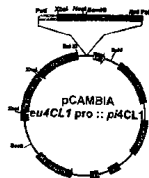


Vector tách dòng pJET 1.2 Blunt chứa gen *pi4CL1* (phân lập từ Thông đuôi ngựa) và promoter *eu4CL1* (phân lập từ Bạch Đàn Trắng) của phòng Đa dạng hệ gen, Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Cùng với, các vector trung gian pRTRA7/3, vector biểu hiện thực vật pCAMBIA1300, vi khuẩn *E. coli* chủng DH10b, vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng C58 (pGV2260) để phục vụ cho quá trình nghiên cứu.

Các cặp mồi cho PCR được liệt kê tại Bảng 1.

Bảng 1. Các mồi được sử dụng trong nghiên cứu

| STT | Tên mồi         | Trình tự                                |
|-----|-----------------|-----------------------------------------|
| 1   | Pro4CL1XbaI0.8F | 5' CGT TCTAGA GTG TAG ATA AGG GAT 3'    |
| 2   | Pro4CL1NcoI R   | 5' CGT CCATGG GAG AAT CGA GAG ACA 3'    |
| 3   | Po4CL1BamHI     | 5' GCCACAGGATCCATCCACAAGAA 3'           |
| 4   | Po4CL1NotI      | 5' GTTCACGCGGCCGCTATGCCCTGCC 3'         |
| 5   | 35S promoter    | 5' CAC TGA CGT AAG GGA TGA CGC 3'       |
| 6   | C-myc KDEL      | 5' TAT CGA CGG ATC GGG CTA GAG TTC G 3' |



Hình 1: Sơ đồ vector pCAMBIA *eu4CL1* pro::*pi4CL1*

### Phương pháp nghiên cứu

Các phương pháp được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm PCR, xử lý DNA plasmid với enzyme hạn chế, ghép nối gen với vector, biến nạp vector vào tế bào vi khuẩn được thực hiện theo Sambrook và Russell (2001).

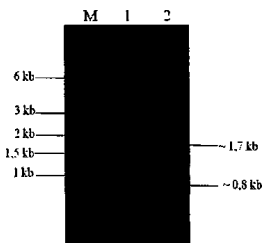
Đoạn gen *pi4CL1* được nhân lên từ vector tách dòng pJET 1.2 Blunt với cặp mồi Po4CL1BamHI và Po4CL1NotI (Bảng 1). Sản phẩm nhân gen *pi4CL1* sau khi được xử lý với enzyme BamHI và NotI được ghép nối với vector pRTRA 7/3 cũng được xử lý với cặp enzyme tương ứng, tạo nên vector pRTRA 35S pro :: *pi4CL1*.

Tiếp theo, vector này được mở vòng bằng XbaI và NcoI và được ghép nối với đoạn *eu4CL1* promoter đã được xử lý bằng cặp enzyme trên tạo nên pRTRA *eu4CL1* pro :: *pi4CL1*. Cấu trúc *eu4CL1* pro :: *pi4CL1* được cắt bởi PstI và ghép nối với vector pCAMBIA 1300 đã được mở vòng bằng enzyme tương ứng để tạo nên vector pCAMBIA *eu4CL1* pro :: *pi4CL1*. Vector chuyển gen thực vật này được biến nạp bằng xung điện vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 (pGV2260).

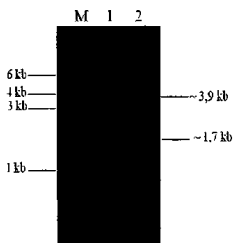
### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Tạo vector pRTRA 35S pro :: *pi4CL1*

Vector pJET 1.2 Blunt mang gen *pi4CL1* được sử dụng làm khuôn cho phản ứng khuếch đại gen *pi4CL1* với cặp mồi Po4CL1BamHI và Po4CL1NotI, đoạn gen được nhân lên có kích thước 1.7 kb đúng với lý thuyết (Hình 2). Vì vậy, sản phẩm này được sử dụng cho việc cắt hai đầu bằng BamHI và NotI để nối vào vector pRTRA 7/3 đã mở vòng bằng BamHI và NotI. Sản phẩm lại được biến nạp và chọn dòng trong tế bào vi khuẩn *E. coli* DH10b. Sự có mặt của gen *pi4CL1* được kiểm tra bằng cách cắt vector tái tổ hợp với cặp enzyme BamHI và NotI (Hình 3). Kết quả điện di cho thấy vector pRTRA 35S pro :: *pi4CL1* mang đoạn gen *pi4CL1* đã được thiết kế thành công. Vector tái tổ hợp pRTRA 35S pro :: *pi4CL1* chứa đoạn 35S promoter được giới hạn trong đoạn DNA có điểm nhận biết của PstI và NcoI, đoạn signal peptide (SP) có chứa mã bộ ba ATG là đoạn tín hiệu dẫn protein hướng lưới nội chất, nằm giữa điểm nhận biết của enzyme NcoI và BamHI. Đoạn gen *pi4CL1* nằm giữa hai điểm nhận biết của BamHI và NotI, sau đó là trình tự của đoạn mã hóa peptide c-myc và cuối cùng là vùng terminator kết thúc bằng trình tự nhận biết của PstI.



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR nhân *eu4CL1* promoter và gen *pi4CL1*. M: Marker 1 kb; 1: Sản phẩm PCR nhân gen *pi4CL1*; 2: Sản phẩm PCR nhân *eu4CL1* promoter

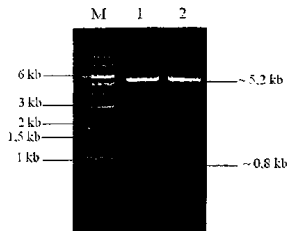


Hình 3. Kiểm tra sự có mặt của gen *pi4CL1* trong vector *pRTRA 35S pro :: pi4CL1*. M: Marker 1 kb; 1: Vector *pRTRA7/3* / *BamHI* + *NotI*; 2: Vector *pRTRA 35S pro :: pi4CL1* / *BamHI* + *NotI*.

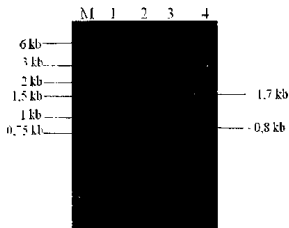
#### Tạo vector *pRTRA eu4CL1 pro :: pi4CL1*

Promoter *eu4CL1* được tách dòng trong vector *pJET 1.2* Blunt được sử dụng làm DNA khuôn cho phản ứng PCR nhân promoter *eu4CL1* với cặp mồi *Pro4CL1* *XbaI* và *Pro4CL1* *NcoI*. Sản phẩm nhân đoạn promoter này có kích thước 0.8 kb là phù hợp với tính toán lý thuyết (Hình 2). Đoạn promoter này được sử dụng làm vật liệu nối với vector *pRTRA 35S pro :: pi4CL1*.

Vector *pRTRA 35S pro :: pi4CL1* sau khi xử lý với *XbaI* và *NcoI* được tinh sạch để thực hiện phản ứng lai với đoạn promoter *eu4CL1* đã được xử lý với cặp enzyme tương ứng. Mục đích thí nghiệm là để gen *pi4CL1* được điều khiển bởi *eu4CL1* promoter. Sản phẩm lai được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* chủng DH10b bằng phương pháp sốc nhiệt và kiểm tra sự có mặt của đoạn promoter *eu4CL1* trong cấu trúc bằng cách cắt với enzyme hạn chế. Kết quả thể hiện ở Hình 4 đường chạy 2, cho thấy đoạn promoter *eu4CL1* đã có trong *pRTRA eu4CL1 pro :: pi4CL1*.



Hình 4. Kiểm tra sự có mặt của promoter *eu4CL1* trong vector *pRTRA eu4CL1 pro :: pi4CL1*. M: Marker 1 kb; 1: Vector *pRTRA 35S pro :: pi4CL1* / *XbaI* + *NcoI*; 2: Vector *pRTRA eu4CL1 pro :: pi4CL1* / *XbaI* + *NcoI*.



Hình 5. Kiểm tra sự có mặt của promoter *eu4CL1* và gen *pi4CL1* trong vector *pCambia eu4CL1 pro :: pi4CL1*. M: Marker 1 kb; 1, 3: Đối chứng âm; 2, 4: PCR nhân *eu4CL1* promoter và gen *pi4CL1*

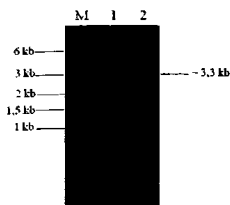
#### Tạo vector *pCambia* chứa cấu trúc *eu4CL1 pro :: pi4CL1*

Đoạn DNA chứa cấu trúc *eu4CL1 pro :: pi4CL1* có kích thước khoảng 3,3 kb thu được khi xử lý *pRTRA eu4CL1 pro :: pi4CL1* với enzyme *PstI*, được tinh sạch và lai với vector *pCambia 1300* đã được mở vòng bằng enzyme *PstI*.

Các khuẩn lạc *E. coli* DH10b chứa vector pCambia 1300 tái tổ hợp được chọn lọc bằng cách PCR nhân đoạn *eu4CL1* promoter sử dụng cặp mồi Pro4CL1XbaI và Pro4CL1NcoI, nhân đoạn gen *pi4CL1* bằng cặp mồi Po4CL1BamHI và Po4CL1NotI.

Kết quả PCR thể hiện trên hình 5, đường chạy 2, 4 cho thấy sản phẩm nhân gen đều có kích thước đúng theo lý thuyết. Như vậy promoter *eu4CL1* và gen *pi4CL1* đã có mặt trong vector pCambia *eu4CL1* promoter :: *pi4CL1*.

Vector tái tổ hợp này được chuyển vào vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng C58 (pGV2260) bằng phương pháp xung điện. Các khuẩn lạc phát triển trên đĩa môi trường chứa kháng sinh kanamycin được chọn lọc nhờ PCR. Cấu trúc *eu4CL1* pro :: *pi4CL1* được kiểm tra trong vector pCambia *eu4CL1* pro :: *pi4CL1* bằng PCR với cặp mồi 35S F và c-myc KDEL (Bảng 1). Toàn bộ cấu trúc này có kích thước khoảng 3,3 kb chứa gen *pi4CL1* và *eu4CL1* promoter. Kết quả ở hình 6 đường chạy 2 cho thấy đã nhân được đoạn DNA 3.3kb. Như vậy, vector pCambia *eu4CL1* pro:: *pi4CL1* đã được biến nạp vào *A. tumefaciens* chủng C58 (pGV2260).



Hình 6. Kiểm tra sự có mặt của cấu trúc *pi4CL1* pro :: *eu4CL1* trong vector pCambia1300. M: Marker 1kb; 1: Đối chứng âm; 2: PCR nhân toàn bộ cấu trúc

Với mục đích tạo vector chuyển gen thực vật mang gen *pi4CL1*, phục vụ các nghiên cứu nhằm tăng cường hàm lượng lignin ở vùng xylen thứ cấp cho các cây lâm nghiệp nên chúng tôi đã tạo vector chuyển gen pCambia *eu4CL1* pro :: *pi4CL1*. Ngoài ra, để dễ dàng cho việc kiểm tra khả năng biểu hiện gen trên cây chuyển gen thì gen *pi4CL1* đã được ghép nối với trình tự mã hóa peptide c-myc để nhận biết bằng kháng thể kháng c-myc. Hơn nữa, cấu trúc này được thiết kế có signal peptide hướng protein vào lưới nội chất, do vậy, nếu gen *pi4CL1* biểu hiện sẽ được tích lũy ở lưới nội chất. Với những đặc điểm như trên, vector pCambia *eu4CL1* pro :: *pi4CL1* thích hợp cho việc chuyển gen nhằm tăng hàm lượng lignin ở cây lấy gỗ.

## KẾT LUẬN

Như vậy, chúng tôi đã thành công trong việc tạo các vector tái tổ hợp là pRTRA *eu4CL1* pro :: *pi4CL1* và pCambia *eu4CL1* pro :: *pi4CL1*. Các vector này đã được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* và *A. tumefaciens*. Chúng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector pCambia *eu4CL1* pro :: *pi4CL1* là nguồn nguyên liệu cho các nghiên cứu chuyển gen thực vật nhằm tăng hàm lượng lignin.

## Lời cảm ơn

Công trình được hoàn thành dựa trên sự hỗ trợ một phần kinh phí của đề tài mã số CNSH DT 03/06-10 thuộc Chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn nhóm nghiên cứu của ThS. Hồ Văn Giảng Trường Đại học Lâm nghiệp đã cung cấp vector tách dòng TA chứa gen *pi4CL1*

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chen ZZ, Chang S, Ho C, Chen YC, Tsia J, Chiang V L (2001). Plant production of transgenic *Eucalyptus camaldulensis* carrying the *Populus tremuloides* cinnamate 4- hydroxylase gene. *Taiwan J For Sci* 16(4): 249-258.
- Chen ZZ, Chen Y C, Chou YH, Lin Y (2006). cDNA cloning molecular characterization of 4 coumarate: coenzyme A ligase in *Eucalyptus camaldulensis*. *Taiwan J For Sci* 21(1): 87-100.
- Hauffe KD, Paszkowski U, Schulze-Lefert P, Hahlbrock K, Dangl JL, Douglas CJ (1991). A parsley 4CL-1 promoter fragment specifies complex expression patterns in transgenic tobacco. *Plant Cell* 3(5): 435-443.
- Hu WJ, Kawakita A, Tsai CJ, Lung J, Osakabe K, Ebinuma H, Chiang VL (1998). Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate: CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). *Proc Natl Acad Sci USA* 95(9): 5407-5412.
- Huỳnh Thị Thu Huệ, Dương Thị Thu Hà, Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải (2010). Promoter 4CL1 từ cây Bạch đàn trắng (*Eucalyptus camaldulensis*) và sự điều khiển biểu hiện gen gus đặc hiệu thân. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(3): 1-7.
- Lee D, Douglas CJ (1996) Two divergent members of a tobacco 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) gene family. cDNA structure, gene inheritance and expression, and properties of recombinant proteins. *Plant Physiol* 112(1): 193-205.
- Lu H, Zhao YL, Jiang XN (2004) Stable and specific expression of 4-coumarate:coenzyme A ligase gene (4CL1) driven by the xylen-specific Pto4CL1 promoter in the transgenic tobacco. *Biotechnol Lett* 26(14): 1147-1152.
- Tourner V, Grat S, Marquet C, El Kayal W, Penchal R, de Andrade G, Boudet AM, Teulier C (2003). An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). *Transgenic Res* 12(4): 403-411

Umezawa T (2010). The cinnamate/monolignol pathway. *Phytochem Rev* 9: 1-17.

## CONSTRUCTION OF A PLANT TRANSFORMATION VECTOR HARBORING *eu4CL1* PROMOTER AND *pi4CL1* GENE

Duong Thi Thu Ha, Huynh Thi Thu Hue, Le Thi Thu Hien, Nong Van Hai  
Institute of Genome research, Vietnam Academy of Science and Technology

### SUMMARY

In plants, lignin is a large and complex organic molecule involved in cell wall construct and it is a key component in plants self-defense mechanisms against external agents. Therefore, many studies have focused on introducing the genes such as C4H, CAD and 4CL in order to affect on lignin synthesis pathway for the purpose of changing lignin content in forest plants according to the wood demand. In these studies, 4CL1 promoter have usually used to control the xylem specific expression of gene. Our previous study about *eu4CL1* promoter which isolated from *Eucalyptus camaldulensis* demonstrated that is the xylem specific promoter. Here, our research aims to construct a cassette in which the expression of a *pi4CL1* gene will be xylem specific express and is targeted to the cells endoplasmic reticulum. So that, recombinant vectors harboring *eu4CL1* promoter and *pi4CL1* gene isolated from *Pinus massoniana* Lamb were constructed. The size of *eu4CL1* promoter is 0.8 kb containing both of TATA box and CAAT box. *pi4CL* gene is fully encoded nucleotide sequence with 1.7kb in length. In the cassette, *pi4CL1* gene is associated with sequence encodes 5' signal peptide directed protein in to the endoplasmic reticulum. A sequence encoded c-myc peptide, associated 3' of *pi4CL1* gene is a signal for checking the gene expression by Western blot with c-myc antibodies. The new created pCambia1300 vector harboring the cassette has transformed into *Agrobacterium tumefaciens* which is material for plant transformation.

**Keywords:** *eu4CL1* promoter, *pi4CL1* gen, construction vector, plant transformation

Author for correspondence: Tel: +84 37918010; Email: hthue@igr.ac.vn

# NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO DUNG DỊCH NANO TITAN ỨNG DỤNG TRONG PHÒNG CHỐNG VIRUS GÂY BỆNH TRÊN THỰC VẬT

Hoàng Hà<sup>1</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>1</sup>, Lê Văn Sơn<sup>1</sup>, Phạm Thanh Tùng<sup>1</sup>, Đàm Thị Phương<sup>2</sup>, Đồng Huy Giỏi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup> Đại học Nông nghiệp Hà Nội

## TÓM TẮT

Trong báo cáo này, chúng tôi tóm tắt một số kết quả nghiên cứu trong việc chế tạo dung dịch nano titan ( $\text{TiO}_2$  nanofluids) ứng dụng trong phòng chống virus thực vật. Các bước tiến hành như sau: trước tiên, hạt nano titan được tổng hợp bằng phương pháp Sol - gel. Hạt nano dạng bột tạo thành sẽ được kiểm tra bằng kính hiển vi SEM (Scanning Electron Microscope) và phân tích UV-vis. Kích thước tinh thể  $\text{TiO}_2$  thu được dao động trong khoảng 3 đến 50 nm ở dạng anatase (một trong ba dạng tinh thể của titanium dioxide) với điều kiện nung  $400^\circ\text{C}$  và kiểm soát bằng nồng độ axit. Sau đó, các hạt nano  $\text{TiO}_2$  được phân tán trong nước deion bằng rung siêu âm để tạo thành dung dịch nano titan có nồng độ từ 1% - 2%. Kết quả ứng dụng xử lý trên thực vật cho thấy, dung dịch nano titan được tổng hợp theo phương pháp trên có khả năng ức chế sự phát triển và lây lan của virus CMV trên cây thuốc lá.

Từ khóa: anatase, nanofluids, nano titan, tinh thể  $\text{TiO}_2$ , virus thực vật.

## MỞ ĐẦU

Nanofluid có bản chất là chất keo được tạo thành bởi một chất lỏng cơ bản hòa tan các hạt có kích thước nano (1-100nm). Chất lỏng cơ bản có thể là nước, chất lỏng hữu cơ (như ethylene, tri-ethylene glycol...), các loại dầu, chất bôi trơn, dịch sinh học, cao phân tử (Kavitha *et al.*, 2012). Vật liệu nano kim loại thường được sử dụng bao gồm các oxit kim loại (nhôm, silic, zirconia, titan), đồ gốm oxit ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , CuO), cacbua kim loại (SiC), carbon trong các hợp chất khác nhau (kim cương, than chì, ống nano carbon)... Ở dạng Nanofluid, các hạt nano kim loại xuất hiện nhiều đặc tính mới. Kích thước hạt, sự phân tán của các hạt nano ảnh hưởng nhiều đến tính chất của dung dịch Nanofluid (Hee-Dong Jang *et al.*, 2008; Songping Mo *et al.*, 2012).

Dung dịch nanofluids có thể được chế tạo theo 2 phương pháp bao gồm phương pháp 1 bước (one-step method) và phương pháp 2 bước (two-step method). Tuy nhiên, phương pháp 2 bước được sử dụng rộng rãi hơn do tính chất ưu việt của nó (Wei *et al.*, 2012). Ở bước đầu tiên, các dạng vật liệu nano như hạt nano, sợi nano, ống nano... được tạo ra bằng các phương pháp khác nhau sử dụng nhiệt, siêu âm, hoá hơi, lắng đọng hoá hơi hoá học (CVD - Chemical vapor deposition) hoặc Sol - gel. Trong đó Sol - gel là phương pháp tỏ ra ưu việt hơn cả trong việc tạo ra các siêu oxit kim loại tốt nhất và đã được sử dụng rộng rãi trong việc tổng hợp titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ ). Các hạt nano kim loại tạo thành sau đó sẽ được phân tán vào trong một chất lỏng nền trong bước xử lý thứ hai với sự trợ giúp của máy khuấy từ, rung siêu âm, khuấy trộn mạnh và đồng nhất... (Songping *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2012). Hiện nay, các nghiên cứu thấy rằng, dung dịch nano titan chính nó không có độc tính với virus và tế bào. Nó sẽ có chức năng xử lý, khử trùng chỉ sau khi có chiếu xạ của ánh sáng tia cực tím (Songping *et al.*, 2012)). Sức mạnh oxy hóa rất mạnh của titan dioxide có thể phá hủy vỏ của virus, các phản ứng oxy hóa hoạt động của virus và kết quả cuối cùng tiêu diệt virus (Songping *et al.*, 2012). Các nghiên cứu của hãng Soma Medical International chỉ ra rằng khi có ánh sáng cực tím chiếu trực tiếp lên dung dịch nano titan, một cặp điện tử lỗ trống sẽ được tạo ra. Hoạt động tích cực của điện tử lỗ trống titanium dioxide đã phá vỡ các phân tử nước để tạo thành khí hydro và gốc hydroxyl. Các phản ứng điện tử với phân tử oxy để tạo thành siêu oxit anion ( $\text{O}_2^-$ ). Siêu oxit anion tạo thành có thể tiếp tục phản ứng với các phân tử nước, tạo ra hydroxyl peroxide triet đề ( $\cdot\text{OOH}$ ) và hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Hơn nữa, hoạt động gốc hydroxyl có thể kết hợp để tạo thành hydroperoxide và  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{HO}_2^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  hình thành trên bề mặt của titanium dioxide có thể phản ứng với virus và thành phần của nó để tiêu diệt virus.

Trong nghiên cứu này, dung dịch nanofluids  $\text{TiO}_2$  được tạo ra theo phương pháp 2 bước. Đầu tiên, hạt nano titan được tạo thành dưới dạng bột bằng phương pháp sol - gel dựa trên cơ chất n-butyl orthotitanate  $\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$  và các hóa chất khác. Tiếp đó, hạt nano titan thành phẩm sẽ được khảo sát về kích thước bằng kính hiển vi SEM. Khi kích thước hạt dao động từ 10 đến 50 nm, các hạt nano titan sẽ được phân tán trong dung dịch nước deion bằng rung siêu âm. Dung dịch nanofluids  $\text{TiO}_2$  tạo thành được thử nghiệm khả năng ức chế virus TMV trên đối tượng cây trồng.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

$\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$ ,  $\text{HNO}_3$ , Trizol, Isopropanol, Cloroform, thang DNA 1 kb (Fermentas), Bacto pepton, Yeast extract, NaCl, Agarose, Tris HCl, EDTA, Glycerol,  $\text{CaCl}_2$ , Ethanol 70 %, nước khử ion, kit tách chiết RNA (Trizol Regent), bộ hóa chất sử dụng cho RT-PCR... của các hãng Fermentas, Invitrogen, Merck, Sigma, Pharmacia Biotech. Cây thuốc lá sạch bệnh và nguồn virus được cung cấp bởi phòng Công nghệ Tế bào Thực vật - Viện Công nghệ Sinh học.

### Phương pháp

#### Phương pháp thực nghiệm điều chế dung dịch $\text{TiO}_2$ kích thước nm bằng phương pháp sol - gel

Cơ chất được sử dụng điều chế dung dịch  $\text{TiO}_2$  bằng phương pháp sol - gel là  $\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$ . Môi trường cho phản ứng thủy phân xảy ra là hệ dung môi hỗn hợp isopropanol - nước dưới sự xúc tác của  $\text{HNO}_3$ .

Quy trình được thực hiện như sau:

1. Chuẩn bị nước cất đã được chuẩn độ bằng  $\text{HNO}_3$  tới giá trị pH = 1.5,  $\text{HNO}_3$  là chất xúc tác.
2. Pha hỗn hợp dung dịch  $\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$  hòa tan với isopropanol khan, theo một tỉ lệ 1:3, isopropanol khan được sử dụng là dung môi để tiến hành phản ứng.
3. Dùng pipet nhỏ từ từ từng giọt dung dịch  $\text{Ti}(\text{OC}_4\text{H}_9)_4$  và isopropanol khan vào dung dịch nước cất đã chuẩn bị trong điều kiện khuấy trộn mạnh.
4. Nâng nhiệt độ của dung dịch đến  $70^\circ\text{C}$  để quá trình thủy phân xảy ra. Quá trình thủy phân được thực hiện ở điều kiện khuấy trộn mạnh, nhiệt độ và thời gian kéo dài cho quá trình sol – gel là 6h.
5. Dung dịch thu được được lọc và đổ ra đĩa petri, sử dụng máy gia nhiệt làm khô.
6.  $\text{TiO}_2$  dạng bột được rửa 3 lần với isopropanol và để khô ở  $50^\circ\text{C}$  trong 1h đến khi bột chuyển sang dạng màu trắng, sau đó đem nung trong lò nung  $400^\circ\text{C}$  trong 2h để thu sản phẩm.
7. Xác định cấu trúc tinh thể, kích thước hạt trung bình của hạt bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), phân tích bằng UV-Vis.

### Phương pháp thực nghiệm chế tạo Nanofluid $\text{TiO}_2$

Nanofluid  $\text{TiO}_2$  được tạo ra theo qui trình sau: Sử dụng 0,05 g tinh thể nano titan trộn với 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  deion khử trùng trong bình tam giác. Tiến hành siêu âm trong 3h.

### Lây nhiễm virus CMV vào thuốc lá

Cần 200 g lá thuốc lá nhiễm bệnh khảm lá do virus CMV, nghiền trong 400 - 800 ml đệm phosphates buffer pH = 7 trong cối chày sứ (photphat buffer có thể thay đổi tùy và điều kiện nhiễm bệnh của lá), để lắng cặn, loại bỏ cặn. Thêm 20 g bột silic cacbon, đảo đều. Chọn 2-3 lá bánh tẻ, dùng bông tăm hoặc phun hỗn hợp trên vào bề mặt lá cần lây nhiễm, chỉ cần phủ 1/2 bề mặt trên của lá, phía gần ngọn lá (silic cacbon không tan, cần đảo đều trong quá trình lây nhiễm, tinh thể silic cacbon có cạnh sắc có tác dụng gây tổn thương với thành tế bào). Theo dõi biểu hiện bệnh bắt đầu từ 1 tuần sau khi lây nhiễm (thời gian này tùy vào chủng virus và giống cây). Sau 1-2 ngày cần rửa sạch lá, loại bỏ silic cacbon tồn dư gây tổn thương lá cây.

### Tách chiết ARN, RT – PCR phát hiện sự có mặt của virus

ARN tổng số được tách bằng cách sử dụng kit Trizol<sup>®</sup> Regents (Invitrogen). Phản ứng RT – PCR được tiến hành trong hai bước. Bước một, cDNA được tạo ra bằng cách sử dụng bộ kit First stand cDNA synthesis (Fermentas). Bước hai, phản ứng PCR nhân gen đặc hiệu cho CMV.

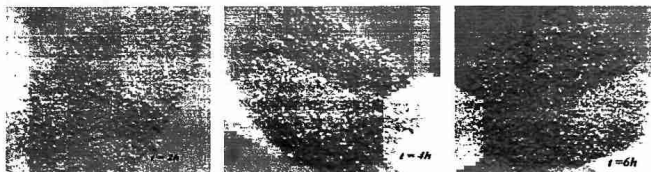
### Xử lý cây bị bệnh bằng dung dịch nano titan và đánh giá khả năng ức chế sự phát triển của virus CMV

Cây thuốc lá sau khi được lây nhiễm nhân tạo virus CMV qua vết thương 1 ngày được phun 400 ml đến 800 ml dung dịch nano titan. Quan sát sự phát triển của cây sau 1 tuần, 2 tuần và 3 tuần. Tiến hành thu các mẫu lá gần khu vực lây nhiễm và khu vực thân cây. Khả năng ức chế sự phát triển của virus CMV bằng dung dịch nano titan được đánh giá thông qua các phân tích và so sánh giữa khả năng lây nhiễm của virus CMV ở cây lây nhiễm nhân tạo có xử lý và cây lây nhiễm nhân tạo không xử lý bằng dung dịch nano titan.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Chế tạo tinh thể titan oxit

Theo nghiên cứu của Duan và đồng tác giả (2009), Kavitha và đồng tác giả (2013), tinh thể nano titan tạo ra theo phương pháp sol – gel chịu ảnh hưởng rất nhiều bởi các yếu tố như pH, nhiệt độ trong quá trình tạo sol, phương pháp hòa trộn, thời gian tạo sol – gel. Khi các điều kiện này đạt chuẩn sẽ tạo hạt có ánh kim, kích thước hạt nhỏ, sự liên kết giữa các tinh thể yếu, bề mặt hạt mịn, hạt có màu vàng nhạt và sự phân tán của hạt trong nước cao.



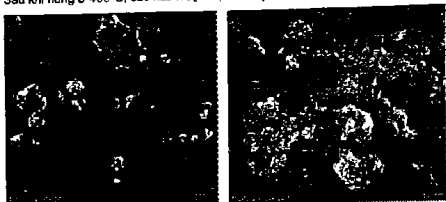
Hình 1. Tinh thể titan trước khi nung với các điều kiện tạo sol khác nhau

Nghiên cứu của các nhóm tác giả này cũng chỉ ra rằng với điều kiện pH=1,5; nhiệt độ:  $70^\circ\text{C}$ ; phương pháp hòa trộn là nhỏ giọt cho phép tạo ra các hạt nano titan có kích thước nhỏ từ 3 nm trở lên. Do đó, chúng tôi sử dụng điều kiện này cho quá trình tạo hạt. Đồng thời, chúng tôi khảo sát thời gian kéo dài cho quá trình sol – gel với các mức thời gian là 2h, 4h và 6h. Kết quả cho thấy khi quá trình sol – gel kéo dài 2h hoặc 4h thì khả năng phân tán của hạt trong nước không cao. Hạt thu được ở 2h và 4h có lẫn tạp do sự dư thừa cơ chất, hạt có màu vàng nhạt. Trong công bố của Karami và đồng tác giả (2010), màu sắc của hạt  $\text{TiO}_2$  thu được ảnh hưởng rất lớn đến cấu trúc tinh thể, kích thước hạt và hoạt tính của  $\text{TiO}_2$  kích thước nm. Theo đó, tinh thể  $\text{TiO}_2$  có màu vàng cánh gián, kích thước tinh thể nhỏ sẽ tạo ra hạt titan có kích

thước dao động trong khoảng 3 đến 40 nm. Kết quả trên hình 1 cho thấy với khoảng thời gian tạo sol là 6h sẽ cho ra các tinh thể titan đáp ứng được những điều kiện này. Khi đó, các hạt tinh thể titan có kích thước nhỏ, màu vàng cánh gián và có khả năng phân tán trong nước tốt nhất. Đây là nguyên liệu cần thiết đáp ứng tốt cho các thí nghiệm tiếp theo.

### Phân tích mẫu bằng phương pháp chụp SEM

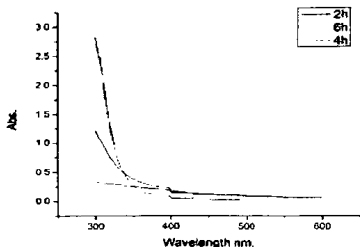
Sau khi nung ở 400°C, các hạt  $\text{TiO}_2$  được đem phân tích hình thái học bằng phương pháp chụp SEM.



Hình 2. Ảnh SEM mô tả hình thái học của hạt nano titan khi nung ở 400°C

Hình 2 cho thấy, hình thái học của các hạt nano dao động từ 3 đến 50 nm. Hình ảnh hạt sắc nét, một số vị trí có hình thái bất thường do sự kết tụ của các tiểu hạt.

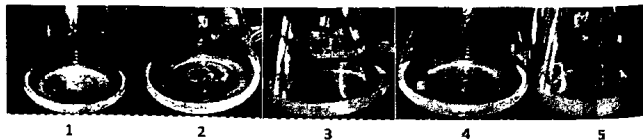
### Phân tích mẫu bằng phương pháp đo phổ hấp thụ UV/Vis



Hình 3. Phổ UV-Vis của dung dịch nano titan với khoảng thời gian tạo sol là 2h, 4h, 6h

Phân tích phổ UV-VIS với các khoảng thời gian tạo sol khác nhau cho kết quả thể hiện ở Hình 3. Theo nghiên cứu của Ngô Huỳnh Bửu Trọng và đồng tác giả (2012) thì phổ hấp thụ của  $\text{TiO}_2$  ở khoảng bước sóng 380 nm. Kết quả thực nghiệm được thể hiện trên Hình 3 cho thấy mẫu  $\text{TiO}_2$  với thời gian tạo 4h và 6h đều có phổ hấp thụ khoảng 380 nm. Điều đó chứng minh rằng mẫu hạt của chúng tôi tạo được ở dạng tinh thể nano, có tính chất hấp thụ tia tử ngoại như vật liệu  $\text{TiO}_2$  kích thước nm.

Tạo dung dịch nano  $\text{TiO}_2$ : Theo nhóm nghiên cứu của Kavitha (2012), thời gian rung siêu âm ảnh hưởng nhiều đến sự phân bố của hạt trong dung dịch. Do đó, chúng tôi nghiên cứu khảo sát tạo dung dịch nano  $\text{TiO}_2$  theo tỉ lệ 0,05 g tinh thể nano titan với 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  và tiến hành rung siêu âm với dãy thời gian từ 0h đến 4h.



Hình 4. Dung dịch nano  $\text{TiO}_2$  tạo thành sau các khoảng thời gian rung siêu âm khác nhau. Số thứ tự 1; 2; 3; 4; 5 lần lượt tương ứng với các điều kiện không rung siêu âm, rung siêu âm 1h, 2h, 3h và 4h

Kết quả Hình 4 cho thấy khi tạo dung dịch nano  $\text{TiO}_2$  không tiến hành rung siêu âm, khả năng phân tán của hạt  $\text{TiO}_2$  ở mức trung bình, độ lắng của  $\text{TiO}_2$  theo thời gian cao, dung dịch có màu gel trong nhạt. Khi tiến hành rung siêu âm, màu của dung dịch đậm dần, khả năng phân tán của hạt trong nước tăng và mức độ lắng đọng của hạt  $\text{TiO}_2$  giảm dần. So sánh giữa các khoảng thời gian 1h đến 4h cho thấy với quá trình rung siêu âm là 3h sẽ thu được dung dịch có màu gel trong đặc, khả năng phân tán của hạt trong nước tốt nhất và giảm thiểu sự lắng đọng theo thời gian. Do đó, rung siêu âm 3h là điều kiện cho ra dung dịch nano titan có độ phân tán cao nhất.

#### Đánh giá khả năng ức chế sự phát triển của virus thực vật bằng dung dịch nano titan

Cây thuốc lá sạch bệnh được lấy nhiễm nhân tạo với chủng virus *Cucumber mosaic* (CMV) theo quy trình đã được trình bày ở mục phương pháp. Sau 1 ngày lấy nhiễm nhân tạo, chúng tôi chia các cây thành hai nhóm để tiến hành thí nghiệm tiếp theo (các thí nghiệm này đều được thực hiện tại nơi có ánh sáng mặt trời với mục đích xúc tác cho quá trình quang hoá của dung dịch nano titan): một nhóm cây bị lấy nhiễm sẽ được xử lý bằng dung dịch nano titan, trong khi đó nhóm cây bị lấy nhiễm còn lại sẽ không được xử lý để làm đối chứng. Sự phát triển của các cây thuốc lá thuộc hai nhóm sau 1 đến 3 tuần xử lý với dung dịch nano titan được quan sát và so sánh (Hình 5).

Nhóm không xử lý bằng  
dung dịch nano titan

Nhóm xử lý bằng dung  
dịch nano titan



Sau 1 tuần lấy nhiễm

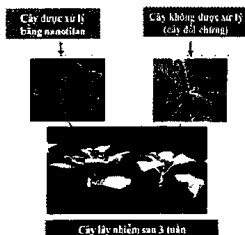
Hình 5. Biểu hiện bệnh của cây thuốc lá nhiễm CMV được xử lý bằng dung dịch nanotitan sau 1 tuần lấy nhiễm

Kết quả quan sát cho thấy sau 1 tuần xử lý bằng dung dịch nano titan, không có sự khác biệt về hình thái giữa hai nhóm cây lấy nhiễm. Hình thái cũng sự phát triển của cây, lá vẫn bình thường và không xuất hiện các dấu hiệu hay triệu chứng của bệnh khảm lá.

Do không phân biệt được triệu chứng của bệnh bằng mắt thường, chúng tôi đã tách chiết RNA tổng số từ mẫu lá và thực hiện phản ứng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu cho CMV để khẳng định sự có mặt hay không của virus này ở hai nhóm cây.



Hình 6. RT-PCR kiểm tra sự có mặt của CMV ở hai nhóm cây. Ký hiệu: (+) phân thân cây đối chứng được lấy nhiễm nhân tạo với CMV nhưng không được xử lý bằng dung dịch nano titan. Số thứ tự 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 tương ứng với các mẫu lá của cây lấy nhiễm nhân tạo và được xử lý bằng dung dịch nano titan. 8: mẫu thân của cây được lấy nhiễm nhân tạo và xử lý bằng nano titan. M: Marker



Hình 7. Biểu hiện bệnh của cây thuốc lá nhiễm CMV được xử lý bằng dung dịch nano titan sau 3 tuần lấy nhiễm

Kết quả hình 6 cho thấy: với nhóm cây không xử lý bằng dung dịch nano titan, phản ứng RT-PCR phát hiện sự có mặt virus CMV ở phần thân. Như vậy, đã có hiện tượng lan truyền virus từ lá bị nhiễm nhân tạo sang thân. Kiểm tra phần thân với nhóm cây được xử lý bằng dung dịch nano titan, phản ứng RT-PCR không phát hiện virus CMV ở bộ phận này (giếng 8). Kết quả âm tính cũng xảy ra khi kiểm tra sự có mặt của virus ở các bộ phận khác như lá của nhóm cây này (giếng 2-7). Duy nhất một mẫu lá bị lấy nhiễm nhân tạo sau khi được xử lý bằng dung dịch nano titan vẫn phát hiện được sự có mặt của virus CMV (giếng 1). Kết quả này cho thấy khả năng ức chế sự phát triển của virus, ngăn cản khả năng lây lan của virus sang các phần khác của cây khi xử lý cây nhiễm virus bằng dung dịch nano titan.

Tiếp tục quan sát hai nhóm cây này sau 3 tuần, chúng tôi phát hiện thấy có sự biểu hiện khác nhau giữa hai nhóm cây. Trong khi nhóm cây được xử lý bằng dung dịch nano titan không có triệu chứng biểu hiện bệnh thì nhóm cây không được xử lý bắt đầu biểu hiện những dấu hiệu đặc trưng của cây thuốc lá nhiễm virus CMV như xuất hiện các vết khảm đốm màu vàng nhạt xen kẽ các vết xanh đậm, thùy lá nhỏ hẹp, xoắn cong, cây kém phát triển, thân mảnh (Hình 7).

Những kết quả này cho phép chúng tôi tạm thời kết luận dung dịch nano titan có khả năng ức chế sự phát triển và phát tán của virus CMV trong cây thuốc lá. Với cây được xử lý bằng dung dịch nano titan, virus không có khả năng lây nhiễm sang các bộ phận khác của cây, do đó cây vẫn phát triển bình thường và không có sự biểu hiện bệnh sau 3 tuần xử lý.

Hiện nay, các nhà nghiên cứu thấy rằng trong dung dịch, các hạt titanium dioxide hấp thụ trên bề mặt của tế bào vi sinh vật làm tăng khả năng tìm và tiêu diệt các dạng vi khuẩn và virus. Ngoài ra nếu hàm lượng dung dịch nano titan không quá lớn sẽ cho phép tiêu diệt hiệu quả các virus gây bệnh nằm bên trong tế bào vật chủ mà không gây ảnh hưởng lớn đến tế bào vật chủ.

## KẾT LUẬN

Chế tạo thành công dung dịch nano titan có kích thước dao động từ 3 đến 50 nm với điều kiện nung 400°C, pH=1,5; nhiệt độ tạo sol 70°C, phương pháp hòa trộn lá nhỏ giọt, thời gian kéo dài quá trình tạo sol – gel là 6h. Dung dịch nano titan thành phẩm có khả năng ức chế sự phát triển và lây lan của virus CMV trên cây thuốc lá

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Karami A (2010). Synthesis of  $\text{TiO}_2$  Nano Powder by the Sol – gel Method and Its Use as a Photocatalyst. *J Iranian Chem Soc* 7(2): 154-160
- Ariet G, Brami G, D Hee-Dong Jang, Hankwon Chang, Kuk Cho, Soon-Joong Kim, Jin-Ho Park, Jeong-Woo Choi, Kikuo Okuyama(2006). Fabrication of porous nanostructured  $\text{TiO}_2$  particles by an aerosol templating method. *Ultramicroscopy* 108(10):1241-5
- Duan Y, Liu J, Ma L, Li N, Liu H, Wang J, Zheng L, Liu C, Wang X, Zhao X, Yan J, Wang S, Wang H, Zhang X, Hong F (2010). Toxicological characteristics of nanoparticulate anatase titanium dioxide in mice. *Medical College of Soochow University, Suzhou* 215123, *PR China* 31(5):694-9
- Kavitha T, Rajendran A, Durairajan A (2012). Synthesis, characterization of  $\text{TiO}_2$  nano powder and water based nanofluids using two step method. *EJAESR* 1(4):235-240.
- Kavitha T, Rajendran A, Durairajan A (2013). Synthesis and characterization of nanosized  $\text{TiO}_2$  powder derived from a sol – gel process in acidic conditions. *NESET* 4(2): 90-95
- Ngô Huỳnh Bửu Trọng, Võ Văn Hoàng (2007) Structural properties of amorphous  $\text{TiO}_2$  nanoparticles. *Eu Physic J* 44(3):515-524
- Songping Mo, Ying Chen, Lisi Jia, Xianglong Luo (2012). Investigation on crystallization of  $\text{TiO}_2$ -water nanofluids and deionized water. *Appl Ener* 93 (C):65-70
- Wei Yuand and Huagang Xie (2012). A Review on Nanofluids Preparation, Stability Mechanisms, and Applications. *J Nanomat* 2012 (2012), Article ID 435873, 17 pages doi:10.1155/2012/435873

## STUDY ON SYNTHESIS OF $\text{TiO}_2$ NANOFLUIDS APPLIED IN PREVENTION OF VIRUS INFECTION IN PLANTS

Hoang Ha<sup>1</sup>, Chu Hoang Ha<sup>1</sup>, Le Van Son<sup>1</sup>, Phạm Thanh Tung<sup>1</sup>, Dam Thi Phuong<sup>2</sup>, Dong Huy Gioi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biotechnology, VAST

<sup>2</sup> Hanoi University of Agriculture

## SUMMARY

This paper summarizes some of our recent study results on the synthesis of  $\text{TiO}_2$  nanofluids applied in prevention of plant viruses. In this study,  $\text{TiO}_2$  nano particles were synthesized by Sol-gel technique. The prepared  $\text{TiO}_2$  powder was characterized by using SEM (Scanning Electron Microscope) and UV-vis analysis. By heating at 400°C in 2 hours and controlling the acidity, the resulted crystallite size of  $\text{TiO}_2$  powder, in the form of anatase (one of three mineral forms of titanium dioxide), ranged from 3 to 50 nm. Then, crystallized  $\text{TiO}_2$  nano particles were dispersed in deionized water by ultrasonic vibration in order to get the  $\text{TiO}_2$  nanofluids with the concentrations ranging from 1% to 2%. Treatment results showed that our synthesized  $\text{TiO}_2$  nanofluids were able to inhibit the growth and the spread of CMV in tobacco.

**Keywords:** anatase, crystalline  $\text{TiO}_2$ , nanofluids, nano titanium, plant viruses

Author for correspondence: Tel: 0974922312; Email: hoanghapcb@ibt.ac.vn