

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN ĐỨC HÀO

**THIẾT KẾ VECTOR MANG CẤU TRÚC GEN *GmEXPI*  
LIÊN QUAN ĐẾN SỰ PHÁT TRIỂN BỘ RỄ PHỤC VỤ  
CHUYỂN GEN Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG  
[*Glycine max* (L.) Merrill]**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Thái Nguyên - 2013**

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

NGUYỄN ĐỨC HÀO

**THIẾT KẾ VECTOR MANG CẤU TRÚC GEN *GmEXP1*  
LIÊN QUAN ĐẾN SỰ PHÁT TRIỂN BỘ RỄ PHỤC VỤ  
CHUYỂN GEN Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG**

[*Glycine max* (L.) Merrill]

Chuyên ngành: Di truyền học

Mã số: 60.42.01.21

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

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

**Thái Nguyên - 2013**

## **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 và chưa có ai công bố trong một công trình nào khác. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc.

Tác giả luận văn

**Nguyễn Đức Hòa**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới GS.TS Chu Hoàng Mậu đã tận tình hướng dẫn và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành bản luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn NCS Lò Thanh Sơn, Trường Đại học Tây Bắc đã đóng góp những ý kiến quý báu và tận tình chỉ bảo, giúp đỡ tôi trong quá trình tiến hành thí nghiệm để hoàn thành đề tài luận văn.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn các thầy cô, cán bộ Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, khoa Sinh-KTNN, trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên, cảm ơn các cán bộ phòng Công nghệ tế bào thực vật, Phòng thí nghiệm trọng điểm quốc gia về công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn Lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam đã tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, thực hiện các thí nghiệm của đề tài..

Tôi cũng xin cảm ơn Ban giám hiệu trường THPT Phù Lưu, Tuyên Quang đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong học tập và hoàn thành khoá học.

Tôi cũng xin bày tỏ lời cảm ơn đến gia đình, bè bạn đã động viên khuyến khích giúp đỡ tôi trong quá trình làm luận văn.

*Tác giả luận văn*

**Nguyễn Đức Hòa**

## MỤC LỤC

	Trang
Trang bìa phụ	
Lời cam đoan.....	i
Lời cảm ơn .....	ii
Mục lục.....	iii
Danh mục bảng.....	v
Danh mục hình .....	vi
Các ký hiệu dùng trong luận văn .....	vi
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	<b>1</b>
<b>Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....	<b>3</b>
1.1. Chọn giống đậu tương theo định hướng nâng cao khả năng chịu hạn... 3	
1.1.1. Chọn giống đậu tương chịu hạn bằng đột biến thực nghiệm..... 4	
1.1.2. Chọn dòng đậu tương chịu hạn bằng công nghệ tế bào thực vật..... 5	
1.1.3. Chọn dòng đậu tương chịu hạn bằng kỹ thuật chuyển gen..... 6	
1.2. Gen liên quan đến tính chịu hạn và gen <i>GmEXPI</i> ở cây đậu tương..... 7	
1.2.1. Các gen liên quan đến tính chịu hạn của cây đậu tương..... 7	
1.2.2. Gen <i>GmEXPI</i> và protein EXP1 ở cây đậu tương .....	10
1.2.3. Vector chuyển gen ở thực vật .....	11
<b>Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>14</b>
2.1. Vật liệu và thiết bị..... 14	
2.1.1. Vật liệu .....	14
2.1.2. Hoá chất và thiết bị .....	15
2.1.3. Địa điểm nghiên cứu .....	16
2.2. Phương pháp nghiên cứu..... 16	
2.2.1. Phân lập gen .....	16
2.2.2. Phương pháp chuyển gen vào cây thuốc lá..... 23	

2.3. Phương pháp thiết kế vector.....	25
<b>Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b> .....	<b>27</b>
3.1. Phân lập gen <i>GmEXPI</i> bằng kỹ thuật RT-PCR.....	27
3.1.1. Nhân bản đoạn mã hoá của gen <i>GmEXPI</i> .....	27
3.1.2. Tách dòng đoạn mã hoá (cDNA) của gen <i>GmEXPI</i> .....	27
3.1.3. Kiểm tra plasmid trước khi đọc trình tự.....	33
3.1.4. Kết quả đọc trình tự đoạn mã hoá của gen <i>GmEXPI</i> .....	34
3.2.2. Kết quả cắt mở vòng plasmid pRTRA7/3.....	40
3.2.3. Tạo plasmid pRTRA7/3 tái tổ hợp mang gen <i>GmEXPI</i> .....	41
3.2.4. Kết quả cắt plasmid pRTRA7/3 tái tổ hợp bằng <i>HindIII</i> .....	42
3.2.5. Kết quả cắt plasmid pCB301 bằng <i>HindIII</i> .....	43
3.2.6. Tạo vector chuyển gen pCB301 mang cấu trúc <i>GmEXPI</i> .....	44
3.2.7. Kết quả tạo dòng vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> mang cấu trúc gen <i>GmEXPI</i> .....	45
3.3. Kiểm tra hoạt động của vector mang cấu trúc <i>GmEXPI</i> trên cây thuốc lá mô hình.....	47
3.3.1. Kết quả chuyển cấu trúc <i>GmEXPI</i> vào cây thuốc lá .....	47
3.3.2. Kết quả kiểm tra cây thuốc lá mang gen <i>GmEXPI</i> .....	49
<b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ</b> .....	<b>52</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b> .....	<b>53</b>

## DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Sản xuất đậu tương ở Việt Nam từ 2007 đến 2013 .....	3
Bảng 2.1. Thành phần cho phản ứng tổng hợp cDNA.....	17
Bảng 2.2. Thành phần của phản ứng PCR.....	18
Bảng 2.3. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR.....	18
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng colony – PCR.....	20
Bảng 2.5. Chu trình nhiệt của phản ứng colony – PCR.....	20
Bảng 2.6. Thành phần gắn gen <i>GmEXPI</i> vào vector tách dòng pBT.....	21
Bảng 2.7. Thành phần hóa chất tách chiết plasmid.....	22
Bảng 2.8. Thành phần dung dịch đệm tách chiết DNA .....	24
Bảng 3.1. Kết quả tạo cây thuốc lá chuyển gen <i>GmEXPI</i> .....	48

## DANH MỤC HÌNH

Hình 2.1. Ảnh hạt của giống đậu tương SL1 .....	14
Hình 2.2. Sơ đồ cấu trúc các vector sử dụng trong nghiên cứu .....	15
Hình 3.1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân đoạn mã hoá gen <i>GmEXP1</i> ...	28
Hình 3.2. Hình ảnh điện di sản phẩm thổi gel đoạn mã hoá của gen <i>GmEXP1</i> .....	29
Hình 3.3. Ảnh khuẩn lạc .....	31
Hình 3.4. Hình ảnh điện di sản phẩm colony-PCR.....	32
Hình 3.5. Hình ảnh điện di kiểm tra plasmid tái tổ hợp.....	33
Hình 3.6. Hình ảnh điện di kiểm tra plasmid trước khi đọc trình tự .....	34
Hình 3.7. Sơ đồ so sánh trình tự đoạn mã hoá gen <i>GmEXP1</i> của giống đậu tương SL1 và AF516879 .....	36
Hình 3.8. Sơ đồ so sánh trình tự amino acid của protein EXP1 giữa giống SL1 và AF516879 .....	37
Hình 3.9. Ảnh điện di sản phẩm cắt pBT/EXP1 .....	38
Hình 3.10. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt pRTRA7/3 bằng <i>NotI</i> + <i>NcoI</i> .....	40
Hình 3.11. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt pRTRA7/3 bằng <i>HindIII</i> .....	42
Hình 3.12. Ảnh cắt pCB301 bằng <i>HindIII</i> .....	43
Hình 3.13. Hình ảnh điện di sản phẩm colony- PCR .....	45
Hình 3.14. Hình ảnh điện di sản phẩm colony-PCR.....	47
Hình 3.15. Hình ảnh minh họa giai đoạn chuyển gen vào cây thuốc lá .....	49
Hình 3.16. Ảnh điện di kiểm tra DNA tổng số tách từ lá cây thuốc lá.....	50
Hình 3.17. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen <i>GmEXP1</i> từ thuốc lá....	51



## CÁC KÝ HIỆU DÙNG TRONG LUẬN VĂN

BAP	6- benzyl amino purine
bp	Base pair
DDT	Dichloro-diphenyl-trichloroethane
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxy Nucleotide Triphosphate
EDTA	Ethylene diamine tetra- acetic acid
đtg	Đồng tác giả
<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
HSG	Heat Shock Granules
HSP	Heat Shock protein - Protein sốc nhiệt
IBA	Indole 3 - butyric acid
IPTG	Isopopyl $\beta$ -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
NST	Nhiễm sắc thể
OD	Optical density

PCR	Polymerase Chain Reaction - Phản ứng chuỗi
RM	Rooting medium - Môi trường ra rễ
TAE	Tris - Acetate - EDTA
Taq	Thermus aquaticus
v/p	vòng / phút
X-gal	5-bromo-4-chloro-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside