

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**

NGUYỄN VIỆT ANH

**PHÂN LẬP GEN MÃ HÓA NHÂN TỐ PHIÊN MÃ DREB6
TỪ CÂY ĐẬU TƯƠNG PHỤC VỤ THIẾT KẾ
VECTOR CHUYỂN GEN THỰC VẬT**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2018

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**

NGUYỄN VIỆT ANGA

**PHÂN LẬP GEN MÃ HÓA NHÂN TỐ PHIÊN MÃ DREB6
TỪ CÂY ĐẬU TƯƠNG PHỤC VỤ THIẾT KẾ
VECTOR CHUYỂN GEN THỰC VẬT**

Ngành: DI TRUYỀN HỌC

Mã số: 8 42 01 21

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Cán bộ 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 cùng nhóm nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về những kết quả nghiên cứu trong luận văn này.

Tác giả luận văn

Nguyễn Việt Nga

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 giúp đỡ của PGS.TS. Lê Văn Sơn và nhóm nghiên cứu, Viện Công nghệ sinh học đã tận tình giúp đỡ tôi hoàn thành thí nghiệm phân lập gen. Tôi xin cảm ơn 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 đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Luận văn được sự hỗ trợ của Đề tài cấp Bộ Giáo dục & Đào tạo “*Nghiên cứu bước đầu tạo dòng cây đậu tương chuyển gen GmDREB6 có khả năng chịu hạn cao*”, mã số B2017-TNA-38.

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

Nguyễn Việt Nga

MỤC LỤC

	Trang
TRANG BÌA PHỤ	
LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT	iv
DANH MỤC BẢNG	v
DANH MỤC HÌNH	vi
MỞ ĐẦU	1
1.Đặt vấn đề	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
3. Nội dung nghiên cứu.....	3
4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn	3
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1.Cây đậu tương	4
1.1.1. Cây đậu tương.....	4
1.1.2. Tình hình sản xuất đậu tương trên thế giới và Việt Nam.....	8
1.2. Gen và đặc tính chịu hạn của cây đậu tương.....	9
1.2.1. Cơ chế chịu hạn của cây đậu tương.....	9
1.2.2. Gen liên quan đến tính chịu hạn của cây đậu tương.....	11
1.3. Phân họ gen mã hóa nhân tố phiên mã <i>DREB</i>	12

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	16
2.1. Vật liệu nghiên cứu và địa điểm nghiên cứu.....	16
2.1.1. Vật liệu nghiên cứu.....	16
2.1.2. Địa điểm nghiên cứu.....	17
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	18
2.2.1. Nghiên cứu thông tin về gen và thiết kế cặp mồi nhân gen.....	19
2.2.2. Phương pháp tách chiết RNA tổng số.....	20
2.2.3. Phương pháp tạo cDNA.....	21
2.2.4. Phương pháp PCR.....	21
2.2.5. Tách dòng gen <i>GmDREB6</i>	22
2.2.6. Phương pháp xác định trình tự nucleotide và xử lý kết quả.....	24
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	25
3.1. Thiết kế cặp mồi PCR và nhân bản gen <i>GmDREB6</i> từ giống đậu tương DT2008.....	25
3.1.1. Thiết kế cặp mồi <i>DREB6-F/DREB6-R</i>	25
3.1.2. Kết quả tách chiết RNA tổng số và tổng hợp cDNA.....	26
3.1.3. Kết quả nhân bản gen <i>GmDREB6</i>	27
3.2. Tách dòng và giải trình tự gen <i>GmDREB6</i> từ giống đậu tương DT2008.....	28
3.2.1. Kết quả tách dòng gen <i>DREB6</i>	28
3.2.2. Kết quả giải trình tự gen <i>GmDREB6</i> từ giống đậu tương DT2008.....	29

3.3. Đặc điểm của trình tự gen <i>GmDREB6</i> phân lập từ giống đậu tương DT2008.....	31
3.3.1. So sánh trình tự nucleotide của gen <i>GmDREB6</i> phân lập từ giống đậu tương DT2008 với trình tự EF551166 và NM_001248412 trên GenBank.....	31
3.3.2. So sánh trình tự amino acid suy diễn của gen <i>GmDREB6</i> của giống DT2008 với trình tự amino acid suy diễn của EF551166 và NM_001248412 trên GenBank.....	34
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	40
1. Kết luận.....	40
2. Đề nghị.....	40
CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN.....	41
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	42

DANH MỤC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

AP2/ERF	<i>APETALA2/Ethylene Responsive Factor</i>
bp	Base pair
cDNA	Complementary deoxyribonucleotide acid
cs	Cộng sự
DNA	Deoxyribonucleotide acid
DNase	Deoxyribonuclease
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>GmDREB6</i>	<i>Glycine max</i> Dehydration responsive element binding protein 6
gr	Gram
HSP	Heat Shock Protein
LEA	Late Embryogenesis Abundant
LTP	Lipid Transfer Protein
NST	Nhiễm sắc thể
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleotide acid
TAE	Tris – Acetate - EDTA

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Trình tự nucleotide của cặp mồi.....	19
Bảng 2.2. Các bước tiến hành tách RNA tổng số.....	20
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng tạo cDNA.....	21
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng PCR.....	22
Bảng 2.5. Bảng chu kỳ nhiệt phản ứng nhân gen <i>DREB6</i>	22
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng gắn gen <i>GmDREB6</i> vào vector tách dòng.....	23
Bảng 2.7. Thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn <i>E.coli</i>	24
Bảng 3.1. Các vị trí sai khác trong trình tự nucleotide của gen <i>GmDREB6</i> phân lập từ giống cây đậu tương DT2008 và trình tự mang mã số EF551166 và NM_001248412.....	33
Bảng 3.2. Các vị trí sai khác trong trình tự amino acid suy diễn của gen <i>GmDREB6</i> phân lập từ giống đậu tương DT2008 và suy diễn từ trình tự mang mã số EF551166, NM_001248412.....	38

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Vị trí của gen <i>GmDREB6</i> trên NST số 5 của cây đậu tương.....	14
Hình 1.2. Trình tự amino acid của protein DREB6 trên Genbank mang mã số ABQ42205.....	15
Hình 2.1. Hạt của giống đậu tương DT2008.....	16
Hình 2.2. Vector pBT sử dụng trong tách dòng phân tử gen <i>GmDREB6</i> từ cây đậu tương.....	17
Hình 2.3. Sơ đồ tóm tắt quá trình thực hiện phân lập gen <i>GmDREB6</i> từ giống đậu tương DT2008.....	18
Hình 3.1. Sơ đồ thiết kế cặp mồi <i>DREB6-F/DREB6-R</i>	25
Hình 3.2. Kết quả tách chiết RNA tổng số từ lá non của giống đậu tương DT2008.....	26
Hình 3.3. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen <i>GmDREB6</i> (cDNA) từ mRNA của giống đậu tương DT2008.....	27
Hình 3.4. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR nhân bản gen <i>GmDREB6</i> từ 5 dòng khuẩn lạc màu trắng.....	28
Hình 3.5. Kết quả phân tích BLAST gen <i>GmDREB6</i> phân lập từ giống đậu tương DT2008.....	29
Hình 3.6. Trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của gen <i>GmDREB6</i> phân lập từ giống đậu tương DT2008.....	30
Hình 3.7. So sánh trình tự nucleotide của gen <i>GmDREB6</i> phân lập từ giống đậu tương DT2008 và trình tự gen <i>GmDREB6</i> mang mã số EF551166, NM_001248412.2 trên Genbank.....	32