

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

V.KHCNVN  
V.CNSH  
V.KHCNVN  
V.CNSH

V.KHCNVN  
V.CNSH

## SẢN PHẨM ĐỀ TÀI

NGHIÊN CỨU ÁP DỤNG CÔNG NGHỆ GEN ĐỂ TẠO  
CÂY CHUYỂN GEN NÂNG CAO SỨC CHỐNG CHỊU ĐỐI  
VỚI SÂU BỆNH VÀ NGOẠI CẢNH BẤT LỢI

Mã số: **KC.04.13**

Chủ nhiệm Đề tài: **PGS. TS. LÊ TRẦN BÌNH**

Cơ quan chủ trì: Viện Công nghệ Sinh học

Cơ quan chủ quản: Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Thời gian thực hiện: 10/2001 - 10/2004

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
**VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

---

V.KHCNVN  
V.CNSH  
V.KHCNVN  
V.CNSH

V.KHCNVN  
V.CNSH

*Sản phẩm Đề tài*

**Nghiên cứu áp dụng công nghệ gen  
để tạo cây chuyển gen nâng cao sức chống chịu  
đối với sâu bệnh và ngoại cảnh bất lợi**

*Mã số:* **KC.04.13**

*Chủ nhiệm Đề tài:* **PGS. TS. LÊ TRẦN BÌNH**

*Cơ quan chủ trì:* Viện Công nghệ Sinh học

*Cơ quan chủ quản:* Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

*Thời gian thực hiện:* 10/2001 - 10/2004

**Hà Nội, 2005**

## *Mục lục*

<b>I. DANH SÁCH CÁC DÒNG CÂY CHUYỂN GEN VÀ CÁC GEN THU ĐƯỢC TRONG ĐỀ TÀI.....</b>	<b>1 - 4</b>
<b>I.1. Danh sách các dòng cây chuyển gen.....</b>	
I.1.1. Danh sách các dòng cây bông chuyển gen.....	1
I.1.2. Danh sách các dòng cây hồng chuyển gen.....	1
I.1.3. Danh sách các dòng cây hoa cúc chuyển gen.....	2
I.1.4. Danh sách các dòng cây lúa chuyển gen.....	3
<b>I.2. Danh sách các gen thu được trong đề tài.....</b>	<b>4</b>
I.2.1. Danh sách các gen phân lập được.....	4
I.2.2. Danh sách các gen sưu tập được.....	4
<b>II. CÁC QUY TRÌNH TẠO ĐƯỢC.....</b>	<b>5 - 76</b>
II.1. Quy trình tách dòng gen <i>vip3</i> mã hóa protein có hoạt tính diệt côn trùng.....	5
II.2. Quy trình tái sinh cây bông qua đa chồi.....	13
II.3. Quy trình tái sinh cây bông qua phôi soma.....	17
II.4. Quy trình chuyển gen trực tiếp qua ống phấn bằng vi tiêm.....	21
II.5. Quy trình chuyển gen cây hồng.....	35
II.6. Quy trình nuôi cấy mô, chuyển gen và đánh giá cây hoa cúc chuyển gen.....	46
II.7. Quy trình chuyển gen vào cây lúa nhờ súng bắn gen.....	53
II.8. Quy trình chuyển gen vào lúa thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> và chọn dòng bằng manose đấm bảo tạo ra cây chuyển gen „sạch“, không chứa gen kháng kháng sinh.....	56
II.9. Quy trình chuyển gen vào lúa thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> và chọn dòng kinh điển bằng kháng sinh hygromycin .....	61
II.10. Quy trình Thử nghiệm sinh học tính kháng sâu đục thân hai chấm <i>Scirpophaga incertulas</i> của các dòng lúa biến đổi gen <i>Bt</i> .....	65
II.11. Quy trình nhận biết và đánh giá cây lúa chuyển gen.....	69
<b>III. NHỮNG ĐÓNG GÓP KHÁC TRONG ĐỀ TÀI</b>	
Pocket 1: Hỏi đáp về cây chuyển gen	
Pocket 2: Sản phẩm công nghệ sinh học thực phẩm (hiện nay đang được bán trên thị trường)	
Pocket 3: An toàn cho người tiêu dùng: Các thực phẩm chuyển gen có an toàn hay không	
Pocket 4: Cây trồng chuyển gen và môi trường	
Pocket 5: Những lợi ích đã được ghi nhận của cây chuyển gen	
Pocket 6: Công nghệ BT kháng côn trùng	
Pocket 7: Dán nhãn thực phẩm GM	
Pocket 8: Nghị định thư Cartagena về an toàn sinh học	
Pocket 9: Quyền sở hữu trí tuệ và công nghệ sinh học nông nghiệp	
Pocket 10: Công nghệ kháng thuốc diệt cỏ	
Pocket 11: Đóng góp của công nghệ GM trong chăn nuôi	
Pocket 12: Công nghệ chín chậm	
Sách tham khảo: An toàn sinh học: Đánh giá và quản lý rủi ro các sinh vật biến đổi gen	

## QUY TRÌNH PHÂN LẬP GEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP PCR

### 1. Các bước trong quy trình phân lập gen *vip3*

#### **Bước 1.** Tách chiết ADN tổng số của *Bacillus thuringiensis* AB51

Tách chiết ADN tổng số của *Bacillus thuringiensis* AB51 được tiến hành theo phương pháp của Vance Kramer và cộng sự (2002).

- Cấy chuyển một khuẩn lạc vào 10 ml LB lỏng, nuôi lắc ở 30°C, 200v/p, qua đêm.
- Ly tâm 6.000 v/p, 10 phút, 4°C, thu tủa.
- Hoà tan tủa trong 4 ml TE có chứa 8 mg lysozym.
- Ủ hỗn hợp ở 37°C trong 1 giờ, thêm protein K tới nồng độ cuối cùng 100 òg/ml rồi ủ tiếp ở 37°C trong 1 giờ.
- Thêm tiếp vào hỗn hợp các chất sau theo thứ tự: 1M urea 7M, 50mM EDTA, 1% SDS.
- Sau mỗi lần thêm các chất phải đánh đều. Ủ ở 55°C qua đêm.
- Tách chiết 1 lần với Phenol/Chloroform (tỉ lệ 1:1 so với mẫu), ly tâm 5 phút ở 4°C.
- Tách chiết lại một lần nữa với Phenol, tủa dịch chiết bằng Isopropanol (tỉ lệ 1:1 so với mẫu), để qua đêm để ADN tủa hoàn toàn. Ly tâm thu tủa ở 12.000 v/p, 15 phút, 4°C. Rửa tủa 3 lần bằng cồn 70%.
- Để khô ADN ở nhiệt độ phòng, hoà tan trong TE, bảo quản ở 4°C.

#### **Bước 2.** Phản ứng PCR

Trên cơ sở trình tự gen *vip3A* đã được công bố (kí hiệu AY295778 trong ngân hàng gen NCBI), chúng tôi đã thiết kế cặp mồi đặc hiệu V2.1 và V2.2 để nhân gen *vip3*.

Bảng 1. Trình tự và các thông số cần thiết của hai môi V2.1 và V2.2

STT	Trình tự môi	Tm	% GC	Vị trí gắn
V2.1	5'-GCGGATCCATGAACAATAATACTAA-3'	61°C	32,2	1 - 20
V2.2	5'-CGGAGCTCTTACTTATATGAGACATCGTA-3'	62,5°C	41,5	2349 - 2370

Bảng 2. Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (àl)
Nước cất hai lần	29,75
Dung dịch đệm (10X)	5
dNTP	3
MgCl <sub>2</sub>	3
V <sub>2.1</sub>	2
V <sub>2.2</sub>	2
ADN mẫu	5
Taq ADN polymerase	0,25
Tổng	50

Bảng 3. Chương trình thực hiện phản ứng PCR

Bước	Phản ứng	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ
1	Biến tính	94	2 phút	1
2	Biến tính	94	30 giây	
3	Bắt cặp	61	45 giây	
4	Kéo dài	72	1 phút 30 giây	
5	Hoàn tất kéo dài	72	10 phút	
6	Kết thúc phản ứng	4	∞	

### Bước 3. Gắn gen *vip3* vào vectơ tách dòng

Sau khi nhân bản gen *vip3* và kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 0,8%, chúng tôi đã tiến hành gắn trực tiếp sản phẩm PCR vào vectơ tách dòng pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO của hãng Invitrogen.

Bảng 4. Thành phần hỗn hợp phản ứng nối ghép

Thành phần	Thể tích ( $\mu$ l)
Nước cất hai lần	3,5
Dung dịch đệm (10X)	1
Sản phẩm PCR	4
Vectơ pCRđ2.1- TOPO (25 ng/ $\mu$ l)	0,5
T <sub>4</sub> ADN ligase	1
Tổng	10

Dịch hỗn hợp được ủ ở 16°C qua đêm (16 giờ) sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến chủng *E.coli* DH5 $\alpha$  để tách dòng.

**Bước 4.** Biến nạp plasmit tái tổ hợp vào tế bào *E.coli* DH5 $\alpha$

Biến nạp plasmit tái tổ hợp vào tế bào *E.coli* DH5 $\alpha$  được tiến hành theo Cohen và cộng sự (1972). Màng tế bào vi khuẩn dưới tác dụng của hoá chất hoặc điện trường trở nên xốp, mỏng hơn và tạo các lỗ cho các phân tử ADN có thể chui vào. Sau đó, các tế bào được phục hồi trong môi trường nuôi cấy và các thể biến nạp được phát hiện trên môi trường thích hợp.

+ Chuẩn bị tế bào khả biến

Chọn một khuẩn lạc *E.coli* nuôi cấy trong 10 ml LB lỏng, lắc 200 v/p, 37°C, qua đêm. Hút 0,5 ml dịch tế bào cho vào 50 ml LB lỏng, lắc 200 v/p, 37°C, trong 4 giờ. Ly tâm 4.000 v/p, 4°C, 5 phút, thu tủa. Tan tủa tế bào trong 5 ml CaCl<sub>2</sub> 0,1M (để lạnh sẵn ở 0°C), ly tâm thu tủa.

Tan tủa tế bào trong 0,85 ml CaCl<sub>2</sub> 0,1M và 0,15 ml glycerol. Chia nhỏ 200  $\mu$ l vào các ống Eppendorf 1,5 ml; bỏ nhanh vào N<sub>2</sub> lỏng, giữ ở 80°C.

+ Biến nạp

Bổ sung trực tiếp vào ống đựng tế bào khả biến 3  $\mu$ l ADN plasmit, ủ 30 phút trong đá. Sốc nhiệt ở 42°C trong 2 phút rồi chuyển ngay sang giữ trong đá 2 - 3 phút. Cho thêm 250  $\mu$ l môi trường SOC, nuôi lắc 200 v/p ở 37°C trong 45-60 phút. Trải 100  $\mu$ l dịch tế bào lên trên đĩa LB đặc chứa Ampicillin nồng độ cuối cùng 100  $\mu$ g/ml, IPTG 100  $\mu$ g/ml và X-Gal 0.4% rồi ủ ở 37°C qua đêm.

### **Bước 5.** Tách plasmit

Tiến hành theo phương pháp của Birnboim & Doly (1979); Ish-Horowicz & Burke (1981).

- Cấy chuyển một khuẩn lạc vào ống nghiệm chứa 10 ml LB lỏng có bổ sung kháng sinh chọn lọc, lắc qua đêm ở 37°C, 200 v/p.
- Chuyển 2 ml dịch nuôi cấy vào các ống Eppendorf loại 2 ml và đem ly tâm 6.000 v/p, 5 phút, 4°C để thu tế bào. Cặn được hoà trong 200  $\mu$ l dung dịch I bằng máy vortex.
- Bổ sung ngay 400  $\mu$ l dung dịch II, đảo nhẹ nhàng, giữ trong đá 5 phút.
- Bổ sung tiếp 300  $\mu$ l dung dịch III, đảo nhẹ nhàng, giữ trong đá 3 phút.
- Ly tâm 10.000 v/p, 4°C, 10 phút. Chuyển dịch nổi sang ống Eppendorf mới. Bổ sung 900  $\mu$ l dung dịch Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol (25:24:1), trộn thật đều và đem ly tâm 10.000 v/p, 15 phút để loại protein và ADN nhiễm sắc thể.
- Hút nhẹ nhàng pha trên sang ống Eppendorf mới (tránh làm vẩn pha dưới). Tủa dung dịch thu được với 1 lần thể tích Isopropanol. Đảo nhẹ nhàng, để yên ở nhiệt độ phòng 2-5 phút. Thu ADN kết tủa trong dung dịch bằng cách ly tâm 13.000 v/p, 15 phút.
- Bổ sung thêm 1 ml cồn 70%, ly tâm 13.000 v/p, 2 phút. Làm khô tủa. Hoà tan ADN thu được trong 300  $\mu$ l TE hoặc nước cất hai lần khử trùng chứa ARNase 10  $\mu$ g/ml và ủ ở 37°C trong vòng 1 giờ. Chạy điện di kiểm tra 2-5  $\mu$ l trên gel agarose 0.8%.

+ Hóa chất

- Dung dịch I: glucose 50mM; Tris-HCl 25mM; EDTA 10mM; pH 8,0
- Dung dịch II: NaOH 0,2N; SDS 1%
- Dung dịch III: 60 ml Potassium acetat 5M; 11,5 ml axit acetic; 28,5 ml H<sub>2</sub>O

### **Bước 6.** Chọn plasmit mang gen *vip3*

ADN plasmit được xử lý với enzym giới hạn *E.coRI* theo phản ứng:

H <sub>2</sub> O	3,7 µl
Đệm 10X riêng của enzym	1 µl
ADN	5 µl
Enzym (10U/µl)	0,3 µl
Tổng thể tích phản ứng	<b>10 µl</b>

**Bước 7. Đọc trình tự nucleotit gen *vip3***

Gen *vip3* được xác định trình tự trên máy tự động ABI PRIMS<sup>d</sup> 3100 Avant Genetic Analyzer bằng cách sử dụng bộ hoá chất sinh chuẩn BigDye<sup>d</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Do gen *vip3* có kích thước lớn nên để xác định đầy đủ và chính xác trình tự, nên chúng tôi đã sử dụng thêm một cặp môi nằm phía bên trong gen kí hiệu là V3.1 và V3.2.

Bảng 6. Thành phần phản ứng PCR cho xác định trình tự

Thành phần	Thể tích(µl)
Dung dịch đệm(5X)	3
Môi xuôi	1,275
ADN mẫu (~100 ng)	7,725
BigDye	3
<b>Tổng</b>	<b>15</b>

Bảng 7. Chương trình phản ứng PCR cho xác định trình tự

Bước	Phản ứng	Nhiệt độ	Thời gian	Chu kỳ
1	Biến tính	96°C	1 phút	
2	Biến tính	96°C	10 giây	
3	Bắt cặp	55°C	5 giây	
4	Kéo dài	60°C	4 phút	
5	Hoàn tất kéo dài	72°C	8 phút	
6	Kết thúc phản ứng	4°C	30phút	

Sản phẩm PCR được rửa bằng cách bổ sung 5µl 125mM EDTA, 60µl 100% EtOH. ủ ở nhiệt độ phòng 15 phút. Ly tâm dịch 12000 v/p trong 15 phút, loại bỏ EtOH. Rửa rửa bằng



70 à 70% EtOH, ly tâm 12000 v/p trong 5 phút rồi để khô. Bổ sung 10  $\mu$ l Hi-Di™ Formamide và biến tính ở 95°C trong 5 phút. Các mẫu được tra vào các giếng của khay đựng mẫu và điện di trong ống mao quản (80 cm x50  $\mu$ l) với polymer POP-4™ của hãng ABI, Mỹ.


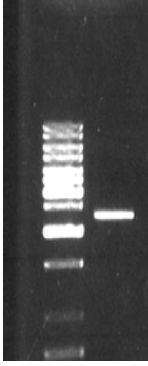
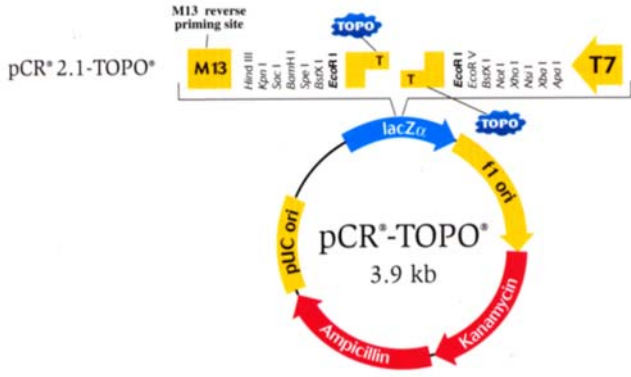
#### **Bước 8.** So sánh trình tự nucleotit

Trình tự nucleotit vừa được xác định sẽ được xử lý so sánh với trình tự nucleotit của gen *vip* đã được công bố trong ngân hàng gen quốc tế bằng phần mềm ADNStar và BioEdit.

## **2. Sản phẩm của quy trình**

1. Plasmid pCR2.1 mang gen *vip3*.
2. Tế bào vi khuẩn E.coli chủng DH5 $\alpha$  mang gen *vip3*.
3. 01 trình tự gen *vip3*

Sơ đồ 1. Quy trình phân lập gen *vip3*

Bước	Nội dung thực hiện	Ảnh minh họa
1	Tách chiết ADN tổng số của <i>Bacillus thuringiensis</i> AB51	
2	Phản ứng PCR	
3	Gắn gen <i>vip3</i> vào vectơ tách dòng	
4	Biến nạp plasmit tái tổ hợp vào tế bào <i>E.coli</i> DH5α	