

SO SÁNH TÍNH HIỆU QUẢ VÀ KINH TẾ CỦA BA PHƯƠNG PHÁP LY TRÍCH ADN TRÊN CÂY LÚA

Lã Cao Thắng¹, Hà Minh Luân¹, Bùi Thanh Liêm¹

TÓM TẮT

Ba phương pháp ly trích ADN được nghiên cứu để đánh giá tính hiệu quả và kinh tế khi sử dụng đánh giá kiểu gen phục vụ nghiên cứu chọn tạo giống. Mỗi phương pháp được đánh giá dựa vào khả năng khuếch đại của phản ứng PCR, thành phần hóa chất, vật tư tiêu hao cũng như thời gian thực hiện. Kết quả cho thấy phương pháp ly trích bằng NaOH-Tris cho hiệu quả kinh tế cao nhất so với phương pháp IRRI và CTAB. Kết quả sản phẩm PCR của phương pháp NaOH-Tris tương đương với hai phương pháp còn lại. Phương pháp NaOH-Tris được thực hiện trong 2 bước, hiệu quả, thời gian thực hiện ngắn nhất cũng như rẻ tiền nhất so với phương pháp IRRI và CTAB. Phương pháp ly trích ADN với NaOH-Tris thích hợp cho các nghiên cứu ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống ở các phòng thí nghiệm trang bị cơ bản tại Việt Nam.

Từ khóa: Ly trích ADN, hiệu quả, cây lúa, PCR, NaOH-Tris

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chọn giống nhờ chỉ thị phân tử (Marker-Assisted Selection, MAS) hiện đang được áp dụng rộng rãi trên thế giới và cả Việt Nam. Công việc đánh giá kiểu hình của một số lượng lớn cá thể đòi hỏi tiêu tốn nhiều thời gian và công sức. Do đó, quá trình ly trích ADN từ một số lượng lớn quần thể để chọn lọc cá thể mang gen/QTL mục tiêu cần được thực hiện đơn giản và nhanh chóng. Hiện nay đã có nhiều phương pháp ly trích ADN đã được phổ biến (Zheng *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1993; Guidet, 1994; Ikeda *et al.*, 2001; Collard *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016) và mỗi phương pháp có ưu/nhược điểm riêng cũng như phụ thuộc vào điều kiện trang bị của phòng thí nghiệm.

Trong các phương pháp vừa nêu thì phương pháp ly trích ADN sử dụng CTAB cho sản phẩm ADN nhiều và độ tinh sạch cao chỉ phù hợp với các thí nghiệm phân tích yêu cầu chất lượng ADN cao (Doyle & Doyle, 1990). Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi phải tốn nhiều thời gian và sử dụng nhiều thành phần hóa chất khác nhau. Trong khi đó phương pháp ly trích ADN theo kiểu đơn giản có thời gian ly trích ngắn hơn, tuy nhiên số lượng ADN thấp và độ tinh sạch không cao (Wang *et al.*, 1993; Ikeda *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016 có cải tiến). Các kết quả ly trích ADN từ các phương pháp ly trích ADN theo kiểu đơn giản có thể áp dụng hiệu quả trong việc kiểm tra cá thể mang gen ở các thế hệ sớm, đánh giá vật liệu ban đầu đối với các chỉ thị phân tử SSR trong ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn giống.

Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá hiệu quả ly trích, so sánh tính kinh tế trong việc sử dụng

3 phương pháp ly trích ADN có thay đổi trên cây lúa trong điều kiện phòng thí nghiệm trang bị cơ bản.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hạt lúa của 8 giống lúa (BB57, BB61, OM4900, ST24, IR64-Saltol, FL478, OM7347) có kiểu gen tương phản nhau đối với tính trạng kháng bệnh bạc lá và chống chịu mặn được dùng để đánh giá tính hiệu quả của các phương pháp ly trích ADN thông qua phản ứng PCR. Các hạt lúa được gieo trên đĩa petri để dùng cho việc thu mẫu lá. Lá lúa được thu khi cây con được 3 lá được sử dụng để ly trích ADN.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp NaOH-Tris có thay đổi (Wang, 1993)

Khoảng 20 mg mẫu lá non được cắt nhỏ và cho vào tube 2,0 ml có sẵn viên bi thép (đường kính 5 mm) và được thêm 200 μ l NaOH 0,5 M. Mẫu được nghiền bằng máy đập mẫu Bioblock Scientific (Germany) với tốc độ đập 60 Hz trong 1 phút. Sau khi nghiền, bi thép được loại ra ngoài và thêm vào 350 μ l Tris 1M pH 8,0, trộn đều và ly tâm 13000 rpm trong 3 phút. Dịch trích có thể sử dụng trực tiếp cho phản ứng PCR hoặc trữ ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng.

2.2.2. Phương pháp IRRI (Zheng, 1995)

Khoảng 20 mg mẫu lá non được nghiền bằng cối chày trong 200 μ l dịch trích [Tris-HCl 50 mM, EDTA 25 mM, NaCl 300 mM, SDS 1%, pH 8,0]. Sau khi mẫu lá được nghiền, 800 μ l dịch trích được thêm vào, trộn đều và chuyển sang tube 1,5 ml. Để tủa protein, 500 μ l chloroform:isoamyl alcohol (tỷ lệ

¹ Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long

24 : 1) được thêm vào và trộn đều; sau đó mẫu được ly tâm 1 phút ở 13000 rpm. Dịch trích được chuyển sang tube mới có chứa 750 µl cồn tuyệt đối (ethanol 100%) lạnh nhằm tủa ADN; sau đó mẫu được ly tâm 13000 rpm trong 3 phút. Phần dung dịch phía trên được đổ bỏ và phần tủa ADN ở đáy tube được rửa lại với 500 µl cồn 70%. Phần kết tủa ADN thu được được hòa tan bằng 70 µl TE buffer (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) sau khi làm khô ở nhiệt độ phòng khoảng 20 phút (để ethanol còn sót lại bay hơi hết). ADN sau khi hòa tan có thể được sử dụng trong phản ứng PCR hoặc trữ ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng.

2.2.3. Phương pháp CTAB có thay đổi (Doyle và Doyle, 1990)

Khoảng 20 mg mẫu lá non được nghiền bằng cối chày trong 500 µl dung dịch CTAB (CTAB 2%, PVP 1%, Tris 100 mM, NaCl 1,4M, EDTA 20 mM) và được chuyển sang tube 1,5 ml. Dịch trích được ủ ở 65°C trong 30 phút; sau đó 500 µl chloroform:isoamyl alcohol (tỷ lệ 24 : 1) được thêm vào, trộn đều và ly tâm 13000 rpm trong 3 phút. Dịch trích được chuyển sang tube mới có sẵn 750 µl cồn tuyệt đối (ethanol 100%) lạnh để tủa ADN. Sau đó, mẫu được ly tâm 13000 rpm trong 3 phút. Phần dung dịch phía trên được đổ bỏ và phần tủa ADN ở đáy tube được rửa lại với 500 µl cồn 70%. Phần kết tủa ADN thu được được hòa tan bằng 70 µl TE buffer (Tris HCl 10 mM,

EDTA 1 mM, pH 8,0) sau khi làm khô ở nhiệt độ phòng khoảng 20 phút (để ethanol còn sót lại bay hơi hết). ADN sau khi hòa tan có thể được sử dụng trong phản ứng PCR hoặc trữ ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng.

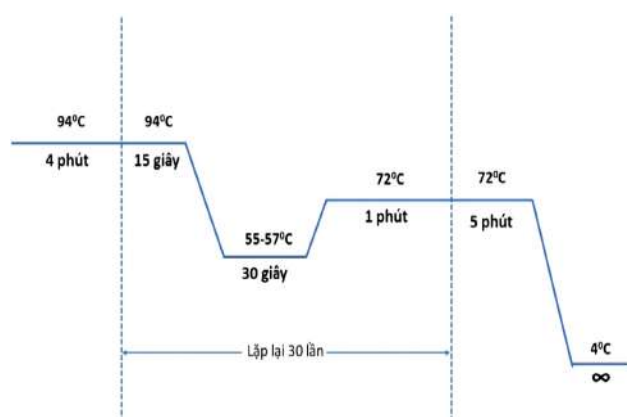
2.2.4. Kiểm tra hiệu quả ly trích ADN thông qua phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thực hiện để khuếch đại một đoạn của gen *Xa21* với đoạn mã chuyên biệt *Xa21* và chỉ thị phân tử RM336 có liên kết chặt với QTL *Saltol* (Bảng 1). *Xa21* là một trong những gen quy định khả năng kháng của cây lúa với nhiều loại chủng gây bệnh bạc lá như PX061, PX086, PX079 và DX020 trong khi *Saltol* là QTL chủ lực quy định tính chống chịu mặn trên cây lúa. Hai đoạn gen này được ưu tiên sử dụng để kiểm tra hiệu quả các phương pháp ly trích do tính sẵn có và phù hợp với các nghiên cứu đang được thực hiện tại phòng thí nghiệm. Thể tích phản ứng là 20 µl, thành phần gồm: 1,0 µl dịch trích ADN, 4 µl 5X MyTaq (Bioline, UK), 0,5 µl mỗi thuận 10 ng/µl, 0,5 µl mỗi nghịch 10 ng/µl và 14 µl H₂O. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy eppendorf TM 96 giếng (Applied Biosystems, USA). Để khuếch đại đoạn gen mục tiêu, chu kỳ nhiệt được thực hiện như minh họa ở hình 1.

Sản phẩm PCR sẽ được phân tích bằng điện di trên gel agarose 3%, các gel được nhuộm bằng GelRed và quan sát dưới đèn UV.

Bảng 1. Trình tự cặp mỗi được sử dụng trong nghiên cứu

Chỉ thị phân tử	Mỗi	Trình tự mỗi	Tm (°C)
Xa21	Xa21-R	5'-AGACGCGGTAATCGAAAGATGAAA-3'	57
	Xa21-F	5'-AGACGCGGAAGGGTGGTTCCTCCGGA-3'	
RM336	RM336-R	5'-GCTGGTTTGTTTCAGGTTTCG-3'	55
	RM336-F	5'-CTTACAGAGAAACGGCATCG-3'	



Hình 1. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR để khuếch đại đoạn gen mục tiêu với các mỗi *Xa21* (Tm = 57°C) và RM336 (Tm = 55°C)

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

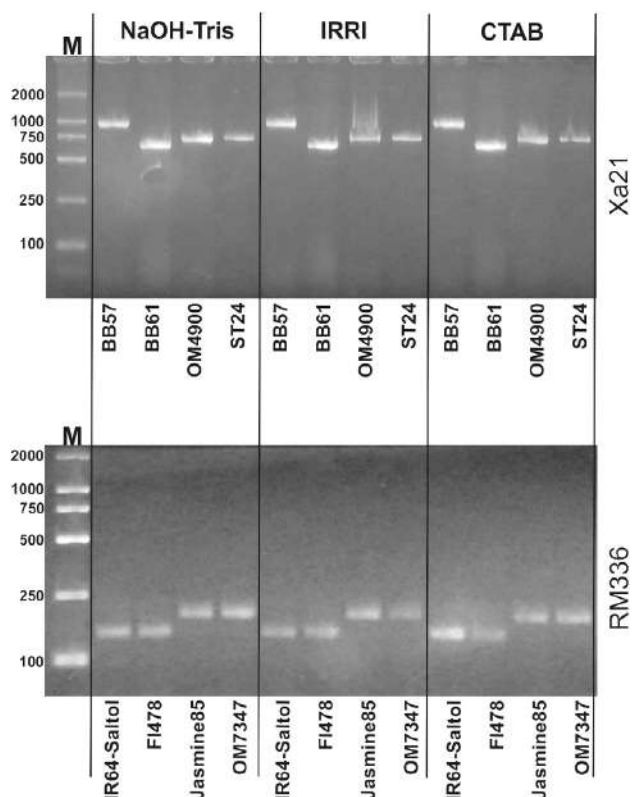
Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 3 đến tháng 6 năm 2020 tại Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá hiệu quả ly trích ADN thông qua kết quả của phản ứng PCR

Sản phẩm PCR khuếch đại các đoạn gen *Xa21* và QTL *Saltol* từ ADN của 3 phương pháp ly trích cho thấy hiệu quả ly trích ADN tương đương. Cần lưu ý thêm là sử dụng các lá non để ly trích ADN sẽ cho hiệu quả cao hơn. Lượng lá dùng trong ly trích khoảng 20 - 40 mg và sử dụng lá của cây 7 - 10 ngày tuổi. Phản ứng PCR sử dụng ADN ly trích bằng phương pháp NaOH-Tris, IRR1 và CTAB đều

cho thấy sản phẩm khuếch đại (Hình 2). Hình ảnh các băng khuếch đại sản phẩm PCR từ các phương pháp ly trích cho kết quả các băng ADN sáng và rõ trên bảng gel điện di. Các sản phẩm khuếch đại PCR đều dễ dàng phân biệt được các alen của từng chỉ thị phân tử trên các giống lúa sử dụng. Điều này chứng tỏ cả 3 phương pháp sử dụng đều cho hiệu quả tương tự nhau trong nghiên cứu này nhưng phương pháp ly trích với NaOH-Tris cho nhiều ưu điểm hơn như được mô tả ở các bảng 2 và 3.



Hình 2. Sản phẩm khuếch đại PCR của đoạn gen *Xa21* (hình trên) và QTL *Saltol* (hình dưới) sử dụng các chỉ thị phân tử *Xa21* và *RM336* đối với các phương pháp ly trích khác nhau: Phương pháp NaOH-Tris cải tiến, phương pháp IRRI, phương pháp CTAB

Ghi chú: M: Thang chuẩn. Giống BB57 mang alen kháng bệnh bạc lá của gen *Xa21*; BB61, OM4900 và ST24 mang alen nhiễm của gen *Xa21*. Giống IR64-Saltol và FI478 mang QTL *Saltol* chống chịu mặn; Jasmine85 và OM7347 không mang QTL *Saltol*.

3.2. So sánh hiệu quả kinh tế của các phương pháp ly trích ADN

Hiệu quả kinh tế xét về tiêu chí thời gian, bước thực hiện cũng như thành phần vật tư hóa chất để thực hiện các phương pháp được mô tả ở bảng 2 và 3. Thời gian thực hiện thì phương pháp NaOH-Tris cho thời gian ngắn nhất (< 5 phút), kể đến là

phương pháp IRRI (thời gian thực hiện khoảng 1 giờ), trong khi phương pháp CTAB cho thời gian dài nhất (thời gian thực hiện trong khoảng 2 giờ) (Wang *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1995; Doyle & Doyle, 1990). Phương pháp NaOH-Tris tiêu tốn thời gian ngắn cũng như đơn giản (chỉ thực hiện trong 2 bước) giúp tiết kiệm nhiều thời gian và chi phí, thành phần hóa chất sử dụng ở mức tối thiểu nhưng đảm bảo hiệu quả ly trích về chất lượng cũng như số lượng cho các phản ứng PCR. Cụ thể, phương pháp NaOH-Tris chỉ qua bước nghiền mẫu phá vỡ tế bào và ly tâm thu dịch trích chứa ADN để chạy trực tiếp sản phẩm PCR mà không qua các bước loại bỏ tạp chất và tủa để thu nhận ADN (Wang *et al.*, 1993). Do phương pháp NaOH-Tris có ít bước thực hiện dẫn đến hạn chế việc sử dụng các vật tư tiêu hao như tube đựng mẫu, các loại tip dùng cho pipet nên hiệu quả kinh tế hơn.

Bảng 2. So sánh các bước và thời gian thực hiện của các phương pháp ly trích ADN

Bước ly trích	NaOH-Tris	IRRI	CTAB
Phá vỡ tế bào	1 phút	5 phút	3 - 5 phút
Ủ	Không	Không	30 - 60 phút
Tinh sạch	Không	10 phút	20 phút
Tủa	Không	5 phút	5 phút
Rửa	Không	1 phút	1 phút
Làm khô	Không	20 phút	20 phút

Bảng 3. So sánh thành phần hóa chất và vật tư sử dụng của các phương pháp ly trích ADN

Vật tư/hóa chất sử dụng	NaOH-Tris	IRRI	CTAB
Chloroform: isoamyl alcohol	Không	Có	Có
Ethanol 100%	Không	Có	Có
Ethanol 70%	Không	Có	Có
EDTA	Không	Có	Có
NaCl	Không	Có	Có
SDS	Không	Có	Không
CTAB	Không	Không	Có
Tris-HCl	Có	Có	Có
NaOH	Có	Không	Không
Số tube 2,0 ml	≥ 1	≥ 2	≥ 2
Số tip 1000µl	≥ 2	≥ 4	≥ 4
Số tip 200µl	≥ 1	≥ 1	≥ 1

Hơn nữa, việc sử dụng máy nghiền trong ly trích mẫu càng cho thấy hiệu quả của việc sử dụng phương pháp ly trích ADN với NaOH-Tris. Sử dụng máy nghiền mẫu giúp gia tăng số mẫu ly trích cho một lần nghiền là một lợi thế cho các thí nghiệm đánh giá sàng lọc kiểu gen số lượng lớn. Tuy nhiên, nếu sử dụng các phương pháp ly trích như CTAB hay IRRI bao gồm nhiều bước lại là một trở ngại to lớn do phải chuyển mẫu nhiều bước trên số lượng lớn mẫu, điều này làm chậm đi quá trình thực hiện cũng như hiệu suất ly trích.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

- Phương pháp ly trích ADN với NaOH-Tris trong nghiên cứu này cho hiệu quả đánh giá kiểu gen tương đương với phương pháp IRRI và CTAB.

- Phương pháp ly trích với NaOH-Tris cho hiệu suất cao khi sử dụng cho sàng lọc số lượng lớn mẫu kết hợp với việc nghiền mẫu bằng máy. Bên cạnh đó, phương pháp này sử dụng hóa chất và vật tư tiêu hao ở mức tối thiểu, đồng thời quá trình ly trích được rút ngắn đáng kể.

- Phương pháp ly trích với NaOH-Tris thực hiện đơn giản, nhanh chóng và dễ áp dụng cho các phòng thí nghiệm sinh học phân tử được trang bị ở mức cơ bản.

4.2. Đề nghị

- Phương pháp ly trích với NaOH-Tris nên được sử dụng rộng rãi tại các phòng thí nghiệm chọn tạo giống lúa.

- Có thể ứng dụng kết quả nghiên cứu này cho các đối tượng cây trồng khác.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn kinh phí tài trợ thực hiện nghiên cứu từ dự án “Nghiên cứu chọn tạo giống lúa nếp có mùi thơm, chịu mặn cho vùng Đồng bằng sông Cửu Long”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Collard B. C. Y., Das A., Virk P. S. and Mackill D. J.,** 2007. Evaluation of ‘quick and dirty’ DNA extraction methods for marker-assisted selection in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breeding*, 126: 47-50.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L.,** 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Guidet F.,** 1994. A powerful new technique to quickly prepare hundreds of plant-extracts for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Res*, 22: 1772-1773.
- Ikeda N., N. S. Bautista, T. Yamada, O. Kamijima, and T. Ishii,** 2001. Ultra-simple DNA extraction method for marker-assisted selection using microsatellite markers in rice. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 19:27-32.
- Kim S., Yang J., An G., Jena K. K.,** 2016. A Simple DNA Preparation Method for High Quality Polymerase Chain Reaction in Rice. *Plant Breed. Biotech.*, 4: 99-106.
- Wang H., M. Q. Qi, and A. J. Cutler,** 1993. A simple method of preparing plant-samples for PCR. *Nucleic Acids Res*, 21: 4153-4154.
- Zhang Y., Feng C., Bie S., Wang X., Yi X., Zhang C., Qin H.,** 2016. An Improved TPS Method for Rapid DNA Extraction from Cotton Leaves. *Cotton Science*, 28 (4): 413-417.
- Zheng K., P. K. Subudhi, J. Domingo, G. Maopantay, and N. Huang,** 1995. Rapid DNA isolation for marker assisted selection in rice breeding. *Rice Genet. Newslett*, 12: 48p.

A comparison on efficiency and economy of three DNA extraction methods in rice

La Cao Thang, Ha Minh Luan, Bui Thanh Liem

Abstract

Three DNA extraction methods were used to assess their efficient and economical aspects for rice genotyping in breeding programs. Each method was assessed based on PCR amplification, chemical components, consumables and time requirement. The results showed that the NaOH-Tris method had the highest economical efficiency among three methods. The NaOH-Tris method was only done in two steps and consumed less reagents and consumables. This method produced nearly identical PCR amplification results to IRRI and CTAB methods. The NaOH-Tris method will be useful in Marker Assisted Breeding in basic laboratories in Vietnam.

Keywords: DNA extraction, efficiency, rice, PCR

Ngày nhận bài: 02/6/2020

Ngày phản biện: 13/6/2020

Người phản biện: TS. Đỗ Tấn Khang

Ngày duyệt đăng: 19/6/2020