

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

**Thadthasine PHOMMASENG**

**BIẾN NẠP VÀ BƯỚC ĐẦU PHÂN TÍCH BIỂU HIỆN  
GEN *ACF3'5'H* TỪ CÂY Ô ĐÀU Ở CÂY THUỐC LÁ**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**THÁI NGUYÊN - 2021**

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

**Thadthasine PHOMMASENG**

**BIẾN NẠP VÀ BƯỚC ĐẦU PHÂN TÍCH BIỂU HIỆN  
GEN  $AcF3'5'H$  TỪ CÂY Ô ĐÀU Ở CÂY THUỐC LÁ**

**Ngành: Sinh học thực nghiệm**

**Mã số: 8.42.01.14**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

*Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS Vũ Thị Thu Thủy*

**THÁI NGUYÊN - 2021**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan rằng, đây là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS Vũ Thị Thu Thủy. Kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa được sử dụng để bảo vệ một học vị nào.

Tôi xin cam đoan rằng, mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện luận văn đã được cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong luận văn đều được chỉ rõ nguồn gốc.

*Tác giả luận văn*

**Thadthasine PHOMMASENG**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến PGS.TS Vũ Thị Thu Thủy đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và tạo điều kiện cho tôi hoàn thành tốt quá trình học tập, thực hiện nghiên cứu đề tài và hoàn chỉnh luận văn.

Tôi cũng xin được trân trọng cảm ơn ThS. Trần Thị Hồng, Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên luôn theo dõi và hướng dẫn chu đáo để tôi tiến hành thực nghiệm luận văn này.

Tôi xin cảm ơn sự hỗ trợ của đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số B2020-TNA-11 do TS. Nguyễn Thị Ngọc Lan, Khoa Sinh học làm chủ nhiệm.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô Bộ môn Di truyền học và Công nghệ sinh học, Trường Đại học Sư phạm Đại học Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện thuận lợi và có những góp ý sâu sắc cho tôi trong thời gian học tập, thực hiện luận văn. Tôi xin cảm ơn các thầy cô và cán bộ Khoa Sinh học, các cán bộ bộ phận đào tạo Sau đại học, Trường Đại học Sư phạm Đại học Thái Nguyên đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành khóa học này.

Qua đây, tôi biết ơn những người thân trong gia đình và bạn bè đã luôn động viên, khích lệ và chia sẻ những khó khăn cùng tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu, tạo điều kiện giúp đỡ tôi thực hiện đề tài và hoàn thành bản luận văn tốt nghiệp.

*Tác giả luận văn*

**Thadthasine PHOMMASENG**

## MỤC LỤC

Lời cam đoan .....	i
Lời cảm ơn .....	ii
Mục lục .....	iii
Danh mục ký hiệu, các từ và chữ viết tắt.....	iv
Danh mục các bảng.....	v
Danh mục các hình .....	vi
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	1
1. Đặt vấn đề .....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu .....	2
3. Nội dung nghiên cứu.....	2
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....	3
1.1. Giới thiệu chung về cây thuốc lá .....	3
1.1.1. Phân loại cây thuốc lá .....	3
1.1.2. Vai trò của cây thuốc lá .....	5
1.1.3. Lịch sử hình thành - phát triển thuốc lá.....	6
1.1.4. Các đặc điểm thực vật học cây thuốc lá .....	6
1.2. Cây Ô đầu và con đường tổng hợp flavonoid ở cây Ô đầu .....	7
1.2.1. Cây Ô đầu .....	7
1.2.2. Con đường tổng hợp flavonoid ở cây Ô đầu .....	8
1.3. Gen mã hóa enzyme <i>F3'5'H</i> và các nghiên cứu biểu hiện gen <i>F3'5'H</i> .....	10
1.3.1. Gen mã hóa enzyme <i>F3'5'H</i> .....	10
1.3.2. Các nghiên cứu biểu hiện gen <i>F3'5'H</i> .....	10
1.4. Nghiên cứu chuyển gen thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> .....	11
1.4.1. Vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> .....	11
1.4.2. Chuyển gen thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	14
1.5. Đánh giá sinh vật chuyển gen bằng kỹ thuật sinh học phân tử .....	16
<b>CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	19
2.1. Vật liệu, hoá chất, thiết bị.....	19

2.1.1. Vật liệu nghiên cứu.....	19
2.1.2. Hóa chất .....	19
2.1.3. Thiết bị .....	19
2.2. Địa điểm và thời gian.....	19
2.3. Phương pháp nghiên cứu .....	20
2.3.1. Phương pháp pha môi trường nuôi cấy.....	21
2.3.2. Phương pháp biến nạp gen.....	23
2.3.3. Phương pháp tái sinh cây thuốc lá biến nạp gen.....	23
2.3.4. Phương pháp phân tích sự có mặt của gen chuyển trong cây thuốc lá biến nạp.....	24
2.3.5. Phương pháp phân tích sự biểu hiện của gen chuyển.....	26
2.4. Phương pháp phân tích số liệu.....	26
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>27</b>
3.1. Đặc điểm của cấu trúc <i>vector pCB301_AcF3'5'H</i> .....	27
3.2. Kết quả tạo cây thuốc lá biến nạp gen .....	28
3.2.1. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen chuyển <i>AcF3'5'H</i> vào mô lá thuốc lá thông qua <i>A. tumefaciens</i> .....	28
3.2.2. Kết quả tái sinh cây từ mảnh lá của cây thuốc lá.....	30
3.2.3. Kết quả ra cây ngoài vườn ươm.....	31
3.3. Kết quả phân tích sự có mặt của gen chuyển <i>AcF3'5'H</i> trên cây thuốc lá ở thế hệ T0 .....	34
3.3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số.....	34
3.3.2. Kết quả nhân gen <i>AcF3'5'H</i> bằng kỹ thuật PCR.....	36
3.4. Kết quả phân tích sự biểu hiện của gen chuyển <i>AcF3'5'H</i> trên cây thuốc lá ở thế hệ T0 .....	37
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>39</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>40</b>

## DANH MỤC KÝ HIỆU, CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

AS	Acetylseringone
BAP	6 - benzyladenine
bp	Base pair = cặp bazơ
Cefo	Cefotaxime
CNSH	Công nghệ sinh học
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
GM	Môi trường tái sinh chồi
GM Kan 50	Môi trường tái sinh chồi chứa kanamycin nồng độ 50mg/l
RM	Môi trường ra rễ
<i>gus</i>	$\beta$ - Glucuronidase gene = Gen mã hóa enzyme $\beta$ -Glucuronidase
Kan	Kanamycin
LB	Môi trường theo Luria và Bertani
kb	kilo base
MS	Môi trường cơ bản theo Murashige và Skoog (1962)
MT	Môi trường
OD	Optical density = mật độ quang học
PCR	Polymerase Chain Reaction = phản ứng chuỗi polymerase
RNA	Ribo Nucleic Acid
IBA	Indole_3_butiric acid

## DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1.	Môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962).....	21
Bảng 2.2.	Môi trường nuôi cấy cây thuốc lá .....	22
Bảng 2.3.	Môi trường nuôi cấy vi khuẩn <i>A.tumefaciens</i> .....	22
Bảng 2.4.	Trình tự cặp môi nhân gen <i>AcF3'5'H</i> .....	25
Bảng 2.5.	Thành phần phản ứng PCR .....	25
Bảng 2.6.	Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR.....	25
Bảng 3.1.	Kết quả biến nạp cấu trúc 35S_ <i>AcF3'5'H</i> _cmyc_KDE trong vector chuyển gen pCB301_ <i>AcF3'5'H</i> .....	33



## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1.	Cây thuốc lá ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.).....	4
Hình 1.2.	Con đường sinh tổng hợp flavonoid [14].....	9
Hình 1.3.	Cấu trúc không gian 3D của protein F3'5'H .....	10
Hình 1.4.	Mô hình chuyển gen gián tiếp nhờ <i>A.tumefaciens</i> [41]. .....	15
Hình 1.5.	Các mức độ đánh giá sinh vật chuyển gen.....	17
Hình 2.1.	Sơ đồ thí nghiệm chuyển gen vào cây thuốc lá .....	20
Hình 3.1.	Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pCB301_ <i>AcF3'5'H</i> . .....	27
Hình 3.2.	Hình ảnh mô tả quá trình chuẩn bị và biến nạp gen vào cây thuốc lá .....	29
Hình 3.3.	Hình ảnh mô tả quá trình tái sinh cây .....	31
Hình 3.4.	Hình ảnh cây thuốc lá chuyển gen <i>in vitro</i> ngoài vườn ươm.....	32
Hình 3.5.	Hình ảnh kết quả điện di DNA tổng số.....	35
Hình 3.6.	Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại gen <i>AcF3'5'H</i> từ các cây thuốc lá chuyển gen T0. ....	36
Hình 3.7.	Hình ảnh điện di kiểm tra kết quả RT-PCR khuếch đại gen <i>AcF3'5'H</i> (cDNA) từ các cây thuốc lá biến nạp. ....	37

## MỞ ĐẦU

### 1. Đặt vấn đề

Cây Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.) là những vị thuốc quý, được dùng phổ biến trong y dược học cổ truyền phương Đông. Củ Ô đầu chứa nhiều loại dược chất quý, trong đó có flavonoid. Flavonoid là chất chuyển hóa thứ cấp liên quan đến một số khía cạnh của sự phát triển và bảo vệ thực vật. Chúng tạo màu cho hoa và quả, tạo điều kiện cho hạt và phần phát tán, đồng thời góp phần giúp cây trồng thích nghi với các điều kiện môi trường như áp lực lạnh hoặc tia cực tím, và sự tấn công của mầm bệnh. Flavonoid là chất quan trọng có tác dụng chống oxy hóa, chống tăng sinh tế bào và đặc biệt là chống ung thư. Những năm gần đây các nhà khoa học trên thế giới quan tâm tới nhóm chất flavonoid trong chi *Aconitum* nhằm phát triển các dược phẩm theo hướng hiện đại, nâng cao hiệu quả sử dụng một số loài thuộc chi này trong phòng và điều trị bệnh. Tuy nhiên, hàm lượng flavonoid trong Ô đầu lại rất thấp, do vậy, việc lựa chọn công nghệ làm tăng hàm lượng flavonoid trong củ Ô đầu là vấn đề đặt ra cho nghiên cứu dược chất từ Ô đầu.

Con đường sinh tổng hợp flavonoid, có nhiều loại enzyme tham gia. Trong đó, có hai loại enzyme monooxygenase thuộc họ P450 tham gia, đó là flavonoid 3'-hydroxylase (*F3'H*) và flavonoid 3' 5' hydroxylase (*F3'5'H*). Enzyme *F3'5'H* giữ vai trò đặc biệt quan trọng trong việc tạo thành sản phẩm cuối của con đường sinh tổng hợp flavonoid ở thực vật. Vì vậy, khi tăng hàm lượng và hoạt tính của enzyme *F3'5'H* sẽ làm tăng tổng hợp và tích lũy hàm lượng flavonoid.

Cây thuốc lá là thực vật 2 lá mầm, có thời gian phân hóa từ mô đến cây hoàn chỉnh tương đối ngắn. Thuốc lá cũng được lựa chọn làm cây mô hình để chuyển nhiều gen có giá trị với cây trồng. Chính vì vậy, nghiên cứu chuyển gen mã hóa flavonoid 3' 5' hydroxylase (*F3'5'H*) phân lập từ cây Ô đầu vào cây thuốc lá làm cơ sở để tạo cây Ô đầu chuyển gen có hàm lượng flavonoid cao là rất cần thiết. Xuất phát từ lý do trên chúng tôi chọn đề tài **“Biến nạp và bước đầu phân tích biểu hiện gen *AcF3'5'H* từ cây Ô đầu ở cây thuốc lá”**.