

Study on technical measures for Ha thu o do [*Fallopia multiflora* (Thunb.) Haraldson] at Son Dong commune, Son Tay, Hanoi

Pham Thanh Huyen, Phan Van Truong

Abstract

The experiments were designed to evaluate the effects of growing time, planting distance and fertilizer doses on growth, development, yield and quality of *F. multiflora*. The results showed that the best growing time was in March or in October of the year; the planting distance of 40 × 30 cm and fertilizer dose for 1 ha within 2 year including 4 tons of microbial organic fertilizer + 200 kg N + 400 kg P₂O₅ + 200 kg K₂O. With all the above conditions, the yield of Ha thu o do growing in Son Dong commune, Son Tay district, Hanoi city reached 2600 - 2800 kg/ha and the content of 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside was recorded over 2%.

Key words: Cultivation, Ha thu o do, *Fallopia multiflora*, high quality and yield

Ngày nhận bài: 13/8/2017

Người phản biện: PGS. TS. Ninh Thị Phép

Ngày phản biện: 16/8/2017

Ngày duyệt đăng: 10/9/2017

THẨM ĐỊNH MỘT SỐ PHƯƠNG PHÁP TÁCH CHIẾT ADN CHO PHÁT HIỆN BIẾN ĐỔI GEN

Lưu Minh Cúc¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện để thẩm định 4 phương pháp tách chiết ADN, trong đó 3 phương pháp theo TCVN 7606: 2007 (ISO 21571: 2005) bao gồm các phương pháp tách chiết ADN bằng phenol/chloroform, polyvinylpyrrolidone (PVP) và CTAB. Phương pháp thứ tư là tách ADN bằng bộ kit Wizard clean-up (Promega). Tổng số 11 mẫu thí nghiệm chia thành năm nền mẫu hạt, bột, nước, thức ăn chăn nuôi và thực phẩm đã được khảo sát. Mỗi mẫu được tách chiết lặp lại 2 lần đối với 4 phương pháp, kèm theo các đối chứng dương tính (lá ngô), âm tính (H₂O). Kết quả cho thấy phương pháp tách chiết ADN bằng phenol/chloroform không phù hợp cho các nền mẫu nghiên cứu, trong khi phương pháp PVP có thể dùng cho nền mẫu hạt. Phương pháp CTAB cho ADN tinh sạch có nồng độ từ 10,7 ng/μl đến 234,6 ng/μl, tỉ lệ quang phổ A260/280 đạt được từ 1,68 đến 2,27. Phương pháp tách ADN bằng bộ kit Wizard clean-up (Promega) cho ADN tinh sạch có nồng độ từ 82,8 ng/μl đến 226,2 ng/μl, tỉ lệ bước quang phổ A260/280 đạt được từ 1,8 đến 2,07. Hai phương pháp tách ADN bằng CTAB và sử dụng kit Wizard clean-up có thể sử dụng trong các phòng thí nghiệm để tinh sạch ADN cho phát hiện biến đổi gen.

Từ khóa: Tách chiết ADN, loại nền mẫu, nồng độ, chất lượng

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tách chiết ADN là khâu đầu tiên quan trọng nhất trong tất cả các thí nghiệm sinh học phân tử. Các thao tác di truyền của công nghệ gen đều tiến hành với ADN (hay RNA). Nguyên tắc cơ bản của việc tách chiết ADN bao gồm việc giải phóng ADN có mặt trong chất nền và sau đó là tinh sạch ADN khỏi các chất ức chế phản ứng PCR (TCVN 7606:2007 - ISO 21571:2005). ADN tách chiết được cần đảm bảo về độ tinh khiết và độ nguyên vẹn về cấu trúc để thực hiện được các khâu nghiên cứu tiếp theo trong công nghệ gen thực vật. Đặc biệt trong công tác thử nghiệm và giám định biến đổi gen, việc tách chiết được ADN có chất lượng cho phản ứng PCR nghĩa là các ADN làm khuôn có độ dài phù hợp, sạch về

mặt hóa học và nguyên vẹn về mặt cấu trúc (TCVN 7608:2007 - ISO 24276:2007), có nồng độ cao từ các nền mẫu khác nhau là vô cùng khó, do trong các sản phẩm chế biến hoặc tinh chế ở mức độ cao, ADN đã bị phân hủy hầu hết. Có rất nhiều phương pháp tách chiết ADN, tùy thuộc mục đích nghiên cứu mà lựa chọn các phương pháp tách ADN cho phù hợp. Nghiên cứu này tiến hành thẩm định các phương pháp tách chiết ADN theo Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN 7606:2007 (ISO 21571:2005) và phương pháp tách bằng bộ kit của Promega để tìm ra phương pháp thích hợp nhất cho các nền mẫu nghiên cứu phục vụ cho mục đích kiểm tra, xác định biến đổi gen trong mẫu phân tích (ISO/IEC 17025).

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- 11 mẫu thí nghiệm thuộc năm nền mẫu khác nhau, bao gồm nền mẫu hạt (đậu tương, ngô), bột (bột ngũ cốc, bột đậu xanh, sữa bột), lỏng (sữa đậu nành), 3 loại thức ăn chăn nuôi và thực phẩm (ngô đóng hộp, bim bim). Mẫu đối chứng âm tính: nước cất; mẫu đối chứng dương tính: lá ngô. Tên các loại sản phẩm được nêu trong bảng 1.

- Các vật tư, hóa chất đã được liệt kê trong TCVN 7606:2007 (ISO 21571:2005).

- Bộ kit Wizard ADN clean-up system của Promega.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Để đảm bảo tính chính xác trong việc thẩm định phương pháp tách ADN (Thompson *et al.*, 2002), các nền mẫu tham gia nghiên cứu đã được xử lý trước khi tách chiết ADN như sau:

- Đối với nền mẫu hạt: Nghiền mẫu thành bột mịn.
- Đối với nền mẫu lỏng: Tiến hành ly tâm, lấy phần lắng xuống làm mẫu phân tích.
- Đối với nền mẫu bột: Nếu bột thô thì xay mịn thành hỗn hợp đồng nhất.
- Đối với mẫu thực phẩm bao gói:
 - + Thực phẩm chứa đường: Nghiền thành bột mịn, sau đó cho nước vô trùng vào hòa tan mẫu, đem ly tâm để thu lấy phần lắng xuống dùng cho phân tích.
 - + Thực phẩm chứa muối dạng bánh (bim bim): Tiến hành rửa nhẹ dưới vòi nước chảy, sau đó sấy khô ở 70° C trong 2 giờ. Lấy mẫu ra nghiền thành dạng bột mịn.
- Đối với thức ăn chăn nuôi: Nghiền thành dạng bột.

- Thí nghiệm sử dụng các phương pháp tách chiết ADN theo TCVN 7606:2007 (ISO 21571:2005) như sau:

Phương pháp dựa trên phenol/chloroform: Gồm các bước phân hủy nhiệt trong sự có mặt của natri dodecyl sunfat và hàm lượng EDTA cao, loại bỏ các tạp chất (như các phân tử ưa mỡ, các chất polisacarit và protein) và các nuclease sử dụng phenol và chloroform. Kết tủa ADN cuối cùng bằng ethanol, làm cô đặc DNA và loại trừ các muối và chloroform còn dư.

Phương pháp dựa trên polyvinyl-pyrrolylidon (PVP) bao gồm bước phân giải bằng nhiệt với sự có mặt của natri dodecyl sunfat và EDTA hàm lượng

cao, tiếp theo là bước loại bỏ các tạp chất như các phân tử polyphenol, polysacarit, các chất trao đổi và các protein hòa tan ra khỏi pha lỏng chứa DNA bằng việc kết hợp PVP và amoni axetat. Bước kết tủa bằng ancol cuối cùng để thu lấy DNA và loại bỏ các muối.

Phương pháp dựa trên CTAB: Qua bước phân giải bằng nhiệt với sự có mặt của CTAB, tiếp theo là các bước loại bỏ các tạp chất như polisacarit, protein để thu được ADN tổng số tinh sạch.

- Phương pháp tách chiết ADN bằng bộ kit Wizard ADN clean-up system của Promega: theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Wizard® ADN Clean-Up System).

- So sánh nồng độ và chất lượng của các loại ADN đã chiết tách bằng đo quang phổ trên máy nanodrop và điện di trên gel agarose 0,8%.

Nồng độ ADN: $C_{ADN} = A_{260\text{ nm}} \times 50 \times \text{độ pha loãng}$. Một dung dịch nucleic acid được xem là sạch (không tạp nhiễm protein) khi tỷ số $A_{260/280}$ nằm trong khoảng 1,8 đến 2.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: Tháng 1/2017 đến tháng 6/2017.

- Địa điểm: Phòng Giám định Sinh vật và Sản phẩm biến đổi gen, Viện Di truyền Nông nghiệp.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tiến hành so sánh các phương pháp tách chiết ADN: ADN tổng số sau khi đã tách chiết bằng 4 phương pháp, phenol/chloroform, PVP, CTAB và kit Wizard, được đo nồng độ và độ tinh sạch bằng máy NanoDrop. Kết quả đo được hiển thị trên bảng 1.

Kết quả đo nồng độ ADN đối với phương pháp tách chiết sử dụng phenol/chloroform như bảng trên cho thấy, chỉ số $A_{260/280}$ của tất cả các loại chất nền đều <1,8, chỉ có mẫu đối chứng dương tính (+) đạt trong mức độ cho phép. Như vậy ADN không đủ độ tinh sạch để có thể thực hiện thí nghiệm tiếp theo. Các nền mẫu khác tuy nồng độ cao nhưng lại quá nhiều chất ức chế khác ngoài ADN nên chỉ số $A_{260/280}$ thấp hơn giá trị 1,8.

Kết quả đo nồng độ ADN đối với phương pháp tách chiết sử dụng PVP cho thấy, chỉ số $A_{260/280}$ của hạt ngô và hạt đậu tương là >1,8; các mẫu còn lại đều <1,8. Chỉ có ADN chiết được từ hạt đậu tương là tinh sạch, $A_{260/280}$ trong khoảng cho phép từ 1,98 - 1,99, mẫu ngô có độ tinh sạch kém hơn với $A_{260/280}$ từ 2,1 - 2,48. Điều đó chứng tỏ phương pháp PVP thích hợp cho tách hạt đậu tương.

Bảng 1. Kết quả đo nồng độ ADN (độ tinh sạch) tách chiết trên máy NanoDrop

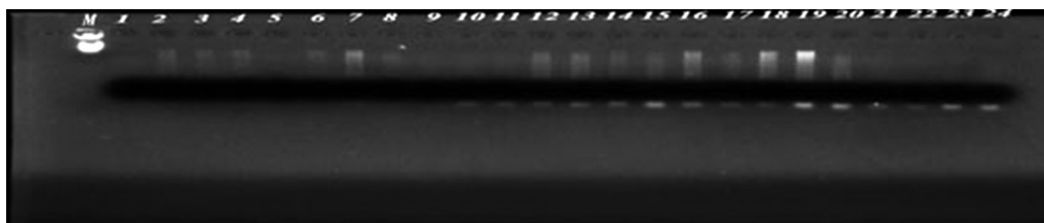
STT	Tên chất nền	Số lần lặp	Phương pháp phenol/chlorofom		Phương pháp PVP		Phương pháp CTAB		Phương pháp kit Wizard	
			Nồng độ ADN (ng/μl)	A _{260/280}	Nồng độ ADN (ng/μl)	A _{260/280}	Nồng độ ADN (ng/μl)	A _{260/280}	Nồng độ ADN (ng/μl)	A _{260/280}
1	Hạt ngô	1	78,5	1,52	5,5	2,48	78,5	2,1	176,3	1,82
		2	123,8	1,63	8,5	2,1	54,2	2,07	184,4	2,02
2	Hạt đậu tương	1	176,3	1,07	89,5	1,98	156,5	1,85	163,5	1,88
		2	177,1	1,14	88	1,99	163,9	1,92	177,1	1,96
3	TACN C20 con cò	1	405,7	1,46	263,2	1,66	234,6	2,02	226,2	1,87
		2	408,3	1,58	205,2	1,46	209,1	2,07	159,1	2,01
4	TACN 554 - HiGro	1	281,6	1,24	307,3	1,58	89,5	1,90	169,5	1,98
		2	320,5	1,32	321,3	1,53	94,8	1,81	154,2	2,01
5	TACN VH - 20S - Viethope	1	736,9	1,73	443,4	1,69	113,4	1,68	143,4	1,98
		2	648,3	1,69	426,2	1,55	106,2	1,76	126,2	1,86
6	Bim bim Ostar	1	9,9	1,12	20,9	1,23	40,7	2,27	120,7	2,07
		2	111,4	1,29	31,8	1,36	40,5	1,80	140,5	1,86
7	Sữa đậu nành Fami	1	158,6	1,25	34,9	1,76	74,9	2,26	134,9	2,06
		2	104,5	1,07	32,2	1,63	72,2	2,13	152,2	2,03
8	Bột đậu xanh Rồng Vàng	1	22,4	1,09	360,9	1,12	161,2	2,06	179,1	2,03
		2	18,6	1,1	354,4	1,15	154,4	2,13	156,3	2,03
9	Sữa bột	1	18,5	1,15	2,3	1,69	48,7	1,93	122,7	1,82
		2	18,6	1,19	8,8	1,08	48,8	1,97	116,8	1,88
10	Ngô đóng hộp	1	688,5	1,67	3,5	1,67	58,6	1,97	88,6	1,91
		2	685,3	1,47	10,1	1,47	52,8	1,8	82,8	1,9
11	Bột ngũ cốc	1	13,5	1,21	22,9	1,36	68,4	1,76	88,4	2,01
		2	10,1	1,45	18,7	1,29	75,6	1,79	85,6	1,96
	H ₂ O ĐC (-)	1	1,8	4,01	0	-0,11	0	-0,11	0,1	-0,06
	Mẫu lá ngô ĐC (+)	1	201,2	1,86	259	1,91	151	1,97	158,9	1,91

Đối với phương pháp tách chiết ADN bằng CTAB, với kết quả đo như bảng trên, chỉ số A_{260/280} của tất cả các mẫu đều nằm trong khoảng từ 1,68 đến 2,27. Như vậy, ADN tổng số tách chiết được từ tất cả các mẫu bằng phương pháp CTAB là tinh sạch hơn nhiều so với hai phương pháp trước.

Riêng đối với phương pháp sử dụng bộ kit Wizard ADN clean-up system, kết quả đo như bảng 1, chỉ số A_{260/280} của tất cả các mẫu đều nằm trong khoảng từ 1,8 đến 2,07. Như vậy, ADN tổng số tách chiết được

từ tất cả các mẫu bằng phương pháp sử dụng bộ kit Wizard ADN clean-up system là tinh sạch hơn so với phương pháp CTAB, không còn lẫn tạp chất và protein.

ADN tổng số của các mẫu sau khi tách chiết bằng phương pháp phenol/chlorofom được vào điện di trên gel agarose 0,8% trong 30 phút ở 100 miliAmp và đưa vào soi dưới tia cực tím. Ảnh chụp bằng Hệ thống xử lý hình ảnh gen - VisionCapt cho kết quả như sau:



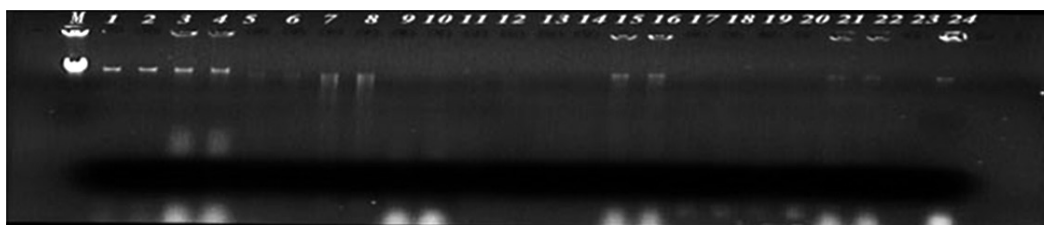
Hình 1. Kết quả điện di ADN trên gel agarose 0,8% đối với phương pháp phenol/chloroform

Giếng M: marker λ ADN chuẩn nồng độ 200 ng; 1: ĐC (-); 2-3: Hạt ngô; 4-5: Hạt đậu tương; 6-7: TACN C20 Con cò; 8-9: TACN554 Higo; 10-11: TACN VH20S; 12-13: Bim bim Ostar; 14-15: Sữa đậu nành Fami; 16-17: Bột đậu xanh Rong Vàng; 18-19: Sữa bột; 20-21: Ngô đóng hộp; 22-23: Bột ngũ cốc; 24: ĐC (+)

Kết quả trong hình 1 cho thấy, phương pháp phenol/chloroform tách chiết ADN không thành công, ADN bị đứt gãy, lượng ADN thu được tương đối ít, sản phẩm ADN thu được là các vạch mờ, hoặc dài dài, không thành băng vạch rõ ràng và cùng kích thước vị trí với λ ADN chuẩn. Phần băng sáng nhỏ ở phía trước dải màu chất nhuộm là các sản phẩm ARN và các tạp chất còn lại chứ không phải là ADN. Trong quá trình tách chiết, ARN cần được xử lý thêm để loại bỏ hoàn toàn ra khỏi sản phẩm tách ADN. Vậy phương pháp này không thích hợp để tách chiết

tinh sạch ADN có nguồn gốc từ các sản phẩm nền mẫu đã bao gồm trong nghiên cứu này.

Trong hình 2, có thể nhận thấy ADN thu được ít, có ADN bị đứt gãy, vạch không sáng rõ, khá mờ, còn lẫn nhiều tạp chất. Chỉ tách được ADN của các mẫu hạt ngô và hạt đậu tương. Mẫu 1 (giếng 1, 2) tách chiết ADN chấp nhận được, lẫn tạp ít. Mẫu 2 (giếng 3, 4) tách chiết ADN chấp nhận được. Mẫu 4 (giếng 7, 8), mẫu 8 (giếng 15, 16) và mẫu 11 (giếng 21, 22) có ADN nhưng bị đứt gãy, vạch sáng mờ, không rõ. Các mẫu còn lại tách chiết không thành công.

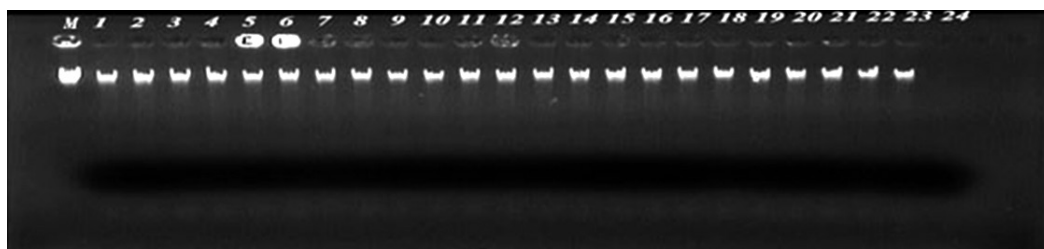


Hình 2. Kết quả điện di ADN trên gel agarose 0,8% đối với phương pháp PVP

Giếng M: marker λ ADN chuẩn nồng độ 200 ng; 1-2: Hạt ngô; 3-4: Hạt đậu tương; 5-6: TACN C20 Con cò; 7-8: TACN554 Higo; 9-10: TACN VH20S; 11-12: Bim bim Ostar; 13-14: Sữa đậu nành Fami; 15-16: Bột đậu xanh Rong Vàng; 17-18: Sữa bột; 19-20: Ngô đóng hộp; 21-22: Bột ngũ cốc; 23: ĐC (-); 24: ĐC (+)

Phía dưới của hình 2, vẫn thấy một số mẫu có vạch sáng như giếng số 3-4; 9-10; 15-16; 21-22; 24. Đó không phải là ADN mà chính là ARN và các

tạp chất khác chưa được xử lý hết trong quá trình tách chiết.

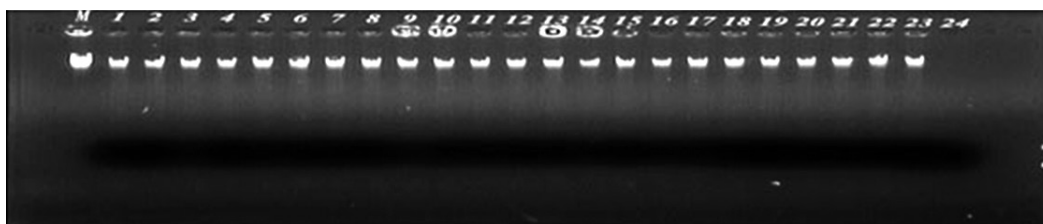


Hình 3. Kết quả điện di ADN trên gel agarose 0,8% đối với phương pháp CTAB

Giếng M: marker λ ADN chuẩn nồng độ 200 ng; 1-2: Hạt ngô; 3-4: Hạt đậu tương; 5-6: TACN C20 Con cò; 7-8: TACN554 Higo; 9-10: TACN VH20S; 11-12: Bim bim Ostar; 13-14: Sữa đậu nành Fami; 15-16: Bột đậu xanh Rong Vàng; 17-18: Sữa bột; 19-20: Ngô đóng hộp; 21-22: Bột ngũ cốc; 23: ĐC (+); 24: ĐC (-)

Hình 3 cho thấy ADN không bị đứt gãy, các vạch ADN đều sáng rõ, không bị lẫn các tạp chất như protein hay ARN do không bị tạo thành các vệt sáng. Alpha-amylaza được cho vào dung dịch đệm phân giải đã thủy phân các tinh bột khi các chất nền chứa nhiều tinh bột. Việc xử lý mẫu bằng proteinase K là cần thiết đối với nhiều loại chất nền khi việc kết tủa đồng thời ARN có thể làm nhiễu phép phân tích tiếp theo. Nồng độ muối trong suốt quá trình tách chiết là rất quan trọng trong việc loại bỏ các tạp chất, vì sự kết tủa của axit CTAB-nucleic sẽ xảy ra nếu nồng độ muối giảm xuống thấp khoảng 0,5 mol/l ở nhiệt độ phòng và/hoặc nếu nhiệt độ giảm xuống dưới 16°C.

Bằng cách tăng nồng độ muối lên đến 1,4 mol/l, việc loại bỏ các protein đã biến tính và polysaccharit được tạo phức với CTAB sẽ xảy ra, lúc đó axit nucleic được hòa tan và dễ dàng thu lại ở bước rửa cuối cùng bằng Isopropanol và ethanol. Như vậy, khi so sánh 3 phương pháp tách chiết ADN thông thường, chỉ có phương pháp tách chiết bằng CTAB theo đúng như TCVN 7606:2007 (ISO 21571:2005) dùng để tách chiết được ADN từ hầu hết các loại chất nền từ các mẫu hạt (hạt đậu tương, hạt ngô), đến các mẫu chứa nhiều hỗn hợp các loại ADN (thức ăn chăn nuôi), đến các sản phẩm chế biến (sữa đậu nành, sữa bột, bím bím, bột đậu, bột ngũ cốc, ngô đóng hộp).



Hình 4. Kết quả điện di ADN trên gel agarose 0,8% đối với phương pháp sử dụng bộ kit Wizard ADN clean-up system của Promega

Giếng M: marker λ ADN chuẩn nồng độ 200 ng; 1-2: Hạt ngô; 3-4: Hạt đậu tương; 5-6: TACN C20 Con cò; 7-8: TACN554 Hígro; 9-10: TACN VH20S; 11-12: Bím bím Ostar; 13-14: Sữa đậu nành Fami; 15-16: Bột đậu xanh Rồng Vàng; 17-18: Sữa bột; 19-20: Ngô đóng hộp; 21-22: Bột ngũ cốc; 23: ĐC (+); 24: ĐC (-)

Từ kết quả trên hình 4 cho thấy phương pháp sử dụng kit Wizard ADN clean-up system của Promega tách chiết ADN rất thành công. ADN không bị đứt gãy, các vạch ADN đều sáng rõ, ngoài ra đều không bị lẫn các tạp chất như protein hay ARN do không bị tạo thành các vệt sáng trên gel điện di. Vậy phương pháp này thích hợp để tách chiết tinh sạch ADN có nguồn gốc đa dạng từ các mẫu hạt (hạt đậu tương, hạt ngô), đến các mẫu chứa nhiều hỗn hợp các loại ADN (thức ăn chăn nuôi), đến các sản phẩm chế biến (sữa đậu nành, sữa bột, bím bím, bột đậu, bột ngũ cốc, ngô đóng hộp).

So sánh về tính hiệu quả của 4 phương pháp được khảo sát cho thấy, phương pháp tách chiết ADN bằng phenol/chloroform và PVP cho hiệu quả thấp. Phương pháp tách chiết ADN bằng CTAB thu được ADN nồng độ và chất lượng tốt. Phương pháp sử dụng kit Wizard ADN clean-up system dễ thao tác, thời gian tách nhanh và cho ADN chất lượng cao, nhưng giá thành tương đối cao. Tuy nhiên, khi tách ADN cho phát hiện biến đổi gen, nếu chỉ kiểm tra bằng PCR thường, thì chỉ cần tách chiết bằng phương pháp CTAB là đủ (Amd.1:2013). Nhưng khi kiểm tra định tính, định lượng bằng phương pháp Real time PCR, thì việc sử dụng kit Wizard ADN

clean-up system tách chiết ADN là cần thiết để đạt được ADN tinh sạch, đảm bảo chất lượng kết quả thử nghiệm.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

- Phương pháp tách chiết ADN bằng phenol/chloroform không phù hợp để tách chiết các nền mẫu nghiên cứu.

- Phương pháp tách chiết ADN bằng PVP chỉ phù hợp để tách chiết các nền mẫu hạt (đậu tương hạt).

- Phương pháp tách chiết ADN bằng CTAB thích hợp dùng để tách chiết ADN tinh sạch từ 5 nền mẫu nghiên cứu, cho nồng độ đạt từ 40,5 ng/μl đến 184,4 ng/μl, chỉ số $A_{260/280}$ đạt từ 1,68 đến 2,27.

- Phương pháp sử dụng bộ kit (Wizard ADN clean-up system) của Promega thích hợp dùng để tách chiết ADN tinh sạch từ 5 nền mẫu nghiên cứu, cho nồng độ đạt từ 82,8 ng/μl đến 184,4 ng/μl, chỉ số $A_{260/280}$ trong khoảng từ 1,8 đến 2,07.

- Hai phương pháp tách chiết ADN bằng CTAB và tách chiết ADN bằng bộ kit (Wizard ADN clean-up system) của Promega có thể được sử dụng trong các phòng thí nghiệm cho mục đích phát hiện biến đổi gen đối với 5 nền mẫu hạt, bột, nước, thức ăn chăn nuôi và thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Tiêu chuẩn Quốc gia**, 2007. TCVN 7606:2007 (ISO 21571:2005). Thực phẩm - Phương pháp phân tích để phát hiện sinh vật biến đổi gen và sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen - Tách chiết axit nucleic. 62 trang.
- Tiêu chuẩn Quốc gia**, 2007. TCVN 7608:2007 (ISO 24276:2007). Thực phẩm - Phương pháp phân tích để phát hiện sinh vật biến đổi gen và sản phẩm có nguồn gốc biến đổi gen - Yêu cầu chung và định nghĩa. 27 trang.
- Tiêu chuẩn Quốc gia**, 2007. TCVN ISO/IEC 17025:2007 (ISO/IEC 17025:2005). Yêu cầu chung về năng lực của phòng thử nghiệm và hiệu chuẩn. 40 trang.
- International Standard**, 2013. ISO21571 Amendment 1:2013. Foodstuffs - Method of analysis for the detection of genetically modified organism and derived products - Nucleic acid extraction. 10 pages.
- Thompson, M., Ellison S.L. and Wood R.**, 2002. Harmonised guidelines for single laboratory validation of method of analysis. *Pure Appl. Chem.* 47, No. 5, 2002, pp.835-855.
- Promega**. Wizard® ADN Clean-Up System. Technical Bulletin No.141. Instructions for Use of Product A7280.

Verification of DNA extraction methods for GMO detection purposes

Luu Minh Cuc

Abstract

This study was carried out to verify four DNA extraction methods, three in accordance with TCVN 7606: 2007 (ISO 21571: 2005) including Phenol/Chloroform, Polyvinyl-pyrrolidone (PVP) and CTAB DNA extraction methods. The fourth method was DNA extraction using Wizard kit clean-up (Promega). A total of 11 samples were extracted, including seed/particle, powder, liquid, feed and food products. Negative control (H₂O) and positive control (maize leaves) were also included. Each sample was extracted twice in each method. The results showed that the method of extracting DNA by phenol/chloroform was not suitable for the above matrix samples while method of extracting DNA by PVP was suitable for seed/particle matrix. The DNA extraction by using CTAB was suitable for pure DNA with a concentration ranging from 40.5 ng/μl to 184.4 ng/μl, the ratio of A260/280 fluorescent gained from 1.68 to 2.27. The method of extraction by using DNA clean-up kit was suitable for pure DNA with concentrations ranging from 75.6 ng/μl to 184.4 ng/μl, the A260/280 index ranging from 1.8 to 2.07. Two DNA extraction methods of using CTAB and DNA clean-up kit were recommended for testing purposes in the GMO laboratories.

Key words: DNA extraction methods, matrix samples, concentration, quality

Ngày nhận bài: 11/8/2017
Ngày phản biện: 16/8/2017

Người phản biện: TS. Khuất Hữu Trung
Ngày duyệt đăng: 10/9/2017

MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC, SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA CHỦNG NẤM *Paecilomyces cicadae* CÓ TIỀM NĂNG PHÒNG TRỪ VE SẤU HẠI CÀ PHÊ

Trần Văn Huy¹, Lê Văn Trinh¹, Nguyễn Văn Liêm¹,
Nguyễn Thị Nga¹, Hà Thị Thu Thủy¹, Nguyễn Thị Như Quỳnh¹

TÓM TẮT

Nấm *Paecilomyces cicadae* là loài nấm có nhiều tiềm năng ký sinh gây chết ve sấu hại cà phê tại Tây Nguyên. Từ năm 2013 - 2015 đã tiến hành thu thập, phân lập và làm chủng thuần được 5 nguồn nấm *Paecilomyces cicadae* đó là Pae1, Pae2, Pae3, Pae4, Pae5. Trong đó đã tuyển chọn được chủng nấm *Paecilomyces cicadae* Pae1 có hiệu lực cao trong phòng trừ ve sấu hại cà phê, đạt tới 87,8 % trong điều kiện nhà lưới. Đã xác định được đặc điểm hình thái, sinh học cơ bản của chủng nấm Pae1. Nấm phát triển tốt trên môi trường PDA, ở nhiệt độ từ 20 - 25° C và độ pH từ 6,0 - 6,5, với đường kính khuẩn lạc đạt từ 5,10 - 5,75 cm sau 12 ngày nuôi cấy. Đây là cơ sở dữ liệu quan trọng để thiết lập kỹ thuật sản xuất và sử dụng chế phẩm sinh học *Paecilomyces cicadae* để phòng trừ ve sấu hại cà phê ở Tây Nguyên.

Từ khoá: Nấm *Paecilomyces cicadae*, ve sấu, cà phê, hiệu quả, đặc điểm sinh học

¹ Viện Bảo vệ thực vật