ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

HOÀNG VĂN SÔNG

THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN KHÁNG VIRUT TRÊN CÂY THUỐC LÁ MANG GEN CHỌN LỌC THÂN THIỆN MÔI TRƯỜNG

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, năm 2013

Số hóa bởi trung tâm học liệu http://www.lrc.tnu.edu.vn/

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu khoa học của tôi. Các số liệu và kết quả nêu trọng luận văn là trung thực và chưa từng được ai công bố trong công trình nghiên cứu khác.

Thái Nguyên, ngày 20 tháng 04 năm 2013

Tác giả

Hoàng Văn Sông

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Lê Văn Sơn, Phòng Công nghệ Tế bào thực vật - Viện Công nghệ sinh học đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện khóa luận này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới PGS.TS. Chu Hoàng Hà, ThS. Phạm Thị Vân, KS. Nguyễn Thị Thu Hiền, KS. Nguyễn Văn Đoài, cùng tập thể cán bộ, nghiên cứu sinh, học viên, sinh viên Phòng công nghệ tế bào thực vật - Viện Công nghệ sinh học đã tạo điều kiện làm việc, giúp đỡ và truyền đạt nhiều kinh nghiệm làm việc quý báu trong suốt quá trình hoàn thành khóa luận này.

Tôi xin cảm ơn PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh cùng các thầy cô giáo Khoa khoa học sự sông – 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 bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới gia đình và bạn bè những người đã luôn bên tôi, động viên và góp ý cho tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện khóa luận.

Hà Nội, ngày 20 tháng 4 năm 2013

Học viên

Hoàng Văn Sông

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN I
LỜI CẢM ƠN III
MỤC LỤC IV
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC TỪ VIẾT TẮT VII
DANH MỤC CÁC BẢNG VIII
DANH MỤC CÁC HÌNH IX
MỞ ĐẦU 1
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 2
1.1. GIỚI THIỆU CHUNG VỀ CÂY THUỐC LÁ 3
1.1.1. Nguồn gốc cây thuốc lá 3
1.1.2. Phân loại và nguồn gốc 4
1.1.3. Giá trị kinh tế và giá trị khoa học của cây thuốc lá 4
1.2. MỘT SỐ BỆNH VIRUS THƯỜNG GẶP Ở CÂY THUỐC LÁ 5
1.2.1. Bệnh virus trên cây thuốc lá 5
1.2.2. Sơ lược về virus gây bệnh khảm TMV trên cây thuốc lá 7
1.2.3. Biện pháp phòng chống bệnh virus 10
1.2.3.1. Sử dụng giống kháng bệnh 10
1.2.3.2. Sử dụng giống sạch bệnh 10
1.2.3.3. Các biện pháp canh tác 11
1.2.3.4. Sử dụng biện pháp công nghệ sinh học 11
1.3. ỨNG DỤNG VECTOR CHUYỂN GEN THẾ HỆ MỚI, MANG TÍNH AN TOÀN SINH HỌC 15
1.3.1. Giới thiệu chung 15
1.3.2. Phương pháp để tránh hoặc loại bỏ gen chọn lọc 16
1.3.3. Gen mã hóa biến dưỡng đường mannose. 17
1.4. MỘT SỐ THÀNH TỰU TẠO CÂY CHUYỂN GEN KHÁNG VIRUS Ở VIỆT NAM 18
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 20

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU 20
2.1.1. Nguồn gen CP của virus 20
2.1.2. Chủng vi khuẩn 20
2.1.3. Nguồn thực vật: 20
2.1.4. Hóa chất 20
2.1.5. Thiết bị 20
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 21
2.2.1. Thiết kế vector RNAi gốc chọn lọc bằng mannose 21
2.2.1.1. Chuẩn bị tế bào khả biến 21
2.2.1.2. Xử lý vector pK7GWIWG2(II) 22
2.2.1.3. Xử lý vector pNOV-Gusplus 24
2.2.1.4. Tạo vector chuyển gen pK7_M mang gen chọn lọc mannose 25
2.2.2. Thiết kế vector RNAi chuyển đơn gen TMV chọn lọc bằng mannose 26
2.2.3. Nghiên cứu nồng độ đường mannose thích hợp để chọn lọc 29
2.2.4. Chuyển gen vào thuốc lá thông qua Agrobacterium tumefaciens 30
2.2.4.1. Tạo dịch huyền phù vi khuẩn Agrobacterium 30
2.2.4.2. Tạo nguyên liệu chuyển gen 30
2.2.4.3. Nhiễm khuẩn và đồng nuôi cấy 30
2.2.4.4. Tái sinh và chọn lọc cây chuyển gen 31
2.2.4.5. Tạo rễ và cây hoàn chỉnh 31
2.2.4.6. Phân tích sự có mặt của cấu trúc chuyển gen 31
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 33
3.1. Thiết kế vector RNAi gốc chọn lọc bằng mannose 33
3.1.1. Kết quả xử lý vector pK7GWIWG2(II) 33
3.1.2. Kết quả xử lý vector pNOV-gusplus 34
3.1.3. Tạo vector chuyển gen pK7_M mang gen chọn lọc mannose 35
3.2. Thiết kế vector RNAi chuyển đơn gen TMV chọn lọc bằng mannose 36
3.2.1. Kết quả chọn dòng bằng phản ứng cắt bởi emzyme hạn chế 37
3.2.2. Kết quả chọn dòng bằng phản ứng PCR 38

3.3. Nghiên cứu nồng độ đường mannose thích hợp để chọn lọc 40
3.3.1. Xác định nồng độ mannose đối với mảnh lá thuốc lá 40
3.3.2. Ảnh hưởng của mannose tới sự phát triển của chồi/cây thuốc lá 41
3.4. Chuyển gen và tái sinh vào cây thuốc lá 42
3.4.1. Chuyển cấu trúc RNAi TMV-M-CPi vào giống thuốc lá C9-1 và K326 thông qua Agrobacterium tumefaciens 42
3.4.2. Phân tích cây chuyển gen 44
3.4.2.1. Phân tích khả năng kháng TMV của các cây chuyển gen 44
3.4.4.2. Kết quả phản ứng PCR 46
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 48
Kết luận 48
Kiến nghị 48
TÀI LIỆU THAM KHẢO 49

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC TỪ VIẾT TẮT

A.tumefaciens	*Agrobacterium tumefaciens*
bp	Base pair
CP	Coat protein (protein vỏ)
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylene Diamine tetra-acetate acid
EtBr	Ethidium Bromide
et al	Đồng tác giả
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria and Bertani
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RNase	Ribonuclease
TAE	Tris Acetate EDTA
Taq	*Thermus aquaticus*
TMV	Tobacco mosaic virus
v/p	vòng/phút

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Bệnh virus trên thuốc lá 6
Bảng 2.1: Thành phần phản ứng cắt pK7GWIWG2(II) enzyme S*ph* I..... 22
Bảng 2.2: Thành phần phản ứng bởi T4 DNA Polymerase 23
Bảng 2.3: Thành phần phản ứng cắt bởi enzyme *Hin*d III..... 24
Bảng 2.4: Thành phần phản ứng cắt pNOV-Gusplus bởi *Hin*d III và *Pme* I 25
Bảng 2.5: Thành phần phản ứng ghép nối nhờ enzyme T4 ligase. 25
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng..... 26
Bảng 2.7. Thành phần phản ứng cắt bằng enzyme hạn chế 27
Bảng 2.8. Thành phần phản ứng PCR 28
Bảng 2.9. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR..... 29
Bảng 2.10: Thành phần môi trường nuôi cấy 29
Bảng 3.1. Các phân đoạn thu được theo tính toán lý thuyết khi cắt plasmid 37
Bảng 3.2: Ảnh hưởng của mannose tới khả năng sống sót và sinh trưởng..... 40
Bảng 3.3: Ảnh hưởng của mannose tới khả năng sống sót và sinh trưởng 42
Bảng 3.4. Kết quả của biến nạp cấu trúc RNAi TMV-M-CP vào thuốc lá..... 44
Bảng 3.5. Kết quả lây nhiễm virus các dòng thuốc lá chuyển gen 45
Bảng 3.6. Kết quả PCR kiểm tra sự có mặt của các gen cần chuyển..... 47

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1: Cây thuốc lá 3
Hình 1.2. Cấu trúc TMV và tổ chức hệ gen 8
Hình 1.3: Hình ảnh hiển vi virus TMV 9
Hình 1.4: Sơ đồ cấu trúc genome của TMV 10
Hình 1.5: Cơ chế hoạt động RNAi. 13
Hình 1.6: Quy trình chuyển gen sử dụng mannose làm chất chọn lọc..... 17
Hình 2.1: Mô hình thiết kế vector pK7_M 21
Hình 3.1: Biến nạp vector pK7GWIWG2(II) vào tế bào khả biến E.coli DB 3.1 33
Hình 3.2: Kết quả điện di sản phẩm tách chiết plasmid pK7GWIWG2(II) 33
Hình 3.3: Kết quả điện di sản phẩm cắt plasmid pK7GWIWG2(II)..... 34
Hình 3.4: Kết quả điện di sản phẩm tách chiết plasmid pNOV-gusplus..... 35
Hình 3.5: Kết quả điện di sản phẩm cắt pNOV-gusplus..... 35
Hình 3.6: Kết quả điện di sản phẩm tách chiết plasmid 36
Hình 3.7. Bản đồ cấu trúc pK7M/TMV-CPi. 37
Hình 3.8. Phân tích sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp pK7M/TMV-CPi 38
Hình 3.9. Các vị trí gắn của các cặp mồi trên pK7M/TMV-CPi 39
Hình 3.10. Phân tích sản phẩm colony-PCR chọn dòng khuẩn lạc mang 39
Hình 3.11: Hình ảnh về sự ảnh hưởng của mannose tới khả năng sống sót 41
Hình 3.12. Hình ảnh qua các bước nghiên cứu của thí nghiệm 43
Hình 3.13. Hình ảnh của cây chuyển gen sau lây nhiễm 45
Hình 3.14. Hình ảnh điện di DNA tổng số của một số dòng thuốc lá 46
Hình 3.15. Kết quả PCR kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong mẫu thuốc lá . . 46

MỞ ĐẦU

- **LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI**

Thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) là cây công nghiệp ngắn ngày, có giá trị kinh tế cao và đem lại nguồn thu ngân sách đáng kể cho nhiều quốc gia trên thế giới. Việc trồng và sản xuất thuốc lá cũng thu hút nhiều nhân công, góp phần tạo công ăn việc làm và thu nhập cho nhiều đối tượng lao động. Cây thuốc lá còn được sử dụng làm nguyên liệu sản xuất nicotin, axit hữu cơ, dùng làm thuốc trừ sâu hay chiết xuất dầu thực vật từ hạt. Ngoài ra, thuốc lá còn được xem là cây mô hình cho nhiều nghiên cứu sinh học cơ bản như nghiên cứu quá trình trao đổi chất ở thực vật, hay vai trò, chức năng của gen và protein,… với khả năng dễ tái sinh và chấp nhận gen ngoại lai. Vì vậy, thuốc lá là một trong những đối tượng được sử dụng nhiều nhất trong các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng đặc biệt là làm đối tượng chuyển gen.

Tuy nhiên, hiện nay thuốc lá đang chịu thiệt hại nghiêm trọng bởi bệnh do virus gây ra, làm ảnh hưởng lớn tới nền kinh tế của nhiều quốc gia và trong đó có Việt Nam. Điển hình bệnh virus trên thuốc lá là virus gây bệnh khảm thuốc lá TMV (Tobacco mosaic virus). Đây là loại virus đang gây thiệt hại nặng nề làm giảm năng suất và chất lượng cho hầu hết các thửa ruộng trồng thuốc lá.

Để hạn chế sự lây lan của virus thực vật, những biện pháp truyền thống đã được áp dụng như loại bỏ những cây bị bệnh ngay khi mới phát hiện, phun thuốc hoặc vệ sinh đồng ruộng... không những không mang lại hiệu quả mà còn đòi hỏi nhiều thời gian, công sức và ảnh hưởng xấu tới môi trường. Việc tìm ra các biện pháp để ngăn chặn sự phát triển và lây lan của virus thực vật đang là một vấn cấp bách.

Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học, đã có rất nhiều ứng dụng sinh học phân tử trong chọn tạo giống cây trồng kháng virus, trong đó, công nghệ RNA interference (RNAi) tỏ ra là một giải pháp hữu hiệu nhất thông qua việc sử dụng các vật liệu di truyền từ virus gây bệnh như gen mã hóa protein vỏ (coat protein, CP), protein di chuyển (movement protein, MP) chuyển vào cây trồng tạo cây trồng chuyển gen kháng chính virus đó.