

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN KHOA HỌC VÀ
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT



NGUYỄN MẬU HƯNG

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN
GEN SSIV MÃ HÓA ENZYME STARCH SYNTHASE TĂNG
CƯỜNG SINH TỔNG HỢP TINH BỘT**

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Hà Nội - 2016

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN KHOA HỌC VÀ
CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT



LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN SSIV MÃ HÓA ENZYME STARCH SYNTHASE TĂNG CƯỜNG SINH TỔNG HỢP TINH BỘT

Chuyên ngành:
Mã số:

Sinh học thực nghiệm
60420114

Học viện:
Hướng dẫn khoa học:

Nguyễn Mậu Hưng
TS. Phạm Bích Ngọc

Hà Nội - 2016

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan Luận văn này hoàn toàn được hoàn thiện bằng quá trình nghiên cứu khoa học của bản thân dưới sự hướng dẫn trực tiếp của TS. Phạm Bích Ngọc cùng với cán bộ Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học. Các số liệu hình ảnh, kết quả được trình bày, trong luận văn này là trung thực, không sao chép bất cứ tài liệu, công trình nghiên cứu của người khác mà không chỉ rõ nguồn tham khảo. Tôi xin chịu trách nhiệm về lời cam đoan của mình trước hội đồng khoa học.

Hà Nội, tháng 1 năm 2016

Học viên

Nguyễn Mậu Hưng

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến những người đã hướng dẫn, giúp đỡ tận tình để tôi hoàn thành luận văn này:

TS. Phạm Bích Ngọc, Phó trưởng phòng Công nghệ Tế bào Thực vật - Viện Công nghệ Sinh học, đã hướng dẫn và hỗ trợ tận tình, truyền đạt kiến thức, những kinh nghiệm quý báu trong suốt quá trình thực hiện đề tài.

PGS.TS. Chu Hoàng Hà - Viện trưởng Viện công nghệ sinh học, Viện trưởng Viện Công nghệ sinh học đã chỉ bảo tận tình về chuyên môn, luôn theo sát thí nghiệm của tôi để có những lời khuyên bổ ích và kịp thời.

ThS. Lê Thu Ngọc, CN. Nguyễn Khắc Hưng, CN. Phạm Thanh Tùng đã giúp đỡ tôi trong suốt thời gian làm luận văn.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn đến các thầy cô giáo tại Cơ sở đào tạo Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã truyền đạt cho tôi những kiến thức quý báu trong thời gian học tập vừa qua.

Bằng tình cảm chân thành, tôi xin gửi lời cảm ơn đến gia đình và bạn bè đã luôn ở bên, động viên, giúp đỡ tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn này.

Hà Nội, tháng 1 năm 2016

Học viên

Nguyễn Mậu Hưng

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	11
1. Đặt vấn đề	11
2. Mục đích nghiên cứu	12
3. Nội dung nghiên cứu	12
4. Ý nghĩa khoa học	13
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	14
1.1. Tổng quan về tinh bột và sinh tổng hợp tinh bột	14
1.1.1. Giới thiệu về tinh bột	14
1.1.2. Cấu trúc của tinh bột	15
1.1.3. SỰ THỦY PHÂN TINH BỘT	16
1.1.4. HÌNH DẠNG TINH BỘT	17
1.1.5. Các loại hạt tinh bột hay gặp	17
1.1.6. Cơ chế sinh tổng hợp tinh bột và các gen liên quan	18
1.1.7. Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học nhằm cải biến quá trình trao đổi tinh bột	21
1.2. Cây sắn và tình hình sản xuất cây sắn trên thế giới và Việt Nam	22
1.3. Rễ tơ và ứng dụng nuôi cấy rễ tơ trong sản xuất protein tái tổ hợp	26
1.4. Giới thiệu về <i>Agrobacterium rhizogenes</i> – phương pháp tạo rễ tơ ở tế bào thực vật	28
1.5. Cơ chế chuyển các gen vùng T-DNA vào tế bào thực vật	29
1.6. Nuôi cấy sinh khối rễ tơ	30
CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	32
2.1. Vật liệu, hóa chất và thiết bị	32
2.1.1. Thực vật	32
2.1.2. Chủng khuẩn, vector và cặp môi sử dụng	32
2.1.3. Hóa chất	33
2.1.4. Thiết bị	33
2.2. Phương pháp nghiên cứu	34
2.2. Phương pháp thu thập mẫu, phân lập, xác định trình tự gen SSIV	34
2.2.1. Tách chiết RNA tổng số từ củ sắn giống KM140	34
2.2.2. Phản ứng RT-PCR	34

2.2.3. Tách dòng sản phẩm bằng vector pENTR™/D-TOPO	36
2.2.4. Kiểm tra các khuẩn lạc bằng phương pháp PCR từ khuẩn lạc.....	37
2.2.5. Tách chiết plasmid.....	38
2.2.6. Xác định trình tự và so sánh trình tự gen thu được với các trình tự tương ứng trên GenBank.	39
2.2.7. Thiết kế vector pK7GWIWG2(II) mang đoạn gen SSIV bằng kỹ thuật Gateway.	39
2.2.8. Phương pháp chuyển gen tạo rễ ở khoai lang nhờ vi khuẩn <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	42
2.2.9. Phương pháp đánh giá mô chuyển gen trên môi trường chọn lọc.....	43
2.2.10. Phương pháp xử lý số liệu	43
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	44
3.1. Phân lập, giải trình tự gen SSIV mã hóa cho enzyme Starch Synthase ở sắn.....	44
3.1.1. Tách chiết RNA tổng số từ củ sắn giống KM140.	44
3.1.2. Thiết kế mồi đặc hiệu nhân gen SSIV của sắn và tổng hợp cDNA.....	44
3.1.3. Phân lập, tách dòng, giải trình tự gen SSIV của sắn.....	45
3.2. Thiết kế vector chuyển gen thực vật pK7WG2D/SSIV và tạo chủng vi khuẩn <i>Agrobacterium rhizogenes</i> tương ứng	46
3.2.1. Thiết kế vector chuyển gen thực vật pK7WG2D/SSIV bằng kỹ thuật Gateway	46
3.2.2. Tạo chủng vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> mang cấu trúc vector chuyển gen đã thiết kế	47
3.3. Kết quả chuyển gen tạo rễ ở khoai lang mang gen SSIV	48
3.5. Phân tích các dòng rễ ở khoai lang chuyển gen SSIV bằng kỹ thuật PCR	50
3.6. Phân tích cây chuyển gen SSIV bằng kỹ thuật RT-PCR	51
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	55
KẾT LUẬN:.....	55
ĐỀ NGHỊ:.....	55
Tài Liệu Tham Khảo	56
Phụ Lục:	

DANH MỤC HÌNH

Hình 1. Cấu trúc phân tử của amylopectin và amylose	15
Hình 2. Quá trình sinh tổng hợp tinh bột và các enzyme liên quan.....	19
Hình 3. Cây Sắn	23
Hình 4. Sản lượng sắn theo châu lục, năm 2006-2011	Error! Bookmark not defined.
Hình 5. Tỷ lệ sản lượng sắn các nước trên thế giới, 2012	Error! Bookmark not defined.
Hình 6. Vector pK7GWG2D.....	40
Hình 7. RNA tổng số tách chiết từ củ giống sắn KM140	44
Hình 8. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại gen SSIV từ cDNA sắn	45
Hình 9. Colony-PCR chọn lọc các dòng khuẩn mang vector pENTR/SSIV..	46
Hình 10. Kết quả colony-PCR sử dụng môi đặc hiệu SSIV-Frag_F/R và kiểm tra sản phẩm cắt plasmid pK7WG2D/SSIV bằng <i>EcoRI</i>	47
Hình 11. Kết quả điện di colony-PCR các dòng khuẩn lạc	48
Hình 12. Hình ảnh các mảnh lá và thân mẫu khoai lang <i>in vitro</i> trên môi trường đồng nuôi cấy sau 2 ngày lây nhiễm <i>A.rhizogenes</i>	49
Hình 13. Hình ảnh các mảnh lá và thân mẫu khoai lang <i>in vitro</i> bắt đầu ra rễ trên môi trường chọn lọc sau khi chuyển gen 30 ngày	49
Hình 14. Kết quả tách chiết DNA tổng số một số rễ tơ	50
Hình 15. Sản phẩm PCR nhân gen SSIV từ DNA tổng số tách chiết từ một số dòng rễ tơ chuyển gen và không chuyển gen.....	51
Hình 16. Điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR xác định hoạt động của gen actin trong các dòng rễ tơ chuyển gen M: thang chuẩn DNA 1kb; 1 - 15: sản phẩm RT-PCR các cây chuyển gen.....	52

Hình 17. Điện di đồ kiểm tra sản phẩm RT-PCR xác định hoạt động của gen
.....52

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1. Diện tích, năng suất và sản lượng sản của thế giới từ năm 2000-2012
..... **Error! Bookmark not defined.**

Bảng 2. Trình tự các cặp môi sử dụng 32

Bảng 3. Kích thước các phân đoạn thu được khi cắt plasmid tái tổ hợp pK7GWG2D/SSIV bằng EcoRI 41

Bảng 4: Kết quả chuyển gen tạo rễ tơ mang cấu trúc gen tăng cường tổng hợp tinh bột SSIV ở cây khoai lang 53

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT VÀ KÝ HIỆU

STT	KÝ HIỆU	CHỮ VIẾT TẮT
1	<i>A.tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
2	<i>DNA</i>	<i>Acid Deoxiribonucleic</i>
3	<i>BA</i>	<i>6-benzyl adenine</i>
4	<i>bp</i>	<i>Base pair</i>
5	<i>cDNA</i>	<i>Complementary DNA</i>
6	<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
7	<i>EDTA</i>	<i>Ethylene Diamine Tetra acetic Acid</i>
8	<i>Etal</i>	<i>Đồng tác giả</i>
9	<i>EtBr</i>	<i>Ethidium Bromid</i>
10	<i>GFP</i>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
11	<i>HSPs</i>	<i>Heat shock proteins</i>
12	<i>Hyg</i>	<i>Hygromycine resistant</i>
13	<i>LB</i>	<i>Luria Bertani</i>
14	<i>M</i>	<i>Thang Marker chuẩn</i>
15	<i>mRNA</i>	<i>RNA thông tin</i>
16	<i>MT</i>	<i>Môi trường</i>
17	<i>MS</i>	<i>Murashige and Skoog, 1962</i>

18	<i>MT-sHSP</i>	<i>Mitochondrial small Heat shock protein</i>
19	<i>MUG</i>	<i>4-methyl-umbelliferyl-β-D-glucuronide</i>
20	μ l	<i>Micro litte</i>
21	μ M	<i>Micromolar</i>
22	<i>NAA</i>	<i>1-Naphthaleneacetic acid</i>
23	<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
24	<i>RT-PCR</i>	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
25	<i>RAPD</i>	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
26	<i>SOD</i>	<i>Superoxide dismutase</i>
27	<i>SSIV</i>	<i>Starch synthase IV</i>
28	<i>T-DNA</i>	<i>Transfer-DNA</i>
29	<i>TAE</i>	<i>Tris-acetate –EDTA</i>
30	<i>Ti-plasmid</i>	<i>Tumor-Inducing Plasmid</i>
31	<i>TP</i>	<i>Transit peptide</i>
32	<i>Vir</i>	<i>Virulence</i>
33	<i>WT</i>	<i>Dòng không chuyển gen</i>