

TS. TRẦN THỊ LỆ (CHỦ BIÊN)
TS. TRƯƠNG THỊ BÍCH PHƯỢNG - ThS. TRẦN THỊ TRIỀU HÀ

Giáo trình
CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC VẬT

NHÀ XUẤT BẢN NÔNG NGHIỆP
HÀ NỘI - 2008

LỜI NÓI ĐẦU

Công nghệ sinh học hiện đại được ra đời và phát triển như vũ bão, mang lại những thành tựu tuyệt vời cho nhân loại. Hiện nay, công nghệ sinh học không chỉ là công cụ nghiên cứu sắc bén cho phép nghiên cứu cơ chế của các hiện tượng sống ở mức độ phân tử mà còn nhanh chóng trở thành một công nghệ sản xuất với những sản phẩm hoàn toàn mới mẽ trên mọi lĩnh vực, trước hết là y tế và nông nghiệp.

Để đáp ứng cho nhu cầu học tập của sinh viên khoa Nông học, tập thể tác giả chúng tôi được giao nhiệm vụ biên soạn giáo trình “Công nghệ sinh học thực vật”.

Nội dung giáo trình gồm 4 chương, với sự phân công biên soạn như sau:

Chương 1: Công nghệ DNA tái tổ hợp
(TS. Trần Thị Lệ)

Chương 2: Các kỹ thuật chính sử dụng trong phân tích acid nucleic
(TS. Trần Thị Lệ)

Chương 3: Công nghệ chuyển gene vào tế bào thực vật
(TS. Trương Thị Bích Phượng)

Chương 4: Công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật
(ThS. Trần Thị Triều Hà)

Do mới được xuất bản lần đầu nên giáo trình khó tránh khỏi thiếu sót hoặc chưa đáp ứng được yêu cầu bạn đọc. Vì thế, chúng tôi mong nhận được nhiều ý kiến đóng góp để lần xuất bản sau được hoàn thiện hơn.

Chúng tôi trân trọng cảm ơn PGS.TS. Nguyễn Hoàng Lộc đã đọc bản thảo, đóng góp nhiều ý kiến quý báu và Trường Đại học Nông Lâm Huế đã hỗ trợ chúng tôi biên soạn và xuất bản giáo trình này.

Các tác giả

Chương I

CÔNG NGHỆ DNA TÁI TỔ HỢP

I. KHÁI NIỆM

1. Ý nghĩa của tạo dòng DNA

Trước đây khoảng hơn một trăm năm Gregor Mendel đã đưa ra những định luật cho phép giải thích sự di truyền những đặc điểm sinh học. Cơ sở của những định luật này là mỗi một đặc điểm di truyền của sinh vật được điều khiển bởi 1 yếu tố, được gọi là gene, tồn tại ở đâu đó trong tế bào. Sự khám phá lại những định luật này của Mendel vào năm 1900 là sự khai sinh của di truyền học, ngành khoa học này có mục đích là hiểu bản chất của gene và giải thích những tác động của nó.

Công nghệ DNA tái tổ hợp là một tập hợp các kỹ thuật phân tử để định vị, phân lập, biến đổi và nghiên cứu các đoạn DNA. Thuật ngữ tái tổ hợp được dùng thường xuyên do mục tiêu của nó là phối hợp DNA từ hai nguồn xa nhau. Ví dụ: các gene từ hai nguồn vi khuẩn khác nhau có thể được liên kết lại, hoặc một gene người có thể được đưa vào nhiễm sắc thể vi khuẩn. Công nghệ DNA tái tổ hợp (thường được gọi là công nghệ di truyền) hiện nay bao gồm một mạng lưới các kỹ thuật phân tử được dùng để phân tích, biến đổi và tái tổ hợp hầu như mọi trình tự DNA.

2. Tạo dòng DNA là gì?

Về nguyên tắc một thí nghiệm tạo dòng DNA gồm những bước cơ bản sau đây:

1. Tinh sạch DNA
2. Cắt phân tử DNA
3. Xác định độ lớn của các đoạn DNA
4. Đưa các đoạn DNA vào vector tạo DNA tái tổ hợp
5. Đưa DNA tái tổ hợp vào tế bào chủ
6. Xác định những tế bào chủ chứa phân tử tái tổ hợp DNA

3. Tại sao sự tạo dòng DNA quan trọng như vậy? Ý nghĩa của tạo dòng đối với nghiên cứu và công nghệ sinh học

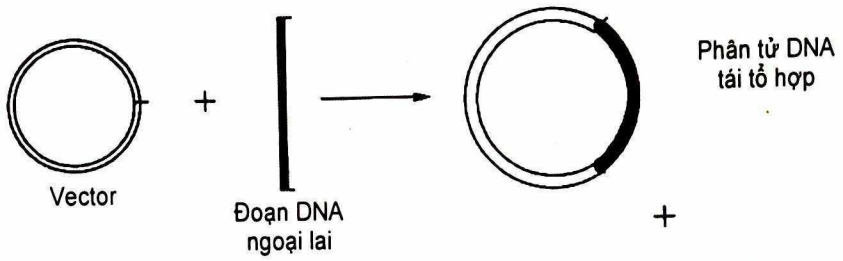
Từ hình 1.1 ta nhận thấy việc tạo dòng gene là một quá trình tương đối đơn giản. Tại sao phương pháp này trong sinh học lại có ý nghĩa lớn như vậy? Câu trả lời là: Trước hết việc tạo dòng gene là tách một gene ra khỏi tất cả những gene khác ở dạng tinh khiết, mà những gene này thường tồn tại với nhau trong một tế bào.

Sẽ hiểu chính xác hơn khi quan sát thí nghiệm tạo dòng ở hình 1.2. Đoạn DNA được tạo dòng có thể thuộc một hỗn hợp gồm nhiều đoạn khác nhau, mà mỗi đoạn mang một gene hoặc một phần của gene. Hỗn hợp này có thể là toàn bộ hệ gene của một sinh vật (ví dụ hệ gene của người). Sau đó mỗi một đoạn được đưa vào một phân tử vector phù hợp và tạo nên một tập hợp các phân tử DNA tái tổ hợp, trong đó một phân tử mang gene cần tìm. Thông thường mỗi tế bào chủ chỉ tiếp nhận một phân tử DNA tái tổ hợp duy nhất. Như vậy, khi một gene nào đó được tách ra từ nhiều gene khác thì người ta có thể nghiên cứu đặc điểm của nó chính xác hơn.

Quyết định sự thành công của thí nghiệm tạo dòng là liệu người ta có phân biệt được dòng quan tâm từ nhiều dòng khác nhau không? Ví dụ khi quan sát hệ gene của vi khuẩn *E.coli* có khoảng 2000 gene, có thể tìm ra một gene trong điều kiện có nhiều dòng không (Hình 1.3)?

Kỹ thuật gene đã mở ra một loạt cơ hội mà trước đây không thể có được. Vấn đề cơ bản là các gene có kích thước quá nhỏ và có hàng ngàn gene ở trong mỗi tế bào. Thậm chí khi quan sát trên kính hiển vi mạnh nhất, thì DNA xuất hiện như là một sợi dây bé xíu, không thể thấy các nucleotide và không có một dấu hiệu nào để nhận biết chỗ bắt đầu và kết thúc của một gene.

1. Thiết kế phân tử DNA tái tổ hợp



2. Đưa vào tế bào chủ

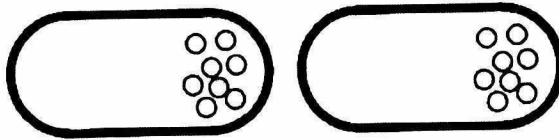
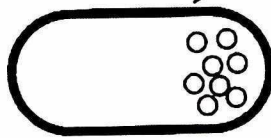


3. Nhân phân tử DNA tái tổ hợp



Vi khuẩn chứa phân tử DNA tái tổ hợp

4. Nhân tế bào chủ

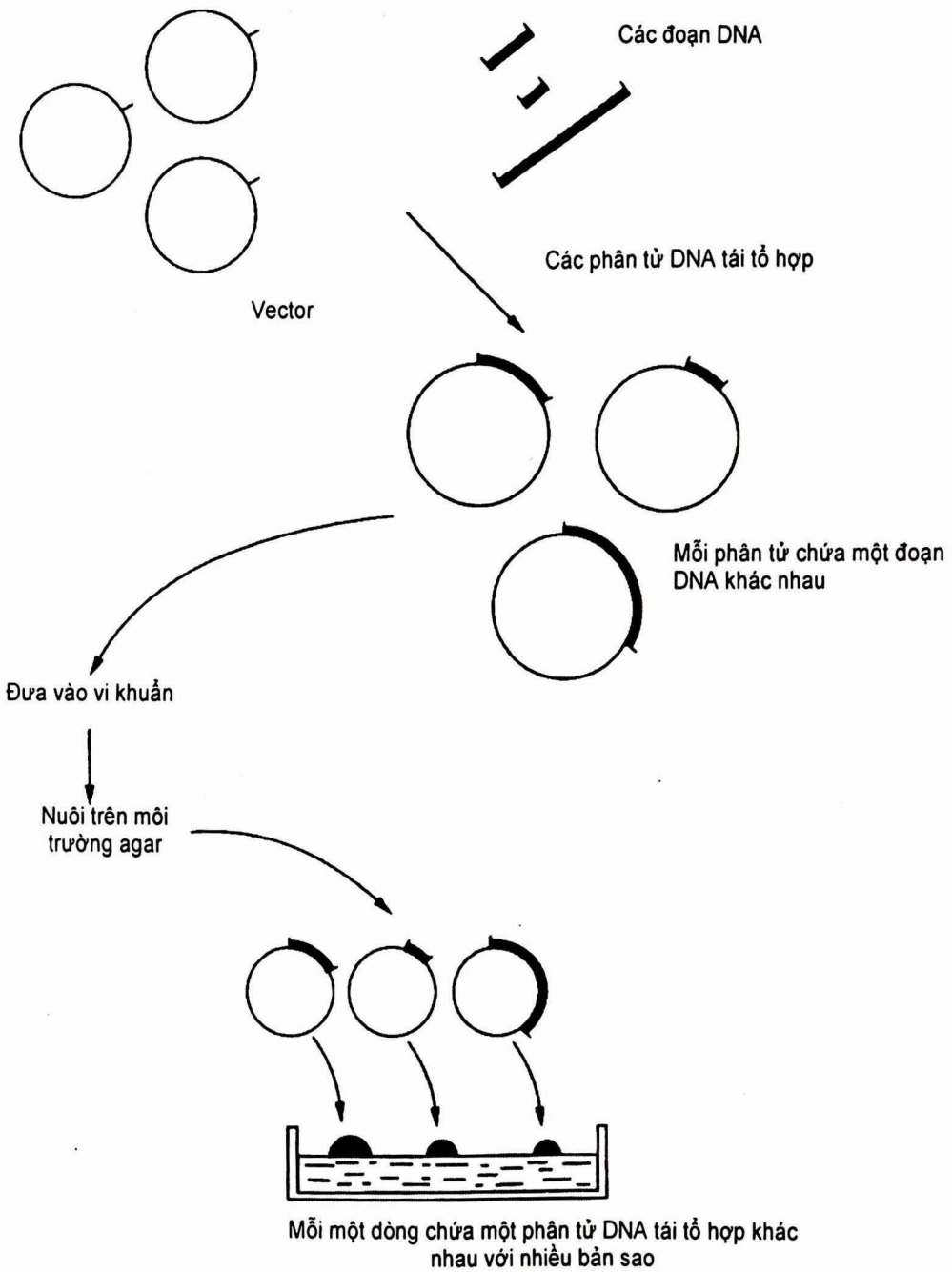


5. Xuất hiện một dòng qua nhiều lần phân chia tế bào



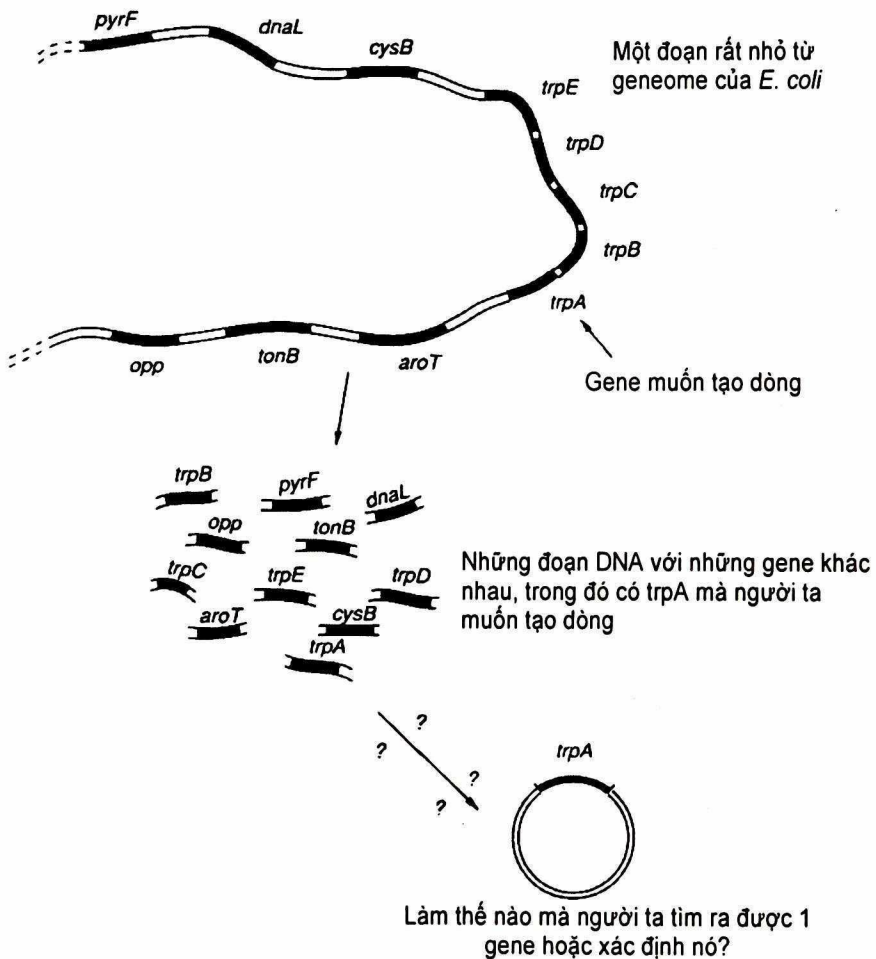
Các dòng vi khuẩn phát triển trên môi trường agar

Hình 1.1. Các bước cơ bản của tạo dòng DNA



Hình 1.2. Bằng việc tạo dòng người ta tạo ra dạng đồng nhất chứa các đoạn DNA khác nhau

Để minh họa vấn đề này chúng ta hãy xem xét một ví dụ đặc trưng về di truyền phân tử như sau: Giả thiết chúng ta muốn phân lập một gene của người và đưa nó vào vi khuẩn để sản xuất một lượng lớn các protein người. Vấn đề đầu tiên là phải tìm được gene mong muốn. Genome đơn bội của người chứa khoảng 3,3 tỷ cặp base. Giả sử gene mà chúng ta muốn phân lập dài 3.000 bp. Như vậy gene đích của chúng ta chỉ chiếm một phần triệu của genome, vì thế để tìm kiếm gene trong một hệ gene đồ sộ là khó khăn hơn nhiều so với việc tìm kiếm một cây kim trong một đồng cỏ khô. Và nếu chúng ta có thể định vị gene, thì tách nó ra khỏi genome như thế nào? Không có forcep đủ nhỏ để gấp một đoạn DNA, và cũng không có một cái kéo cơ học nào đủ nhỏ để cắt ra khỏi hệ gene một đoạn gene riêng biệt.



Hình 1.3. Vấn đề khó khăn khi chọn lọc

Công nghệ DNA tái tổ hợp đã biến đổi sâu sắc phương thức nghiên cứu gene. Trước đây thông tin về cấu trúc và tổ chức của gene thu được bằng cách kiểm tra biểu hiện kiểu hình, ngày nay những kỹ thuật mới đã tạo ra khả năng tự đọc các trình tự nucleotide. Trước đây các nhà di truyền phải chờ đợi sự xuất hiện các đột biến ngẫu nhiên hoặc cảm ứng để phân tích hiệu quả của sự sai khác di truyền, ngày nay họ có thể tạo ra đột biến ở các điểm nhất định một cách chính xác và xem chúng thay đổi kiểu hình như thế nào.

Công nghệ DNA tái tổ hợp đã cung cấp thông tin mới về cấu trúc và chức năng của gene và đã thay đổi nhiều khái niệm cơ bản của di truyền học. Ví dụ: trong khi mã di truyền được xem là rất phổ biến, thì bây giờ chúng ta còn biết rằng các mã không phổ biến cũng tồn tại trong DNA ty thể. Trước đây chúng ta cho rằng tổ chức gene eukaryote giống với prokaryote, nhưng bây giờ đã chứng minh được nhiều gene eukaryote bị gián đoạn bởi các intron. Ngày nay, chúng ta đã biết đầy đủ hơn về các quá trình tái bản, phiên mã, dịch mã, biến đổi RNA (RNA processing) và điều hòa gene thông qua việc sử dụng các kỹ thuật DNA tái tổ hợp. Các kỹ thuật này cũng được dùng trong nhiều lĩnh vực khác, như hóa sinh học, vi sinh vật học, sinh học phát triển, sinh học thần kinh, tiến hóa và sinh thái học.

Công nghệ DNA tái tổ hợp cũng được ứng dụng để tạo ra nhiều sản phẩm thương mại: thuốc, hormone, enzyme và các giống cây trồng, vật nuôi. Một nền công nghiệp hoàn toàn mới, công nghệ sinh học, đã phát triển chung quanh việc sử dụng các kỹ thuật này để tạo ra các sản phẩm mới. Trong y học, kỹ thuật DNA tái tổ hợp được dùng để thăm dò bản chất của ung thư, chẩn đoán các bệnh di truyền và nhiễm trùng, sản xuất thuốc và điều trị các rối loạn di truyền.

Nếu chúng ta thành công trong việc định vị và phân lập gene mong muốn, thì bước tiếp theo là đưa nó vào tế bào vi khuẩn. Các đoạn DNA mạch thẳng sẽ bị thoái biến nhanh bởi vi khuẩn và để tồn tại và tái bản được gene phải được chèn vào trong một dạng ổn định.

Khi biến nạp DNA tái tổ hợp thành công vào vi khuẩn còn phải đảm bảo rằng gene được phiên mã và dịch mã. Sự biểu hiện của gene