

**Research Article****Validation of a real-time polymerase chain reaction method for detecting the nopaline synthase terminator gene in milk-based matrices****Dang Thi Huong\*, Pham Van Quan, Thieu Quang Thang, Pham Nhu Trong, Nguyen Thanh Trung***National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam**(Received: 26 Apr 2025; Revised: 8 Sep 2025; Accepted: 15 Sep 2025)***Abstract**

The nopaline synthase terminator (*T-nos*) is a transcriptional termination sequence originally derived from the Ti (tumor-inducing) plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*, a well-known soil bacterium capable of inducing crown gall disease in plants. In plant biotechnology, *T-nos* is widely employed as a functional regulatory element in expression cassettes to control the transcriptional termination of transgenes in genetically modified (GM) crops. The inclusion of *T-nos* ensures accurate termination of transcription, leading to the generation of stable and efficiently translatable mRNA transcripts, thereby enhancing the expression of the target gene. Due to its high compatibility with plant expression systems and consistent performance across diverse plant species, *T-nos* has become a standard terminator in the design of plant transformation vectors. The most frequently used method for detecting the presence of genetically modified material in food products is the screening of specific deoxyribonucleic acid (DNA) sequences, notably the CaMV 35S promoter and the *T-nos* terminator, using polymerase chain reaction (PCR) techniques. This study aimed to develop a real-time PCR assay targeting an 84 bp fragment of the *T-nos* sequence for the detection of GM material in milk-based matrices, using a TaqMan probe-based approach. Certified reference materials (CRMs) containing Roundup Ready soybean (GTS 40-3-2) and NK603 events were utilized for method development and optimization. The proposed method demonstrated high sensitivity, with a limit of detection (LOD) of 0.05%, and achieved 100% specificity and accuracy. These results indicate that the method is highly reliable and effective for the detection of trace amounts of GM-derived DNA containing the *T-nos* sequence in complex food matrices such as milk products.

**Keywords:** *real-time PCR, Nopaline synthase terminator, T-nos, GM.*

\*Corresponding author: Dang Thi Huong (E-mail: [danghuong243@gmail.com](mailto:danghuong243@gmail.com))  
<https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4547>

Copyright © 2025 The author(s). This article is licensed under [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

## Xác nhận phương pháp phát hiện gen Nopaline synthase terminator trong nền sữa bằng kỹ thuật Real-time Polymerase Chain Reaction

**Đặng Thị Hương, Phạm Văn Quân, Thiệu Quang Thắng, Phạm Như Trọng, Nguyễn Thành Trung**  
*Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, Hà Nội, Việt Nam*

### Tóm tắt

Nopaline synthase terminator (*T-nos*) là trình tự kết thúc phiên mã có nguồn gốc từ plasmid Ti (gây khối u) của *Agrobacterium tumefaciens*, được biết đến là một loại vi khuẩn đất có khả năng gây khối u trên thực vật. Trong lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật, *T-nos* được sử dụng rộng rãi như một thành phần chức năng trong các cassette biểu hiện gen nhằm điều khiển hoạt động của các transgene trong cây trồng biến đổi gen. Việc sử dụng *T-nos* đảm bảo rằng quá trình phiên mã được kết thúc đúng vị trí, giúp tạo ra các phân tử mRNA ổn định và có khả năng dịch mã hiệu quả, từ đó tăng cường biểu hiện của gen mục tiêu. Nhờ tính tương thích cao với hệ thống biểu hiện trong thực vật và khả năng hoạt động ổn định trong nhiều loài cây khác nhau, *T-nos* đã trở thành một trình tự kết thúc chuẩn mực trong thiết kế vector chuyển gen thực vật. Phương pháp được sử dụng thường xuyên nhất để phát hiện sự hiện diện của vật liệu biến đổi gen trong các thực phẩm là sàng lọc trình tự Deoxyribonucleic acid (DNA) khởi động CaMV 35S và trình tự DNA kết thúc *nos* dựa trên kỹ thuật PCR. Nghiên cứu này nhằm xây dựng phương pháp phát hiện gen *T-nos* (84 bp) trong nền sữa bằng kỹ thuật real time PCR kết hợp với đầu dò *T-nos*. Các vật liệu tham chiếu được chứng nhận có chứa đậu nành Roundup Ready GTS 40-3-2 và NK603 đã được sử dụng để phát triển và tối ưu hóa phương pháp. Phương pháp được đánh giá có độ nhạy cao với giới hạn phát hiện là 0,05%, độ đặc hiệu và độ chính xác đều đạt 100%.

**Từ khóa:** realtime PCR, Nopaline synthase terminator, *T-nos*, GM.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, một số loại cây trồng biến đổi gen đã được chấp thuận trồng và thương mại hóa ở nhiều quốc gia và khu vực khác nhau. Năm 2018, diện tích trồng cây trồng biến đổi gen trên toàn cầu đã đạt 191,7 triệu ha. Trong đó, đậu tương, ngô, bông và cải dầu biến đổi gen chiếm 99% tổng diện tích cây trồng biến đổi gen trên toàn cầu, với tỷ lệ diện tích tương ứng từng loại là 78%, 30%, 76% và 29% [1]. Nhận thức của công chúng về cây trồng biến đổi gen ngày càng gia tăng song song với quá trình phát triển và ứng dụng rộng rãi của các loại cây trồng này trong nông nghiệp. Để bảo vệ quyền của mình, người tiêu dùng cần được biết sản phẩm có chứa sinh vật biến đổi gen (Genetically Modified Organism-GMO) hay không. Quy định về nhãn thực phẩm biến đổi gen (Genetically Modified (GM) Label hoặc GM) được thực hiện ở nhiều quốc gia. Việc dán nhãn trên các sản phẩm có thành phần GM là bắt buộc ở một số quốc gia, chẳng hạn như Liên minh Châu Âu, Nhật Bản và Hàn Quốc. Ngưỡng dán nhãn lần lượt là 0,9; 5 và 3% [2]. Tại Việt Nam, Bộ Khoa học Công nghệ và Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn và Bộ Khoa học công nghệ đã ban hành thông tư liên tịch số 45/2015/TTLT-BNNVPTNT-BKHCN ngày 23/11/2015 về hướng dẫn ghi nhãn đối với thực phẩm biến đổi gen bao gói sẵn bắt buộc phải dán nhãn bằng tiếng việt có ghi rõ “biến đổi gen”. Sản phẩm đóng gói sẵn có ít nhất một thành phần nguyên liệu GM lớn hơn 5% tổng nguyên liệu được sử dụng đều phải ghi nhãn khi lưu thông tại thị trường Việt Nam. Do đó, cần phải giám sát việc tuân thủ dán nhãn GM. Thông thường, trong phân tích vật liệu GM, các yếu tố chuyển gen, trình tự nối giữa hai đoạn DNA liền kề và các mối nối giữa bộ gen thực vật và gen ngoại lai được sử dụng như đích nhắm để sàng lọc và phát hiện có chọn lọc theo cấu trúc hoặc theo từng sự kiện chuyển gen cụ thể. Một trong những yếu tố chuyển gen được ứng dụng phổ biến và có giá trị chẩn đoán cao là trình tự kết thúc phiên mã nopaline synthase (*T-nos*)[3] là một trong những yếu tố chuyển gen quan trọng nhất. *T-nos* là một trình tự điều hòa phiên mã có nguồn gốc từ plasmid Ti (Tumor-inducing plasmid) của *Agrobacterium tumefaciens*, một loại vi khuẩn đất có khả năng gây u sưng trên thực vật. Trong tự nhiên, *T-nos* đảm nhiệm vai trò kết thúc quá trình phiên mã của gen nopaline synthase, giúp ổn định phân tử mRNA và đảm bảo độ chính xác của quá trình biểu hiện gen. Trong công nghệ chuyển gen thực vật, *T-nos* được tích hợp như một phần không thể thiếu của cấu trúc gen tổng hợp (transgene cassette), thường nằm ở vị trí 3' của gen mục tiêu nhằm đảm bảo kết thúc phiên mã hiệu quả và hình thành mRNA ổn định cho dịch mã. *T-nos* không chỉ có chức năng sinh học rõ ràng mà còn mang tính bảo tồn cao, giúp các nhà nghiên cứu dễ dàng thiết kế các cặp mồi đặc hiệu để nhận diện bằng kỹ thuật PCR. Chính vì vậy, *T-nos* đã trở thành một trong

những marker (chỉ thị) phổ biến nhất trong các chiến lược sàng lọc, xác định và xác nhận sơ bộ vật liệu biến đổi gen. Việc phát hiện sự hiện diện của *T-nos* thông qua PCR – đặc biệt khi kết hợp với các yếu tố như promoter CaMV 35S - cho phép nhanh chóng đánh giá xem một mẫu thực phẩm hoặc cây trồng có khả năng chứa GM hay không, trước khi thực hiện các phân tích đặc hiệu theo sự kiện hoặc định lượng nâng cao. Tính phổ biến của *T-nos* trong các dòng cây trồng chuyển gen thương mại cũng góp phần củng cố giá trị của nó như một chỉ thị đầu tiên và đáng tin cậy trong các quy trình kiểm soát an toàn sinh học và truy xuất nguồn gốc thực phẩm biến đổi gen. Để giám sát sự hiện diện của các thành phần biến đổi gen, các phương pháp phát hiện thực phẩm biến đổi gen chủ yếu bao gồm các kỹ thuật dựa trên protein và axit nucleic (DNA) [4 - 6]. So với các phương pháp phát hiện dựa trên protein, các phương pháp dựa trên DNA có những ưu điểm rõ ràng về độ nhạy, độ chính xác, thời gian phát hiện nhanh chóng và giá thành phải chăng. Hầu như tất cả các phương pháp ghi nhận của luật đều dựa vào việc phát hiện định lượng GM trong phòng thí nghiệm; do đó, việc phát hiện và xác định các sản phẩm biến đổi gen phải dựa vào các phương pháp phát hiện nhạy hơn và thuận tiện hơn [7]. Hiện nay, tại Việt Nam đã có một số bộ sinh phẩm bán thương mại được phát triển nhằm phát hiện sinh vật biến đổi gen (GM) trong thực phẩm, trong đó nhiều bộ kit sử dụng trình tự *T-nos* làm mục tiêu phát hiện chủ yếu. Sở dĩ *T-nos* được lựa chọn là do mức độ phổ biến rộng rãi của nó trong các dòng cây trồng biến đổi gen thương mại, tính bảo tồn cao, và khả năng khuếch đại hiệu quả bằng kỹ thuật PCR. Tuy nhiên, phần lớn các nghiên cứu và bộ kit hiện có mới chỉ tập trung vào các sản phẩm từ thực vật, trong khi việc phát hiện GM trong các sản phẩm từ động vật như sữa và chế phẩm sữa vẫn còn ít được khai thác ở Việt Nam, dù nhu cầu thị trường đang gia tăng. Một số sản phẩm từ sữa có thể gián tiếp chứa thành phần từ cây biến đổi gen, dẫn đến khả năng tồn dư DNA GM trong sản phẩm cuối cùng. Trong bài báo này, chúng tôi đã chọn *T-nos* làm trình tự mục tiêu, sử dụng phương pháp real time PCR kết hợp đầu dò (probe) để sàng lọc nhanh *T-nos* trong quá trình phát hiện GM trong các sản phẩm từ sữa.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nhóm nghiên cứu tiến hành xây dựng và thẩm định trên nền mẫu chuẩn, nền mẫu sữa và ứng dụng vào 3 loại sữa: sữa bắp, sữa đậu nành, sữa tươi được thu thập ngẫu nhiên tại các cửa hàng trên địa bàn Hà Nội.

### 2.2. Hóa chất, mẫu chuẩn

#### 2.2.1. Hóa chất chính

TaqMan Universal PCR Master Mix (2X) (Thermo), Bộ hóa chất tách chiết DNA (TopPURE FOOD DNA EXTRACTION KIT) (Việt Nam), Primer (IDT), Probe (IDT), dải ống realtime-PCR (Thermo), Găng tay cao su không bột (Việt Nam).

#### 2.2.2. Mẫu chuẩn

Các mẫu chuẩn sử dụng trong nghiên cứu bao gồm:

- Các mẫu chuẩn đối chiếu Châu Âu ERM BCR và IRMM được sản xuất và cung cấp bởi Directorate General Joint Research Centre (JRC) bao gồm: Bt176 maize code BF 411f, MON 863 maize code BF 416dk, GA 21 maize code BF 414fk, Bt11 maize code BF 412e, GTS 40-3-2 maize code BF 410 gk, NK603 maize code BF 415f.

- Các mẫu (các nền mẫu như phụ gia thực phẩm, gạo, dầu đậu nành, nguyên liệu thực phẩm, thực phẩm bổ sung thức uống dinh dưỡng, sữa bắp, sữa đậu nành) sử dụng làm chứng âm trong nghiên cứu đã được kiểm tra ban đầu là không phát hiện thực phẩm biến đổi gen dựa trên promoter 35s bằng kỹ thuật realtime-PCR đang được lưu giữ tại Viện kiểm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia và được mã hóa, ký hiệu bao gồm: 261; 445; 043; 851; 913; 446; 755; 876; 500; 685.

### 2.3. Thiết bị

Máy Real time PCR 7500 (Thermo), máy đo nồng độ DNA/protein Nanodrop 1000 (Thermo), máy li tâm lạnh Mikro 200 (Hettich), máy phá vỡ tế bào (Labnet), máy lắc xoáy vortex (IKA), spindown (Gene Reach), Pipetman và đầu tip các kích cỡ 1-10 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL (Eppendorf/Đức) và các thiết bị phụ trợ khác.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1 Phương pháp tách chiết DNA

Mẫu được đồng nhất, tách chiết DNA theo bộ hóa chất tách chiết DNA (Toppure food DNA extraction kit) (Việt Nam). Chất lượng và số lượng DNA chiết xuất từ các mẫu được ước tính bằng phương pháp quang phổ sử dụng máy quang phổ Nanodrop 1000 ở độ hấp thụ 260 nm (A260) và 280 nm (A280). Độ tinh khiết của DNA được xác định bằng tỷ lệ A260/A280. Dung dịch sau tách chiết có mật độ quang OD<sub>260</sub> từ 1,8 - 2,0 được sử dụng để phân tích realtime-PCR.

2.4.2 Phương pháp realtime PCR khuếch đại gen đích

Mỗi được tham khảo theo trình tự gen (*T-nos* từ *Agrobacterium tumefaciens*, có kích thước 84 bp từ tác giả Reiting et al., 2007 (JRC) [8, 9]. Trình tự mỗi được trình bày trong **Bảng 1** và thành phần phản ứng và chu trình nhiệt được trình bày ở **Bảng 2**.

**Bảng 1.** Trình tự cặp mỗi đặc hiệu gen *T-nos*

| Trình tự mỗi                                                         | Kích thước sản phẩm | Gen đích     | Tài liệu tham khảo |
|----------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------|--------------------|
| Mỗi xuôi Tnos F: 5'-CAT GTA ATG CAT GAC GTT ATT TAT G-3'             | 84 bp.              | <i>T-nos</i> | [8, 9]             |
| Mỗi ngược Tnos R: 5'-TTG TTT TCT ATC GCG TAT TAA ATG T-3'            |                     |              |                    |
| Đầu dò Tnos P: 5'-FAM-ATG GGT TTT TAT GAT TAG AGT CCC GCA A-TAMRA-3' |                     |              |                    |

**Bảng 2.** Thành phần phản ứng và quy trình nhiệt gen *T-nos* [8, 9]

|                            |                                    |                          |
|----------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| <b>Thành phần phản ứng</b> | QuantiTect Probe PCR kit (Qiagen), | 1X                       |
|                            | 2X                                 |                          |
|                            | ADN khuôn (100 – 200 ng)           | 100 - 200 ng             |
|                            | Mỗi xuôi (10 µM)                   | 0,4 µM                   |
|                            | Mỗi ngược (10 µM)                  | 0,4 µM                   |
|                            | Đầu dò- P, 10 µM                   | 0,1 µM                   |
| <b>Chu trình nhiệt</b>     | Thêm nước đến                      | 25 µL                    |
|                            | Bước 1                             | Biến tính ban đầu        |
|                            | Bước 2                             | 45 chu kì tiếp theo gồm: |
|                            |                                    | Biến tính                |
|                            |                                    | Gắn mỗi                  |
|                            |                                    |                          |

2.4.3 Thẩm định phương pháp

Các thông số bao gồm giới hạn phát hiện (LOD), độ chính xác (accuracy-AC, ≥ 95%), độ đặc hiệu (Specificity- SP, ≥ 95%), độ nhạy (sensitivity-SE, ≥ 95%), được xác định dựa trên các công thức sau[10, 11]:

Độ chính xác (Accuracy-AC):  $AC = \frac{TP+TN}{N} \times 100$

Độ nhạy (Sensitivity-SE):  $SE = \frac{TP}{TP+FN} \times 100$

Độ đặc hiệu (Specificity-SP):  $SP = \frac{TN}{TN+FP} \times 100$

Trong đó:

TP (True positive): dương tính đúng

TN (True negative): âm tính đúng

FP (False positive): dương tính giả

FN (False negative): âm tính giả

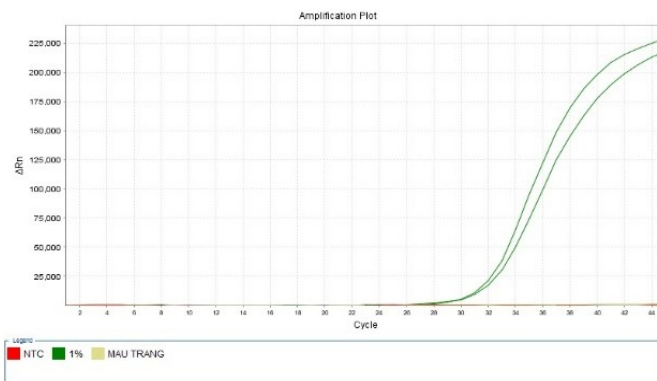
N: tổng số mẫu phân tích

### 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

#### 3.1. Kiểm tra sự khuếch đại cặp mồi *nopaline synthase terminator* và mẫu ngô không chứa gen *nopaline synthase terminator (T-nos)* (mẫu trắng)

Nhóm nghiên cứu tiến hành 2 thí nghiệm: thí nghiệm 1- Sử dụng vật liệu chuẩn NK603 (code BF 415d – 1% GM) để kiểm tra khả năng khuếch đại của cặp mồi đặc hiệu cho gen *nopaline synthase terminator (T-nos)*. Thí nghiệm 2- Tìm mẫu ngô không chứa gen đích để làm mẫu trắng sử dụng cho các thử nghiệm tiếp theo. DNA từ cả hai mẫu được tách chiết theo mục 2.4.1 và tiến hành phản ứng khuếch đại theo mục 2.4.2.

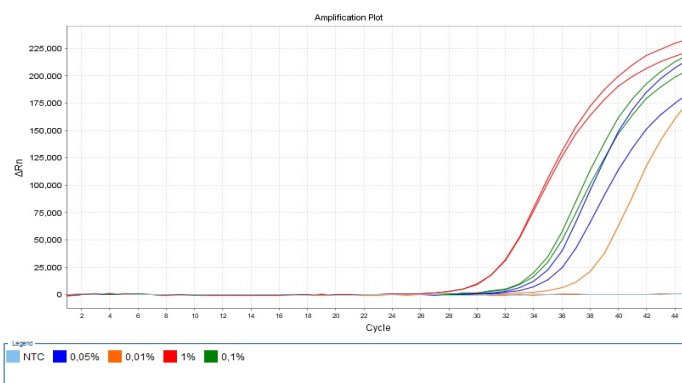
Kết quả từ **Hình 1** cho thấy, thí nghiệm với vật liệu chuẩn NK603 xuất hiện đường cong khuếch đại điển hình với giá trị  $C_t$  xấp xỉ 31.12, chứng tỏ sự hiện diện của gen *T-nos* trong mẫu. Ngược lại, thí nghiệm với mẫu ngô không chứa gen đích (mẫu trắng) không xuất hiện đường cong khuếch đại điển hình, và giá trị  $C_t$  nằm dưới ngưỡng nền, cho thấy không có tín hiệu khuếch đại, đồng nghĩa với việc gen *T-nos* không hiện diện trong mẫu.



**Hình 1.** Đường khuếch đại điển hình của vật liệu chuẩn NK 603 và mẫu ngô không chứa gen đích

#### 3.2. Giới hạn phát hiện của phương pháp (LOD)

Giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp là mức phân tích ở mức GM thấp nhất mà ở đó có ít nhất 95% mẫu phân tích có kết quả dương tính. Để xác định LOD, tiến hành khảo sát các hàm lượng ADN biến đổi gen khác nhau: 1%; 0,1%; 0,05%; 0,01% được dùng làm khuôn trong phản ứng realtime PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu kết hợp với đầu dò nhân gen *nopaline synthase terminator (T-nos)*. Kết quả thu được thể hiện trong **Hình 2** và **Bảng 3**.



**Hình 2.** Đường khuếch đại điển hình của các mẫu có hàm lượng NK 603 khác nhau (1%-0,01%).

Kết quả từ **Hình 2** và **Bảng 3** cho thấy, tại hàm lượng 0,01% ngưỡng chu kỳ  $C_t$  xấp xỉ 37.35. Vì vậy hàm lượng 0,01% được dự đoán là hàm lượng thấp nhất mà phương pháp có thể phát hiện được gen đích. Để xác định giới hạn phát hiện, phản ứng được lặp lại 10 lần tại hàm lượng gen đích là 0,01%, nhưng số phản ứng phát hiện được gen đích không đạt  $\geq 95\%$ . Vì thế, thí nghiệm được lặp lại 10 lần với hàm lượng gen đích là 0,05%. Kết quả cho thấy, tỉ lệ % phát hiện tại hàm lượng gen đích 0,05% là 100%, với giá trị  $C_t$  trung bình là 35.27. Do vậy, giới hạn phát hiện của phương pháp (LOD) là: 0,05%.

**Bảng 3.** Giá trị ngưỡng chu kỳ (Ct) của các mẫu có hàm lượng NK 603 khác nhau (1%-0,01%).

| STT | Tên mẫu | Hàm lượng GM (%) | Giá trị ngưỡng chu kỳ (Ct) |       | Giá trị trung bình ngưỡng chu kỳ (TB Ct) |
|-----|---------|------------------|----------------------------|-------|------------------------------------------|
|     |         |                  | Lần 1                      | Lần 2 |                                          |
| 1   | N1      | 1%               | 30,66                      | 30,69 | 30,68                                    |
| 2   | N2      | 0,1%             | 33,55                      | 33,82 | 33,69                                    |
| 3   | N3      | 0,05%            | 34,29                      | 35,07 | 34,68                                    |
| 4   | N4      | 0,01%            | NA                         | 37,35 |                                          |
| 5   | N5      | 0% (NTC)         | NA                         |       |                                          |

### 3.3. Độ chính xác, độ đặc hiệu và độ nhạy của phương pháp

Phản ứng Realtime-PCR được tiến hành nhằm kiểm tra sự hiện diện của gen đích *T-nos* trong các mẫu DNA đã được mã hóa. Tổng cộng có 22 mẫu DNA (20 mẫu, 1 chứng dương, 1 NTC) được phân tích, 22 mẫu chia thành hai nhóm chính:

Nhóm 1 – Mẫu âm tính với gen đích *T-nos*: Gồm 10 mẫu DNA được xác định không chứa gen đích, bao gồm các mẫu có mã số: 445, 043, 876, 851, 913, 446, 685, 755, 500, 261.

Nhóm 2 – Mẫu dương tính với gen đích *T-nos*: Gồm 1 chứng dương, 1 NTC và 10 mẫu DNA trong đó: 4 mẫu là vật liệu chuẩn có chứa gen đích bao gồm: MON 863, GA21, Bt11, GTS 40-3-2 và 6 mẫu là các mẫu âm tính thuộc nhóm 1 đã được "spike" (bổ sung) DNA chuẩn NK603 (chứa gen đích) ở nồng độ 4,91% và 1%, bao gồm: SP 755, SP 876, SP 500, SP 261, SP 445, SP 043.

Giá trị Ct của 2 nhóm mẫu trên được thể hiện trong **Bảng 4**.

**Bảng 4.** Giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) của 2 nhóm mẫu nhóm 1 và nhóm 2

| STT                                                                     | Tên mẫu               | Giá trị ngưỡng chu kỳ (Ct) |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| <i>Nhóm 1: 10 mẫu DNA âm tính với gen đích</i>                          |                       |                            |
| 1                                                                       | 445                   | NA                         |
| 2                                                                       | 043                   | NA                         |
| 3                                                                       | 876                   | NA                         |
| 4                                                                       | 851                   | NA                         |
| 5                                                                       | 913                   | NA                         |
| 6                                                                       | 446                   | NA                         |
| 7                                                                       | 685                   | NA                         |
| 8                                                                       | 755                   | NA                         |
| 9                                                                       | 500                   | NA                         |
| 10                                                                      | 261                   | NA                         |
| <i>Nhóm 2: 10 mẫu DNA dương tính với gen đích, 1 chứng dương, 1 NTC</i> |                       |                            |
| 11                                                                      | SP775                 | 30,60                      |
| 12                                                                      | SP876                 | 28,06                      |
| 13                                                                      | SP500                 | 31,99                      |
| 14                                                                      | SP261                 | 29,98                      |
| 15                                                                      | MON863                | 27,60                      |
| 16                                                                      | GA21                  | 27,63                      |
| 17                                                                      | Bt11                  | 32,08                      |
| 18                                                                      | GTS 40-3-2            | 30,74                      |
| 19                                                                      | SP445                 | 27,55                      |
| 20                                                                      | SP043                 | 22,50                      |
| 21                                                                      | NTC                   | NA                         |
| 22                                                                      | Chứng dương NK 603 1% | 29,73                      |

Kết quả trong **Bảng 4** cho thấy: đối với nhóm mẫu DNA dương tính với gen đích-nhóm 2: 10 mẫu dương tính với gen đích *T-nos* đều có đường cong khuếch đại điển hình. Trong khi đó, đối với nhóm mẫu DNA âm tính với gen đích-nhóm 1: 10/10 mẫu không có đường cong khuếch đại điển hình. Kết quả cho thấy phương pháp Realtime-PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu kết hợp với đầu dò có khả năng phát hiện chính xác sự hiện diện của gen *T-nos* có chứa trong mẫu. Độ chính xác, độ đặc hiệu và độ nhạy cũng đã được xác định dựa trên công thức trình bày trong 2.4.3 và có giá trị đều bằng 100%.

**3.4. Giới hạn phát hiện (LOD) trên nền mẫu sữa ngô bổ sung mẫu chuẩn có gen nopaline synthase terminator (*T-nos*)**

Mẫu ADN tách chiết từ sữa ngô không chứa gen *T-nos* được bổ sung thêm chuẩn gen *T-nos* thành các mẫu có hàm lượng biến đổi gen (GM) khác nhau. Sau đó khảo sát ở các hàm lượng GM: 1%; 0,1%; 0,05%, 0,01%. Kết quả thu được thể hiện trong **Bảng 5**.

***Bảng 5.** Giá trị ngưỡng chu kỳ (Ct) trên nền sữa ngô bổ sung hàm lượng mẫu chuẩn NK 603 khác nhau (1%-0,01%).*

| STT | Tên mẫu | Hàm lượng GM (%) | Giá trị ngưỡng chu kỳ (Ct) |       | Giá trị trung bình ngưỡng chu kỳ (TB Ct) |
|-----|---------|------------------|----------------------------|-------|------------------------------------------|
|     |         |                  | Lần 1                      | Lần 2 |                                          |
| 1   | Nmt1    | 1%               | 30,18                      | 30,02 | 30,10                                    |
| 2   | Nmt2    | 0,1%             | 32,93                      | 33,52 | 33,22                                    |
| 3   | Nmt3    | 0,05%            | 34,33                      | 35,86 | 35,10                                    |
| 4   | Nmt4    | 0,01%            | 37,53                      | NA    |                                          |
| 5   | Nmt5    | 0% (NTC)         | NA                         |       |                                          |

Kết quả từ **Bảng 5** cho thấy, tại hàm lượng 0,01% ngưỡng chu kỳ Ct xấp xỉ 37,53 và “không xác định”. Vì vậy giới hạn phát hiện được xác định tại hàm lượng gen đích là 0,05%. Để xác định giới hạn phát hiện, mẫu ADN tách chiết từ sữa ngô không chứa gen *T-nos* được bổ sung chuẩn có chứa gen *T-nos* với hàm lượng tương đương 0,05% GM và thực hiện lặp lại 10 lần. Kết quả cho thấy trong 10 lần lặp lại, phản ứng đạt 100% dương tính nền mẫu sữa ngô, với Ct trung bình là 35,741.

**3.5. Phân tích mẫu thực tế**

Kiểm tra có mặt hoặc không có mặt các mẫu sữa có chứa gen đích *T-nos* được thu thập trên thị trường Hà Nội. Các loại sữa: sữa bắp (10 mẫu), sữa đậu nành (9 mẫu), sữa tươi (5 mẫu) được thu thập ngẫu nhiên tại các cửa hàng trên địa bàn Hà Nội **Bảng 6**.

***Bảng 6.** Danh sách các mẫu sữa ngô, sữa đậu nành, sữa tươi thu thập trên thị trường*

| STT | Tên                                 | Mã hóa | Thành phần chính                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----|-------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | Sữa bắp non 180 mL                  | 11500  | Nước, bắp non (100 g/L), đường kính, bột sữa (28 g/L), chất béo thực vật, maltodextrin, chất xơ hòa tan, chất ổn định, hương liệu tổng hợp, chất tạo màu, muối, vitamin.                                                                                                                                                                               |
| 2   | Sữa ngô                             | 26021  | Không công bố                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 3   | Sữa ngô                             | 26022  | Không công bố                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 4   | Sữa ngô                             | 26023  | Không công bố                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 5   | Sữa đậu nành                        | 26024  | Không công bố                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 6   | Sữa đậu nành                        | 26025  | Không công bố                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 7   | Sữa ngô                             | 04031  | Không công bố                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 8   | Sữa ngô                             | 04032  | Không công bố                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 9   | Sữa hạt: 9 loại hạt ít đường 180 mL | 04033  | Sữa hạt (94,4%) (sữa chiết từ hạnh nhân nghiền, sữa chiết từ đậu nành nguyên hạt, nước, dầu thực vật, đậu phộng nghiền, chiết xuất đậu đỏ, bột yến mạch, chiết xuất hạt óc chó, chiết xuất đậu đen, chiết xuất đậu xanh, chiết xuất đậu trắng) đường (4,7%) chất nhũ hóa, khoáng chất, hương liệu tổng hợp, muối ăn, vitamin, chất điều chỉnh độ axit. |
| 10  | Sữa ngô                             | 04034  | Không công bố                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

| STT | Tên                                                            | Mã hóa | Thành phần chính                                                                                                                                                                                                          |
|-----|----------------------------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11  | Sữa hạt đậu nành<br>đậu đỏ ít đường<br>180 mL                  | 04035  | Sữa chiết từ hạt đậu nành nguyên hạt (63,8%), nước, đường (6%), chiết xuất đậu đỏ (16,6 g/L), dầu thực vật, chất nhũ hóa, sữa bột dừa, nguyên liệu tổng hợp, muối ăn, vitamin.                                            |
| 12  | Sữa đậu nành tươi                                              | 04036  | Dịch trích từ hạt đậu nành (50,3%), nước, sữa tươi (10%), đường, dầu thực vật, chất ổn định, calci carbonat, hương đậu xanh và hương vani tổng hợp dùng cho thực phẩm, chất điều chỉnh độ acid, muối ăn, vitamin.         |
| 13  | Sữa hạt đậu nành<br>óc chó ít đường<br>180 mL                  | 04037  | Sữa chiết từ hạt đậu nành nguyên hạt (48,5%), nước, đường (5%), dầu thực vật, đậu phộng nghiền, chiết xuất hạt óc chó (5,1g/L), muối ăn, nguyên liệu tổng hợp, chiết xuất các loại đậu, vitamin, chất điều chỉnh độ axit. |
| 14  | Sữa tươi thanh<br>trùng Dalat milk<br>hương dâu                | 04038  | Sữa bò tươi nguyên chất (93,5%), đường, hương liệu tự nhiên (hương dâu), màu tự nhiên carmin.                                                                                                                             |
| 15  | Sữa đậu nành<br>super soy nguyên<br>chất                       | 04039  | Dịch trích từ hạt đậu nành (71%), nước, đường, chất nhũ hóa, hương liệu tổng hợp dùng cho thực phẩm, chất điều chỉnh độ acid, muối ăn.                                                                                    |
| 16  | Sữa tươi thanh<br>trùng ít đường<br>Mộc Châu                   | 040310 | Sữa tươi (97,4%), đường (2,5%), hương sữa tổng hợp dùng cho thực phẩm.                                                                                                                                                    |
| 17  | Sữa tươi nguyên<br>chất thanh trùng<br>không đường Mộc<br>Châu | 06031  | Sữa tươi 100%                                                                                                                                                                                                             |
| 18  | Sữa tươi tiệt trùng<br>ít đường TH                             | 06032  | Sữa hoàn toàn từ sữa bò tươi (97%), đường (2,8%), chất ổn định                                                                                                                                                            |
| 19  | Sữa tươi tiệt trùng<br>ít đường                                | 06033  | Sữa từ 100% sữa tươi (97,1%) / Fresh milk (97.1%), đường (2,7%), chất ổn định* (471, 460(i), 407, 466), vitamin (A, D3), khoáng chất/ mineral                                                                             |
| 20  | Sữa ngô                                                        | 17031  | Không công bố                                                                                                                                                                                                             |
| 21  | Sữa ngô                                                        | 17032  | Không công bố                                                                                                                                                                                                             |
| 22  | Sữa ngô                                                        | 17033  | Không công bố                                                                                                                                                                                                             |
| 23  | Sữa đậu nành Fami<br>canxi 200 mL                              | 17034  | Nước, dịch trích từ đậu nành hạt (40%), đường (8,5%), Calci (0,18%), chất ổn định, dầu đậu nành, hương liệu giống tự nhiên dùng cho thực phẩm, vitamin, khoáng chất, muối ăn, chất điều chỉnh độ acid.                    |
| 24  | Sữa đậu nành Fami<br>green soy ít đường<br>200 mL              | 17035  | Dịch trích từ đậu nành hạt (96,2%, nước, đậu nành hạt), đường (3,5%), chất ổn định, hương liệu giống tự nhiên dùng cho thực phẩm, muối ăn.                                                                                |

Khảo sát 6 mẫu được mã hóa như sau: 11500; 26021; 26022; 26023; 26024; 26025. Kết quả được thể hiện như **Bảng 7**.

**Bảng 7.** Giá trị ngưỡng chu kỳ (Ct) của 6 mẫu thực với gen đích T-nos.

| STT | Tên mã mẫu            | Giá trị ngưỡng chu kỳ (Ct) |       |
|-----|-----------------------|----------------------------|-------|
|     |                       | Lần 1                      | Lần 2 |
| 1   | NTC                   | NA                         |       |
| 2   | Chứng dương NK 603 1% | 30,22                      |       |
| 3   | 26021                 | NA                         | NA    |
| 4   | 26022                 | NA                         | NA    |
| 5   | 26023                 | NA                         | NA    |
| 6   | 26024                 | NA                         | NA    |
| 7   | 26025                 | NA                         | NA    |
| 8   | 26026                 | NA                         | NA    |

Kết quả cho thấy 6 mẫu thu thập đầu tiên đều không chứa gen *T-nos*. Do đó, khảo sát 18 mẫu tiếp theo mã hóa bao gồm: 04031; 04032; 04033; 04034; 04035; 04036; 04037; 04038; 04039; 040310; 06031; 06032; 06033, 17031; 17032; 17033; 17034; 17035 chúng tôi sẽ tiến hành vừa phân tích mẫu thực kết hợp với thêm mẫu chuẩn vào từng nền mẫu thực để đánh giá ảnh hưởng của nền mẫu thực gen nghiên cứu (*T-nos*). Kết quả được thể hiện như **Bảng 8**.

**Bảng 8.** Giá trị ngưỡng chu kỳ (Ct) của 18 mẫu thực và mẫu thêm chuẩn với gen đích *T-nos*.

| STT | Tên mã mẫu            | Giá trị ngưỡng chu kỳ (Ct) |       |
|-----|-----------------------|----------------------------|-------|
|     |                       | Lần 1                      | Lần 2 |
| 1   | NTC                   |                            | NA    |
| 2   | Chứng dương NK 603 1% |                            | 29,28 |
| 3   | spike04031            |                            | 30,27 |
| 4   | 04031                 | NA                         | NA    |
| 5   | spike04032            |                            | 31,35 |
| 6   | 04032                 | NA                         | NA    |
| 7   | spike04033            |                            | 29,70 |
| 8   | 04033                 | NA                         | NA    |
| 9   | spike04034            |                            | 31,19 |
| 10  | 04034                 | NA                         | NA    |
| 11  | Spike04035            |                            | 29,49 |
| 12  | 04035                 | NA                         | NA    |
| 13  | Spike04036            |                            | 30,00 |
| 14  | 04036                 | NA                         | NA    |
| 15  | Spike04037            |                            | 29,48 |
| 16  | 04036                 | NA                         | NA    |
| 17  | Spike04038            |                            | 30,71 |
| 18  | 04038                 | NA                         | NA    |
| 19  | Spike04039            |                            | 29,21 |
| 20  | 04039                 | NA                         | NA    |
| 21  | Spike040310           |                            | 30,68 |
| 22  | 040310                | NA                         | NA    |
| 23  | Spike06031            |                            | 29,29 |
| 24  | 06031                 | NA                         | NA    |
| 25  | Spike06032            |                            | 29,37 |
| 26  | 06032                 | NA                         | NA    |
| 27  | Spike06033            |                            | 29,36 |
| 28  | 06033                 | NA                         | NA    |
| 29  | Spike17031            |                            | 30,92 |
| 30  | 17031                 | NA                         | NA    |
| 31  | Spike17032            |                            | 31,71 |
| 32  | 17032                 | NA                         | NA    |
| 33  | Spike17033            |                            | 29,96 |
| 34  | 17033                 | NA                         | NA    |
| 35  | Spike17034            |                            | 30,40 |
| 36  | 17034                 | NA                         | NA    |
| 37  | Spike17035            |                            | 30,90 |
| 38  | 17035                 | NA                         | NA    |

Kết quả từ **Bảng 8** cho thấy, trong 18 mẫu thu thập được, kết quả cho thấy trong toàn bộ chu kỳ khuếch đại bằng Real-time PCR, không có mẫu nào xuất hiện tín hiệu khuếch đại đặc hiệu đối với trình tự *T-nos*. Không ghi nhận giá trị Ct hoặc Ct > 36, cho thấy không có sự hiện diện của trình tự mục tiêu trong các mẫu thử nghiệm. Do đó, có thể kết luận rằng tất cả 18 mẫu thực phẩm khảo sát đều âm tính với gen *T-nos*. Kết quả phân tích cho thấy nền mẫu không gây ảnh hưởng đến hiệu quả phản ứng PCR, cụ thể không ghi nhận tín hiệu khuếch đại không đặc hiệu trong các phản ứng và đường baseline ổn định trên toàn bộ chu kỳ, không có tín hiệu giả hoặc nhiễu nền, đảm bảo độ chính xác của dữ liệu phát hiện. Về kiểm soát quá trình phản ứng, mẫu đối chứng âm (NTC) không xuất hiện khuếch đại, xác nhận không có hiện tượng nhiễm chéo hoặc nhiễm hóa chất. Mẫu đối chứng dương (chứa gen *T-nos*) khuếch đại thành công với đường cong huỳnh quang sigmoid điển hình và giá trị Ct phù hợp, chứng tỏ quá trình phản ứng và các thành phần hóa chất hoạt động ổn định và chính xác.

### 3.6. Bàn luận

Việc giám sát sự hiện diện của vật liệu biến đổi gen trong thực phẩm là yêu cầu quan trọng trong bối cảnh ngày càng nhiều sản phẩm biến đổi gen được thương mại hóa toàn cầu. Kỹ thuật Realtime-PCR hiện đang là phương pháp được lựa chọn phổ biến trong phát hiện GM nhờ ưu điểm vượt trội về độ nhạy, độ đặc hiệu, thời gian phân tích nhanh và chi phí hợp lý [7]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác nhận thành công phương pháp phát hiện gen *T-nos*, một trong những yếu tố chuyển gen phổ biến nhất trong cây trồng biến đổi gen thương mại, trên nền mẫu thực phẩm là 3 loại sữa: sữa bắp, sữa đậu nành, sữa tươi.

Kết quả cho thấy, phương pháp đạt giới hạn phát hiện (LOD) là 0,05%, với độ chính xác, độ nhạy và độ đặc hiệu đạt 100%. Các giá trị này hoàn toàn đáp ứng tiêu chí thẩm định phương pháp quốc tế theo Codex Alimentarius (CAC, 2010) [11]. Khi so sánh với các nghiên cứu trước đó như nghiên cứu của Grohmann et al. (2007) [12] có giới hạn phát hiện là 0,1%, và nghiên cứu của Leimanis et al. (2008) [13] đạt 0,045%, đặc biệt là khi áp dụng được trên nền sữa thực tế, trong khi một số nghiên cứu chỉ dừng lại ở nền tinh khiết, kết quả của chúng tôi chứng minh mức độ nhạy tương đương, đồng thời có ưu thế là được triển khai thành công trên nền mẫu thực tế thay vì chỉ là mẫu DNA tinh khiết.

Một điểm nổi bật khác là khả năng chịu nhiễu nền mẫu của phương pháp tốt. Trên 24 mẫu sữa có nguồn gốc khác nhau, bao gồm sữa bắp, sữa đậu nành và sữa tươi thu thập trên thị trường Hà Nội, phương pháp không ghi nhận khuếch đại giả, nhiễu nền hoặc tín hiệu không đặc hiệu. Các mẫu được thêm chuẩn gen *T-nos* (spike) đều cho tín hiệu khuếch đại rõ ràng, khẳng định tính ổn định và tính lặp lại cao của phản ứng PCR. Điều này rất quan trọng vì nền sữa chứa nhiều thành phần như chất béo, protein, polysaccharide có thể gây ức chế phản ứng PCR nếu phương pháp không được tối ưu tốt (Zhou et al., 2016) [4].

Ngoài ra, việc không phát hiện tín hiệu gen *T-nos* trên toàn bộ 24 mẫu sữa khảo sát cho thấy các sản phẩm này không chứa hoặc chứa dưới ngưỡng phát hiện DNA biến đổi gen. Tuy nhiên, với xu hướng sử dụng nguyên liệu từ cây biến đổi gen làm thức ăn chăn nuôi và nguyên liệu chế biến ngày càng phổ biến, việc duy trì hệ thống sàng lọc chủ động và nhạy bén như phương pháp này là hết sức cần thiết để đảm bảo tính minh bạch và an toàn thực phẩm (Holst-Jensen et al., 2003) [3].

Tuy *T-nos* là một chỉ thị thông dụng trong chiến lược sàng lọc GM, phương pháp này cũng có thể được mở rộng kết hợp với các mục tiêu khác như promoter CaMV 35S hoặc các trình tự đặc hiệu theo sự kiện chuyển gen (event-specific junctions) để tăng độ chính xác và khả năng định danh nguồn gốc (Cottenet et al., 2013) [5].

Tóm lại, phương pháp phát hiện gen *T-nos* bằng kỹ thuật real-time PCR trong nghiên cứu này đã được chứng minh có hiệu quả cao, ứng dụng tốt trên nền thực phẩm thực tế, phù hợp để sử dụng trong giám sát nhân GMO, kiểm nghiệm thực phẩm, và quản lý an toàn sinh học trong bối cảnh Việt Nam hiện nay.

### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công phương pháp phát hiện gen Nopaline synthase terminator bằng kỹ thuật Real-time PCR trên nền mẫu chuẩn và nền mẫu sữa ngô. Phương pháp cho kết quả ổn định, độ nhạy cao (LOD = 0,05%), và đạt 100% độ đặc hiệu, độ chính xác và độ nhạy, đồng thời không bị ảnh hưởng bởi nền mẫu phức tạp. Kết quả khảo sát 24 mẫu thực phẩm thu thập từ thị trường Hà Nội cho thấy không phát hiện sự

hiện diện của gen *T-nos*, khẳng định tính ứng dụng thực tiễn cao của phương pháp trong giám sát GMO và đảm bảo an toàn sinh học thực phẩm.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. L. Thị, T. Hải, H. Nga, N. P. Thúy, and L. T. Linh, “Genetically modified crops in the context of modern agriculture-benefits and risks,” *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*, vol. 6, no. 115, 2020 [in Vietnamese].
- [2]. Colin A. Carter, Guillaume P. Gruere, “International Approaches to the Labeling of Genetically Modified Foods,” *The magazine of food, farm and resource*, issues, second quarter, 2003.
- [3]. Arne Holst-Jensen, Sissel B. Rønning, Astrid Løvseth, Knut G. Berdal, “PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs),” *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 375, no. 8, pp 985-993, 2003.
- [4]. D. Zhou et al., “Detection of Bar Transgenic Sugarcane with a Rapid and Visual Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay,” *Frontiers in Plant Science*, vol. 8, no.7, p. 279, 2016.
- [5]. G. Cottenet, C. Blancpain, V. Sonnard, and P. F. Chuah, “Development and validation of a multiplex real-time PCR method to simultaneously detect 47 targets for the identification of genetically modified organisms,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 405, no. 21, pp. 6831–6844, 2013.
- [6]. S. Meriç, Ö. Çakır, N. Turgut-Kara, and Ş. Arı, “Detection of genetically modified maize and soybean in feed samples,” *Genetics and Molecular Research*, vol. 13, no. 1, pp. 1160–1168, 2014.
- [7]. M. B. Gašparič et al., “Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 396, no. 6, pp. 2023-2029, 2010.
- [8]. Reiting et al., “Qualitative PCR method for detection of nopaline synthase terminator,” *GMOMETHODS European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EURL GMFF)*, 2007.
- [9]. R. Reiting, H. Broll, H. U. Waiblinger, and L. Grohmann, “Collaborative study of a *T-nos* real-time PCR method for screening of genetically modified organisms in food products,” *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, vol. 2, no. 2, pp. 116–121, 2007.
- [10]. Tran Cao Son, Le Thi Hong Hao et al., Method validation and evaluation of measurement uncertainty in chemical analysis, Science and Technology Publishing, 2021 [In Vietnamese].
- [11]. C. A. Commission, “Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific dna sequences and specific proteins in foods,” pp.74,2010.
- [12]. R. Reiting, H. Broll, H. U. Waiblinger, and L. Grohmann, “Collaborative study of a *T-nos* real-time PCR method for screening of genetically modified organisms in food products,” *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, vol. 2, no. 2, pp. 116–121, 2007.
- [13]. S. Leimanis et al., “Validation of the performance of a GMO multiplex screening assay based on microarray detection,” *European Food Research and Technology*, vol. 227, no. 6, pp. 1621–1632, 2008.