

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

LÊ ĐỨC HUẤN

**NGHIÊN CỨU CHUYỂN CẤU TRÚC GEN
CYSTATIN2 VÀO MỘT SỐ GIỐNG NGÔ THÔNG QUA
VI KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2015

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

LÊ ĐỨC HUẤN

**NGHIÊN CỨU CHUYỂN CẤU TRÚC GEN
CYSTATIN2 VÀO MỘT SỐ GIỐNG NGÔ THÔNG QUA
VI KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

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 - 2015

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; Khoa Sinh – Đại học Sư Phạm 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 01 tháng 05 năm 2015

Tác giả luận văn

LÊ ĐỨC HUẤN

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, anh chị em 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 các thầy cô giáo, anh chị em Khoa Sinh học - Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện thuận lợi về cơ sở vật chất giúp tôi 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 1 tháng 05 năm 2015

Tác giả luận văn

Lê Đức Huấn

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	ii
LỜI CẢM ƠN	iii
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu.....	2
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. TỔNG QUAN VỀ CÂY NGÔ (<i>ZEA MAYS</i> L.)	3
1.2. ĐẶC ĐIỂM MỘT HẠI NGÔ <i>Sitophyllus zeamais</i>	10
1.2.1. <i>Sơ lược về một hại ngô</i>	10
1.2.2. <i>Đặc điểm hình thái của một ngô</i>	11
1.3. PROTEINASE VÀ <i>CYSTATIN</i>	13
1.3.1. <i>Proteinase và các loại proteinase</i>	13
1.3.2. <i>Proteinase inhibitor và Cystatin</i>	15
1.4. CHUYỂN GEN Ở THỰC VẬT.....	18
1.4.1. Phương pháp chuyển gen vào thực vật thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
1.4.2. Các nghiên cứu chuyển gen ở ngô	22
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	25
2.1. VẬT LIỆU VÀ THIẾT BỊ	25
2.1.1. <i>Vật liệu</i>	25
2.1.2. <i>Hóa chất, thiết bị sử dụng</i>	26
2.1.3. <i>Địa điểm và thời gian nghiên cứu</i>	27
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	27
2.2.1. <i>Chuẩn bị mẫu</i>	29
2.2.2. <i>Khử trùng mẫu</i>	29
2.2.3. <i>Tạo dịch huyền phù</i>	30

2.2.4. Nhiễm khuẩn và đồng nuôi cấy	30
2.2.5. Diệt khuẩn, nuôi cấy và chọn lọc mô sẹo chuyển gen	30
2.2.6. Phương pháp tái sinh cây từ mô sẹo, tạo rễ và cho cây ra đất	31
2.2.7. Phương pháp bố trí thí nghiệm thử các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng chuyển gen của ngô	32
2.2.8. Đánh giá, phân tích kết quả chuyển gen	34
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	37
3.1 Chuyển vector mang gen <i>Cystatin2</i> vào 2 giống ngô nghiên cứu	37
3.2. Kết quả kiểm tra cây ngô mang gen <i>Cys2</i> sau khi chuyển gen.....	42
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	47
4. 1. Kết luận	47
4.2. Kiến nghị	47
TÀI LIỆU THAM KHẢO	48
PHỤ LỤC	55

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	
5	CS		Cộng sự
6	Cys2	<i>Cystatin2</i>	
7	DNA	Deoxyribose nucleic acid	
8	dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	
9	EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	
10	IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside	
12	kb	kilo base	
13	LB	Luria Bertani	
14	MS		Môi trường nuôi cấy mô cơ bản theo Murashige và Skoog
15	NXB		Nhà xuất bản
16	mRNA	messenger ribonucleic acid	
17	OD	Optical density	
19	PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi trùng hợp
20	RNA	Ribonucleic acid	
21	TAE	Tris – acetate- EDTA	
22	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	

DANH MỤC CÁC BẢNG TRONG LUẬN VĂN

Bảng 1.1. Sản xuất ngô trên thế giới giai đoạn 1961 – 2012.....	8
Bảng 1.2. Thống kê diện tích, năng suất, sản lượng ngô của Việt Nam từ năm 2007 - 2013.....	9
Bảng 2.1. Đặc điểm 2 giống ngô nghiên cứu.....	25
Bảng 2.2. Trình tự cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu	26
Bảng 2.3. Thành phần dung dịch đệm tách chiết DNA	34
Bảng 2.4. Thành phần chạy phản ứng PCR nhân gen <i>Cys2</i> từ DNA tổng số của ngô chuyển gen	35
Bảng 2.5. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR nhân gen <i>Cys2</i>	35
Bảng 3.1. Ảnh hưởng thời gian gây nhiễm <i>A.tumefaciens</i> đến khả năng tạo mô sẹo từ phôi non của 2 dòng ngô LVN99 và LVN885	38
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ chất kháng sinh kanamycin đến khả năng tạo mô sẹo từ phôi non của 2 giống ngô LVN99 và LVN885	40
Bảng 3.3. Kết quả tạo cây ngô chuyển gen <i>Cys2</i>	42

DANH MỤC CÁC HÌNH SỬ DỤNG TRONG LUẬN VĂN

Hình 2.1. Cây ngô mẹ được trồng ngoài đồng ruộng	29
Hình 2.2. Phôi ngô được tách ra khỏi hạt	29
Hình 3.1. Ảnh hưởng thời gian gây nhiễm đến khả năng tạo mô sẹo của 2 giống ngô LVN 99 và LVN885	38
Hình 3.2. Ảnh hưởng của chất kháng sinh kanamycin đến khả năng tạo mô sẹo của 2 giống ngô LVN99 và LVN885	41
Hình 3.3. Ảnh hưởng của chất kháng sinh kanamycin đến khả năng tạo mô sẹo từ phôi non của 2 giống ngô LVN99 và LVN885	41
Hình 3.4. Dòng cây ngô chuyển gen được tái sinh từ phôi non (A) và dòng cây chuyển gen được đưa ra môi trường đất pha cát (B) từ giống ngô LVN9943	
Hình 3.5. Ảnh điện di kiểm tra DNA tổng số tách từ lá cây ngô.....	44
Hình 3.6. Hình điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen <i>Cys2</i>	45

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Cây ngô (*Zea mays* L.) là cây lương thực giàu dinh dưỡng có vai trò quan trọng trong nền kinh tế toàn cầu, đứng thứ hai sau lúa mì. Cụ thể, ngô là một trong ba cây ngũ cốc quan trọng nhất cung cấp lương thực cho loài người, được sử dụng làm thức ăn cho gia súc, là nguyên liệu cho các nhà máy sản xuất và chế biến lương thực - thực phẩm - dược phẩm và ngô cũng là mặt hàng nông sản xuất khẩu có giá trị. Cây ngô được gieo trồng rộng khắp trên thế giới, đứng thứ ba về diện tích, thứ hai về sản lượng và thứ nhất về năng suất. Theo thống kê của FAO, năm 2012 cây ngô được trồng trên toàn thế giới với diện tích 177,38 triệu ha, sản lượng 872,07 triệu tấn [57]. Tại Việt Nam, ngô là cây lương thực được trồng phổ biến, đứng thứ 2 chỉ sau lúa gạo. Hiện nay và trong tương lai, ngô vẫn thuộc nhóm cây ngũ cốc có vai trò quan trọng ở nước ta, góp phần thúc đẩy phát triển kinh tế cả nước nói chung và nền kinh tế nông nghiệp nói riêng.

Ở nước ta hiện nay, ngô là một trong những cây trồng đang được coi trọng để phát triển cả diện tích cũng như năng suất và chất lượng. Tuy nhiên, do điều kiện khí hậu, thời tiết nước ta rất phức tạp, vấn đề bảo quản ngô sau thu hoạch chưa được chú trọng, tạo điều kiện cho loài mọt hại ngô có cơ hội phát triển dẫn đến chất lượng của hạt ngô giảm. Vấn đề đặt ra là cần chọn tạo giống ngô mới có khả năng kháng mọt cao, chất lượng tốt để đưa vào sản xuất. Hiện nay, đã có nhiều công trình nghiên cứu về khả năng kháng mọt của ngô như: nghiên cứu về thành phần sâu mọt hại ngô trong quá trình bảo quản, đặc điểm sinh thái học của loài mọt ngô, đánh giá giống ngô nhiệt đới kháng mọt *Sitophilus zeamais* [42], [45], nghiên cứu đánh giá cải thiện giống ngô lai với mức độ kháng khác nhau với mọt ngô [49], đánh giá biểu hiện của gen *Cystatin* lúa mạch trong ngô tăng cường