

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM**



**TRƯỜNG KIM OANH**

**PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT ĐỘNG CỦA  
PROMOTER CHUYÊN BIỆT HẠT PHÂN TỬ  
CÂY LÚA (*Oryza sativa* L.)**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**Thái Nguyên - 2019**

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM



**TRƯỜNG KIM OANH**

**PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT ĐỘNG CỦA  
PROMOTER CHUYÊN BIỆT HẠT PHÂN TỬ  
CÂY LÚA (*Oryza sativa* L.)**

**Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học**

**Mã số ngành: 8420201**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Tiến Dũng**

**Thái Nguyên – 2019**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu khoa học độc lập của riêng tôi và nhóm nghiên cứu được sự hướng dẫn khoa học của TS. Nguyễn Tiến Dũng. Các nội dung nghiên cứu, kết quả trong đề tài này là trung thực và chưa công bố dưới bất kỳ hình thức nào trước đây. Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về nội dung luận văn của mình.

Thái Nguyên, ngày 02 tháng 11 năm 2019

Học viên

Trương Kim Oanh

## LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, lời đầu tiên tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới TS. Nguyễn Tiến Dũng đã tận tình hướng dẫn và dìu dắt tôi trong suốt quá trình nghiên cứu và thực hiện luận văn.

Tôi xin cảm ơn lãnh đạo trường Đại học Nông Lâm – Đại học Thái Nguyên và các thầy cô giáo trong trường đã giảng dạy và tạo điều kiện cho tôi học tập và thực hiện luận văn.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến các thầy cô giáo khoa Công nghệ sinh học – Công nghệ thực phẩm trường Đại học Nông Lâm đã truyền dạy kiến thức và kỹ năng cho tôi trong suốt quá trình học tập tại trường, tạo điều kiện thuận lợi để tôi có thể thực hiện tốt đề tài nghiên cứu của mình.

Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn tới gia đình, bạn bè, đồng nghiệp cùng tập thể lớp Công nghệ sinh học K25, nhóm sinh viên trong phòng thí nghiệm Sinh học phân tử - Khoa Công nghệ Sinh học và Công nghệ thực phẩm, những người đã luôn sát cánh bên tôi, giúp đỡ, động viên và góp ý cho tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành đề tài này.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

*Thái Nguyên, ngày 02 tháng 11 năm 2019*

*Học viên*

*Trương Kim Oanh*

## MỤC LỤC

MỞ ĐẦU.....	1
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục đích nghiên cứu.....	2
1.3. Ý nghĩa của luận văn.....	2
1.3.1. Ý nghĩa khoa học .....	2
1.3.2. Ý nghĩa thực tiễn.....	2
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....	3
1.1. Vai trò của cây lúa.....	3
1.2. Tổng quan về promoter .....	5
1.2.1. Khái niệm về promoter.....	5
1.2.2. Phân loại promoter .....	6
1.2.3. Điều hòa gene ở sinh vật nhân chuẩn .....	8
1.2.4. Ứng dụng promoter trong công nghệ gene thực vật .....	13
1.2.5. Vai trò của yếu tố điều hòa Cis .....	15
1.3. Vai trò hạt phấn trong nghiên cứu chọn tạo giống cây trồng thích ứng với biến đổi khí hậu .....	16
1.4. Phương pháp chuyển gene ở thực vật qua <i>Agrobacterium</i> .....	18
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	21
2.1. Đối tượng, phạm vi nghiên cứu .....	21
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu: .....	21
2.1.2. Phạm vi nghiên cứu.....	21
2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu .....	21
2.2.1. Địa điểm nghiên cứu .....	21
2.2.2. Thời gian nghiên cứu .....	21
2.3. Vật liệu, hóa chất, thiết bị nghiên cứu .....	21
2.3.1. Vật liệu nghiên cứu .....	21
2.3.2. Hóa chất.....	22

2.3.3. Thiết bị thí nghiệm .....	23
2.4. Nội dung nghiên cứu .....	23
2.4.1. Nội dung 1: Nghiên cứu sàng lọc gene chuyên biệt hạt phấn.....	23
2.4.2. Nội dung 2: Tách dòng promoter chuyên biệt hạt phấn và thiết kế vector chuyển gene.....	23
2.4.3. Nội dung 3: Đánh giá hoạt động của promoter trên cây mô hình <i>Arabidopsis</i> .....	23
2.5. Phương pháp nghiên cứu.....	23
2.5.1. Nghiên cứu sàng lọc gene chuyên biệt hạt phấn.....	23
2.5.2. Phương pháp tách chiết DNA tổng số.....	24
2.5.3. Phương pháp khuếch đại DNA tổng số bằng kỹ thuật PCR.....	25
2.5.4. Phương pháp tinh sạch sản phẩm PCR .....	26
2.5.5. Phương pháp thiết kế vector tách dòng promoter .....	26
2.5.6. Phương pháp biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến .....	27
2.5.7. Phương pháp sàng lọc dòng tế bào tái tổ hợp .....	27
2.5.8. Phương pháp tách chiết plasmid .....	28
2.5.9. Phương pháp định lượng DNA .....	29
2.5.10. Phương pháp xác định trình tự.....	30
2.5.11. Thiết kế vector biểu hiện GUS.....	30
2.5.12. Phương pháp biến nạp vào vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> .....	31
2.5.13. Phương pháp chuyển gene trên cây <i>Arabidopsis</i> .....	32
2.5.14. Phương pháp đánh giá hoạt động của promoter .....	33
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	34
3.1. Sàng lọc gene chuyên biệt hạt phấn lúa .....	34
3.2. Tách dòng và thiết kế vector .....	36
3.3. Kết quả nghiên cứu chuyển gene và phân tích biểu hiện gen GUS .....	38
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....	42
4.1. Kết luận .....	42

4.2. Kiến nghị.....	42
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	43
PHỤ LỤC .....	43

**DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT**

<b>TỪ VIẾT TẮT</b>	<b>VIẾT ĐẦY ĐỦ</b>
CaMV	Cauliflower mosaic virus
ARN pol	RNA polymerases
TF	Transcription factor
TBP	TATA box binding protein
CRE	Cis regulatory element
IME	Intron mediate enhancement
ARF	Auxin response factors



**DANH MỤC BẢNG**

Bảng 1.1. Một số yếu tố điều hòa cis quan trọng đáp ứng điều kiện bất lợi .	16
Bảng 2.1. Trình tự môi sử dụng trong nghiên cứu.....	22
Bảng 2.2. Thành phần của phản ứng PCR.....	25
Bảng 2.3. Thành phần hóa chất tách chiết plasmid.....	28
Bảng 3.1. Các gene chuyên biệt hạt phấn lúa và vùng promoter tương ứng trong nghiên cứu.....	35

**DANH MỤC HÌNH**

Hình 1.1. Hình thái hoa và hạt phấn <i>Arabidopsis</i> trong điều kiện stress nhiệt độ cao. ....	18
Hình 2.1. Sơ đồ miêu tả phản ứng BP ghép nối gene và vector tách dòng ....	27
Hình 2.2. Sơ đồ miêu tả phân tử DNA tham gia vào phản ứng LR.....	31
Hình 3.1. Bản đồ nhiệt thể hiện mức độ biểu hiện của các gene RMP ở hạt phấn.. ....	36
Hình 3.2. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc trên gel agarose 1% để sàng lọc khuẩn lạc tái tổ hợp với vector tách dòng pDONR201 và vector chuyển gene pKGWFS7.....	38
Hình 3.3. Cấu trúc vector chuyển gene mang promoter RMP.....	38
Hình 3.4. Kết quả phân tích cây chuyển gene bằng PCR với cặp mồi GUS-F/GUS-R.....	39
Hình 3.5. Biểu hiện của gene GUS ở cụm hoa cây chuyển gene .....	41