

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC

BÁO CÁO TỔNG KẾT ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
CẤP ĐẠI HỌC

Tên đề tài

TÁCH DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA ENZYME
DEACETYL VINDOLINE 4-O-ACETYLTRANSFERASE (DAT)
THAM GIA TỔNG HỢP ALKALOID TỪ CÂY
DỪA CẠN (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)

Mã số: ĐH2016 – TN05-04

Chủ nhiệm đề tài: ThS. Bùi Thị Hà

THÁI NGUYÊN, 2018

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT ĐỀ TÀI KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
CẤP ĐẠI HỌC**

Tên đề tài

**TÁCH DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA ENZYME
DEACETYL VINDOLINE 4-O-ACETYLTRANSFERASE (DAT)
THAM GIA TỔNG HỢP ALKALOID TỪ CÂY
DỪA CẠN (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)**

Mã số: ĐH2016 – TN05-04

Xác nhận của tổ chức chủ trì

(ký, ghi rõ họ tên)

Chủ nhiệm đề tài

ThS. Bùi Thị Hà

THÁI NGUYÊN, 2018

DANH SÁCH THÀNH VIÊN THAM GIA ĐỀ TÀI**I. Danh sách thành viên**

STT	Họ và tên	Đơn vị công tác
1	Nguyễn Thị Tâm	Khoa sinh học, ĐH Sư phạm Thái Nguyên
2	Nguyễn Thu Hiền	Bộ môn Sinh học, ĐH Y Dược Thái Nguyên
3	Nguyễn Huy Hoàng	Bộ môn Sinh học, ĐH Y Dược Thái Nguyên

II. Đơn vị phối hợp thực hiện

1. Khoa sinh học, Trường ĐH Sư phạm, ĐH Thái Nguyên
2. Bộ môn Sinh học, ĐH Y Dược Thái Nguyên
3. Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
MỤC LỤC	ii
DANH MỤC KÝ HIỆU, CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH	vii
MỞ ĐẦU.....	1
1. Đặt vấn đề	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu.....	2
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. ALKALOID Ở CÂY DỪA CẠN.....	4
1.1.1. Vai trò của alkaloid thực vật	4
1.1.2. Alkaloid ở cây dứa cạn	6
1.2. SINH TỔNG HỢP ALKALOID VÀ HOẠT ĐỘNG CỦA ENZYME DAT Ở CÂY DỪA CẠN	10
1.2.1. Quá trình sinh tổng hợp alkaloid ở cây dứa cạn.....	10
1.2.2. Hoạt động của enzyme DAT và gen <i>DAT</i>	17
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	19
2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	19
2.1.1. Vật liệu thực vật.....	19
2.1.2. Chủng vi khuẩn và các loại vector.....	19
2.2. HÓA CHẤT, THIẾT BỊ VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	19
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	20
2.3.1. Các phương pháp sinh học phân tử.....	20
2.3.2. Phương pháp thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc chứa gen <i>CrDAT</i>	24
2.3.3. Chuyển cấu trúc mang gen <i>CrDAT</i> vào cây thuốc lá.....	28

2.3.4. Phương pháp phân tích cây chuyển gen	29
2.3.5. Phương pháp tính hiệu suất chuyển gen	31
2.3.6. Các phương pháp phân tích, xử lý số liệu	31
3.1. ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN <i>CrDAT</i> PHÂN LẬP TỪ CÂY DỪA CẠN.....	32
3.1.1. Kết quả tách dòng và xác định trình tự nucleotide của gen <i>CrDAT</i>	32
3.1.2. So sánh trình tự nucleotide của gen <i>CrDAT</i>	34
3.2. THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN MANG GEN <i>CrDAT</i>	39
3.2.1. Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc chứa gen <i>CrDAT</i>	Error! Bookmark no
3.2.2. Phân tích biểu hiện gen <i>CrDAT</i> trên cây thuốc lá chuyển gen	44
3.2.3. Thảo luận kết quả thiết kế và đánh giá hoạt động của vector chuyển gen pBI121- <i>CrDAT</i>	50
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	54
1. Kết luận.....	54
2. Đề nghị.....	54
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	55
PHỤ LỤC	64

DANH MỤC KÝ HIỆU, CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
35S	Promoter CaMV 35S	
bp	base pair	Cặp bazơ nitơ
DNA	Deoxyribonucleic acid	
cDNA	Complementary DNA	DNA bổ sung
<i>DAT</i>	Deacetyl vindoline 4-O-acetyltransferase	Gen <i>DAT</i>
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	
Kb	Kilo base	
kDa	Kilo Dalton	
LB	Luria Bertami	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy vi khuẩn
MS	Murashige và Skoog	Tên gọi đặt cho môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy mô thực vật
mRNA	Messenger ribonucleic acid	
<i>NptII</i>	Neomycin phosphatranferaseII	Gen kháng kanamycine
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
RNA	Ribonucleic acid	
rCrDAT	Recombinant CrDAT protein	Protein DAT tái tổ hợp
SDS	Sodium dodecyl sulfate	
TAE	Tris Acetate EDTA	

<i>Taq</i> DNA polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polymerase	
T-DNA	Transfer DNA	Đoạn DNA được chuyển vào thực vật
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	
WT	Wild type	Cây không chuyển gen
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galacto-pyranoside	

DANH MỤC CÁC BẢNG

	<i>Trang</i>
Bảng 2.1. Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu.....	21
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR.....	21
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng gắn gen <i>CrDAT</i> vào vector tách dòng.....	22
Bảng 2.4. Thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn	23
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng cắt DNA bằng <i>BamHI</i>	24
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng cắt plasmid bằng <i>NotI/ NcoI</i>	26
Bảng 2.7. Thành phần phản ứng cắt plasmid bằng <i>HindIII</i>	26
Bảng 3.1. Các vị trí nucleotide sai khác giữa ba trình tự nucleotide của gen <i>CrDAT</i>	35
Bảng 3.2. Các vị trí sai khác giữa trình tự amino acid suy diễn của protein DAT ở mẫu dừa cạn TN1, TN2 và protein mang mã số AAC99311 trên Ngân hàng Gen.....	38
Bảng 3.3. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen <i>CrDAT</i> vào cây thuốc lá	46

DANH MỤC CÁC HÌNH

	<i>Trang</i>
Hình 1.1. Hoa của ba giống <i>Catharanthus roseus</i>	7
Hình 1.2. Sơ đồ biểu diễn con đường sinh tổng hợp các terpenoid indole alkaloid (TIA)	12
Hình 1.3. Công thức cấu tạo của vinblastine và vincristine	16
Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen pBI121- <i>CrDAT</i>	25
Hình 3.1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen <i>CrDAT</i>	32
Hình 3.2. Trình tự nucleotide của gen <i>CrDAT</i> phân lập từ cây dừa cạn mẫu TN1, TN2 và trình tự mang mã số AF053307 trên Ngân hàng gen quốc tế.	36
Hình 3.3. Trình tự amino acid suy diễn của gen <i>CrDAT</i> từ hai mẫu dừa cạn TN1, TN2 và của protein mang mã số AAC99311 trên Ngân hàng Gen.	37
Hình 3.4. Kết quả cắt vector tách dòng tái tổ hợp pBT- <i>CrDAT</i> với cặp enzyme giới hạn <i>NcoI</i> và <i>NotI</i>	40
Hình 3.5. Kết quả cắt mở vòng vector pRTRA7/3.	41
Hình 3.6. Kết quả tạo vector tái tổ hợp pRTRA7/3- <i>CrDAT</i>	42
Hình 3.7. Kết quả tạo vector chuyển gen pBI121- <i>CrDAT</i>	43
Hình 3.8. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pBI121- <i>CrDAT</i> và kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR.	44
Hình 3.9. Hình ảnh mô tả quá trình biến nạp, chọn lọc và tái sinh tạo cây thuốc lá chuyển gen.	45
Hình 3.10. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định sự có mặt của gen <i>CrDAT</i> trong các cây thuốc lá chuyển gen và đối chứng.	47
Hình 3.11. Kết quả phân tích Southern blot các dòng thuốc lá chuyển gen <i>CrDAT</i>	48

Hình 3.12. Kết quả phân tích Western blot các dòng cây thuốc lá chuyển gen *CrDAT*.50

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Hiện nay, loài người trên thế giới đang phải đối mặt với rất nhiều căn bệnh nguy hiểm: ung thư, AIDS, tiểu đường, thoái hóa khớp, viêm gan B, C. Ung thư là căn bệnh gây tử vong hàng đầu trên toàn thế giới. Theo tổ chức Y tế Thế giới (WHO) tỉ lệ người mắc ung thư năm 2012 là 14 triệu người, đến năm 2015 đã có hơn 90 triệu người mắc ung thư và hàng năm có hơn 8 triệu người chết vì ung thư [23]. Bệnh ung thư đang gia tăng ở trẻ em. Tại Mỹ, năm 2016 có hơn 10 nghìn trẻ mắc ung thư từ sơ sinh đến 14 tuổi và có khoảng hơn một nghìn trẻ sẽ chết vì căn bệnh này [25]. Vì vậy, việc tìm kiếm và phát triển thuốc chữa các bệnh ung thư là vấn đề cấp bách hiện nay.

Cây dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) là một trong những loại cây dược liệu quý. Cây dừa cạn có khả năng sản xuất các indole alkaloid có dược tính quan trọng và ứng dụng trong sản xuất các loại thuốc chống ung thư, đặc biệt là ung thư máu. Ngoài ra, cây dừa cạn còn được chỉ dẫn trong điều trị bệnh bạch cầu lympho cấp và một số bệnh ung thư khác. Trong dân gian, dừa cạn được sử dụng trị cao huyết áp, bệnh tiểu đường, điều hòa kinh nguyệt, chữa tiêu hóa kém và chữa lỵ, lợi tiểu khá mạnh, chữa bệnh đi tiểu đỏ và ít, tẩy giun, chữa sốt cao [3].

Trong tất cả các alkaloid thực vật, terpenoid indole alkaloid (TIA) là một nhóm quan trọng chứa hơn 3000 loại hợp chất có cấu trúc đa dạng và được tìm thấy ở 8 họ thực vật [60]. Trong đó, các loài cây có nguồn gốc từ họ mã tiền (Loganiaceae), họ trúc đào (Apocynaceae) và họ cà phê (Rubiaceae) chứa hàm lượng alkaloid cao [40]. Dừa cạn có chứa 2 loại alkaloid là vinblastine và vincristine được sử dụng rộng rãi trong điều trị bệnh ung thư [72]. Vinblastine và vincristine là những chất ức chế mạnh sự phân chia tế bào và do vậy ngăn

cản sự tăng số lượng tế bào. Ngoài ra, một số TIA khác như ajmalicine và serpentine được sử dụng để điều trị rối loạn tuần hoàn [72]. Quá trình chuyển hóa tổng hợp các TIA ở cây dừa cạn là một quá trình phức tạp, trải qua nhiều phản ứng với sự tham gia của nhiều enzyme, các chất điều hòa và các chất vận chuyển [80].

Hàm lượng vinblastine và vincristine trong cây dừa cạn hoang dại rất thấp [47]. Vì vậy, định hướng nghiên cứu nhằm tăng hàm lượng alkaloid ở cây dừa cạn được quan tâm với việc sử dụng kỹ thuật hiện đại, trong đó xác định và tăng cường biểu hiện enzyme chìa khóa là khâu nghiên cứu rất quan trọng. Deacetylvindoline-4-O-acetyltransferase (DAT) là một enzyme chìa khóa trong chuỗi chuyển hóa tổng hợp alkaloid ở cây dừa cạn. Biểu hiện mạnh gen mã hóa enzyme DAT sẽ làm tăng các sản phẩm chuyển hóa thứ cấp và hàm lượng vinblastine và vincristine trong dừa cạn được nâng cao.

Xuất phát từ những lý do trên chúng tôi đã thực hiện đề tài: ***“Tách dòng và biểu hiện gen mã hóa enzyme deacetylvindoline-4-O-acetyltransferase (DAT) tham gia tổng hợp alkaloid từ cây dừa cạn (Catharanthus roseus (L.) G. Don)”***.

2. Mục tiêu đề tài

Phân lập và tách dòng được gen *DAT* từ cây dừa cạn thu thập tại Thái Nguyên. Thiết kế được vector chuyển gen mang gen *DAT* và biểu hiện thành công enzyme tái tổ hợp DAT trên cây thuốc lá.

3. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Thu thập các mẫu dừa cạn tại Thái Nguyên, phân lập cDNA DAT từ giống dừa cạn hoa hồng tím và giống dừa cạn hoa trắng.

- Thu thập mẫu dứa cựa hoa hồng tím và hoa trắng tại một số địa phương Thái Nguyên;
- Nghiên cứu thông tin về gen DAT , thiết kế cặp mồi nhân gen DAT. Tách chiết RNA tổng số, tạo cDNA và khuếch đại cDNA DAT từ hai mẫu dứa cựa hoa hồng tím và hoa trắng;
- Nghiên cứu dòng hóa cDNA DAT và xác định trình tự gen DAT. So sánh trình tự cDNA DAT giữa giống dứa cựa hoa hồng tím và hoa trắng.

Nội dung 2: Thiết kế vector chuyển gen mang gen *CrDAT* phân lập từ cây dứa cựa.

- Tạo cấu trúc vector chứa promoter biểu hiện trên lá, thân, rễ thực vật, gen *CrDAT* và một số cấu trúc khác.
- Tạo vi khuẩn *Agrobacterium* mang vector tái tổ hợp chứa cấu trúc gen *CrDAT*

Nội dung 3: Nghiên cứu biểu hiện protein tái tổ hợp rDAT trên cây thuốc lá

- Lây nhiễm *Agrobacterium* mang vector tái tổ hợp chứa cấu trúc gen *CrDAT* vào mô thuốc lá;
- Tái sinh cây thuốc lá chuyển gen;
- Phân tích các dòng cây thuốc lá chuyển gen bằng PCR, lai Western blot.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. ALKALOID Ở CÂY DỪA CẠN

1.1.1. Vai trò của alkaloid thực vật

Alkaloid là những hợp chất hữu cơ có chứa nitơ, đa số có nhân dị vòng, có phản ứng kiềm, thường gặp ở thực vật và đôi khi có trong động vật, có dược tính mạnh. Ngoài carbon, hydro và nitơ, alkaloid cũng có thể chứa oxy, lưu huỳnh và các yếu tố khác như clo, brom, và phospho [79]. Alkaloid được sản xuất bởi một lượng lớn các sinh vật bao gồm vi khuẩn, nấm, thực vật và động vật. Trong lĩnh vực y học, alkaloid cung cấp nhiều loại thuốc có giá trị chữa bệnh cao và đặc biệt bao gồm cả thuốc chống sốt rét (quinine), chữa trị bệnh hen suyễn (ephedrine), chống ung thư (homoharringtonine), thuốc an thần (galantamine) [31], giãn mạch (vincamine), chống loạn nhịp (quinidine), giảm đau (morphine), kháng khuẩn (chelerythrine) [19],[20], chữa bệnh Alzheimer [55] và thuốc chữa huyết áp (piperine) [54].

Ranh giới giữa alkaloid và các hợp chất tự nhiên có chứa nitơ khác không rõ ràng. Các hợp chất như amino acid, protein, nucleic acid, amin và các loại thuốc kháng sinh thường không được gọi là alkaloid. Các hợp chất tự nhiên có chứa nitơ ở vị trí exocyclic (mescaline, serotonin, dopamine ...) được phân loại là hợp chất amin, không gọi là alkaloid [53].

Các nghiên cứu về alkaloid bắt đầu vào thế kỷ XIX. Năm 1804 - 1805, ở Pháp và Đức đã phân lập được morphin và điều chế được dạng muối, đồng thời chứng minh được morphin là hoạt chất chính của cây thuốc phiện có tác dụng sinh lý rõ rệt. Năm 1820, từ vỏ cây canhkina (thuộc họ cà phê) người ta đã chiết và kết tinh được một chất đặt tên là "cinchonino". Sau đó hai nhà hóa

học Pháp đã xác định cinchonino là hỗn hợp của hai alkaloid là quinin và cinchonin. Năm 1918, người ta đã phát hiện ra alkaloid của họ mã tiền là strychnin và bruxin và cũng là năm phát hiện cafein trong chè, cà phê, sau đó là nicotin trong thuốc lá, atropin trong cà độc dược, theobromin trong cacao, codein trong thuốc phiện, cocain trong lá coca. Giữa năm 1973, người ta đã xác định được 4959 loại alkaloid khác nhau, trong đó có 3293 chất đã xác định được công thức hóa học. Hiện nay, số loại alkaloid đã đưa vào ứng dụng trong y học ngày một tăng [45].

So với các thành phần khác của các hợp chất tự nhiên, alkaloid được đặc trưng bởi sự đa dạng về cấu trúc và không có sự phân loại thống nhất. Phương pháp phân loại alkaloid đầu tiên trong lịch sử dựa vào nguồn gốc tự nhiên là phổ biến. Việc phân loại không dựa vào cấu trúc hóa học của alkaloid, cho nên phương pháp trên được coi là lỗi thời [79]. Các alkaloid thông thường được phân loại theo đặc trưng phân tử chung của chúng, dựa theo kiểu trao đổi chất được sử dụng để tạo ra phân tử. Khi còn ít thông tin về quá trình sinh tổng hợp alkaloid, các loại alkaloid được gộp lại thành nhóm theo tên của các hợp chất đã biết, hay gọi tên dựa theo nhóm động vật, thực vật mà từ đó người ta chiết xuất ra các alkaloid. Ví dụ các alkaloid chiết từ cây dừa cạn *vinca* thì được gọi chung là các *vinca* alkaloid. Khi có thông tin và hiểu biết nhiều hơn về một alkaloid cụ thể, việc gộp nhóm thường lấy theo tên gọi của amin quan trọng về mặt sinh học và nổi bật nhất trong quá trình tổng hợp.

Trong giới thực vật bậc cao, người ta đã xác định được một số cây dược liệu chứa alkaloid như: cây ba chạc, bách bộ, bình vôi, cà độc dược, cà phê, canhkina, cau, lá ngón, chè, cỏ nhọ nôi, dừa cạn, đại, hoàng liên, hoàng liên gai, hò tiêu, khở sâm, kim tiền thảo, ma hoàng, mộc hoa trắng, mộc

huong, ớt, ô đầu phụ tử, sen, táo nhân, thuốc lá, thuốc phiện, tỏi độc, trinh nữ hoàng cung, vôi. Điểm chung của các loài cây dược liệu này là alkaloid có hàm lượng rất thấp và khó tách chiết, nhưng lại có giá trị rất lớn đối với y học và ngành dược phẩm [52]. Trong cơ thể thực vật, alkaloid là những chất chuyển hóa thứ cấp, là sản phẩm cuối cùng trong quá trình chuyển hóa ở thực vật. Một số các alkaloid thực vật có vai trò bảo vệ như aporphine của cây tulip, bởi khả năng kháng lại nấm ký sinh. Một số alkaloid khác có khả năng ngăn ngừa côn trùng và động vật gây hại, số ít có thể đóng vai trò là các chất điều hòa sự sinh trưởng và quá trình chuyển hóa của thực vật, tương tự như hormone thực vật [11]. Đối với con người, nhiều alkaloid thực vật có hoạt tính sinh học mạnh và được sử dụng trong y học. Từ thế kỷ XIX, nhiều alkaloid được phát hiện để sử dụng làm thuốc và được ứng dụng trong y học như morphine, quinine... Một số chất quá độc, không dùng trong y học (Gelsemin trong lá ngón), nhiều chất có thêm tác động nguy hại đến xã hội (gây nghiện, ma túy, ảo giác) [46]. Ngoài ra, một số alkaloid còn là các chất dự trữ, có khả năng cung cấp nitơ hoặc các chất khác. Việc nghiên cứu các alkaloid có giá trị rất lớn góp phần vào việc tạo ra nhiều loại dược phẩm ứng dụng trong điều trị các bệnh.

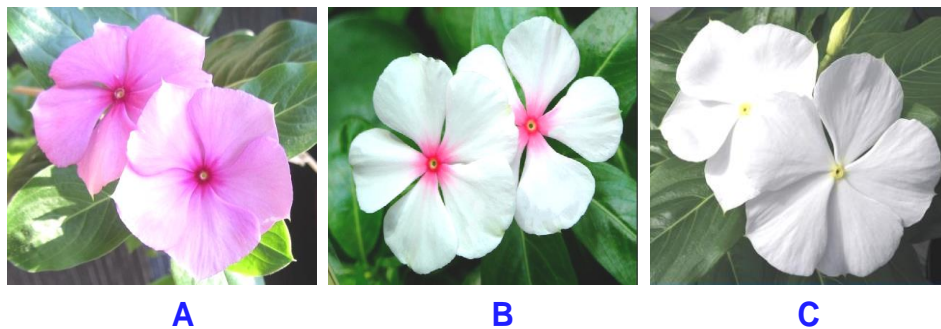
1.1.2. Alkaloid ở cây dừa cạn

1.1.2.1. Cây dừa cạn

Theo Đỗ Tất Lợi (1977), cây dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G.Don.) hay hải đằng, dương giác, bông dừa, trường xuân hoa là một loài thực vật trong chi *Catharanthus* thuộc họ La bố ma (*Apocynaceae*) [3]. Dừa cạn là cây bản địa và đặc hữu của Madagascar (Châu Phi). Ở Việt Nam, dừa cạn là cây hoang dại, phân bố tự nhiên, từ tỉnh Quảng Ninh đến Kiên Giang dọc theo vùng ven biển và tập trung ở các tỉnh miền Trung như Thanh Hóa, Nghệ An,

Thừa Thiên - Huế, Quảng Nam, Đà Nẵng, Bình Định và Phú Yên. Ở những vùng ven biển, dừa cạn mọc gần như thuần loại trên các bãi cát dưới rừng phi lao, trồng cỏ cây bụi thấp, có khả năng chịu đựng điều kiện khô cằn của vùng cát ven biển. Dừa cạn còn được trồng để làm cảnh và làm thuốc [7].

Dừa cạn là nguồn giàu alkaloid thuộc chủng loại terpenoid indole alkaloid (TIA) được tách chiết từ ba giống, đó là *roseus* có cánh hoa màu hồng tím, *albus* có cánh hoa màu trắng vàng và *ocellatus* có cánh hoa màu trắng đỏ. Trong đó dừa cạn hoa màu hồng tím có hàm lượng vincristine và vinblastine cao nhất (Hình 1.1) [49].



Hình 1.1. Hoa của ba giống *Catharanthus roseus*. A: *Catharanthus roseus* var. *roseus*; B: *Catharanthus roseus* var. *ocellatus*; C: *Catharanthus roseus* var. *albus* [49].

Cây dừa cạn là loài cây thân thảo sống lâu năm, cao 40 - 60 cm, phân nhiều cành, cây có bộ rễ phát triển, thân gỗ ở phía gốc, mềm ở phần trên. Mọc thành bụi dày. Lá mọc đối, thuôn dài, đầu lá hơi nhọn, cuống lá hẹp nhọn, dài 4 - 6 cm, rộng 2 - 3 cm, hai mặt nhẵn, mặt trên sẫm bóng, mặt dưới nhạt. Cánh hoa màu trắng hoặc cánh hoa màu hồng tím, có mùi thơm. Hoa mọc riêng lẻ ở kẽ lá gần ngọn. Vòi nhụy dài bằng ống tràng, dạng sợi màu trắng. Đầu nhụy hình trụ, màu xanh, đỉnh có 2 thùy nhọn, phía dưới có màng mỏng màu vàng. Hai đĩa mật màu vàng, hình tam giác hẹp nằm xen kẽ 2 lá noãn. Quả gồm 2

đại, dài 2 - 4 cm, rộng 2 - 3 cm, mọc thẳng đứng, hơi ngả sang hai bên, trên vỏ có vạch dọc, đầu quả hơi tù, trong quả chứa 12 - 20 hạt nhỏ màu nâu nhạt, hình trứng, trên mặt hạt có các hạt nổi thành đường chạy dọc. Mùa hoa và quả gần như quanh năm [7].

Tác dụng dược lý của cây dừa cạn

Từ những năm 1950, y học đã phát hiện ra dược tính của dừa cạn. Người thử nghiệm đầu tiên về tác dụng của cây dừa cạn là bác sĩ Clark Noble ở Canada. Ông đã phát hiện thấy cây dừa cạn không những có tác dụng hạ đường huyết trong máu mà còn có hoạt tính trị bệnh ung thư bạch cầu ở người. Dừa cạn đã được đưa vào bệnh viện thử nghiệm và trở thành cây dược liệu chính thức trong y khoa hiện đại [45]. Thành phần vincristine có tác dụng với bệnh nhân ung thư nhưng chúng lại là thành phần gây hại cho thai nhi, ức chế hệ thần kinh.

Kết quả phân tích thành phần alkaloid chiết xuất từ cây dừa cạn cho thấy, dừa cạn giàu vinblastine, vincristine, tetrahydroalstonine, pirinine, vindoline, catharanthine, ajmalicine.... Trong đó, vincristine và vinblastine khi điều chế thành dạng thuốc tiêm sẽ có tác dụng lớn trong ức chế sự phân bào và sinh trưởng của tế bào, cho nên hạn chế được việc hình thành bạch cầu thừa ở bệnh nhân ung thư máu [45].

Ở Việt Nam và một số nước châu Phi, châu Mỹ, dừa cạn được trồng làm cảnh và làm thuốc thông tiểu, điều kinh, trị tăng huyết áp, đái tháo đường, sốt rét, kiết lỵ, tiêu hoá kém... Bộ phận dùng làm thuốc là rễ, hoặc lá, hoặc cả cây. Sử dụng nguyên bụi cây dừa cạn đem phơi khô, chặt nhỏ, sao qua cho thơm trước khi nấu nước uống. Tùy vào mục đích trị liệu và kinh nghiệm địa

phương, có thể dùng độc vị dừa cạn hoặc phối hợp với những vị thuốc khác [3].

Trong điều trị ung thư, thường sử dụng dạng muối sulfat để chế tạo dạng chế phẩm tiêm truyền tĩnh mạch. Vincristine sulfat được sử dụng khá rộng rãi để điều trị ung thư máu, đặc biệt là bệnh bạch cầu lympho cấp. Trong khi đó, vinblastine sulfat lại có tác dụng tốt trong điều trị ung thư biểu mô tinh hoàn, ung thư nhau, ung thư biểu mô da đầu và ung thư biểu mô thận, u nguyên bào thần kinh, ung thư vú, ung thư cổ tử cung,... Một đặc điểm của vinblastine là chưa phát hiện sự đề kháng chéo với các loại thuốc chống ung thư khác [69].

Bên cạnh việc sử dụng các alkaloid thiên nhiên chiết xuất từ dừa cạn, các chuyên gia dược học đã nghiên cứu bán tổng hợp một số alkaloid để mở rộng phạm vi và hiệu quả của điều trị ung thư. Vindesine, navelbine là những sản phẩm phối hợp những tính năng của cả vinblastine và vincristine có nhiều hứa hẹn trong lĩnh vực điều trị u thần kinh đệm mãn tính, u hắc sắc tố, u lympho bào, ung thư biểu mô trực tràng, đại tràng, vú, thực quản [39]. Tương tự các loại thuốc kháng ung thư khác, các chế phẩm alkaloid của dừa cạn cũng gây một số phản ứng bất lợi như buồn nôn, nôn, nhức đầu, tiêu chảy, táo bón, tắc ruột, liệt, chán ăn, viêm miệng, rụng tóc, giảm bạch cầu, viêm thần kinh. Sử dụng liều cao và kéo dài có thể gây mù, tử vong. Thuốc có thể gây độc cho thai, nên tránh dùng cho thai phụ và người đang nuôi con bằng sữa mẹ [26].

1.1.2.2. Alkaloid ở cây dừa cạn

Trong cây dừa cạn có khoảng 130 loại alkaloid, trong đó vinblastine và vincristine là hai hợp chất quan trọng nhất [72]. Alkaloid có nhân indol được tìm thấy trong tất cả các bộ phận của cây, nhiều nhất trong lá và rễ. Alkaloid toàn phần có ở lá dừa cạn với hàm lượng 0,37% - 1,15%, thân 0,40%, rễ chính

0,7% - 2,4%, rễ phụ 0,9% - 3,7%, hoa 0,14% - 0,84%, vỏ quả 1,14%, hạt 0,18%. Trong các loại alkaloid đã được chiết từ cây dừa cạn, người ta đặc biệt chú ý 20 nhóm alkaloid có hoạt tính chống ung thư bao gồm vincristine và vinblastine [49].

Các alkaloid chủ yếu trong cây dừa cạn là vinblastine, vincristine tetrahydroalstonine, prinine, vindoline, catharanthine, ajmalicine, vincosid [6]. Từ dừa cạn, người ta còn chiết xuất được pyrocatechic, sắc tố flavonoid và anthocyanine từ thân và lá dừa cạn hoa hồng tím. Ngoài ra từ lá chiết được acid ursoloc, từ rễ chiết được choline.

Căn cứ vào cấu tạo hóa học, alkaloid trong cây dừa cạn được chia làm ba nhóm chính: (1) Nhóm alkaloid nhân indole gồm có các loại như perivine, peviridine, perosine, catharanthine, cavicine, ajmalicin... (2) Nhóm alkaloid nhân indoline: vindoline, ajmaline, lochnericine, lochneridine, lochrovine... (3) Nhóm alkaloid có 2 vòng indole hoặc một vòng indole và một vòng indoline như leurosine, leubcosidine... và đặc biệt là các alkaloid có tác dụng chữa bệnh ung thư nhưng có hàm lượng rất thấp như vinblastine (vincalucoblastine) 0,005– 0,015% trong lá, vincristine (leucocristine) 0,003 – 0,005% trong lá [49].

1.2. SINH TỔNG HỢP ALKALOID VÀ HOẠT ĐỘNG CỦA ENZYME DAT Ở CÂY DỪA CẠN

1.2.1. Quá trình sinh tổng hợp alkaloid ở cây dừa cạn

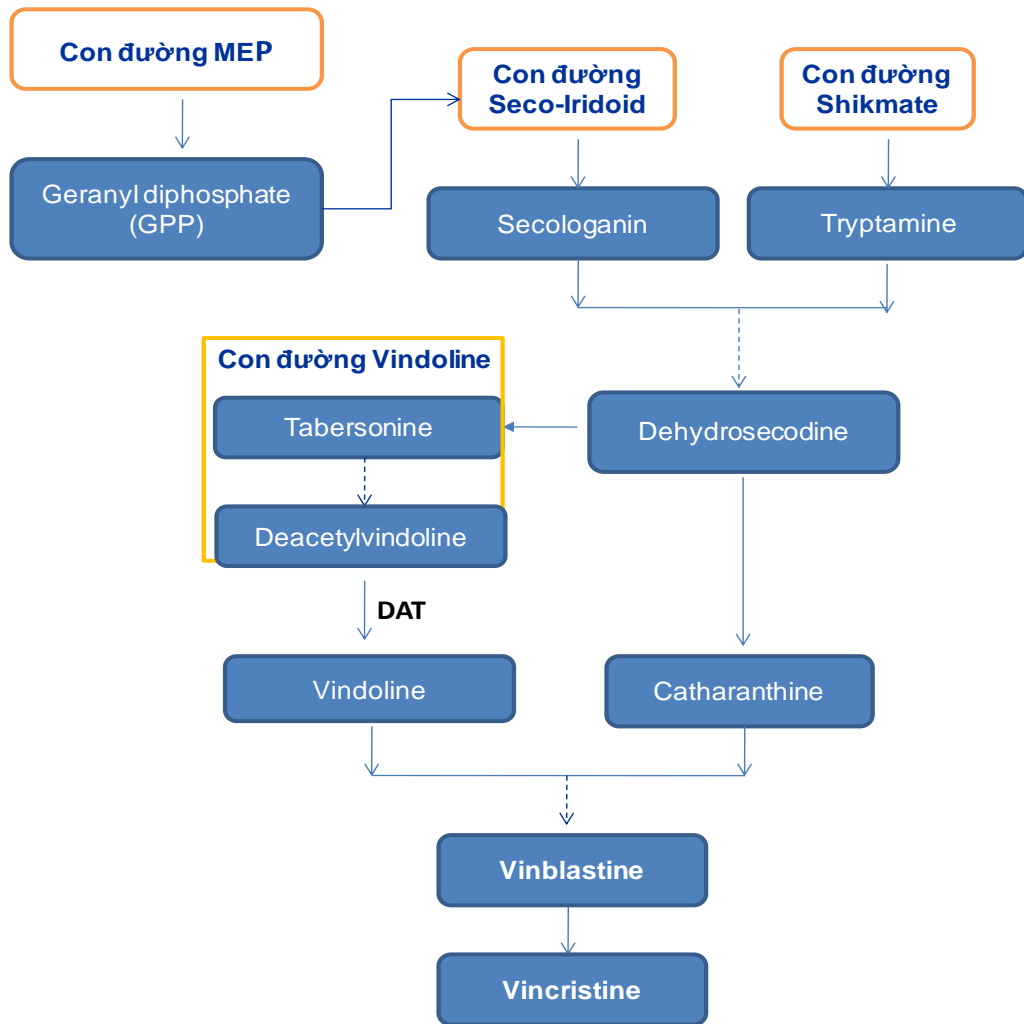
Trong những năm gần đây, con đường chuyển hóa tổng hợp các alkaloid ở cây dừa cạn được nghiên cứu khá chi tiết. Ở mức độ phân tử, con đường chuyển hóa tổng hợp terpenoid indole alkaloid (TIA) ở cây dừa cạn rất phức tạp, chịu sự chi phối của nhiều nhân tố và với sự tham gia của 30 loại

enzyme và trải qua 35 phản ứng trung gian [22], [72]. Quá trình chuyển hóa tổng hợp các TIA trong cây dứa cần trải qua 4 con đường, đó là con đường MEP (methylerythritol phosphate), con đường seco-iridoid, con đường shikimate và con đường vindoline (Hình 1.2).

Trong con đường MEP trải qua 7 phản ứng trung gian với sự tham gia của 6 enzyme và tạo nên sản phẩm cuối cùng là geranyl diphosphate (GPP). GPP là tiền chất để tạo các monoterpenoid trong đó có secologanin, sau đó được chuyển vào trong con đường seco - iridoid [15], [28].

Con đường seco - iridoid là con đường quan trọng trong quá trình tổng hợp các TIA. Chất đầu tiên là geranyl diphosphate từ con đường seco - iridoid trải qua 9 phản ứng trung gian với sự tham gia của nhiều enzyme, trong đó enzyme SLS (secologanin synthase) là enzyme xúc tác cho phản ứng cuối cùng tạo thành sản phẩm là secologanin [14], [42].

Con đường shikimate dẫn đến sự hình thành vòng thơm amino acid tryptophan, nguồn cung cấp vòng indole duy nhất cho sự chuyển hóa của cây bao gồm auxin, glucosinolate, phytoalexin, TIAs [9], [32]. Tryptophan được tách cacboxyl để hình thành tryptamin bởi hoạt động xúc tác của enzyme tryptophan decarboxylase, enzyme này được mã hóa bởi gen *TDC* (tryptophan decarboxyl) [27], [46].



Hình 1.2. Sơ đồ biểu diễn con đường sinh tổng hợp các terpenoid indole alkaloid (TIA) [53].

→ : Phản ứng trực tiếp; -> : Qua nhiều phản ứng; Khung màu : Con đường chuyển hóa; Các khung màu : Sản phẩm chuyển hóa.

Khi biểu hiện mạnh gen *TDC* với mục đích làm tăng tổng hợp các TIA lại không thành công vì sự biểu hiện quá mức của gen *TDC* phụ thuộc nhiều vào sự có sẵn của tryptophan [76], [77]. Secologanin kết hợp với tryptamine tạo nên phân tử strictosidine trong không bào và được xúc tác bởi enzyme strictosidine synthase [13], [29], [65].

Từ strictosidine trải qua nhiều phản ứng trung gian với sự tham gia của nhiều enzyme tạo nên dehydrosecodine. Từ dehydrosecodine một hướng tạo thành tabersonine trong con đường vindoline, một hướng tạo thành catharanthine để kết hợp với vindoline tạo thành Iminium.

Tabersonine chuyển hóa thành vindoline cần có sự tham gia của ánh sáng và ánh sáng tác động đến các giai đoạn phát triển khác nhau của cây [13], [29], [63]. Hầu như mọi nghiên cứu đều tập trung vào con đường tổng hợp vindoline, bởi vì vindoline liên quan trực tiếp đến sự hình thành các alkaloid, trong đó có vinblastine và vincristine. Tuy nhiên khi quá trình tích lũy tabersonine ở mức độ cao lại thường không tổng hợp được vindoline [18].

Con đường vindoline được miêu tả khá kỹ, từ tabersonine trải qua 6 phản ứng trung gian với sự tham gia của 6 loại enzyme để tạo nên deacetylvindoline.

Từ tabersonine chuyển thành 16 - hydroxytabersonine được xúc tác bởi enzyme tabersonine -16 - hydroxylase (T16H), sau đó được methyl hóa bằng 16-hydroxytabersonine-16-O-methyl transferase (16OMT) tạo nên 16-methoxytabersonine [60]. Sau đó trải qua bước oxi hóa để biến đổi từ 16-methoxy tabersonine thành 16 methoxy -2, 3-dihydroxytabersonine bởi enzyme tabersonine 3-oxygenase (T3O). Các bước tiếp theo liên quan đến một enzyme N - methyltransferase (NMT) để tạo nên deacetoxy vindoline [37]. Hai phản ứng cuối cùng được xúc tác bởi hai enzyme là deacetoxy vindoline - 4 - hydroxylase (D4H) tạo deacetylvindoline và enzyme deacetylvindoline - 4 - O - acetyltransferase (DAT) tạo nên vindoline.

Vindoline là một tiền chất quan trọng trong chuỗi chuyển hóa tổng hợp nên vinblastine và vincristine. Sau đó vindoline kết hợp với catharanthine tạo nên iminium, từ iminium tạo thành α 3'4'anhydrovinblastine (AVLB) với

sự xúc tác của peroxidase 1 (Prx1) để hình thành nên vinblastine và sau đó hình thành nên vincristine đánh dấu sự hoàn thiện quá trình sinh tổng hợp các TIA hữu ích ở cây dừa cạn [16], [32].

Cả catharanthine và vindoline đều được tổng hợp ở trong thân, rễ và lá của cây dừa cạn [34]. Khi phân tích alkaloid bằng phương pháp sắc ký cho thấy, hàm lượng vindoline và catharanthine ở rễ và thân của cây rất thấp, khoảng từ 0,16 đến 1,8% và thấp hơn so với ở lá. Điều này cho thấy khả năng tích lũy alkaloid ở lá cao hơn các bộ phận khác của cây, đặc biệt cao nhất ở biểu bì lá cây dừa cạn. Các nghiên cứu trước đây cho rằng, sự tích lũy catharanthine phụ thuộc vào sự có mặt của các TIA trên bề mặt của lá [54]. Một phần catharanthine kết hợp với vindoline tạo sản phẩm cuối cùng vinblastine và vincristine, một phần catharanthine có trên bề mặt lá được hoạt động như lớp sáp chống lại sự phá hại của côn trùng và nấm mốc. Bằng thực nghiệm các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, phần hòa tan bằng chloroform bề mặt của lá dừa cạn chứa 100% catharanthine và 3–5% vindoline so với toàn bộ lá. Sự tích lũy và chiết xuất catharanthine trên bề mặt lá đã cho thấy con đường sinh tổng hợp catharanthine xảy ra ở biểu bì lá [54].

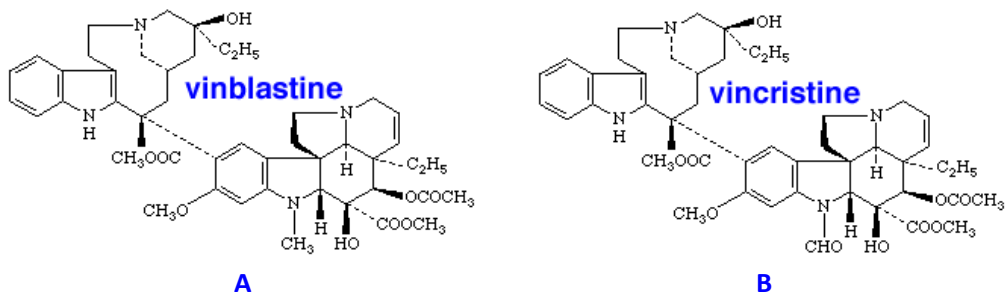
Roepke và cs (2010) nghiên cứu ảnh hưởng của catharanthine đến loài nấm *Phytophthora nicotianiae* cho thấy, catharanthine ức chế sự phát triển của nấm trong môi trường có nồng độ 10 µg /ml. Đây là nồng độ thấp hơn rất nhiều so với nồng độ trung bình của catharanthine trong lá non và lá già là 14 µg và 23 µg/ml. Các tác dụng chống côn trùng xâm hại của catharanthine được thí nghiệm bằng cách cho các loài côn trùng như *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera eridania*, *Helicoverpa armigera*, *Phaedon cochleariae* and *Bombyx mori* ăn lá cây dừa cạn. Kết quả cho thấy, ấu trùng của *S. eridania*

không ăn lá dứa cạn, trong khi hai loài là *Spodoptera* và *B. mori* ăn lá mà không bị chết. Ngược lại, *P. cochleariae* không ăn lá trong vòng 5 ngày và bị chết đói. Khi cho ấu trùng *B. mori* ăn với chế độ ăn trộn lá dứa cạn với lá dâu tằm đã cho thấy tỷ lệ tử vong giảm khi nghiền lá thành bột. Mặt khác, khi cho ấu trùng ăn lá dâu tằm trộn với catharanthine tinh khiết thì chúng đã bị chết và tỷ lệ chết phụ thuộc vào liều lượng catharanthine [54].

Vinblastine hay còn gọi là vincalucoblastine là tinh thể hình kim kết tinh bởi methanol, không tan trong nước và ether dầu hỏa, tan trong alcol, aceton, ethyl acetat, chloroforme [7]. Vinblastine có khả năng ức chế sự hình thành các cấu trúc vi ống, được sử dụng trong điều trị các tế bào tiền ung thư, khối u ác tính, u sùi dạng nấm, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư tinh hoàn và ung thư nhau thai.

Vincristine hay còn gọi là leurocristine là tinh thể hình phiến, sau khi tiêm vincristine nhanh chóng phân bố vào các mô trong cơ thể và gắn với các yếu tố máu đã hình thành, đặc biệt là hồng cầu và tiểu cầu. Vincristine thường được dùng để điều trị khối u ác tính ở trẻ em ở liều lượng thích hợp. Mặt khác ở cả người lớn và trẻ em, vincristine là một phần cần thiết trong liệu pháp hóa học để chữa viêm bạch cầu cấp tính, bệnh lymphoma Hodgkin... Vincristine cũng đóng vai trò trong liệu pháp điều trị khối u Wilms, u nguyên bào thần kinh, tế bào ung thư phổi ở người lớn.

Vinblastine và vincristine được tạo thành từ sự ghép nối của catharanthine (indole) và vindoline (dihydroindole) ở trạng thái tự do trong cây. Vincristine cũng có cấu trúc tương tự như vinblastine, nhưng trong cấu tạo của vincristine, trên phân tử nitrogen indole của vindoline là nhóm formyl (CHO), còn ở vinblastine là nhóm methyl (CH₃) [49], [80].



Hình 1.3. Công thức cấu tạo của vinblastine và vincristine [80]

Nghiên cứu của Amirjani (2013) cho thấy, khi gây hạn nhẹ cho cây dưa cạn trong môi trường nuôi cấy *in vitro* đã làm tăng hàm lượng vinblastine và vincristine. Tuy nhiên, khi cây bị hạn nặng có thể ảnh hưởng đến việc tổng hợp vinblastine và vincristine [8].

Hiện nay, có thể tạo ra sự biến đổi vinblastine thành vincristine bằng phương pháp hóa học hay thông qua sự chuyển hóa của vi sinh vật. Vinblastine và vincristine liên kết đặc hiệu với tubulin là những protein vi ống ở thời phân bào và ngăn cản sự kết hợp của những cấu trúc hình ống có ở trong nguyên sinh chất của nhiều tế bào di động, ngăn cản sự phân chia tế bào từ giai đoạn kỳ giữa của nguyên phân, do vậy hạn chế sự tăng sinh về số lượng tế bào. Vinblastine có tác dụng chống ung thư bởi tác động chuyển hoá glutamate và aspartate, còn vincristine tác dụng chống ung thư do ngăn cản sự tổng hợp mRNA và các protein. Ở nồng độ cao vinblastine và vincristine có thể diệt được tế bào, còn ở nồng độ thấp làm ngừng phân chia tế bào ở kỳ giữa. Vì thế, chúng được sử dụng làm nguyên liệu bào chế thuốc điều trị ung thư [7].

1.2.2. Hoạt động của enzyme DAT và gen *DAT*

DAT là enzyme chìa khóa xúc tác cho phản ứng cuối cùng trong chuỗi tổng hợp vindoline từ deacetylvindoline ở cây dừa cạn [63], [50]. Trong nghiên cứu của Benoit và cs (1998), sự hoạt động của enzyme DAT được xác định ở những cơ quan khác nhau của cây dừa cạn. Enzyme DAT hoạt động cao nhất ở lá non, giảm xuống 76% ở lá già, ở thân là 5%, hoa khoảng 11% và ở rễ không đáng kể [10]. Mối quan hệ giữa hoạt động của enzyme và sự tích lũy protein DAT được xác định bằng kết quả phân tích Western blot [10].

Để chứng minh mức độ hoạt động của enzyme DAT và gen *CrDAT* tương quan với sự tích lũy các mRNA người ta đã tách chiết mRNA từ các bộ phận khác nhau của cây. Sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử phân tích mRNA của gen *CrDAT* ở các bộ phận khác nhau của cây dừa cạn cho thấy mRNA của gen *CrDAT* có kích thước khoảng 1,3 kb xuất hiện nhiều nhất ở lá non, lá trưởng thành và giảm dần trong thân cây và hoa, nhưng lại không có trong rễ cây [10]. Khảo sát tác động của ánh sáng đến hoạt động của enzyme DAT cho thấy, khi cây dừa cạn non ở trong tối thì enzyme DAT hoạt động kém, nhưng sau khi điều chỉnh ánh sáng thì hoạt động của DAT tăng dần theo thời gian. Phân tích Western blot cho thấy, khi cây ở trong tối protein DAT có trọng lượng phân tử khoảng 50 kDa và khi cây ở ngoài sáng trọng lượng phân tử của DAT tăng lên và đạt khoảng 52 kDa [10],[66]. Ánh sáng kích thích quá trình phiên mã gen *CrDAT* và cùng với các gen mã hóa enzyme tham gia vào quá trình sinh tổng hợp các alkaloid khác như deacetoxy vindoline 4 - hydroxylase (*D4H*) và tryptophan decarboxylase (*TDC*) [54], [74], [75].

Khi nghiên cứu gen *DAT* người ta đã xác định được gen *DAT* có ở 18 loài thực vật (17-30%), số còn lại chưa biết hết chức năng. Trong đó, 13 gen phân lập từ loài *Arabidopsis thaliana*, 19 gen phân lập từ hoa cẩm chướng [8].

Theo St-Pierre và cs (1998), gen *CrDAT* phân lập từ DNA genome cây dứa cạn có kích thước 1320 bp, mã hóa enzyme DAT có 439 amino acid và DAT gồm 9 chuỗi polypeptid tham gia vào bước cuối cùng trong quá trình sinh tổng hợp vindoline ở cây dứa cạn [63].

Quá trình phiên mã của gen liên quan đến chức năng của các nhân tố khởi đầu phiên mã, trong đó có mã mở đầu. Tuy nhiên, sự phiên mã còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác như: vùng promoter, vùng mã hóa, các protein là nhân tố phiên mã ... Các nghiên cứu cũng cho thấy gen *CrDAT* chỉ được biểu hiện khi có tín hiệu của ánh sáng hoặc tín hiệu methyl jasmonate [106]. Wang và cs (2010), đã mô tả trình tự của 3 đoạn TGACG liên quan đến con đường tín hiệu methyl jasmonate trong vùng khởi động của gen *CrDAT*. Các phân tích vùng promoter của gen *CrDAT* có đoạn motif liên quan đến tín hiệu ánh sáng. Ngoài ra, một số motif khác có liên quan đến nhân tố vô sinh và hữu sinh, hormon sinh trưởng như gibberellin và auxin [77]. Gen *CrDAT* biểu hiện mạnh nhất ở biểu bì lá cây dứa cạn, nhưng ở cây *Arabidopsis thaliana* có thêm một số các promoter khác liên quan tới việc biểu hiện gen *CrDAT* trong tế bào biểu bì lá [77].

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Vật liệu thực vật

Hạt của giống dưa cạn màu hoa hồng tím (TN1) và màu hoa trắng (TN2) thu thập tại tỉnh Thái Nguyên.

Giống thuốc lá *Nicotinana tabacum* K326 có nguồn gốc từ Viện kinh tế kỹ thuật thuốc lá, do Phòng tế bào Thực vật, Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

2.1.2. Chủng vi khuẩn và các loại vector

Các chủng vi khuẩn *E. Coli* (DH5 α), chủng *A. tumefaciens* CV58 do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Các loại vector tách dòng pBT, vector pCB-gusplus, vector pRTRA7/3, vector chuyển gen pBI121 (Phụ lục 1) do Phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

2.2. HÓA CHẤT, THIẾT BỊ VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Hóa chất

Hóa chất tinh khiết sử dụng trong phân tích sinh học phân tử có nguồn gốc từ các hãng Fermentas, Bio-Neer, Invitrogen, như Trizol Reagents, kit Maxima® First Strand cDNA Synthesis, kit GenJET PCR Purification, kit Plasmid Extraction, *taq*-polymerase, buffer PCR, EDTA, Tris, agarose,

enzyme giới hạn như *BamHI*, *NotI*, *NcoI*, *HindIII*, T4 ligase, kháng sinh kanamycine, rifamycine, cefotaxime, carbenicillin và một số hóa chất khác có nguồn gốc từ các hãng Fermentas, Invitrogen, Sigma, Amersham và một số hãng khác.

Thang chuẩn 1 kb của hãng Guangzhou Genshun Biotech Ltd. Kháng thể 1 (anti-cmyc từ chuột), kháng thể 2 (anti-mouse-Ig, Horseradish peroxidase) được đặt tổng hợp từ hãng GE Health UK Limited.

Thiết bị

Máy PCR System 9700 (Applied Biosystem, Mỹ), máy điện di Powerpac 300 (Bio-Rad, Mỹ), máy soi DNA (Mini-transillumination, Bio-Rad, Mỹ), máy chụp ảnh (Amersham Pharmacia Biotech, Thụy Điển), máy vortex (Mimishaker, IKA, Đức), máy hút chân không Speed-Vac 110A (Savant, Mỹ), máy ly tâm, máy xung điện Gen Plulser,... cùng một số các thiết bị khác phục vụ cho nghiên cứu.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Các phương pháp sinh học phân tử

2.3.1.1. Nghiên cứu thông tin về gen và thiết kế cặp mồi nhân gen

Dựa trên những thông tin về trình tự gen *CrDAT* của cây dứa cạn đã công bố trên Ngân hàng gen quốc tế mang mã số AF053307 [97] cặp mồi đặc hiệu *DAT-NcoI/DATR-NotI* đã được thiết kế để khuếch đại đoạn mã hoá enzyme *DAT* từ cDNA và dự kiến kích thước đoạn cDNA được nhân bản là 1320 bp. Cặp mồi *XbaI-DAT-F/cmyc-KDEL-SacI-R* sử dụng cho PCR để kiểm tra cây chuyển gen dự kiến có kích thước là 1383 bp (Bảng 2.1).

2.3.1.2. Phân lập gen

Tách chiết RNA tổng số và tổng hợp cDNA

RNA tổng số được tách chiết bằng Trizol Reagent Kit. cDNA được tổng hợp theo quy trình Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit và được tách chiết theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 2.1. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Ký hiệu	Trình tự nucleotide (5'-3')	Sản phẩm dự kiến (bp)
DAT- <i>Nco</i> I-F/ DAT-NotI-R	CATGCCATGGATGGAGTCAGGAAAAATATC TTGCGGCCGCATTAGAAACAAATTGAAGTA	1320
XbaI-DAT-F/ cmc-KDEL- SacI-R	CGTCTAGAATGGAGTCAGGAAAAATATCGG CCGAGCTCCTAGAGTTCGTCTTTGGAACC	1383

Kỹ thuật PCR khuếch đại gen *CrDAT*

Gen *CrDAT* được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu. Thành phần phản ứng PCR được trình bày ở bảng 2.2.

Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (µl)
1	PCR Master Mix	2X	12,5
2	DAT- <i>Nco</i> I	10pmol/ µl	1,0
3	DAT-NotI	10pmol/ µl	1,0
4	DNA hoặc cDNA khuôn	500ng/ µl	2,0
5	Nước khử ion	-	8,5

Tổng thể tích	25
----------------------	-----------

Phản ứng được thực hiện theo chu kỳ nhiệt: 94° trong 4 phút, lặp lại 30 chu kỳ, trong mỗi chu kỳ nhiệt độ và thời gian của các giai đoạn là biến tính ở 94°C trong 1 phút, gắn nối ở 58°C trong 1 phút, tổng hợp ở 72°C trong 1 phút 30 giây); ổn định mẫu và kết thúc phản ứng ở 72°C trong 7 phút, bảo quản ở 4°C.

2.3.1.3. Tách dòng gen

Kỹ thuật tách dòng gen được thực hiện theo Sambrook và Russell (2001) [90], gồm các bước tinh sạch gen, gắn đoạn DNA vào vector tách dòng pBT, chọn các dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp bằng kỹ thuật colony - PCR, cắt kiểm tra gen *CrDAT* trên plasmid tái tổ hợp.

Tinh sạch gen

Gen *CrDAT* được tinh sạch bằng bộ kit GenJET PCR Purification của hãng Fermentas theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất.

Gắn đoạn *CrDAT* vào vector tách dòng pBT

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%; tinh sạch sản phẩm PCR theo GenJET PCR Purification Kit và gắn vào vector tách dòng pBT để tạo plasmid tái tổ hợp mang gen *CrDAT* với điều kiện phản ứng 20°C trong 3 giờ và thành phần phản ứng được trình bày ở bảng 2.3.

Bảng 2.3. Thành phần phản ứng gắn gen *CrDAT* vào vector tách dòng

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (µl)
1	T4 DNA Ligase Buffer	10X	2,0
2	T4 DNA Ligase	5 u/µl	1,0
3	<i>CrDAT</i>	100ng/ µl	12

4	pBT	100ng/ μ l	3,0
5	Nước khử ion	-	2,0
Tổng			20

Biến nạp vector tách dòng vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α

Sau khi tạo được vector tách dòng pBT thì biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α bằng sốc nhiệt (42°C trong 1 phút 30 giây).

Sau khi sốc nhiệt bổ sung 200 - 300 μ l LB lỏng để nuôi phục hồi ở 37°C, nuôi lắc 200 rpm trong 2 giờ. Vi khuẩn mang vector tái tổ hợp được cấy chọn lọc trên môi trường LB đặc bổ sung X-gal 30 mg/l, IPTG 100 μ M, kháng sinh carbenicillin 50 mg/l. Sau đó nuôi ở 37°C trong 16 giờ (Bảng 2.4).

Bảng 2.4. Thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Môi trường	Thành phần
LB lỏng	Bacto pepton 10 g/l + NaCl 10 g/l + Yeast Extract 5 g/l, pH = 7
LB đặc	LB lỏng + agar 10 g/l

Chọn dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp bằng kỹ thuật colony - PCR

Chọn lọc những khuẩn lạc màu trắng có khả năng mang plasmid tái tổ hợp gen *CrDAT*, hòa vào 5 μ l nước khử ion, dùng dung dịch này để làm DNA khuôn cho phản ứng colony - PCR. Sử dụng cặp mồi đặc hiệu *DAT-NcoI/DAT-NotI*. Thành phần phản ứng colony - PCR và chu kỳ nhiệt được thực hiện như phản ứng PCR cơ bản đã được mô tả ở phần trên.

Plasmid tái tổ hợp được thu nhận bằng cách tách chiết theo phương pháp tách dòng phân tử theo Sambrook và Russell (2001) [56].

Cắt kiểm tra gen *CrDAT* trên plasmid tái tổ hợp

Sử dụng enzyme giới hạn *BamHI* để xác định sự có mặt của gen *CrDAT* với thành phần, điều kiện phản ứng 37°C trong 4 giờ và thành phần phản ứng được trình bày ở bảng 2.5. Sản phẩm được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 0,8 %.

Bảng 2.5. Thành phần phản ứng cắt DNA bằng *BamHI*

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (µl)
1	<i>BamHI</i> Buffer	10X	1,0
2	<i>BamHI</i>	5 u/µl	1,0
3	Plasmid	200ng/ µl	5,0
4	Nước khử ion	-	3,0
Tổng			10

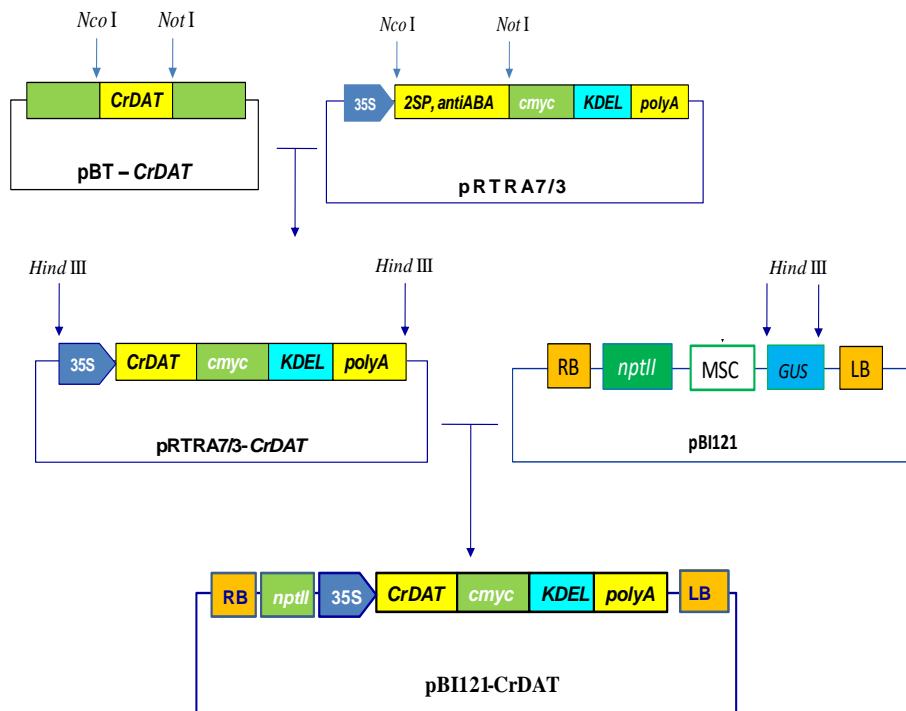
Trình tự gen *CrDAT* được xác định trên thiết bị giải trình tự gen tự động ABI Prism 3130 - Hoa Kỳ. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Tin sinh học, như Blast trong NCBI, BioEdit và DNASTar.

2.3.2. Phương pháp thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc chứa gen *CrDAT*

Vector chuyển gen mang gen *CrDAT* được thiết kế theo hai bước cơ bản (1) Thiết kế cấu trúc độc lập mang gen chuyển *CrDAT*; (2) Gắn cấu trúc chứa gen *CrDAT* vào vector chuyển gen thực vật pBI121. Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc chứa gen *CrDAT* phân lập từ cây dưa cạm được tóm tắt ở sơ đồ hình 2.2.

2.3.2.1. Thiết kế cấu trúc độc lập mang gen chuyển *CrDAT*

Xử lý vector tái tổ hợp pBT - CrDAT và vector pRTRA 7/3 bằng cặp enzyme giới hạn *NcoI/NotI* tạo các đầu dính tương ứng với thành phần và điều kiện phản ứng trình bày ở bảng 2.6. Dựa vào kích thước phân đoạn DNA, lựa chọn và tinh sạch các băng điện di theo kit GenJET PCR Purification để thu nhận các thành phần cần cho thiết kế vector gồm gen đích mang gen *CrDAT* và vector trung gian pRTRA 7/3.



Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế vector chuyển gen pBI121-*CrDAT*

Tiến hành phản ứng ghép nối gen *CrDAT* với vector pRTRA 7/3 đã mở vòng sau khi tinh sạch, bổ sung T4 ligase xúc tác cho quá trình gắn nối nhằm tạo được vector trung gian tái tổ hợp pRTRA 7/3 chứa cấu trúc mang gen chuyển *CrDAT* (35S-DAT-cmyc-KDEL). Vector tái tổ hợp pRTRA 7/3 mang gen chuyển *CrDAT* (pRTRA 7/3 – DAT) được đưa vào tế bào vi khuẩn *E. coli* DH5 α bằng biến nạp nhờ sốc nhiệt và chọn dòng tái tổ hợp bằng colony - PCR với cặp mồi đặc hiệu *DAT-NcoI/DAT-NotI*.

Bảng 2.6. Thành phần phản ứng cắt plasmid bằng *NotI/NcoI*

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (µl)
1	Orange Buffer	10X	2,0
2	<i>NcoI</i>	5 u/µl	2,0
3	<i>NotI</i>	5 u/µl	1,5
4	Plasmid	200ng/ µl	8,0
5	Nước khử ion	-	6,5
Tổng			20

2.3.2.2. Gắn cấu trúc mang gen chuyển *CrDAT* vào vector chuyển gen *pBI121*

Xử lý vector pRTRA - CrDAT và pBI121 với enzyme giới hạn *HindIII* với các thành phần được thể hiện ở bảng 2.7. Dựa vào kích thước các phân đoạn DNA, lựa chọn và tinh sạch các băng điện di theo kit GenJET PCR Purification để thu nhận thành phần cần thiết.

Bảng 2.7. Thành phần phản ứng cắt plasmid bằng *HindIII*

STT	Thành phần	Nồng độ	Thể tích (µl)
1	Red Buffer	10X	2,0
2	<i>HindIII</i>	5 u/µl	2,0
3	Plasmid	200ng/ µl	10

4	Nước khử ion	-	6,0
Tổng			20

Thực hiện phản ứng ghép nối cấu trúc mang gen *CrDAT* tinh sạch với vector pBI121 đã mở vòng, bổ sung T4 DNA ligase xúc tác cho quá trình gắn nối nhằm tạo được vector chuyển gen thực vật pBI121 mang cấu trúc gen *CrDAT*. Vector tái tổ hợp pBI121 mang cấu trúc gen *CrDAT* được nhân dòng trong *E.coli* DH5 α bằng biến nạp nhờ sốc nhiệt và chọn dòng tái tổ hợp bằng colony - PCR với cặp mồi đặc hiệu *DAT-NcoI/DAT-NotI*.

2.3.2.3. Biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào *A. tumefaciens*

Tạo tế bào khả biến *A. tumefaciens* bằng cách làm mới giống trên môi trường LB đặc. Nuôi lác một khuẩn lạc trong 2 ml môi trường LB lỏng ở 28°C trong 6 giờ. Lấy 100 μ l dung dịch vi khuẩn nuôi cấy tiếp ở 28°C qua đêm trong 100 ml LB lỏng có bổ sung kháng sinh chọn lọc đến khi OD_{600nm} = 1 - 1,5. Làm lạnh mẫu trong đá 15 phút, ly tâm 5000 vòng/phút trong 20 phút để thu cặn tế bào. Rửa cặn hai lần trong 10 ml HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2 - ethanesulfonic acid) pH 7,0. Cặn tế bào hoà tan trong 500-700 μ l 10% glycerol. Chia 45 μ l dịch tế bào vào mỗi ống eppendorf, làm lạnh trong nitơ lỏng và giữ chủng ở -85°C.

Khi đã có được tế bào khả biến *A. tumefaciens*, tiến hành biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào bằng phương pháp xung điện. Tế bào khả biến đặt trong đá 5 phút. Bổ sung 1 μ l vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến và trộn nhẹ. Rửa cuvette bằng cồn 100°, rửa lại bằng nước khử ion, khử trùng rồi thấm khô. Chuyển tất cả hỗn hợp dịch *A. tumefaciens* và vector tái tổ hợp vào cuvette. Xung điện ở 2,5 kv, 25 μ F và điện trở 400 Ω , sau đó đặt ngay vào trong đá, sau 5 phút bổ sung 500 μ l LB lỏng và đảo nhẹ. Chuyển sang ống eppendorf 2 ml, ủ

ở 28°C trong 1 giờ trên máy lắc. Chuyển 300 µl vào các đĩa chọn lọc chứa kháng sinh streptomycine 40 mg/l, spectinomycine 100 mg/l và rifamycin 50 mg/l. Ủ ở 28°C từ 24 - 48 giờ. Giữ chủng trong tủ lạnh và dùng cho lây nhiễm trong chuyển gen.

2.3.3. Chuyển cấu trúc mang gen *CrDAT* vào cây thuốc lá

Phương pháp chuyển cấu trúc chứa gen *CrDAT* vào cây thuốc lá trong môi trường tái sinh *in vitro* (Phụ lục 2-P2.1) được thực hiện theo Topping (1998), qua các bước cơ bản sau [70].

Chuẩn bị nguyên liệu biến nạp: Sử dụng cây con của giống thuốc lá K326 đã phát triển được 2-3 lá thật có thể tiến hành các thí nghiệm cho phục vụ chuyển gen. Các mảnh lá được cắt với kích thước khoảng 1cm² và cảm ứng trên môi trường tái sinh (MS + sucrose 30 g/l + agar 10 g/l + BAP 1 mg/l) trong 48 giờ.

Chuẩn bị vi khuẩn lây nhiễm: *A.tumefaciens* mang vector chuyển gen chứa *CrDAT* được nuôi chọn lọc trong 15 ml môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh kanamycine 50 mg/l và rifamycine 50 mg/l ở 28°C lắc 200 rpm trong 48 giờ. Lấy 10 ml dịch huyền phù tế bào trên vào 50 ml LB lỏng không kháng sinh để nuôi phục hồi ở 28°C lắc 200 rpm khi OD_{600nm} = 0,8 là thích hợp cho biến nạp. Ly tâm thu cặn tế bào, hòa tan cặn trong dung dịch ½ MS + AS 50 µl đặt trong nước đá lạnh.

Biến nạp: Ngâm các mảnh lá đã đặt cảm ứng vào dịch huyền phù vi khuẩn có OD_{600nm} = 0,8 trong 10 phút, thấm khô và chuyển lên môi trường GM không chứa kháng sinh để đồng nuôi cây 2 ngày.

Tái sinh đa chồi: Thực hiện rửa khuẩn ngoại vi bằng cách ngâm các mảnh lá biến nạp trong ½ MS + cefotaxim 400 mg/l, 10 phút, thấm khô và chuyển lên môi trường GM bổ sung kanamycine 50 mg/l và cefotaxim 400 mg/l.

Chọn lọc và kéo dài chồi: Sau 3 tuần các cụm chồi hình thành được cắt tách nhỏ và chuyển sang môi trường MS có bổ sung kanamycin 50 mg/l và cefotaxim 400 mg/l.

Ra rễ: Sau 5 tuần các chồi phát triển cao khoảng 3 cm thì được cắt và chuyển sang môi trường ra rễ RM có bổ sung kanamycin 50 mg/l và cefotaxim 400 mg/l.

Ra bầu và nhà lưới: Sau 4 tuần cây con ra rễ và phát triển hoàn chỉnh với 3-4 lá thật sẵn sàng cho ra bầu bầu : cát (tỷ lệ 1:1). Cây phát triển với 5 lá thật thì chuyển ra trồng trong nhà lưới.

2.3.4. Phương pháp phân tích cây chuyển gen

2.3.4.1. Tách chiết DNA tổng số và kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong cây chuyển gen

DNA của cây chuyển gen được tách chiết theo phương pháp của Murray và cs (1980) [44]. Gen chuyển *CrDAT* trong cây chuyển gen được xác định bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *DAT-NcoI/DAT-NotI*. DNA tổng số và sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% và 1%.

2.3.4.2. Xác định sự hợp nhất của gen chuyển *CrDAT* vào hệ gen của cây chuyển gen

Xác định sự hợp nhất gen chuyển *CrDAT* vào hệ gen tế bào chủ của cây thuốc lá chuyển gen bằng Southern blot được thực hiện theo mô tả của Southern (1975) [60].

Tổng hợp mẫu dò: Tổng hợp DNA dò có đánh dấu huỳnh quang bằng PCR với mồi ngẫu nhiên.

Ở cây thuốc lá sử dụng sản phẩm PCR nhân gen *CrDAT* tinh sạch để làm khuôn cho phản ứng tổng hợp mẫu dò theo hướng dẫn của bộ Biotin

DecaLabel DNA Labeling Kit. Gen chuyển *CrDAT* được đánh dấu bằng biotin.

DNA hệ gen cây chuyển gen được cắt bằng enzyme giới hạn *SacI* với thành phần gồm 5 μ l enzyme *SacI* (10 u/ μ l), 5 μ l buffer 10X, DNA 200 ng/ μ l, nước khử ion. Phản ứng ở 37°C để qua đêm. Điện di sản phẩm cắt DNA tổng số trên gel agarose 1%, ở điện thế thấp trong thời gian là 6 giờ. Chuyển sản phẩm cắt DNA lên màng cellulose (blotting). Sau đó màng lai được rửa với dung dịch 2X SSC và tiến hành lai với mẫu dò.

Màng lai được đưa vào khay nhựa chứa dung dịch tiền lai (6xSSC, 5xDenhardt's buffer, 0,5% BSA, 50% deion formamide) và ủ trong 4 giờ ở 44°C trong ống lai. Sau đó bỏ dung dịch tiền lai và chuyển màng sang khay chứa dung dịch lai (60 μ l/cm²), lai qua đêm ở 44°C. Rửa màng lai 2 lần trong dung dịch SSC 2x + SDS 0,1% trong 10 phút ở nhiệt độ phòng và 2 lần trong dung dịch SSC 0,1x + SDS 0,1% trong 30 phút ở 60°C. Đổ bỏ dung dịch, dùng giấy lọc làm khô màng lai.

Hiển thị trên phim X quang và phân tích kết quả: Phức hợp enzyme Streptavidin-AP có khả năng gắn bám đặc hiệu với gốc biotin trên mẫu dò. Ngoài ra, enzyme Alkaline phosphatase có khả năng phân hủy BCIP-T (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p-toluidine salt) thành hợp chất có màu tím đen. Nhờ vậy có thể phát hiện mẫu dò gắn với đoạn DNA cần nghiên cứu trên màng lai. Quy trình này được thực hiện theo hướng dẫn của bộ kit Biotin Chromogenic Detection Kit (hãng Themoscience).

2.3.4.3. Phân tích sự biểu hiện của protein tái tổ hợp CrDAT trong cây chuyển gen

Các cây chuyển gen dương tính với kết quả lai Southern được sử dụng cho phân tích sự biểu hiện protein tái tổ hợp CrDAT bằng Western blot. Western blot thực hiện với các bước cơ bản sau: (1) Tách chiết protein tổng số (nghiền 0,5 g lá trong nitor lỏng và hoà tan trong 1ml PBS + Tween 0,05%, ly tâm 13000 rpm, 15 phút); (2) Điện di biến tính protein trên gel polyacrylamide - SDS 10 %; (3) Chuyển protein trên gel điện di lên màng lai nitrocellulose bằng máy Pierce G2 Fast Blotter (25V, 1,3 mA trong 20 phút); (4) Màng chứa kháng nguyên c-myc được phủ bằng 5% sữa tách béo pha trong dung dịch PBS + Tween 0,05% trong 16 giờ; (5) Lai kháng thể 1 (ngâm màng trong 15 ml dung dịch PBS 5% sữa tách béo có chứa kháng thể c-myc với độ pha loãng 700 lần, lắc trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng); (6) Lai kháng thể 2 (ngâm màng trong 15 ml dung dịch PBS + 5% sữa tách béo có chứa kháng thể anti-mouse IgG có gắn HRP (Horse Radish Peroxidase) trong 2 giờ); (7) Hiện màu trong dung dịch có chứa cơ chất TMB (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine) và hiển thị kết quả dưới ánh sáng thường [33].

2.3.5. Phương pháp tính hiệu suất chuyển gen

Phương pháp tính hiệu suất chuyển gen được tính bằng số dòng cây dương tính với PCR, hoặc dương tính với Southern blot, hoặc với Western blot trong tổng số mẫu biến nạp theo công thức sau:

$$\text{Hiệu suất chuyển gen} = \frac{\text{Số cây dương tính}}{\text{Tổng số mẫu biến nạp}} \times 100\%$$

2.3.6. Các phương pháp phân tích, xử lý số liệu

Các số liệu trong nghiên cứu được xử lý thống kê bằng chương trình Excel theo Chu Hoàng Mậu (2008), xác định giá trị trung bình, phương sai, độ lệch chuẩn, sai số trung bình mẫu [4].

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

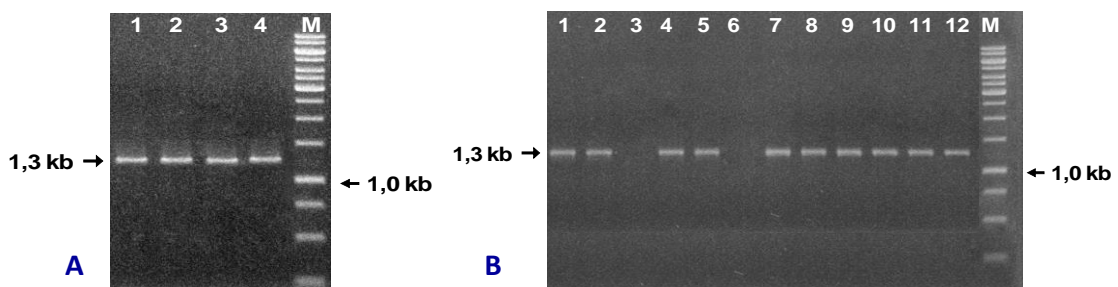
3.1. ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN *CrDAT* PHÂN LẬP TỪ CÂY DỪA CẠN

3.1.1. Kết quả tách dòng và xác định trình tự nucleotide của gen *CrDAT*

3.1.1.1. Kết quả khuếch đại và tách dòng cDNA

Dựa trên những thông tin về trình tự gen *DAT* của cây dứa cạn đã công bố trên Ngân hàng gen mang mã số AF053307 [64], cặp mồi PCR *DAT-NcoI-F/DATR-NotI-R* (có trình tự nucleotide thể hiện ở bảng 2.1) được thiết kế để nhân bản gen *CrDAT* từ mRNA, dự kiến kích thước cDNA được khuếch đại là 1320 bp.

RNA tổng số được tách chiết từ lá cây dứa cạn hoa hồng tím (TN1), dứa cạn hoa trắng (TN2) và cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số bằng phản ứng phiên mã ngược. Phản ứng PCR khuếch đại cDNA của gen *CrDAT* với cặp mồi đã thiết kế *DAT-NcoI-F/DAT-NotI-R*. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 1% cùng với thang DNA 1 kb được thể hiện ở hình 3.1.



Hình 3.1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen *CrDAT*. A: Sản phẩm PCR nhân gen *CrDAT* (cDNA) từ hai mẫu dứa cạn TN1 và TN2. M: thang DNA 1 kb; 1,2: gen *CrDAT* (cDNA) khuếch đại từ mẫu TN1; 3,4: gen *CrDAT* (cDNA) khuếch đại từ mẫu TN2). B: Sản phẩm colony-PCR từ 12 dòng khuẩn lạc. 1-6: đoạn gen *CrDAT* (cDNA) khuếch đại từ khuẩn lạc của

mẫu TN2; 7-12: đoạn gen *CrDAT* (cDNA) khuếch đại từ khuẩn lạc của mẫu TN1.

Kết quả thu được ở hình 3.1A cho thấy, mẫu dừa cạn TN1 và TN2 cho sản phẩm PCR với một băng DNA với kích thước ước tính khoảng 1,3 kb. Các băng đều sáng, rõ nét và không có sản phẩm phụ. Kích thước này phù hợp theo tính toán lý thuyết và tương ứng với kích thước của đoạn mã hoá của gen *CrDAT* ở dừa cạn mang mã số AF053307 trên Ngân hàng gen. Tuy nhiên, để khẳng định chính xác sản phẩm PCR thu được là gen *CrDAT* của cây dừa cạn chúng tôi đã tiến hành tách dòng, xác định trình tự nucleotide và so sánh với trình tự gen *DAT* của dừa cạn mang mã số AF053307 trên Ngân hàng gen quốc tế.

Sau khi tinh sạch, sản phẩm PCR được gắn trực tiếp vào vector tách dòng pBT, tạo vector tái tổ hợp pBT-*CrDAT* và biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α . Tiến hành chọn dòng các khuẩn lạc màu trắng và chọn ngẫu nhiên 12 dòng khuẩn lạc trắng cho phản ứng colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu *DAT-NcoI-F/DAT-NotI-R*. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR ở hình 3.1B cho thấy, băng DNA có kích thước khoảng 1,3 kb xuất hiện ở tất cả các làn điện di 7, 8, 9, 10, 11, 12 của các dòng khuẩn lạc chứa đoạn gen *CrDAT* từ mẫu TN1; băng DNA xuất hiện ở các làn điện di số 1, 2, 4, 5 đối với các dòng khuẩn lạc chứa đoạn gen *CrDAT* từ mẫu TN2; Kích thước của đoạn DNA tương ứng kích thước của gen *DAT* của cây dừa cạn theo tính toán lý thuyết.

Các khuẩn lạc màu trắng dương tính với phản ứng với colony-PCR được sử dụng tách chiết plasmid và các plasmid tái tổ hợp được đem giải trình tự nucleotide.

3.1.1.2. Xác định trình tự gen *CrDAT*

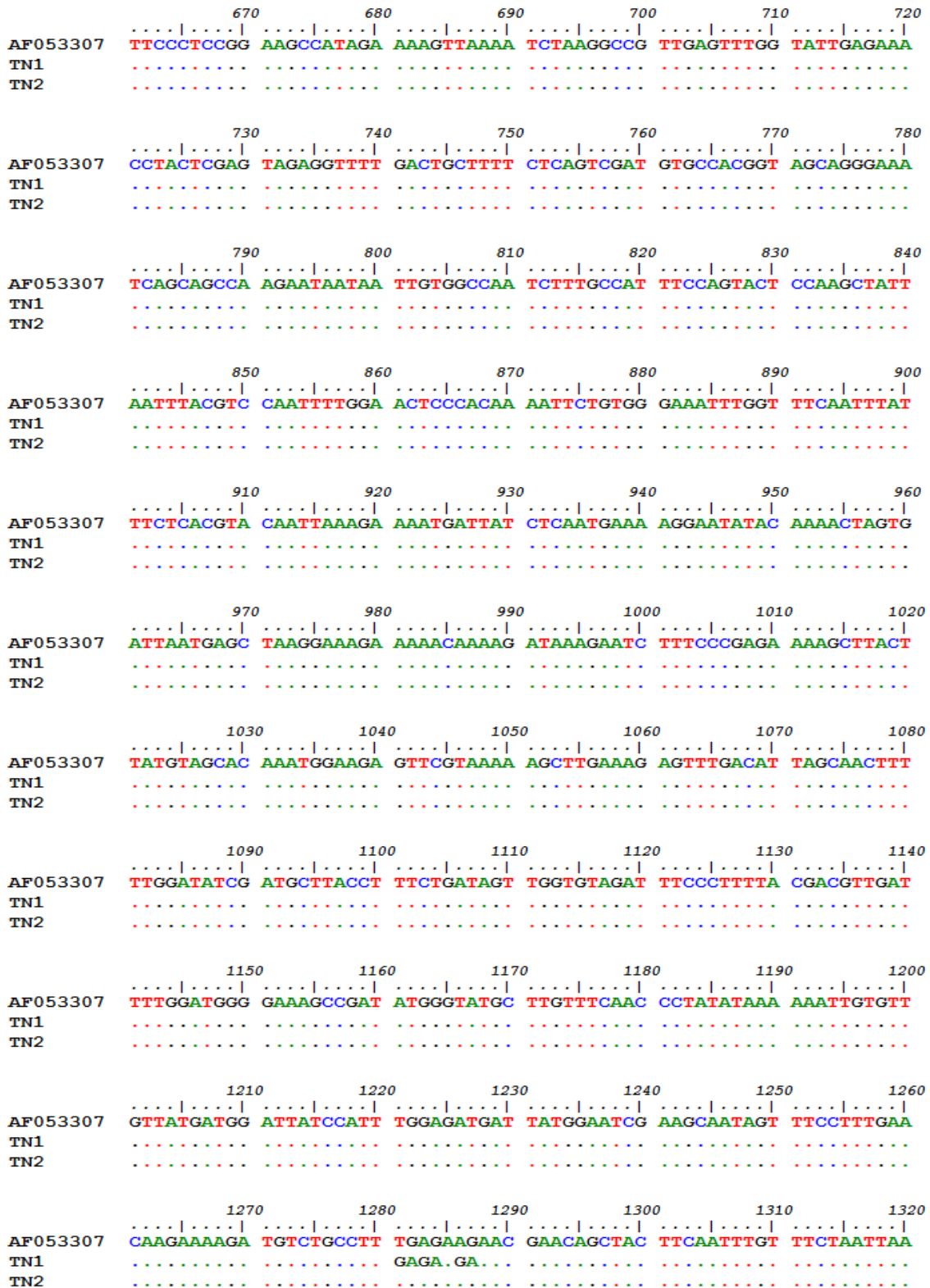
Kết quả giải trình tự nucleotide của đoạn cDNA phân lập từ hai mẫu dưa cạn TN1 và TN2 đều cho kích thước 1320 bp (Hình 3.2). Phân tích bằng BLAST trong NCBI cho thấy trình tự nucleotide của đoạn cDNA phân lập từ hai mẫu dưa cạn TN1 và TN2 là đoạn gen *DAT* của cây dưa cạn. Trình tự gen *CrDAT* của hai mẫu dưa cạn TN1, TN2 thu được so với trình tự gen *DAT* mang mã số AF053307 trên Ngân hàng gen NCBI cho thấy, đoạn mã hóa của gen *CrDAT* có độ tương đồng cao. Gen *CrDAT* phân lập từ hai mẫu dưa cạn TN1 và TN2 có độ tương đồng so với trình tự gen *DAT* mang mã số AF053307 là 99,5% và 99%. Như vậy có thể kết luận rằng, gen *CrDAT* phân lập từ mẫu dưa cạn TN1 và TN2 đã được tách dòng thành công. Trình tự nucleotide của gen *CrDAT* phân lập từ hai mẫu dưa cạn TN1, TN2 đã được đăng ký trên Ngân hàng Gen quốc tế với mã số LN809930 và LN809931.

3.1.2. So sánh trình tự nucleotide của gen *CrDAT*

Trình tự nucleotide của mẫu dưa cạn TN1 có sự sai khác so với trình tự mang mã số AF053307 ở 6 vị trí nucleotide (1281, 1282, 1283, 1284, 1286, 1287). Gen *CrDAT* của mẫu dưa cạn TN2 có sự sai khác so với trình tự mang mã số AF053307 ở 7 vị trí nucleotide (482, 493, 500, 503, 505, 519, 566). Trình tự nucleotide của gen *CrDAT* ở hai mẫu dưa cạn TN1 và TN2 khác nhau ở 13 nucleotide (Bảng 3.1).

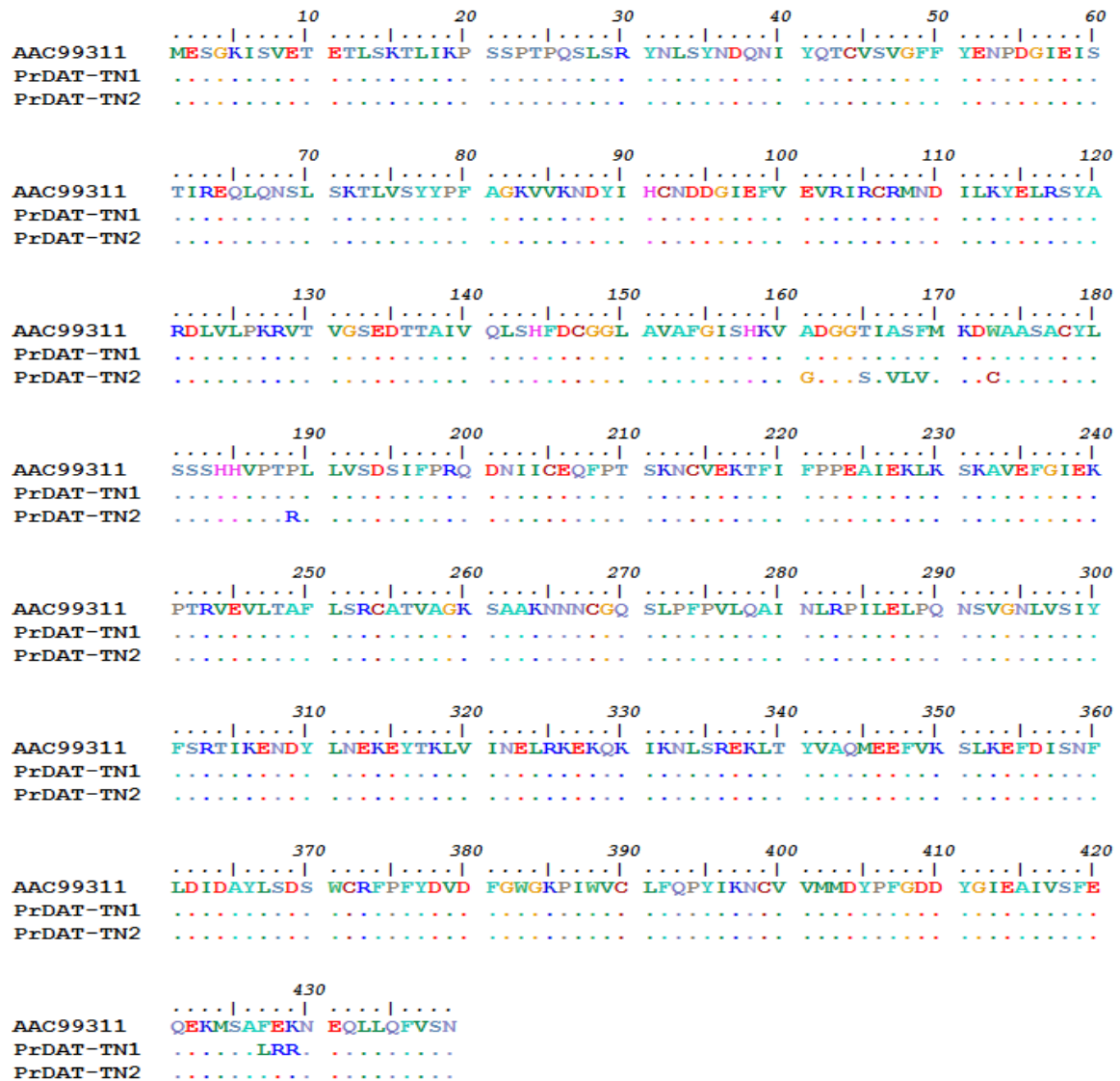
Bảng 3.1. Các vị trí nucleotide sai khác giữa ba trình tự nucleotide của gen *CrDAT*

Vị trí	482	493	500	503	505	519	566	1281	1282	1283	1284	1286	1287
AF05330 7	C	A	C	C	T	G	C	T	G	A	G	A	G
TN1	C	A	C	C	T	G	C	G	A	G	A	G	A
TN2	G	T	T	T	G	T	G	T	G	A	G	A	G



Hình 3.2. Trình tự nucleotide của gen *CrDAT* phân lập từ cây dưa cạn mẫu TN1, TN2 và trình tự mang mã số AF053307 trên Ngân hàng gen quốc tế.

Tiếp tục phân tích, so sánh trình tự amino acid suy diễn từ trình tự nucleotide của hai mẫu dưa cạn TN1, TN2 với protein mang mã số AAC99311 trên Ngân hàng Gen (protein suy diễn từ gen *CrDAT* mang mã số AF053307), kết quả được thể hiện ở hình 3.3.



Hình 3.3. Trình tự amino acid suy diễn của gen *CrDAT* từ hai mẫu dưa cạn TN1, TN2 và của protein mang mã số AAC99311 trên Ngân hàng Gen.

Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn của protein DAT ở hai mẫu dưa cạm TN1, TN2 và protein DAT mang mã số AAC99311 trên Ngân hàng Gen (protein suy diễn từ gen *CrDAT* mang mã số AF053307) (Hình 3.3) cho thấy protein DAT gồm 439 amino acid và có độ tương đồng cao. So với protein mang mã số AAC99311 trên Ngân hàng gen thì trình tự amino acid suy diễn của mẫu TN1 có độ tương đồng 99,3 %, của mẫu TN2 có độ tương đồng 99,4 %. Trình tự amino acid suy diễn của hai mẫu TN1 và TN2 tương đồng là 97,7 %. Tuy nhiên, các trình tự amino acid của protein DAT cũng có sự khác nhau ở 10 vị trí amino acid (Bảng 3.2).

Bảng 3.2. Các vị trí sai khác giữa trình tự amino acid suy diễn của protein DAT ở mẫu dưa cạm TN1, TN2 và protein mang mã số AAC99311 trên Ngân hàng Gen.

Vị trí	161	165	167	168	169	173	189	427	428	429
AAC9931 1	A	T	A	S	F	W	P	F	E	K
TN1	A	T	A	S	F	W	P	L	R	R
TN2	G	S	V	L	V	C	R	F	E	K

Bảng 3.2 cho thấy, trình tự amino acid suy diễn của mẫu TN1 khác với DAT mang mã số AAC99311 ở 3 amino acid (427, 428, 429), còn trình tự amino acid suy diễn của mẫu TN2 khác với DAT mang mã số AAC99311 ở 7 amino acid (161, 165, 167, 168, 169, 173, 189).

Deacetylindoline 4-O-acetyltransferase là enzyme thành viên của họ transferase có chức năng xúc tác ở khâu cuối cùng trong sinh tổng hợp vindoline. Motif HXXXD có thể là một phần trong vị trí hoạt động của

enzyme này. Vùng transferase của DAT có 427 amino acid, từ amino acid thứ 8 đến 434 [64]. Cây dứa cựa gồm ba giống khác nhau, giống dứa cựa hoa hồng tím, dứa cựa hoa trắng và dứa cựa hoa trắng đỏ. Marfori và Alejar (1993), đã phân tích sự thay đổi hàm lượng alkaloid trong mô sẹo có nguồn gốc từ lá, rễ và hoa của mẫu dứa cựa hoa hồng tím và mẫu hoa trắng đưa ra nhận xét rằng, hàm lượng alkaloid phụ thuộc vào nguồn gốc mô sẹo từ lá, rễ hay hoa và hàm lượng alkaloid ở mô sẹo có nguồn gốc từ rễ của mẫu dứa cựa hoa hồng tím cao hơn ở mẫu hoa trắng [41]. Protein DAT của mẫu dứa cựa TN1 và TN2 khác nhau ở 10 amino acid trong vùng transferase, sự khác nhau này có liên quan gì đến tổng hợp alkaloid và sự khác nhau về hàm lượng alkaloid giữa mẫu hoa hồng tím và mẫu hoa trắng là vấn đề cần tiếp tục nghiên cứu để làm sáng tỏ.

3.2. THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN MANG GEN CrDAT

3.2.1. Tạo vector mang cấu trúc chứa gen đích CrDAT

Thu nhận gen CrDAT từ vector tách dòng tái tổ hợp pBT-CrDAT

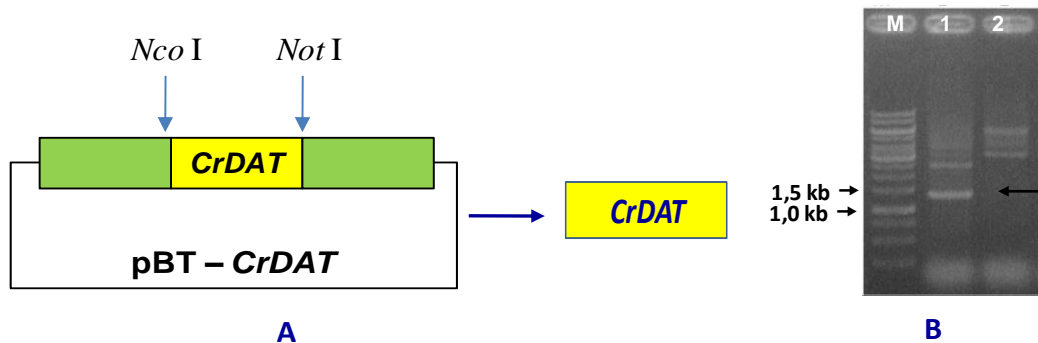
Gen *CrDAT* của cây dứa cựa màu hoa hồng tím đã được tách dòng trong vector pBT (pBT-*CrDAT*) được cắt bằng cặp enzyme giới hạn là *NcoI/NotI*. Kết quả tạo hai phân đoạn DNA có kích thước khoảng 1,3 kb và 2,7 kb. Trong đó phân đoạn DNA 1,3 kb chính là gen *CrDAT* cần thu nhận. Hình 3.4 thể hiện sản phẩm DNA tinh sạch có kích thước khoảng 1,3 kb tương ứng với kích thước gen *CrDAT* sau khi cắt vector pBT tái tổ hợp bởi cặp enzyme giới hạn là *NcoI/NotI*. Đoạn DNA này được dùng để phát triển vector chuyển gen ở các bước tiếp theo.

Tạo vector tái tổ hợp chứa cấu trúc 35S-CrDAT-cmyc-KDEL

Vector trung gian pRTRA7/3 được dùng để cung cấp các thành phần cần thiết cho việc biểu hiện và kiểm tra hoạt động của gen đích *CrDAT* trong

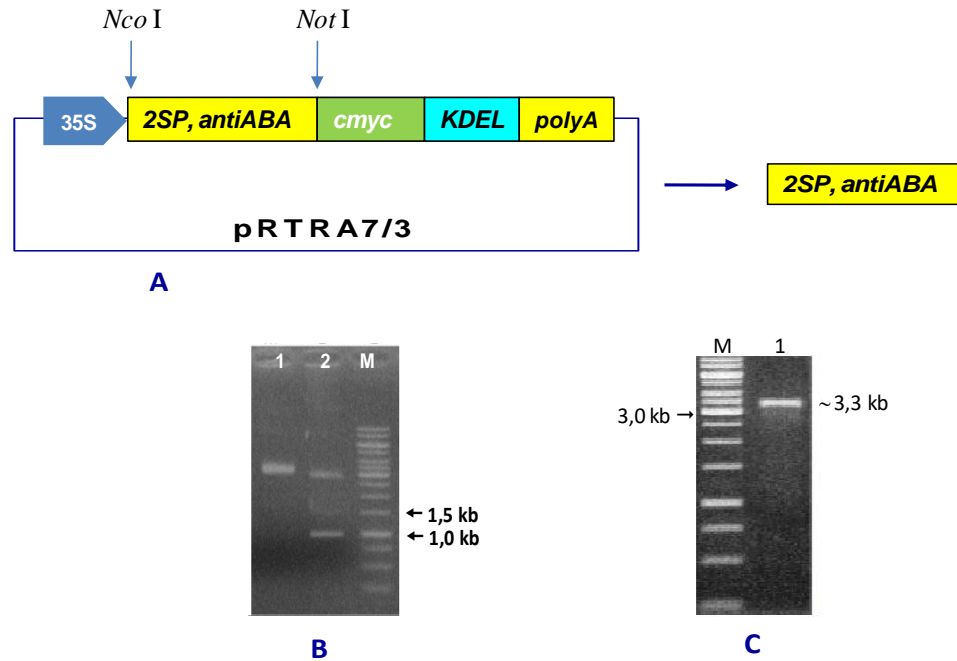
tế bào thực vật như: CaMV35S là promotor mạnh phân lập từ virus gây khảm súp lơ, có thể khởi động phiên mã gen chuyển ở tất cả các tế bào và mô trên cơ thể thực vật. Vector pRTRA 7/3 còn cung cấp trình tự chuỗi peptit kháng nguyên cmyc để có thể dễ dàng xác định sự có mặt của sản phẩm protein đích khi dùng kháng thể tương ứng bằng Western blot hoặc ELISA.

Sau khi cắt mở vòng được vector pRTRA7/3 bằng sử dụng cặp enzyme giới hạn *NcoI/NotI* thu được hai phân đoạn DNA với kích thước tính toán khoảng 0,9 kb (là đoạn 2SP và antiABA) và 3,3 kb (kích thước của vector pRTRA7/3), trong đó phân đoạn 3,3 kb chính là của pRTRA7/3 đã mở vòng.



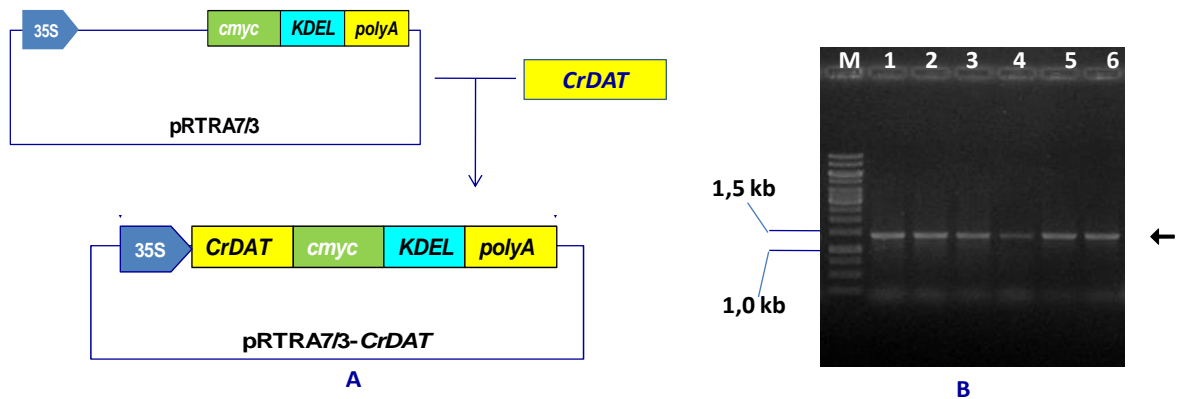
Hình 3.4. Kết quả cắt vector tách dòng tái tổ hợp pBT-*CrDAT* với cặp enzyme giới hạn *NcoI* và *NotI*. A: Sơ đồ mô tả cắt vector tách dòng tái tổ hợp pBT-*CrDAT* tạo gen *CrDAT*; B: Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm cắt pBT-*CrDAT*; M: DNA 1 kb; 1: pBT-*CrDAT* đã cắt; 2: pBT-*CrDAT* chưa cắt.

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm cắt ở hình 3.5 đúng như tính toán. Phân đoạn có kích thước 3,3 kb được tinh sạch để thu nhận cấu trúc mở vòng của pRTRA7/3 (Hình 3.5).



Hình 3.5. Kết quả cắt mở vòng vector pRTRA7/3. A. Sơ đồ cắt vector pRTRA7/3 bằng cặp enzyme *NotI/NcoI*. B: Kết quả cắt pRTRA7/3; M: DNA 1 kb; 1: pRTRA7/3 chưa cắt; 2: pRTRA7/3 đã cắt) C- Sản phẩm tinh sạch vector pRTRA7/3; M- Thang DNA 1kb; 1- Vector pRTRA7/3 tinh sạch.

Tiến hành phản ứng gắn gen *CrDAT* vào vector pRTRA7/3 đã mở vòng nhờ DNA T4 ligase tạo ra cấu trúc tái tổ hợp pRTRA7/3 – *CrDAT* chứa cấu trúc 35S-*CrDAT*-*cmyc*-KDEL (Hình 3.6A). Vector pRTRA7/3 – *CrDAT* được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α và chọn dòng bằng phản ứng colony – PCR với cặp mồi đặc hiệu *CrDAT-NcoI/CrDAT-NotI*. Kết quả điện di kiểm tra cho thấy, cả 5 dòng khuẩn lạc xuất hiện một băng DNA đặc hiệu khoảng 1,3 kb tương ứng với kích thước của gen *CrDAT* (Hình 3.6B). Như vậy cả 6 dòng vi khuẩn chọn lọc đều mang plasmid tái tổ hợp chứa gen *CrDAT*. Plasmid tái tổ hợp pRTRA7/3-DAT được sử dụng để thu nhận cấu trúc 35S-*CrDAT*-*cmyc*-KDEL phục vụ thiết kế vector chuyển gen thực vật.



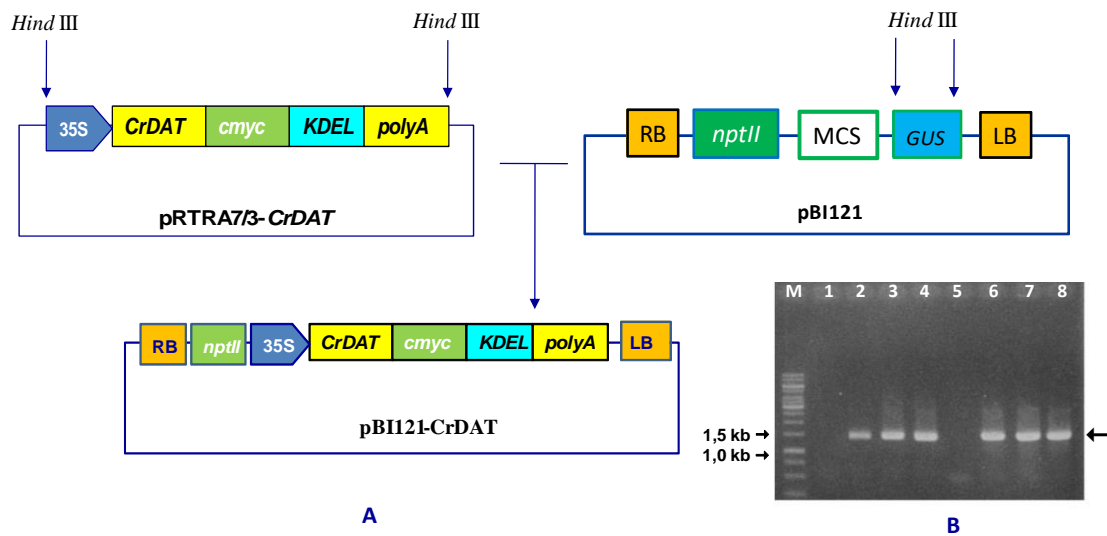
Hình 3.6. Kết quả tạo vector tái tổ hợp pRTRA7/3-CrDAT. A: Sơ đồ tạo vector pRTRA7/3-CrDAT. B: Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm clony-PCR các dòng khuẩn lạc chứa pRTRA7/3-CrDAT. M: thang DNA 1kb; 1-6: Các dòng khuẩn lạc.

Thu nhận cấu trúc 35S-CrDAT-cmc-KDEL-polyA, cắt mở vòng pBI121 và tạo vector chuyển gen pBI121-CrDAT

Sau khi tạo được cấu trúc gen CrDAT đầy đủ các thành phần cần thiết cho biểu hiện và kiểm tra hoạt động của gen trong vector trung gian pRTRA7/3-CrDAT. Sử dụng enzyme giới hạn *Hind*III xử lý vector pRTRA7/3-CrDAT để thu nhận cấu trúc 35S-CrDAT-cmc-KDEL-polyA.

3.2.2. Tạo vector chuyển gen và chọn dòng *A.tumefaciens* tái tổ hợp chứa vector chuyển gen pBI121-CrDAT

Sử dụng enzyme giới hạn *Hind*III mở vòng vector chuyển gen pBI121. Gắn cấu trúc 35S-CrDAT-cmc-KDEL-polyA vào vector chuyển gen pBI121 bằng DNA T4 ligase tạo vector chuyển gen mang cấu trúc chứa gen chuyển CrDAT (pBI121-CrDAT) (Hình 3.7A). Sản phẩm tái tổ hợp pBI121-CrDAT được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5 α . Vi khuẩn sau khi biến nạp được nuôi trên môi trường LB đặc bổ sung kháng sinh chọn lọc Km (mg/l).



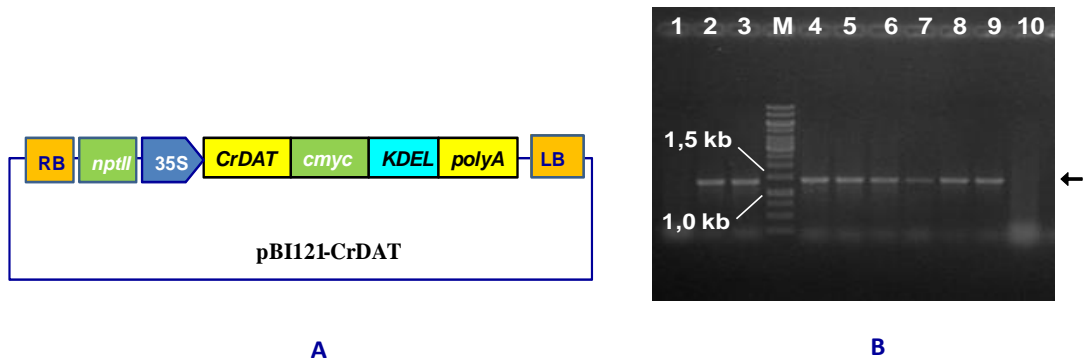
Hình 3.7. Kết quả tạo vector chuyển gen pBI121- *CrDAT*. A- Sơ đồ tạo cấu trúc vector chuyển gen pBI121-*CrDAT*. LB: bờ trái của T-DNA; RB: bờ phải của T-DNA; *nptII*: gen kháng Km; 35S: promoter CaMV35S. B- Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR các dòng khuẩn lạc *E.coli* DH5 α . M: thang DNA 1 kb; 1-8: kết quả điện di sản phẩm colony-PCR từ 8 dòng khuẩn lạc.

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony - PCR ở hình 3.7B cho thấy 2 dòng khuẩn lạc (lần điện di số 1,5) âm tính, không xuất hiện băng đặc hiệu, có thể do chứa plasmid pBI121 tự đóng vòng, kháng được Km nhưng không mang cấu trúc gen *CrDAT*. Các dòng dương tính với colony - PCR (lần điện di số 2, 3, 4, 6, 7, 8) xuất hiện băng đặc hiệu khoảng 1,3 kb, chứa plasmid tái tổ hợp mang cấu trúc gen *CrDAT*. Những dòng khuẩn lạc dương tính được nuôi trong LB lỏng bổ sung kháng sinh chọn lọc Km để nhân dòng vector tái tổ hợp.

Chọn dòng A. tumefaciens tái tổ hợp mang vector chuyển gen pBI121-CrDAT

Plasmid tái tổ hợp pBI121-35S-*CrDAT*-*cmc*-KDEL được tách chiết, kiểm tra và biến nạp vào *A. tumefaciens*. Cấu trúc vector chuyển gen pBI121 – *CrDAT* bao gồm các thành phần chính được thể hiện ở hình 3.8A. Các dòng *A. tumefaciens* tái tổ hợp chứa vector chuyển gen pBI121-35S-DAT-*cmc* được

kiểm tra bằng colony - PCR và kết quả phân tích ngẫu nhiên 10 dòng khuẩn lạc thu được 8 dòng dương tính với colony-PCR (Hình 3.8B). Các dòng *A. tumefaciens* tái tổ hợp chứa vector chuyển gen pBI121-*CrDAT* được lưu giữ và sử dụng cho các thí nghiệm chuyển gen tiếp theo.

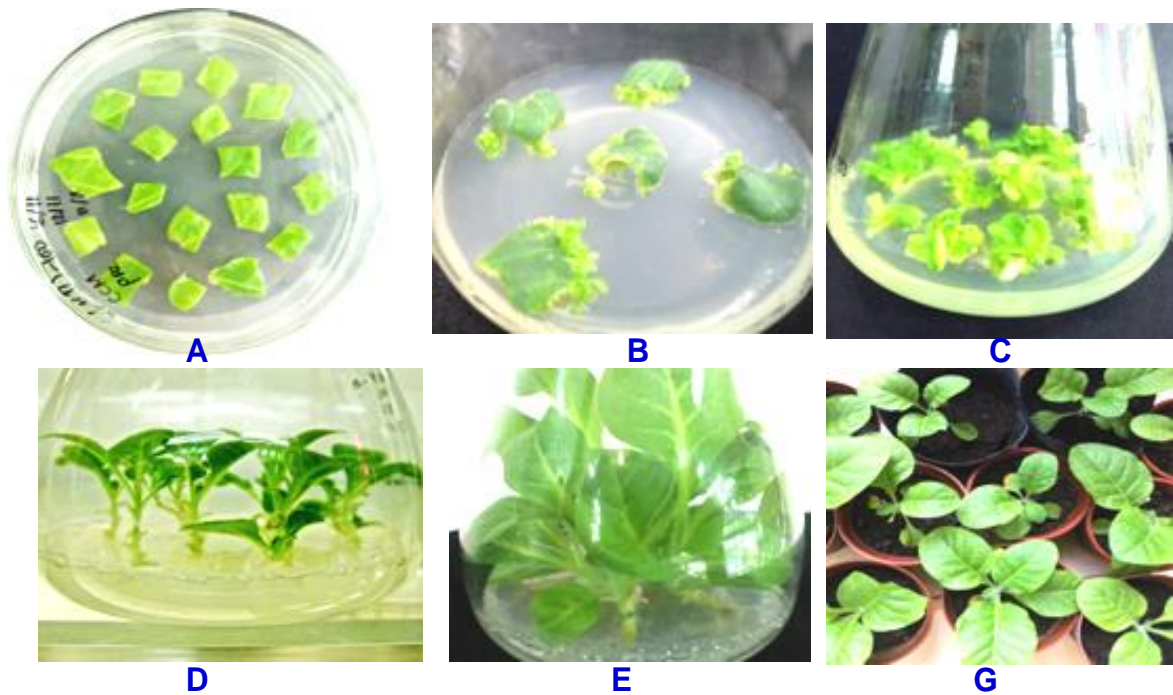


Hình 3.8. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pBI121-*CrDAT* và kết quả điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR. A: Cấu trúc vector chuyển gen pBI121-*CrDAT*. LB: bờ trái của T-DNA; RB: bờ phải của T-DNA; *nptII*: gen kháng kanamycine; 35S: promoter CaMV35S. B: Kết quả kiểm tra sản phẩm colony-PCR các dòng *A. tumefaciens* chứa vector chuyển gen pBI121-*CrDAT*.

3.3. Phân tích biểu hiện gen *CrDAT* trên cây thuốc lá chuyển gen

3.3.1. Biến nạp cấu trúc chứa gen *CrDAT* và tạo cây thuốc lá chuyển gen nhờ *A. tumefaciens*

Các mảnh lá cây thuốc lá giống K326 có kích thước khoảng 1cm² được sử dụng làm vật liệu nhận gen. Thí nghiệm chuyển gen *CrDAT* vào thuốc lá được trình bày ở hình 3.9.



Hình 3.9. Hình ảnh mô tả quá trình biến nạp, chọn lọc và tái sinh tạo cây thuốc lá chuyển gen. A: Mảnh lá sau khi rửa khuẩn được cấy trên môi trường chọn lọc; B, C: Tái sinh đa chồi; D: Kéo dài chồi; E: Tạo rễ; G: Ra cây trong bầu ở điều kiện nhà lưới.

Sau khi ngâm mảnh lá trong dung dịch chứa khuẩn *A. tumefaciens* CV58 tái tổ hợp mang cấu trúc chứa gen *CrDAT* trong 30 phút, thấm khô mảnh lá và nuôi tiếp trên môi trường MS. Sau ba ngày đồng nuôi cây trong tối trên môi trường MS, rửa khuẩn bằng kháng sinh cefotaxim và được chuyển sang môi trường MS có bổ sung kháng sinh cefotaxim, Km và BAP 1 mg/l (Hình 3.9A). Sau 2-3 tuần từ các mảnh lá xuất hiện các chồi nhỏ (Hình 3.9B,C). Các chồi nhỏ được tách từ các mảnh lá và cấy lên môi trường MS bổ sung kháng sinh (Hình 3.9D), các chồi được cấy chuyển sang môi trường MS để cho ra rễ (Hình 3.9E). Các cây thuốc lá sau khi ra rễ trên môi trường có kháng sinh chọn lọc được chuyển trực tiếp ra bầu chứa giá thể ra cây trong nhà

lưới (Hình 3.9G). Kết quả biến nạp gen và tái sinh cây thuốc lá chuyển gen được trình bày ở bảng 3.3.

Bảng 3.3. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen *CrDAT* vào cây thuốc lá

Đối chứng và thí nghiệm	Tổng số mảnh lá	Số mảnh lá sống sót sau 4 tuần	Số mảnh lá cảm ứng tạo chồi	Số cây ra rễ trên môi trường chọn lọc	Số cây ra bầu	Số cây trồng trong nhà lưới
ĐC0*	30	0	0	0	0	0
ĐC1*	30	30	40	25	15	15
Lần 1	82	79	68	55	34	22
Thí nghiệm 2	90	86	74	61	44	25
Lần 3	77	70	63	52	35	18
<i>Tổng</i>	<i>249</i>	<i>235</i>	<i>205</i>	<i>186</i>	<i>113</i>	<i>65</i>

Ghi chú: ĐC0*: các mẫu thuốc lá không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh; ĐC1*: các mẫu thuốc lá không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh.

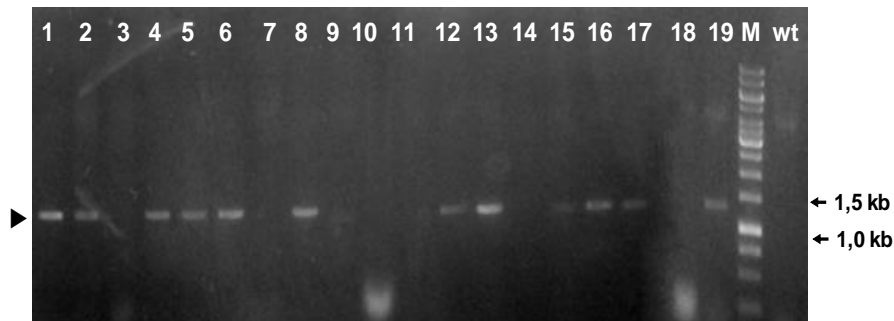
Bảng 3.3 cho thấy, sau 3 lần biến nạp cấu trúc mang gen *CrDAT* vào các mảnh thuốc lá. Kết quả có 235/ 249 mảnh lá sống sót sau 4 tuần, phát sinh 205 chồi và thu được 186 cây con *in vitro* sống sót trên môi trường MS có bổ sung kháng sinh. Số cây ra bầu đất là 113 cây và có 65 cây trồng tại nhà lưới có biểu hiện xanh tốt, mập mạp. Trong khi đó, ở ĐC0* trong 30 mảnh lá không có mẫu nào sống sót; còn ở ĐC1* thuốc lá không chuyển gen

được cấy lên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh thu được 30 cây sống, số cây ra bầu đất là 15 cây và đem trồng ở nhà lưới.

3.3.2. Phân tích sự có mặt và sự hợp nhất của gen chuyển *CrDAT* trong hệ gen cây thuốc lá

*Xác định sự có mặt của gen chuyển *CrDAT* trong hệ gen cây thuốc lá bằng PCR*

Các dòng cây thuốc lá chuyển gen T0 sau khi trồng trong nhà lưới được 4 tuần thì tiến hành thu lá để thực hiện phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *CrDAT*. Thu lá của 19 cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0 có sự sinh trưởng và phát triển bình thường (ký hiệu từ T0-1 đến T0-19) đem tách chiết DNA tổng số và tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *CrDATF-Xba/CrDATR-Sac*. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1% được thể hiện ở hình 3.10.



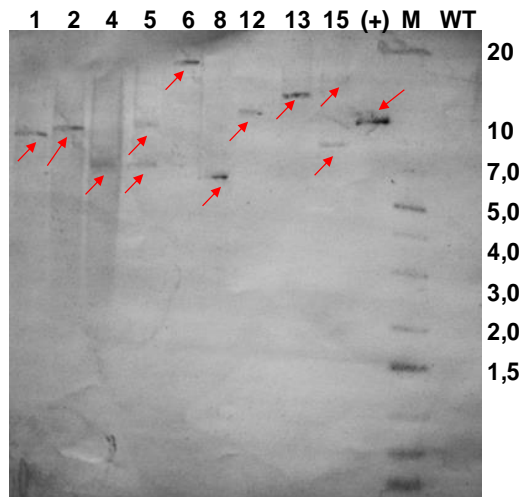
Hình 3.10. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định sự có mặt của gen *CrDAT* trong các cây thuốc lá chuyển gen và đối chứng. Từ 1 đến 19: các dòng cây thuốc lá chuyển gen; M: thang DNA 1 kb; wt: cây thuốc lá không chuyển gen.

Hình 3.10 cho thấy, trong 19 dòng cây thuốc lá chuyển gen thì có 12 dòng cây thuốc lá chuyển gen dương tính với phản ứng PCR là các dòng T0-1, T0-2, T0-4, T0-5, T0-6, T0-8, T0-12, T0-13, T0-15, T0-16, T0-17, T0-19 (các dòng ở làn điện di số 1, 2, 4, 5, 6, 8, 12, 13, 15, 16, 17, 19); còn 7 dòng T0-3,

T07, T0-9, T0-10, T0-11, T0-14, T0-18 (các dòng ở làn điện di số 3, 7, 9, 10, 11, 14, 18) không xuất hiện băng DNA. Băng điện di sản phẩm PCR thu được có kích thước khoảng 1,3 kb phù hợp với kích thước của gen chuyển *CrDAT*. Như vậy bước đầu có thể nhận xét rằng, cấu trúc mang gen chuyển *CrDAT* đã được chuyển vào cây thuốc lá giống K326 và tạo được các dòng cây thuốc lá chuyển gen T0.

Xác định sự hợp nhất của gen chuyển CrDAT vào hệ gen cây thuốc lá bằng Southern blot

Để khẳng định gen chuyển *CrDAT* đã được hợp nhất vào hệ gen cây thuốc lá, DNA của 9 cây thuốc lá chuyển gen (T0-1, T0-2, T0-4, T0-5, T0-6, T0-8, T0-12, T0-13, T0-15) cho kết quả PCR dương tính được lựa chọn ngẫu nhiên để sử dụng phân tích bằng Southern blot. Sử dụng enzyme giới hạn *SacI* cắt DNA tổng số của 9 dòng cây thuốc lá chuyển gen và kết quả phân tích Southern blot được thể hiện ở hình 3.11.



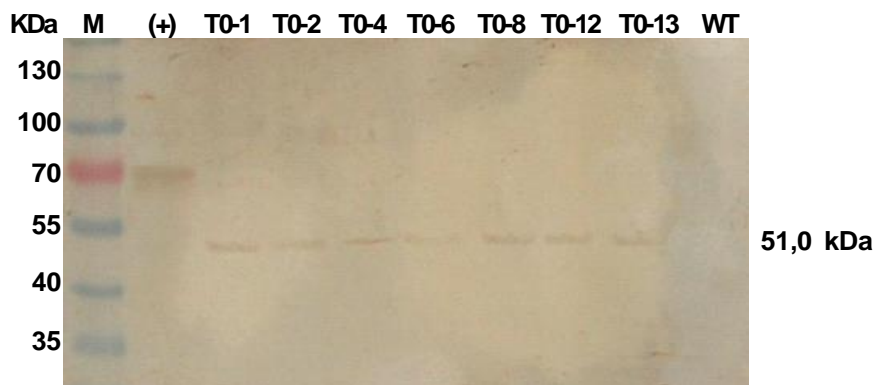
Hình 3.11. Kết quả phân tích Southern blot các dòng thuốc lá chuyển gen *CrDAT*. M: Marker 1kbplus, (+) Plasmid pBI121- *CrDAT* cắt bởi *SacI*, 1-15: các cây chuyển gen T0 (1: T0-1 ; 2 : T0-2 ; 4 : T0-4 ; 5 : T0-5 ; 6 : T0-6 ; 8 :

T0-8 ; 12 : T0-12 ; 13 : T0-13; 15 : T0-15), WT: cây đối chứng không chuyển gen.

Hình 3.11 cho thấy, tất cả 9 dòng thuốc lá chuyển gen cho kết quả lai Southern (T0-1, T0-2, T0-4, T0-5, T0-6, T0-8, T0-12, T0-13, T0-15), trong đó hai dòng T0-5 và T0-15 cho 2 băng DNA (2 bản copy), bảy dòng còn lại đều có một băng DNA ở các kích thước khác nhau. Bảy dòng thuốc lá chuyển gen (T0-1, T0-2, T0-4, T0-6, T0-8, T0-12, T0-13) cho kết quả lai Southern có một bản copy được sử dụng phân tích Western blot.

3.3.3 Phân tích sự biểu hiện protein CrDAT tái tổ hợp trên cây thuốc lá chuyển gen

Protein tổng số của 7 dòng thuốc lá chuyển gen T0-1, T0-2, T0-4, T0-6, T0-8, T0-12, T0-13 xuất hiện 1 băng DNA từ kết quả lai Southern được phân tích điện di SDS-PAGE và chuyển các phân đoạn protein lên màng nitrocellulose và thực hiện phản ứng lai Western. Protein CrDAT tái tổ hợp trong mẫu protein chiết từ các cây thuốc lá chuyển gen được phát hiện nhờ phản ứng hiện màu bằng cơ chất TMB (3,3'; 5,5'-Tetramethylbenzidine). Kết quả phân tích sự biểu hiện protein tái tổ hợp CrDAT ở 7 dòng cây thuốc lá chuyển gen T0-1, T0-2, T0-4, T0-6, T0-8, T0-12, T0-13 có phản ứng dương tính với lai Southern bằng Western blot được thể hiện ở hình 3.12.



Hình 3.12. Kết quả phân tích Western blot các dòng cây thuốc lá chuyển gen *CrDAT*. M: thang protein chuẩn ; (+) đối chứng dương ; T0-1, T0-2, T0-4, T0-6, T0-8, T0-12, T0-13: các cây chuyển gen; WT: cây đối chứng không chuyển gen.

Hình 3.12 cho thấy, trên màng lai nitrocellulose xuất hiện băng màu ở vị trí kích thước khoảng 51 kDa ở các dòng cây thuốc lá chuyển gen T0-1, T0-2, T0-4, T0-6, T0-8, T0-12, T0-13, còn cây thuốc lá không chuyển gen (WT) không xuất hiện băng protein. Kết quả cho thấy, 7 dòng cây thuốc lá chuyển gen đều có protein tái tổ hợp mang đuôi c-myc nên xảy ra phản ứng tạo màu của enzyme trên kháng thể với cơ chất. Làn chạy điện di protein của cây thuốc lá không chuyển gen do không có protein gắn đuôi c-myc nên không xảy ra phản ứng tạo màu. Như vậy có thể thấy gen *CrDAT* đã được biểu hiện và protein tái tổ hợp CrDAT được tổng hợp ở các dòng cây thuốc lá *Nicotinana tabacum* K326.

Kết quả phân tích PCR, Southern blot và Western blot các dòng cây thuốc lá chuyển gen *CrDAT* ở thế hệ T0 đã chứng minh gen chuyển *CrDAT* đã hợp nhất vào hệ gen của cây thuốc lá được chuyển gen và gen chuyển *CrDAT* hoạt động phiên mã và dịch mã cho kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp CrDAT.

3.4. Thảo luận kết quả thiết kế và đánh giá hoạt động của vector chuyển gen pBI121-*CrDAT*

Vector pBI121-*CrDAT* được thiết kế chứa cấu trúc 35S-*CrDAT*-cmyc-KDEL-polyA, gen *nptIII* kháng Km và một số thành phần khác. Tập hợp các thành phần trong cấu trúc nằm giữa bờ trái (Left Border-LB) và bờ phải (Right Border-RB) của vector thiết kế bảo đảm cho gen đích hoạt động và dễ dàng

sàng lọc thể tái tổ hợp được gọi là cấu trúc gen chuyển hoàn chỉnh (cassette). Promoter 35S, một promoter mạnh được phân lập từ virus gây bệnh khảm lá súp lơ (*Cauliflower Mosaic Virus - CaMV*). *CaMV35S* là promoter mạnh có thể khởi động phiên mã cho gen trong tất cả các loại mô bào thực vật ở các giai đoạn sinh trưởng và phát triển. Trong nghiên cứu này, khi thiết kế vector chuyển gen pBI121, promoter *CaMV35S* đã được sử dụng hướng đến việc khởi động phiên mã của gen chuyển *CrDAT* nhằm tăng cường sinh tổng hợp vindoline ở cây dứa cạn. Một số nghiên cứu gần đây về chuyển gen ở thực vật đã sử dụng promoter *CaMV35S* trong cấu trúc vector chuyển gen đã thu được kết quả biểu hiện gen chuyển khả quan thông qua phân tích Western blot và ELISA. Promoter *CaMV35S* trong vector chuyển gen pCB301-*GmEXP1* đã tăng cường sự biểu hiện của gen chuyển *GmEXP1* trên cây thuốc lá chuyển gen được xác nhận bằng kết quả phân tích Real-time RT-PCR và Western blot (Lo và cs, 2015). Sự biểu hiện mạnh của gen mã hóa nhân tố phiên mã *GmDREB2* trong vector pBI121-*GmDREB2* chứa promoter *CaMV35S* được minh chứng bằng kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp GmDREB2 và tác động tăng cường tổng hợp proline ở cây chuyển gen trong điều kiện gây hạn nhân tạo (Tan và cs, 2015). Theo hướng tạo cây chuyển gen kháng virus theo cơ chế RNAi, Lo Thi Mai Thu và cs (2016) đã sử dụng promoter *CaMV35S* trong vector chuyển gen mang cấu trúc RNAi [pK7GW-CPi (SMV-BYMV)]. Kết quả phân tích các cây thuốc lá chuyển gen bằng Real-time RT-PCR đã chứng minh sự điều khiển phiên mã của *CaMV35S* đối với cấu trúc RNAi. Kế thừa kết quả của các nghiên cứu trước, vector chuyển gen pBI121-*CrDAT* chứa promoter *CaMV35S* được thiết kế trong mục đích biểu hiện mạnh gen *CrDAT* phân lập từ cây dứa cạn sẽ được chứng minh trong các thí nghiệm chuyển gen ở cây thuốc lá và cây dứa cạn.

Cấu trúc 35S-CrDAT-cmyc chứa đoạn peptide cmyc đã được sử dụng làm kháng nguyên cho phản ứng Western blot để phát hiện protein tái tổ hợp trong cây chuyển gen. Một số cặp kháng nguyên đã được thiết kế để sử dụng cho mục đích chọn cây biến đổi gen, nhưng đuôi cmyc đã được coi là một lựa chọn có hiệu quả và kinh tế cho nhiều nghiên cứu hiện tại. Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi, sự biểu hiện protein tái tổ hợp được phát hiện trong cây thuốc lá mô hình nhờ cấu trúc cmyc trong lai Western blot và hiệu quả sử dụng vector PBI121-*CrDAT* đã được thử nghiệm và đánh giá trên cây mô hình là nền tảng cơ bản cho việc sử dụng vector chuyển gen chứa gen *CrDAT* để biến nạp vào cây dứa cạn.

Khi kiểm tra hoạt động của gen *CrDAT* trên thuốc lá chuyển gen. Kết quả nghiên cứu của Magnotta và cs (2006,2007), cho thấy hoạt động của *CrDAT* ở cây thuốc lá chuyển gen ít hơn 10 lần so với enzyme được tìm thấy trong chiết xuất lá cây dứa cạn. Một nghiên cứu theo hướng sử dụng promoter DAT để đánh giá hoạt động của gen *CrDAT* với việc sử dụng các promoter DAT khác nhau (pDAT 812, pDAT 2.3, pDAT 2.3/DAT và pCAMBIA1305.1) thông qua lây nhiễm *A. tumefaciens* LB4404 vào lá cây thuốc lá để kiểm tra hiệu quả hoạt động của gen *CrDAT* làm cơ sở lựa chọn promoter điều khiển gen *CrDAT* biểu hiện mạnh, kết quả cho thấy vùng promoter DAT được xác định là có cảm ứng với ánh sáng. Nhận xét này cũng được chứng minh bằng thực nghiệm rằng sự biểu hiện gen *CrDAT* liên quan đến sự cảm ứng ánh sáng của promoter [29], [62], [63], [74]. Nghiên cứu của Magnotta và cs (2007) đã chứng minh gen *CrDAT* được biểu hiện ở hệ thống rễ dưới sự điều khiển của promoter 35S [40]. Nghiên cứu của chúng tôi, promoter 35S được sử dụng điều khiển hoạt động của gen *CrDAT* trên cây thuốc lá K326 cho kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp CrDAT với kích thước

khoảng 51,5 kDa và được kiểm tra bằng Western blot. Từ các kết quả trên đã cung cấp thông tin rõ ràng về hoạt động của gen *CrDAT* liên quan đến các nhân tố phiên mã trans và yếu tố *cis* của promoter trong vai trò biểu hiện protein CrDAT ở mô hoặc tế bào cụ thể ở thực vật. Tuy nhiên, yếu tố *cis* và nhân tố trans có vai trò cụ thể như thế nào với sự biểu hiện của gen *CrDAT* trong thực vật chuyển gen cần tiếp được phân tích làm sáng tỏ.

Cấu trúc 35S-CrDAT-cmyc đã được chuyển thành công vào mô thuốc lá *N. tabacum* K326 nhờ *A. tumefaciens*, tạo cây thuốc lá chuyển gen. Sự có mặt và hợp nhất của gen chuyển *CrDAT* vào hệ gen của cây thuốc lá được chuyển gen được kiểm tra bằng PCR và Southern blot. Protein tái tổ hợp CrDAT có trọng lượng phân tử khoảng 51 kDa được biểu hiện ở 7 dòng thuốc lá chuyển gen. Kết quả biến nạp và đánh giá hoạt động của cấu trúc 35S-CrDAT-cmyc ở cây thuốc lá chuyển gen là cơ sở cho việc điều khiển biểu hiện mạnh gen *CrDAT* trong cây dưa cạn, tạo dòng dưa cạn chuyển gen có hàm lượng vincristine và vinblastine được cải thiện.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

1.1. Gen *CrDAT* phân lập từ cây dứa cạn đã được tách dòng phân tử và xác định trình tự nucleotide. Gen *CrDAT* (cDNA) có kích thước 1320 bp, mã hóa cho 439 amino acid.

1.2. Vector chuyển gen thực vật pBI121-*CrDAT* đã được thiết kế và chuyển vào hệ gen của cây thuốc lá và cây dứa cạn chuyển gen đã biểu hiện được protein tái tổ hợp CrDAT có kích thước khoảng 51 kDa.

1.3. Môi trường MS bổ sung sucrose 30 g/l; agar 10 g/l; BAP 1,0 mg/l và IBA 0,6 mg/l; nước dứa 100 ml/l; pH = 5,8 thích hợp cho sự phát sinh chồi và sự sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên. Môi trường MS bổ sung sucrose 30 g/l; agar 10 g/l; BAP 0,5 mg/l và IBA 0,4 mg/l; nước dứa 100 ml/l; pH = 5,8, thích hợp cho sự phát sinh chồi và sinh trưởng chồi từ nách lá mầm.

2. Đề nghị

Tiếp tục chuyển gen DAT vào cây dứa cạn và phân tích cây dứa cạn chuyển gen nhằm tạo ra những cây ở thế hệ T2, T3 có hàm lượng alkaloid cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu Tiếng Việt

1. Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb Y học, Hà Nội.
2. Chu Hoàng Mậu (2008), *Phương pháp phân tích di truyền hiện đại trong chọn giống cây trồng*, Nxb Đại học Thái Nguyên.
3. Vương Đình Tuấn, Nguyễn Xuân Cường, Phan Thị My Lan (2012), *Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến chuyển gen gus vào phôi trưởng thành ở gia đình Thông nhựa bằng vi khuẩn Agrobacterium tumefaciens*, Kết quả nghiên cứu Khoa học công nghệ lâm nghiệp giai đoạn 2006-2010, Nxb Nông nghiệp Hà Nội, tr. 60 - 66.

Tài liệu Tiếng Anh

4. Allen G. J., Murata Y., Chu S. P., Nafisi M., Schoeder J. I. (2002), “Hypersensitivity of abscisic acid-induced cytosolic calcium increases in the *Arabidopsis* farnesyltransferase mutant *era1-2*”, *Plant Cell*, 14(7), pp. 1649 - 1662.
5. Arcuri H. A., Zafalon G. F. D., Marucci E. A., Bonalumi C. E., Da Silveira N. J. F., Machado J. M., De Azevedo W. F., Palma M. S. (2010), “SKPDB: a structural database of shikimate pathway enzymes”, *BMC Bioinformatics*, Jan 7, pp. 11:12. doi: 10.1186/1471-2105-11-12.
6. Benoid St-Pierre, Pierre Laflamme, Anne-Marie Alarco and Vincenzo De Luca (1998), “The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer”, *The Plant Journal*, 14(6), pp. 703 - 713.

7. Bernays E. A. (1982), *The insect on a plant- A closer look in: insect-plant Relationships*, Wageningen, pp. 3 – 17.
8. Brown R. L., Kazan K., McGrath K. C., Maclean D. J., Manners J. M. (2003), "A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gen of *Arabidopsis*", *Plant Physiology*, 132, pp. 1020 – 1032.
9. Canel C., Lopes-Cardoso M. I., Whitmer S., van der Fits L., Pasquali G., van der Heijden R., Hoge J. H. C., Verpoorte R. (1998), "Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*", *Planta*, 205 (3), pp. 414 – 419.
10. Collu G., Unver N., Peltenburg-Looman A. M. G., van der Heijden R., Verpoorte R., Memelink J. (2001), "Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis", *FEBS Letters*, 16: 508(2), pp. 215 – 220.
11. Costa M. M. R., Hilliou F., Duarte P., Pereira L. G., Almeida I., Leech M., Memelink J., Barcelo A. R., Sottomayor M. (2008), "Molecular cloning and characterization of a vacuolar class III peroxidase involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus*", *Plant Physiology*, 146, pp. 403 – 417.
12. Choi P. S., Kim Y. D., Choi K. M., Chung H. J., Choi D. W., Liu J. (2004), "Plant regeneration from hairy-root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*", *Plant Cell Reports*, 22(11), pp. 828 – 831.
13. Dao Xuan Tan, Ho Manh Tuong, Vu Thi Thu Thuy, Le Van Son, and Chu Hoang Mau (2015), "Cloning and overexpression of *GmDREB2* gen from Vietnamese drought-resistant soybean variety", *Brazilian Archives Biology and Technology*, 58 (5), pp. 651 - 657.

14. De Luca V., Balsevich J., Tyler R. T., Eilert U., Panchuk B. D., Kurz W. G. W. (1986), "Biosynthesis of indole alkaloids: developmental regulation of the biosynthetic pathway from tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*", *Journal of Plant Physiology*, 125(1-2), pp. 147 – 156.
15. De Luca V., Cutler A. J. (1987), "Subcellular localization of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*", *Plant Physiology*, 85(4), pp.1099 – 1102.
16. De Waal A., Meijer A. H., Verpoorte R. (1995), "Strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*: purification and characterization of multiple forms", *Biochemical Journal*, 306 (2), pp. 571 – 580.
17. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, F. Bray (2014), "Globocan, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012", *International Journal of Cancer*, 136(5), doi:10.1002/ijc.29210 PMID:25220842.
18. Finer K. R., Finer J. J., (2000), "Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium* mediated transformation-treated soybean cotyledons", *Letters in Applied Microbiology*, 30, pp. 406 – 410.
19. Global Burden of Disease Study 2015 provides GPS for global health 2030 (GBD) Collaborators (630) (2016), "Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015", *Lancet*, 388 (10053), pp. 1545 – 1602.
20. Gajalakshmi S., Vijayalakshmi S., and Rajeswari V. (2013), "Pharmacological activities of *catharanthus roseus*: A perspective review", *International Journal of Pharma Bio Sciences*, 4(2), pp. 431 – 439.

21. Goddijn O. J. M., De Kam R. J., Zanetti A., Schilperoort R. A., Hoge J. H.C. (1992), "Auxin rapidly down-regulates transcription of the tryptophan decarboxylase gen from *Catharanthus roseus*", *Plant Molecular Biology*, 18(6), pp. 1113 – 1120.
22. Guillon S., Gantet P., Trémouillaux-Guiller J., Thiersault M., Rideau M. (2008), *Hairy Roots of Catharanthus roseus: Efficient routes to monomeric indole alkaloid*, *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, pp. 285 – 295.
23. Hernandez-Dominguez E., Campos-Tamayo F., Vazquez-Flota F. (2004), "Vindoline synthesis *in vitro* shoot cultures of *Catharanthus roseus*", *Biotechnology Letters*, 26(8), pp. 671 – 674.
24. Hughes E., Hong S., Gibson S., Shanks J., San K., (2004), "Metabolic engineering of the indole pathway in *Catharanthus roseus* hairy roots and increased accumulation of tryptamine and serpentine", *Metabolic Engineering*, 6(4), pp. 268 – 276.
25. Knaggs A. R. (2001), "The biosynthesis of shikimate metabolites", *Natural Product Reports*, 18(3), pp. 334 - 355.
26. Kumar S., Dutta A., Sinha A. K., Sen J. (2007), "Cloning characterization and localization of a novel basic peroxidase gen from *Catharanthus roseus*", *FEBS Journal*, 274(5), pp. 1290 – 1303.
27. Laflamme P., St Pierre B., De Luca V. (2001), "Molecular and biochemical analysis of a Madagascar periwinkle root - specific minovincinine – 19 - hydroxy-O-acetyltransferase, *Plant Physiology*, 125, pp. 189 – 198.
28. Levac D., Murata J., Kim W. S., De Luca V. (2008), "Application of carborundum abrasion for investigating leaf epidermis: molecular cloning of *Catharanthus roseus* 16-hydroxy-tabersonine-16-Omethyltransferase", *Plant Journal*, 53(2), pp. 225 – 236.

29. Lo Thi Mai Thu, Vi Thi Xuan Thuy, Le Hoang Duc, Le Van Son, Chu Hoang Ha, Chu Hoang Mau (2016), “RNAi-mediated resistance to SMV and BYMV in transgenic tobacco”, *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 6, pp. 213 - 218.
30. Magnotta M, Murata J, Chen J, De Luca V (2006), Identification of a low vindoline accumulating cultivar of *Catharanthus roseus* (L.) G Don by alkaloid and enzymatic profiling, *Phytochemistry*, 67, pp. 1758 – 1764.
31. Magnotta M, Murata J, Chen J, De Luca V (2007), Expression of deacetylvindoline-4-O-acetyltransferase in *Catharanthus roseus* hairy roots, *Phytochemistry*, 68(14), pp. 1922-1931.doi:10.1016/j.phytochem.2007.04.037.
32. Meehan T.D., Coscia C.J. (1973), Hydroxylation of geraniol and nerol by a monooxygenase from *Vinca rosea*, *Biochemistry Biophys Res Commun* 53, pp. 1043 – 1048.
33. Mei-Liang Zhou, Xue-Mei Zhu, Ji-JongShao, Yan-Min Wu, Yi-Xiong Tang (2012), An protocol for gentic transformation of *catharanthus roseus* by *Agrobacterium rhizogenes* A4, *Appl Biochemistry Biotechnology*, 166(7), pp. 1674 - 1684.
34. Nisa Nur Iskandar and Iriawati (2016), “Vinblastine and Vincristine Production on Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) Callus Culture Treated with Polethylene Glycol”, *Makara Journal of Science*, 20/1, pp. 7 - 16 doi: 10.7454/mss.v20i1.5656.
35. Noé W., Mollenschott C., Berlin J (1984), “Tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures: purification, molecular and kinetic data of the homogenous protein”, *Plant Molecular Biology* 3(5), pp. 281 – 288.

36. Nowacki E. and Wezyk S., (1960), "Preliminary reseach on lupin alkaloid. Toxicity for Rabbit organism", *Rozniki Nauk Rolinkzych*, pp. 75 - 383.
37. O'Keefe B. R., Mahady G. B., Gills J. J., Beecher C. W. W. (1997), "Stable vindoline production in transformed cell cultures of *Catharanthus roseus*", *Journal of Natural Products* 60(3), pp. 261 – 264.
38. Pahwa D. (2008), *Catharanthus alkaloids*, B. Pharm Punjab University Chandigarh.
39. Peebles C. A., Sander G. W., Hughes E. H., Peacock R., Shanks J. V., San K. Y. (2011), "The expression of 1-deoxy-D-xylulose synthase and geraniol-10-hydroxylase or anthranilate synthase increases terpenoid indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* hairy roots", *Metabolic England*, 13(2), pp. 234 – 240.
40. Qifang Pan., Quan Wang., Fang Yuan., Shihai Xing., Jingya Zhao., Young Hae Choi., Robert Verpoorte., Yuesheng Tian., Guofeng Wang and Kexuan Tang. (2012), "Overexpression of ORCA3 and G10H in *Catharanthus roseus* Plants Regulated Alkaloid Biosynthesis and Metabolism Revealed by NMR-Metabolomics", *BMC Biotechnology*, 7(8), pp. 12 - 34. doi: 10.1186/1472-6750.
41. Roepke J., Salim V., Wu M., Thamm A. M. K., Murata J., Ploss K., Boland W., De Luca V. (2010), "Vinca drug components accumulate exclusively in leaf exudates of Madagascar periwinkle", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), pp. 15287 – 15292.
42. Russo P., Frustaci A., Del Bufalo A., Fini M., Cesario A. (2013), "Multitarget drugs of plants origin acting on Alzheimer's disease", *Current Medicinal Chemistry*, 20 (13), pp. 1686 - 1693.

43. Sambrook J., Russell D W., (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
44. Santarém ER., Trick HN., Essig JS., Finer JJ. (1998), “Sonication assisted Agrobacterium-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression”, *Plant Cell Reports*, 17 (10), pp. 752 – 759.
45. Southern EM. (1975), “Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis”, *Journal of molecular Biology*, 98(3), pp. 503 - 517.
46. St-Pierre B., De Luca V. (1995), “A Cytochrome P-450 Monooxygenase Catalyzes the First Step in the Conversion of Tabersonine to Vindoline in *Catharanthus roseus*”, *Plant Physiology* 109(1), pp. 131 - 139.
47. St-Pierre B., Laflamme P., Alarco AM., De Luca V. (1998), “The terminal Oacetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A dependent acyl transfer”, *Plant Journal* 14(6), pp. 703 – 713
48. St-Pierre B., Vazquez-Flota FA., De Luca V. (1999), “Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate”, *Plant Cell* 11(5), pp. 887 – 900.
49. Stevens LH., Blom TJM., Verpoorte R. (1993), “Subcellular localization of tryptophan decarboxylase, strictosidine synthase and strictosidine glucosidase in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus* and *Tabernaemontana divaricata*”, *Plant Cell Reports*, 12(10), pp. 573 – 576.
50. Shukla AK., Shasany AK., Verma RK., Gupta MM., Mathur AK., Khanuja SPS. (2010), “Influence of cellular differentiation and ligation on

- intermediate and late steps of terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*”, *Protoplasma* 242, pp. 35 – 47.
51. Sun HJ., Cui ML., Ma B., Ezura H. (2006), “Functional expression of the tastemodifying protein, miraculin, in transgenic lettuce”, *FEBS Letters*, 580 (2), pp. 620 - 626.
 52. Topping J F., Foster G D., Taylor S C. (1998), “Plant virology protocols, from virus isolation to transgenic resistance”, *Human Press, Totowa*, 81, pp. 365 - 480.
 53. Vancanneyt G., Schmidt R., Connor-Sanchez AO., Willmitzer L., Sosa MR (1990), “Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation”, *Molecular Genetics*, 220, pp. 245 - 250.
 54. Van der Heijden R., Jabos DJ., Snoeijer W., Hallard D., Verpoorte R. (2004), “The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology”, *Current medicinal chemistry* 11(5), pp. 607 – 628.
 55. Vázquez - Flota F., Vincenzo De Luca V. (1998), “Jasmonate modulates development and light regulated alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*”, *Phytochemistry* 49(2), pp. 395 – 402.
 56. Vázquez - Flota FA., St-Pierre B., De Luca V. (2000), “Light activation of vindoline biosynthesis does not require cytomorphogenesis in *Catharanthus roseus* seedlings”, *Phytochemistry* 55(6), pp. 531 – 536.
 57. Vázquez - Flota F., De Luca V., Carrillo - Pech M., Canto - Flick A., de Lourde M - Ham M. (2002), “Vindoline biosynthesis is transcriptionally blocked in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures”, *Molecular Biotechnology* 22(1).

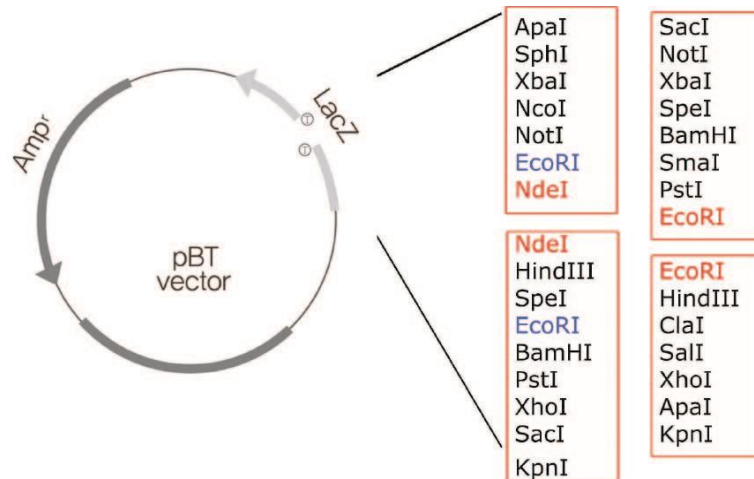
58. Verma P., Mathur AK (2011a), “Direct shoot bud organogenesis and plant regeneration from leaf explants in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell*”, *Tissue and Organ Culture* 106(3), pp. 401 – 408.
59. Wang Q., Yuan F., Pan Q., Li M., Wang G., Zhao J., Tang K. (2010), “Isolation and functional analysis of the *Catharanthus roseus* deacetylindoline-4-Oacetyltransferase gen promoter”, *Plant Cell Reports*, 29(2), pp. 185 - 192.
60. Zárate R., Verpoorte R. (2007), “Strategies for the genetic modification of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don”, *Phytochemistry Reviews* 6(2-3), pp. 475 - 491.
61. Woolley JG (2001), Plant Alkaloids, *Encyclopedia of life science*. Nature Publishing Group / www.els.net (11 pages).

Trang web

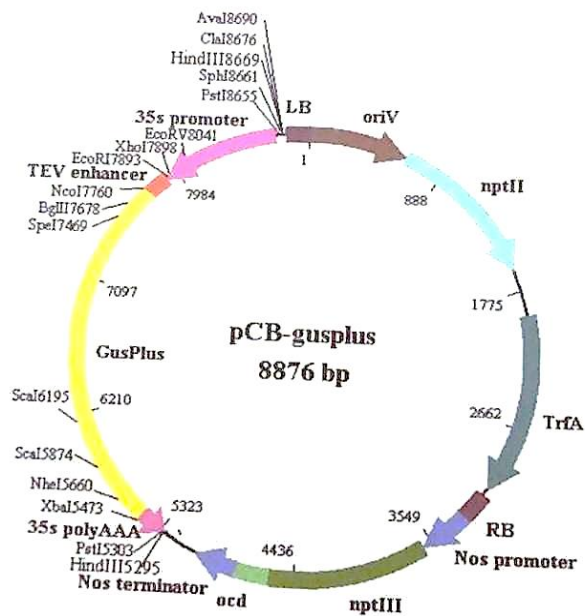
62. <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2002/jjones/Content/vincristine.htm>

PHỤ LỤC

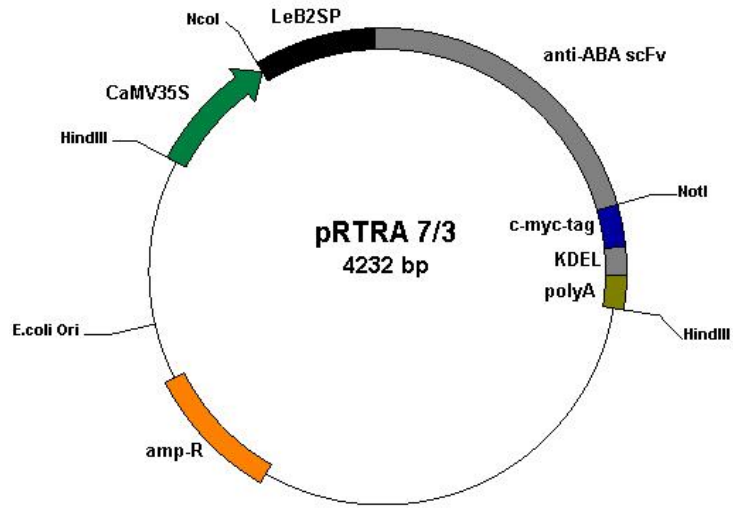
Phụ lục 1. Sơ đồ cấu trúc vector sử dụng trong nghiên cứu



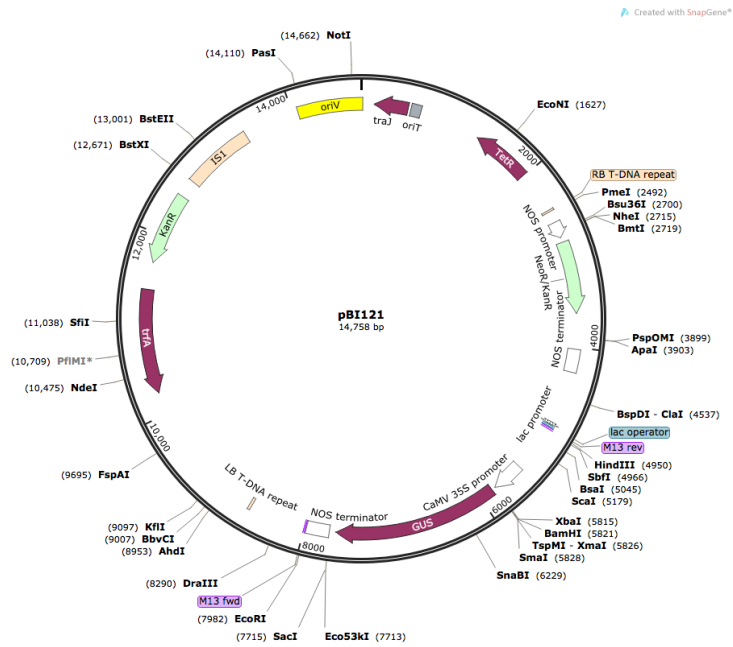
P1.1. Sơ đồ cấu trúc vector tách dòng pBT



P1.2. Sơ đồ cấu trúc vector pCB-gusplus



P1.3. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pRTRA7/3



P1.4. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pBI121

Phụ lục 2. Thành phần môi trường sử dụng trong nuôi cấy *in vitro* và chuyển gen

P2.1. Thành phần môi trường nuôi cấy *in vitro* cây thuốc lá

Môi trường	Thành phần
Nảy mầm (MS)	MS ₁ (20ml/l) + MS ₂ (20ml/l) + MS ₃ (5ml/l) + MS ₄ (5ml/l) + MS ₅ (5ml/l) + agar (10g/l) + sucrose (30g/l); pH=5,8
Cảm ứng tạo chồi 1 (GM1)	MS ₁ (20ml/l) + MS ₂ (20ml/l) + MS ₃ (5ml/l) + MS ₄ (5ml/l) + MS ₅ (5ml/l) + agar (10g/l) + sucrose (30g/l) + BAP (0,001g/l); pH=5,8
Cảm ứng tạo chồi 2 (GM2)	MS ₁ (20ml/l) + MS ₂ (20ml/l) + MS ₃ (5ml/l) + MS ₄ (5ml/l) + MS ₅ (5ml/l) + agar (10g/l) + sucrose (30g/l) + BAP (0,001g/l) + Kanamycin 0,05g/l + cefortaxime 0,4g/l; pH=5,8
Kéo dài chồi (GM3)	MS ₁ (20ml/l) + MS ₂ (20ml/l) + MS ₃ (5ml/l) + MS ₄ (5ml/l) + MS ₅ (5ml/l) + agar (10g/l) + sucrose (30g/l) + BAP (0,001g/l) + Kanamycin 0,05g/l + cefotaxime 0,4g/l; pH=5,8
Ra rễ (RM1)	MS ₁ (20ml/l) + MS ₂ (20ml/l) + MS ₃ (5ml/l) + MS ₄ (5ml/l) + MS ₅ (5ml/l) + agar (10g/l) + mannose (30g/l) + IBA 0,0001g/l. + Kanamycin 0,05g/l + cefotaxime 0,25 g/l; pH=5,8
Ra rễ 2 (RM2)	MS ₁ (20ml/l) + MS ₂ (20ml/l) + MS ₃ (5ml/l) + MS ₄ (5ml/l) + MS ₅ (5ml/l) + agar (10g/l) + sucrose (30g/l) + IBA 0,0001g/l. + Kanamycin 0,05g/l + cefotaxime 0,25 g/l; pH=5,8

* Ghi chú: Các môi trường đều được chuẩn pH = 5,8 và khử trùng. Thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian chiếu sáng 16 giờ sáng/ngày.

P2.2. Thành phần môi trường nuôi cấy *in vitro* cây dừa cạn

Môi trường	Thành phần
GM	MS + đường sucrose 30 g/l + agar 8,5g/l + than hoạt tính 1g/l + nước dừa 100 ml/l bổ sung BAP 0,5mg/l
SIM	MS + BAP 0,5mg/l + IBA 0,4mg/l + đường sucrose 30g/l + agar 8,5g/l + than hoạt tính 1g/l + nước dừa 100ml/l.
SEM	MS + IBA 0,2 mg/l + đường sucrose 30 g/l + agar 8,5g/l + than hoạt tính 1g/l.
RM	MS + IBA 0,2 mg/l + đường sucrose 30 g/l + agar 8,5g/l + than hoạt tính 1g/l.