

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**
-----  -----

ĐÀO THU TRANG

**TÁCH DÒNG, THIẾT KẾ VECTOR
VÀ CHUYỂN GEN LIÊN QUAN ĐẾN SỰ TÍCH LŨY ASEN
VÀO CÂY THUỐC LÁ**

Chuyên ngành sinh học thực nghiệm
Mã số: 60420114

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC
TS. Lê Thị Bích Thủy

HÀ NỘI, 12/2015

Công trình được hoàn thành tại:

- Phòng Di truyền tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Người hướng dẫn khoa học: TS. Lê Thị Bích Thủy

Viện CNSH, Viện HL KHCN VN

Phản biện 1: PGS. TS. Lê Văn Sơn

Viện CNSH, Viện HL KHCN VN

Phản biện 2: TS. Hồ Quỳnh Liên

Viện Hóa sinh biển, Viện HL KHCN VN

Luận văn sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận văn họp tại:

Nhà A11, tầng 2, Viện Sinh thái và Tài Nguyên sinh vật, số 18 Hoàng
Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội.

Vào hồi 08 giờ30 ngày 22 tháng 12 năm 2015

Có thể tìm hiểu luận văn tại:

- Trung tâm học liệu Đại học Thái Nguyên
- Thư viện Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới TS. Lê Thị Bích Thủy, trưởng phòng Di truyền tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã định hướng nghiên cứu, hướng dẫn tận tình và tạo mọi điều kiện về hóa chất cũng như trang thiết bị để tôi có thể hoàn thành quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin cảm ơn tập thể các cán bộ phòng Di truyền tế bào thực vật đã nhiệt tình giúp đỡ và tạo điều kiện cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu khoa học và hoàn thành luận văn.

Tôi xin cảm ơn các thầy, cô giáo cùng cơ sở đào tạo Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật – Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giảng dạy và tạo điều kiện cho tôi được học tập tại đây.

Cuối cùng tôi xin gửi lời biết ơn tới gia đình và bạn bè đã quan tâm, động viên và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Hà Nội, tháng 12, năm 2015

Học viên

Đào Thu Trang

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN

MỤC LỤC

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC HÌNH

DANH MỤC BẢNG

MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1. Tổng quan về tình hình ô nhiễm KLN	3
1.1. Tình hình ô nhiễm KLN trên thế giới.....	3
1.2. Tình hình ô nhiễm kim loại nặng ở Việt Nam	3
2. Tổng quan chung về Asen	5
2.1. Asen và độc tính của asen	5
2.2. Sự phơi nhiễm Asen	6
2.3. Tác động của nhiễm độc Asen đến sức khỏe con người	8
2.4. Điều trị nhiễm độc Asen ở người.....	8
3. Các phương pháp xử lý ô nhiễm KLN	8
3.1. Phương pháp truyền thống	8
3.1.1. Phương pháp cơ học	9
3.1.2. Phương pháp vật lý và hoá học.....	9
3.2. Công nghệ xử lý KLN trong đất bằng thực vật.....	10
3.3. Các nghiên cứu về biện pháp xử lý KLN bằng thực vật sử dụng công nghệ gen.....	13
3.3.1. Các nghiên cứu trên thế giới.....	13
3.3.2. Các nghiên cứu ở Việt Nam	15
4. Chuyển gen ở thực vật.....	18
4.1. Cơ sở khoa học của chuyển gen thực vật.....	18
4.2. Giới thiệu chung về vector sử dụng trong chuyển gen thực vật	19
4.2.1. Các hệ thống vector sử dụng trong chuyển gen thực vật.....	19
CHƯƠNG 2: NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	23
2.1. Nội dung nghiên cứu.....	23

2.2. Vật liệu nghiên cứu	23
2.2.1. Nguyên vật liệu	23
2.2.2. Hóa chất và thiết bị.....	23
2.2.2.1. Hóa chất.....	23
2.2.2.2. Thiết bị.....	24
2.2.3. Môi trường nuôi cấy.....	24
2.3. Phương pháp nghiên cứu	25
2.3.1. Nuôi cấy và lưu giữ chủng khuẩn	25
2.3.2. Phương pháp tách ARN.....	25
2.3.3. Phương pháp tổng hợp cDNA	26
2.3.4. Phương pháp xử lý với enzym giới hạn.....	26
2.3.5. Phương pháp biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào <i>E.coli</i>	27
2.3.6. Phương pháp tách chiết và tinh sạch DNA plasmid của vi khuẩn <i>E.coli</i>	28
2.3.7. Phương pháp biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào <i>A. tumefaciens</i> bằng xung điện	29
2.3.8. Phương pháp chuyển gen vào thuốc lá thông qua <i>A. tumefaciens</i> (theo Topping, 1998).....	29
2.3.9. Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ thuốc lá.....	31
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	32
3.1. Tách dòng gen <i>arsC</i> từ RNA của cây dương xỉ <i>Pityrogramma calomelanos</i>	32
3.1.1. Kết quả tách chiết RNA tổng số.....	32
3.1.2. Phản ứng RT-PCR	32
3.1.3. Biến nạp cấu trúc gen <i>arsC</i> vào vector tách dòng pBT	33
3.1.4. Kiểm tra vector pBT- <i>arsC</i>	34
3.1.5. Xác định trình tự gen trình tự gen <i>arsC</i>	36
3.2. Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc gen <i>arsC</i>	38
3.2.1. Gắn gen <i>arsC</i> vào vector biểu hiện pCambia 1301	38
3.2.2. Kết quả kiểm tra vector pCambia 1301- <i>arsC</i>	40

3.3. Biến nạp vector chuyển gen pCambia 1301-<i>arsC</i> vào chủng vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> C58.....	42
3.4. Tạo cây thuốc lá chuyển gen mang gen <i>arsC</i>.....	43
3.5. Kiểm tra cây chuyển gen bằng PCR	47
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	49
TÀI LIỆU THAM KHẢO	50
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

<i>A.tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
As	Asen
Amp	Ampicillin
BAP	6-benzenladenine
Bp	Base pair
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTPs	Deoxy Nucleoside Triphosphate
EDTA	Ethylene Diamine tetra- acetate Acid
Gus	Gen mã hóa enzyme β -glucuronidase
Kb	Kilo base
LB	Môi trường theo Luria và Bertani
MS	Môi trường cơ bản theo Murashige và Skoog
NAA	Naphthalene Acetic Acid
OD	Optical density
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic Acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TAE	Tris bazơ – Axit acetic – EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBKB	Tế bào khả biến
T-DNA	Transferred-DNA
Ti-plasmid	Tumor inducing plasmid = plasmid gây khối u
UV	Ultraviolet (light)
<i>Vir</i>	Virulence region = vùng gây độc

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1: Hình ảnh về Asen.....	5
Hình 1.2: Mô hình xâm nhiễm của <i>A. tumefaciens</i> vào tế bào thực vật	19
Hình 3.1. RNA tổng số tách từ lá cây dương xỉ <i>Pityrogramma calomelanos</i> chưa xử lý Dnase.....	32
Hình 3.2. Kết quả điện di sản phẩm phản ứng RT-PCR.....	33
Hình 3.3. Kết quả tách chiết plasmid pBT- <i>arsC</i>	34
Hình 3.4. Kết quả PCR pBT- <i>arsC</i> với cặp mồi đặc hiệu.....	35
Hình 3.5. Kết quả cắt pBT- <i>arsC</i> bằng <i>BamHI</i> , M: Marker Fermentas 1kb,1-4: Sản phẩm cắt pBT-ArsC bằng <i>BamHI</i>	35
Hình 3.6. Kết quả cắt pBT- <i>arsC</i> bằng <i>NcoI</i> và <i>Eco72I</i>	36
Hình 3.7. So sánh trình tự đoạn gen phân lập từ lá cây dương xỉ <i>Pityrogramma calomelanos</i> với trình tự được công bố trên ngân hàng gen NCBI (X80057.1).	37
Hình 3.8. Độ tương đồng các axit amin khi so sánh 2 trình tự	38
Hình 3.9. Sơ đồ cấu trúc vector pCambia 1301- <i>arsC</i>	38
Hình 3.10. Sản phẩm cắt plasmid pCambia1301 và pBT- <i>arsC</i>	39
Hình 3.11. Sản phẩm tinh sạch pCambia1301 và gen <i>arsC</i> sau khi cắt bằng enzyme <i>NcoI</i> và <i>Eco72I</i>	40
Hình 3.12: Kết quả tách chiết plasmid pCambia1301- <i>arsC</i>	41
Hình 3.13: Kết quả PCR kiểm tra sự có mặt của gen <i>arsC</i>	41
Hình 3.14. Sản phẩm cắt pCambia1301- <i>arsC</i> bằng enzyme <i>NcoI</i> và <i>Eco72I</i>	42
Hình 3.15. Kết quả phản ứng Colony- PCR của 10 khuẩn lạc <i>A.tumefaciens</i> C58 được biến nạp pCambia1301- <i>arsC</i>	43
Hình 3.16. Hình ảnh chọn lọc mảnh lá tái sinh đa chồi sau chuyển gen	45
Hình 3.17. Hình ảnh chồi thuốc lá trong môi trường đa chồi bổ sung hygromycin 10mg/l và cefotaxime 500mg/l.....	45
Hình 3.18. Khả năng ra rễ của các chồi trên môi trường RM hygromycin 10mg/l sau 3 tuần nuôi cấy.	46
Hình 3.19. Cây thuốc lá hoàn chỉnh được trồng trong bầu đất: trấu: cát.....	47
Hình 3.20. Kết quả điện di sản phẩm PCR của các dòng thuốc lá chuyển gen	48

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Danh mục thiết bị.....	24
Bảng 2.2. Phản ứng tổng hợp cDNA	26
Bảng 2.3. Phản ứng cắt bằng enzyme cắt giới hạn	27
Bảng 2.4. Phản ứng ghép nối đoạn gen vào vector.....	27
Bảng 3.1: Tỷ lệ tái sinh của các mẫu qua các giai đoạn	44

MỞ ĐẦU

Tình hình ô nhiễm môi trường nói chung và ô nhiễm kim loại nặng nói riêng đang trở thành vấn đề hết sức cấp bách của xã hội hiện đại. Công nghiệp ngày càng phát triển dẫn tới các chất thải độc hại không được xử lý hay xử lý không đạt yêu cầu giải phóng vào môi trường là nguyên nhân chủ yếu dẫn đến tình trạng ô nhiễm kim loại nặng nghiêm trọng. Kim loại nặng (KLN) có Hg, Cd, Pb, As, Sb, Cr, Cu, Zn, Mn, v.v... thường không tham gia hoặc ít tham gia vào quá trình sinh hoá của các thể sinh vật và thường tích lũy trong cơ thể chúng. Vì vậy, KLN thường là các nguyên tố độc hại với sinh vật. Ở Mỹ, hiện có trên 43.000 vùng công nghiệp trọng điểm đang trong tình trạng ô nhiễm, trong đó trên 40% là ô nhiễm KLN như: Chì (Pb), Cadmium (Cd), Crôm (Cr), Asen (As). Theo số liệu của tổ chức y tế thế giới về ô nhiễm Asen trong nguồn nước, nồng độ Asen trong khu vực nam Iowa và tây Missouri của Mỹ dao động từ 0,034- 0,490 mg/l, Mexico từ 0,008-0,624 mg/l, có tới 50% số mẫu có nồng độ Asen >0,050mg/l. Bệnh nhiễm độc Asen mãn tính do sử dụng nguồn nước bị ô nhiễm Asen (Arsenicosis) xảy ra ở nhiều nước trên thế giới và mang tính dịch tễ địa phương rõ rệt.

Gần đây tình trạng nhiễm độc Asen đã được báo động, không chỉ ở các quốc gia trên thế giới như Mỹ, Ấn Độ, Trung Quốc... mà ở Việt Nam cũng đã gia tăng ngày càng nhiều. Điển hình như khu vực Quỳnh Lôi, Hai Bà Trưng (Hà Nội) đã có nhiều gia đình phải chịu hậu quả và di chứng nặng nề do nhiễm độc Asen, nhiều trường hợp đã tử vong. Với tình trạng khoan giếng bừa bãi như hiện nay, đa số nguồn nước sau khi khoan lên sẽ được sử dụng trực tiếp mà không qua xử lý triệt để, thường chỉ sử dụng biện pháp thô sơ như: lắng, lọc để lấy nước trong... Các biện pháp này không thể loại bỏ được các kim loại nặng còn lẫn trong nước, lại thiếu sự kiểm soát và hướng dẫn của các cơ quan chức năng nên chất lượng nước làm ảnh hưởng đến sức khỏe người dân là điều khó tránh khỏi. Ở Hà Nội 40% giếng khoan có hàm lượng As lớn hơn mức an toàn nhiều lần.

As hay còn gọi là thạch tím là chất rất độc. Các hợp chất As vô cơ được xếp vào nhóm A các chất gây ung thư ở người và gây ung thư da, phổi, thận và gan, phá hủy hệ thần kinh. Ngoài ra, As còn gây các bệnh về tim mạch, tiểu đường và thiếu