

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN THỊ HÀ

**NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG GEN *CODA* LÀM CHỈ THỊ CHỌN LỌC
TẠO VECTOR CHUYỂN GEN MANG TÍNH AN TOÀN SINH
HỌC**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thái Nguyên -5/2015

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN THỊ HÀ

**NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG GEN *CODA* LÀM CHỈ THỊ CHỌN LỌC
TẠO VECTOR CHUYỂN GEN MANG TÍNH AN TOÀN SINH
HỌC**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 60420201

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Chu Hoàng Hà

Thái Nguyên, 5/ 2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan Luận văn này hoàn toàn được hoàn thiện bằng sự say mê nghiên cứu khoa học của bản thân dưới sự hướng dẫn trực tiếp của PGS.TS Chu Hoàng Hà – Viện trưởng Viện Công nghệ Sinh học, 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 nhà trường.

Hà nội, ngày tháng 5 năm 2015

Học viên

Nguyễn Thị Hà

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành bản Luận văn này, ngoài sự cố gắng nỗ lực của bản thân, tôi đã nhận được những sự quan tâm giúp đỡ của rất nhiều cá nhân và tập thể.

Lời đầu tiên tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc của mình đến PGS.TS Chu Hoàng Hà – Viện trưởng Viện Công nghệ sinh học, người đã dành nhiều thời gian, tâm huyết, tận tình giúp đỡ và trực tiếp hướng dẫn tôi trong suốt quá trình thực hiện Luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự quan tâm, chỉ bảo của TS. Phạm Bích Ngọc, KS. Nguyễn Đình Trọng, ThS. Lê Thu Ngọc và đồng cảm ơn các cán bộ Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Cuối cùng tôi xin gửi tới thầy cô Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên, bạn bè và tập thể lớp cao học công nghệ sinh K6A lời cảm ơn cùng những tình cảm chân thành nhất vì những sự động viên giúp đỡ quý báu mà mọi người đã dành cho tôi trong suốt thời gian qua.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày tháng 5 năm 2015

Học viên

Nguyễn Thị Hà

MỤC LỤC

	Trang
Lời cam đoan.....	i
Lời cảm ơn.....	ii
Mục lục.....	iii
Danh mục các chữ viết tắt và ký hiệu.....	v
Danh mục bảng.....	vii
Danh mục hình.....	viii
MỞ ĐẦU.....	1
1. Tính cấp thiết của đề tài.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu.....	3
CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	4
1.1. Ảnh hưởng của một số điều kiện bất lợi của môi trường tới thực vật.....	4
1.1.1. Sự ảnh hưởng của nhiệt độ cao đến thực vật.....	4
1.1.2. Sự ảnh hưởng của hạn hán tới thực vật.....	5
1.1.3. Sự ảnh hưởng của đất nhiễm mặn tới thực vật.....	7
1.2. Cơ chế chống chịu của thực vật với các điều kiện bất lợi của môi trường.....	9
1.2.1. Hệ thống vector liên hợp.....	9
1.2.2. Vector nhị thể.....	10
1.3. Các gen sử dụng trong chọn lọc và chỉ thị.....	10
1.3.1. Gen kháng kháng sinh.....	10
1.3.2. Gen kháng chất diệt cỏ.....	11
1.3.3. Gen chọn lọc mannose.....	11
1.3.4. Các gen chỉ thị: GFP (green fluorescene protein), GUS (β -1,4-glucuronidase).....	12
1.4. Tổng quan nghiên cứu về vector chuyển gen mang tính an toàn sinh học.....	12
1.4.1. Sự cần thiết nghiên cứu vector chuyển gen mang tính an toàn sinh học.....	12
1.4.2. Các gen/hệ thống chọn lọc thân thiện.....	13
1.4.3. Sự loại bỏ các gen chỉ thị chọn lọc từ cây chuyển gen.....	16
1.5. Cơ sở khoa học trong sử dụng gen <i>codA</i> làm chỉ thị chọn lọc ở thực vật chuyển gen.....	19
1.5.1. Giới thiệu về gen <i>codA</i>	19
1.5.2. Các nghiên cứu chuyển gen <i>codA</i> nhằm tăng cường khả năng chống chịu ở thực vật.....	20
CHƯƠNG II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	23

2.1. Vật liệu nghiên cứu.....	23
2.1.1. Vật liệu thực vật.....	23
2.1.2. Các chủng vi khuẩn, vector và cặp môi sử dụng.....	23
2.1.3. Hóa chất, thiết bị.....	25
2.1.3.1. Hóa chất.....	25
2.1.3.2. Thiết bị và dụng cụ thí nghiệm.....	26
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	26
2.2.1. Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction).....	26
2.2.2. Phương pháp điện di DNA trên gel agarose.....	27
2.2.3. Phương pháp tinh sạch DNA từ gel agarose.....	28
2.2.4. Phương pháp xử lý ADN bằng enzyme hạn chế.....	28
2.2.5. Phản ứng nối ghép gen.....	29
2.2.6. Phương pháp biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến <i>E.coli</i>	29
2.2.7. Phương pháp tách chiết plasmid tái tổ hợp.....	30
2.2.8. Phương pháp biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến <i>A.tumefaciens</i> C58/PGV2260 bằng xung điện.....	31
2.2.9. Phương pháp tạo cây thuốc lá chuyển gen.....	32
2.2.10. Kiểm tra sự biểu hiện của gen chuyển ở mức độ phiên mã bằng kỹ thuật RT-PCR.....	33
2.2.11. Đánh giá khả năng chịu nhiệt của các dòng thuốc lá K326 chuyển gen <i>codA</i>	35
2.2.12. Sàng lọc khả năng chịu mặn của dòng thuốc lá chuyển gen <i>in vitro</i>	36
2.2.13. Phương pháp tính toán và xử lý số liệu.....	36
CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	37
3.1. Thiết kế vector chuyển gen pCAMBIA1301/HSP-codA mang gen <i>codA</i>	37
3.1.1. Thiết kế vector chuyển gen pCAMBIA1301/35S-codA mang gen <i>codA</i> hoạt động dưới sự điều khiển của promoter cơ định 35S.....	38
3.1.2. Thiết kế vector pCAMBIA1301/HSP-codA mang gen <i>codA</i> hoạt động dưới sự điều khiển của promoter HSP 18.2.....	39
3.1.3. Loại bỏ gen chọn lọc <i>hptII</i> mã hóa cho hygromycin phosphotransferase khỏi vector pCAMBIA1301/HSP-codA.....	41
3.1.4. Tạo chủng <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mang vector chuyển gen.....	42
3.2. Kết quả chuyển gen <i>codA</i> vào cây thuốc lá K326.....	44
3.2.1. Chuyển cấu trúc pCAMBIA1301/HSP-codA vào cây thuốc lá thông qua vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i>	44

3.2.2.Sàng lọc khả năng chịu nhiệt của dòng thuốc lá chuyển gen trong <i>in vitro</i>	45
3.2.3.Phân tích các dòng cây chuyển gen bằng kỹ thuật PCR.....	47
3.2.4. Sàng lọc khả năng chịu mặn của dòng thuốc lá chuyển gen trong <i>in vitro</i>	48
3.2.5. Phân tích cây thuốc lá chuyển gen <i>codA</i> bằng kỹ thuật RT-PCR	48
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	50
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	51

DANH MỤC BẢNG

Tên bảng	Trang
Bảng 1.4a. Một số chỉ thị chọn lọc tích cực an toàn có/không nguồn gốc từ thực vật.....	15-16
Bảng 1.4b. Một số hệ thống loại bỏ chỉ thị chọn lọc từ cây chuyển gen.....	17-18
Bảng 1.5. Một số loài cây trồng chuyển gen <i>codA</i> đã được chứng minh là có khả năng chống chịu tốt với điều kiện stress.....	21-22
Bảng 2. 1. Các cặp môi đặc hiệu cho gen <i>codA</i> và promoter HSP18.2.....	25
Bảng 2.2: Chu kì phản ứng PCR nhân gen <i>codA</i>	27
Bảng 2.3: Môi trường nuôi khuẩn.....	31
Bảng 2.4 : Môi trường nuôi và chọn lọc cây thuốc lá chuyển gen.....	32
Bảng 2.5: Thành phần phản ứng tổng hợp cDNA.....	33
Bảng 2.6: Thành phần phản ứng tổng hợp cDNA	33
Bảng 2.7: Thành phần phản ứng PCR nhân gen <i>actin</i> từ cDNA.....	34
Bảng 2.8: Thành phần phản ứng PCR nhân gen <i>codA</i> từ cDNA.....	35
Bảng 3.1: Kết quả chuyển gen <i>codA</i> vào thuốc lá giống K326	45
Bảng 3.2: Dòng thuốc lá chuyển gen <i>codA</i> ra rễ trên môi trường 200 mM NaCl.....	48

DANH MỤC HÌNH

Hình 1. 1. Sơ đồ cấu trúc Ti-plasmid của vi khuẩn <i>A. Tumefaciens</i>	8
Hình 1.2. Quy trình sử dụng manose làm chất chọn lọc.....	11
Hình 2.1: Vector pCAMBIA1301.....	24
Hình 2.2: Vector pBI121.....	24
Hình 3.1. Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen.....	37
Hình 3.2. Kết quả điện di sản phẩm cắt các vector pBI121/35S-codA (1) và pCAMBIA1301 (2) bằng cặp enzyme cắt hạn chế <i>Hind</i> III và <i>Eco</i> RI (A) và sản phẩm tinh sạch các đoạn gen(B).....	38
Hình 3.3. Kết quả điện di sản phẩm cắt kiểm tra vector tái tổ hợp pCAMBIA1301/35S-codA bằng cặp enzyme cắt hạn chế <i>Hind</i> III và <i>Eco</i> RI.....	39
Hình 3.4. Kết quả điện di sản phẩm tinh sạch các phân đoạn gen mong muốn sau khi xử lý các vector pBT/HSP và pCAMBIA1301/35S-codA bằng cặp enzyme hạn chế <i>Hind</i> III và <i>Xba</i> I. (2): vector pCAMBIA1301/35S-codA đã loại bỏ promoter 35S; (1) promoter HSP18.2.....	40
Hình 3.5. Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR sàng lọc các dòng khuẩn mang plasmid tái tổ hợp pCAMBIA1301/HSP-codA bằng cặp mồi đặc hiệu F/HSP- <i>Xba</i> I và R/HSP- <i>Hind</i> III.....	40
Hình 3.6. Kết quả điện di sản phẩm cắt kiểm tra vector tái tổ hợp pCAMBIA1301/HSP-codA bằng cặp enzyme cắt hạn chế <i>Hind</i> III và <i>Xba</i> I.....	41
Hình 3.7. Cắt loại bỏ gen <i>hpt</i> II khỏi vector pCAMBIA1301/HSP-codA bằng	

enzyme hạn chế <i>Xho</i> I.	42
Hình 3.8. Kết quả điện di kiểm tra vector pCAMBIA1301/HSP-codA trước (1) và sau (2) khi loại bỏ gen <i>hptII</i>	42
Hình 3.9. Khuẩn lạc <i>A. tumefaciens</i> biến nạp vector chuyển gen pCAMBIA/HSP-codA mọc trên môi trường LB bổ sung 50 mg/l kanamycin.....	43
Hình 3.10. Sản phẩm PCR nhân gen <i>codA</i> từ 3 dòng plasmid tách từ <i>A. tumefaciens</i>	43
Hình 3.11. Sơ đồ chuyển gen vào thuốc lá thông qua vi khuẩn <i>A.tumefaciens</i>	44
Hình 3.12. Mảnh lá chuyển gen <i>codA</i> tái sinh trên MT CT2 ở nhiệt độ 37°C sau 2 tuần.....	46
Hình 3.13. Cụm chồi tái sinh từ mảnh lá trên MT CT2 ở nhiệt độ 37°C sau 3 tuần.....	46
Hình 3.14. Chồi thuốc lá trên môi trường ra rễ ở nhiệt độ 37°C.....	47
Hình 3.15. Sản phẩm PCR nhân gen <i>codA</i> từ cây thuốc lá chuyển gen.....	47
Hình 3.16: Các dòng thuốc lá chuyển gen <i>codA</i> và không chuyển gen trên môi trường ra rễ có 200 mM NaCl.....	48
Hình 3.17: Sản phẩm RT-PCR từ mRNA của các dòng thuốc lá K326 chuyển gen <i>codA</i>	49

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT VÀ KÝ HIỆU

STT	KÝ HIỆU	CHỮ VIẾT TẮT
1	<i>A.globiformic</i>	<i>Arthrobacter globiformic</i>
2	<i>A.tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
3	<i>DNA</i>	<i>Acid Deoxiribonucleic</i>
4	<i>BHDA</i>	<i>Betain aldehycle dehydrogenase</i>
5	<i>BA</i>	<i>6-benzyl adenine</i>
6	<i>bp</i>	<i>Base pair</i>
7	<i>CaMV</i>	<i>Cailiflower Mosaic Virus</i>
8	<i>cDNA</i>	<i>Complementary DNA</i>
9	<i>Cefo</i>	<i>Cefotaxime</i>
10	<i>CMO</i>	<i>Choline monooxygenase</i>
11	<i>CODA</i>	<i>Choline oxidase</i>
12	<i>ĐC</i>	<i>Đối chứng</i>
13	<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
14	<i>EDTA</i>	<i>Ethylene Diamine Tetra acetic Acid</i>
15	<i>et al</i>	<i>Đồng tác giả</i>
16	<i>EtBr</i>	<i>Ethidium Bromid</i>
17	<i>GB</i>	<i>Glycine betaine</i>
18	<i>Genta</i>	<i>Gentamycine</i>
19	<i>GFP</i>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
20	<i>GUS</i>	β -1, 4-Glucuronidase
21	<i>HSF</i>	<i>Heat shock factor</i>
22	<i>HSPs</i>	<i>Heat shock proteins</i>
23	<i>Hyg</i>	<i>Hygromycine resistant</i>
24	<i>ISSR</i>	<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>
25	<i>Kana</i>	<i>Kanamycine</i>

26	<i>LB</i>	<i>Luria Bertani</i>
27	<i>M</i>	<i>Thang Marker chuẩn</i>
28	<i>MDA</i>	<i>Malondialdehyde</i>
29	<i>mM</i>	<i>Millimolar</i>
30	<i>MT</i>	<i>Môi trường</i>
31	<i>MS</i>	<i>Murashige and Skoog, 1962</i>
32	<i>MT-sHSP</i>	<i>Mitochondrial small Heat shock protein</i>
33	<i>MUG</i>	<i>4-methyl-umbelliferyl- β-D-glucoronide</i>
34	μ l	<i>Micro litte</i>
35	μ M	<i>Micromolar</i>
36	<i>NptII</i>	<i>Neomycin Phosphotransferases II</i>
37	<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
38	<i>QTL</i>	<i>Quantitative trait loci</i>
39	<i>RAPD</i>	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
40	<i>Rifa</i>	<i>Rifamycine</i>
41	<i>SOD</i>	<i>Superoxide dismutase</i>
42	<i>T-DNA</i>	<i>Transfer-DNA</i>
43	<i>TAE</i>	<i>Tris-acetate –EDTA</i>
44	<i>Ti-plasmid</i>	<i>Tumor-Inducing Plasmid</i>
45	<i>TP</i>	<i>Transit peptide</i>
46	<i>Vir</i>	<i>Virulence</i>
47	<i>WT</i>	<i>Dòng không chuyển gen</i>
48	<i>X-Gluc</i>	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D-glucoronide</i>
49	<i>NAA</i>	<i>1-Naphthaleneacetic acid</i>

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Cây trồng biến đổi gen (Genetically Modified Crop - GMC) là loại cây trồng được lai tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật công nghệ sinh học hiện đại, hay còn gọi là kỹ thuật di truyền, công nghệ gen hay công nghệ DNA tái tổ hợp, chuyển một hoặc một số gen chọn lọc để tạo ra cây trồng mang tính trạng mong muốn. Về mặt bản chất, các giống lai từ trước đến nay (hay còn gọi là giống truyền thống) đều là kết quả của quá trình cải biến di truyền. Điểm khác biệt duy nhất giữa giống lai truyền thống và giống chuyển gen là gen (DNA) được chọn lọc một cách chính xác dựa trên khoa học công nghệ hiện đại, chuyển vào giống cây trồng để đem lại một tính trạng mong muốn một cách có kiểm soát.

Việc sử dụng các gen có khả năng chọn lọc đi kèm với gen đích trong kỹ thuật chuyển gen là rất cần thiết nhằm tìm ra được một lượng ít các tế bào mang gen cần chuyển trong vô số các tế bào không mang gen chuyển. Thông thường các gen chọn lọc được dùng là các gen kháng lại kháng sinh như hygromycin (*hpt*) và kanamycin (*nptII*) hoặc kháng lại các chất diệt cỏ như phosphinothricin (*bar*) và chlorosulfuron (*als*).

Mặc dù, cho đến hiện nay chưa có thí nghiệm nào đưa ra được bằng chứng rằng các gen chọn lọc kháng lại các chất kháng sinh hay thuốc diệt cỏ đang sử dụng có nguy cơ gây hại đến sức khỏe người hoặc vật nuôi nhưng vẫn có những lo ngại về độ an toàn với sức khỏe con người và ảnh hưởng đến đa dạng sinh học. Vì vậy, trong những năm gần đây đã có những nghiên cứu liên quan đến việc sử dụng các gen chọn lọc thay thế, không ảnh hưởng đến hoạt động sinh học của tế bào thực vật hay còn gọi là chọn lọc tích cực (positive selection). Trong trường hợp này, các tế bào chuyển gen sẽ sử dụng một số chất không độc hại mà trong điều kiện bình thường không thể sử dụng. Việc thay thế các gen chọn lọc này bằng những gen có tính chất tích cực, thân thiện với môi trường cũng đang là vấn đề được quan tâm trong các nghiên cứu chuyển gen vào thực vật.

Glycine betaine (GB) và proline được biết đến là một trong những chất đóng vai trò quan trọng trong quá trình điều chỉnh áp suất thẩm thấu nội bào khi thực vật sống trong các điều kiện bất lợi như khô, hạn, lạnh.... Trong tế bào thực vật,

glycine betaine được tổng hợp từ choline thông qua hai phản ứng liên tiếp được xúc tác bởi choline monooxygenase (CMO) và betain aldehyde dehydrogenase (BADH) [54].

Từ những hiểu biết về con đường sinh tổng hợp glycine betaine và proline ở sinh vật, cùng với sự phát triển mạnh mẽ của lĩnh vực công nghệ gen, đặc biệt là kỹ thuật tạo cây trồng biến đổi gen. Các nhà khoa học đã phân lập được các gen: *codA* (COD-Choline oxidase), *COX*, *BADH*, *betA* (CDH), *CMO*, *GSMT* (glycine Sarcosine methylntransferase), *SDMT* (Sarcosine dimethylglucine methyltransferase), *P5CS* (Pyrroline -5-Carboxylate Synthetase) và *P5CR* (Pyrroline -5-Carboxylate) từ nhiều nguồn khác nhau, mã hóa cho các enzyme tham gia vào quá trình sinh tổng hợp GB và proline. Các gen này đã được thiết kế với các promoter biểu hiện đặc hiệu, mạnh và chuyển thành công vào nhiều loài cây trồng, các loài cây trồng biến đổi gen tăng cường khả năng chống chịu điều kiện bất lợi của môi trường. Các kết quả đã được công bố cho thấy: các gen *codA* (COD), *COX*, *BADH*, *betA* (CDH), *CMO*, *GSMT*, *SDMT*, *P5CS* và *P5CR* được chuyển vào các đối tượng cây *Arabidopsis thaliana*, Cây thuốc lá, cây lúa (*Oryza sativa*), cây cà chua, cây hồng, cây bạch đàn, cây cải bẹ (*Brassica juncea*), bông, ngô ... giúp cho cây tăng cường khả năng chịu lạnh, nhiệt độ cao, chịu mặn và băng giá *codA* là gen mã hóa cho choline oxidase là enzyme tham gia tổng hợp GB. Trong chuyển gen, các nhà khoa học đã sử dụng gen *codA* (COD) cho thấy cây chuyển gen có khả năng phát triển bình thường trong điều kiện bất lợi như nóng, mặn, khô hạn xảy ra.

Với lý do trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài “**Nghiên cứu sử dụng gen *codA* làm chỉ thị chọn lọc tạo vector chuyển gen mang tính an toàn sinh học**”.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Mục tiêu chung: Phát triển vector chuyển gen mới có gen chọn lọc là *codA* phục vụ việc nâng cao hiệu quả chuyển gen và tính an toàn của cây chuyển gen.

Mục tiêu cụ thể:

- Tạo được vector chuyển gen thực vật có gen chọn lọc là gen *codA*.
- Đánh giá được khả năng chọn lọc và hiệu quả tạo cây chuyển gen sử dụng vector chuyển gen mới tạo được có gen chọn lọc là gen *codA*.

- Xây dựng được quy trình tạo cây chuyển gen sử dụng vector chuyển gen và gen chọn lọc *codA* đối với mô hình cây thuốc lá

3. Nội dung nghiên cứu

(1) Thiết kế vector chuyển gen mang gen *codA* thay thế cho gen chọn lọc (kháng kháng sinh).

(2) Thử nghiệm tạo và đánh giá khả năng tạo cây chuyển gen thông qua chọn lọc bằng điều kiện chống chịu nhiệt độ cao, chịu mặn.

(3) Xây dựng quy trình chọn lọc và tạo cây chuyển gen sử dụng vector chuyển gen và gen chọn lọc *codA* trên mô hình cây thuốc lá.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Cây trồng biến đổi gen (Genetically Modified Crop - GMC) là loại cây trồng được lai tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật công nghệ sinh học hiện đại, hay còn gọi là kỹ thuật di truyền, công nghệ gen hay công nghệ DNA tái tổ hợp, để chuyển một hoặc một số gen chọn lọc để tạo ra cây trồng mang tính trạng mong muốn. Về mặt bản chất, các giống lai từ trước đến nay (hay còn gọi là giống truyền thống) đều là kết quả của quá trình cải biến di truyền. Điểm khác biệt duy nhất giữa giống lai truyền thống và giống chuyển gen là gen (DNA) được chọn lọc một cách chính xác dựa trên khoa học công nghệ hiện đại, chuyển vào giống cây trồng để đem lại một tính trạng mong muốn một cách có kiểm soát.

1.1. Cây trồng biến đổi gen và một số phương pháp sử dụng trong chuyển gen ở thực vật

Cây trồng biến đổi gen được tạo ra trong phòng thí nghiệm bằng cách thay đổi cấu trúc gen của chúng. Người ta dùng kỹ thuật di truyền để thêm vào một hoặc nhiều gen vào trong bộ gen của cây trồng. Hiện nay có nhiều phương pháp chuyển gen ở thực vật đã được nghiên cứu và thành công trên nhiều đối tượng giống cây trồng như: chuyển gen thông qua *A.tumefaciens*, chuyển gen trực tiếp bằng hóa chất, xung điện, súng bắn gen, chuyển gen bằng vi tiêm, chuyển gen qua ống phân, chuyển gen bằng ủ dung dịch hạt khô với dung dịch DNA... Hai phương pháp chuyển gen thành công nhất là chuyển gen trực tiếp bằng súng bắn gen và chuyển gen gián tiếp thông qua vi khuẩn *A.tumefaciens*.

1.1.1. Chuyển gen trực tiếp bằng súng bắn gen

Chuyển gen trực tiếp bằng súng bắn gen là phương pháp đưa các gen ngoại lai vào tế bào chủ, là kỹ thuật sử dụng các viên đạn là vàng (hoặc Vonfam) kích thước hiển vi (0.5-5 μ m) có tỷ trọng cao để đạt gia tốc cao xuyên qua vỏ và màng tế bào, đưa lớp DNA bọc ngoài tiếp cận với bộ máy di truyền của tế bào. Phương pháp chuyển gen bằng súng bắn gen được áp dụng với những đối tượng mà việc chuyển gen bằng *A.tumefaciens* khó thực hiện được (do không miễn cảm với *A.tumefaciens*) hay khả năng tái sinh kém (khi chuyển gen vào tế bào trần). Phương pháp này đã được áp dụng thành công cho rất nhiều loại cây trồng, đặc biệt là thực vật một lá mầm như lúa mì hoặc ngô.

Phương pháp chuyển gen bằng súng bắn gen được sử dụng rộng rãi sau phương pháp chuyển gen qua vi khuẩn *A.tumefaciens* với các ưu điểm là có thể áp dụng với hầu hết các loại mô và tế bào, chuyển DNA ngoại lai vào tế bào nhanh, dễ sử dụng với quy trình đơn giản, một số lượng lớn mẫu có thể được xử lý trong thời gian ngắn, các vectơ được thiết kế đơn giản, không đòi hỏi các trình tự DNA cho đoạn T-DNA như chuyển gen bằng *A.tumefaciens*, cần một lượng nhỏ plasmid DNA, biểu hiện gen tạm thời có thể được quan sát sau vài ngày. Tuy nhiên cũng có nhược điểm như nhiều bản sao vào tế bào cùng một lúc, gây khó khăn cho việc phân tích chọn lọc về sau này, hiệu quả chuyển gen thấp nhưng chi phí lại cao [27]

1.1.2. Phương pháp chuyển gen bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Phương pháp chuyển gen thông qua *A.tumefaciens* được ứng dụng rộng rãi để chuyển một hay nhiều gen vào cây trồng nhờ những đặc tính ưu việt của hệ thống chuyển gen này: giúp tạo cây trồng có tính bền vững cao; có thể chuyển một đoạn DNA có kích thước tương đối lớn vào thực vật mà không cần thiết bị cũng như hệ thống nuôi cấy phức tạp; số bản copy của gen chuyển trong cây chuyển gen ít, tạo thuận lợi cho việc phân tích cũng như nghiên cứu sự biểu hiện của gen mới trong cây chuyển gen.

Phương pháp chuyển gen bằng *A.tumefaciens* thường được dùng cho các loại cây hai lá mầm vì *A.tumefaciens* mẫn cảm với các loại cây này. Tuy nhiên, ngày nay người ta đã tìm ra các chủng *A.tumefaciens* mẫn cảm với cây một lá mầm trong đó có ngô, lúa và các cây chuyển gen hữu thụ đã nhận được. Chuyển gen bằng *A.tumefaciens* đã được nghiên cứu thành công bởi nhiều tác giả, các yếu tố ảnh hưởng tới hiệu quả chuyển gen đã được tối ưu hoá như chủng *A.tumefaciens*, kiểu gen của từng loài, giống, thành phần môi trường nuôi cấy, nhiệt độ...). Một nghiên cứu ở đậu tương đã kết hợp hai phương pháp dùng súng bắn gen và *A.tumefaciens*, trước khi lây nhiễm *A.tumefaciens* mô được làm bị thương bằng cách “bắn” đạn không mang gen. Phương pháp này có thể cho hiệu quả lây nhiễm cao, bởi sau khi bị “bắn” mô tạo phản ứng đối với vết thương, tạo điều kiện cho lây nhiễm bằng *A.tumefaciens*.

A.tumefaciens là loài vi khuẩn đất, có khả năng chuyển một đoạn DNA từ Ti plasmid (tumor-inducing plasmid) vào tế bào thực vật. Ti plasmid - một phân tử DNA mạch vòng, sợi kép có trọng lượng phân tử bằng 3-5% so với trọng lượng

phân tử của nhiễm sắc thể vi khuẩn. Ti plasmid có kích thước khoảng 200 kb, trong tế bào chúng tồn tại như một đơn vị sao chép độc lập gồm 4 vùng tương đồng: A, B, C và D. Vùng A luôn được truyền sang tế bào thực vật nên có tên là T-DNA. Tại đây có hai hệ gen: hệ gen gây khối u onc (oncogenic) gồm các gen khi hoạt động sẽ sản sinh một lượng lớn các chất kích thích sinh trưởng như auxin, cytokinin tạo thành khối u ở thực vật; hệ gen mã hoá một số enzym điều khiển quá trình tổng hợp các dẫn xuất của các axit amin hay đường, gọi là opin. Vùng B có liên quan đến sự tái bản. Vùng C liên quan đến sự tiếp hợp. Vùng D chứa các gen vir, giữ vai trò quan trọng trong việc chuyển T-DNA vào hệ gen nhân của tế bào thực vật.

Các vector dùng trong chuyển gen thông qua *A.tumefaciens* là: vector liên hợp và vector nhũ thể, hai loại vector này đang được sử dụng rất có hiệu quả.

Đoạn T- DNA muốn được chuyển, trước tiên nó phải được hoạt hoá bởi hoạt động của các gen vir. Hiện tượng này xảy ra khi *A.tumefaciens* bắt đầu tiếp xúc với hợp chất chứa phenol được tiết ra từ vết thương của cây hoặc từ tế bào nuôi cấy hay protoplast, đầu tiên là sự hoạt động của các sản phẩm được tạo ra từ gen virA. Protein virA nằm ở màng trong của tế bào *A.tumefaciens*, đóng vai trò như một chất thụ cảm đối với acetosyringon có trong môi trường. Tín hiệu này sẽ được truyền dẫn qua sự hoạt hoá gen virG. Protein virG sau đó lại gắn vào gen chỉ huy nằm sát trình tự khởi động thuộc các gen vir khác nhau. Bằng cách như vậy, protein của gen virG đã được hoạt hoá làm tăng quá trình hoạt hoá của chính nó, đồng thời làm giảm hoạt động của các operon B, C, D và E. Trong tiến trình chuyển T-DNA, ở giai đoạn đầu xuất hiện các vết cắt Ti-plasmid tại hai trật tự biên, ở vị trí giữa bazơ nitơ thứ ba và thứ tư của mạch đơn nằm phía dưới. Từ đó một mạch đơn T-DNA được giải phóng ra khỏi Ti-plasmid và thay thế vào đó là một mạch đơn mới được tổng hợp theo chiều 5' – 3', bắt đầu từ chỗ đứt của trật tự biên phải. Điều này giải thích tại sao đầu biên phải cần thiết cho quá trình chuyển T-DNA vào thực vật. Trong quá trình di chuyển, sợi đơn DNA phải chui qua rất nhiều màng trước khi vào được đến nhân tế bào thực vật. Vì vậy, để giữ được tình trạng nguyên vẹn thì T- DNA sợi đơn được gắn với virE. Sản phẩm của gen virB nằm trên màng tế bào vi khuẩn có nhiệm vụ chuyển trực tiếp DNA sợi đơn sang tế bào thực vật. Sau khi T-DNA chui được qua màng tế bào, chúng đi thẳng vào nhân và kết hợp với DNA nhân thực vật ở những vị trí ngẫu nhiên. Tại đó các gen trên T- DNA dưới sự điều

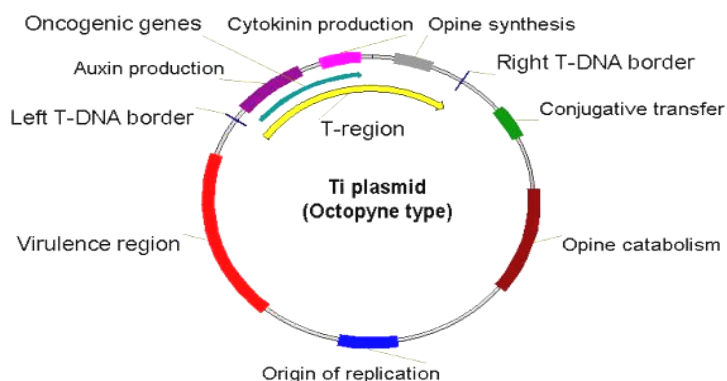
khẩn của gen thực vật bắt đầu sản sinh ra auxin, cytokinin, opine dẫn đến sự hình thành khối u trên cơ thể thực vật [3].

Phương pháp chuyển gen bằng vi khuẩn *A.tumefaciens* thường tỏ ra hữu hiệu hơn do ít gây ra những hư hỏng nghiêm trọng đối với mô tế bào. Để chuyển gen bằng *A.tumefaciens* chúng ta phải sử dụng các hệ thống vector sử dụng trong chuyển gen sẽ được trình bày trong các phần sau.

1.1.3. Đặc điểm Ti plasmid của *Agrobacterium*

Vào đầu thế kỷ 20, người ta đã biết đến vi khuẩn *Agrobacterium* là nhóm vi khuẩn gram âm sống trong đất, có khả năng gây ra các triệu chứng bệnh ở thực vật khi xâm nhiễm qua vết thương. Có rất nhiều cách phân loại *Agrobacterium*, và phương pháp phổ biến nhất là dựa vào triệu chứng gây bệnh và loại cây chủ. Chi *Agrobacterium* có các loài chính sau: *A. tumefaciens*: gây bệnh khối u hình chóp ở thân; *A.rhizogenes*: gây bệnh rễ tơ (hairy root); *A.rubi*: gây ra khối u ở các loài dâu đất, mâm xôi; *A.radiobacter*: được coi là loài không gây độc vì chúng sản sinh kháng sinh đặc trưng (agrocin 84) ngăn cản tác hại của các loài *Agrobacterium* kể trên.

Trong đó, chủng *A.tumefaciens* và *A.rhizogenes* được sử dụng phổ biến trong chuyển gen vào thực vật. Theo cơ chế tự nhiên, hai loài này có khả năng xâm nhiễm qua vết thương của hầu hết các loài thực vật hai lá mầm và một số ít các loài thực vật một lá mầm, kết quả là gây ra những khối u hay hình thành rễ tơ. Về sau, người ta xác định được rằng trong tế bào của các dạng hoang dại *A.tumefaciens* có chứa một loại plasmid đặc biệt gọi là Ti-plasmid (Tumor-inducing plasmid), còn *A.rhizogenes* chứa plasmid cảm ứng tạo rễ tơ gọi là Ri-plasmid (Root-inducing plasmid). Ti và Ri plasmid đều chứa một đoạn DNA có thể chuyển sang tế bào chủ theo cơ chế tự nhiên (T-DNA: Transferred-DNA). Do đó, *Agrobacterium* là một hệ thống chuyển gen tự nhiên. Bằng cách cải biến cắt bỏ những gen gây khối u và rễ tơ, cài xen vào vùng T-DNA những gen đích, gen này sẽ được chuyển và gắn vào hệ gen tế bào thực vật dễ dàng. Những phát hiện này có ý nghĩa rất quan trọng cho sự ra đời của phương pháp chuyển gen vào thực vật nhờ vi khuẩn *Agrobacterium* [66].



Hình 1.1. Sơ đồ cấu trúc Ti-plasmid của vi khuẩn *A. tumefaciens*

Phần lớn các loại Ti-Plasmid có kích thước khoảng 200-800 kb và gồm bốn vùng A, B, C, D. Trong đó, vùng A luôn luôn được truyền sang tế bào thực vật nên có tên là T-DNA (Transferred DNA). Tại đây mang 2 hệ gen: một hệ gen gây khối u cho thực vật có chứa ít nhất 3 gen tổng hợp các phytohormone là auxin và cytokinin, do đó, có liên quan đến việc sinh ra và duy trì sự phân chia tế bào liên tục mà không phụ thuộc vào sự sinh trưởng của cây; hệ gen thứ hai mã hóa cho một số enzyme điều khiển tổng hợp các dẫn xuất của amino acid hay đường gọi là opine. Vùng B là vùng tái bản có mang điểm khởi đầu sao chép (*oriT*). Vùng C liên quan đến sự tiếp hợp. Vùng D có tên gọi là vùng độc (virulence region) có chứa các gen *vir*, giữ vai trò quan trọng trong việc chuyển T-DNA vào hệ gen nhân của tế bào thực vật. Ngoài ra, Ti-plasmid còn chứa các gen nằm ngoài vùng T-DNA mã hóa cho các enzyme phân giải opine để làm nguồn dinh dưỡng carbon và nitơ cho vi khuẩn.

Vùng T-DNA có kích thước khoảng 10-20 kb, nằm kẹp giữa 2 trật tự 25 bp lặp lại không hoàn chỉnh gọi là biên trái (left border-LB) và biên phải (right border-RB). Toàn bộ giới hạn giữa hai biên này đều được chuyển sang tế bào thực vật. LB và RB là những yếu tố cần thiết để định hướng cho sự chuyển DNA. Sự mất đi 6bp đầu tiên hoặc 10 bp cuối cùng trong số 25 bp đều ngăn cản sự chuyển của T-DNA. Quá trình chuyển T-DNA bắt đầu từ vị trí RB và kết thúc ở vị trí LB. Sự định hướng này rất quan trọng nếu thiếu yếu tố này việc chuyển gen sẽ không xảy ra hoặc không hiệu quả. Trong các gen được mã hóa ở vùng T-DNA có 3 gen rất quan trọng trong việc phát triển khối u: một gen mã hóa cho AMP-isopentenyl

transferase và 2 gen mã hóa cho enzyme tham gia vào hoạt động sinh tổng hợp auxin (tryptophane-2 mono oxygenase và acetamid hydrolase). Sự hoạt động của các gen này tạo điều kiện cho sự phát triển của tế bào thực vật có sự phụ thuộc vào auxin và cytokinin. Đặc điểm này được sử dụng để chọn lọc các tế bào được biến nạp từ trong phần lớn các tế bào không được biến nạp. Cần lưu ý là, không một gen nào trong vùng cần thiết cho việc chuyển của T-DNA. Việc chuyển đi vùng này mang tính thụ động. Tuy nhiên, T-DNA trong các khối u thực vật thường có kích thước ổn định như trong Ti-plasmid. Vì thế, có thể coi mỗi T-DNA là một đơn vị được gắn vào hệ gen thực vật mà không cần có sự biến đổi nào. Điều này có ý nghĩa rất quan trọng trong việc ứng dụng tạo cây biến đổi gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium*. Đó là với cấu trúc gen mục tiêu được thiết kế trước khi chuyển vào tế bào thực vật thì cấu trúc gen đó được giữ nguyên vẹn.

Hoạt động của vùng *vir* đóng vai trò quan trọng cho việc chuyển T-DNA sang tế bào thực vật. Vùng này có kích thước khoảng 40 kb và bao gồm 6 operon: các vir A, B, D và G là hoàn toàn cần thiết cho việc tạo độc tính; còn vir C và E liên quan đến việc tạo thành khối u. Trừ virA và G các operon khác đều là cistron. Nói chung, gen virA biểu hiện ở mọi điều kiện; gen virC biểu hiện ở khắp các tế bào sinh dưỡng nhưng biểu hiện mạnh ở dịch chiết từ các mô bị thương tổn. Hoạt động của các operon này có liên quan chặt chẽ đến sự có mặt của các hợp chất phenol được tiết ra từ các vết thương tổn của cây. Từ vết thương cây thuốc lá người ta đã tinh chế và xác định các hợp chất này là acetosyringone và hydroxy acetosyringone. Chất này vừa có tác dụng làm lành vết thương vừa có tác dụng dẫn dụ vi khuẩn xâm nhập, lại có vai trò như một chất kích hoạt vùng gen vir thuộc Ti-plasmid kích thích cho sự cắt đoạn T-ADN (tại vùng biên trái và biên phải) để gắn vào genome thực vật.

1.2. Các hệ thống vector sử dụng trong chuyển gen ở thực vật

1.2.1. Hệ thống vector liên hợp

Hệ thống vector liên hợp là kết quả của sự liên hợp hai loại plasmid: Ti-plasmid đã loại trừ vùng gen gây khối u và gen tạo các hợp chất opine nhưng vẫn giữ lại vùng vir và vùng bờ trái, bờ phải. Thay vào những gen bị cắt bỏ là đoạn tương đồng với một đoạn trên plasmid thứ hai (plasmid trung gian) để phục vụ cho việc liên hợp hai loại plasmid. Plasmid trung gian là một plasmid tách dòng từ vi

khuẩn *E.coli* và có thể tái sinh được ở *Agrobacterium*. Plasmid này có chứa vùng gắn gen cần chuyển nạp, các gen chỉ thị phục vụ cho việc chọn lọc và có mặt đoạn tương đồng. Khi cho tương tác hai loại plasmid này với nhau chúng sẽ liên hợp qua trao đổi chéo giữa hai đoạn tương đồng và hình thành vector liên hợp. Thực chất vector liên hợp là một loại vector lai có chỗ cho lai cần chuyển đi nhờ vào tế bào thực vật [2]

1.2.2. Vector nhị thể

Việc sử dụng trực tiếp Ti-plasmid của *A.tumefaciens* chuyển gen gặp khó khăn do nó có kích thước lớn. Mặt khác, Ti-plasmid chứa các gen gây khối u gây bất lợi cho thực vật- cản trở quá trình sinh trưởng và phát triển bình thường ở thực vật. Các enzyme giới hạn có thể cắt DNA của Ti-plasmid ở nhiều chỗ khác nhau. Trong khi đó công nghệ gen lại cần những vị trí cắt duy nhất cho hoạt động của một số enzym giới hạn [1]. Với các lí do trên đây, các nhà khoa học đã cải tiến Ti-plasmid thành một hệ vector nhị thể gồm có vector chuyển gen (Ti-plasmid tái tổ hợp) và vector hỗ trợ (helper T-plasmid).

❖ Vector chuyển gen có cấu trúc từ Ti-plasmid với đoạn DNA được cắt bỏ hết các gen không cần thiết như gen onc và gen tổng hợp opine ở giữa hai trình tự LB và RB, gắn thêm một số thành phần tạo cấu trúc mới gồm: Các replicon để DNA plasmid có thể vừa tự nhân bản trong cả *E.coli* và *A. tumefaciens*; các gen chọn lọc, gen chỉ thị và vùng có chứa nhiều điểm cắt của các enzyme giới hạn nằm ở hai trình tự LB và RB để chèn gen mong muốn cần chuyển.

❖ Vector hỗ trợ có cấu trúc gồm các gen vir được tách và được đưa vào chung một plasmid đảm nhiệm chức năng vận chuyển gen vào tế bào thực vật. Plasmid này được cải tiến loại bỏ gen kích thích tế bào thực vật phát triển khối u, nhưng vẫn duy trì khả năng xâm nhập vào tế bào thực vật. Hai cấu trúc này cùng được đưa vào *A.tumefaciens*, khi các gen trên vector hỗ trợ hoạt động thì các sản phẩm của nó sẽ tác động tới đoạn T-DNA trên vector chuyển gen dẫn đến sự chuyển đoạn T-DNA sang tế bào thực vật.

1.3. Các gen sử dụng trong chọn lọc và chỉ thị

Các gen chọn lọc thường được sử dụng trong công nghệ chuyển gen thực vật thường là các gen tổng hợp các protein giúp phân biệt các tế bào đã được chuyển

gen và các tế bào không được chuyển gen (gen chọn lọc), hoặc ghi nhận sự hoạt động của gen chuyển (gen chỉ thị).

1.3.1. Gen kháng kháng sinh

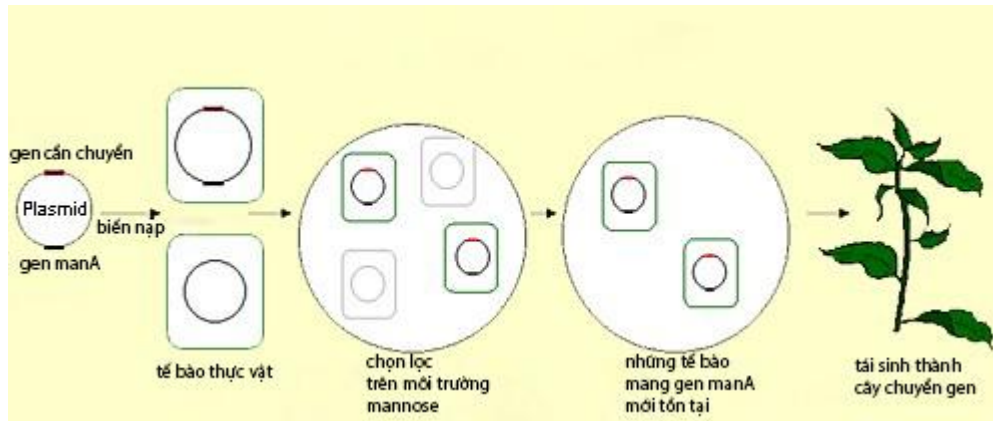
Các gen kháng kháng sinh thường sử dụng trong kỹ thuật chuyển gen như gen *nptII*(*neomycin phosphotransferase*) kháng kanamycine, gen *hpt*(*hygromycin phosphotransferase*) kháng hygromycin, gen *streptomycin phosphotransferase* kháng streptomycin

1.3.2. Gen kháng chất diệt cỏ

Gen *bar* là tên gọi của gen mã hóa cho enzyme phosphinothricin acetyltransferase (PAT), có tác dụng làm mất độc tính của phosphinothricin (PPT), là hoạt chất chính của thuốc trừ cỏ như Bialaphos và Basta. Gen *bar* được tạo dòng đầu tiên từ một dòng vi khuẩn *Streptomyces hygroscopicus*. Phương pháp đơn giản nhất để kiểm tra sự có mặt của gen *bar* là phương pháp trực tiếp. Mô, tế bào hoặc cây chuyển gen được đặt trên môi trường có các nồng độ phosphinothricin khác nhau (hoặc các thuốc trừ cỏ tương ứng) và so sánh sinh trưởng của mô, tế bào hoặc cây đối chứng đặt trên cùng môi trường.

1.3.3. Gen chọn lọc mannose

Một trong những gen chọn lọc tích cực được sử dụng nhiều là gen mã hóa biến dưỡng đường manose, là một ví dụ điển hình trong việc sử dụng thành công chất chọn lọc thay thế các kháng sinh và chất diệt cỏ trong chuyển gen (hình 1.2) - Gen *manA* được tách từ *Escherichia coli* [45]. Gen *manA* mã hóa cho enzym phosphomannose isomerase (PMI) sẽ biến đổi mannose-6-phosphate thành fructose-6-phosphate có thể sử dụng như là chất dinh dưỡng của tế bào. Vì thế các tế bào mang gen chuyển sẽ phát triển được trên môi trường có đường manose thay vì sacrose trong điều kiện bình thường. Đối với các tế bào không chuyển gen, bản thân đường mannose không gây độc, nhưng khi bị phosphoryl hóa bởi hexokinase thành mannose-6-phosphate dẫn đến các tế bào không thể phát triển được.



Hình 1.2. Quy trình sử dụng manose làm chất chọn lọc

1.3.4. Các gen chỉ thị: GFP (green fluorescene protein), GUS (β -1,4-glucuronidase)

Gen tổng hợp GFP được phát hiện và tách từ loài sứa *Aequorea victoria*. Protein GFP rất dễ phát hiện, chỉ cần quan sát dưới kính hiển vi phát huỳnh quang, máy đếm tế bào, máy quang phổ đo huỳnh quang. Protein có tính ổn định cao, tồn tại lâu, không cần co-enzym như các hệ thống phát màu, phát ánh sáng hay phát huỳnh quang khác, ít xảy ra dương tính giả, độ chính xác khá cao, không phá hủy tế bào.

Gen *gus A* mã hóa cho sinh tổng hợp enzyme β -glucuronidase. β -glucuronidase là một hydrolase xúc tác cho sự phân giải các β -glucuronide, sản phẩm phân giải có màu xanh chàm đặc trưng, dễ nhận biết. β -glucuronide thường dùng nhất trong phản ứng để nhận biết sự tồn tại của gen *gus A* là X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide). Dung dịch X-Gluc không màu dưới tác động của enzyme β -glucuronidase sẽ chuyển sang màu xanh chàm.

1.4. Tổng quan nghiên cứu về vector chuyển gen mang tính an toàn sinh học

1.4.1. Sự cần thiết nghiên cứu vector chuyển gen mang tính an toàn sinh học

Cây trồng chuyển gen là sự biến đổi vật chất di truyền, tiếp nhận thêm những gen mới, kết quả là xuất hiện những tính trạng mới dưới sự tác động của môi trường. Quá trình biến đổi vật chất di truyền (thêm gen mới) nhờ vào công nghệ chuyển gen, nếu so sánh quá trình này với quá trình đột biến trong tự nhiên về bản

chất thì hai quá trình là một, bởi vì quá trình tiến hóa của sinh vật đều phải trông chờ vào quá trình biến đổi vật chất di truyền, trong đó đột biến đóng vai trò quan trọng. Dưới tác động của các nhân tố gây đột biến, vật chất di truyền được biến đổi theo hai hướng: thêm đoạn hay bớt đoạn. Như vậy, quá trình thêm đoạn nhờ chuyển gen cũng tương tự như quá trình thêm đoạn DNA trong đột biến tự nhiên.

Tuy nhiên, hai quá trình này có nhiều điểm khác nhau: Nếu quá trình chọn lọc tự nhiên chỉ giữ lại những biến dị có lợi cho quá trình tiến hóa của loài, thì trong kỹ thuật chuyển gen cây trồng chỉ giữ lại tính trạng đã được định hướng trước, có lợi về kinh tế, không đóng góp gì cho quá trình tiến hóa của loài. Đây là điểm khác biệt căn bản nhất giữa đột biến tự nhiên và "đột biến" nhờ kỹ thuật chuyển gen. Sản phẩm của đột biến tự nhiên là tính trạng có lợi cho tiến hóa, còn sản phẩm của quá trình chuyển gen là các tính trạng có lợi cho con người, đây là ưu điểm nổi bật nhất của công nghệ chuyển gen.

Việc sử dụng các gen có khả năng chọn lọc đi kèm với gen đích trong kỹ thuật chuyển gen là rất cần thiết nhằm tìm ra được một lượng ít các tế bào chuyển gen trong vô số các tế bào không mang gen chuyển. Thông thường các gen chọn lọc được dùng là các gen kháng lại kháng sinh như hygromycin (*hpt*) và kanamycin (*nptII*) hoặc kháng lại các chất diệt cỏ như phosphinothricin (*bar*) và chlorosulfuron (*als*). Các chất này được gọi là các chất chọn lọc và có tác dụng diệt các tế bào không mang các gen kháng lại nó nhưng không làm ảnh hưởng đến các tế bào có mang gen chuyển. Trong thực tế những gen này sẽ không cần thiết đối với cây đã trưởng thành và đặc biệt đối với cây đã trồng ngoài cánh đồng. Việc có mặt của các gen chọn lọc này trong cây trồng chuyển gen đã gây nên những lo lắng trong công chúng về mặt sức khỏe của con người sử dụng và môi trường. Mặc dù, cho đến hiện nay chưa có thí nghiệm nào đưa ra được bằng chứng rằng các gen chọn lọc kháng lại các chất kháng sinh hay thuốc diệt cỏ đang sử dụng có nguy cơ gây hại đến sức khỏe người hoặc vật nuôi. Tuy vậy những lo ngại trên, thực tế đã làm chậm quá trình sử dụng nguồn lợi từ cây chuyển gen, nhưng vẫn có những lo lắng về độ an toàn với sức khỏe con người và ảnh hưởng đến đa dạng sinh vật.

Vì thế đã có nhiều nghiên cứu được tiến hành theo hướng phát triển các phương pháp chuyển gen không sử dụng gen chọn lọc hoặc loại bỏ các gen chọn lọc. Bên cạnh việc giảm bớt những lo lắng của công chúng, việc vắng mặt các gen

chọn lọc trong cây chuyển gen đồng thời giảm chi phí trong việc phát triển cây chuyển gen và thời gian cần thiết để đánh giá về an toàn và vì thế sẽ thúc đẩy việc thương mại hóa các sản phẩm chuyển gen. Việc tạo ra cây chuyển gen không mang gen chọn lọc còn tạo cơ hội cho việc chuyển nhiều gen liên quan đến những tính trạng phức tạp như chống chịu với nhiều loại bệnh và các tác nhân bất lợi của môi trường.

1.4.2. Các gen/hệ thống chọn lọc thân thiện

Trong công nghệ chuyển gen ở thực vật, các gen chỉ thị chọn lọc đóng vai trò hết sức quan trọng cho sự chọn lọc nhanh cây chuyển gen từ những mô, tế bào không chuyển gen. Các gen chỉ thị chọn lọc mã hoá cho các protein liên quan đến sự chống chịu các tác nhân chọn lọc như kháng sinh/thuốc diệt cỏ. Sau khi chuyển gen, dưới sự có mặt của các tác nhân chọn lọc, các tế bào không mang gen chuyển có thể bị chết. Các gen chỉ thị chọn lọc được phân chia thành hai loại: Các gen chỉ thị chọn lọc tích cực và không tích cực.

Phương thức chọn lọc tích cực là chọn lọc các tế bào chuyển gen có sinh trưởng và phát triển mạnh hơn so với các tế bào không chuyển gen. Các chỉ thị chọn lọc tích cực chia thành 2 nhóm nhỏ là chọn lọc tích cực trên môi trường bổ sung cơ chất và không bổ sung vào cơ chất. Các chỉ thị chọn lọc phụ thuộc vào khả năng chống chịu của tế bào chuyển gen trên môi trường bổ sung cơ chất như các chất trao đổi chất trung gian, kháng sinh, thuốc diệt cỏ - những chất này là độc với các tế bào không chuyển gen, ví dụ *manA* [33] và *xylA* [22]. Các chỉ thị chọn lọc tích cực không cần bổ sung các cơ chất để chọn lọc tế bào chuyển gen mà các chỉ thị này sẽ kích hoạt hệ thống nội sinh của tế bào chuyển gen. Ví dụ trong trường hợp isopentenyl transfer- ase (ipt) gen [18] làm tăng cường sự phát triển chồi bằng cách hàm lượng hormone nội sinh ở tế bào/cụm tế bào chuyển gen.

Phương thức chọn lọc không tích cực ức chế sự sinh trưởng và phát triển của tế bào chuyển gen. Các chỉ thị chọn lọc này cũng có thể chia làm hai nhóm là chọn lọc không tích cực trên môi trường bổ sung cơ chất và không bổ sung vào cơ chất, và ngược lại với chọn lọc tích cực, trong trường hợp này việc bổ sung cơ chất sẽ ức chế sự sinh trưởng của tế bào chuyển gen. Khi bổ sung cơ chất, các chỉ thị chọn lọc sẽ chuyển hoá cơ chất từ không độc sang độc cho các tế bào chuyển gen, ví dụ gen

codA ở vi khuẩn mã hoá cho enzyme cytosine deaminase[64] và *adh* gen mã hoá enzyme alcohol dehydrogenase ở *Arabidopsis* [40]. Các chỉ thị chọn lọc không tích cực không phụ thuộc cơ chất, ví dụ như MyMV TrAp protein hoạt hoá sự phiên mã của virus gây bệnh khảm vàng ở đậu xanh [53].

Các chỉ thị chọn lọc gây chết là sự gây chết tế bào không chuyển gen mà có thể bị ảnh hưởng bởi các tế bào chuyển gen lân cận tiết các hợp chất độc hại [22]. Cần xét đến sự gây chết của cơ chất/gen lên các tế bào không chuyển gen xảy ra trong suốt quá trình chọn lọc. Trong những năm gần đây đã có những nghiên cứu liên quan đến việc sử dụng các gen chọn lọc thay thế, không có hại đến hoạt động sinh học của tế bào thực vật. Trong trường hợp này, các tế bào chuyển gen sẽ sử dụng một số chất không độc hại mà trong điều kiện bình thường không thể sử dụng. Thêm vào đó trong các chỉ thị chọn lọc, có các chỉ thị chọn lọc tích cực an toàn có nguồn gốc cả từ thực vật và không có nguồn gốc từ thực vật. Chi tiết một số chỉ thị chọn lọc tích cực an toàn có/không nguồn gốc từ thực vật được trình bày Bảng 1.4a.

Bảng 1.4a. Một số chỉ thị chọn lọc tích cực an toàn có/không nguồn gốc từ thực vật (Manimaran et al. 2011)

Gen	Nguồn phân lập	Enzymes	Cơ chất/tác nhân chọn lọc	Tài liệu tham khảo	
<i>lac Z</i>	<i>Escherichia coli</i>	β -galactosidase	X-gal	Helmer et al. (1984)	
<i>Luc</i>	<i>Photinus pyralis</i>	<i>Luciferase</i>	Luciferin	Ow et al. (1986)	
<i>dao1</i>	<i>Rhodotorula gracilis</i>	<i>D-amino acid oxidase</i>	D-amino acids	Erikson et al. (2004)	
<i>dsdA</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>D-serine ammonia lyase</i>	D-serine	Erikson et al. (2005)	
<i>manA</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Phosphomannose isomerase</i>	Mannose	Joersbo et al. (1998)	

<i>kn1</i>	<i>Maize</i>	-	None	Luo et al. (2006)
<i>TPS1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Trehelose 6 phosphate synthase</i>	Glucose	Avonce et al. (2004)
<i>ASA2</i>	<i>Tobacco</i>	<i>Anthranilate synthase</i>	Herbicide (Trifluralin)	Tsai et al. (2005)
<i>Tub1</i>	<i>Goose grass</i>	-	Amino acid analog	Ye et al. (2003)
<i>NiR</i>	<i>Rice</i>	<i>Nitrite reductase</i>		Nishimura et al. (2005)
<i>Atwbc19</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>ATP binding cassette transporter</i>	Kanamycin	Mentewab and Stewart (2005)
<i>MPR1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae Sigma 1278b</i>	<i>N-acetyltransferase</i>	Azetidine-2-carboxylic acid	Shichiri et al. (2001)
<i>M6PR</i>	<i>Apium graveolens</i>	<i>Mannose 6 phosphate reductase</i>	Mannitol	Everard et al. (1997)
<i>csr1-2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Acetolactate synthase</i>	Imidazolines	Aragao et al. (2000)
<i>BADH</i>	<i>Spinacia oleracea</i>	<i>Betaine aldehyde dehydrogenase</i>	Betaine aldehyde	Daniell et al. (2001)
<i>xylA</i>	<i>Streptomyces rubiginosus</i>	<i>Xylose isomerase</i>	D-xylose	Haldrup et al. (1998)

1.4.3. Sự loại bỏ các gen chỉ thị chọn lọc từ cây chuyển gen

Việc tạo ra cây chuyển gen không mang gen chọn lọc không những đảm bảo an toàn sinh học, giảm thiểu rủi ro đối với môi trường và đảm bảo an toàn cho người và vật nuôi khi sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc từ sinh vật biến đổi gen.

Về nguyên tắc có ba cách để tránh hoặc loại bỏ gen chọn lọc truyền thống khỏi cây chuyển gen trước khi được cây chuyển gen ra sản xuất:

- Đồng thời chuyển hai gen một gen đích và một gen chọn lọc và sau đó loại bỏ gen chọn lọc ở các thế hệ sau thông qua phân ly. Đây là phương pháp đơn giản nhất và đã được dùng thành công trong một vài cây trồng có tần số chuyển gen từ 85% trở lên. Tuy nhiên việc dựa vào phân ly sẽ không thể tiến hành với những cây nhân giống vô tính. Một hạn chế khác là quá trình chọn lọc các cá thể chỉ mang gen đích đòi hỏi thời gian và nhiều công sức.

- Cắt bỏ các gen chọn lọc sau khi đã tìm được cây mang gen chuyển thông qua hệ thống tái tổ hợp tại những trình tự xác định (site – specific recombination), hệ thống gen nhảy (transposition) hoặc tái tổ hợp đồng hợp tử (homologous recombination). Trong hệ thống tái tổ hợp tại những trình tự xác định, các enzyme recombinase chịu trách nhiệm tái tổ hợp sẽ được dùng để loại bỏ gen chọn lọc ở các giai đoạn sau. Các gen mã hóa cho các enzyme này được gắn bên cạnh các gen chọn lọc. Một khi các tế bào mang gen đích đã được chọn lọc, các gen recombinase có thể được kích hoạt bởi những yếu tố bên ngoài và loại bỏ các gen chọn lọc và chính nó ra khỏi genome thực vật, tạo ra các cây chuyển gen không mang các gen chọn lọc. Có ba hệ thống tái tổ hợp đặc hiệu đã được ứng dụng thành công để loại bỏ gen chọn lọc. Thường được dùng nhất là hệ thống Cre/loxP của bacteriophage P1, trong đó recombinase Cre xúc tác cho các phản ứng tái tổ hợp giữa hai trình tự loxP gắn hai đầu của gen chọn lọc dẫn đến việc cắt bỏ gen chọn lọc ra khỏi genome thực vật. Việc sử dụng hệ thống gen nhảy tại vị trí nhất định trong genome của thực vật cũng có khả năng loại bỏ các gen chọn lọc. Hướng này tương tự với quá trình tổ hợp tại vị trí xác định. Hệ thống phổ biến được sử dụng là Ac/Ds được phát hiện lần đầu tiên ở ngô. Tuy nhiên hướng này đòi hỏi thời gian dài qua quá trình lai tạo và phân ly. Chi tiết một số hệ thống loại bỏ chỉ thị chọn lọc từ cây chuyển gen được trình bày chi tiết bảng 1.4b.

Bảng 1.4b. Một số hệ thống loại bỏ chỉ thị chọn lọc từ cây chuyển gen (Manimaran et al. 2011)

Hệ thống	Phương pháp chuyển gen	Cây trồng	Gen chỉ thị chọn	Tài liệu tham khảo
----------	------------------------	-----------	------------------	--------------------

			loc	
Co-transformation	<i>Agrobacterium</i>	<i>Tobacco</i>	<i>nptII</i>	Jacob and Veluthambi (2002)
Co-transformation	<i>Agrobacterium</i>	<i>Potato</i>	<i>None</i>	De Vetten et al. (2003)
Ac/DS	<i>Agrobacterium</i>	<i>Rice</i>	<i>hpt</i>	Jin et al. (2003)
Co-transformation	<i>Agrobacterium</i>	<i>Maize</i>	<i>epsp</i>	Huang et al. (2004)
Co-transformation	<i>Agrobacterium</i>	<i>Rice</i>	<i>hpt</i>	Breitler et al. (2004)
R/RS	<i>Agrobacterium</i>	<i>Strawberry</i>	<i>nptII</i>	Schaart et al. (2004)
Cre/loxP (heat inducible)	<i>Agrobacterium</i>	<i>Tobacco</i>	<i>nptII</i>	Wang et al. (2005)
Cre/loxP (chemically regulated)	<i>Agrobacterium</i>	<i>Rice</i>	<i>hpt</i>	Sreekala et al. (2005)
R/RS	<i>Agrobacterium</i>	<i>Potato</i>	<i>nptII, 5-FC</i>	Kondrak et al. (2006)
Cre/loxP	<i>Agrobacterium</i>	<i>Potato</i>	<i>nptII</i>	Cuellar et al. (2006)
Cre/loxP (chemical regulated)	<i>Agrobacterium</i>	<i>Tomato (for Lepidopteran insect)</i>	<i>nptII</i>	Zhang et al. (2006)
Co-transformation	<i>Agrobacterium</i>	<i>Rice (for Bacterial leaf blight)</i>	<i>Not known</i>	Xia et al. (2006)
Cre/loxP	<i>Agrobacterium</i>	<i>Soybean</i>	<i>hpt</i>	Li et al. (2007)
Direct	<i>Agrobacterium</i>	<i>Tobacco</i>	<i>gus</i>	Jia et al. (2007)
Co-transformation	<i>Agrobacterium</i>	<i>Soybean</i>	<i>bar</i>	Ye and Qin (2007)
Cre/loxP	<i>Agrobacterium</i>	<i>Brassica juncea</i>	<i>nptII G418</i>	Arumugam et al. (2007)
Cre/loxP	<i>Agrobacterium</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>ipt</i>	Bai et al. (2008)
FLP/loxP/FRT	<i>Agrobacterium</i>	<i>Tobacco</i>	<i>nptII</i>	Luo et al. (2008)
Cre/loxP	<i>Flora dip in Agrobacterium</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>hpt</i>	Verweire et al. (2007)
Co-bombarded	<i>Biolistic</i>	<i>Zea mays</i>	<i>nptII</i>	Prakash et al. (2009)
Cre/loxP	<i>Agrobacterium</i>	<i>Tomato</i>	<i>nptII</i>	Zhang et al. (2009)
FLP/FRT (Autoexcision)	<i>Agrobacterium</i>	<i>Tobacco</i>	<i>hpt</i>	Woo et al. (2009)
Direct	<i>Ovary drip in Agrobacterium</i>	<i>Zea mays</i>	<i>None</i>	Yang et al. (2009)
R/RS	<i>Agrobacterium</i>	<i>Cassava</i>	<i>ipt</i>	Saelim et al. (2009)

Co-transformation	<i>Agrobacterium</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>hph</i>	Sripriya et al. (2008)
Direct	<i>Agrobacterium</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>None</i>	Bhatnagar et al. (2010)
Co-bombarded	<i>Biolistic</i>	<i>Oryza sativa</i> (for YSB)	<i>hpt</i>	Kumar et al. (2010)
Cre/loxP	<i>Agrobacterium</i>	<i>Oryza sativa</i> (for sap sucking planthopper)	<i>hpt</i>	Sengupta et al. (2010)
Cre/loxP	<i>Agrobacterium</i>	<i>Tobacco</i>	<i>bar</i>	Kopertekh et al. (2010)
FLP/FRT	<i>Agrobacterium</i>	<i>Zea mays</i> (for salt tolerance)	<i>ALS</i>	Li et al. (2010)
Co-transformation	<i>Agrobacterium</i>	<i>Tobacco</i>	<i>bar</i>	Ramanarao and Veluthambi (2010)

1.5. Cơ sở khoa học trong sử dụng gen *codA* làm chỉ thị chọn lọc ở thực vật chuyển gen

Những tác động bất lợi từ môi trường đến sự sinh trưởng và phát triển của các loài cây trồng bao gồm khô hạn, mặn, lạnh và nhiệt độ cao. Đây cũng là những tính trạng mà các nhà khoa học rất quan tâm và tìm cách cải tiến. Cũng như các loài sinh vật khác, khi gặp các điều kiện bất lợi từ môi trường, thực vật có khả năng sinh ra các cơ chế thích nghi khác nhau để có thể tồn tại, sinh trưởng và phát triển. Cơ chế thường gặp nhất khi cây gặp các điều kiện bất lợi về nước đó là tăng cường khả năng duy trì sức căng của các mô, tế bào thông qua việc tăng cường tổng hợp các chất như các loại đường tan, các loại axit amin,... để tăng cường áp suất thẩm thấu cho tế bào. Glycine betain và proline là hai trong số những chất trao đổi được quan tâm do hiện tượng tích lũy rất mạnh của các hợp chất này khi cây gặp các điều kiện bất lợi từ môi trường, đặc biệt là những yếu tố liên quan đến áp suất thẩm thấu nội bào.

Người ta cho rằng, có nhiều gen liên quan đến sinh tổng hợp GB như: CMO, BADH, *codA* từ những cơ thể sinh vật có khả năng tích lũy GB một cách tự nhiên. Gen mã hóa cho CMO và BADH được phân lập từ một số loài thực vật bậc cao [55]. Trong đó gen *codA* được phân lập từ vi khuẩn *A. globiformis* [23] mã hóa cho choline oxydase, là enzyme chìa khóa có vai trò quan trọng trong phản ứng sinh

tổng hợp GB. Từ đó, nhiều nhà chọn tạo giống đã chú ý chuyển gen này vào nhiều loại cây trồng khác nhau. Nhưng ứng dụng kỹ thuật chuyển gen để chuyển gen *codA* vào thực vật vẫn đang còn là vấn đề mới mẻ chưa được nghiên cứu toàn diện.

1.5.1. Giới thiệu về gen *codA*

Gen *codA* mã hóa cho choline oxydase, là enzyme chìa khóa có vai trò quan trọng trong phản ứng sinh tổng hợp Glycine betain (GB). Quá trình sinh tổng hợp GB được tìm thấy ở nhiều sinh vật khác nhau: vi khuẩn, động vật và thực vật hạt kín. Tuy nhiên, gen *codA* chỉ được tìm thấy và phân lập ở vi khuẩn *A.globiformis*, thuộc nhóm vi khuẩn gram dương sống trong đất. Khi môi trường đất nhiễm mặn, vi khuẩn này sử dụng gen *codA* như một vũ khí bảo vệ giúp chúng sống sót.

Gen *codA* (đã được công bố trong ngân hàng gen NCBI có mã số AY304485), phân lập từ vi khuẩn *A.globiformis* có kích thước 1641bp, mã hóa cho choline oxidase gồm 547 amino acid, là một enzyme giữ vai trò quan trọng đối với quá trình sinh tổng hợp glycine betaine ở vi khuẩn. Choline oxidase xúc tác phản ứng oxi hóa bốn electron của choline để tạo thành glycine betaine. Vì vậy, enzyme này có ý nghĩa quan trọng trong sự tồn tại và thích nghi với môi trường sống của vi khuẩn *A.globiformis*, sự tích lũy hàm lượng cao glycine betaine trong tế bào chất giúp cho tế bào chống lại sự khử nước và hiện tượng co nguyên sinh chất trong điều kiện môi trường bất lợi.

Gen *tp-codA* là gen được cải biến từ gen *codA* phù hợp cho sự biểu hiện ở thực vật. Ngoài ra, đầu 5' trình tự gen *codA* tổng hợp nhân tạo được thiết kế thêm một đoạn 216 nucleotide mã hóa đoạn peptide (Transite Peptide -TP) giúp vận chuyển enzyme vào trong lục lạp và ở đầu 3' là một đoạn 30 nucleotide mã hóa đoạn peptide (cmcy) giúp cho việc lai Western blot để kiểm tra sự biểu hiện gen chuyển. Tổng chiều dài gen *codA* tổng hợp nhân tạo 1887 bp. Mặc dù trình tự nucleotide của gen *codA* tổng hợp (*tp-codA*) sai khác với trình tự gốc có mã số AY304485 nhưng trình tự amino acid giống nhau 100% [4].

1.5.2. Các nghiên cứu chuyển gen *codA* nhằm tăng cường khả năng chống chịu ở thực vật

Năm 1997, Hayashi và cộng sự đã chuyển gen *codA* phân lập từ vi khuẩn *A.globiformis* vào cây *Arabidopsis thaliana*. Trong nghiên cứu này, gen *codA* được thiết kế thêm đoạn peptide tín hiệu (transit peptide) dẫn vào trong đích là lục lạp.

Nồng độ GB được tích lũy trong lục lạp lên đến 50 – 100 mM. Kết quả thu được là hạt của cây chuyển gen có khả năng chịu được nồng độ muối cao trong suốt quá trình nảy mầm và quá trình phát triển tiếp theo của cây. Gen *codA* cũng được chuyển vào trong cây lúa và tích lũy GB ở lục lạp, kết quả cho thấy cây lúa chuyển gen cũng có khả năng chịu mặn cao hơn so với cây đối chứng. Tuy nhiên, khi không thiết kế thêm đoạn transit peptide tín hiệu với mục đích biểu hiện gen *codA* trong tế bào chất thì lượng GB tích lũy trong tế bào chất tăng lên từ 3 – 5 lần so với trong lục lạp. Từ kết quả này, một số tác giả đưa ra giả thuyết rằng trong tế bào chất chứa lượng cơ chất là choline cao hơn trong lục lạp, do đó, đây có thể là vị trí tổng hợp choline trong tế bào. Khi các nhà khoa học tiếp tục kiểm tra cây *Arabidopsis thaliana* chuyển gen *codA* trong các điều kiện bất lợi khác như: nhiệt độ thấp, nhiệt độ cao, khô hạn thì thu được kết quả tương tự. Nghĩa là, cây chuyển gen *codA* có khả năng chống chịu được các điều kiện bất lợi từ môi trường: mặn, lạnh, hạn và nhiệt độ cao.

Kể từ đó, nhiều nhà chọn tạo giống đã chú ý chuyển gen này vào nhiều loại cây trồng khác nhau như là năm 2003, Sulpice et al. đã cho rằng cây *Arabidopsis thaliana* chuyển gen *codA* tạo choline oxidase cho phép tổng hợp glycine betaine (GB) và tăng cường khả năng chịu đựng các loại căng thẳng không những trong quá trình nảy mầm và tăng trưởng thực vật mà còn ở giai đoạn sinh sản, đó là giai đoạn cây nhạy cảm nhất với môi trường căng thẳng [65]. Cây thuốc lá chuyển gen nhỏ (1.0-1.5 cm) có thể tồn tại môi trường MS có 400 mM/l NaCl trong hơn 30 ngày trong khi cây không chuyển gen không có khả năng như vậy [25]. Dòng lúa indica Pusa Basmati 1 biến đổi gen với choline oxidase (*codA*) gen từ *A.globiformis* bằng *Agrobacterium* cũng thể hiện khả năng chịu mặn [46]. Ngoài ra, lúa *Oryza sativa* L chuyển gen này không chỉ chịu mặn mà còn thể hiện chịu lạnh [57].

Những năm gần đây, các nhà khoa học đã bước đầu chuyển gen *codA* vào một số cây khác như là vào cà chua bảo vệ hạt, cây và hoa khỏi sự phá huỷ bởi lạnh và cũng làm tăng cường khả năng chịu muối và stress nước. Gen *codA* cũng làm tăng cường khả năng chịu nóng ở cây trồng cũng được một số nhà khoa học chú ý như đã là tạo cây cà chua có khả năng chịu nóng giai đoạn hạt nảy mầm và cây con [39]; Cây *Brassica chinensis* khi được chuyển gen này cũng thể hiện khả năng chịu nhiệt độ cao và muối cao [43], [70], đã sử dụng gen choline oxidase (*codA*) để tăng

cường khả năng chịu mặn của cây *Eucalyptus globulus* (một loại cây lấy gỗ nguyên liệu để làm giấy)... Ở Việt Nam, tác giả Bùi Văn Thắng và cộng sự đã chuyển gen *codA* làm tăng cường khả năng chịu muối khá tốt ở cây xoan ta [4].

Bảng 1.5. Một số loài cây trồng chuyển gen *codA* đã được chứng minh là có khả năng chống chịu tốt với điều kiện stress

Loài	Gen	Lượng GB (cơ quan)	Bào quan biểu hiện	Sức chịu đựng	Tác giả
<i>Arabipopsis thaliana</i>	<i>codA</i> (COD)	12,2-18,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ dw hạt	Diệp lục	Ánh sáng mạnh	Alia et al. 1999
<i>Arabipopsis thaliana</i>	<i>codA</i>	1,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw lá/hạt	Diệp lục	Lạnh, muối	Hayashi et al. 1997, 1998
<i>Arabipopsis thaliana</i>	<i>codA</i>	12,0-18,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ dw (hạt)	Diệp lục	Nhiệt	Alia et al. 1998b
<i>Arabipopsis thaliana</i>	<i>codA</i>	0,7-0,9 $\mu\text{mol g}^{-1}$ dw chồi	Diệp lục	Đóng băng	Sakamoto et al. 2000
<i>Brassica juncea</i>	<i>codA</i>	0,82 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw lá	Diệp lục	Muối	Waditee et al. 2005
<i>Diospyros kaki</i>	<i>codA</i>	0,1-0,3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw lá	Tế bào chất	Hạn hán, muối	Huang et al. 2000
<i>Euchlyptus globulus</i>	<i>codA</i>	0,17-0,29 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw lá	N.A.	Hạn hán, muối	Yu et al. 2009
<i>Oryza sativa</i>	<i>codA</i>	5,3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw lá)	Diệp lục/ Tế bào chất	Hạn hán, muối	Sakamoto et al. 1998
<i>Oryza sativa</i>	<i>codA</i>	1,0-2,12 $\mu\text{mol g}^{-1}$ dw lá)	Diệp lục	Muối	Mohanty et al. 2002
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>codA</i>	0,1-0,3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw lá)	Diệp lục	Lạnh	Park et al. 2004
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>codA</i>	2,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw cơ quan sản xuất)	Diệp lục/ Tế bào chất	Lạnh, muối, sự oxi hóa	Park et al. 2007a
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>codA</i>	0,9-1,43 $\mu\text{mol g}^{-1}$ fw lá)	Diệp lục	Sự oxi hóa, muối	Ahmad et al. 2008

CHƯƠNG II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Các vật liệu thực vật

- Giống thuốc lá K326 do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp

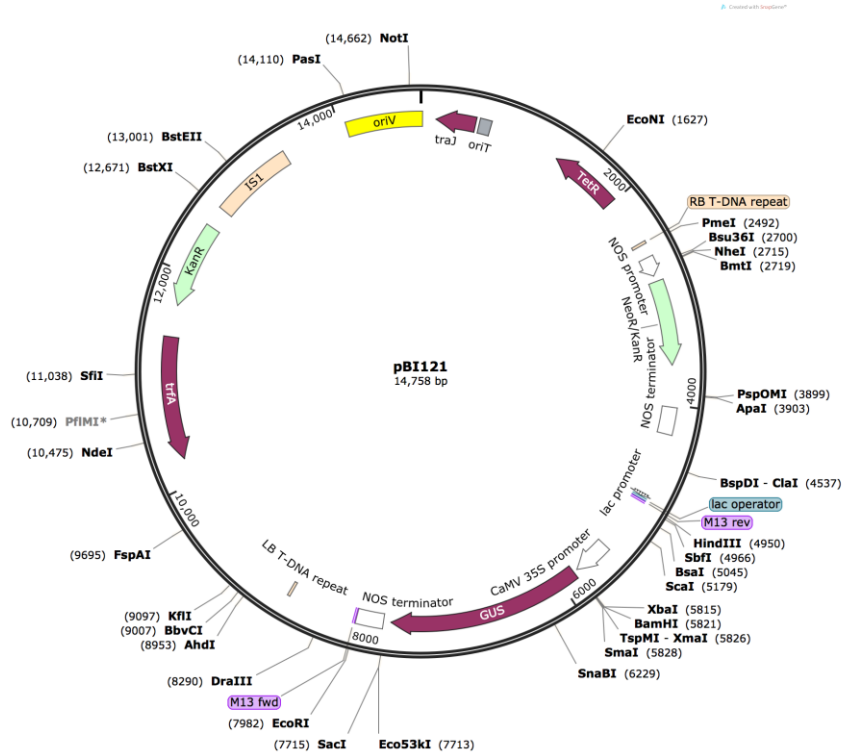
2.1.2. Các chủng vi khuẩn, vector và cặp môi sử dụng

- Các chủng vi khuẩn *E.coli* DH5 α , *Agrobacterium tumefaciens* C58/pGV2260 do phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

- Vector tách dòng pBT/HSP mang promoter HSP18.2 được phân lập từ *Arabidopsis thaliana*. Các vector chuyển gen ở thực vật pCAMBIA1301; pBI121/35S-*codA* mang gen *codA* nhân tạo được tổng hợp dựa trên trình tự gen *codA* phân lập từ vi khuẩn *A.globiformis* công bố trong ngân hàng gen NCBI có mã số AY304485 đồng thời được cải biến mã di truyền cho phù hợp với sự biểu hiện trong hệ thống tế bào thực vật và bổ sung một đoạn 30 nucleotide mã hóa đoạn peptide c-myc giúp cho phát hiện mức độ biểu hiện gen chuyển, gen này hoạt động dưới sự điều khiển của promoter cơ định 35S. Các vector này do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học cung cấp.



Hình 2.1: Vector pCAMBIA1301



Hình 2.2: Vector pBI121

- Các cặp mồi đặc hiệu cho gen *codA* và promoter HSP được tổng hợp từ hãng Macrogen (Hàn Quốc), có trình tự như bảng 2.1.

Bảng 2. 1. Các cặp mồi đặc hiệu khuếch đại gen *codA* và promoter HSP18.2

Tên mồi	Trình tự nucleotide	Nhân gen	Kích thước đoạn DNA nhân (bp)
F/codA-XbaI	5'GCT <u>TCTAGA</u> ATGCACATCGATAATATTGA3'	<i>codA</i>	1688
R/cmyc-SacI	5' <u>CGAGCTCT</u> CAATTCAGATCCTCTTTC3'		
F/HSP-XbaI	5'GCT <u>TCTAGA</u> GGTTCGTTGCTTTTCGGGA3'	HSP18.2	750
R/HSP-HindIII	5'GC <u>AAGCTT</u> CCCGTCATTTCTTCTGGTT3'		

2.1.3. Hóa chất, thiết bị

2.1.3.1. Hóa chất

Dung dịch tách chiết plasmid: Dung dịch 1 (Tris HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0; Glucose 50 mM; H₂O); Dung dịch 2 (NaOH 0,2 M; SDS 1%); Dung dịch 3 (đệm Potassium acetat 3M; Acetic acid 11,5%; H₂O); Isopropanol; Ethanol 70%; dung dịch chloroform: isoamyl alcohol (24:1).

Dung dịch điện di DNA: dung dịch đệm TAE 50X (Tris base: 121 g, Axit acetic glacia: 28,6 ml; 0,5 M EDTA pH 8,0: 50 ml; nước khử ion vừa đủ: 500 ml), dung dịch đệm TAE 1X, Agarose 0,8%, 1%, 1,2%; Ethidium bromide (EtBr) 0,5 µg/ml. Đệm kiểm tra mẫu DNA (Loading buffer), Thang DNA 1 kb (Fermentas).

Kit tinh sạch DNA (Gene JETTM Gel Extraction KIT) của hãng Fermentas (Mỹ) cung cấp.

Các hóa chất: H₂O khử ion, dung dịch đệm buffer Tango 10X, emzym cắt *XbaI*, *SacI* và *HindIII*, *XhoI*, enzyme T4 DNA ligase, Buffer T4 DNA ligase 10X, enzyme *Taq* DNA polymerase.

Các hóa chất đa lượng, vi lượng, vitamin, chất điều hòa sinh trưởng BAP, kinetin, IBA, NAA, Yeast extract, Bacto pepton, Trypton, NaCl, Agarose, Sucrose, Tris HCL, EDTA, MgSO₄, Glycerol, Glycine betaine, Proline, Kanamycin,

Rifamycin, Cefotaxime, X-gluc và các loại hóa chất thông dụng khác được cung cấp bởi các hãng như Sigma (Mỹ), Merck (Đức) và Wako (Nhật Bản).

2.1.3.2. Thiết bị và dụng cụ thí nghiệm

Các thiết bị dùng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật và chuyển gen: box cấy vô trùng, bình nuôi cấy, dàn nuôi cấy, nồi khử trùng, máy nuôi lắc, máy đo pH, máy đo OD. Các thiết bị dùng trong sinh học phân tử: pipetman, máy soi gel (Bio-Rad), máy chụp ảnh điện di (Amersham Pharmacia Biotech), máy li tâm (Eppendorf), bộ điện di (Bio-Rad), máy hút chân không (Savant), máy PCR System 9700 (Applied Biosystem), bể ổn nhiệt, máy biến nạp bằng xung điện, máy voltex v.v cùng các trang thiết bị khác của Phòng Công nghệ tế bào thực vật và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)

❖ Nguyên lý

Kỹ thuật PCR (phản ứng chuỗi trùng hợp - Polymerase Chain Reaction) là kỹ thuật tổng hợp nhân tạo các đoạn DNA với tốc độ nhanh, chính xác cao được thực hiện trong máy chu trình nhiệt (máy PCR). Kỹ thuật tổng hợp DNA ngoài cơ thể cũng tuân thủ các nguyên tắc cơ bản của sao chép DNA trong cơ thể như: đoạn DNA cần được mở xoắn thành 2 mạch đơn, cần có các cặp mồi xuôi ngược đặc hiệu, cần nguyên liệu, điều kiện môi trường thích hợp và enzyme DNA polymerase. Tuy nhiên kỹ thuật PCR có khác là dùng nhiệt độ cao (94°C) để tháo xoắn thay cho enzyme helicase kết hợp với enzyme DNA polymerase chịu nhiệt và hệ thống nhiệt thích hợp cho từng giai đoạn phản ứng tổng hợp cùng với các đoạn mồi được thiết kế chủ động. Nhờ kỹ thuật PCR mà với một lượng nhỏ DNA ban đầu chúng ta có thể thu được đủ lượng DNA cần thiết để tiến hành các thí nghiệm về DNA.

❖ Các thành phần phản ứng PCR

Thành phần phản ứng	Thể tích (μl)
Nước khử ion vô trùng	17,5
Dung dịch đệm <i>Pfu</i> +MgSO ₄ (10X)	2,5
dNTPs (10 mM)	2
Primer codA_F	1
Primer codA_R	1
<i>Pfu</i> polymerase (2,5 u/ μ l)	0,5
Vector pBSK-codA	0,5
Tổng thể tích	25

Bảng 2.2: Chu kì phản ứng PCR nhân gen *codA*

2.2.2. Phương pháp điện di DNA trên gel agarose

❖ Nguyên lý

Các đoạn DNA có khối lượng và điện tích khác nhau được tách ra khi di chuyển từ cực âm sang cực dương trong cùng điện trường có điện thế và cường độ thích hợp.

❖ Hóa chất sử dụng

- Gel Agarose 0,8%.
- Dung dịch đệm TAE 1X (Tris HCl, EDTA....).
- Ethidium bromide (EtBr) 10 mg/ml.
- Dye tra mẫu 10X.

❖ Quy trình

- Chuẩn bị gel agarose: cân 0,8 gam agarose vào 100 ml dung dịch TAE 1X, lắc đều và đun cho tới khi gel tan hết thành dung dịch đồng nhất. Để nguội đến khoảng 50 – 60°C sau đó đổ dung dịch vào khay điện di có gài sẵn rãnh lược thích hợp. Chờ gel đông cứng, rút lược ra đặt bản gel vào bể điện di. Đổ dung dịch TAE 1X tới ngập bản gel từ 1-2 mm.

- Tra mẫu và điện di: mẫu DNA được trộn đều với dye 6X theo tỷ lệ 1:5, tra vào giếng chạy điện di với Marker chuẩn để so độ dài phân tử DNA.

- Nhuộm bản gel: bản gel được lấy ra khỏi khuôn, ngâm trong 20-30 phút trong dung dịch nước cất có chứa EtBr, rửa lại bằng nước cất và quan sát dưới ánh sáng 254 nm trên máy soi DNA, ảnh được chụp bằng máy soi gel.

2.2.3. Phương pháp tinh sạch DNA từ gel agarose

❖ Nguyên lý

Dựa trên khả năng làm tan gel agarose trong buffer của hãng Thermo Scientific sau đó DNA được giữ lại trên bề mặt màng của cột tinh sạch.

❖ Quy trình

- Cắt vùng gel chứa đoạn DNA quan tâm trên bản điện di.
- Cân đoạn gel vừa cắt được và xác định thể tích đoạn gel này theo quy ước 1mg trọng lượng sẽ tương đương với 1 μ l thể tích.
- Bổ sung dung dịch Binding buffer theo tỷ lệ 1:1 với khối lượng của gel. Ủ ở 65°C trong máy ủ nhiệt đến khi gel tan hết, trộn đều.
- Sau khi gel tan hoàn toàn chuyển hỗn hợp dung dịch lên cột thôi gel, ly tâm cực đại 12000 v/p trong 1 phút và loại bỏ dịch chảy qua cột.
- Bổ sung 700 μ l dung dịch Washing buffer. Ly tâm 12000 v/p trong 1 phút.
- Đảo dịch chảy qua cột đem đi ly tâm khô 12000 v/p. Chuyển cột sang ống Eppendorf bổ sung 30 – 50 μ l nước deion.
- Để trong 2-3 phút sau đó đem ly tâm 12000 v/p trong 1 phút thu dịch DNA.

2.2.4. Phương pháp xử lý DNA bằng enzyme cắt hạn chế

❖ Nguyên lý

Sử dụng các enzyme hạn chế cắt phân tử DNA thành hai mảnh dạng đầu bằng hay đầu dính tại các vị trí xác định nhờ trình tự nhận biết đặc hiệu.

❖ Thành phần phản ứng với các enzyme giới hạn

<i>Thành phần phản ứng</i>	<i>Thể tích (μl)</i>
Nước khử ion vô trùng	5
Buffer Tango (10X)	3
<i>Xba</i> I (10 U/l)	1
<i>Sac</i> I (10 U/l)	1
DNA	20
<i>Tổng thể tích</i>	<i>30</i>

Phản ứng được ủ ở 37°C trong 3 giờ. Sản phẩm cắt được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%.

2.2.5. Phản ứng nối ghép gen

❖ Nguyên lý

Khi vector và các đoạn gen cần nối có các đầu dính bổ sung với nhau, trong cùng một hỗn hợp chúng sẽ hình thành các liên kết hidro. Dưới tác dụng của enzyme DNA ligase, các cầu nối phosphodiester sẽ được hình thành giữa 2 nucleotide sát cạnh nhau của 2 đoạn DNA.

❖ Thành phần phản ứng

<i>Thành phần phản ứng</i>	<i>Thể tích (μl)</i>
Nước khử ion vô trùng	2
Đệm T4 ligase (10X)	1
Đoạn gen cần gắn	5
Vector đã mở vòng	1
T4 ligase	1
Tổng thể tích	10

Phản ứng được ủ qua đêm ở 22°C trong 3h hoặc qua đêm.

2.2.6. Phương pháp biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E.coli*

Biến nạp plasmid tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5α được tiến hành theo Cohen và cộng sự (1972).

❖ Chuẩn bị tế bào khả biến

Chủng khuẩn được cấy ria trên môi trường LB đặc và nuôi qua đêm ở 37°C, sau đó lấy một khuẩn lạc đơn, to điển hình cấy vào 3ml môi trường LB lỏng, lắc 200 v/p ở 37°C qua đêm. Chuyển 0,5 ml dịch khuẩn sang 50 ml môi trường LB lỏng, nuôi lắc 200 v/p, 37°C khoảng 3 giờ cho đến khi OD_{660nm} đạt từ 0,6-0,8 thì chuyển dịch nuôi cấy sang ống ly tâm đã giữ lạnh trên đá và ly tâm 6000 v/p, 10 phút. Thu cặn và hòa nhẹ nhàng trong 0,7 – 1,5 ml CaCl₂ 0,1M. Chia vào mỗi ống eppendorf 50 μl glycerol 60%, làm đông nhanh bằng nitơ lỏng và giữ ở 80°C. Sau đó, các tế bào được phục hồi trong môi trường nuôi cấy và các tế bào được phát hiện trên môi trường thích hợp. Cấy trải trên đĩa môi trường LB không có kháng sinh để kiểm tra.

❖ Biến nạp DNA plasmid tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E.coli* bằng sốc nhiệt

- Lấy tế bào khả biến *E.coli* ở tủ -84°C bỏ nhanh vào đá trong 30 phút cho tan dần.
- Bổ sung 5 µl DNA plasmid vào ống đựng tế bào khả biến và trộn đều sau đó giữ trong đá 30 phút.
- Đem sốc nhiệt ở 42°C trong 90 giây rồi chuyển ngay sang đá giữ trong đá 5 phút.
- Bổ sung 0,5 ml môi trường SOC, nuôi lắc 200 v/p ở 37°C trong 1 giờ.
- Cấy trải dịch tế bào lên trên đĩa LB đặc có bổ sung kháng sinh thích hợp và nuôi qua đêm ở 37°C.

2.2.7. Phương pháp tách chiết plasmid tái tổ hợp

❖ Nguyên lý

Phương pháp tách chiết DNA plasmid dựa trên nguyên lý sử dụng các hóa chất như SDS, NaOH có tác dụng phá vỡ cấu trúc thành tế bào vi khuẩn, giải phóng plasmid của vi khuẩn. Sau đó SDS gây biến tính protein và potassium acetate kết tủa protein để loại bỏ chúng ra khỏi pha chứa DNA plasmid. DNA plasmid được thu lại bằng cồn lạnh tuyệt đối và loại bỏ RNA trong mẫu bằng RNAase.

❖ Quy trình

- Cấy chuyển 1 khuẩn lạc vào ống penicilin chứa 2ml môi trường LB lỏng, nuôi lắc 200 vòng/ phút qua đêm ở 37°C.
- Chuyển 2 ml dịch nuôi cấy vào eppendorf, ly tâm 10000 vòng/ phút trong 1 phút, loại dịch trên.
- Bổ sung 100 µl dung dịch Sol I (Tris HCl 50 Mm, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0), dùng máy Voltex hòa tan tế bào. Từ bước này các thao tác phải được thực hiện trong đá.
- Bổ sung 200 µl dung dịch Sol II (200 mM NaOH + SDS 1%), đảo nhẹ nhàng. Dung dịch sol II có tác dụng phá vỡ thành tế bào.
- Bổ sung 150 µl dung dịch Sol III (Kali Acetat 3M, pH 5,5) để kết tủa protein, đảo đều.
- Bổ sung 450 µl Chloroform : isoamin (24:1), lắc đều.
- Ly tâm 13000 vòng/ phút trong 10 phút. Dưới tác dụng của lực ly tâm, mẫu chia thành ba pha: pha trên chứa DNA plasmid, pha giữa là protein tủa và pha dưới cùng là tạp chất.

- Dùng pipet hút nhẹ nhàng pha trên cùng chứa DNA plasmid sang ống eppendorf mới.
- Bổ sung 1ml ethanol 100% để tủa plasmid, đặt mẫu tủa ở tủ - 20°C trong 30 phút.
- Ly tâm thu DNA plasmid ở 13000 vòng/ phút trong 10 phút.
- Làm khô mẫu trong box cây trong 15 phút. Hòa tan DNA thu được trong 30 µl H₂O deion.
- Điện di kiểm tra plasmid trên gel agarose 0,8%.

2.2.8. Phương pháp biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến *A.tumefaciens* C58/PGV2260 bằng xung điện

❖ Chuẩn bị tế bào khả biến *A.tumefaciens* C58/PGV2260

Lấy 50 ml tế bào vi khuẩn *A.tumefaciens* C58/PGV2260 nuôi cấy trên môi trường mới đến đầu pha log được thu lại bằng ly tâm lạnh. Cặn của tế bào vi khuẩn được làm sạch bằng cách rửa nhiều lần bằng nước khử ion và glycerol 10% đã được làm lạnh trước. Các thao tác được thực hiện trong bốc vô trùng. Bước cuối cùng bổ sung 0,5 ml glycerol 10% chia đều 50 µl vào 10 ống eppendorf và giữ ở tủ -85°C.

❖ Phương pháp biến nạp bằng xung điện

- Chuẩn bị tế bào khả biến trong các cuvet đã khử trùng.
- Đặt các ống cuvet đã khử trùng vào đá.
- Bổ sung 5 µl plasmid tái tổ hợp vào 100 µl đựng sẵn tế bào *A.tumefaciens* khả biến.
- Đảo nhẹ, đặt trong đá 5 phút, chuyển dịch sang ống cuvet mới.
- Xung điện 2,5 kw; 25 µF và 400 Ω trong 4 – 5 µ.
- Chuyển ngay ống dịch vào đá, sau 5 phút, bổ sung 1ml môi trường LB, mix nhẹ và chuyển các tế bào sang ống eppendorf 2ml, nuôi lắc ở 28°C trong 1 giờ.
- Cấy trải 100 µl tế bào vào đĩa chứa môi trường kháng sinh chọn lọc và nuôi từ 24 – 48 giờ. Thành phần môi trường nuôi khuẩn theo bảng sau:

Bảng 2.3: Môi trường nuôi khuẩn

Tên môi trường	Thành phần
LB đặc	5g/l yeast extract + 5g/l NaCl + 10g/l trytone + 15g/l bacto agar, pH = 7,0
LB lỏng	5g/l yeast extract + 5g/l NaCl + 10g/l trytone, pH = 7,0
^{1/2} MS lỏng	^{1/2} MS (I-V) + 30g/l sucrose, pH = 5,8

2.2.9. Phương pháp tạo cây thuốc lá chuyển gen

Thành phần môi trường nuôi và chọn lọc cây thuốc lá chuyển gen theo bảng sau:

Bảng 2.4 : Môi trường nuôi và chọn lọc cây thuốc lá chuyển gen

Tên môi trường	Ký hiệu	Thành phần môi trường
Đồng nuôi cấy	CT1	MS + 1mg/l BAP + 30g/l sucrose + 8g/l agar, pH=5,8
Chọn lọc chồi chuyển gen	CT2	MS + 1mg/l BAP + 30g/l sucrose + 8g/l agar + 500mg/l cefotaxime, pH=5,8
Ra rễ	CT3	MS + 0,1mg/l IBA + 30g/l sucrose + 8g/l agar + 300mg/l cefotaxime, pH 5,8

i) Tạo dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens*

Sau khi chọn lọc thành công các dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector chuyển gen, lấy một khuẩn lạc riêng biệt, phát triển tốt trên đĩa khuẩn cấy vào 10ml môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh kanamycin 50mg/l và kháng sinh rifamycin 50mg/l, nuôi qua đêm ở 28°C. Lấy 2ml dịch huyền phù chuyển sang 50ml LB lỏng (không bổ sung kháng sinh) nuôi phục hồi trong 4 giờ. Ly tâm 5.000v/p trong 10 phút ở 4°C để thu cặn tế bào vi khuẩn. Sau đó, hòa tan cặn khuẩn trong môi trường ^{1/2} MS lỏng, pH = 5.8, đến mật độ khuẩn đạt giá trị OD₆₀₀ = 0,5, để biến nạp vào tế bào thực vật.

ii) Tạo nguyên liệu chuyển gen

Chọn các lá bánh tẻ, có kích thước vừa phải ở cây con khỏe mạnh 2 tuần tuổi. Dùng dao cắt bốn cạnh mép lá gây tổn thương, tạo thành các mảnh lá có kích

thước khoảng 1x1cm. Sau đó, các mảnh lá này được đặt trong môi trường ½ MS lỏng trước khi biến nạp để tránh bị khô.

iii) **Nhiễm khuẩn và đồng nuôi cấy**

Ngâm các mảnh lá vào dịch huyền phù vi khuẩn, $OD_{600} = 0,5$ trong 10 phút, có lắc nhẹ. Mẫu cấy được thấm khô bằng giấy thấm khử trùng và đặt lên môi trường đồng nuôi cấy CT1 trong tối 2 ngày.

iv) **Sàng lọc chồi và cấy thuốc lá chuyển gen trên môi trường có kháng sinh chọn lọc**

Sau 2 ngày đồng nuôi cấy, đặt các mảnh lá lên giấy thấm khô hết dịch khuẩn và chuyển lên môi trường CT2. Sau 3-4 tuần, xuất hiện các cụm chồi nhỏ từ mép các mảnh lá, tách các cụm chồi, tiếp tục cấy lên môi trường CT2 mới. Đến khi các chồi thật phát triển từ các cụm chồi thì tiến hành tách từng chồi riêng rẽ và cấy lên môi trường ra rễ CT3.

2.2.10. Kiểm tra sự biểu hiện của gen chuyển ở mức độ phiên mã bằng kỹ thuật RT-PC

RNA tổng số từ mẫu lá của cây chuyển gen được tách chiết theo hướng dẫn của bộ Kit Purelink™ Plant RNA Reagent. Sau đó mRNA được tách chiết theo hướng dẫn của bộ Kit FastTrack^R MAG mRNA Isolation” của hãng Invitrogen. mRNA được sử dụng làm khuôn cho phản ứng RT-PCR như sau:

Tổng hợp cDNA từ mRNA

cDNA sợi đơn được tổng hợp từ khuôn của mRNA bằng Kít tổng hợp cDNA “SuperScript™ III First Strand Kits” của hãng Invitrogen. Các bước tiến hành như sau:

Bước 1. Chuẩn bị: Ống 1 với thành phần như bảng 2.5:

Bảng 2.5: Thành phần phản ứng tổng hợp cDNA

STT	Thành phần phản ứng	Thể tích (μl)
1	Primer (50μM oligo(dT) ₂₀)	1
2	10mM dNTP mix	1
3	mRNA	5
4	DEPC-treated water	3
	Tổng thể tích	10

Hỗn hợp dung dịch trên được trộn đều, ủ ở 65°C trong 5 phút, sau đó ủ trong đá ít nhất 1 phút. Ống 2 với thành phần như bảng 2.6:

Bảng 2.6: Thành phần phản ứng tổng hợp cDNA

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	10X RT buffer	2
2	25mM MgCl ₂	4
3	0,1M DTT	2
4	RNaseOUT™ (40U/ μl)	1
5	SuperScript™ III RT(200 U/ μl)	1
Tổng thể tích		10

Bước 2. Tiến hành:

- Lấy 10 μl dung dịch ở ống 1 cho vào ống 2 rồi trộn đều
- Ủ ở 50°C trong 50 phút
- Kết thúc phản ứng ở 85°C trong 5 phút rồi ủ trong đá
- Thêm 1 μl RNase H vào ống, ủ ở 37°C trong 20 phút để loại bỏ sợi mRNA
- Sản phẩm cDNA sợi đơn được sử dụng làm khuôn để nhân gen.

▪ **Nhân gen *actin* từ cDNA**

Phản ứng nhân gen *actin* từ cDNA có thành phần như sau:

Bảng 2.7: Thành phần phản ứng PCR nhân gen *actin* từ cDNA

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	DEPC treated water	13,5
2	Đệm PCR 10X	2,5
3	MgCl ₂ (25mM)	2,5
4	dNTPs (10 mM)	2,0
5	Môi xuôi (10 pM)	1,0
6	Môi ngược (10 pM)	1,0
7	cDNA	2,0
8	<i>Taq</i> polymerase (5u/μl)	0,5
	Tổng	25

Trình tự mỗi xuôi F1: 5'-ATG GAG AAC ACA GAT CCT TGT-3' và R1: 5'-GAA GAT CCA ATT GGT CGA GTG T-3' cho nhân một đoạn gen *actin* có kích thước 1100 bp.

Chu kỳ nhiệt độ: 94°C/3 phút; 35 chu kỳ [94°C/1 phút, 56°C/50 giây, 72°C/1 phút 30 giây; 72°C/10 phút và kết thúc phản ứng ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%, nhuộm bằng ethidium bromide, soi dưới đèn UV và chụp ảnh.

▪ **Nhân gen *codA* từ cDNA**

Phản ứng nhân gen *codA* từ cDNA có thành phần như sau:

Bảng 2.8: Thành phần phản ứng PCR nhân gen *codA* từ cDNA

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	DEPC treated water	13,5
2	Đệm PCR 10X	2,5
3	MgCl ₂ (25mM)	2,5
4	dNTPs (10 mM)	2,0
5	Môi xuôi (10 pM)	1,0
6	Môi ngược (10 pM)	1,0
7	cDNA	2,0
8	<i>Taq</i> polymerase (5u/μl)	0,5
	Tổng	25

Sử dụng cặp môi F/codA-XbaI và R/cmyc-SacI cho phản ứng kiểm tra nhân gen *codA*. Theo tính toán cặp môi này sẽ nhân đoạn gen có kích thước gần 1,7 kb.

Phản ứng nhân gen *codA* từ cDNA có chu kỳ nhiệt độ: 94°C/3 phút; 30 chu kỳ [94°C/1 phút, 56°C/50 giây, 72°C/1 phút]; 72°C/10 phút và kết thúc phản ứng ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%, nhuộm bằng ethidium bromide, soi dưới đèn UV và chụp ảnh.

2.2.11. Đánh giá khả năng chịu nhiệt của các dòng thuốc lá K326 chuyển gen *codA*

Đánh giá nhanh khả năng chịu nhiệt của các dòng thuốc lá chuyển gen được tiến hành ở giai đoạn mảnh lá sau biến nạp, nhân đa chồi và hình thành rễ. Các dòng thuốc lá chuyển gen và đối chứng không chuyển gen được xử lý nhiệt độ (đặt trong buồng sinh trưởng trong 3 tuần), nuôi trong buồng sinh trưởng với điều kiện nhiệt độ $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm 60%, cường độ chiếu sáng 4.000 – 5.000 lux, thời gian chiếu sáng 12h/ngày. Khả năng chịu nhiệt của các dòng cây thuốc lá chuyển gen được đánh giá thông qua hình thái và so sánh với các dòng chưa chuyển gen.

2.2.12. Sàng lọc khả năng chịu mặn của dòng thuốc lá chuyển gen *in vitro*

Chồi của các dòng thuốc lá chuyển gen *codA* và đối chứng không chuyển gen được nuôi cấy trên môi trường ra rễ (MS + 0,1mg/l NAA + 30g/l sucrose + 8g/l agar + 250mg/l cefotaxime) bổ sung 200mM NaCl.

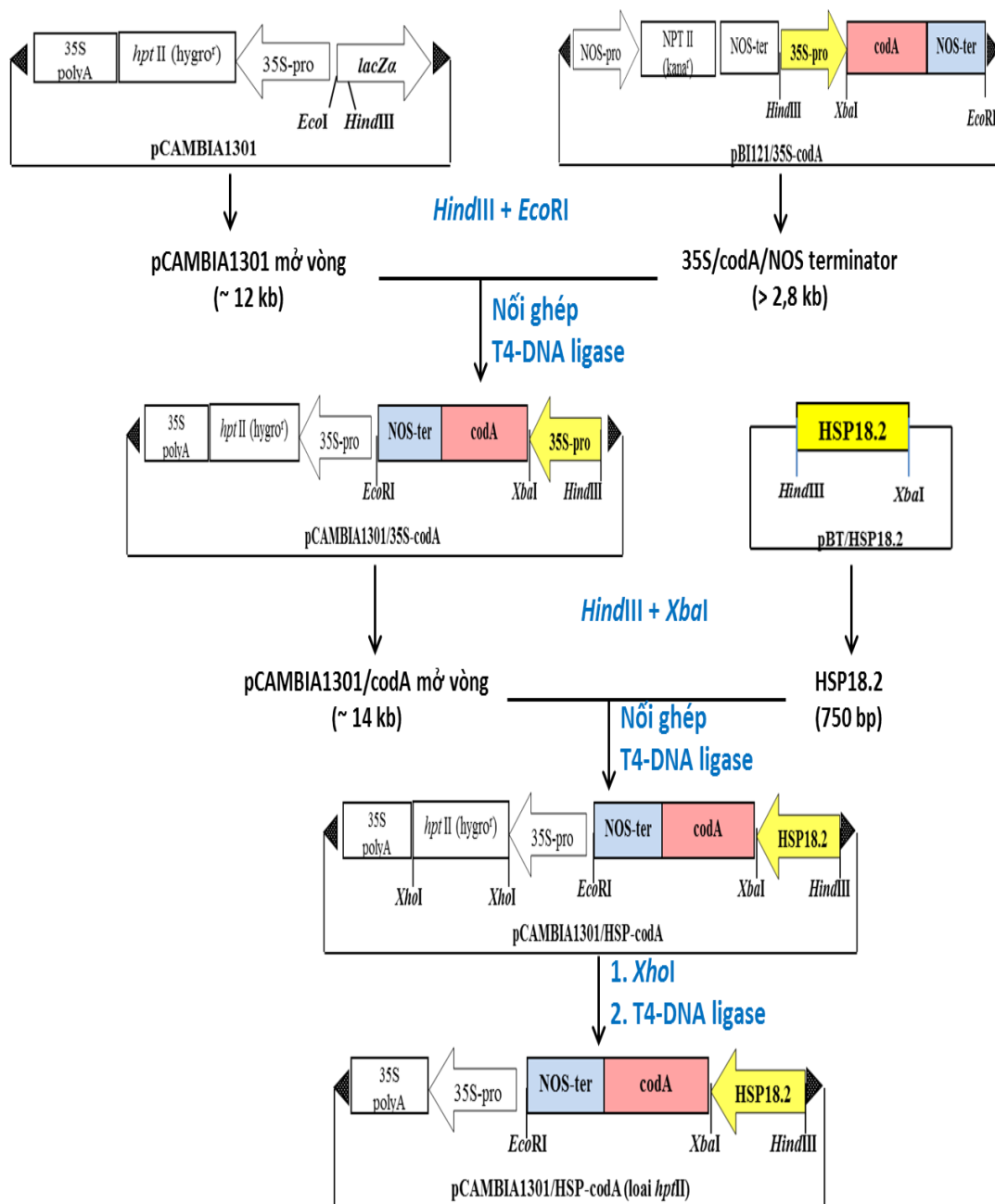
2.2.13. Phương pháp tính toán và xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học trên máy tính bằng phần mềm Microsoft Excel. Phân tích trình tự nucleotide của gen và trình tự axit amin của protein bằng phần mềm BioEdit và DNASTAR.

CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.2. Thiết kế vector chuyển gen pCAMBIA1301/HSP-codA mang gen *codA*

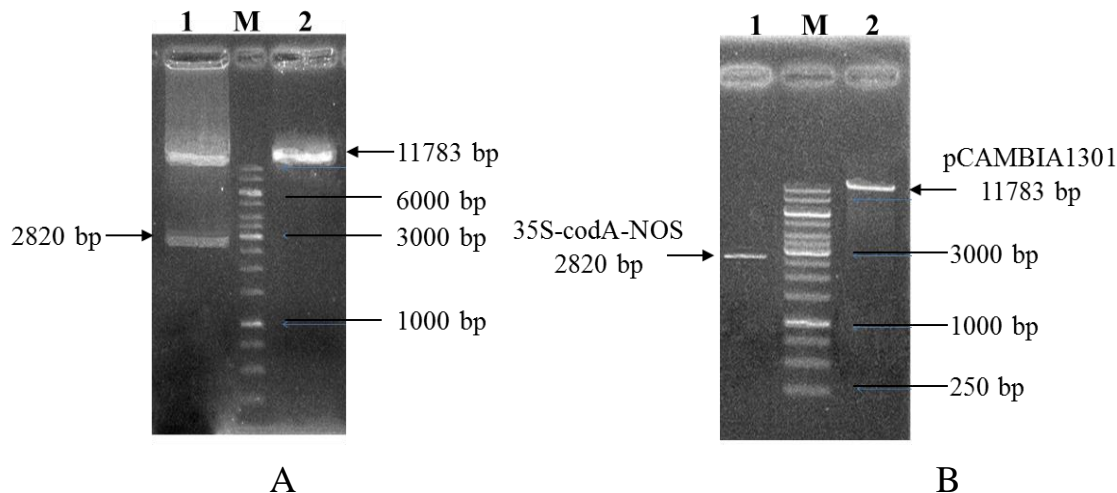
Vector pCAMBIA1301/HSP-codA được thiết kế theo sơ đồ như sau:



Hình 3.1. Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen

3.2.1. Thiết kế vector chuyển gen pCAMBIA1301/35S-codA mang gen *codA* hoạt động dưới sự điều khiển của promoter cơ định 35S

Với mục đích ghép nối đoạn gen 35S-codA-NOS từ plasmid pBI121/35S-codA vào vector nhận pCAMBIA1301, chúng tôi tiến hành xử lý đồng thời 2 vector trên bằng cặp enzyme cắt giới hạn *Hind*III và *Eco*RI để thu được đoạn gen mục tiêu có kích thước 2820 bp và mở vòng vector nhận pCAMBIA1301 (Hình 3.2). Các đoạn gen sau khi tinh sạch được tiến hành phản ứng ghép nối nhờ xúc tác của T4-DNA ligase. Vector tái tổ hợp thu được kí hiệu là pCAMBIA/35S-codA. Sản phẩm nối ghép này được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH-5 α bằng phương pháp sốc nhiệt và được chọn lọc trên môi trường chứa kháng sinh kanamycin.

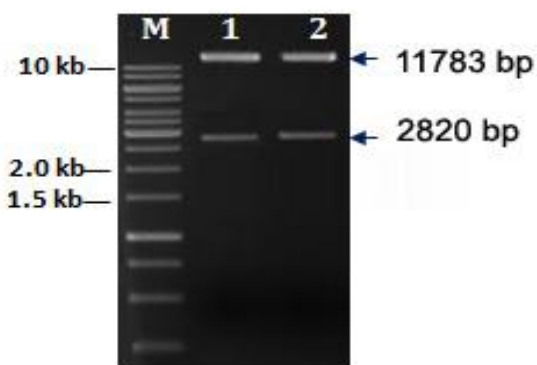


Hình 3.2. Kết quả điện di sản phẩm cắt các vector pBI121/35S-codA (1) và pCAMBIA1301 (2) bằng cặp enzyme cắt hạn chế *Hind*III và *Eco*RI (A) và sản phẩm tinh sạch các đoạn gen (B)

M: Thang marker DNA 1 kb (Thermo Scientific)

Để sàng lọc các dòng tế bào mang plasmid tái tổ hợp mong muốn, chúng tôi tiến hành chọn ngẫu nhiên một số khuẩn lạc mọc trên môi trường có chứa kháng sinh, nuôi cấy thu lượng lớn tế bào để tách chiết plasmid và cắt kiểm tra bằng cặp enzyme giới hạn *Hind*III và *Eco*RI. Theo tính toán lý thuyết, vector tái tổ hợp pCAMBIA1301/35S-codA khi được xử lý bằng cặp enzyme này sẽ tạo ra 2 đoạn DNA có kích thước lần lượt là 2820 bp (cấu trúc 35S-codA-NOS) và 11783 bp (phần còn lại của vector pCAMBIA1301). Kết quả điện di sản phẩm cắt (Hình 3.3)

cho các băng DNA có kích thước đúng như mong đợi, chứng tỏ vector pCAMBIA1301/35S

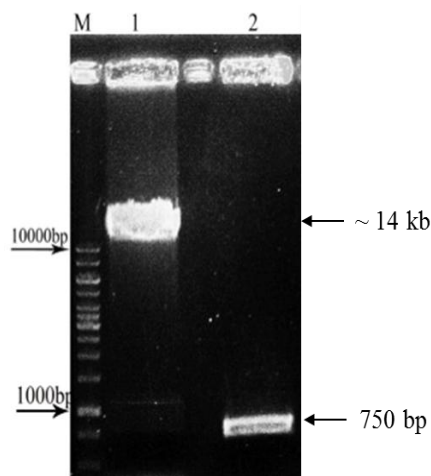


Hình 3.3. Kết quả điện di sản phẩm cắt kiểm tra vector tái tổ hợp pCAMBIA1301/35S-codA bằng cặp enzyme cắt hạn chế *Hind*III và *Eco*RI

M: Thang marker DNA 1 kb (Thermo Scientific)

3.2.2. Thiết kế vector pCAMBIA1301/HSP-codA mang gen *codA* hoạt động dưới sự điều khiển của promoter HSP 18.2

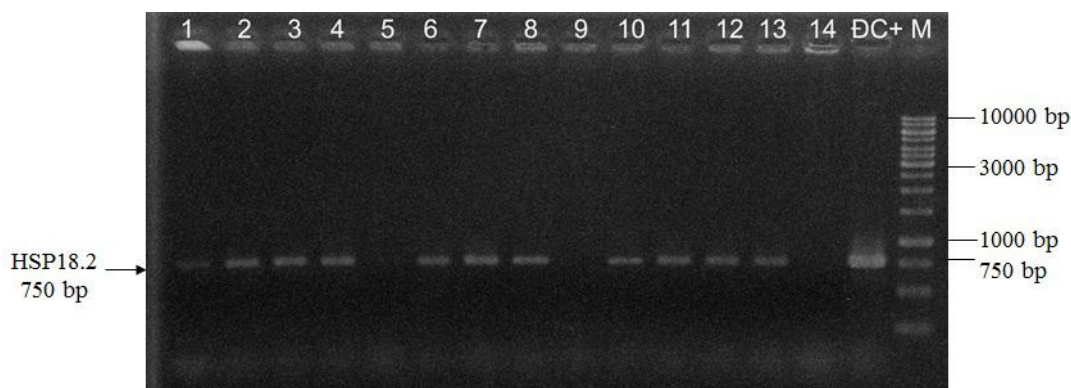
Để thiết kế vector tái tổ hợp mang gen *codA* được điều khiển bởi promoter HSP18.2, chúng tôi tiến hành xử lý vector nhân dòng pBT/HSP và vector pCAMBIA1301/35S-codA bằng cặp enzyme giới hạn *Hind*III và *Xba*I và tinh sạch các phân đoạn gen mong muốn: đoạn promoter HSP có kích thước 750 bp và vector pCAMBIA1301/35S-codA sau khi loại bỏ promoter 35S có kích thước gần 14000 bp. Kết quả điện di sản phẩm theo gel và tinh sạch (Hình 3.4) cho các băng DNA sáng rõ, không bị đứt gãy, có kích thước đúng như tính toán. Các sản phẩm này sau đó sẽ được dùng làm nguyên liệu để thực hiện phản ứng nối ghép gen dưới tác dụng của T4-DNA ligase. Vector tái tổ hợp thu được kí hiệu là pCAMBIA/HSP-codA. Sản phẩm nối ghép này được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH-5α bằng phương pháp sốc nhiệt và được chọn lọc trên môi trường chứa kháng sinh kanamycin.



Hình 3.4. Kết quả điện di sản phẩm tinh sạch các phân đoạn gen mong muốn sau khi xử lý các vector pBT/HSP và pCAMBIA1301/35S-codA bằng cặp enzyme hạn chế *Hind*III và *Xba*I.

(2): vector pCAMBIA1301/35S-codA đã loại bỏ promoter 35S; (1) promoter HSP18.2

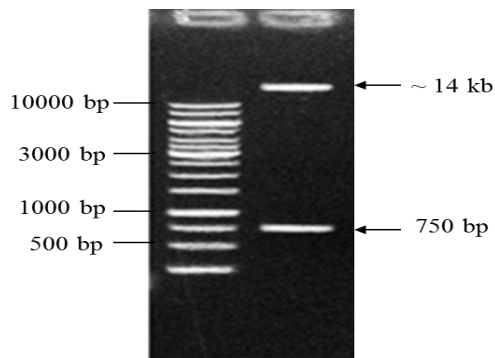
M: Thang marker DNA 1 kb (Thermo Scientific).



Hình 3.5. Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR sàng lọc các dòng khuẩn mang plasmid tái tổ hợp pCAMBIA1301/HSP-codA bằng cặp mồi đặc hiệu F/HSP-*Xba*I và R/HSP-*Hind*III.

Vector tái tổ hợp pCAMBIA1301/HSP-codA được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH-5 α bằng phương pháp sốc nhiệt. Các khuẩn lạc mọc được trên môi trường chọn lọc có kháng sinh được kiểm tra bằng phản ứng colony-PCR sử dụng

cặp mồi đặc hiệu F/HSP-XbaI và R/HSP-HindIII. Sản phẩm colony-PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8%. Hình ảnh điện di (Hình 3.5) cho thấy trong số 14 dòng khuẩn lạc được kiểm tra có 11 dòng cho kết quả PCR dương tính, chứng tỏ những dòng khuẩn lạc này có thể mang plasmid tái tổ hợp pCAMBIA1301/HSP-codA



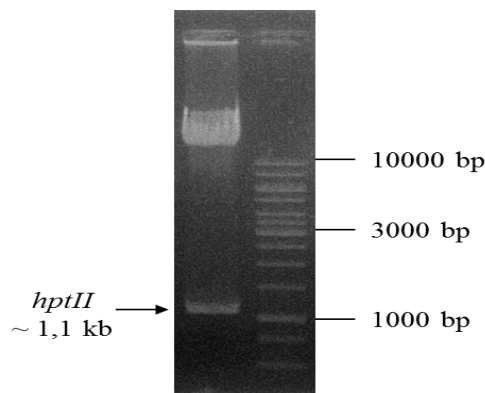
Hình 3.6. Kết quả điện di sản phẩm cắt kiểm tra vector tái tổ hợp pCAMBIA1301/HSP-codA bằng cặp enzyme cắt hạn chế *HindIII* và *XbaI*.

Để chắc chắn hơn nữa về sự nối ghép thành công promoter HSP18.2 vào vector pCAMBIA/codA, chúng tôi tiến hành nuôi cấy lượng lớn khuẩn lạc cho kết quả dương tính với phản ứng colony-PCR để tách chiết plasmid và cắt kiểm tra bằng cặp enzyme giới hạn *HindIII* và *XbaI*. Theo tính toán lý thuyết, vector tái tổ hợp pCAMBIA1301/HSP-codA khi được xử lý bằng cặp enzyme này sẽ tạo ra 2 đoạn DNA có kích thước lần lượt là 750 bp (đoạn promoter HSP18.2) và ~ 14 kb (phần còn lại của vector pCAMBIA1301 có chứa gen codA). Kết quả điện di sản phẩm cắt (Hình 3.6) cho các băng DNA có kích thước đúng như mong đợi, chứng tỏ vector pCAMBIA1301/HSP-codA đã được thiết kế thành công.

3.2.3. Loại bỏ gen chọn lọc *hptII* mã hóa cho hygromycin phosphotransferase khỏi vector pCAMBIA1301/HSP-codA

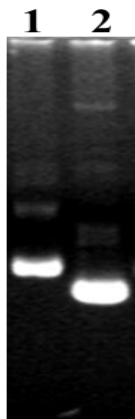
Với mục đích đưa gene *codA* vào vector pCAMBIA1301 để thay thế gen chọn lọc kháng sinh *hptII* giúp giảm chi phí cho việc sàng lọc các mô và cây chuyển gen, đồng thời thân thiện hơn với môi trường, sau khi nối ghép thành công gen *hptII* có kích thước khoảng 1,1 kb mã hóa cho hygromycin phosphotransferase

sẽ được cắt bỏ khỏi vector pCAMBIA1301/HSP-codA bằng cách xử lý vector tái tổ hợp trên bằng enzyme hạn chế *XhoI* (Hình 3.7). Phần còn lại của vector sẽ được thôi gel, tinh sạch làm nguyên liệu cho phản ứng đóng vòng dưới tác dụng của enzyme T4-DNA ligase.



Hình 3.7. Cắt loại bỏ gen *hptII* khỏi vector pCAMBIA1301/HSP-codA bằng enzyme hạn chế *XhoI*.

Dựa trên nguyên lý của phương pháp điện di, plasmid có kích thước lớn hơn sẽ di chuyển chậm hơn so với plasmid có kích thước nhỏ khi chạy trên gel agarose, chúng tôi đã điện di kiểm tra vector pCAMBIA1301/HSP-codA trước (đường chạy 1) và sau (đường chạy số 2) khi loại bỏ gen *hptII* (Hình 3.8). Trên điện di đồ ta thấy, tại đường chạy thứ 1 xuất hiện băng cao hơn ở đường chạy số 2. Điều này cho thấy chúng tôi đã loại bỏ thành công gen *hptII* khỏi vector pCAMBIA1301/HSP-codA. Vector thành phẩm sẽ được sử dụng cho mục đích chuyển gen vào thực vật để kiểm tra khả năng chọn lọc của gen *codA* đối với các mô và cây chuyển gen.

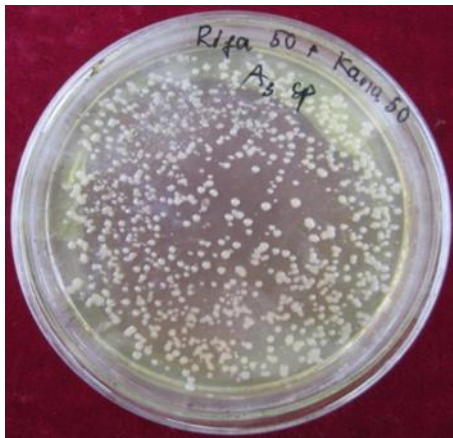


Hình 3.8. Kết quả điện di kiểm tra vector pCAMBIA1301/HSP-codA trước (1) và sau (2) khi loại bỏ gen *hptII*.

M: Thang marker DNA 1 kb (Thermo Scientific).

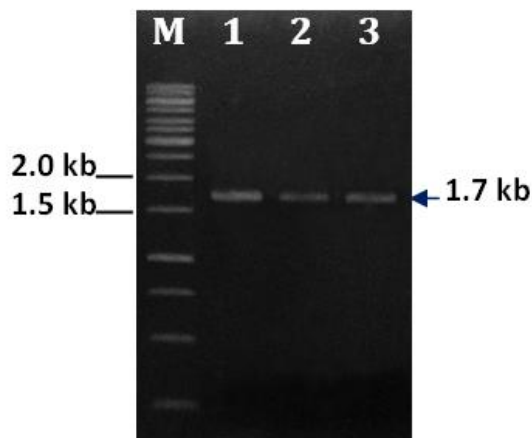
3.2.4. Tạo chủng *Agrobacterium tumefaciens* mang vector chuyển gen

Biến nạp vector chuyển gen pCAMBIA1301/HSP-codA đã loại bỏ gen *hptII* vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58/pGV2260 khả biến bằng phương pháp xung điện. Sau khi biến nạp, dịch vi khuẩn được cấy trải trên môi trường LB đặc có 50 mg/l kanamycin, nuôi ở 28°C trong 2 ngày. Kết quả biến nạp cho thấy rất nhiều dòng khuẩn lạc mọc trên bề mặt môi trường có kháng sinh chọn lọc (Hình 3.9).



Hình 3.9. Khuẩn lạc *A. tumefaciens* biến nạp vector chuyển gen pCAMBIA/HSP-codA mọc trên môi trường LB.

Để khẳng định chắc chắn các dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* mọc trên môi trường có kháng sinh chọn lọc đã được biến nạp vector chuyển gen pCAMBIA1301/HSP-codA, chúng tôi tách chiết plasmid của ba dòng khuẩn lạc làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu F/codA-XbaI và R/cmyc-SacI nhân gen *codA*. Kết quả nhân PCR với 3 dòng plasmid đều xuất hiện một băng DNA rõ nét, duy nhất có kích thước khoảng 1,7 kb tương ứng gen *codA* (Hình 3.10). Kết quả này chứng tỏ rằng đã tạo được chủng *Agrobacterium tumefaciens* C58/pGV2260 mang vector chuyển gen pCAMBIA1301/HSP-codA; các dòng vi khuẩn này đã được giữ chủng ở điều kiện bảo quản - 85°C làm vật liệu chuyển gen vào cây trồng.



Hình 3.10. Sản phẩm PCR nhân gen *codA* từ 3 dòng plasmid tách từ *A.tumefaciens*.

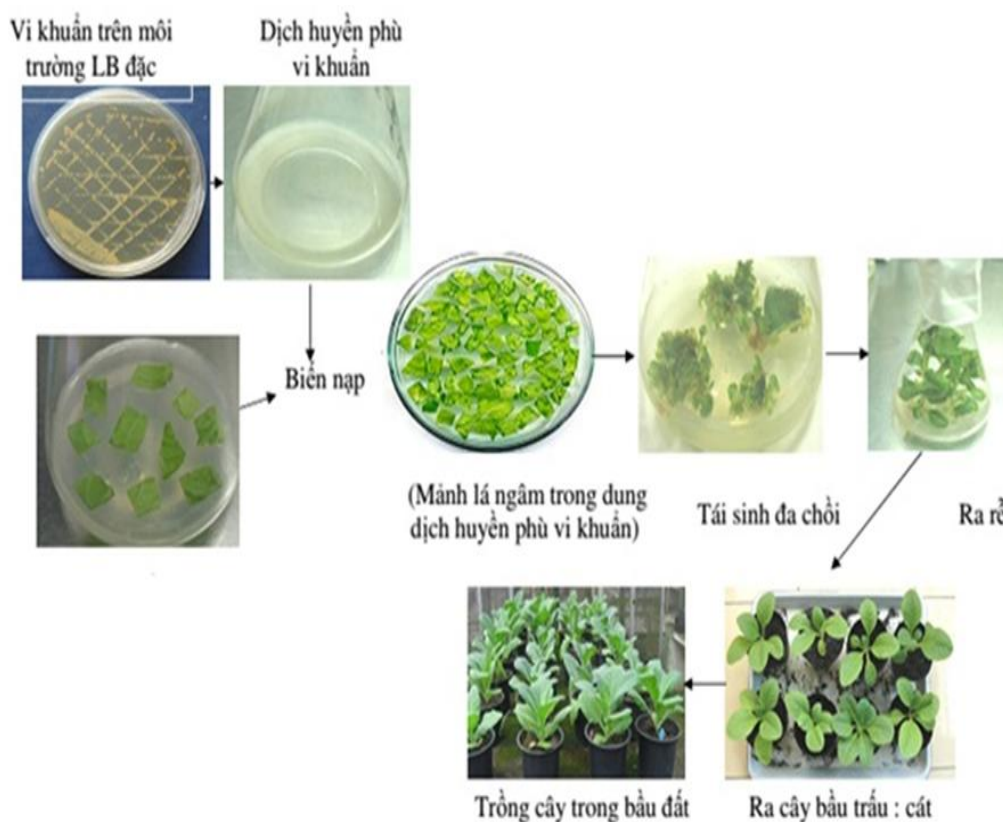
M: thang DNA 1 kb

3.3. Kết quả chuyển gen *codA* vào cây thuốc lá K326

3.3.1. Chuyển cấu trúc pCAMBIA1301/HSP-codA vào cây thuốc lá thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Trong chuyển gen thực vật, cây thuốc lá được xem xét như là loại cây mô hình phục vụ cho các nghiên cứu đánh giá chức năng gen bởi vì hệ thống tái sinh và tiếp nhận gen ngoại lai của cây thuốc rất hiệu quả, thời gian phân hóa từ mô đến tạo cây hoàn chỉnh khá ngắn, mặt khác cây thuốc lá là cây ngắn ngày, dễ trồng và chăm sóc nên dễ dàng thu được hạt để nghiên cứu các thế hệ tiếp theo. Bởi vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi chọn cây thuốc lá làm cây mô hình để đánh giá cấu trúc vector chuyển gen thiết kế pCAMBIA1301/HSP-codA.

Tạo dịch huyền phù vi khuẩn: Dòng khuẩn lạc *A.tumefaciens* dương tính mang gen *codA* được nuôi phục hồi để thu dịch huyền phù phục vụ cho nội dung chuyển gen. Khuẩn lạc mọc tốt trên môi trường có kháng sinh chọn lọc.



Hình 3.11. Sơ đồ chuyển gen vào thuốc lá thông qua vi khuẩn *A.tumefaciens*

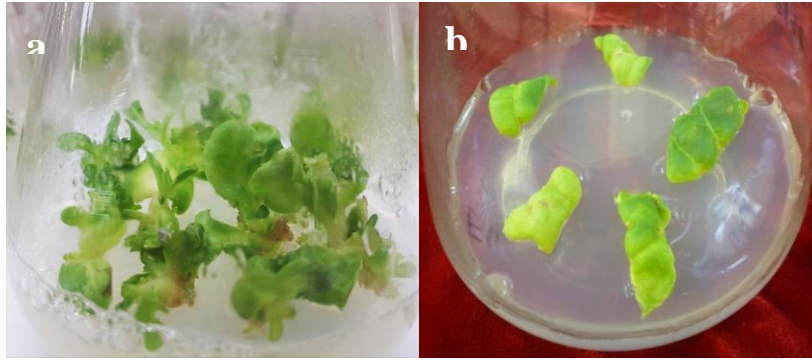
3.3.2. Sàng lọc khả năng chịu nhiệt của dòng thuốc lá chuyển gen trong *in vitro*

Dịch huyền phù vi khuẩn thu được có giá trị đo OD_{660nm} 0,5, đủ điều kiện để biến nạp vào mảnh lá thuốc lá. Sau biến nạp, các mảnh lá được đồng nuôi cấy 2 ngày trên môi trường MS + 1 mg/l BAP sau đó rửa khuẩn và đặt trên môi trường MS + 1 mg/l BAP + 500 mg/l cefotaxim. Sau 1 tuần được đưa vào buồng sinh trưởng (nhiệt độ $37 \pm 2^\circ C$, chiếu sáng 12h/ngày, độ ẩm 50%) trong thời gian 2 tuần. Sau 2 tuần các cụm chồi được tách và cấy chuyển sang môi trường MS + 1 mg/l BAP + 500 mg/l cefotaxim và đưa trở lại vào buồng sinh trưởng. Sau đó các chồi sinh trưởng tốt trong buồng sinh trưởng được cấy chuyển sang môi trường ra rễ (MS + 0,1 mg/l IBA) tạo cây hoàn chỉnh. Kết quả theo dõi quá trình tái sinh của các dòng thuốc lá qua các giai đoạn khác nhau thể hiện trong bảng sau:

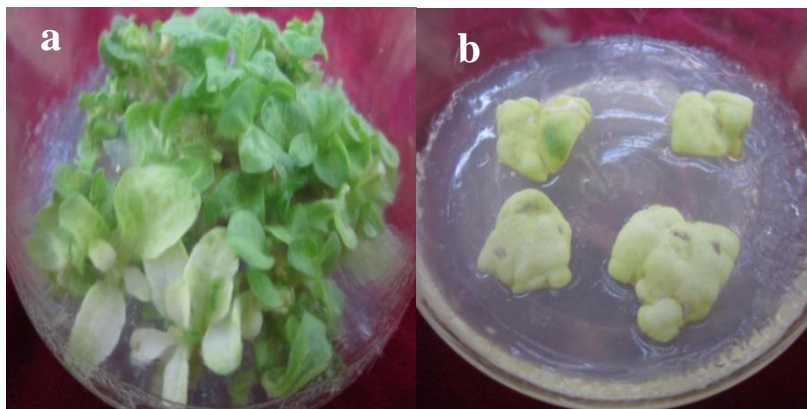
Bảng 3.1: Kết quả chuyển gen *codA* vào thuốc lá giống K326

Gen	Lô thí nghiệm	Số mảnh lá biến nạp	Số cụm chồi/MT tái sinh lần 1 (ở nhiệt độ 37°C)	Số cụm chồi/MT tái sinh lần 2 (ở nhiệt độ 37°C)	Số chồi cây/MT ra rễ (ở nhiệt độ 37°C)	Số chồi ra rễ (ở nhiệt độ 37°C)
	1	47	63	42	28	20
<i>codA</i>	2	56	89	47	20	13
	3	54	69	43	19	10
Tổng số		157	221	132	67	43
	1	52	7	0	0	0
WT	2	42	5	0	0	0
	3	57	3	0	0	0
Tổng số		151	15	0	0	0

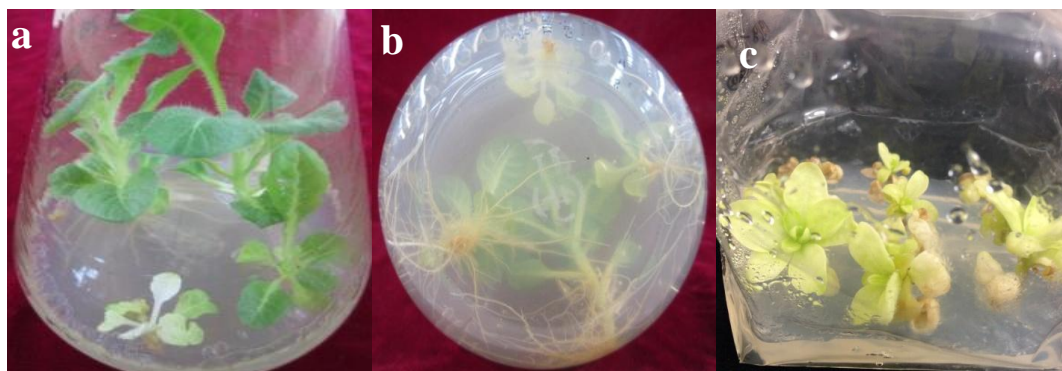
Sử dụng chủng vi khuẩn *A.tumefaciens* C58 mang vector chuyển gen nhị thể pCAMBIA1301/HSP-codA chuyển gen vào mảnh lá thuốc lá giống K326. Kết quả thu được như bảng trên cho thấy, sau 3 lần thí nghiệm chuyển cấu trúc gen *codA* vào 157 mảnh lá thuốc lá thu được 221 cụm chồi tái sinh trên môi trường có nhiệt độ 37°C sau thời gian 2 tuần, chọn lọc 132 chồi sinh trưởng, phát triển tốt (có thân, lá xanh đậm) cấy chuyển sang môi trường ra rễ chọn lọc ở nhiệt độ 37°C thu được 43 chồi ra rễ. Ngược lại, mảnh lá thuốc lá không được chuyển gen cấy chuyển sinh trưởng trên môi trường có nhiệt độ 37°C (làm đối chứng), 100% mẫu bị chết không tái sinh chồi. Điều này cho thấy khả năng các dòng thuốc lá tái sinh và ra rễ trên môi trường chọn lọc là các dòng đã được chuyển gen.



Hình 3.12. Mảnh lá chuyển gen *codA* tái sinh trên MT CT2 ở nhiệt độ 37°C sau 2 tuần.
a: chuyển gen *codA*; b: không chuyển gen (đối chứng).



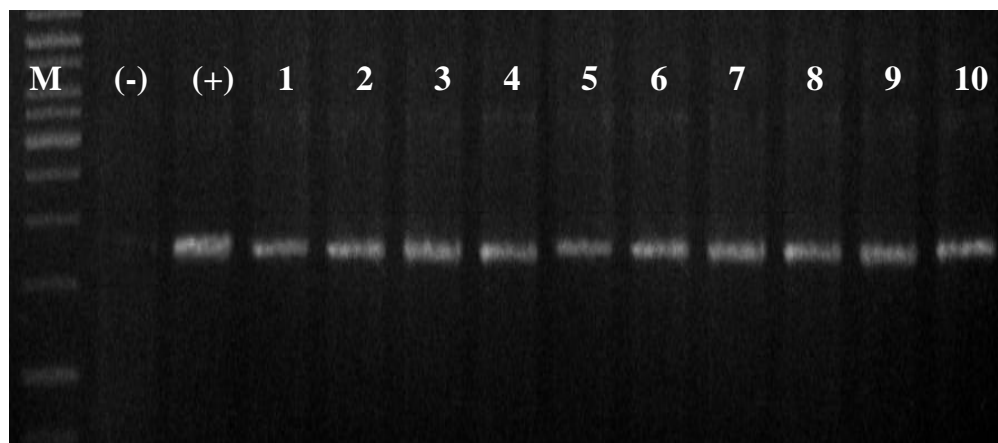
Hình 3.13. Cụm chồi tái sinh từ mảnh lá trên MT CT2 ở nhiệt độ 37°C sau 3 tuần.
a: chuyển gen *codA*; b: không chuyển gen (đối chứng).



Hình 3.14. Chồi thuốc lá trên môi trường ra rễ ở nhiệt độ 37°C.
a, b: Chồi chuyển gen; c: Chồi không chuyển gen (đối chứng)

3.3.3. Phân tích các dòng cây chuyển gen bằng kỹ thuật PCR

Để kiểm tra chắc chắn các dòng thuốc lá ra rễ được trên môi trường ở nhiệt độ 37°C là các dòng chuyển gen. Chúng tôi chọn ngẫu nhiên 10 dòng thuốc lá ra rễ chuyển gen *codA* và 1 dòng đối chứng không chuyển gen, thu lá tách chiết DNA tổng số làm khuôn cho phản ứng PCR. Sử dụng cặp mồi đặc hiệu F/CODA-XbaI và R/CMYC-SacI nhân gen *codA*, sản phẩm PCR cũng cho kết quả cả 10 dòng thuốc lá chuyển gen *codA* xuất hiện một băng DNA có kích thước khoảng 1,7 kb tương ứng với băng DNA xuất hiện ở mẫu đối chứng dương (plasmid pBI121:*codA*), mẫu đối chứng âm không xuất hiện băng DNA (hình 3.15). Kết quả này cho thấy các dòng thuốc lá chuyển gen *codA* ra rễ trên môi trường ở nhiệt độ 37°C là các dòng đã được chuyển gen.



Hình 3.15. Sản phẩm PCR nhân gen *codA* từ cây thuốc lá chuyển gen

M: thang DNA 1 kb; (-): cây không chuyển gen; (+): plasmid pBI121::*codA*; 1-10: các dòng thuốc lá chuyển gen *codA*.

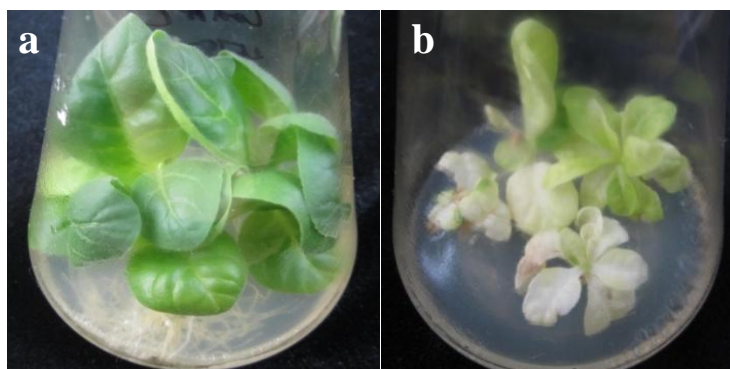
3.3.4. Sàng lọc khả năng chịu mặn của dòng thuốc lá chuyển gen trong *in vitro*

Các dòng thuốc lá chuyển gen *codA* được nuôi cấy trên môi trường ra rễ bổ sung thêm 200 mM NaCl (theo nghiên cứu của nhóm nghiên cứu B.V.Thắng và cs). Bên cạnh đó chúng tôi cũng sử dụng dòng thuốc lá không chuyển gen để làm đối chứng. Từ 43 dòng thuốc lá chuyển gen *codA* đã được phân tích PCR trong thí nghiệm trên, chúng tôi tiến hành cấy trên môi trường bổ sung muối, sau 3 tuần thu được 8 chồi ra rễ chiếm 18,6%; 35 dòng còn lại không ra rễ, lá bị bạch tạng do mất diệp lục (cây ngừng sinh trưởng và chết). Trong khi đó các dòng không chuyển gen

khi nuôi cây trên môi trường có nồng độ NaCl 200 mM đều cho lá bị bạch tạng và chết sau 3 tuần nuôi cấy.

Bảng 3.2: Dòng thuốc lá chuyển gen *codA* ra rễ trên môi trường 200 mM NaCl

Gen	Số dòng thí nghiệm	Số dòng chết (lá mất diệp lục)	Số dòng ra rễ	Tỉ lệ (%)
<i>codA</i>	43	35	8	18,6
cây WT	15	15	0	0,00

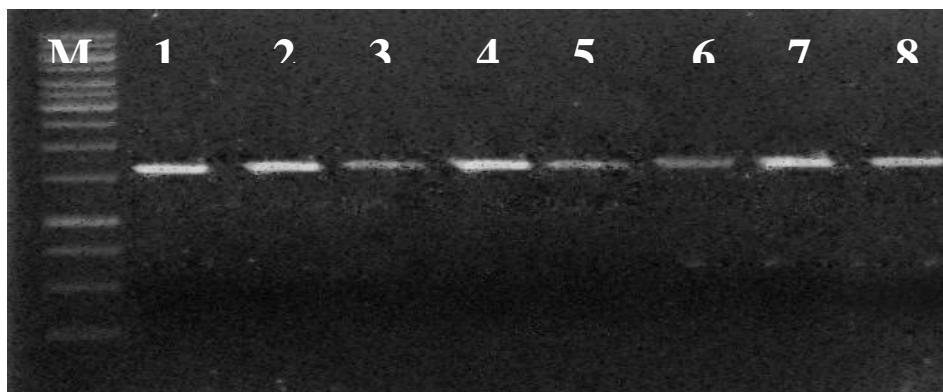


Hình 3.16: Các dòng thuốc lá chuyển gen *codA* và không chuyển gen trên môi trường ra rễ có 200 mM NaCl.

a: dòng thuốc lá chuyển gen *codA*; **b:** dòng thuốc lá không chuyển gen (WT).

3.2.5. Phân tích cây thuốc lá chuyển gen *codA* bằng kỹ thuật RT-PCR

Để xác định khả năng hoạt động của gen *codA* trong các cây chuyển gen dương tính với PCR, chúng tôi tiến hành phản ứng RT-PCR. Đây là kỹ thuật cho phép phát hiện nhanh sự biểu hiện của gen chuyển thông qua hoạt động phiên mã của gen ngoại lai trong cây thuốc lá chuyển gen. Các cây thuốc lá được tách chiết RNA tổng số, thực hiện tổng hợp cDNA bằng enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase) và sau đó tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *codA_F* và *codA_R*. Sản phẩm RT-PCR được kiểm tra trên gel agarose 0,8% (Hình 3.17).



Hình 3.17: Sản phẩm RT-PCR từ mRNA của các dòng thuốc lá K326 chuyển gen *codA*

M: thang chuẩn DNA 1kb; **1 - 8:** sản phẩm RT-PCR các cây thuốc lá chuyển gen

Kết quả cả 8 dòng chuyển gen đều dương tính với phản ứng RT-PCR, xuất hiện một băng DNA kích thước khoảng 1700 bp. Điều này chỉ ra rằng cả 8 dòng thuốc lá chuyển gen *codA* dưới sự điều khiển của promoter HSP đều có sự biểu hiện mạnh ở mức độ mRNA (Hình 3.17). Như vậy, cấu trúc pCAMBIA1301/HSP-*codA* hoạt động tốt trong cây thuốc lá. Và có thể sử dụng gen *codA* thay thế cho gen chọn lọc kháng sinh.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

KẾT LUẬN:

- Đã thiết kế thành công vector chuyển gen pCAMBIA1301/HSP-*codA* loại bỏ gen chọn lọc kháng sinh *hptII* và tạo được chủng *Agrobacterium tumefaciens* C58/pGV2260 chứa vector chuyển gen pCAMBIA1301/HSP-*codA*.
- Đã chuyển thành công cấu trúc pCAMBIA1301/HSP-*codA* vào cây thuốc lá thông qua *Agrobacterium tumefaciens*.
- Bước đầu đánh giá khả năng chọn lọc cây thuốc lá chuyển gen trên trong điều kiện nhiệt độ cao và khả năng chống chịu mặn thay thế cho các gen kháng kháng sinh. Kết quả thu được 8 dòng cây sống sót được trên môi trường có nồng độ NaCl là 200 mM và được đánh giá hoạt động ở mức độ mARN.

ĐỀ NGHỊ:

- Chọn lọc cây thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc pCAMBIA1301/HSP-*codA* với các điều kiện khác như chịu nóng và chịu hạn.
- Chuyển cấu trúc pCAMBIA1301/HSP-*codA* vào các đối tượng thực vật khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Lê Trần Bình, Hồ Hữu Nhị, Lê Thị Muội (1997), Công nghệ sinh học thực vật trong cải tiến giống cây trồng. NXB Nông nghiệp. 107.
2. Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (1999), Phân lập gen và chọn dòng chống chịu ngoại cảnh bất lợi ở cây lúa. NXB Đại học quốc gia, Hà Nội.
3. Nguyễn Đức Thành (2000), Nuôi cấy mô tế bào thực vật - nghiên cứu và ứng dụng. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
4. Bùi Văn Thắng – Nghiên cứu tăng cường khả năng chống chịu hạn và mặn của cây Xoan ta (*Melia azedarach* L.) bằng chuyển gen, Luận án tiến sĩ, 2014, Viện Công nghệ sinh học.

Tiếng Anh

5. Alia, Hayashi H, Sakamoto A, Murata N (1998b) Enhancement of the tolerance of *Arabidopsis* to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. *Plant J* 16: 155–161.
6. Alia, Kondo Y, Sakamoto A, Nonaka H, Hayashi H, Pardha Saradhi P, Chen THH, Murata N (1999) Enhanced tolerance to light stress of transgenic *Arabidopsis* plants that express the *codA* gene for a bacterial choline oxidase. *Plant Mol Biol* 40: 279-288.
7. Aragao FJL, Sarokin L, Vianna GR, Rech EL. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *Theor Appl Genet* 2000;101: 1–6.
8. Arumugam N, Gupta V, Jagannath A, Mukhopadhyay A, Pradhan AK, Burma PK, et al. A passage through in vitro culture leads to efficient production of marker-free transgenic plants in *Brassica juncea* using the Cre-loxP system. *Transgenic Res* 2007;16:703–12.
9. Aswath CR, Mo SY, Kim DH, Park SW (2006) *Agrobacterium* and biolistic transformation of onion using non-antibiotic selection marker phosphomannose isomerase. *Plant Cell Rep* 5, 92 -99.

10. Avonce N, Leyman B, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijck P, Thevelein JM, Iturriaga G. The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid and stress signaling. *Plant Physiol* 2004;136:3649–59.
11. Bai X, Wang Q, Chu C. Excision of a selective marker in transgenic rice using a novel Cre/ loxP system controlled by a floral specific promoter. *Transgenic Res* 2008;17: 1035–43.
12. Bhatnagar M, Prasad K, Bhatnagar-Mathur P, Narasu ML, Waliyar F, Sharma KK. An efficient method for the production of marker-free transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Rep* 2010;29:495–502.
13. Boscariol RI, Almeida WAB, Derbyshire MTVC, Mourao Filho FAA, Mendes BMJ (2003) The use of the PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L.Osbeck). *Plant Cell Rep* 22, 122-128.
14. Breitler JC, Meynard D, Van Boxtel J, Royer M, Bonnot F, Cambillau L, et al. A novel two TDNA binary vector allows efficient generation of marker-free transgenic plants in three elite cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Transgenic Res* 2004;13:271–87.
15. Cuellar W, Gaudin A, Solorzano D, Casas A, Nopo L, Chudalayandi P, et al. Self-excision of the antibiotic resistance gene nptII using a heat inducible Cre–loxP system from transgenic potato. *Plant Mol Biol* 2006;62:71–82.
16. Daniell H, Muthukumar B, Lee SB. Marker-free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr Genet* 2001;39: 109–16.
17. De Vetten N, Wolters AM, Raemakers K, Meer I, Stege RT, et al. A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nat Biotechnol* 2003;21:439–42.
18. Endo S, Kasahara T, Sugita K, Matsunaga E, Ebinuma H. The isopentyl transferase gene is effective as a selectable marker gene for plant transformation in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Petite havana SR1). *Plant Cell. Rep* 2001;20:60–6.

19. Erikson O, Hertzberg M, Näsholm T. A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. *Nat Biotechnol* 2004;22:455–8.
20. Erikson O, Hertzberg M, Näsholm T. The *dsdA* gene from *Escherichia coli* provides a novel selectable marker for plant transformation. *Plant Mol Biol* 2005;57:425–33.
21. Everard JD, Cantini C, Grumet R, Plummer J, Loescher WH. Molecular cloning of mannose 6-phosphate reductase and its developmental expression in celery. *Plant Physiol* 1997;113:1427–35.
22. Haldrup A, Petersen SG, Okkels FT. Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry. *Plant cell Rep* 1998;18:76–81.
23. Hayashi H, Alia, Mustardy L, Deshnum P, Ida M, Murata N. (1997), Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the CODA gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J*, 12 (1), 133-142+_1.
24. Hayashi H, Alia, Sakamoto A, Nonaka H, Chen THH, Murata N (1998) Enhanced germination under high salt conditions of seeds of transgenic *Arabidopsis* with a bacterial gene (*codA*) for choline oxidase. *J Plant Res* 111: 357– 362.
25. He PM, Zhang DB, Liang WQ, Yao QH, Zhang RX. (2001), Expression of Choline Oxidase Gene (CODA) Enhances Salt Tolerance of the Tobacco. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao*, 33 (5), 519-524.
26. Helmer G, Casadaban M, Bevan M, Kayes L, Chilton MD. A new chimeric gene as a marker for plant transformation: the expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in sunflower and tobacco cells. *Nat Biotechnol* 1984;2:520–7.
27. Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumasho T (1994) “Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries the T-DNA”, *The Plant J* (271-282)
28. Huang J, Hirji R, Adam L, Rozwadowski KL, Hammerlindl JK, Keller WA, Selvaraj G (2000) Genetic engineering of glycinebetaine production toward

- enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol* 122: 747–756.
29. Huang S, Gilbertson LA, Adams TH, Malloy KP, Reisenbigler EK, Birr DH, et al. Generation of marker-free transgenic maize by regular two-border *Agrobacterium* transformation vectors. *Transgenic Res* 2004;13:451–61.
 30. Jacob S, Veluthambi K. Generation of selection marker-free transgenic plants by cotransformation of a cointegrate vector T-DNA and a binary vector T-DNA in one *Agrobacterium* strain. *Plant Sci* 2002;163:801–6.
 31. Jia H, Liao M, Verbelen JP, Vissenberg K. Direct creation of marker-free tobacco plants from agroinfiltrated leaf discs. *Plant Cell Rep* 2007;26:1961–5.
 32. Jin WZ, Duan RJ, Zhang F, Chen SY, Wu YR, Wu P. Application of Ac/Ds transposon system to generate marker gene free transgenic plants in rice. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2003;19:668–73.
 33. Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, Petersen SG, Brunstedt J, Okkels FT (1998) Analysis of Mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol Breed* 4,11-117.
 34. Kondrak M, van der Meer IM, Banfalvi Z. Generation of marker- and backbone-free transgenic potatoes by site-specific recombination and a bi-functional marker gene in a non-regular one-border *Agrobacterium* transformation vector. *Transgenic Res* 2006;15:729–37.
 35. Kopertekh L, Schulze K, Frolov A, Strack D, Broer I, Schiemann J. Cre-mediated seed-specific transgene excision in tobacco. *Plant Mol Biol* 2010;72:597–605.
 36. Kumar S, Arul L, Talwar D. Generation of marker-free Bt transgenic indica rice and evaluation of its yellow stem borer resistance. *J Appl Genet* 2010;51:243–57.
 37. Li Z, Xing A, Moon BP, Burgoyne SA, Guida AD, Liang H, et al. A Cre/loxP-mediated self-activating gene excision system to produce marker gene free transgenic soybean plants. *Plant Mol Biol* 2007;65:329–41.

38. Li B, Li N, Duan X, Wei A, Yang A, Zhang J. Generation of marker-free transgenic maize with improved salt tolerance using the FLP/FRT recombination system. *J Biotechnol* 2010;145:206–13.
39. Li S, Li F, Wang J, Zhang W, Meng Q, Chen T H, Yang Y. (2011), Glycinebetaine enhances the tolerance of tomato plants to high temperature during germination of seeds and growth of seedlings. *Plant Cell Environ*, 34 (11), 1931 – 1942+1.
40. Lopez-Juez E, Jarvis RP, Takeuchi A, Page AM, Choury J. New Arabidopsis cue mutants suggest a close connection between plastid- and phytochrome-regulation of nuclear gene expression. *Plant Physiol* 1998;118:803–15.
41. Luo K, Zheng X, Chen Y, Xiao Y, Zhao D, McAvoy R, et al. The maize Knotted1 gene is an effective positive selectable marker gene for Agrobacterium-mediated tobacco transformation. *Plant Cell Rep* 2006;25:403–9.
42. Luo K, Sun M, Deng W, Xu S. Excision of selectable marker gene from transgenic tobacco using the GM-gene-deletor system regulated by a heat-inducible promoter. *Biotechnol Lett* 2008;30:1295–302.
43. Matsunaga E, Nanto K, Oishi M, Ebinuma H, Morishita Y, Sakurai N, Shimada T, (2012), Agrobacterium – mediated transformation of Eucalyptus globulus using explant with shoot apex with introduction of bacterial choline oxidase gene to enhance salt tolerance. *Plant Cell Rep*, 31 (1), 225-235.
44. Mentewab A, Stewart Jr CN. Overexpression of an Arabidopsis thaliana ABC transporter confers kanamycin resistance to transgenic plants. *Nat Biotechnol* 2005;23: 1177–80.
45. Miles JS, and Guest JR (1984) Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (manA) of *Escherichia coli*. *Gene* 32, 41 – 48.
46. Mohanty A, Kathuria H, Ferjani A, Sakamoto A, Mohanty P, Murata N, Tyagi AK, (2002), Transgenics of an elite indica rice variety Pusa Basmati 1 harbouring the CODA gene are highly tolerant to stress. *Theor Appl Genet*, 106 (1), 51-57.

47. Nishimura A, Ashikari M, Lin S, Takashi T, Angeles ER, Yamamoto T, et al. Isolation of a rice regeneration quantitative trait loci gene and its application to transformation systems. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:11940–4.
48. Ow DW, Wood KV, DeLuca M, De Wet JR, Helinski DR, Howell SH. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 1986;234:856–9.
49. Park EJ, Jeknic Z, Sakamoto A, DeNoma J, Yuwansiri R, Murata N, Chen THH (2004) Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage. *Plant J* 40: 474–487.
50. Park EJ, Jeknic Z, Pino MT, Murata N, Chen THH (2007a) Glycinebetaine accumulation is more effective in chloroplasts than in the cytosol for protecting transgenic tomato plants against abiotic stress. *Plant Cell Environ* 30: 994–1005.
51. Prakash SN, Bhojaraja R, Shivbachan SK, Hari Priya GG, Nagraj TK, Prasad V, et al. Marker-free transgenic corn plant production through co-bombardment. *Plant Cell Rep* 2009;28:1655–68.
52. Rajeswaran R, Sunitha S, Shivaprasad PV, Pooggin MM, Hohn T, Veluthambi K. The Mungbean yellow mosaic begomovirus transcriptional activator protein transactivates the viral promoter-driven transgene and causes toxicity in transgenic tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 2007;20:1545–54.
53. Ramanathan V, Veluthambi K. Transfer of non T-DNA portions of *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of TL-DNA. *Plant Mol Biol* 1995;28:1149–54.
54. Rathinasapathi B, Brunet M, Russell BL, Gage DA, Liao PC, Nye GJ, Scott P, Golbeck JH, Hanson AD, (1997), Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plant: Prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3454–3458.

55. Rathinasapathi B, Fouad WM, Sigua CA. (2001), b-Alanine betaine synthesis in the Plumbaginaceae. Purification and characterization of a trifunctional, S-adenosyl-L-methionine-dependent N-ethyltransferase from *Limonium latifolium* leaves. *Plant Physiol* 126: 1241-1249.
56. Saelim L, Phansiri S, Suksangpanomrung M, Netrphan S, Narangajavana J. Evaluation of a morphological marker selection and excision system to generate marker-free transgenic cassava plants. *Plant Cell Rep* 2009;28:445–55.
57. Sakamoto A, Alia, Murata N (1998) Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Mol Bio* 138: 1011–1019.
58. Sakamoto A, Murata N (2000) Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *J Exp Bot* 51: 81–88.
59. Schaart JG, Krens FA, Pelgrom KT, Mendes O, Rouwendal GJ. Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. *Plant Biotechnol J* 2004;2:233–40.
60. Sengupta S, Chakraborti D, Mondal HA, Das S. Selectable antibiotic resistance marker gene-free transgenic rice harbouring the garlic leaf lectin gene exhibits resistance to sap-sucking plant hoppers. *Plant Cell Rep* 2010;29:261–71.
61. Shichiri M, Hoshikawa C, Nakamori S, Takagi H. A novel acetyltransferase found in *Saccharomyces cerevisiae* Σ 1278b that detoxifies a proline analogue, azetidine-2- carboxylic acid. *J Biol Chem* 2001;276:41998–2002.
62. Sreekala C, Wu L, Gu K, Wang D, Tian D, Yin Z. Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated Cre/loxP system. *Plant Cell Rep* 2005;24:86–94.
63. Sripriya R, Raghupathy V, Veluthambi K. Generation of selectable marker-free sheath blight resistant transgenic rice plants by efficient co-transformation of a cointegrate vector T-DNA and a binary vector T-DNA in one *Agrobacterium tumefaciens* strain. *Plant Cell. Rep* 2008;27:1635–44.

64. Stougaard J. Substrate-dependent negative selection in plants using a bacterial cytosine deaminase gene. *Plant J* 1993;3:755–61.
65. Sulpice R, Tsukaya H, Nonaka H, Mustardy L, Chen TH, Mutara N, (2003), Enhanced formation of flowers in salt-stressed *Arabidopsis* after genetic engineering of the synthesis of glycine betaine. *Plant J*, 36 (2), 165-176.
66. Tinland B, Schoumacher F, Gloeckler V, Bravo AM, Angel M, and Hohn B (1996) The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *EMBO Journal* 14: 3585- 3595.
67. Tsai FY, Brotherton JE, Widholm JM. Overexpression of the feedback-insensitive anthranilate synthase gene in tobacco causes tryptophan accumulation. *Plant Cell Rep* 2005;23:548–56.
68. Verweire D, Verleyen K, De Buck S, Claeys M, Angenon G. Marker-free transgenic plants through genetically programmed auto-excision. *Plant Physiol* 2007;145:1220–31.
69. Waditee R, Bhuiyan MN, Rai V, Aoki K, Tanaka Y, Hibino T (2005) Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 1318–1323.
70. Wang F, Zeng B, Sun Z, Zhu C (2010) Relationship between proline and Hg²⁺-induced oxidative stress in a tolerant rice mutant. *Arch Environ Contam Toxicol* 56: 723–731.
71. Woo HJ, Cho HS, Lim SH, Shin KS, Lee SM, Lee KJ, et al. Auto-excision of selectable marker genes from transgenic tobacco via a stress inducible FLP/FRT site-specific recombination system. *Transgenic Res* 2009;18:455–65.
72. Xia ZH, Li XB, Chen CY, Fan HK, Jiang GH, Zhu LH, et al. Generation of selectable markerfree and vector backbone sequence-free Xa21 transgenic rice. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2006;22:204–10.
73. Yang A, Su Q, An L. Ovary-drip transformation: a simple method for directly generating vector- and marker-free transgenic maize (*Zea mays* L.) with a linear GFP cassette transformation. *Planta* 2009;229:793–801.

- 74.Ye GN, Colburn S, Xu CW, Hajdukiewicz PTJ, Staub JM. Persistence of unselected transgenic DNA during a plastid transformation and segregation approach to herbicide resistance. *Plant Physiol* 2003;33:402–40.
- 75.Ye XG, Qin H. Obtaining marker-free transgenic soybean plants with optimal frequency by constructing three T-DNAs binary vector. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2007;23:138–44.
- 76.Zhang P, Puonti-Kaerlas J (2000) PIG – mediated cassava transformation using positive and negative selection. *Plant Cell Rep* 19,1041-1048.
- 77.Zhang Y, Li H, Ouyang B, Lu Y, Ye Z. Chemical-induced autoexcision of selectable markers in elite tomato plants transformed with a gene conferring resistance to lepidopteran insects. *Biotechnol Lett* 2006;28:1247–53.
- 78.Zhang Y, Liu H, Li B, Zhang JT, Li Y, Zhang H. Generation of selectable marker-free transgenic tomato resistant to drought, cold and oxidative stress using the Cre/loxP DNA excision system. *Transgenic Res* 2009;18:607–19.

