

THIẾT KẾ VECTOR MANG CẤU TRÚC GEN DREB2 PHỤC VỤ CHUYỂN GEN KHÁNG HẠN Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG

TỔNG QUAN

Trong những năm gần đây, do biến đổi khí hậu, tình trạng khô hạn kéo dài đã xảy ra ở nhiều vùng trên đất nước ta cũng như trên thế giới. Việc chọn tạo giống cây trồng hiện nay, ngoài vấn đề quan tâm đến năng suất, phẩm chất, tính chống chịu nói chung... Các nhà chọn giống thực vật đang quan tâm đến tính chịu hạn của cây trồng trong đó có cây đậu tương. Bằng các phương pháp chọn giống truyền thống, mặc dù kỹ thuật chọn ra các cây trồng có khả năng chịu hạn thường đơn giản, dễ làm, song mới dừng lại ở khâu chọn ra các cá thể có biểu hiện chịu hạn, thời gian chọn tạo dài và chưa đi sâu vào cơ chế phân tử của đặc tính này. Bên cạnh đó, khả năng chịu hạn chưa chắc đã đi kèm với năng suất cao và phẩm chất tốt. Phương pháp tạo giống bằng công nghệ gen, đặc biệt là kỹ thuật chuyển gen bước đầu đã làm sáng tỏ cơ chế phân tử của tính chịu hạn, có thể tạo ra giống cây trồng vừa có năng suất cao, phẩm chất tốt lại vừa có khả năng chịu hạn chỉ trong thời gian ngắn. Các công trình nghiên cứu về đặc tính chịu hạn của cây đậu tương cho thấy, khả năng chịu hạn của cây đậu tương liên quan đến nhiều gen, mặc dù chưa xác định được gen nào mang tính quyết định song có thể chia làm hai nhóm: Gen chức năng và gen điều khiển.

Hiện nay, kỹ thuật chuyển gen để nâng cao tính chịu hạn của cây trồng trong đó có cây đậu tương đang được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và ở Việt Nam đã có một vài công trình nghiên cứu tiến hành theo hướng sử dụng kỹ thuật chuyển gen để cải thiện khả năng chịu hạn của cây đậu tương (Trần Thị Phương Liên và đtg, 1998), (Chu Hoàng Mậu và đtg, 2011), (Nguyễn Thị Thúy Hùng và đtg, 2008). Nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới về DREB (Dehydration-responsive element-binding) đã cho rằng: DREB là một họ protein. Các protein DREB là nhân tố phiên mã kích hoạt nhóm gen liên quan đến tính chịu hạn của thực vật nói chung và của cây đậu tương nói riêng. Nhân tố phiên mã DREB đóng vai trò quan trọng trong biểu hiện gen trong môi trường cực đoan và đối với quá trình phát triển cây trồng. Trên cơ sở tương tự và đặc tính của chuỗi axit amin gen DREB được chia thành 5 nhóm, nhóm thứ nhất gồm DREB3, DREB4 và DREB5; nhóm thứ hai gồm W5, DREB6, DREB7 và DREB1; nhóm thứ ba gồm DREB2 và DREB8; nhóm thứ tư gồm DREB9 và DREB10; nhóm thứ năm gồm DREB11, ERF1, ERF2 (Liu và cộng sự, 1998; Riechman và cộng sự, 2000; Tsui-Hung Phang, 2008).

Việc nghiên cứu về DREB đang được các nhà khoa học quan tâm, vì các nhân tố DREB không trực tiếp tham gia vào quá trình chống chịu hạn nhưng chúng đã tác động đến khả năng chịu hạn bằng cách kích hoạt đồng thời sự biểu hiện của gen chống chịu. Nghiên cứu nhân tố phiên mã DREB và gen mã hoá nhân tố này là cơ sở để cải thiện khả năng chống chịu của cây trồng đối với hạn thông qua kỹ thuật chuyển gen.

MỤC TIÊU

- (1) Tạo được vector mang cấu trúc gen DREB2 phục vụ tạo cây chuyển gen kháng hạn.
- (2) Đánh giá hoạt động của vector chuyển gen trên cây thuốc lá mô hình

NỘI DUNG

Nội dung 1. Phân lập gen DREB từ mRNA của cây đậu tương

- (1) Thu thập thông tin về nhóm gen DREB và nhóm nhân tố phiên mã DREB; về gen DREB2 và protein DREB2;
- (2) Thiết kế và tổng hợp cặp mô PCR nhân gen DREB2 từ cây đậu tương;
- (3) Nhân bản gen DREB2 từ mRNA: Tách chiết RNA tổng số, tạo cDNA, khuếch đại gen DREB2 (cDNA);
- (4) Tách dòng cDNA gen DREB2: Tạo vector tách dòng tái tổ hợp, biến nạp vào vi khuẩn E.coli DH5a, nhân dòng và tách plasmid tái tổ hợp;
- (5) Xác định trình tự gen DREB2 trên thiết bị tự động;
- (6) Phân tích trình tự gen DREB2 để khẳng định gen DREB2 đã được phân lập;
- (7) So sánh trình tự gen DREB2, protein DREB2 và vùng AP2 được phân lập với các trình tự gen DREB2 đã công bố trên GenBank để đánh giá sự đa dạng của gen DREB2 và nhân tố phiên mã DREB2, vùng AP2.

Nội dung 2. Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc gen DREB

- (1) Lựa chọn vector chuyển gen phù hợp ở thực vật trong điều kiện phòng thí nghiệm;
- (2) Tạo vector chuyển gen mang cấu trúc gen DREB2;
- (3) Kiểm tra vector tái tổ hợp bằng enzym giới hạn và bằng phản ứng colony-PCR;

Nội dung 3. Tạo chủng vi khuẩn Agrobacterium tumefaciens mang vector chứa cấu trúc gen DREB2;

- (1) Biến nạp vector chuyển gen tái tổ hợp mang gen DREB2 vào Agrobacterium tumefaciens;
- (2) Nuôi cấy và nhân dòng Agrobacterium tumefaciens tái tổ hợp;
- (3) Chọn dòng Agrobacterium tumefaciens tái tổ hợp bằng colony-PCR;

Nội dung 4. Phát triển hệ thống tái sinh ở cây thuốc lá mô hình và tạo cây chuyển gen

- (1) Lấy nhiễm m Agrobacterium tumefaciens tái tổ hợp vào mô thuốc lá,;
- (2) Phát triển hệ thống tái sinh cây thuốc lá từ lá và từ một vài bộ phận khác;
- (3) Sử dụng hệ thống chọn lọc mô, chồi chuyển gen;
- (4) Tạo cây thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc DREB2.

Nội dung 5. Kiểm tra kết quả biến nạp và hoạt động của cấu trúc gen DREB2 trong cây thuốc lá mô hình. Phân tích cây chuyển gen

- (1) Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển DREB2 bằng phản ứng PCR;
- (2) Kiểm tra sự biểu hiện của gen chuyển DREB2 bằng RT-PCR;
- (3) So sánh khả năng chịu hạn của dòng cây chuyển gen so với cây đối chứng không chuyển gen.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- (i) Thu thập thông tin về gen DREB2, thiết kế cặp mô PCR nhân gen DREB2
- (ii) Phương pháp sinh học phân tử: tách chiết RNA tổng số, tổng hợp cDNA từ mRNA bằng kỹ thuật RT-PCR, tách dòng và xác định trình tự gen DREB2 của cây đậu tương;
- (iii) Thiết kế vector chuyển gen chứa gen DREB2 theo phương pháp được mô tả theo Sambrook và cộng sự 1998.
- (iv) Phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật: Phát triển hệ thống tái sinh cây thuốc lá từ các mảnh lá.

(v) Biến nạp, kiểm tra kết quả biến nạp và đánh giá hoạt động của vector mang gen DREB2 ở cây thuốc lá. Phân tích cây thuốc lá chuyển gen bằng PCR và RT-PCR.

(vi) Đánh giá khả năng chịu hạn của dòng cây chuyển gen so với cây đối chứng trong điều kiện hạn nhân tạo;

(vii) Phương pháp phân tích số liệu thống kê bằng phần mềm Excel. Phân tích trình tự gen bằng phần mềm BioEdit và DNASTAR. So sánh trình tự gen, trình tự amino acid của protein bằng phần mềm Megalign.

HIỆU QUẢ KTXH

Hiệu quả về Giáo dục và đào tạo: (i) Kết quả nghiên cứu của đề tài là tài liệu khoa học sẽ được sử dụng trong giảng dạy các chuyên đề cho hệ đào tạo thạc sĩ; (ii) Tham gia đào tạo 01 NCS; đào tạo 02 thạc sĩ và 02 đề tài NCKH của sinh viên; (iii) Kết quả nghiên cứu của đề tài là tài liệu phục vụ nghiên cứu, đào tạo ngành Sinh học và Công nghệ Sinh học tại ĐH Thái Nguyên.

Hiệu quả về kinh tế - xã hội: (i) Vector mang cấu trúc gen DREB điều khiển hoạt động của nhóm gen liên quan đến tính chịu hạn có thể chuyển vào các đối tượng cây trồng khác. (ii) Các kết quả nghiên cứu là cơ sở phát triển các kỹ thuật chuyển gen nhằm cải thiện đặc tính chống chịu của cây trồng tại các phòng thí nghiệm thuộc trường Đại học Sư phạm và Đại học Thái nguyên.

ĐƠN VỊ SỬ DỤNG

Khoa Sinh – Kỹ thuật nông nghiệp, Trường Đại học sư phạm-ĐH Thái Nguyên;