ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN THỊ KHUYÊN

PHÂN LẬP GEN MÃ HÓA PROTEIN Lc ĐIỀU HÒA SINH TỔNG HỢP ANTHOCYANIN TỪ CÂY NGÔ NẾP ĐỊA PHƯƠNG

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2018

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN THỊ KHUYÊN

PHÂN LẬP GEN MÃ HÓA PROTEIN Lc ĐIỀU HÒA SINH TỔNG HỢP ANTHOCYANIN TỪ CÂY NGÔ NẾP ĐỊA PHƯƠNG

Ngành: Di truyền học
Mã ngành: 8.42.01.21

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. Phạm Thị Thanh Nhàn

THÁI NGUYÊN - 2018

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa được ai công bố.

Thái Nguyên, tháng 4 năm 2018

Tác giả luận văn

Nguyễn Thị Khuyên

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới TS. Phạm Thị Thanh Nhàn đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Trong quá trình nghiên cứu, tôi đã nhận được sự giúp đỡ của cô Trần Thị Hồng kĩ thuật viên Phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật - Khoa Sinh học Trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên và Viện Khoa học sự sống – Đại học Nông lâm – Đại học Thái Nguyên. Tôi xin chân thành cảm ơn những sự giúp đỡ quý báu đó.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô trong Bộ môn Sinh học hiện đại và Giáo dục sinh học, bộ phận Sau đại học thuộc Phòng đào tạo - Trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Tôi xin bày tỏ lời biết ơn đến gia đình, bạn bè đã động viên, khuyến khích và giúp đỡ tôi trong tiến trình học tập và hoàn thành luận văn.

Trong quá trình hoàn thiện luận văn không tránh khỏi những sai sót, tôi rất mong nhận được những đóng góp quý báu để luận văn được hoàn thiện hơn.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Thái Nguyên, tháng 4 năm 2018

Tác giả luận văn

Nguyễn Thị Khuyên

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN i
LỜI CẢM ƠN ii
MỤC LỤC iii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT iv
DANH MỤC CÁC BẢNG v
DANH MỤC CÁC HÌNH vi
MỞ ĐẦU 1
1. Đặt vấn đề 1
2. Mục tiêu của đề tài 2
3. Nội dung nghiên cứu 2
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3
1.1. Sơ lược về cây ngô 3
1.1.1. Đặc điểm sinh học của cây ngô 3
1.1.2. Giá trị dinh dưỡng và kinh tế của ngô nếp 4
1.2. Hạn và phản ứng của cây ngô trước tác động của hạn 5
1.2.1. Hạn và tính chống chịu stress oxy hóa 5
1.2.2. Cơ sở sinh lý, sinh hóa và sinh học phân tử của tính chịu hạn ở ngô 8
1.3. Anthocyanin và vai trò chuyển hóa các dạng oxy hoạt hóa 11
1.3.1. Vai trò của anthocyanin khi thực vật bị hạn 11
1.3.2. Gen điều hoà tổng hợp anthocyanin ở cây ngô 14
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 18
2.1. Vật liệu 18
2.2. Hoá chất, thiết bị và địa điểm nghiên cứu 18
2.2.1. Hóa chất 18
2.2.2. Thiết bị 18
2.2.3. Địa điểm nghiên cứu 18
2.3. Phương pháp nghiên cứu 19
2.3.1. Phương pháp gây hạn nhân tạo 19

2.3.2. Phương pháp tách chiết RNA tổng số 19
2.3.3. Phương pháp RT- PCR 20
2.3.4. Tạo vector tái tổ hợp 21
2.3.5. Biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến chủng E.coli DH5α 21
2.3.6. Kiểm tra sản phẩm tách dòng.....21
2.3.7. Tách plasmid 21
2.3.8. Phương pháp xác định trình tự gen 23
2.3.9. Phương pháp xử lý số liệu.....23
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 24
3.1. Kết quả phân lập gen Lc từ giống ngô nếp địa phương NH 24
3.1.1. Kết quả tách dòng phân tử mang gen *Lc* từ giống NH 24
3.1.2. Kết quả xác định trình tự nucleotide của gen *Lc* ở giống ngô nếp NH 26
3.2. Đặc điểm trình tự gen *Lc* của giống ngô nếp địa phương NH 26
3.2.1. So sánh trình tự gen *Lc* của giống NH với các trình tự trên GenBank.....26
3.2.2. Phân tích sự tương đồng gen *Lc* của giống NH với các gen khác trong họ bHLH.....33
3.3. Đặc điểm trình tự protein Lc suy diễn của giống ngô nếp địa phương NH.....34
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ 39
TÀI LIỆU THAM KHẢO 40

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tên tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
ABA	Abscisic acid	Axit abscisic
ANR	Anthocyanidin reductase	Enzyme chuyển hóa flavan-3-ol
ANS	Anthocyanidin synthase	Enzyme chuyển hóa tạo anthocyanidin
APX	Ascorbate peroxidase	Enzyme chuyển hoá H_2O_2 thành H_2O
bHLH	Binding helix- loop- helix	Protein họ bHLH
Bp	Base pair	Cặp bazơ nitơ
C1	Colored aleurone 1	Gen *C1*
cDNA	Complementary DNA	DNA sợi đôi được tổng hợp từ mRNA nhờ enzyme phiên mã ngược
CHS	Chalcone synthase	Enzyme xúc tác tổng hợp chalcon
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	Chất ức chế enzyme phân hủy RNA
CLP	Protease CLP	Enzym protease CLP
DFR	Dihydroflavonol 4 reductase	Enzyme chuyển hóa tạo leucoanthocyanidin
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic (ADN)
dNTPs	Deoxynucleotit triphosphate	Các loại nucleotit triphotphate
DRE	Dehydration responsive element	Yếu tố đáp ứng với hydrat hóa
EDTA	Ethylene diamine tetraa acid cetic	Axit etylen diamin tetraxetic
EREBP	Ethylene-responsive element binding protein	Protein liên kết nguyên tố Ethylene
GSH	Glutathione	
LEA	Late embryo abundant	Protein trong giai đoạn muộn của quá trình hình thành phôi
Lc /LC	Leaf colour	Gen *Lc*

LcF/LcR	Forward primer/ Reverse primer	Cặp mồi xuôi ngược trong phản ứng RT-PCR của mRNA gen *Lc*
MGPT	Molecular brokerage	Môi giới phân tử
MYB	Myeloblastosis	Gen *MYB*
MYC	Myelocolour	Gen *MYC*
mRNA	Messenger RNA	ARN thông tin
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Coenzym được sử dụng trong phản ứng đồng hóa
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
RNA	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic (ARN)
RT- PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction	Phản ứng khuếch đại cDNA từ mRNA nhờ enzyme phiên mã ngược
ROS	Reactive oxygen species	Các dạng oxy hoạt hóa
SOD	Superoxide dismutase	Enzyme xúc tác phản ứng loại bỏ superoxide
Sol	Solution	Dung dịch
TF	Transcription factors	Các nhân tố phiên mã, hay yếu tố phiên mã
Cs	Cộng sự	Người cùng làm chung trong một công việc

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Thành phần phản ứng PCR.....20
Bảng 2.2. Thành phần dung dịch tách plasmid.....22
Bảng 3.1. Các vị trí sai khác về nucleotid giữa gen *Lc* của giống NH với các trình tự trên GenBank.....32
Bảng 3.2. Bảng hệ số tương đồng di truyền về gen *Lc* giữa giống NH và các trình tự trên GenBank. 33
Bảng 3.3. Sự sai khác về amino acid trong protein Lc suy diễn giữa giống NH với các trình tự trên GenBank.....36
Bảng 3.4. Bảng hệ số tương đồng di truyền về protein Lc suy diễn giống NH và một số trình tự trên GenBank. 38

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc cơ bản của aglucon của anthocyanin 11
Hình 1.2. Vai trò chất chống oxy hóa của anthocyanin 13
Hình 1.3. Ba nhóm gen điều hòa tham gia tổng hợp anthocyanin ở ngô 15
Hình 1.4. Cấu trúc không gian của protein bHLH 16
Hình 1.5. Các vùng chức năng của nhân tố bHLH 16
Hình 3.1. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm RT- PCR gen *Lc*.....24
Hình 3.2. Hình ảnh điện di kiểm tra plasmid (A) và sản phẩm clony- PCR (B) 25
Hình 3.3. Hình ảnh điện di kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng *BamHI* (B) 25
Hình 3.4. Ảnh blast trình tự nucleotid của gen *Lc* giống NH trên NCBI 26
Hình 3.5. So sánh trình tự nucleotid của gen *Lc* ở giống NH và trình tự khác trên GenBank. 31
Hình 3.6. Sơ đồ hình cây mô tả mối quan hệ di truyền giữa gen *Lc* của giống ngô NH với các gen thuộc họ bHLH 33
Hình 3.7. So sánh trình tự amino acid suy diễn của protein Lc ở giống NH và các trình tự trên GenBank.....35
Hình 3.8. Sơ đồ hình cây mô tả mối quan hệ di truyền giữa protein Lc suy diễn của giống ngô NH với các trình tự trên GenBank 38