

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

NGUYỄN HỮU KIÊN

**PHÂN LẬP VÀ THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN GEN
ZmNF-YB2 VÀ *ZmNAC1* NHẪM ĐÁP ỨNG KHẢ NĂNG
CHỐNG CHỊU VỚI ĐIỀU KIỆN HẠN HÁN Ở CÂY NGÔ**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI, năm 2014

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**

NGUYỄN HỮU KIÊN

**PHÂN LẬP VÀ THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN GEN
ZmNF-YB2 VÀ *ZmNAC1* NHẪM ĐÁP ỨNG KHẢ NĂNG
CHỐNG CHỊU VỚI ĐIỀU KIỆN HẠN HÁN Ở CÂY NGÔ**

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: **PGS.TS. Nguyễn Văn Đồng**

HÀ NỘI, năm 2014

MỤC LỤC

<i>Lời cảm ơn</i>	<i>i</i>
<i>Lời cam đoan</i>	<i>ii</i>
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	iii
DANH MỤC CÁC BẢNG	v
DANH MỤC CÁC HÌNH	vi
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Tổng quan về cây ngô	4
1.1.1. Nguồn gốc địa lý của cây ngô	4
1.1.2. Nguồn gốc di truyền của cây ngô	5
1.1.3. Đặc điểm nông sinh học của cây ngô	6
1.1.4. Vai trò của cây ngô trong nền kinh tế	6
1.1.5. Tình hình sản xuất ngô trên thế giới và Việt Nam	9
1.1.5.1. Tình hình sản xuất ngô trên thế giới	9
1.1.5.2. Tình hình sản xuất ngô ở Việt Nam	10
1.2. Tình hình phát triển ngô biến đổi gen trên thế giới và ở Việt Nam	11
1.2.1. Các phương pháp chuyển gen vào ngô	11
1.2.2. Thành tựu và triển vọng của cây ngô biến đổi gen trên thế giới và Việt Nam	13
1.3. Ảnh hưởng của hạn hán đến cây trồng và phản ứng của cây trồng với điều kiện hạn hán	16
1.3.1. Hạn hán và nhu cầu tạo cây trồng kháng hạn	16
1.3.2. Khái niệm về tính chịu hạn và phản ứng của cây trồng với điều kiện hạn	17
1.4. Tổng quan về gen NF-YB2 và NAC1	19
1.4.1. Khái niệm và vai trò của các nhân tố phiên mã với điều kiện bất lợi phi sinh học	19
1.4.2. Tổng quan về gen NF-YB2	20
1.4.3. Tổng quan về gen NAC1	22

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	26
2.1. Vật liệu nghiên cứu.....	26
2.1.1. Vật liệu thực vật	26
2.1.2. DNA plasmid và chủng vi khuẩn.....	26
2.1.3. Hóa chất.....	26
2.1.4. Các thiết bị máy móc.....	27
2.1.5. Địa điểm nghiên cứu	27
2.2. Phương pháp	27
2.2.1. Phương pháp tìm kiếm dữ liệu và thiết kế môi đặc hiệu cho gen <i>ZmNF-YB2</i> và <i>ZmNAC1</i>	27
2.2.2. Phương pháp tổng hợp cDNA.....	28
2.2.3. Tách dòng gen <i>ZmNF-YB2</i> và <i>ZmNAC1</i> từ cDNA của giống NTCB.....	32
2.2.4. Thiết kế vector siêu biểu hiện gen <i>ZmNF-YB2</i> và <i>ZmNAC1</i>	37
2.2.5. Khảo sát khả năng tiếp nhận gen <i>ZmNF-YB2</i> và <i>ZmNAC1</i> của một số dòng ngô Việt Nam.....	42
2.2.6. Các chỉ tiêu theo dõi và đánh giá	43
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	44
3.1. Kết quả tách chiết RNA tổng số từ giống NTCB	44
3.2. Kết quả phân lập gen <i>ZmNF-YB2</i> và <i>ZmNAC1</i> từ cDNA của giống NTCB..	45
3.3. Thiết kế vector siêu biểu hiện <i>pZY:CaMV35S::ZmNF-YB2</i> và <i>pZY:CaMV5S::ZmNAC1</i>	51
3.4. Kết quả đánh giá khả năng tiếp nhận gen của một số dòng ngô Việt Nam sử dụng vector <i>pZY:CaMV35S::ZmNFYB2</i> và <i>pZY:CaMV35S::ZmNAC1</i>	55
3.4.1. Kết quả biến nạp gen <i>ZmNF-YB2</i> và <i>ZmNAC1</i> vào các dòng ngô.....	55
3.4.2. Kết quả phân tích các cây mang gen <i>ZmNF-YB2</i> và <i>ZmNAC1</i> bằng kỹ thuật PCR.....	59
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	62
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	63
PHỤ LỤC.....	68

Lời cảm ơn

Trước hết. Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn tới các thầy cô và cán bộ công tác tại Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật đã dạy dỗ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập tại viện.

*Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc tới **PGS.TS. Nguyễn Văn Đông**, người đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và hỗ trợ tôi trong suốt quá trình công tác cũng như trong thời gian học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn này.*

Nhân dịp này, tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành tới các cán bộ, anh, chị, em trong Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp đã giúp đỡ và động viên tôi trong quá trình công tác và nghiên cứu khoa học vừa qua.

Cuối cùng, tôi xin chân thành cảm ơn gia đình và bạn bè đã nhiệt tình động viên, giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu khoa học cũng như trong cuộc sống.

Luận văn này được thực hiện từ nguồn kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu tạo giống ngô chịu hạn bằng công nghệ gen” thuộc chương trình đề tài cấp nhà nước về lĩnh vực CNSH Nông nghiệp.

Xin chân thành cảm ơn!

Hà nội, tháng năm 2014

Nguyễn Hữu Kiên

Lời cam đoan

Tôi xin cam đoan đã trực tiếp thực hiện các nghiên cứu trong luận văn này. Mọi kết quả thu được nguyên bản, không chỉnh sửa hoặc sao chép từ các nghiên cứu khác, các số liệu, sơ đồ kết quả của luận văn này chưa từng được công bố.

Mọi dữ liệu hình ảnh, biểu đồ và trích dẫn tham khảo trong luận văn đều được thu thập và sử dụng từ nguồn dữ liệu mở hoặc với sự đồng ý của tác giả.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm với những lời cam đoan trên!

Tác giả

Nguyễn Hữu Kiên

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

AS	Acetosyringone
A.tumefaciens	Agrobacterium tumefaciens
BAP	6-Benzyl Amino Purine (Benzyladeninpurin)
Bp	Base pair
cDNA	Complementary DNA
Cs	Cộng sự
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylen dimine tetra acetic acid
g/l	Gam/lít
IPTG	Isopropylthio-beta-D-galactoside
Kb	Kilobase
kDa	KiloDalton

LB	Luria Bertani
mg/l	Miligam/lít
NTCB	Ngô tẻ cao bằng
OD	Optical density
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic Acid
Rnase	Ribonuclease
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TAE	Tris-Acetic acide-EDTA
Taq polymerase	Thermus aquaticus polymerase
TE	Tris-EDTA
X-Gal	5-brom-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosidase

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Dự báo nhu cầu ngô thế giới đến năm 2020	9
Bảng 1.2. Diện tích, năng suất, sản lượng ngô trên thế giới 2009 – 2012	10
Bảng 1.3. Sản xuất ngô Việt Nam từ năm 2009 – 2012	11
Bảng 2.1. Trình tự các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu	27
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng	29
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng	31
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng tổng hợp cDNA	31
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng PCR gen <i>ZmNF-YB2</i> và <i>ZmNAC1</i> từ cDNA	32
Bảng 2.6. Chu trình nhiệt phản ứng PCR	33
Bảng 2.7. Thành phần phản ứng gắn 3' A Overhang	34
Bảng 2.8. Thành phần phản ứng gắn đoạn gen vào vector tách dòng	35
Bảng 2.9. Thành phần phản ứng PCR từ khuôn lạc	36
Bảng 2.10. Thành phần phản ứng cắt enzyme giới hạn	37
Bảng 2.11. Thành phần phản ứng cắt DNA plasmid	38
Bảng 2.12. thành phần phản ứng loại nhóm 5' phosphatase	39
Bảng 2.13. Thành phần phản ứng gắn đoạn gen vào vector	39
Bảng 2.14. Thành phần phản ứng cắt plasmid <i>pZY:CaMV35S</i>	40
Bảng 3.1. Kết quả tách chiết RNA tổng số của giống NTCB	44
Bảng 3.2. Kết quả biến nạp vector <i>pZY:CaMV35S::ZmNF-YB2</i> và <i>pZY:CaM35S::ZmNAC1</i> vào 3 dòng ngô Việt Nam	56
Bảng 3.3. Kết quả phân tích các dòng ngô chuyển gen <i>ZmNF-YB2</i> và <i>ZmNAC1</i> thế hệ T0 của 3 dòng ngô sử dụng biến nạp	59

DANH MỤC CÁC HÌNH

<i>Hình 1.1. Cơ chế đáp ứng của thực vật trong điều kiện hạn hán</i>	19
<i>Hình 2.1. Vector plasmid pGEM-T Easy mở vòng</i>	35
<i>Hình 2.2. Bản đồ cấu trúc vector biểu hiện pZY:CaMV35S</i>	38
<i>Hình 3.1. Kết quả điện di kiểm tra RNA tổng số</i>	45
<i>Hình 3.2. Kết quả khuếch đại gen ZmNF-YB2 từ cDNA</i>	46
<i>Hình 3.3.a. Kết quả PCR gen ZmNAC1 từ các cDNA; b. Kết quả PCR đoạn gen ZmNAC1 dự kiến sau khi xử lý với sorbitol 12 giờ</i>	47
<i>Hình 3.4.a. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR từ khuẩn lạc mang gen ZmNF-YB2; b. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR khuẩn lạc mang gen ZmNAC1</i>	49
<i>Hình 3.5. Cấu trúc vector siêu biểu hiện pZY:CaMV35S::ZmNF-YB2</i>	52
<i>Hình 3.6. Cấu trúc vector siêu biểu hiện pZY:CaMV35S::ZmNAC1</i>	52
<i>Hình 3.7.a. Kết quả PCR gen ZmNF-YB2 sử dụng cặp mồi 35S-F/ZmNF-YB2Asc-R; b. Kết quả PCR khuẩn lạc sử dụng cặp mồi 35S-F/ZmNAC1BamHI-R</i>	53
<i>Hình 3.8.a. Kết quả cắt vector pZY:CaMV35S::ZmNF-YB2 bằng enzyme giới hạn AscI; b. Kết quả cắt vector pZY:CaMV35S::ZmNAC1 bằng enzyme giới hạn BamHI</i>	54
<i>Hình 3.9. Quy trình biến nạp gen ZmNF-YB2 và ZmNAC1 vào các dòng ngô Việt Nam</i>	59
<i>Hình 3.10. Kết quả phân tích PCR gen chọn lọc (Bar) của các cây ngô chuyển gen ZmNF-YB2 thế hệ To</i>	60
<i>Hình 3.11. Kết quả phân tích PCR gen đích ZmNF-YB2 của các cây ngô chuyển gen thế hệ To</i>	60
<i>Hình 3.12. Kết quả phân tích PCR gen chọn lọc (Bar) của các cây ngô chuyển gen ZmNAC1 thế hệ To</i>	61