

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM  
-----

NGUYỄN HUY HOÀNG

**THIẾT KẾ VECTOR MANG GEN HA1 MÃ HÓA  
PROTEIN BỀ MẶT CỦA VIRUS H5N1 VÀ  
BƯỚC ĐẦU CHUYỂN GEN HA1 TẠO CÁC DÒNG  
RỄ TỔ CHUYỂN GEN Ở CÂY THUỐC LÁ**

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2010

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

**NGUYỄN HUY HOÀNG**

**THIẾT KẾ VECTOR MANG GEN HA1 MÃ HÓA  
PROTEIN BỀ MẶT CỦA VIRUS H5N1 VÀ  
BƯỚC ĐẦU CHUYỂN GEN HA1 TẠO CÁC DÒNG  
RỄ TỎ CHUYỂN GEN Ở CÂY THUỐC LÁ**

**Chuyên ngành: DI TRUYỀN HỌC  
Mã số: 60.42.70**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: TS. CHU HOÀNG HÀ**

**THÁI NGUYÊN - 2010**

## **LỜI CAM ĐOAN**

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

*Thái Nguyên, ngày 01 tháng 9 năm 2010*

*Tác giả luận văn*

**Nguyễn Huy Hoàng**

## LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, lời đầu tiên tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **TS. Chu Hoàng Hà**, Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, là người thầy đã tận tình hướng dẫn, tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong suốt thời gian thực hiện và hoàn thành luận văn này.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành tới **TS. Phạm Bích Ngọc, TS. Lê Văn Sơn, KS. Vũ Thị My, KS. Nguyễn Chi Mai** cùng toàn thể các cô chú, các anh chị và các bạn Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ Sinh học, là những người đã tận tình chỉ bảo, truyền đạt nhiều kinh nghiệm quý báu và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình làm thực nghiệm tại phòng.

Qua đây, tôi cũng xin cảm ơn **PGS.TS Chu Hoàng Mậu**, các thầy cô giáo khoa Sinh-KTNN trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên đã giảng dạy, truyền đạt cho tôi những kiến thức mới và tạo điều kiện để tôi có thể hoàn thành được khóa học này.

Cuối cùng tôi xin gửi tới gia đình, bạn bè, người thân lòng biết ơn sâu sắc. Những người luôn luôn ở bên, ủng hộ, động viên, giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Thái Nguyên, ngày 01 tháng 9 năm 2010

**Tác giả luận văn**

**Nguyễn Huy Hoàng**

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN .....	i
LỜI CẢM ƠN .....	ii
MỤC LỤC .....	iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT .....	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG .....	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH .....	viii
MỞ ĐẦU .....	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....	3
1.1. Cúm A/H5N1 .....	3
1.1.1. Cấu tạo .....	3
1.1.2. Độc lực và tính thích ứng vật chủ .....	5
1.1.3. Khả năng gây bệnh của virus cúm A/H5N1 .....	7
1.1.4. Cơ chế xâm nhiễm gây bệnh của virus cúm A trong tế bào vật chủ.....	8
1.2. Kháng nguyên HA .....	10
1.3. Tình hình nghiên cứu cúm A và vấn đề nghiên cứu vaccine cúm A/H5N1 ở Việt Nam và trên thế giới .....	12
1.3.1. Tình hình nghiên cứu cúm A/H5N1 ở Việt Nam và trên thế giới.. ..	12
1.3.2. Nghiên cứu phát triển vaccine cúm A/H5N1 ở Việt Nam và trên thế giới .....	16
1.4. Kỹ thuật chuyển gen thông qua <i>A. rhizogens</i> và ứng dụng.....	19
1.4.1. Giới thiệu vi khuẩn <i>A. rhizogens</i> .....	19
1.4.2. Hệ vector nhị thể .....	21
1.4.3. Ứng dụng nuôi cấy rễ tơ trong sản xuất dược phẩm sinh học tái tổ hợp .....	23

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	25
2.1. Vật liệu, hóa chất và thiết bị.....	25
2.1.1. <i>Vật liệu</i> .....	25
2.1.2. <i>Hóa chất</i> .....	25
2.1.3. <i>Thiết bị</i> .....	26
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	26
2.2.1. <i>Phương pháp nhân đoạn gen HA1 bằng kỹ thuật PCR</i> .....	26
2.2.2. <i>Phương pháp ghép nối đoạn gen HA1 vào pENTR221/cal</i> .....	28
2.2.3. <i>Biến nạp sản phẩm ghép nối gen vào tế bào khả biến</i> <i>E. coli DH-5α bằng phương pháp sốc nhiệt</i> .....	30
2.2.4. <i>Tạo vector chuyển gen bằng kỹ thuật Gateway</i> .....	32
2.2.5. <i>Biến nạp vector chuyển gen vào A. rhizogenes ATCC15834</i> .....	35
2.2.6. <i>Chuyển cấu trúc mang gen mã hóa protein vỏ virus vào thuốc lá</i> <i>thông qua vi khuẩn A. rhizogenes ATCC15834</i> .....	36
2.2.7. <i>Phương pháp đánh giá cây trồng chuyển gen</i> .....	37
2.2.8. <i>Phương pháp xử lý số liệu</i> .....	39
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....	40
3.1. Kết quả tách dòng gen HA1 .....	40
3.1.1. <i>Kết quả PCR nhân đoạn gen HA1</i> .....	40
3.1.2. <i>Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR</i> .....	41
3.1.3. <i>Ghép nối đoạn gen HA1 vào vector pENTR/cal</i> .....	42
3.2. Thiết kế vector tái tổ hợp mang gen HA1 bằng kỹ thuật Gateway®. 47	
3.2.1. <i>Tạo vector tái tổ hợp theo phản ứng LR</i> .....	47
3.2.2. <i>Kết quả kiểm tra vector tái tổ hợp bằng phản ứng colony-PCR</i> . 48	
3.2.3. <i>Kết quả kiểm tra vector tái tổ hợp bằng enzyme giới hạn</i> .....	48
3.3. Kết quả biến nạp pK7WG2D/cal/HA1 vào vi khuẩn <i>A. rhizogenes</i> .. 49	

3.4. Kiểm tra hệ thống tạo rễ tơ chuyển gen thông qua <i>A. rhizogenes</i> sử dụng gen chỉ thị Gus.....	51
3.5. Kết quả chuyển gen HA1 vào mảnh lá thông qua <i>A. rhizogens</i> đề tạo các dòng rễ tơ chuyển gen HA1.....	53
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....	56
TÀI LIỆU THAM KHẢO .....	57
PHỤ LỤC .....	66

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

ADN	Acid Deoxyribonucleic
ARN	Acid Ribonucleic
A.rhizogens	Vi khuẩn <i>Agrobacterium rhizogens</i>
bp	Base pair
cal	calreticulin
Dal	Dalton
<i>gus</i>	$\beta$ –Glucuronidase gene = Gen mã hóa enzyme $\beta$ -Glucuronidase
kb	Kilo bazo
kD	Kilô Dalton
LB	Luria & Bertani
MS	Môi trường muối cơ bản theo Murashige và Skoog (1962)
NXB	Nhà xuất bản
OD	Optical density
ORFs	Open reading frames = khung đọc mở
ppt	Phosphinothricin = thuốc diệt cỏ
T-DNA	Transfer –DNA = đoạn ADN được chuyển
Ti- plasmid	Tumor inducing plasmid = plasmid gây khối u thực vật
signal peptide	Peptide tín hiệu
<i>vir</i>	Virulence Region = vùng gây nhiễm có khả năng tạo khối u
X-gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide



## DANH MỤC CÁC BẢNG

STT	Tên bảng	Trang
2.1	Thành phần phản ứng PCR	27
2.2	Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR	28
2.3	Thành phần phản ứng cắt bằng enzyme giới hạn	29
2.4	Thành phần phản ứng lai	29
2.5	Thành phần phản ứng LR	33
2.6	Thành phần phản ứng cắt bằng enzyme <i>SacI</i> và <i>HindIII</i>	35
3.1	Trình tự và các thông số cần thiết của hai môi HA1_F và HA1_R	40
3.2	Tỷ lệ mô lá chuyển gen pPTN289/gus trên môi trường chọn lọc	52
3.3	Tỷ lệ mô lá chuyển gen pK7WG2D/cal/HA1 trên môi trường chọn lọc	54

## DANH MỤC CÁC HÌNH

STT	Tên hình	Trang
1.1	Ảnh chụp kính hiển vi điện tử (A), mô hình (B) và phức hợp ribonucleoprotein RNP (C) của virus cúm A	3
1.2	Cấu trúc bộ gen (hình trái) gồm 8 gen là 8 đoạn RNA sợi đơn âm (-ssRNA) và mô hình (hình phải) thể virus cúm H5N1 gồm các protein và các đoạn -ssRNA.	5
1.3	Mối quan hệ lây nhiễm và thích ứng các loài vật chủ của virus cúm A	6
1.4	Cơ chế xâm nhiễm và nhân lên của virus cúm A/H5N1 trong tế bào chủ	10
1.5	Mô hình cấu trúc protein 3 chiều của HA	11
1.6	Cấu trúc Ri plasmid	21
1.7	Hình ảnh tạo khối u gây ra do <i>A. tumefaciens</i> (trái) và rễ tơ do <i>A. rhizogenes</i> (phải).	22
1.8	Nuôi cấy rễ tơ <i>G. glabra</i>	24
2.1	Cấu trúc attL1_Cal/SacI & HindIII/attL2 nằm trong vector pENTR/Cal	29
3.1	Kết quả PCR và tinh sạch gen HA1 từ pUC18/Haop	41
3.2	Kết quả cắt đoạn gen HA1 và pENTR/cal bằng enzyme giới hạn SacI và HindIII	42
3.3	Kết quả biến nạp plasmid tái tổ hợp pENTR/HA1 vào E.Coli	43
3.4	Kết quả điện di 7 khuẩn lạc mọc trên môi trường chọn lọc	44
3.5	Trình tự ghép nối gen HA1 trên vector pENTR221/cal	47
3.6	Kết quả PCR colony pK7WG2D/cal/HA1	48
3.7	Kết quả cắt pK7WG2D/cal/HA1 bằng SacI và Hind III	49
3.8	Kết quả clony-PCR bằng cặp mồi HA1_SacI_F và HA1_Hind III_R	50
3.9	Mảnh lá thuốc lá cảm ứng trên môi trường WPM	51