ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

PHẠM HẢI YẾN

NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN *GmCHI* VÀO GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT51

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN – 2018

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

PHẠM HẢI YẾN

NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN *GmCHI* VÀO GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT51

Chuyên ngành : **Sinh học thực nghiệm**
Mã số : **8 42 01 14**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS. Chu Hoàng Mậu

THÁI NGUYÊN – 2018

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan nội dung trình bày trong luận văn là kết quả nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn trực tiếp của GS.TS. Chu Hoàng Mậu. Các số liệu, kết quả sử dụng trong luận văn là trung thực và được sự đồng ý của cán bộ hướng dẫn và nhóm nghiên cứu.

Tác giả luận văn

Phạm Hải Yến

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc nhất tới GS.TS. Chu Hoàng Mậu, người thầy đã tận tình giúp đỡ, hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện tốt nhất giúp tôi thực hiện nghiên cứu và hoàn thành bản luận văn thạc sĩ này.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của Đề tài cấp Bộ Giáo dục & Đào tạo *"Nghiên cứu nâng cao hàm lượng isoflavone trong cây đậu tương bằng công nghệ gen",* mã số B2016-TNA-18 do TS Hoàng Phú Hiệp làm chủ nhiệm.

Tôi xin cảm ơn cô Trần Thị Hồng, nghiên cứu sinh Lê Thị Hồng Trang cùng toàn thể các thầy cô và cán bộ Bộ môn Sinh học hiện đại & Giáo dục sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên đã tạo điều kiện và giúp đã tôi trong quá trình nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin được gửi lời cảm ơn đến gia đình và bạn bè đã động viên, giúp đỡ để tôi có thể hoàn thành bài luận văn này.

Tác giả luận văn

Phạm Hải Yến

MỤC LỤC

Trang

Lời cam đoan……. i

Lời cảm ơn…… ii

Mục lục……. iii

Danh mục bảng……..... iv

Danh mục hình…… v

Danh mục chữ viết tắt……... vi

Mở đầu ……. 1

1. Đặt vấn đề ……..... 1

2. Mục tiêu nghiên cứu ……. 2

3. Nội dung nghiên cứu……..... 2

Chương 1. Tổng quan tài liệu…… 3

1.1. Cây đậu tương…… 3

1.1.1. Đặc điểm hình thái cây đậu tương……..... 3

1.1.2. Vai trò của đậu tương……..... 4

1.2. Isoflavone và enzyme chìa khóa trong quá trình sinh tổng hợp isoflavone..……..... 6

1.2.1. Isoflavone...……. 6

1.2.2. Con đường sinh tổng hợp isoflavone ở đậu tương……..... 9

1.2.3. Enzyme chalcone isomerase (CHI) và *gen GmCHI*…..... 10

1.3. Chuyển gen ở đậu tương nhờ *Agrobacterium*…….…… 13

1.3.1. Tình hình nghiên cứu chuyển gen ở đậu tương..... 13

1.3.2. Nghiên cứu biểu hiện gen *CHI*……..……. 17

Chương 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu..... 19

2.1. Vật liệu nghiên cứu…… 19

2.2. Hóa chất và thiết bị…… 21

2.3. Phương pháp nghiên cứu…… 21

2.3.1. Phương pháp tạo cây đậu tương chuyển gen…….. 21

2.3.2. Phương pháp sinh học phân tử……..... 24

2.4. Địa điểm nghiên cứu và hoàn thành luận văn……..... 27

Chương 3. Kết quả và thảo luận……..... 28

3.1. Chuyển cấu trúc *35S-GmCHI-cmyc* vào giống đậu tương ĐT51 nhờ *A.tumefaciens*……..... 28

3.1.1. Kết quả khử trùng hạt……..... 28

3.1.2. Kết quả tạo nguyên liệu biến nạp…… 29

3.1.3. Kết quả lây nhiễm và tái sinh cây đậu tương ……. 30

3.2. Phân tích sự có mặt của gen chuyển *GmCHI* trong đậu tương chuyển gen thế hệ T0…… 35

3.2.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số……. 35

3.2.2.Kết quả phân tích khuếch đại gen chuyển *GmCHI*…….. 36

3.3. Thảo luận kết quả nghiên cứu…… 38

Kết luận và đề nghị…….. 42

1. Kết luận……. 42

2. Đề nghị…….. 42

Công trình công bố liên quan đến luận văn……... 43

Tài liệu tham khảo……..... 44

Phụ lục 1……..... 50

Phụ lục 2……..... 51

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Thành phần đệm tách DNA tổng số..... 24

Bảng 2.2. Trình tự nucleotide của các cặp mồi *GmCHI-coI-F/GmCHI-cmyc-SacI-R*..... 25

Bảng 2.3. Thành phần của phản ứng PCR nhân bản đoạn *GmCHI-cmyc-KDEL*……. 26

Bảng 2.4. Chu kì nhiệt của phản ứng PCR…….. 26

Bảng 3.1. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen *GmCHI* nhờ vi khuẩn *A.tumefaciens* qua nách lá mầm hạt chín……... 34

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc phân tử isoflavone..…….. 7

Hình 1.1. Chu trình chuyển hóa isoflavone..……..... 11

Hình 2.1. Giống đậu tương ĐT51…… 19

Hình 2.2. Sơ đồ cấu trúc *35S-GmCHi-cmyc* trong vector chuyển gen *pCB301_GmCHI* trong vi khuẩn *A.tumefaciens*…….. 20

Hình 2.3. Sơ đồ thí nghiệm chuyển gen vào cây đậu tương qua nách lá mầm……..... 23

Hình 3.1. Khử trùng hạt bằng khí clo trong bình thủy tinh kín 29

Hình 3.2. Hình ảnh hạt đậu tương và hạt nảy mầm trong giai đoạn chuẩn bị nguyên liệu cho biến nạp…….. 30

Hình 3.3. Hình ảnh của đậu tương trong giai đoạn gây tổn thương nách lá mầm và biến nạp…….. 31

Hình 3.4. Hình ảnh của đậu tương chuyển gen trong giai đoạn tạo chồi và kéo dài chồi……..... 32

Hình 3.5. Hình ảnh của đậu tương chuyển gen trong giai đoạn ra rễ và trồng cây đậu tương chuyển gen trên giá thể ……..... 33

Hình 3.6. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm DNA tổng số tách từ lá các cây đậu tương chuyển gen và cây không chuyển gen..... 36

Hình 3.7. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen *GmCHI-cmyc-KDEL* từ các cây đậu tương chuyển gen và cây không chuyển gen với cặp mồi *GmCHI-NcoI-F/GmCHI-cmyc- SacI-R*……..... 37

DANH MỤC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

GmCHI	*Glycine max chalcone isomerase*
CHI	*Chalcone isomerse*
PCR	Polymerase Chain Reaction
A. tumefaciens	*Agrobacterium tumefaciens*
HPLC	High-performance liquid chromatography (Sắc ký lỏng áp suất cao)
ER	Estrogens receptor (thụ thể estrogens)
CHR	Chalcone reductase
CHS	Chalcone synthease
IFS	Isoflavones synthease
PAL	Phenylalanine amoni-lyase
DNA	Deoxyribonucleotide acid
cDNA	Complementary deoxyribonucleotide acid
BAP	6-Benzylaminopurine
GA_3	Gibberillic acid
IAA	Indole-3-acetic acid
DNTPs	Deoxynucleotide triphosphate