

Xây dựng phương pháp phát hiện nhanh tại thực địa giống lúa Khang Dân 18 chỉnh sửa gen bằng kỹ thuật RPA

Nguyễn Bá Nhiệt¹, Trần Hồng Diễm², Võ Ngọc Trúc Giang¹, Phùng Thị Thu Hương², Bùi Lê Minh¹

¹Ngành Công nghệ sinh học, Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

²Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

*nbnhiet@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Nghiên cứu được thực hiện nhằm ứng dụng kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt để phát hiện nhanh giống lúa Khang Dân 18 chỉnh sửa gen trực tiếp từ mẫu lá, từ đó phát triển thành bộ kit có thể sử dụng tại thực địa. Giống lúa Khang Dân 18 đột biến và mất đoạn gen *OsDSG1* được xử lý nhanh bằng các phương pháp khác nhau để thu nhận DNA nhằm sử dụng cho phản ứng RPA với cặp mồi đặc hiệu. Phương pháp xử lý bằng SDS kết hợp với tinh sạch nhanh bằng hỗn hợp phenol/chloroform/isoamyl alcohol theo tỉ lệ 25:24:1 phù hợp để thu nhận DNA cho phản ứng RPA. Việc tối ưu quy trình xử lý mẫu cho thấy, khi ủ mẫu lá lúa đã nghiền nhỏ với dung dịch SDS nồng độ 20 % ở 65 °C trong 15 phút, sau tinh sạch nhanh có thể thực hiện phản ứng RPA ở nhiệt độ cố định 37 °C trong 20 phút. Phản ứng RPA sau khi thực hiện, có thể đọc kết quả trực tiếp bằng mắt thường thông qua phản ứng màu với Erichrome Black T. Nghiên cứu tạo tiền đề để có thể phát triển giống lúa đã chỉnh sửa gen, có thể thực hiện trực tiếp ngoài đồng ruộng.

© 2025 Journal of Science and Technology - NTTU

Nhận 06/01/2025
Được duyệt 18/03/2025
Công bố 28/04/2025

Từ khóa

biến đổi gen, chỉnh sửa gen, Khang Dân 18, phát hiện nhanh, RPA

1 Đặt vấn đề

Lúa là một trong số các cây lương thực chủ lực trên thế giới, với nhu cầu tiêu thụ làm nguồn thực phẩm chính tương đối cao. Các phương pháp cải tiến giống cây trồng truyền thống là chưa đủ để có thể đáp ứng được nhu cầu với sự tăng trưởng của toàn cầu, do đó nhiều giống lúa GE (Genetically Engineered – biến đổi gen) đã được nghiên cứu và phát triển. Từ giống lúa đầu tiên

được nghiên cứu vào năm 1988 cho đến giống lúa Golden Rice lần đầu được phát triển vào năm 2000 với ưu điểm giàu β -carotene giúp bổ sung vitamin A cho cơ thể, nhiều giống lúa gạo GE khác cũng được nghiên cứu và phổ biến trên thị trường nông nghiệp cây lương thực [1, 2]. Một số dòng lúa biến đổi gen khác được nghiên cứu cho thấy hiệu quả và đã được cấp phép sử

dụng rộng rãi như lúa LLRICE62 mang gen kháng thuốc diệt cỏ glufosinate [3].

Mặc dù vẫn còn tranh cãi về tác động của sinh vật biến đổi gen (Genetically Modified Organism – GMO) đối với sức khỏe, việc kiểm soát và xác định cây trồng GMO vẫn là cần thiết. Ngoài ra, xu hướng tiêu dùng thực phẩm hữu cơ cũng làm gia tăng nhu cầu xác định thực phẩm không có nguồn gốc từ GMO. Phân tích di truyền có thể giúp phát hiện sự xâm nhiễm của các dòng biến đổi gen vào cây trồng không biến đổi gen, cũng như nguy cơ phát tán thực vật GE ra môi trường mà không có sự kiểm soát [4]. Hiện nay, các phương pháp như khuếch đại trình tự, giải trình tự và lai phân tử cho phép sàng lọc và phát hiện chính xác các trình tự đặc trưng của GMO. Trong các phương pháp trên, kỹ thuật khuếch đại nucleic acid đẳng nhiệt (isothermal nucleic acid amplification technique – iNAAT) được đánh giá là phương pháp tiềm năng được sử dụng để xác định trực tiếp trong điều kiện thực địa, đặc biệt một trong những kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt đang được quan tâm đó là kỹ thuật Recombinase polymerase amplification (RPA)[5]. Kỹ thuật khuếch đại DNA đẳng nhiệt RPA chỉ cần 2 trình tự mỗi đặc hiệu tương tự như phản ứng PCR nên khả năng thiết kế cặp mồi cho phản ứng RPA đơn giản. Nhiệt độ hoạt động của RPA là (35-40) °C, đây là khoảng nhiệt độ gần với nhiệt độ cơ thể, nên trong điều kiện thực địa, người thực hiện phản ứng chỉ cần giữ ống phản ứng trong bàn tay là phản ứng đã có thể xảy ra. Điều này giúp cho việc thực hiện trong thực tế đơn giản, khả thi hơn và nhanh hơn, không cần sử dụng đến máy móc phức tạp hoặc đòi hỏi thực hiện tại phòng thí nghiệm chuyên biệt.

Năm 2024, giống lúa Khang Dân 18 (KD18) được chỉnh sửa gen bằng kỹ thuật CRISPR/Cas9 nhằm bất

hoạt gen *OsDSG1*, giúp tăng khả năng chịu mặn [6]. Với tiềm năng ứng dụng cao, giống lúa này có khả năng được đưa vào thị trường. Tuy nhiên, do Việt Nam là quốc gia xuất khẩu gạo, việc kiểm soát các giống lúa chỉnh sửa gen cần được thực hiện chặt chẽ và trên quy mô lớn. Do đó, phát triển một phương pháp phát hiện nhanh giống lúa KD18 mang đột biến *OsDSG1* là cần thiết, tạo tiền đề cho quá trình thương mại hóa. Ngoài ra, việc xây dựng phương pháp phát hiện nhanh còn mở ra khả năng phát triển bộ kit kiểm tra nhanh, giúp đơn vị cung cấp giống xác thực nguồn gốc mà không cần quy trình kiểm tra phức tạp. Bên cạnh đó, phương pháp dựa trên kỹ thuật RPA có thể hỗ trợ sàng lọc hiệu quả các cá thể mang đột biến ngay từ giai đoạn đầu của cây, góp phần tối ưu hóa quá trình nhân giống. Vì vậy, nghiên cứu phát triển phương pháp phát hiện đột biến *OsDSG1* trên giống lúa KD18 là cần thiết, đáp ứng mục tiêu thương mại hóa giống lúa chỉnh sửa gen có khả năng chịu mặn.

2 Phương pháp nghiên cứu

2.1 Thiết kế phản ứng RPA để phát hiện giống lúa KD18 chỉnh sửa gen

Mẫu được sử dụng là giống lúa chỉnh sửa gen trên nền giống KD18 do Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST) cung cấp (ký hiệu D3.4 cho giống lúa mang đột biến lớn mất đoạn 134 nt) [6]. Mồi RPA được thiết kế sao cho một trong hai mồi xuôi hoặc ngược bắt cặp với vùng trình tự liên tục mới được tạo thành sau quá trình chỉnh sửa DNA hệ gen giống lúa KD18. Với cách thiết kế này, chỉ khi có sự hiện diện của đột biến mất đoạn, cả hai đoạn mồi RPA mới có khả năng bắt cặp vào trình tự đích và tạo sản phẩm khuếch đại. Để tránh trường hợp âm tính giả, một bộ

mồi universal cho lúa được sử dụng trong phản ứng đối chứng dương.

Phản ứng RPA: tổng phản ứng 15 μL với các thành phần theo bộ kit của TwistDx gồm 0,75 μL primer (mỗi loại nồng độ 10 μM), 7,5 μL 2X Reaction Buffer, 1,5 μL 10X Basic E-mix, 2 μL dNTPs 10 mM, 0,75 μL 20X Core Reaction Mix, 0,75 μL MgOAc 280 mM và 1 μL DNA tinh sạch. Tiến hành chạy phản ứng RPA ở nhiệt độ trung bình 39 $^{\circ}\text{C}$ trong 40 phút. Lưu ý trong lúc ủ, ở 4 phút ủ đầu tiên lấy các mẫu ra vortex nhẹ rồi ủ tiếp để tối ưu hóa quá trình phản ứng. Đọc kết quả của các phản ứng bằng hình ảnh gel điện di trên agarose 2 % và màu nhuộm EBT ở nồng độ tham khảo là 0,08 mM [7]. Tối ưu điều kiện phản ứng RPA bằng 2 khảo sát điều kiện nhiệt độ và thời gian:

- **Khảo sát nhiệt độ:** sau khi bổ sung phản ứng RPA cho hai mẫu, tiến hành ủ theo dãy nhiệt độ từ 35 $^{\circ}\text{C}$ đến 45 $^{\circ}\text{C}$ (cách nhau 1 $^{\circ}\text{C}$) trong 60 phút bằng bể ủ nhiệt. Sau đó phân tích kết quả bằng điện di trên gel agarose và màu nhuộm EBT.

- **Khảo sát thời gian:** chọn ra nhiệt độ tối ưu của phản ứng rồi tiếp tục khảo sát với các mốc thời gian từ 5 phút đến 60 phút (cách nhau 5 phút). Sau đó cũng tiến hành phân tích kết quả bằng điện di trên gel agarose và màu nhuộm EBT.

2.2 Khảo sát và đánh giá một số phương pháp xử lý mẫu lá để thu nhận DNA thực hiện phản ứng RPA trên mẫu lá lúa

Trong nghiên cứu này, mẫu lá lúa Khang Dân đột biến D3.4 được xử lý nhanh bằng 3 phương pháp như sau:

- **Phương pháp sử dụng SDS:** khoảng 100 mg mẫu lá lúa được nghiền nhỏ trong eppendorf 1,5 mL có sẵn 200 μL dung dịch DNA extraction buffer (500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH = 7,5; 50 mM EDTA, pH = 7,5). Sau khi mẫu lá được nghiền nhuyễn, bổ sung

vào dịch nghiền mẫu 20 μL dung dịch SDS 20 % và vortex trong 30 giây. Ủ mẫu ở 65 $^{\circ}\text{C}$ trong 10 phút. Tiếp tục bổ sung 220 μL dung dịch phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) vào mẫu, vortex trong 30 giây, và ly tâm ống mẫu ở tốc độ 10 000 rpm trong 3 phút. Pha loãng dịch nổi 5 lần với nước cất tiệt trùng và sử dụng 1 μL dịch nổi đã pha loãng để thực hiện phản ứng RPA [8].

- **Phương pháp sử dụng NaOH:** khoảng 100 mg mẫu lá lúa được nghiền nhỏ trong eppendorf 1,5 mL có sẵn 1 mL dung dịch NaOH 0,5 N. Sau khi mẫu lá được nghiền nhuyễn, hút 5 μL dịch nghiền mẫu lá vào eppendorf 1,5 mL có sẵn 495 μL dung dịch 100 mM Tris, pH = 7,5. Trộn đều ống và sử dụng 1 μL dịch nghiền lá đã pha loãng để thực hiện phản ứng RPA [9].

- **Phương pháp sử dụng nước:** khoảng 100 mg mẫu lá lúa được nghiền nhỏ trong eppendorf 1,5 mL có sẵn 1 mL nước cất vô trùng. Sau khi mẫu lá được nghiền nhuyễn, sử dụng 1 μL dịch nghiền mẫu lá để thực hiện phản ứng RPA [10].

2.3 Tối ưu quy trình phát hiện giống lúa KD18 chính sửa gen bằng phản ứng RPA trên mẫu lá lúa

Khảo sát nhằm tối ưu quy trình xử lý mẫu lá lúa nhanh bằng phương pháp SDS với hai yếu tố sau:

- **Khảo sát thời gian ủ với dung dịch SDS:** mẫu lá lúa xử lý bằng phương pháp SDS được ủ ở 65 $^{\circ}\text{C}$ với các mốc thời gian từ 5 phút đến 30 phút (mỗi mốc cách nhau 5 phút). Kết quả khảo sát được so sánh và phân tích bằng điện di gel agarose và chất chỉ thị màu EBT.

- **Khảo sát nồng độ SDS dùng để ủ:** mẫu lá lúa được nghiền nhuyễn trong DNA extraction buffer theo tỉ lệ 100 mg lá / 200 μL buffer được hút chia đều trong mỗi eppendorf 200 μL dịch mẫu lá đã nghiền, sau đó bổ sung 20 μL dung dịch SDS ở các nồng độ từ 5 % đến 25 % (mỗi mốc cách nhau 5 %) vào mỗi ống, vortex

trong 30 giây và ủ ở 65 °C trong thời gian tối ưu đã khảo sát trước đó.

Ngoài ra, nhằm có thể đánh giá được độ nhạy phản ứng đối với phương pháp xử lý mẫu lá lúa nhanh đã được tối ưu, tiến hành khảo sát ngưỡng giới hạn phát hiện (LoD) của phản ứng RPA đối với phương pháp xử lý mẫu lá lúa nhanh tiến hành pha loãng dịch mẫu lá đã xử lý với nước cất tiệt trùng ở các độ pha loãng khác nhau để thực hiện phản ứng RPA. Sử dụng 1 μ L dịch xử lý ở độ pha loãng 1, 1/5, 10^{-1} , 10^{-2} và 10^{-3} cho mỗi phản ứng RPA. Kiểm tra bằng điện di gel agarose và chất chỉ thị màu EBT.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Thiết kế phản ứng RPA để phát hiện giống lúa KD18 chỉnh sửa gen

Thiết kế 2 bộ mồi đặc hiệu: bộ mồi ký hiệu FR-D3.4 đặc hiệu cho mẫu lúa D3.4 và bộ mồi ký hiệu FR-KD18 là cặp mồi universal để làm chứng nội cho mẫu lúa KD18. Do mồi F-D3.4 bắt cặp với đoạn DNA liên tục sau chỉnh sửa trên giống lúa D3.4, nên mồi này không thể bắt cặp trên vùng gen *OsDSG1* của giống lúa gốc KD18.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi sử dụng cho quy trình xét nghiệm giống lúa chỉnh sửa gen

STT	Tên mồi	Trình tự (5' – 3')	Kích thước sản phẩm
1	FR-D3.4	F-D3.4: GTATTCTACAGTTTGC GCCCCGGGAGCA	D3.4: 188 bp
		R-D3.4: GCATATGCATCACAGGTTGCCTCCAGAATA	
2	FR-KD18	F-KD18: CGTCCTCAGGGATTCCATTTTTGTGTAC	D3.4: 346 bp
		R-KD18: TATGCATCACAGGTTGCCTCCAGAATAA	KD18: 477 bp

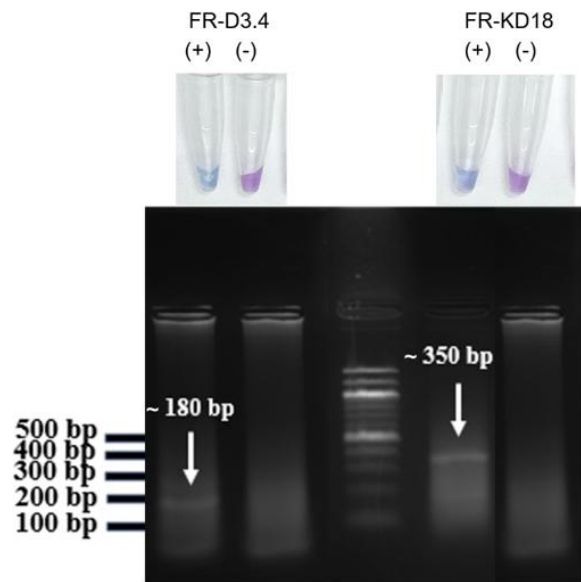


Hình 1 Trình tự vùng gen *OsDSG1* của giống lúa chỉnh sửa gen D3.4 và vị trí bắt cặp của mồi đã thiết kế trên vùng gen



Hình 2 Trình tự vùng gen OsDSG1 của giống lúa KD18 và vị trí bắt cặp của mỗi đã thiết kế trên vùng gen (đoạn gen (-D3.4) là DNA bị mất đoạn ở giống lúa chỉnh sửa gen D3.4)

Sau khi thực hiện phản ứng RPA để kiểm tra phản ứng của 2 cặp mồi cho mẫu lúa D3.4 ở nhiệt độ 39 °C trong 40 phút, tiến hành đọc kết quả bằng cách quan sát sự thay đổi màu thuốc nhuộm EBT 0,08 mM. Kết quả thấy được mức độ chuyển đổi màu sắc giữa các phản ứng âm tính và dương tính. Đối với kết quả điện di trên gel agarose, cho thấy vị trí sản phẩm RPA trên gel điện di tương ứng với kích thước sản phẩm khuếch đại của giống lúa D3.4 trên cả hai cặp mồi (Hình 1). Tuy nhiên, sản phẩm khuếch đại được thể hiện trên gel không rõ nét, kết quả điện di bị vạch mờ kéo dài khiến kết quả chưa được rõ ràng. Điều này có thể là do nhiệt độ phản ứng RPA được thiết lập ở 39 °C chưa phải là nhiệt độ tối ưu của phản ứng RPA, điều đó dẫn đến hiệu suất khuếch đại không đạt mức tối đa, làm giảm cường độ của các băng đặc hiệu trên gel điện di. Để cải thiện kết quả, cần tiếp tục tối ưu các điều kiện nhiệt độ và thời gian phù hợp nhằm đảm bảo phản ứng RPA diễn ra hiệu quả và rõ ràng hơn.

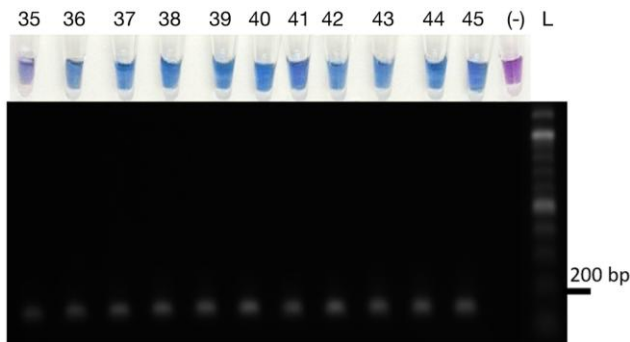


Hình 3 Hình ảnh kết quả điện di trên gel agarose và kết quả chỉ thị màu của phản ứng RPA ở nhiệt độ 39 °C 40 phút của 2 cặp mồi cho mẫu DNA giống lúa D3.4 (Thang chuẩn DNA 100 bp, (-): chứng âm không có DNA; (+): mẫu có DNA lúa D3.4)

Ở kết quả tối ưu nhiệt độ phản ứng, cặp mồi FR-D3.4 cho phản ứng màu EBT rõ ràng từ 37 °C trở lên, còn cặp mồi FR-KD18 cũng có phản ứng rõ ràng ở tại 37 °C. Do đó, nhiệt độ tối ưu cho phản ứng RPA của 2

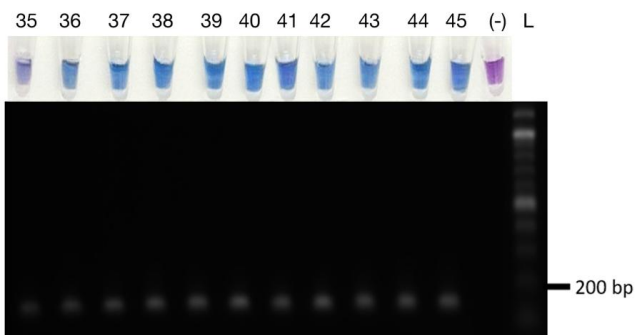
cặp mồi là 37 °C. Đối với kết quả tối ưu thời gian phản ứng, cặp mồi FR-D3.4 cho kết quả rõ ràng từ 15 phút trở lên, còn cặp mồi FR-KD18, thời gian tối ưu vào khoảng 20 phút trở lên. Do vậy, để tối ưu hơn nữa các

mốc thời gian lại với nhau để thực hiện các thí nghiệm kế tiếp một cách đơn giản và rút gọn thời lượng hơn, mốc thời gian 20 phút được lựa chọn là thời gian phản ứng RPA tối ưu cho cả hai cặp mồi.



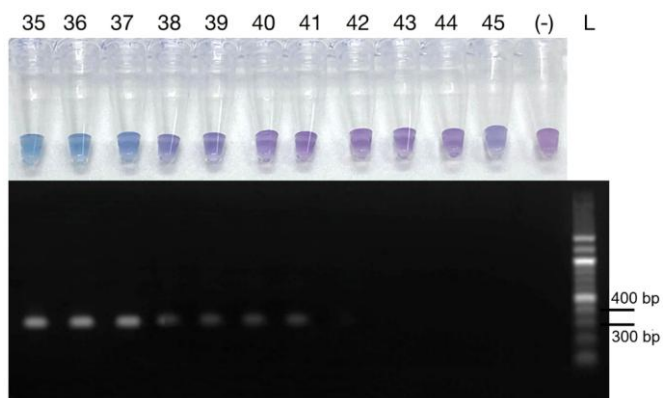
Hình 4 Hình ảnh kết quả điện di trên gel agarose và chỉ thị màu EBT của phản ứng RPA khảo sát nhiệt độ tối ưu từ 35 °C đến 45 °C trong 60 phút cho mẫu D3.4 với cặp mồi FR-D3.4.

(L: thang chuẩn DNA 100 bp; (-): chứng âm)

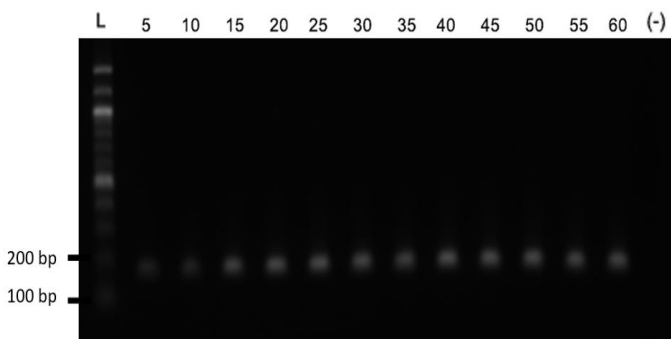


Hình 6 Hình ảnh kết quả điện di trên gel agarose và chỉ thị màu EBT của phản ứng RPA khảo sát nhiệt độ tối ưu từ 35 °C đến 45 °C trong 60 phút cho mẫu D3.4 với cặp mồi FR-D3.4.

(L: thang chuẩn DNA 100 bp; (-): chứng âm)

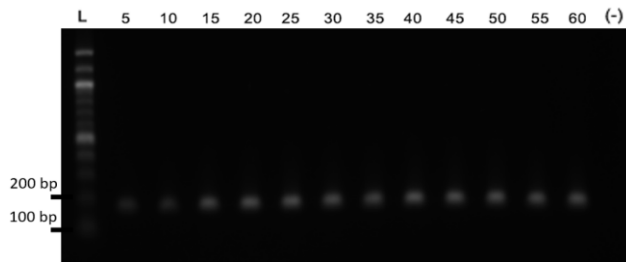


Hình 5. Kết quả nhuộm màu EBT và điện di trên gel agarose của phản ứng RPA khảo sát nhiệt độ tối ưu từ 35 °C đến 45 °C trong 60 phút cho 2 mẫu D13.2 và D3.4 với cặp mồi FR-KD18 cho mẫu DNA giống lúa D3.4. (L: thang chuẩn DNA 100 bp; (-): chứng âm)



Hình 7 Kết quả nhuộm màu EBT và điện di trên gel agarose của phản ứng RPA khảo sát nhiệt độ tối ưu từ 35 °C đến 45 °C trong 60 phút cho 2 mẫu D13.2 và D3.4 với cặp mồi FR-KD18 cho mẫu DNA giống lúa D3.4.

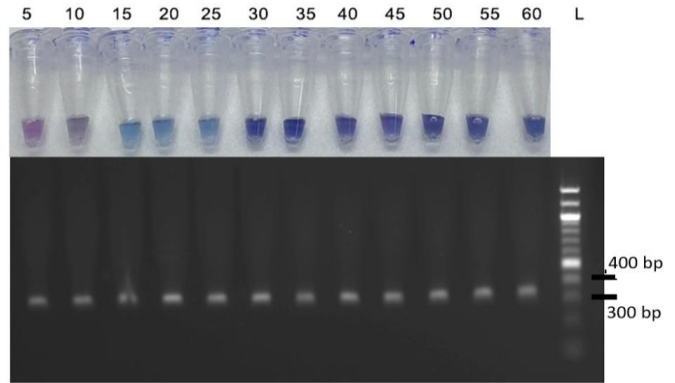
(L: thang chuẩn DNA 100 bp; (-): chứng âm)



Hình 8 Kết quả điện di trên gel agarose của phản ứng RPA khảo sát thời gian tối ưu từ 5 phút đến 60 phút (cách nhau 5 phút) ở nhiệt độ 37 °C cho mẫu D3.4 với cặp môi FR-D3.4

(L: thang chuẩn DNA 100 bp; (-): chứng âm)

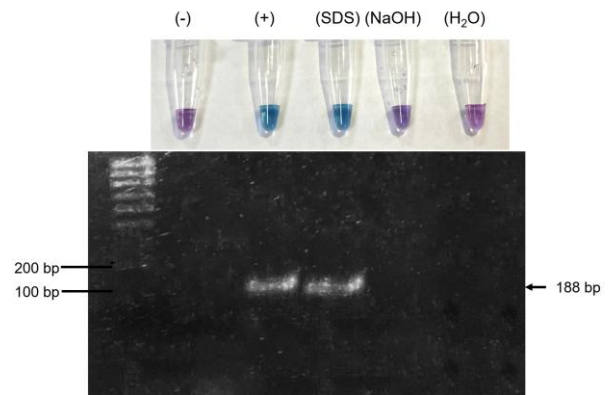
3.2 Khảo sát phương pháp xử lý mẫu lá lúa nhanh để thu nhận DNA thực hiện phản ứng RPA trên lá lúa Sau khi đã xác định cặp môi đã thiết kế phù hợp để phát hiện giống lúa D3.4 bằng phương pháp RPA cũng như tối ưu các điều kiện phản ứng, tiến hành khảo sát các phương pháp xử lý mẫu lá lúa nhanh nhằm mục đích thu nhận DNA cho phản ứng RPA. Kết quả điện di và phản ứng màu EBT cho thấy chỉ có phương pháp sử dụng chất hoạt động bề mặt SDS cho kết quả dương tính với phản ứng RPA phát hiện lúa biến đổi gen (Hình 2). Điều này cũng phù hợp đối với nghiên cứu khi sử dụng phương pháp SDS để tách chiết DNA trong lá của nhiều loài thực vật, trong đó có cả lá lúa [8]. Phương pháp sử dụng NaOH mặc dù được nhiều nghiên cứu tham khảo để sử dụng như một phương pháp tách chiết nhanh DNA [9], tuy nhiên phương pháp này khi thực hiện với mẫu lá lúa lại cho kết quả âm tính. Điều này có thể là do lá lúa tương đối dai và khó có thể nghiền nhuyễn được, làm giảm hiệu quả của phương pháp. Đối với phương pháp nghiền trực tiếp mẫu lá với nước cũng cho kết quả không phát hiện được, điều này là do phương pháp được tham khảo trong nghiên cứu ở tài liệu tham khảo số [10], trong đó nghiên cứu này sử



Hình 9 Hình ảnh đọc kết quả bằng màu EBT và điện di trên gel agarose của phản ứng RPA khảo sát thời gian tối ưu từ 5 phút đến 60 phút (cách nhau 5 phút) ở nhiệt độ 37 °C cho mẫu D3.4 với cặp môi FR-KD18

(L: thang chuẩn DNA 100 bp; (-): chứng âm)

dụng mẫu lá đã được đông khô. Việc sử dụng mẫu lá tươi trực tiếp và không sử dụng hóa chất để phá màng tế bào khiến cho mẫu lá không thu nhận được DNA trong tế bào. Từ kết quả trên, có thể thấy phương pháp sử dụng SDS để thu nhận DNA từ mẫu lá là một phương pháp phù hợp để xử lý mẫu cho mục đích thực hiện phản ứng RPA.

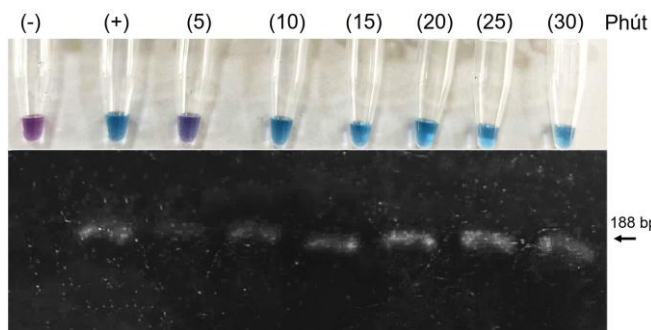


Hình 10 Hình ảnh đọc kết quả bằng màu EBT và điện di gel agarose khảo sát phương pháp tách mẫu lá lúa nhanh.

(Thang chuẩn 100 bp; (-): Chứng âm không có DNA; (+): Phản ứng RPA với mẫu DNA D3.4 và cặp môi FR-D3.4; Mẫu lá D3.4 được xử lý bằng các phương pháp khác nhau và cho phản ứng RPA với cặp môi FR-D3.4, phương pháp được sử dụng để xử lý nhanh bao gồm xử lý với SDS (SDS), xử lý với NaOH (NaOH) và chỉ nghiền với nước (H₂O)

3.3 Tối ưu quy trình phát hiện giống lúa KD18 chính sửa gen bằng phản ứng RPA trên mẫu lá lúa

Để tối ưu về thời gian cũng như hiệu quả phản ứng, các điều kiện trong quy trình xử lý mẫu như thời gian ủ với SDS và nồng độ SDS được khảo sát và đánh giá. Đối với kết quả khảo sát thời gian ủ mẫu nghiền lá với SDS, ủ ở nhiệt độ 65 °C trong khoảng thời gian tối thiểu 15 phút cho kết quả điện di cũng như phát hiện màu rõ

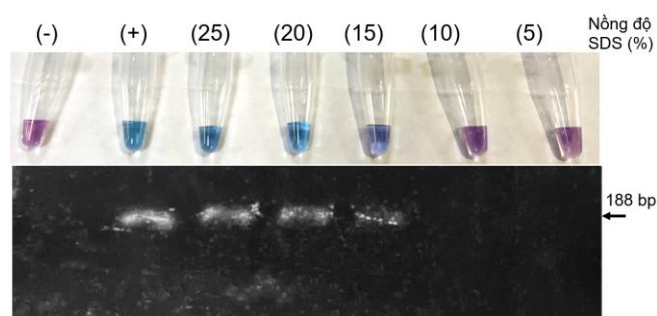


Hình 11 Hình ảnh đọc kết quả bằng màu EBT và điện di agarose khảo sát thời gian ủ với SDS để xử lý mẫu lá lúa D3.4 cho phản ứng RPA với cặp mồi FR-D3.4

((-): chứng âm không có DNA; (+): phản ứng RPA với mẫu DNA D3.4 và cặp mồi FR-D3.4; Thời gian ủ với SDS được khảo sát trong phương pháp xử lý mẫu lá lúa D3.4 từ 5 phút đến 30 phút, sau đó dùng dịch xử lý mẫu lá để thực hiện phản ứng RPA với cặp mồi FR-D3.4)

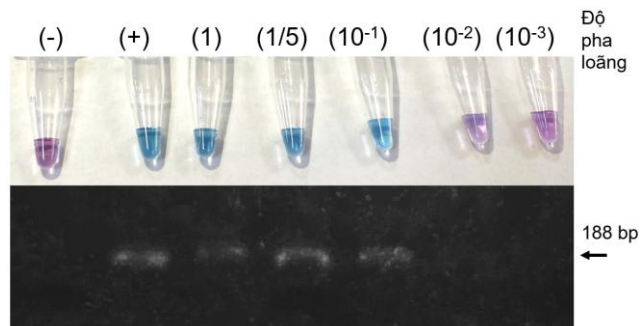
Việc xác định ngưỡng giới hạn phát hiện của phương pháp xử lý mẫu nhanh giúp đưa ra được mức độ pha loãng dịch xử lý mẫu phù hợp trước khi đưa vào phản ứng RPA. Tương tự các thí nghiệm trước đó, kết quả điện di của sản phẩm RPA và phản ứng với chất chỉ thị màu EBT được ghi nhận tương tự với nhau. Trong đó, cặp mồi phát hiện giống lúa biến đổi gen D3.4 có thể phát hiện được dịch xử lý mẫu lá lúa theo phương pháp SDS ở độ pha loãng nhỏ nhất là 10^{-1} (Hình 5). Điều này cho thấy kỹ thuật RPA phù hợp để phát hiện mẫu lá từ cây trồng biến đổi gen được xử lý nhanh bằng phương pháp SDS với độ pha loãng tối đa là 10 lần theo phương pháp đã tối ưu.

ràng và ổn định nhất (Hình 3). Đối với kết quả khảo sát nồng độ SDS, sử dụng SDS nồng độ 15 % đã có thể cho kết quả dương tính (Hình 4). Tuy nhiên, ở nồng độ SDS 15 % kết quả vạch tương đối mờ hơn so với sử dụng nồng độ SDS 25 % và 20 %, kết hợp với chỉ thị màu EBT cho thấy kết quả chưa ổn định. Do đó, sử dụng SDS ở nồng độ 20 % cho kết quả phù hợp và tiết kiệm nhất trong các nồng độ đã khảo sát.



Hình 12 Hình ảnh đọc kết quả bằng màu EBT và điện di agarose khảo sát nồng độ SDS sử dụng để xử lý mẫu lá lúa D3.4 cho phản ứng RPA với cặp mồi FR-D3.4

((-): chứng âm không có DNA; (+): phản ứng RPA với mẫu DNA D3.4 và cặp mồi FR-D3.4; Nồng độ SDS được khảo sát trong phương pháp xử lý mẫu lá lúa D3.4 từ 5 % đến 25 %, sau đó dùng dịch xử lý mẫu lá để thực hiện phản ứng RPA với cặp mồi FR-D3.4)



Hình 13 Hình ảnh kết quả màu EBT và điện di agarose khảo sát LoD của phương pháp RPA đối với phương pháp xử lý nhanh mẫu lá lúa D3.4

((-): chứng âm không có DNA; (+): phản ứng RPA với mẫu DNA D3.4 và cặp mồi FR-D3.4; Dịch xử lý mẫu lá lúa D3.4 được pha loãng ở nhiều mức độ, phản ứng RPA với cặp mồi

FR-D3.4)

4 Kết luận và đề xuất

Nghiên cứu này đã xây dựng thành công quy trình phát hiện giống lúa KD18 chỉnh sửa gen bằng kỹ thuật RPA, kết hợp với phương pháp xử lý mẫu lá nhanh bằng SDS, phù hợp để áp dụng ngoài thực địa.

Nghiên cứu đã tối ưu điều kiện phản ứng RPA, xác định nhiệt độ 37 °C trong 20 phút là điều kiện tối ưu cho cặp mồi đặc hiệu trên giống lúa chỉnh sửa gen D3.4. Việc sử dụng chỉ thị màu EBT giúp đọc kết quả bằng mắt thường, giảm yêu cầu về thiết bị chuyên dụng. Tuy nhiên, sự khác biệt màu sắc giữa phản ứng dương tính và âm tính chưa đủ rõ ràng trong một số trường hợp, gợi ý tiềm năng sử dụng các chất chỉ thị màu khác như cresol red hoặc hydroxynaphthol blue để cải thiện độ tương phản [11].

Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng xây dựng quy trình xử lý mẫu lá nhanh bằng SDS kết hợp với tinh sạch nhanh bằng phenol/chloroform/isoamyl alcohol, giúp thu

nhận DNA phù hợp cho phản ứng RPA. Quy trình này đơn giản, thực hiện trong thời gian ngắn, phù hợp với phân tích số lượng lớn mẫu mà không cần các bước tinh sạch phức tạp hoặc bộ kit thương mại. Điều kiện tối ưu để xử lý mẫu là ủ với dung dịch SDS 20 % trong 15 phút ở 65 °C, đảm bảo kết quả ổn định trên điện di và phản ứng màu EBT.

Kết quả nghiên cứu cung cấp quy trình phát hiện nhanh giống lúa chỉnh sửa gen từ xử lý mẫu đến thực hiện phản ứng RPA, góp phần hỗ trợ kiểm nghiệm và định danh dòng lúa chỉnh sửa gen khi thương mại hóa. Nghiên cứu này cũng mở ra hướng phát triển bộ kit phát hiện nhanh cây trồng biến đổi gen, phục vụ ứng dụng thực địa trong tương lai.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam. Mã số đề tài: 2024.01.165.

Tài liệu tham khảo

1. Toriyama, K., et al. (1988). *Transgenic Rice Plants after Direct Gene Transfer into Protoplasts*. *Bio/technology*, 6(9): p. 1072-1074.
2. Ye, X., et al. (2000). Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287(5451): p. 303-305.
3. Oberdoerfer, R.B., et al. (2005). Rice (*Oryza sativa* L.) containing the bar gene is compositionally equivalent to the nontransgenic counterpart. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5): p. 1457-1465.
4. Price, B., & Cotter, J. (2014). The GM Contamination Register: a review of recorded contamination incidents associated with genetically modified organisms (GMOs), 1997-2013. *International Journal of Food Contamination*, 1, 1-13.
5. Lobato, I.M. and C.K. O'Sullivan. (2018). Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *Trends Analyt Chem*, 98: p. 19-35.
6. Ly Linh Khanh, et al. (2024). CRISPR/Cas9 targeted mutations of OsDSG1 gene enhanced salt tolerance in rice. *Functional & Integrative Genomics*, 24(2): p. 70.

7. Tran Hong Diem, Vo Ngoc Truc Giang, and Phung Thi Thu Huong. (2024). A colorimetric multiplex RPA approach for on-site dual monitoring of *Vibrio parahaemolyticus* and White Spot Syndrome Virus in Pacific Whiteleg shrimp. *Vietnam Journal of Biotechnology*, 22(2): p. 265-277.
8. Kang, T.-J. and M.-S. Yang. (2004). Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic plants. *BMC Biotechnology*, 4: p. 1-12.
9. Wang, H., M. Qi, and A.J. Cutler. (1993). A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Research*, 21(17): p. 4153.
10. Lee, D., et al. (2009). Isothermal amplification of genetically modified DNA sequences directly from plant tissues lowers the barriers to high-throughput and field-based genotyping. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(20): p. 9400-9402.
11. Zhang, F., et al. (2022). Dual-color blending based visual LAMP for food allergen detection: a strategy with enlarged color variation range and contrast. *Food Chemistry: X*, 13: p. 100201.

Developing rapid in-field detection procedure for genetically edited rice based on Recombinase Polymerase Amplification technique

Nhiet Nguyen Ba^{1,*}, Diem Hong Tran², Vo Truc Giang¹, Huong Thi Thu Phung², Le Minh Bui¹

¹ Department of Biotechnology, NTT Hi-tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

² NTT Hi-tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

*nbnhiet@ntt.edu.vn

Abstract The present study was conducted to apply Recombinase Polymerase Amplification (RPA) technique for rapid detection of genetically edited Khang Dan 18 (KD18) rice directly from leaf samples to develop a in-field detection kit. The KD18 rice variety, with a deletion mutation in the OsDSG1 gene, was quickly processed using various methods to obtain DNA for RPA reactions with specific primers. This study demonstrated that the SDS treatment combined with rapid purification using a phenol/chloroform/isoamyl alcohol mixture at a ratio of 25:24:1 is suitable for DNA extraction for RPA reactions. Optimization of the sample processing procedure showed that finely ground rice leaf samples with 20 % SDS solution at 65 °C for 15 minutes, followed by rapid purification, allowed the RPA reaction to take place at a fixed temperature of 37 °C for 20 minutes. The RPA reaction results can be directly recorded by the naked eye through a color reaction with Erichrome Black T. The study established a rapid detection method for genetically edited rice in-field, thus it can be applied for developing a simple, convenient, and quick procedure to determine the presence of genetically edited crops directly in the cultivation fields.

Keywords Recombinase Polymerase Amplification, KD18, genetically edited, OsDSG1

