

**ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ CHẤT LƯỢNG QUẢ CÀ CHUA CHUYỂN GEN
CTB (CHOLERA TOXIN B SUBUNIT)**

Lê Thị Thỉnh

Trường Đại học Phạm Văn Đồng

Đặng Thanh Long

Viện Tài nguyên, Môi trường và Công nghệ sinh học, Đại học Huế

TÓM TẮT

*Chúng tôi đã biểu hiện tiểu đơn vị B của độc tố cholera (CTB) gây bệnh tả của vi khuẩn *Vibrio cholerae* trong quả cà chua giống 311 (*Lycopersicon esculentum* L. cv. 311). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá hình thái, chất lượng và sự biểu hiện của CTB trong quả cà chua chuyển gen. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, không có sự thay đổi đáng kể về đặc điểm hình thái và chất lượng của quả chuyển gen so với đối chứng. Mức độ biểu hiện của CTB trong quả cà chua chín khoảng 0,89% protein hòa tan tổng số. Phân tích GM1-ELISA cho thấy, protein CTB có liên kết khá mạnh với ganglioside-GM1, gợi ý rằng các tiểu đơn vị B đã tạo ra dạng pentamer có hoạt tính sinh học.*

Từ khóa: *Cà chua chuyển gen, CTB, chất lượng quả, hình thái quả.*

1. Mở đầu

Quả cà chua là một loại rau ăn quả giàu vitamin, chất khoáng và nhiều chất có hoạt tính sinh học, có thể ăn sống và chế biến thành nhiều loại thực phẩm quan trọng cho đời sống con người. Bên cạnh những giá trị về dinh dưỡng, quả cà chua còn có giá trị về mặt y học như giúp cơ thể tăng cường khả năng miễn dịch, phòng chống nhiễm trùng, chống oxy hóa,... Với những ưu điểm trên, nhiều phòng thí nghiệm đang sử dụng cà chua làm đối tượng biểu hiện các protein kháng nguyên để sản xuất vaccine phòng bệnh cho người và động vật như các protein gây viêm phổi và dịch hạch, protein vỏ của enterovirus 71 gây bệnh chân-tay-miệng, kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg), độc tố đường ruột không bền nhiệt của *E. coli* (LTB), tiểu đơn vị B của độc tố cholera (CTB)...

Cholera toxin (CT) của vi khuẩn *Vibrio cholerae* là tác nhân gây bệnh tả, làm mất nước và các chất điện giải trong cơ thể. Tiểu đơn vị B của CT có tính kháng nguyên mạnh và có chức năng liên kết với các thụ thể glucosphingolipid trên bề mặt tế bào eukaryote. Kháng thể kháng tiểu đơn vị B có khả năng trung hòa được CT. Vì vậy, CTB là một ứng viên kháng nguyên đầy hứa hẹn trong sản xuất vaccine phòng bệnh tả.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả về đặc điểm hình thái, chất lượng quả và sự biểu hiện của CTB trong quả cà chua chuyển gen.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Quả của sáu dòng cà chua 311 (*Lycopersicon esculentum* L. cv. 311) chuyển gen CTB (số 1-6) đã được tạo ra trong một nghiên cứu trước đây [5].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Các phương pháp đánh giá hình thái và chất lượng quả

Đường kính, chiều dài và hình dạng quả được xác định bằng phương pháp đo. Màu sắc quả được xác định bằng cảm quan (IPGRI, 1996).

Vitamin C được xác định bằng phương pháp chuẩn độ [3].

Carotene được xác định theo phương pháp của Trizel [4].

Độ Brix của dịch quả được xác định trên máy đo UTAGO N1 (Utago, Nhật Bản).

Độ chua dịch quả được xác định bằng phương pháp chuẩn độ [1].

Đường khử tổng số được xác định bằng phương pháp dinitrosalicylic acid [3].

Khối lượng chất khô được xác định theo phương pháp sấy khô tuyệt đối [2].

2.2.2. Các phương pháp phân tích biểu hiện của CTB trong quả

Mức độ biểu hiện của protein CTB trong quả cà chua chuyển gen được xác định bằng phân tích ELISA [10].

Ái lực liên kết của protein CTB với thụ thể GM1-ganglioside được xác định bằng phân tích GM1-ELISA [5].

2.2.3. Xử lý thống kê

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu thực nghiệm được tính giá trị trung bình và phân tích ANOVA (Duncan'test, $p < 0,05$) bằng chương trình SAS.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Đặc điểm hình thái quả

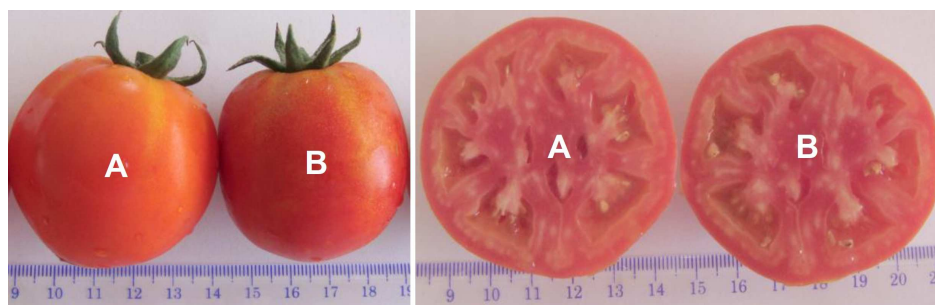
Đặc điểm hình thái quả được trình bày ở Bảng 1. Nhìn chung, đường kính và chiều dài quả giữa các dòng chuyển gen và đối chứng sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Đường kính quả dao động từ 4,67 - 5,03 cm và chiều dài quả dao động từ 4,47 - 4,9 cm.

Hình dạng quả và màu sắc quả thể hiện đặc tính di truyền của giống. Quả của các dòng chuyển gen và đối chứng đều có dạng hơi tròn và màu đỏ sáng (Bảng 1 và Hình 1).

Bảng 1. Một số đặc điểm hình thái quả

Dòng	Đường kính quả (cm)	Chiều dài quả (cm)	Hình dạng quả	Màu sắc quả chín
1	4,70 ^a	4,57 ^a	Tròn hơi dẹt	Đỏ sáng
2	4,93 ^a	4,83 ^a	Tròn hơi dẹt	Đỏ sáng
3	4,70 ^a	4,60 ^a	Tròn hơi dẹt	Đỏ sáng
4	5,03 ^a	4,9 ^a	Tròn hơi dẹt	Đỏ sáng
5	4,67 ^a	4,47 ^a	Tròn hơi dẹt	Đỏ sáng
6	4,93 ^a	4,8 ^a	Tròn hơi dẹt	Đỏ sáng
Đối chứng	4,90 ^a	4,63 ^a	Tròn hơi dẹt	Đỏ sáng

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 1. Quả cà chua chuyển gen CTB (A) và quả cà chua không chuyển gen (B)

3.2. Đặc điểm chất lượng quả

Kết quả phân tích một số chỉ tiêu chất lượng quả giữa các dòng cà chua chuyển gen và đối chứng được trình bày ở Bảng 2.

Khối lượng chất khô khi quả chín đạt cao nhất ở dòng số 3 (9,04%), tiếp đến là dòng số 1 (8,69%) và dòng số 2 (8,79%). Các dòng còn lại và đối chứng sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), dao động từ 7,09 - 7,41%.

Về hàm lượng đường khử trong quả chín, dòng số 6 có hàm lượng đường khử cao nhất (1,64%), tiếp theo là dòng số 2 (1,57%) và dòng số 3 (1,55%). Các dòng còn lại và đối chứng sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), dao động từ 1,14 - 1,23%. Trong khi đó, dòng số 4 có độ chua quả cao nhất (0,82%), kế tiếp là dòng số 5 và đối chứng (0,77%), các dòng còn lại dao động từ 0,44 - 0,64%.

Đối với các loại quả, hàm lượng vitamin C là yếu tố chất lượng quan trọng vì nó góp phần tăng cường sức đề kháng, tăng khả năng trao đổi chất của cơ thể. Kết quả

bảng 2 cho thấy, hàm lượng vitamin C giữa các cây chuyển gen và đối chứng sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), dao động từ 0,102 - 0,128%.

Carotene cũng là một thành phần quan trọng góp phần làm chậm quá trình lão hóa và phòng ngừa ung thư cho con người. Hàm lượng carotene trong quả của dòng số 1 đạt cao nhất (4,6 mg/100g); các dòng còn lại và đối chứng sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), dao động từ 2,3 - 3,6 mg/100g. Độ Brix của quả đạt ở mức cao và biến động từ 6,0 - 7,1. Trong đó, dòng số 2 đạt cao nhất (7,1), thấp nhất là dòng số 5 (6,0), tiếp đến là dòng số 3 (6,3), các dòng còn lại và đối chứng sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

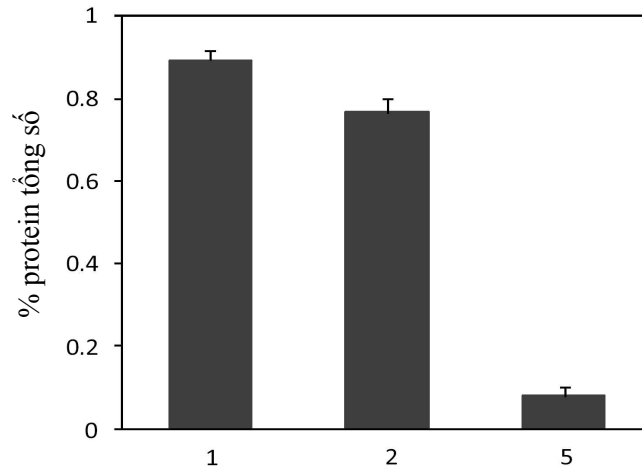
Một số công trình nghiên cứu cũng có kết quả tương tự chúng tôi. Chẳng hạn, Brummel et al. (2006) [6] cho biết sự biểu hiện của gen *LeExp1* ngoại lai không ảnh hưởng đáng kể đến kích thước cuối cùng của quả cà chua. Theo Vannini et al. (2007) [12], không có sự khác nhau đáng kể về đặc điểm chất lượng quả giữa các dòng cà chua chuyển gen *Osm4* của lúa và đối chứng.

Bảng 2. Một số đặc điểm chất lượng quả

Dòng	Chất khô (%)	Đường khử (%)	Độ chua (%)	Vitamin C (%)	Carotene (mg/100 g)	Độ Brix
1	8,69 ^b	1,23 ^d	0,64 ^c	0,102 ^a	4,6 ^a	6,9 ^{ab}
2	8,07 ^c	1,57 ^b	0,46 ^e	0,115 ^a	3,6 ^{ab}	7,1 ^a
3	9,04 ^a	1,55 ^c	0,61 ^d	0,123 ^a	2,3 ^b	6,3 ^{cd}
4	7,18 ^{de}	1,14 ^g	0,82 ^a	0,117 ^a	2,3 ^b	6,6 ^{bc}
5	7,41 ^d	1,21 ^e	0,77 ^b	0,128 ^a	2,6 ^b	6,0 ^d
6	7,09 ^e	1,64 ^a	0,44 ^f	0,127 ^a	3,6 ^{ab}	7,0 ^{ab}
Đối chứng	7,41 ^d	1,17 ^f	0,77 ^b	0,104 ^a	2,3 ^b	6,8 ^{ab}

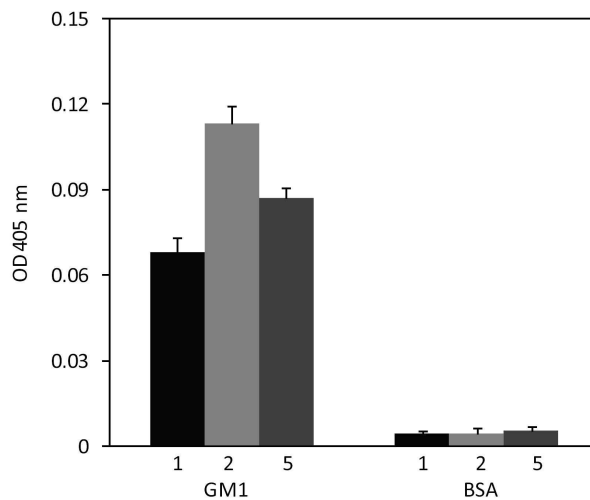
3.3. Phân tích biểu hiện của gen CTB

Phân tích ELISA đã được sử dụng để định lượng mức độ biểu hiện CTB trong quả của cây cà chua chuyển gen (số 1, 2 và 5). Kết quả trình bày ở hình 2 cho thấy, hàm lượng protein CTB trong quả cà chua chuyển gen chiếm khoảng 0,08 - 0,89% protein hòa tan tổng số. Theo Jiang et al. (2007) [8], hàm lượng protein CTB cao nhất trong quả cà chua chín là 0,081%. Một số nghiên cứu khác cũng đã thu được mức độ biểu hiện cao của CTB trong thực vật, như ở lúa [11], cà rốt [9],...



Hình 2. Phân tích ELISA. 1, 2 và 5: quả cà chua chuyển gen CTB

Ái lực liên kết của protein CTB trong quả cà chua chuyển gen với thụ thể ganglioside-GM1 được xác định bằng phân tích GM1-ELISA. Protein CTB của quả cà chua chuyển gen có ái lực khá mạnh với ganglioside-GM1 nhưng không có ái lực đối với BSA (Hình 3). Khả năng liên kết của protein thực vật với các thụ thể ganglioside phụ thuộc vào sự hình thành cấu trúc pentamer từ các monomer. Sự lắp ráp các monomer thành cấu trúc pentamer là cần thiết cho sự liên kết và nhận biết của các tế bào niêm mạc ruột. Hiệu lực liên kết khá mạnh của protein CTB với ganglioside-GM1 chứng tỏ rằng các tiểu đơn vị CTB từ thực vật đã liên kết với GM1. Kết quả phân tích ELISA và liên kết GM1-ELISA trên quả cà chua chuyển gen chứng tỏ protein CTB đã tự lắp ráp thành cấu trúc pentamer có hoạt tính sinh học. Một số nghiên cứu trước đây đã cho thấy, protein CTB thực vật có liên kết mạnh với ganglioside-GM1 như ở cà rốt [9] và lúa [11].



Hình 3. Phân tích GM1-ELISA. 1, 2 và 5: quả cà chua chuyển gen CTB

4. Kết luận

Chúng tôi đã biểu hiện thành công gen CTB trong quả cà chua. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, hình thái và chất lượng quả cà chua chuyển gen CTB không có sự sai khác đáng kể so với đối chứng. Mức độ biểu hiện cao nhất của CTB trong quả cà chua chuyển gen đạt khoảng 0,89% protein hòa tổng số và protein tái tổ hợp này có ái lực khá mạnh với GM1-ganglioside.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, *Tiêu chuẩn rau quả*, Tuyển tập tiêu chuẩn Nông nghiệp Việt Nam, Tập VI, Quyển I, Hà Nội, 2003.
- [2]. Lâm Thị Kim Châu, Nguyễn Thượng Lệnh, Văn Đức Chín, *Thực tập lớn Sinh hóa*, Tài sách Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP Hồ Chí Minh, 1997.
- [3]. Nguyễn Văn Mùi, *Thực hành Hóa sinh học*, Nxb Đại học Quốc gia Hà Nội, 2001.
- [4]. Phạm Văn Sỏ, Bùi Thị Như Thuận, *Kiểm nghiệm lương thực thực phẩm*, NXB Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, 1975.
- [5]. Lê Thị Thính, Tae-Geum Kim, Moon-Sik Yang, Nguyễn Hoàng Lộc, *Biểu hiện của CTB (cholera toxin B subunit) trong cây cà chua (Lycopersicon esculentum L.)*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2010.
- [6]. Brummell DA, Howie WJ, Ma C, Dunsmuir P, *Postharvest fruit quality of transgenic tomatoes suppressed in expression of a ripening-related expansin*, Postharvest Biology and Technology 25, (2002), 209-220.
- [7]. IPGRI, *Descriptors for tomato (Lycopersicon spp.)*, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 1996.
- [8]. Jiang XL, He ZM, Peng ZQ, Yu Q, Qing C, Yu SY, *Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice*, Transgenic Research 16, (2007), 169-175.
- [9]. Kim YS, Kim MY, Kim TG, Yang MS, *Expression and assembly of cholera toxin b subunit (CTB) in transgenic carrot (Daucus carota L.)*, Molecular Biotechnology 41: (2009), 8-14.
- [10]. Loc NH, Nhi PY, Kim TG, Yang MS, *Expression of Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic tomato (Lycopersicon esculentum L.)*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, (2010).
- [11]. Oszvald M, Kang TJ., Tomoskozi S, Jenes B, Kim TG, Cha YS, Tamas L, Yang MS, *Expression of cholera toxin B subunit in transgenic rice endosperm*, Mol Biotechnol 40, (2008), 261-268.

- [12]. Vannini C, Campa M, Iriti M, Genga A, Faoro F, Carravieri S, Rotino GL, Mara Rossoni M, Spinardi A, Bracale M, *Evaluation of transgenic tomato plants ectopically expressing the rice Osmyb4 gene*, Plant Science 173, (2007), 231-239.

MORPHOLOGICAL AND QUALITATIVE CHARACTERISTICS OF CTB (CHOLERA TOXIN B SUBUNIT) TRANSGENIC TOMATO FRUIT

Le Thi Thinh

Pham Van Dong College

Dang Thanh Long

Institute of Resources, Environment and Biotechnology, Hue University

SUMMARY

We expressed the B subunit of cholera toxin (CTB) from Vibrio cholerae in tomato fruit (Lycopersicon esculentum L. cv. 311). In this study we estimated the fruit morphology and the quality of CTB transgenic tomato plants and the appearance of CTB in fruits. Results from our study showed that there were no significant differences in morphological and qualitative characteristics between transgenic and non-transgenic tomato fruits. The expression level of CTB reached approximately 0,89% of the total soluble protein in ripening fruit. GMI-ganglioside binding assay indicated that tomato CTB protein bound specifically to GMI-ganglioside. This suggested that the CTB subunits (monomers) formed biologically active pentamers.

Key words: *CTB, fruit quality, fruit morphology, transgenic tomato.*