

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN THỊ HỢP

**THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN
MANG CẤU TRÚC GEN *CYSTATIN* LIÊN QUAN
ĐẾN KHẢ NĂNG KHÁNG MỌT Ở NGÔ**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2014

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN THỊ HỢP

**THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN
MANG CẤU TRÚC GEN *CYSTATIN* LIÊN QUAN
ĐẾN KHẢ NĂNG KHÁNG MỌT Ở NGÔ**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 60.42.02.01

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS Nguyễn Vũ Thanh Thanh

THÁI NGUYÊN - 2014

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan bản luận văn là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh, sự giúp đỡ của các cán bộ Khoa Khoa học sự sống - Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên; Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các số liệu, kết quả trong luận văn là trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về những số liệu trong luận văn này.

Thái Nguyên, ngày 16 tháng 09 năm 2014

Tác giả luận văn

Nguyễn Thi Hợp

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh, người đã hướng dẫn, chỉ bảo tận tình và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài và hoàn chỉnh luận văn của mình.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô giáo Khoa Khoa học sự sống - Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện thuận lợi và có những góp ý sâu sắc cho tôi trong thời gian học tập và thực hiện đề tài này.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Lê Văn Sơn và các cán bộ, kỹ thuật viên phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện giúp đỡ tốt nhất để tôi có thể hoàn thành đề tài nghiên cứu này.

Cuối cùng, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn chân thành tới gia đình, đồng nghiệp và bạn bè đã luôn động viên, khích lệ, chia sẻ những khó khăn cùng tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Thái Nguyên, ngày 16 tháng 09 năm 2014

Tác giả luận văn

Nguyễn Thị Hợp

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	viii
MỞ ĐẦU	1
1. Lí do chọn đề tài.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. SƠ LƯỢC VỀ CÂY NGÔ (<i>ZEA MAY L.</i>).....	3
1.2. MỘT HẠI NGÔ <i>Sitophyllus zeamais</i>	9
1.3. PROTEINASE VÀ <i>CYSTATIN</i>	12
1.3.1. Proteinase và các loại proteinase	12
1.3.2. Proteinase inhibitor	14
1.4. CHUYỂN GEN THỰC VẬT.....	17
1.4.1. Phương pháp chuyển gen vào thực vật thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
1.4.2. Các nghiên cứu chuyển gen ở ngô	20
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	23
2.1. VẬT LIỆU VÀ THIẾT BỊ	23
2.1.1. Vật liệu	23
2.1.2. Hoá chất và thiết bị	24
2.1.3. Địa điểm nghiên cứu	25
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	25
2.2.1. Phân lập gen	25

2.2.2. Phản ứng lai ghép gen <i>Cystatin2</i> (<i>Cys2</i>) với vector pENTR TM /D-TOPO [®] ...	31
2.2.3. Phương pháp tạo vector chuyển gen mang cấu trúc gen <i>Cys2</i> bằng kỹ thuật Gateway	33
2.2.4. Phương pháp chuyển gen vào cây thuốc lá.....	35
2.2.4.1. Phương pháp biến nạp vector tái tổ hợp vào <i>A. tumefaciens</i>	35
2.2.4.2. Phương pháp tái sinh cây thuốc lá	35
2.2.4.3. Phương pháp tách DNA từ cây thuốc lá	36
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	38
3.1. PHÂN LẬP GEN <i>CYSTATIN2</i> TỪ GIỐNG NGÔ CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG MỘT SL.....	38
3.2. KẾT QUẢ THIẾT KẾ VECTOR MANG CẤU TRÚC GEN <i>Cys2</i>	43
3.3. TẠO CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN MANG CẤU TRÚC GEN pPhaso- <i>Cys2</i>	47
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	51
TÀI LIỆU THAM KHẢO	52
PHỤ LỤC	58

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

STT	Chữ viết tắt	Nghĩa tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
1	BAP	6- benzyl amino purine	
2	bp	Base pair	Cặp bazơ
3	cDNA	Complementary DNA	
4	cs		Cộng sự
5	DEPC	Diethyl pyrocarbonate	
6	DNA	Deoxyribose nucleic acid	
7	dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	
8	EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	
9	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
10	GM	Germination medium	Môi trường nảy mầm của hạt
11	IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside	
12	kb	kilo base	
13	kDa	kilo Dalton	
14	LB	Luria Bertani	
15	MS		Môi trường nuôi cấy mô cơ bản theo Murashige và Skoog
16	mRNA	messenger ribonucleic acid	
17	OD	Optical density	

18	PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi trùng hợp
19	RM	Rooting medium	Môi trường ra rễ
20	RNA	Ribonucleic acid	
21	SDS	Sodium dodecyl sulfate	
22	TAE	Tris – acetate- EDTA	
23	X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galacto-pyranoside	
24	Taq	Thermus aquaticus	
25	v/p	Vòng/phút	

DANH MỤC CÁC BẢNG TRONG LUẬN VĂN

Bảng 1.1:	Sản xuất ngô trên thế giới giai đoạn 1961 - 2012	7
Bảng 1.2:	Diện tích, năng suất, sản lượng ngô của Việt Nam từ 2007 - 2013	9
Bảng 2.1:	Trình tự cặp môi sử dụng trong nghiên cứu	24
Bảng 2.2:	Thành phần cho phản ứng tổng hợp cDNA.....	26
Bảng 2.3:	Thành phần của phản ứng PCR nhân gen <i>Cys2</i>	26
Bảng 2.4:	Chu kì nhiệt cho phản ứng PCR nhân gen <i>Cys2</i>	27
Bảng 2.5:	Thành phần gắn gen <i>Cystatin</i> vào vector tách dòng pBT	27
Bảng 2.6:	Thành phần của phản ứng colony - PCR.....	30
Bảng 2.7:	Chu trình nhiệt của phản ứng colony- PCR	30
Bảng 2.8:	Thành phần hóa chất tách chiết plasmid	30
Bảng 2.9:	Thành phần phản ứng ghép nối gen <i>Cys2</i> với vector pENTR TM /D-TOPO [®]	32
Bảng 2.10:	Thành phần phản ứng LR	34
Bảng 2.11:	Thành phần dung dịch đệm tách chiết DNA	36
Bảng 2.12:	Thành phần chạy phản ứng PCR nhân gen <i>Cys2</i> từ DNA tổng số của thuốc lá chuyển gen.....	37
Bảng 3.1:	Vị trí sai khác giữa trình tự đoạn gen <i>Cys2</i> của giống ngô SL và trình tự có mã số D38130	42
Bảng 3.2:	Sự sai khác giữa trình tự amino acid của giống SL và trình tự có mã số D38130	43
Bảng 3.3:	Kết quả tạo cây thuốc lá chuyển gen <i>Cys2</i>	49

DANH MỤC CÁC HÌNH TRONG LUẬN VĂN

Hình 1.1:	Một ngô <i>Sitophilus zeamais</i>	10
Hình 2.1:	Ảnh của giống ngô SL	23
Hình 2.2:	Sơ đồ minh họa phản ứng LR giữa pENTR- <i>Cys2</i>	33
Hình 3.1:	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR nhân đoạn mã hóa gen <i>Cys2</i>	38
Hình 3.2:	Hình ảnh điện di sản phẩm tinh sạch đoạn mã hoá của gen <i>Cys2</i> ...	39
Hình 3.3:	Hình ảnh điện di tách plasmid tái tổ hợp mang gen <i>Cys2</i>	40
Hình 3.4:	Hình ảnh so sánh trình tự đoạn mã hoá gen <i>Cystatin 2</i> của giống ngô SL và D38130	41
Hình 3.5:	Hình ảnh trình tự amino acid suy diễn của protein <i>Cys2</i> ở giống ngô SL và D38130	42
Hình 3.6:	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR từ plasmid tái tổ hợp tách từ plasmid pENTR- <i>Cys2</i>	44
Hình 3.7:	Hình ảnh điện di kiểm tra vector tái tổ hợp pPhaso- <i>Cys2</i>	45
Hình 3.8:	Hình ảnh vi khuẩn <i>A.tumefaciens</i> sau khi biến nạp	46
Hình 3.9:	Hình ảnh điện di sản phẩm PCR từ plasmid tái tổ hợp tách trong chủng vi khuẩn <i>A.tumefaciens</i> CV58	47
Hình 3.10:	Hình ảnh các giai đoạn chuyển gen vào cây thuốc lá	48
Hình 3.11:	Ảnh điện di kiểm tra DNA tổng số tách từ lá cây thuốc lá;	49
Hình 3.12:	Hình điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen <i>Cys2</i> từ thuốc lá....	50