

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**

---

**NGUYỄN THÀNH LUÂN**

**THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN MÃ HÓA PROTEIN  
KHÁNG CHẤT DIỆT CỎ GLYPHOSATE**

**Chuyên ngành: Sinh học Thực nghiệm**

**Mã số: 60.42.014**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học: TS. LÊ VĂN SƠN**

**Thái Nguyên - 2014**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi và một số kết quả cùng cộng tác với các đồng nghiệp trong nhóm nghiên cứu. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận văn là trung thực, mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc.

**Tác giả luận văn**

**Nguyễn Thành Luân**

**XÁC NHẬN  
CỦA TRƯỞNG KHOA CHUYÊN MÔN**

**XÁC NHẬN  
CỦA CÁN BỘ HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

**TS. Lê Văn Sơn**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS Lê Văn Sơn đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn KS Hồ Mạnh Tường, cán bộ nghiên cứu Phòng Công nghệ DNA ứng dụng. Xin cảm ơn tập thể cán bộ Phòng Công nghệ DNA ứng dụng, 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 điều kiện thuận lợi, tận tình chỉ bảo, giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu và thực hiện thí nghiệm của đề tài.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn các thầy cô Bộ môn Di truyền & Sinh học hiện đại, Ban chủ nhiệm Khoa Sinh - KTNN, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Cuối cùng, tôi bày tỏ lời cảm ơn đến các đồng nghiệp, bạn bè cùng toàn thể gia đình đã giúp đỡ, động viên tôi trong suốt thời gian học tập.

Thái Nguyên, ngày 16 tháng 04 năm 2014

Tác giả

**Nguyễn Thành Luân**

## MỤC LỤC

	<b>Trang</b>
Lời cam đoan .....	i
Lời cảm ơn.....	ii
Mục lục .....	iii
Danh mục các chữ viết tắt .....	v
Danh mục các bảng.....	vi
Danh mục các hình .....	vii
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	<b>1</b>
<b>CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....	<b>3</b>
2.1. Chất diệt cỏ và ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp .....	3
2.1.1 Cỏ dại và cách phòng trừ.....	3
2.1.2. Các loại thuốc diệt cỏ đang sử dụng.....	4
2.2. Chất diệt cỏ glyphosate .....	8
2.2.1 Cấu tạo và cơ chế hoạt động của glyphosate.....	8
2.2.2. Tình hình sử dụng thuốc diệt cỏ glyphosate.....	10
2.3. EPSPS và ứng dụng trong tạo cây trồng kháng glyphosate .....	13
2.3.1. Cây trồng chuyển gen kháng chất diệt cỏ.....	13
2.3.2 EPSPS .....	18
2.3.3. Ứng dụng EPSPS trong tạo cây chuyển gen .....	19
<b>CHƯƠNG II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b> .....	<b>22</b>
3.1. Vật liệu .....	22
3.1.1. Thực vật.....	22
3.1.2. Chủng vi khuẩn.....	22
3.1.3. Các vector .....	22
3.1.4. Hóa chất.....	22
3.1.5. Máy móc và thiết bị .....	23
3.2. Phương pháp nghiên cứu .....	23
3.2.1. Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc SP-EPSPS-Cmyc.....	23
3.2.2. Phương pháp chuyển gen thông qua A.tumefaciens CV58.....	29

3.2.3. Phân tích cây chuyển gen. ....	30
<b>CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN</b> .....	<b>34</b>
4.1.1. Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc SP-EPSPS-Cmyc.....	34
4.1.2. Kết quả chuyển cấu trúc pBI121/EPSPS vào cây thuốc lá .....	42
4.1.3. Phân tích cây thuốc lá chuyển gen. ....	46
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ</b> .....	<b>49</b>
5.1. Kết luận.....	49
5. 2. Kiến nghị .....	49
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b> .....	<b>50</b>
<b>PHỤ LỤC</b>	

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, TỪ VIẾT TẮT

EPSPS	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
bp	Cặp bazơ
S3P	shikimate phosphate-3
ESP	5 enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate
cs	cộng sự
DEPC	Diethy pyrocarbonate
dNTP	Deoxynucleotide
Kb	Kilo bazơ
LB	Luria Bertani
PCR	Polymerase chain reaction - Phản ứng chuỗi polymerase
ĐBSCL	Đồng bằng sông Cửu Long
BAP	6-benzyladenine
PVDF	Polyvinylidene fluoride
WT	isopropylthio- $\beta$ -galactoside
RNAi	wild type
SP	signal peptide
<i>gus</i>	$\beta$ –Glucuronidase gene = Gen mã hóa enzyme $\beta$ -Glucuronidase
IAA	Indoleacetic acid
IBA	Indole-3-butyric acid
MS	Môi trường muối cơ bản theo Murashige và Skoog (1962)
OD	Optical density
Ti- plasmid	Tumor inducing plasmid = plasmid gây khối u

## DANH MỤC CÁC BẢNG

<b>STT</b>	<b>Tên bảng</b>	<b>Trang</b>
2.1	Phân bố 1 số loại cây trồng chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ	14
2.2	Thống kê cây trồng chuyển gen được chấp nhận tại Mỹ	20
3.1	Thành phần phản ứng cắt bằng enzyme giới hạn	24
3.2	Thành phần phản ứng lai SP-EPSPS-Cmyc vào vector pBI121	25
3.3	Thành phần hóa chất tách chiết plasmid	27
3.4	Thành phần phản ứng PCR với pUC18- F và pUC18- R	28
3.5	Thành phần dung dịch đệm tách chiết DNA	31
3.6	Thành phần chạy phản ứng PCR với EPSPS-F và CYMC-R	32
4.1	Kết quả tạo cây thuốc lá chuyển gen SP-EPSPS-Cmyc	45

## DANH MỤC CÁC HÌNH

STT	Tên hình	Trang
3.1	Sơ đồ vector pBI121	22
4.1	Trình tự đoạn gen EPSPS theo NCBI	34
4.2	Trình tự đoạn gen mã hóa cho protein của EPSPS	35
4.3	Trình tự đoạn SP từ Dã yên thảo	35
4.4	Trình tự cấu trúc SP-EPSPS-Cmyc	36
4.5	Trình tự Protein biểu hiện của EPSPS	37
4.6	Kết quả điện di sản phẩm cắt plasmid pBluescriptII	37
4.7	Kết quả cắt vector pBI121 bằng <i>XbaI/SacI</i>	38
4.8	Khuẩn lạc <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ mang plasmid	39
4.9	Kết quả điện di phản ứng cắt vector tái tổ hợp bằng <i>XbaI/SacI</i> và PCR	40
4.10	Kết quả PCR pBI121/EPSPS trong <i>A. tumefaciens</i>	42
4.11	Mảnh lá cảm ứng trên môi trường GM sau 2 ngày	43
4.12	Mảnh lá sau khi đồng nuôi cấy 2 ngày trên môi trường GM	43
4.13	Chồi mọc lên trên môi trường MS + BAP + kanamycin + cefortaxim	44
4.14	Các chồi tái sinh chuẩn bị chuyển sang môi trường ra rễ	44
4.15	Cây hoàn chỉnh chuẩn bị trồng ngoài môi trường	45
4.16	Kết quả PCR kiểm tra 10/30 dòng thuốc lá sau khi chuyển gen	46
4.17	Kết quả lai Western blot	47
4.18	Kết quả kiểm tra các dòng thuốc lá mang gen EPSPS kháng glyphosate	48



## MỞ ĐẦU

### 1.1 Đặt vấn đề

Cỏ dại luôn là một vấn đề lớn với cây trồng. Cỏ dại không chỉ cạnh tranh với cây trồng để lấy nước, chất dinh dưỡng, ánh nắng mặt trời, khoảng không để phát triển mà còn là nơi cư trú cho côn trùng và các loại sâu bệnh gây hại, làm giảm sút chất lượng mùa màng, đem theo hạt giống cỏ dại trộn lẫn với hạt giống cây trồng.

Theo phương pháp truyền thống cỏ dại thường được kiểm soát bằng cách: cày sới, nhổ cỏ, phun thuốc diệt cỏ, hay kết hợp tất cả những tập quán này. Nhưng phương pháp này chỉ áp dụng được trên diện tích rất nhỏ. Biện pháp diệt cỏ hiệu quả cho diện tích canh tác lớn được đưa ra là phun thuốc diệt cỏ một lần trên diện tích lớn. Thuốc diệt cỏ tác động vào một số enzym chủ yếu trong quá trình trao đổi chất của cây, làm rối loạn quá trình tổng hợp hữu cơ của cây và cuối cùng là tiêu diệt cỏ dại. Loại thuốc diệt cỏ hay được sử dụng phổ biến ở Việt Nam là glyphosate và glufosinate. Hai loại thuốc diệt cỏ này rất hữu ích trong việc kiểm soát cỏ dại và ít ảnh hưởng trực tiếp lên vật nuôi và không tồn tại lâu trong môi trường. Chúng có hiệu quả cao nhất và an toàn nhất trong số những hoá chất dùng trong nông nghiệp. Tuy nhiên, hoạt tính tác động lên cỏ dại cũng tác động giống hệt lên cây trồng, kết quả là tiêu diệt cả cỏ dại và cây trồng.

EPSPS là enzyme chìa khóa trong con đường sinh tổng hợp các amino acid vòng thơm. Trong tự nhiên nó tồn tại 2 dạng: EPSPS I tồn tại ở thực vật và vi khuẩn, dạng này nó bị ức chế bởi glyphosate. Dạng EPSPS II chỉ có ở một số vi khuẩn như *Pseudomonas* sp. strain PG2982, *Agrobacterium tumefaciens* sp. strain CP4 và *Staphylococcus aureus*... Trong đó EPSPSII từ *Agrobacterium tumefaciens* sp. strain CP4 có tính kháng glyphosate mức độ cao và đã được nhiều công trình nghiên cứu ứng dụng. Để giải quyết vấn đề

phòng trừ được cỏ dại và đảm bảo được năng suất chất lượng cây trồng, việc chọn tạo được giống cây trồng mang mang gen EPSPS từ *A.tumefaciens* sp. CP4, có khả năng chống chịu được chất diệt cỏ glyphosate là một trong các hướng đi quan tâm nhất hiện nay.

Xuất phát từ lý do trên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đề tài: “**Thiết kế vector chuyển gen mã hóa protein kháng chất diệt cỏ glyphosate.**”

Đề tài được thực hiện nghiên cứu tại phòng Công nghệ tế bào Thực vật, Viện Công nghệ Sinh học – Viện Hàn lâm khoa học quốc gia Việt Nam.

## **1.2. Mục tiêu của đề tài**

Thiết kế được vector chuyển gen mang cấu trúc gen mã hóa protein kháng chất diệt cỏ glyphosate.

## **1.3. Nội dung nghiên cứu**

### **1.3.1. Thiết kế vector chuyển gen**

- Xác định và sửa đổi trình tự nucleotid gen EPSPS phù hợp biểu hiện trong thực vật.
- Thiết kế cấu trúc vector chuyển gen mang cấu trúc EPSPS mã hóa protein kháng chất diệt cỏ glyphosate.
- Chuyển cấu trúc EPSPS vào vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58

### **1.3.2. Chuyển gen**

- Biến nạp cấu trúc EPSPS vào cây thuốc lá.
- Chọn lọc các dòng thuốc lá chuyển gen.

### **1.3.3. Phân tích cây thuốc lá chuyển gen**

- Kiểm tra cấu trúc gen chuyển trong cây thuốc lá chuyển gen
- Kiểm tra biểu hiện protein tái tổ hợp trong cây thuốc lá chuyển gen
- Đánh giá khả năng kháng glyphosate của cây thuốc lá chuyển gen.