

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN THU TRANG

**THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN *GSH1* NHẪM NÂNG
CAO KHẢ NĂNG TÍCH LŨY ASEN TRONG THỰC VẬT**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thái Nguyên – 2013

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN THU TRANG

**THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN *GSH1* NHẪM NÂNG
CAO KHẢ NĂNG TÍCH LŨY ASEN TRONG THỰC VẬT**

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

Mã số: 60 42 0201

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: TS. LÊ VĂN SƠN

Thái Nguyên – 2013

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, lời đầu tiên tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **TS. Lê Văn Sơn**, Phòng Kỹ thuật Di truyền, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo, dìu dắt, giúp đỡ tôi trong thời gian học tập và hoàn thành khóa luận này.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành tới **PGS. TS. Chu Hoàng Hà**, **ThS. Bùi Phương Thảo**, cùng tập thể cán bộ Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ sinh học đã nhiệt tình giúp đỡ, truyền đạt nhiều kinh nghiệm quý báu cho tôi trong suốt thời gian làm khóa luận.

Tôi xin cảm ơn Phòng Đào tạo và các thầy cô giáo tại Cơ sở đào tạo sau đại học, Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên đã luôn quan tâm, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi xin dành cho những người thân trong gia đình và bạn bè lòng biết ơn sâu sắc, những người thân yêu đã luôn bên tôi, động viên và góp ý cho tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành khóa luận.

Tôi chân thành cảm ơn tất cả những sự giúp đỡ quý báu đó./

Thái Nguyên, ngày 25 tháng 10 năm 2013

Tác giả luận văn

Nguyễn Thu Trang

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

<i>A.tumefaciens</i>	Agrobacterium tumefaciens
As	Asen
BAP	6- benzenladenine
Bp	base pair (cặp bazơ)
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTPs	Deoxy Nucleoside Triphosphate
EDTA	Ethylene Diamine tetra- acetate Acid
<i>Gus</i>	Gen mã hóa enzyme β -glucuronidase
GSH	Glutathione
<i>GSH1</i>	Enzyme γ -glutamylcysteine synthetase
IBA	Indole-3-butyric acid
kb	Kilo base
LB	Môi trường theo Luria và Bertani
MS	Môi trường cơ bản theo Murashige và Skoog (1962)
OD	Optical density (mật độ quang học)
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNase	ARN polimerase
Taq	Thermus aquaticus
Ti-plasmid	Tumor inducing plasmid (plasmid gây khối u)
T-DNA	Transferred-DNA
TP	Transit peptide

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng	Tên bảng	Trang
2.1	Trình tự môi nhân bản gen <i>GSH1</i>	25
2.2	Thành phần phản ứng xử lý với enzyme <i>XbaI</i> và <i>SacI</i>	26
2.3	Thành phần phản ứng ghép nối <i>GSH1</i> vào vector PBI121.....	26
2.4	Thành phần phản ứng colony-PCR.....	28
2.5	Thành phần Sol.....	29
2.6	Thành phần dung dịch tách chiết DNA.....	32
2.7	Thành phần phản ứng PCR nhân gen <i>GSH1</i>	33
3.1	Kết quả chuyển gen và chọn lọc <i>in vitro</i> trên cây thuốc lá K326	42
3.2	Kết quả phân tích dòng thuốc lá chuyển gen bằng phương pháp PCR.....	44
3.3	Kết quả đánh giá khả năng chống chịu As của các dòng thuốc lá chuyển gen <i>GSH1</i>	44

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
1.1	Mô hình hấp thụ các chất ở thực vật.....	8
1.2	Sơ đồ của sự hấp thụ As và sự trao đổi chất trong thực vật	12
1.3	Cơ chế lây nhiễm của <i>A. tumefaciens</i> vào tế bào thực vật.....	21
2.1	Sơ đồ vector pBluescript II SK- <i>GSH1</i>	25
3.1	Kết quả xử lý vector pBluescript II SK- <i>GSH1</i> bằng cặp enzyme giới hạn <i>XbaI</i> và <i>SacI</i>	36
3.2	Kết quả xử lý vector pBI121 bằng cặp enzyme giới hạn	36
3.3	Kết quả điện di sản phẩm tinh sạch.....	37
3.4	Kết quả biến nạp plasmid tái tổ hợp vào tế bào khả biến <i>E.coli</i> DH5 α	38
3.5	Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR bằng cặp mồi GSH1-F1/GSH1-M1.....	39
3.6	Kết quả điện di sản phẩm cắt vector tái tổ hợp bằng <i>XbaI</i> và <i>SacI</i>	39
3.7	Kết quả điện di sản phẩm cắt vector tái tổ hợp bằng <i>XbaI</i> và <i>SacI</i>	40
3.8	Mảnh thuốc lá K326 trên môi trường đồng nuôi cấy (A) và bắt đầu cảm ứng tạo cụm chồi trên môi trường GM +Km50 (B).....	41
3.9	Sự phát triển của các mảnh lá trên môi trường chọn lọc GM + Km50 sau khoảng 3 tuần theo dõi.....	42
3.10	Cây con 2 tuần trên môi trường ra rễ (A) và cây <i>ra in vivo</i> 1 tháng (B).....	42
3.11	Kết quả điện di DNA tổng số của các dòng thuốc lá	43
3.12	Kết quả điện di sản phẩm PCR các dòng thuốc lá với cặp mồi GSH1-F/GSH1-R.....	43

MUC LỤC

<i>Lời cảm ơn</i>	i
<i>Danh mục các ký hiệu, các chữ viết tắt</i>	ii
<i>Danh mục các bảng</i>	iii
<i>Danh mục các hình</i>	iv
<i>Mục lục</i>	v
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. Tình hình ô nhiễm As và các biện pháp xử lý.....	3
1.1.1. Tình hình ô nhiễm As.....	3
1.1.2. Tác hại của As đến môi trường và sức khỏe con người.....	5
1.1.3. Các phương pháp xử lý truyền thống.....	6
1.1.4. Xử lý ô nhiễm As trong đất bằng thực vật (Phytoextraction).....	7
1.1.4.1. Xử lý ô nhiễm As trong đất bằng thực vật “siêu tích tụ”.....	7
1.1.4.2. Thực vật biến đổi gen cho mục đích xử lý ô nhiễm kim loại nặng..	10
1.2. Cơ sở khoa học của chuyển gen ở thực vật.....	14
1.2.1. Khái niệm về chuyển gen.....	14
1.2.2. Các phương pháp chuyển gen thực vật.....	14
1.2.2.1. Các phương pháp chuyển gen trực tiếp.....	14
1.2.2.2. Phương pháp chuyển gen gián tiếp.....	17
1.2.3. Các hệ thống vector dùng để chuyển gen.....	20
1.2.3.1. Hệ vector cùng xâm nhập (CXN).....	20
1.2.3.2. Hệ vector nhị thể (Binary vector).....	21

1.3. Glutathione và gen *GSH1*..... 21

CHƯƠNG II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	24
2.1. Vật liệu.....	24
2.1.1. Nguyên liệu thực vật.....	24
2.1.2. Chủng vi khuẩn và các nguyên liệu DNA.....	24
2.1.3. Hóa chất.....	25
2.1.4. Thiết bị.....	25
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	25
2.2.1. Phương pháp thiết kế vector chuyển gen.....	25
2.2.2. Phương pháp chuyển gen vào cây thuốc lá.....	30
2.2.3. Các phương pháp phân tích cây chuyển gen.....	32
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	35
3.1. Kết quả thiết kế cấu trúc vector chuyển gen.....	35
3.1.1. Kết quả thiết kế cấu trúc vector chuyển gen pBI121/GSH1.....	35
3.1.2. Tạo chủng vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> mang vector tái tổ hợp pBI121/GSH1.....	39
3.2. Kết quả chuyển gen và chọn lọc <i>in vitro</i> giống thuốc lá K326.....	40
3.3. Kết quả phân tích cây chuyển gen.....	42
3.3.1 Kết quả phân tích các dòng cây chuyển gen bằng PCR.....	42
3.3.2. Kết quả đánh giá khả năng chống chịu As của các dòng cây chuyển gen.....	44
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	47
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	48
PHỤ LỤC.....	54

MỞ ĐẦU

Lý do chọn đề tài

Asen (As) là một trong những nguyên tố rất phổ biến trong thiên nhiên, chiếm 1,1 – 4 % tổng số nguyên tử trong vỏ trái đất. As trong đất tồn tại ở pha rắn chiếm tới 94% còn lại chỉ 6% tổng As tồn tại trong dung dịch đất, dễ dàng di chuyển ra khỏi đất. Khi tồn tại ở dạng linh động As đặc biệt nguy hiểm cho sinh vật và con người. Vấn đề ô nhiễm As trong đất ngày càng được quan tâm do ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe con người và cây trồng. Nguồn phát thải As trước hết là từ các ngành công nghiệp khai khoáng quặng, than đá và dầu mỏ có chất thải chứa As, chì (Pb), thủy ngân (Hg) và cadmium (Cd). Sau đó là từ hoạt động nông nghiệp, lạm dụng các loại phân bón hóa học, hóa chất bảo vệ thực vật đã làm gia tăng lượng tồn dư As cùng nhiều kim loại nặng khác trong đất. Sự phát triển và mở rộng các làng nghề thủ công đi kèm với việc sử dụng nhiều hóa chất song không có biện pháp xử lý chất thải, cũng chính là một nguồn gây ô nhiễm kim loại nặng trong môi trường đất. Để xử lý đất ô nhiễm As người ta thường sử dụng các phương pháp truyền thống như: rửa đất; cố định các chất ô nhiễm bằng hoá học hoặc vật lý; xử lý nhiệt; trao đổi ion, ôxi 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 kim loại nặng 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. Tuy nhiên các loài thực vật thường được dùng lại có sinh khối thấp, vì vậy yêu cầu đặt ra là phải tạo ra các giống có khả năng sinh trưởng nhanh, sinh khối lớn và có khả năng hấp thụ kim loại nặng. Cây trồng chuyển gen là giải pháp cho vấn đề này.

Trong đề tài này chúng tôi lựa chọn gen *GSH1* mã hóa enzyme γ -glutamyl cysteine synthetase tham gia quá trình sinh tổng hợp glutathione (GSH) - một trung gian giải độc quan trọng của kim loại nặng trong thực vật - là gen mục tiêu. Khi để thực vật tiếp xúc với kim loại nặng quá nhiều sẽ tạo ra các phản ứng oxy hóa (ROS) và tích lũy các ion kim loại (M^+). GSH khử độc Số hóa bởi trung tâm học liệu <http://lrc.tnu.edu.vn/>