

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

NGUYỄN MẠNH CƯỜNG

**THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN GEN
ORGANOPHOSPHORUS HYDROLASE (OPHC2) PHỤC VỤ
TẠO CÂY CHUYỂN GEN PHÂN HỦY THUỐC TRỪ SÂU**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

NGUYỄN MẠNH CƯỜNG

**THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN GEN
ORGANOPHOSPHORUS HYDROLASE (OPHC2) PHỤC VỤ
TẠO CÂY CHUYỂN GEN PHÂN HỦY THUỐC TRỪ SÂU**

**Chuyên ngành: Công nghệ sinh học
Mã số: 60.42.80**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. LÊ VĂN SƠN

MỤC LỤC

	Trang
Mục lục	i
Danh mục các chữ cái viết tắt.....	iii
Danh mục các bảng trong luận văn.....	v
Danh mục các hình trong luận văn	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	4
1.1. VẤN ĐỀ Ô NHIỄM MÔI TRƯỜNG VIỆT NAM VÀ THẾ GIỚI	4
1.1.1. Ô nhiễm không khí	4
1.1.2. Ô nhiễm nước	4
1.1.3. Ô nhiễm đất.....	5
1.1.3.1. Tình hình ô nhiễm đất ở Việt Nam và thế giới	5
1.1.3.2. Ô nhiễm đất do sử dụng hóa chất bảo vệ thực vật	7
1.1.3.3. Các phương pháp xử lý ô nhiễm hóa chất bảo vệ thực vật	10
1.1.4. Xử lý ô nhiễm môi trường bằng thực vật	14
1.2. XỬ LÝ Ô NHIỄM MÔI TRƯỜNG BẰNG CÂY CHUYỂN GEN.....	17
1.2.1. Tác động của cây chuyển gen tới môi trường	17
1.2.2. Nghiên cứu về cây chuyển gen xử lý ô nhiễm môi trường	18
1.2.3. Nghiên cứu tạo cây chuyển gen phân hủy thuốc bảo vệ thực vật	20
1.3. KỸ THUẬT CHUYỂN GEN Ở THỰC VẬT	20
1.3.1. Chuyển gen trực tiếp.....	21
1.3.2. Chuyển gen gián tiếp thông qua Agrobacterium.....	21
1.3.3. Giới thiệu về vector pBI121	22
1.3.4. Gen OPHC2	25
CHƯƠNG 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	26

2.1. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT, THIẾT BỊ	26
2.1.1. Vật liệu.....	26
2.1.2. Hóa chất, thiết bị.....	27
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	28
Hình 2.2 Minh họa tóm tắt quá trình thí nghiệm thiết kế vector chuyển gen pBI121/OPHC2opt và quá trình chuyển gen OPHC2opt vào cây thuốc lá thông qua <i>A. tumefaciens</i>	29
2.2.1. Thiết kế cấu trúc OPHC2opt	29
2.2.2. Thiết kế vector chuyển gen OPHC2opt.....	34
2.2.3. Chuyển cấu trúc mang gen OPHC2opt vào cây thuốc lá	37
2.2.4. Phương pháp đánh giá các dòng thuốc lá chuyển gen	38
2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu.....	39
CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	40
3.1. THIẾT KẾ CẤU TRÚC MANG GEN OPHC2opt	40
3.1.1. Đổi mã gen OPHC2 tối ưu biểu hiện trong thực vật (OPHC2opt)....	40
3.1.2. Thiết kế môi đặc hiệu cho gen OPHC2opt.....	43
3.1.3. Kết quả tổng hợp môi và gen OPHC2opt	43
3.2. THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN OPHC2opt.....	45
3.2.1. Thiết kế vector tái tổ hợp pBI121 mang gen OPHC2opt.....	45
3.2.2. Kết quả tạo dòng <i>A. tumefaciens</i>	51
3.3. KẾT QUẢ TẠO CÂY THUỐC LÁ MANG GEN OPHC2opt.....	52
3.3.1. Kết quả chuyển gen OPHC2opt vào mảnh lá	52
3.3.2. Kết quả kiểm tra cây thuốc lá mang gen	55
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	57
1. Kết luận	57
2. Kiến nghị.....	57
CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN.....	58
TÀI LIỆU THAM KHẢO	59
PHỤ LỤC.....	64

DANH MỤC CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

aa	amino acid - axit amin
BAP	6- benzyl amino purine
Bp	Base pair
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BVTV	Bảo vệ thực vật
cs	Cộng sự
DDT	Dichloro-diphenyl-trichloroethane
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxy Nucleotide Triphosphate
EDTA	Ethylene diamine tetra- acetic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GM	Germination medium - Môi trường nảy mầm của hạt
GMO	Genetically modified organism - Sinh vật biến đổi gen
GMP	Genetically modified plant - Thực vật biến đổi gen
gus	β - Glucuronidase gene (Gen mã hóa enzyme β - Glucuronidase)
IBA	Indole 3 - butyric acid
IPTG	Isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside
Kb	Kilo base
LB	Luria Bertani
MS	Môi trường nuôi cấy mô cơ bản theo Murashige và Skoog
MSI	Dung dịch I (muối đa lượng) dùng để pha môi trường MS
MSII	Dung dịch II (muối đa lượng) dùng để pha môi trường MS
MSIII	Dung dịch III (sắt) dùng để pha môi trường MS
MSIV	Dung dịch IV (muối vi lượng) dùng để pha môi trường MS
MSV	Dung dịch V (vitamin) dùng để pha môi trường MS

OD	Optical density
OP	Organophosphorus
OPH	Organophosphorus hydrolase
Opt	optimization-Tối ưu hóa
PCR	Polymerase Chain Reaction - Phản ứng chuỗi polymerase
PM10	Particulate matter 10 - Những hạt bụi có kích thước bé hơn 10 micromet
RM	Rooting medium - Môi trường ra rễ
RDX	Royal Demolition eXplosive – Chất độc gây nổ (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine hay $(\text{CH}_2\text{-N-NO}_2)_3$).
TAE	Tris - Acetate - EDTA
Taq	Thermus aquaticus
UOW	The University of Wollongong – Trường đại học Wollongong
TNT	Trinitrotoluen
v/p	vòng / phút
X-gal	5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside
WHO	World Health Organization – Tổ chức y tế thế giới
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
2,4,5-T	2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid

DANH MỤC CÁC BẢNG TRONG LUẬN VĂN

	Trang
Bảng 1.1. Thời gian tồn lưu trong đất của một số nông dược	7
Bảng 1.2. Lượng thuốc trừ sâu sử dụng ở Việt Nam qua các năm	8
Bảng 1.3. Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật trong đất nghiên cứu ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	9
Bảng 2.1. Các vector sử dụng trong thí nghiệm.....	26
Bảng 2.2. Thành phần của phản ứng PCR	31
Bảng 2.3. Thành phần hóa chất tách chiết plasmid.....	32
Bảng 2.4. Thành phần dung dịch đệm tách chiết DNA	33
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng	34
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng ghép nối	36
Bảng 3.1. Trình tự môi nhân gen OPHC2opt	43
Bảng 3.2. Kết quả tạo cây thuốc lá chuyển gen OPHC2opt.	53

DANH MỤC CÁC HÌNH TRONG LUẬN VĂN

	Trang
Hình 1.1. Thực vật xử lý ô nhiễm môi trường	15
Hình 1.2. Mô hình hấp thụ các chất ở thực vật	15
Hình 2.1. Sơ đồ quá trình chuẩn bị cấu trúc gen OPHC2opt	28
Hình 2.2. Sơ đồ thiết kế vector và chuyển gen OPHC2opt vào cây thuốc lá	29
Hình 2.3. Cấu trúc gen chuyển trong vector pBI121	35
Hình 3.1. Trình tự nucleotide của gen OPHC2	40
Hình 3.2. Trình tự các aa của protein quy định bởi gen OPHC2	40
Hình 3.3. Trình tự nucleotide của gen OPHC2opt	41
Hình 3.4. So sánh trình tự gen OPHC2 của <i>P.pseudoalcaligenes</i> (OPHC2) và OPHC2 đã sửa đổi (OPHC2opt)	42
Hình 3.5. Sơ đồ cấu trúc OPHC2opt chuyển vào thực vật.....	42
Hình 3.6. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR pBluescript II SK/ OPHC2opt	44
Hình 3.7. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt vector pBI121 bằng BamHI và SacI	45
Hình 3.8. Hình ảnh điện di sản phẩm thổi gel vector pBI121 đã cắt mở vòng bằng 2 enzyme BamHI và SacI.....	46
Hình 3.9. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt	47
plasmid pBluescript II SK/OPHC2opt bằng 2 enzyme BamHI và SacI.....	47
Hình 3.10. Hình ảnh điện di sản phẩm thổi gel cấu trúc OPHC2opt	48
Hình 3.11. Hình ảnh đĩa nuôi cấy <i>E. coli</i> DH5 α đã biến nạp pBI121/OPHC2opt.....	49
Hình 3.12. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR plasmid tái tổ hợp pBI121/OPHC2opt.....	49
Hình 3.13. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt kiểm tra vector pBI121/OPHC2opt	50

Hình 3.14. Hình ảnh điện di sản phẩm colony-PCR khuẩn lạc <i>A. tumefaciens</i> Cv58A1 bằng cặp mồi đặc hiệu OPHC2-F/OPHC2-R.....	52
Hình 3.15. Ảnh minh họa giai đoạn chuyển gen vào cây thuốc lá.....	54
Hình 3.16. Hình ảnh so sánh khả năng phát sinh rễ của cây thuốc lá.....	55
sau khi nuôi cây trên môi trường ra rễ	55
Hình 3.17. Hình ảnh điện di mẫu DNA tổng số các mẫu lá.....	55
cây thuốc lá chuyển gen OPHC2opt	55
Hình 3.18. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân gen OPHC2opt.....	56
từ lá cây thuốc lá chuyển gen bằng cặp mồi đặc hiệu.....	56

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Việc sử dụng tràn lan thuốc bảo vệ thực vật trong sản xuất nông nghiệp đang là một trong những nguyên nhân gây ô nhiễm đất ở nhiều khu vực sản xuất nông nghiệp, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe của con người và cây trồng [25], [41]. Một lượng thuốc trừ sâu đã và đang phát tán ra môi trường sau đó lắng đọng dần xuống, ngấm vào đất. Thuốc trừ sâu tồn dư lâu trong đất dẫn đến ô nhiễm nước ngầm. Chất độc từ thuốc trừ sâu ngấm vào các giếng khoan, các công trình nước sinh hoạt, hồ, ao, sông, suối ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe, sức sinh sản của người và động vật.

Loại bỏ, giảm bớt thuốc bảo vệ thực vật, làm sạch đất ô nhiễm là một quá trình cấp thiết nhằm bảo vệ nguồn tài nguyên đất, nước và sức khỏe con người. Để xử lý đất ô nhiễm người ta thường sử dụng các phương pháp truyền thống như: rửa đất, cố định các chất ô nhiễm bằng phương pháp hoá học hoặc phương pháp vật lý, xử lý nhiệt, trao đổi ion, oxy hoá hoặc khử các chất ô nhiễm, đào đất bị ô nhiễm để chuyển đi đến những nơi chôn lấp thích hợp,... Các phương pháp này thường rất tốn kém về kinh phí, giới hạn về kỹ thuật và hạn chế về diện tích. Gần đây, nhờ những hiểu biết về cơ chế hấp thụ, chuyển hoá, chống chịu và loại bỏ thuốc bảo vệ thực vật của một số loài thực vật, người ta đã bắt đầu chú ý đến khả năng sử dụng thực vật để xử lý môi trường như một công nghệ môi trường đặc biệt.

Việc sử dụng thực vật trong công tác làm sạch các loại đất bị ô nhiễm thuốc bảo vệ thực vật (phytoremediation) là công nghệ đã và đang được áp dụng ở rất nhiều nước trên thế giới, nó đã đem lại hiệu quả cao về công nghệ cũng như tiết kiệm tiền bạc. Những nghiên cứu này đã được tiến hành trên nhiều đối tượng thực vật như lúa, *Arabidopsis thaliana* và cây dương. Tuy nhiên các loại cây trồng truyền thống thường có những hạn chế nhất định về