghiên cứu trước đó của Nkouawa và cộng sự cũng đã khẳng định kỹ thuật LAMP có độ nhạy tốt hơn phương pháp PCR truyền thống [12]. Điều này có thể giúp cho phản ứng LAMP có thể được sử dụng đối với các mẫu phân tích có nồng độ DNA mục tiêu thấp.

3.4. Phát hiện trực tiếp sản phẩm LAMP

Với mục đích cuối cùng là có thể phát hiện ngô biến đổi gen qua quan sát trực tiếp bằng mắt thường, thuốc nhuộm HNB (hydroxyl-naphthol-blue, Sigma, Mỹ) được sử dụng để thay thế SYBR. Kết quả cho thấy ở các sản phẩm phản ứng có DNA của ngô biến đổi gen, sản phẩm phản ứng ở ngô chuyển gen hơi ngả sang màu xanh lục, trong khi đó ngô thường có màu xanh dương và được thể hiện như ở Hình 4. Sự khác biệt này tăng dần khi tăng nồng độ thuốc nhuộm và thể hiện rõ nhất ở nồng độ 80 mM. Khi tăng nồng độ thuốc nhuộm HNB lên 160 mM, việc phân biệt giữa 2 phản ứng không còn hiệu quả do màu sắc trở nên gần giống nhau. Trong khi đó, những nghiên cứu trước đây cho thấy nồng độ phù hợp để phân biệt rõ ràng các mẫu nằm ở mức cao hơn [19, 20].



Hình 4. Kết quả phát hiện ngô chuyển gen *CryIAb* trực tiếp bằng LAMP sử dụng thuốc nhuộm HNA ở các nồng độ 20 μM (A), 40 μM (B), 80 μM (C), và 160 μM (D). (T: ngô thường; CG: ngô chuyển gen).

Mặc dù còn hạn chế, kết quả ban đầu cho thấy khả năng sử dụng thuốc nhuộm HNB có khả năng phát hiện trực tiếp sản phẩm khuếch đại của kỹ thuật LAMP. Kết quả này có tiềm năng trong việc áp dụng trực tiếp ngoài thực tế vì không bị phụ thuộc vào các thiết bị phòng thí nghiệm như hệ thống điện di, hệ thống chụp gel. Ngoài ra, nó cũng giúp góp phần rút ngắn thời gian thực hiện thông qua việc giảm các bước điện di và chụp hình. Đây là một trong những ưu điểm rất lớn của kỹ thuật LAMP đã được đề cập ở các nghiên cứu trước.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu này đã hoàn thiện được quy trình phát hiện ngô biến đổi gen thông qua xác định sự có mặt của gen *CryIAb* bằng kỹ thuật LAMP với các thông số tối ưu: nồng độ, nhiệt độ và ngưỡng khuếch đại. Cuối cùng, khả năng phát hiện trực tiếp sản phẩm khuếch đại của LAMP được hoàn thành bằng cách sử dụng thuốc nhuộm HNB. Bên cạnh những kết quả nghiên cứu đã đạt được, cần có các nghiên cứu khác có thể thực hiện trong tương lai để góp phần hoàn thiện hơn bao gồm: chọn được thuốc nhuộm phù hợp và có độ phân biệt cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tạ Bá Hưng, Cao Minh Kiểm, Đặng Bảo Hà, Nguyễn Mạnh Quân, Nguyễn Phương Anh, Phùng Anh Tiến - Quản lý thực phẩm biến đổi gen: Kinh nghiệm của Mỹ, Liên minh Châu Âu và Trung Quốc, Cục Thông tin Khoa học và Công nghệ Quốc gia (2010) 9-12.
2. ISAAA - Pocket K No.16: Biotech Crop Highlights in 2018:
<https://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/16/>
3. Nguyễn Tiến Dũng - Chính thức công nhận 3 giống ngô biến đổi gen, Báo Công Thương, truy cập ngày 19/03/2015 tại <https://congthuong.vn/chinh-thuc-cong-nhan-3-giong-ngo-bien-doi-gen-48509.html>
4. Chen L., Guo J., Wang Q., Kai G., and Yang L. - Development of the visual loop-mediated isothermal amplification assays for seven genetically modified maize events and their application in practical samples analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59** (11) (2011) 5914-5918.
5. Trung tâm Thông tin và Phát triển Nông nghiệp Nông thôn - Trần ngập nông sản biến đổi gen, truy cập ngày 16/04/2010 tại http://agro.gov.vn/vn/tID17391_Tran-ngap-nong-san-bien-doi-gen.html.
6. Nguyễn Đình Hòa, Nguyễn Ngọc Sinh - Những vấn đề của sinh vật biến đổi gen - GMO, Hội bảo vệ thiên nhiên và môi trường Việt Nam, truy cập ngày 14/8/2012 tại <http://vacne.org.vn/nhung-van-de-cua-sinh-vat-bien-doi-gen-%E2%80%93-gmo/29453.html>.
7. Randhawa G.J., Firke P.K. - Detection of transgenes in genetically modified soybean and maize using polymerase chain reaction, *Indian Journal of Biotechnology* **5** (2006) 510-513.
8. Meric S., Cakir O., Turgut-Kara N., and Ari S. - Detection of genetically modified maize and soybean in feed samples, *Gentics and Molecular Research* **13** (1) (2014) 1160-1168.
9. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., and Hase T. - Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Research* **28** (12) (2000) e63.
10. Randhawa G.J., Singh M., Morisset D., Sood P., Zel J. - Loop-mediated isothermal amplification: rapid visual and realtime method for detection of genetically modified crops, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61** (47) (2013) 11338-11346.
11. Hoàng Phú Hiệp, Lê Quang Huân - Phát triển kỹ thuật LAMP cho việc phát hiện nhanh và chính xác *Escherichia coli* O157:H7, *Tạp chí Sinh học* **34** (3) (2012) 343-346.
12. Nkouawa A., Sako Y., Nakao M., Nakaya K., Ito A. - Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species, *Journal of Clinical Microbiology* **47** (1) (2009) 168-174.
13. Bùi Minh Trí, Bùi Cách Tuyến - Xây dựng quy trình chẩn đoán ngô có chuyển các gen kháng sâu (CryIA [b]) và gen tăng cường chuyển hóa đường (Invertase) bằng kỹ thuật PCR, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Nông Lâm nghiệp, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh*, Số **1** (2003) 3-7.
14. Xu W.T., Cao S., Xiaoyun H., Luo Y., Guo X., Yuan Y., and Huang K. - Safety assessment of Cry1Ab/Ac fusion protein, *Food and Chemical Toxicology* **47** (7) (2009) 1459-1465.

15. Rahman T., Chowdhury E., Mondol A., Hoque M., Nasiruddin K. - Detection of maize intrinsic and recombinant *CryIab* gene fragment in genetically modified maize, *Plant Tissue Culture and Biotechnology* **17** (1) (2007) 103-108.
16. Zhou X., Xing D., Tang Y., and Chen W.R. - PCR-free detection of genetically modified organisms using magnetic capture technology and fluorescence cross-correlation spectroscopy, *PLoS One* **4** (2009) e8074.
17. Zhen Z., Zhang M., Yu Y., Gao X., Zhu Y., Yan Y., Zhang R. - Establishment of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection method for genetically modified maize MON88017, *European Food Research and Technology* **242** (10) (2016) 1787-1793.
18. Zahradnik C., Kolm C., Martzy R., Mach R.L., Krska R., Farnleitner A.H., Brunner K. - Detection of the 35S promoter in transgenic maize via various isothermal amplification techniques: a practical approach, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406** (27) (2014) 6835-6842.
19. Nair S., Manimekalai R., Raj P.G., Hegde V. - Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of coconut root wilt disease and arecanut yellow leaf disease phyoplasma, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **32** (7) (2016) 108.
20. Goto M., Honda E., Ogura A., Nomoto A., and Hanaki K.I. - Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxyl naphthol blue, *Biotechniques* **46** (3) (2009) 167-172.
21. Ghosh R., Nagavardhini A., Sengupta A., and Sharma M. -Development of loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*-wilt pathogen of chickpea, *BMC Research Notes* **8** (40) (2015) 1-10.
22. Khosravi S., Tohidfar M., and Koobaz P. -Development of Gene-Specific Realtime-PCR screening method for detection of *cp4-epsps* gene in GM crops, *BioRxiv* (2017), <https://doi.org/10.1101/155127>.
23. VFC - Ba giống ngô biến đổi gen đầu tiên tại Việt Nam, truy cập ngày 06/04/2015 tại <https://www.vfc.com.vn/vfc/tin-chi-tiet/vi/ba-ging-ngo-bin-i-gen-u-tien-ti-vit-nam>.

ABSTRACT

DEVELOPING METHOD FOR QUICK IDENTIFICATION OF *CryIab*- GENETICALLY MODIFIED MAIZE BASED ON LAMP TECHNIQUE

Ho Viet The^{1,*}, Tran Thi My Hanh², Nguyen Thi An¹,
Ngô Thị Kim Anh¹, Nguyễn Thị Hương¹, Lê Ngọc Giàu¹

¹*Ho Chi Minh City University of Food Industry*

²*Ho Chi Minh City University of Technology (HUTECH)*

*Email: thehv@hufi.edu.vn

Vietnam has allowed the cultivation of genetically modified maize containing *CryIab* gene to increase resistance to stem borer. Despite many advantages, there are still many debates about the safety of this crop so there are many methods used to detect them. However, the current methods rely heavily on laboratory equipment and are difficult to perform in the field. Recently, the LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) DNA amplification technique has been used to quickly detect human and animal disease objects, with high

accuracy and less requirements for expensive equipment. Within the scope of this study, we have successfully developed a process to detect genetically modified maize using LAMP technology. The results of the study have optimized parameters for LAMP reaction including concentration of FIP/BIP and F3/B3 of 0.4 μ M with primer pairing temperature at 60 °C. The authors also found that the sensitivity of LAMP reaction was better than that of Realtime PCR in studied range. When using HNB dye at a concentration of 80 nM, it was possible to distinguish between the non-transgenic and *Cry1ab* gene containing maize. This result is a potential for designing KIT to detect genetically modified corn in the field.

Keywords: Corn, *Cry1Ab*, GMO, LAMP, Realtime PCR.