

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

---

**NGUYỄN THU HIỀN**

**NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN MÃ HÓA PROTEIN  
BỀ MẶT CỦA VIRUS H5N1 VÀO CÂY ĐẬU TƯƠNG  
PHỤC VỤ SẢN XUẤT VACCINE THỰC VẬT**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC**

**THÁI NGUYÊN - 2014**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

---

**NGUYỄN THU HIỀN**

**NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN MÃ HÓA PROTEIN  
BỀ MẶT CỦA VIRUT H5N1 VÀO CÂY ĐẬU TƯƠNG  
PHỤC VỤ SẢN XUẤT VACCINE THỰC VẬT**

**Chuyên ngành: Di truyền học  
Mã số: 62 42 01 21**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học:**

- 1. PGS.TS. CHU HOÀNG HÀ**
- 2. GS. TS. CHU HOÀNG MẬU**

**THÁI NGUYÊN - 2014**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và một số kết quả cùng cộng tác với các cộng sự khác. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trên các Tạp chí khoa học chuyên ngành và trong Kỷ yếu Hội nghị Khoa học-Công nghệ với sự đồng ý và cho phép của các đồng tác giả. Phần còn lại chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

*Tác giả*

**Nguyễn Thu Hiền**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới **GS.TS Chu Hoàng Mậu, PGS.TS Chu Hoàng Hà** đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin cảm ơn Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, xin chân thành cảm ơn TS. Lê Văn Sơn cùng toàn thể cán bộ phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học đã tận tình giúp đỡ, truyền đạt những kinh nghiệm quý báu cho tôi trong quá trình nghiên cứu và thực hiện đề tài luận án. Xin cảm ơn sự giúp đỡ của nhóm nghiên cứu và các đồng nghiệp.

Tôi xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Nguyễn Thị Tâm cùng tập thể cán bộ Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu đề tài luận án.

Tôi xin cảm ơn các thầy cô khoa Sinh-Kỹ thuật Nông nghiệp và Phòng Quản lý sau đại học, trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên, xin cảm ơn lãnh đạo trường Đại học Sư phạm và lãnh đạo Đại học Thái Nguyên.

Tôi xin cảm ơn sự giúp đỡ và tạo điều kiện của Ban chủ nhiệm khoa Khoa học cơ bản, Ban giám hiệu Trường Đại học Y Dược – Đại học Thái Nguyên.

Tôi xin cảm ơn gia đình và bạn bè đã luôn động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện thành công luận án này.

*Nghiên cứu sinh*

**Nguyễn Thu Hiền**

## MỤC LỤC

<b>MỞ ĐẦU</b> .....	1
1. Đặt vấn đề .....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu .....	2
3. Nội dung nghiên cứu .....	2
4. Những đóng góp mới của luận án .....	3
5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn .....	4
<b>Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....	5
1.1. BỆNH CÚM GIA CẦM VÀ VIRUS CÚM A/H5N1 .....	5
1.1.1. Bệnh cúm gia cầm và dịch bệnh cúm A/H5N1 .....	5
1.1.2. Virus cúm A/H5N1 .....	6
1.2. VACCINE PHÒNG CHỐNG BỆNH CÚM A/H5N1 .....	19
1.2.1. Các loại vaccine phòng chống bệnh cúm A/H5N1 .....	19
1.2.2. Nghiên cứu sản xuất vaccine phòng chống bệnh cúm A/H5N1 .....	22
1.3. ỨNG DỤNG KỸ THUẬT CHUYỂN GEN TRONG NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT VACCINE THỰC VẬT .....	27
1.3.1. Nghiên cứu chuyển gen ở cây đậu tương .....	27
1.3.2. Thành tựu ứng dụng kỹ thuật chuyển gen trong chọn giống đậu tương .....	38
1.3.3. Ứng dụng kỹ thuật chuyển gen trong nghiên cứu sản xuất vaccine thực vật .....	43
<b>Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	48
2.1. VẬT LIỆU .....	48
2.1.1. Nguyên liệu thực vật .....	48
2.1.2. Chủng vi khuẩn và các loại vector .....	48
2.1.3. Hóa chất .....	48
2.1.4. Thiết bị .....	48

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	49
2.2.1. Nhóm phương pháp sử dụng để thiết kế vector chuyển gen.....	50
2.2.2. Các phương pháp sử dụng trong xây dựng mô hình tái sinh và chuyển gen in vitro.....	56
2.2.3. Phương pháp phân tích cây chuyển gen.....	61
2.3. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU VÀ HOÀN THÀNH LUẬN ÁN.....	62
<b>Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>63</b>
3.1. THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN MANG GEN HA VÀ ĐOẠN GEN HA1 CỦA VIRUS H5N1.....	63
3.1.1. Kết quả thiết kế vector chuyển gen mang gen HA.....	63
3.1.2. Kết quả thiết kế vector chuyển gen mang đoạn gen HA1 .....	77
3.2. HOÀN THIỆN QUY TRÌNH TÁI SINH VÀ CHUYỂN GEN THÔNG QUA VI KHUẨN <i>A. TUMEFARACIENS</i> Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG.....	85
3.2.1. Phát triển hệ thống tái sinh phục vụ chuyển gen ở hai giống đậu tương DT12 và DT84.....	86
3.2.2. Kết quả chuyển gen gus vào cây đậu tương thông qua vi khuẩn.....	94
3.2.3. Kết quả chuyển cấu trúc đoạn gen HA1 vào cây đậu tương.....	99
3.3. KẾT QUẢ CHUYỂN ĐOẠN GEN HA1 VÀO CÂY ĐẬU TƯƠNG... 101	
3.3.1. Phân tích sự có mặt của đoạn gen HA1 ở các dòng cây đậu tương chuyển gen ở thế hệ T <sub>0</sub> .....	101
3.3.2. Phân tích các dòng cây đậu tương chuyển gen ở thế hệ T <sub>1</sub> .....	103
<b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....</b>	<b>107</b>
<b>CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....</b>	<b>109</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>110</b>

## DANH MỤC NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

AS	Acetosyrigone
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BAP	6-benzyladenine purin
bp	Base pair
CCM	Cocultivation medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
đtg	Đồng tác giả
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GA3	Gibberellic acid
GM	Môi trường nảy mầm
<i>gus</i>	Gen mã hóa enzyme $\beta$ -Glucuronidase
IAA	Indoleacetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
kb	Kilo base
LB	Luria and Bertani
MS	Môi trường cơ bản theo Murashige và Skoog (1962)
NAA	$\alpha$ -Naphthaleneacetic acid
<i>nptII</i>	Neomycin phosphotransferase gene
OD	Optical density
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPT	Phosphinothricin
RM	Môi trường ra rễ
SDS	Sodium dodecylsulfat

SIM	Môi trường tạo chồi
SEM	Môi trường kéo dài chồi
<i>Taq</i>	<i>Thermus Aquaticus</i>
T-DNA	Vùng DNA plasmid chuyển vào thực vật
Ti- plasmid	Plasmid tạo khối u
T <sub>0</sub> , T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub>	Các thế hệ cây đậu tương chuyển gen
T <sub>0</sub>	Cây đậu tương chuyển gen tái sinh từ chồi
T <sub>1</sub>	Hạt của cây chuyển gen T <sub>0</sub> nảy mầm thành cây T <sub>1</sub>
T <sub>2</sub>	Hạt của cây chuyển gen T <sub>1</sub> nảy mầm thành cây T <sub>2</sub>
<i>Vir</i>	Virulence Region
v/p	vòng/phút
X-gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide
YEP	Yeast extract peptone



## DANH MỤC BẢNG

TT	Tên bảng	Trang
<b>Bảng 2.1</b>	Thành phần phản ứng PCR	50
<b>Bảng 2.2</b>	Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR	50
<b>Bảng 2.3</b>	Thành phần phản ứng ligation	52
<b>Bảng 2.4</b>	Thành phần hóa chất tách plasmid	52
<b>Bảng 2.5</b>	Thành phần phản ứng LR	54
<b>Bảng 2.6</b>	Thành phần phản ứng cắt bằng enzyme hạn chế	55
<b>Bảng 2.7</b>	Thành phần môi trường nuôi khuẩn	56
<b>Bảng 2.8</b>	Thành phần các loại môi trường nuôi cấy in vitro	57
<b>Bảng 3.1</b>	Trình tự cặp mồi XhoI-HA/HindIII-HA	66
<b>Bảng 3.2</b>	Trình tự cặp mồi XhoI-HA1/HindIII-HA1	78
<b>Bảng 3.3</b>	Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến khả năng nảy mầm hạt	86
<b>Bảng 3.4</b>	Kết quả tái sinh đa chồi trên các môi trường chứa BAP nồng độ khác nhau	89
<b>Bảng 3.5</b>	Ảnh hưởng của GA3 và IAA đến khả năng kéo dài chồi	91
<b>Bảng 3.6</b>	Ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo rễ	92
<b>Bảng 3.7</b>	Kết quả chuyển gen <i>gus</i> vào nách lá mầm đậu tương thông qua vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i>	95
<b>Bảng 3.8</b>	Khả năng tái sinh thông qua nách lá mầm của giống đậu tương ĐT12 sau khi biến nạp cấu trúc gen <i>HAI</i>	100

## DANH MỤC HÌNH

TT	Tên hình	Trang
<b>Hình 1.1</b>	Hình thái, mô hình cấu tạo, cấu trúc ribonucleoprotein của virus cúm A/H5N1	11
<b>Hình 1.2</b>	Mô hình cấu trúc protein Hemagglutinin	15
<b>Hình 1.3</b>	Sơ đồ xâm nhiễm của virus cúm A/H5N1 trong tế bào chủ	18
<b>Hình 1.4</b>	Khối u thực vật do <i>A. tumefaciens</i>	30
<b>Hình 1.5</b>	Cấu trúc Ti- Plasmid	32
<b>Hình 1.6</b>	Mô hình chuyển gen gián tiếp nhờ <i>A. tumefaciens</i>	34
<b>Hình 2.1</b>	Sơ đồ thí nghiệm tổng quát	49
<b>Hình 2.2</b>	Sơ đồ thí nghiệm tái sinh và chuyển gen vào cây đậu tương	59
<b>Hình 3.1</b>	Trình tự (A) và cấu trúc của đoạn gen nhân tạo (SLHEP) (B)	64
<b>Hình 3.2</b>	Trình tự gen HA đã được thay đổi mã bộ ba ( <i>HAop</i> )	65
<b>Hình 3.3</b>	Hình ảnh điện di kiểm tra kết quả PCR nhân đoạn gen <i>HAop</i> bằng <i>XhoI-HA/HindIII-HA</i>	67
<b>Hình 3.4</b>	Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm thoi gel	68
<b>Hình 3.5</b>	Sơ đồ thí nghiệm ghép nối gen HA/HA1 vào vector p201-SLEHP tạo p201-SLEHP-HA/HA1	69
<b>Hình 3.6</b>	Hình ảnh khuẩn lạc sau khi biến nạp plasmid tái tổ hợp vào <i>E.coli</i>	70
<b>Hình 3.7</b>	Hình ảnh điện di kiểm tra kết quả chọn dòng plasmid tái tổ hợp p201-SLHEP-HA	71