ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

PHẠM THỊ THU MIỀN

PHÂN LẬP VÀ SO SÁNH ĐẶC ĐIỂM CẤU TRÚC GEN *GmDREB2* CỦA MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG CÓ KHẢ NĂNG CHỊU HẠN KHÁC NHAU

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2014

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu http://www.lrc-tnu.edu.vn/

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

PHẠM THỊ THU MIỀN

PHÂN LẬP VÀ SO SÁNH ĐẶC ĐIỂM CẤU TRÚC GEN *GmDREB2* CỦA MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG CÓ KHẢ NĂNG CHỊU HẠN KHÁC NHAU

Chuyên ngành: Di truyền học
Mã số: 60.42.01.21

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. VŨ THỊ THU THỦY

THÁI NGUYÊN - 2014

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu http://www.lrc-tnu.edu.vn/

LỜI CAM ĐOAN

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

Thái Nguyên, tháng 4 năm 2014

Tác giả

Phạm Thị Thu Miền

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu http://www.lrc-tnu.edu.vn/

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới ***TS. Vũ Thị Thu Thủy*** đã trực tiếp hướng dẫn tận tình và tạo mọi điều kiện giúp đỡ để tôi hoàn thành đề tài nghiên cứu này.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của ***GS. TS. Chu Hoàng Mậu***, các cán bộ phòng thí nghiệm Di truyền học, trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên, Ban chủ nhiệm khoa Sinh - KTNN và các thầy cô giáo, cán bộ khoa đã tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình hoàn thành luận văn.

Cuối cùng, tôi xin được cảm ơn đến gia đình, bạn bè đã động viên, khích lệ tôi trong thời gian học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Thái Nguyên, tháng 4 năm 2014

Tác giả

Phạm Thị Thu Miền

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu http://www.lrc-tnu.edu.vn/

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN i
LỜI CẢM ƠN ii
MỤC LỤC iii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT iv
DANH MỤC CÁC BẢNG v
DANH MỤC CÁC HÌNH vi
MỞ ĐẦU 1
1. Đặt vấn đề 1
2. Mục tiêu nghiên cứu 3
3. Nội dung nghiên cứu 3
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU 4
1.1. Cây đậu tương 4
1.1.1. Nguồn gốc và đặc điểm sinh học của cây đậu tương 4
1.1.2. Giá trị kinh tế của cây đậu tương 6
1.1.3. Tình hình sản xuất đậu tương trên thế giới và Việt Nam 7
1.1.4. Đặc điểm hóa sinh của hạt đậu tương 9
1.2. Hạn và khả năng chịu hạn của cây 10
1.2.1. Hạn và ảnh hưởng của hạn đối với cây trồng 10
1.2.2. Cơ sở sinh lý, sinh hóa và cơ chế phân tử liên quan đến tính chịu hạn 12
1.2.3. Đặc tính chịu hạn của cây đậu tương 14
1.3. Gen liên quan đến khả năng chịu hạn của cây đậu tương 15
1.3.1. Các gen chức năng 15
1.3.2. Gen DREB và DREB2 20
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 29
2.1. Vật liệu 29
2.2. Hóa chất - Thiết bị 29
2.2.1. Hóa chất 29

2.2.2. Thiết bị 30
2.3. Phương pháp nghiên cứu 30
2.3.1. Phương pháp sinh học phân tử 30
2.3.1.1. Thiết kế mồi nhân gen DREB2 30
2.3.1.2. Phương pháp tách chiết RNA tổng số 30
2.3.1.3. Tổng hợp cDNA 31
2.3.1.4. Khuyếch đại gen DREB2 32
2.3.1.5. Thôi gel và tinh sạch sản phẩm thôi gel 33
2.3.1.6. Tách dòng gen và xác định trình tự nucleotid của gen 33
2.3.2. Phương pháp phân tích số liệu 36
2.4. Địa điểm nghiên cứu 36
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN 37
3.1. Đặc điểm sinh học của các giống đậu tương nghiên cứu 37
3.2. Kết quả phân lập gen DREB2 từ giống đậu tương DT 26 38
3.2.1. Kết quả tách RNA 38
3.2.2. Kết quả nhân bản gen DREB2 bằng phản ứng RT-PCR 39
3.2.3. Kết quả biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến E.coli chủng DH5α 41
3.2.4. Kết quả chọn dòng tế bào mang vector tái tổ hợp 42
3.2.5. Kết quả tách plasmid 43
3.2.6. Kết quả xác định trình tự nucleotide của gen DREB2 43
3.3. Kết quả phân tích gen DREB2 44
3.3.1. Cấu trúc gen DREB2 44
3.3.2. So sánh trình tự nucleotide 45
3.3.3. So sánh trình tự protein suy diễn 50
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ 53
1. Kết luận 53
2. Đề nghị 53
TÀI LIỆU THAM KHẢO 54

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ABA	Abscisic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
Bp	Base pair (cặp base)
Cs	Cộng sự
CYS	Cystatins
DREB	Dehydration Responsive Element Binding
Kb	Kilo base
HSP	Heat shock protein (protein sốc nhiệt)
LEA	Lea Embryogenesis Abundant (protein tích lũy với số lượng lớn ở giai đoạn cuối của quá trình hình thành phôi) với số lượng lớn ở giai đoạn cuối của quá trình hình thành phôi)
LTP	Lipid transfer protein (protein vận chuyển lipit)
PCR	Polymerase Chain Reaction (phản ứng chuỗi polymeaza)
PC5S	Pyroline - 5 - carboxylate synthease (enzym tham gia trong quá trình tổng hợp proline)
TAE	Tris Acetate Ethylendiamin tetraacetic axit
CBF	C - repeat binding factor
EREBP	Ethylene Responsive Element binding protein
ERF	Ethylene Responsive Element binding factor

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu http://www.lrc-tnu.edu.vn/

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1: Sản xuất đậu tương Việt Nam từ 2007 - 2013 8
Bảng 2.1: Danh sách các giống đậu tương nghiên cứu 29
Bảng 2.2: Trình tự cặp mồi nhân gen *DREB2* 30
Bảng 2.3: Thành phần phản ứng nhân gen *DREB2* 32
Bảng 2.4: Chu trình nhiệt cho phản ứng nhân gen *DREB2* 32
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng ghép nối gen vào vector pBT 34
Bảng 3.1. Một số đặc điểm hình thái của 5 giống đậu tương nghiên cứu 37
Bảng 3.2. Đặc điểm cấu trúc gen *DREB2* ở đậu tương 45
Bảng 3.3. Sự sai khác về trình tự nucleotide trên gen *DREB2* của giống đậu tương DT 26 với các trình tự đã công bố 48
Bảng 3.4. Độ tương đồng và độ sai khác về gen *DREB2* của giống DT 26 với các giống công bố trên ngân hàng gen 49
Bảng 3.5. Trình tự amino acid của gen *DREB2* thay đổi của các giống đậu tương 51
Bảng 3.6. Độ tương đồng và độ sai khác về amino acid của protein DREB2 giống DT 26 với các giống công bố trên Ngân hàng gen. 51

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Sơ đồ mô tả gen và vùng mã hóa của gen GmDREB2 ở đậu tương 26
Hình 1.2. Sơ đồ mô tả protein GmDREB2 ở đậu tương 27
Hình 1.3. Trình tự amino acid của vùng AP2 của protein DREB2 ở đậu tương 27
Hình 1.4. Điểm liên kết với DNA của protein DREB2 27
Hình 2.1. Sơ đồ vector pBT 34
Hình 3.1. Hình ảnh 5 giống đậu tương nghiên cứu 37
Hình 3.2. Kết quả nhân gen DREB2 của giống đậu tương nghiên cứu 40
Hình 3.3. Kết quả biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến E.coli chủng DH5α 41
Hình 3.4. Sản phẩm colony-PCR nhân gen DREB2 trực tiếp từ các khuẩn lạc được chọn 42
Hình 3.5. Kết quả tách plasmide từ khuẩn lạc trắng 43
Hình 3.6. Trình tự nucleotide của gen DREB2 ở giống đậu tương DT26 44
Hình 3.7. So sánh trình tự nucleotide của gen DREB2 của giống DT 26 với các trình tự đã công bố 47
Hình 3.8. Sơ đồ hình cây mô tả mối quan hệ giữa các giống 49
Hình 3.9. So sánh trình tự protein DREB2 của DT26 với các trình tự protein đã được công bố 50
Hình 3.10. So sánh trình tự amino acid trong vùng AP2 của giống đậu tương DT26 với 5 giống đậu tương công bố trên Ngân hàng gen 52

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) thuộc cây họ đậu (*Fabaceae),* là cây trồng cạn ngắn ngày có giá trị dinh dưỡng và kinh tế cao. Hạt đậu tương có hàm lượng protein từ 20% - 40%, dễ tan và chứa hầu hết các loại amino acid, đặc biệt là các loại amino acid không thay thế (lysin, triptophan, metionin ...). Hàm lượng lipid từ 18 - 20%, có chứa tỷ lệ lớn các axit béo chưa no, có hệ số đồng hóa lớn (98%) và chỉ số iốt cao, tốt cho việc phòng chống bệnh bướu cổ ở người. Trong hạt đậu tương còn có nhiều loại vitamin khác như: Vitamin A, D, E, PP, K… cung cấp nguồn dinh dưỡng phong phú, cần thiết cho người và động vật [2], [3], [4].

Cây đậu tương là một trong những cây trồng quan trọng không chỉ ở Việt Nam mà còn ở nhiều nước trên thế giới. Các sản phẩm rất quen thuộc của đậu tương như đậu phụ, nước tương, dầu ăn... có vai trò hết sức quan trọng trong đời sống hằng ngày của con người. Các nhà khoa học đã nghiên cứu phát hiện ra khả năng phòng và điều trị bệnh ung thư, tim mạch trong hạt đậu tương. Đặc tính quan trọng nữa của đậu tương, đó là khả năng cải tạo đất do hệ rễ của chúng có nốt sần chứa vi khuẩn cố định đạm. Cùng với thân và lá làm thay đổi tính chất lý, hóa và tăng độ phì nhiêu cho đất. Chính vì vậy, trồng đậu tương ngoài việc đem lại hiệu quả kinh tế còn góp phần vào công cuộc cải tạo đất trồng trọt [4].

Ở Việt Nam, theo số liệu thống kê chính thức của Chính phủ, đậu tương được trồng ở 28 tỉnh trên khắp cả nước, trong đó 70% ở miền Bắc và 30% ở miền Nam. Khoảng 65% đậu tương nước ta được trồng ở vùng cao, những nơi đất không cần màu mỡ và 35% được trồng ở những vùng đất thấp ở khu vực Đồng bằng sông Hồng. Đậu tương được trồng ở nhiều địa phương trên khắp cả nước vào từng thời điểm khác nhau nên có cả vụ xuân, vụ hè và vụ đông [3].