

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

BÙI TRI THỨC

NGHIÊN CỨU THIẾT KẾ VECTOR PB2GW7 MANG GEN *CRYIA(C)*
VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG CHUYỂN GEN TRÊN CÂY
ARABIDOPSIS THALIANA

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên – 2011

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

BÙI TRI THỨC

NGHIÊN CỨU THIẾT KẾ VECTOR PB2GW7 MANG GEN *CRYIA(C)*
VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG CHUYỂN GEN TRÊN CÂY
ARABIDOPSIS THALIANA

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Chuyên ngành Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60.46.30

Người hướng dẫn khoa học: PGS. TS. Ngô Xuân Bình

Thái Nguyên – 2011

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình học tập và nghiên cứu để hoàn thành khóa luận tôi đã nhận được sự hướng dẫn, giúp đỡ, chỉ bảo và động viên của thầy cô, bạn bè và gia đình.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới Thầy giáo: PGS. TS Ngô Xuân Bình, đã giúp đỡ và hướng dẫn tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài cũng như trong quá trình hoàn chỉnh luận văn tốt nghiệp.

Tôi xin chân thành cảm ơn lãnh đạo trường Đại học Sư phạm, khoa Sau đại học, bộ môn Sinh học phân tử và Công nghệ gen - Viện Khoa học Sự sống, Ban chủ nhiệm khoa Sinh - KTNN và các thầy cô giáo, cán bộ khoa Sinh - KTNN đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới gia đình, người thân và bạn bè đã luôn động viên, chia sẻ giúp đỡ tôi vượt qua mọi khó khăn trong quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Tác giả luận văn

Bùi Tri Thức

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực, chưa được công bố trong bất kì công trình nào khác.

Tác giả

MỤC LỤC

	Trang
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	4
1.1. Vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> và quá trình chuyển gen vào cây trồng	4
1.1.1. Đặc điểm vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i>	4
1.1.2. Cấu trúc và chức năng của Ti-plasmid	5
1.1.3. Cơ chế quá trình chuyển gen nhờ <i>A. tumefaciens</i>	7
1.1.4. Một số hệ thống chuyển gen thông qua vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i>	9
1.2. Vector chuyển gen dựa trên Ti-plasmid	10
1.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen thông qua vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i>	13
1.4. Công nghệ Gateway và vector sử dụng trong đề tài	16
1.4.1. Công nghệ Gateway	16
1.4.2. Vector nhân dòng pENTR TM D/TOPO cloning	20
1.4.3. Vector chuyển gen pB2GW7	22
1.5. Vi khuẩn <i>B. thuringiensis</i> và gen <i>cry</i>	23
1.5.1. Những nghiên cứu chung về vi khuẩn <i>B. thuringiensis</i>	23
1.5.2. Những nghiên cứu về gen <i>cry</i>	24
1.5.3. Những nghiên cứu về gen <i>cryIA</i>	25

1.6. Tình hình nghiên cứu chuyển gen vào cây <i>A. thaliana</i>	25
1.6.1. Đặc điểm nông sinh học cây <i>A. thaliana</i>	25
1.6.2. Những nghiên cứu về cây <i>A. thaliana</i>	26
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	28
2.1. Vật liệu, hóa chất và thiết bị	28
2.1.1. Vật liệu nghiên cứu	28
2.1.2. Hóa chất sử dụng trong đề tài	29
2.1.3. Thiết bị sử dụng trong đề tài	30
2.2. Phương pháp nghiên cứu	30
2.2.1. Nhân dòng gen <i>cryIA(c)</i> từ vector OB-Mutant#16- <i>cryIA(c)</i>	30
2.2.1.1. Nhân gen <i>cryIA(c)</i> từ vector OB-Mut- <i>cryIA(c)</i>	31
2.2.1.2. Gắn gen <i>cryIA(c)</i> lên vector tách dòng pENTR™/D-TOPO®	32
2.2.1.3. PCR kiểm tra các dòng khuẩn lạc thu được sau nhân dòng với cặp mồi đặc hiệu của gen <i>cryIA(c)</i>	32
2.2.1.4. Xác định trình tự đoạn ADN được nhân dòng	32
2.2.2. Tạo chủng vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> mang vector pB2GW7- <i>cryIA(c)</i> ...	33
2.2.2.1. Gắn gen <i>cryIA(c)</i> lên vector chuyển gen pB2GW7	34
2.2.2.2. Phân tích các dòng tế bào <i>E. coli</i> thu được sau chọn lọc.....	35
2.2.2.3. Biến nạp vector pB2GW7- <i>cryIA(c)</i> vào tế bào vi khuẩn <i>A.</i> <i>tumefaciens</i>	35
2.2.2.4. PCR kiểm tra các dòng khuẩn lạc <i>A. tumefaciens</i> thu được sau biến nạp với cặp mồi đặc hiệu của gen <i>cryIA(c)</i>	36
2.2.3. Đánh giá khả năng chuyển gen của hệ thống vector pB2GW7- <i>cryIA(c)</i> trên cây <i>A. thaliana</i>	36

2.2.3.1. Tạo cây <i>A. thaliana</i> chuyển gen	36
2.2.3.2. Đánh giá cây <i>A. thaliana</i> chuyển gen dựa trên khả năng kháng thuốc diệt cỏ	37
2.2.3.3. Đánh giá cây <i>A. thaliana</i> chuyển gen dựa trên phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen <i>bar</i>	37
2.2.3.4. Đánh giá cây <i>A. thaliana</i> chuyển gen dựa trên phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen <i>cryIA(c)</i>	38
2.2.3.5. Đánh giá khả năng sinh trưởng của cây <i>A. thaliana</i> chuyển gen	38
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	39
3.1. Kết quả nhân dòng gen <i>cryIA(c)</i> từ vector OB-Mutant#16- <i>cryIA(c)</i>	39
3.1.1. Kết quả nhân gen <i>cryIA(c)</i> từ vector OB-Mut- <i>cryIA(c)</i>	39
3.1.2. Kết quả gắn gen <i>cryIA(c)</i> lên vector tách dòng pENTR™/D-TOPO® ...	39
3.1.3. Kết quả PCR kiểm tra các dòng khuẩn <i>E. coli</i> thu được với cặp mồi đặc hiệu của gen <i>cryIA(c)</i>	40
3.1.4. Kết quả xác định trình tự đoạn ADN được nhân dòng	41
3.2. Kết quả tạo chủng vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> mang vector pB2GW7- <i>cryIA(c)</i>	45
3.2.1. Kết quả gắn gen <i>cryIA(c)</i> lên vector chuyển gen pB2GW7	45
3.2.2. Kết quả phân tích các dòng tế bào <i>E. coli</i> thu được sau chọn lọc	46
3.2.3. Kết quả biến nạp vector pB2GW7- <i>cryIA(c)</i> vào tế bào vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i>	47
3.2.4. Kết quả PCR kiểm tra các dòng khuẩn lạc <i>A. tumefaciens</i> thu được sau biến nạp với cặp mồi đặc hiệu của gen <i>cryIA(c)</i>	48
3.3. Đánh giá khả năng chuyển gen của hệ thống vector pB2GW7- <i>cryIA(c)</i> trên cây <i>A. thaliana</i>	49

3.3.1. Kết quả đánh giá cây <i>A. thaliana</i> chuyển gen dựa trên khả năng kháng thuốc diệt cỏ.....	49
3.3.2. Kết quả đánh giá cây <i>A. thaliana</i> chuyển gen bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen <i>bar</i>	50
3.3.3. Kết quả đánh giá cây <i>A. thaliana</i> chuyển gen bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen <i>cryIA(c)</i>	51
3.3.4. Đánh giá khả năng sinh trưởng của cây <i>A. thaliana</i> chuyển gen.....	52
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	53
1. Kết luận	53
2. Đề nghị	53
TÀI LIỆU THAM KHẢO	54

DANH MỤC CÁC TỪ, CỤM TỪ VIẾT TẮT

Viết tắt	Nội dung
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
A _{260 nm}	Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260 nm
A _{280 nm}	Giá trị mật độ quang ở bước sóng 280 nm
ADN	Axít deoxyribonucleic
ADNaza	Deoxyribonuclease (enzyme phân hủy ADN)
Amp	Ampicillin
VAM	Anfa mosaic virus (virut khảm anfa)
ARN	Axít ribonucleic
ARNaza	Ribonuclease (enzyme phân hủy ARN)
AS	Asetoseringon
BC	<i>Bacillus cereus</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Base pair - Cặp bazơ nitơ
BT	<i>Bacillus thuringiensis</i>
cADN	Complementary DNA (ngân hàng gen)
VCaM	Cauliflower mosaic virus (virut gây khảm súp lơ)
Cry	<i>Crystal</i>
CTAB	Cetyl trimetyl amonium bromid
ddNTP	Dideoxyribonucleotide triphosphate
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Axít etylendiaminetetraacetic
Gen GUS	Gen mã hóa β -glucuronidase
ISAAA	International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Application
kb	Kilobase
LB	Left border (trật tự biên trái của đoạn T-ADN)
M	Mol/lit
mARN	Messenger RNA

MS	Murashige and Skoog
NCBI	National Center for Biotechnology Information-Trung tâm thông tin quốc gia về thông tin công nghệ sinh học.
NPTII	Neomycin phospho transferase gen
OD	Optical density
ori	Origin of replication
PCR	Polymerase chain reaction
rARN	Ribosomal RNA
RB	Right border (trật tự biên phải của đoạn T-ADN)
T-ADN	Transfer DNA (đoạn ADN được chuyển sang tế bào thực vật)
TAE	Tris-acetate-EDTA
Taq polymeraza	Thermostable DNA polymeraza
TE	Tris : EDTA (10:1)
Ti-plasmid	Tumor inducing plasmid (plasmid gây khối u)
Vir	Virulence (vùng gen gây độc)
YAC	Yeast artificial chromosome (NST nhân tạo nấm men)
