

Biên soạn: TS. Huỳnh Kỳ (Chủ biên)
TS. Đỗ Tiến Phát - KS. Nguyễn Văn Mạnh
KS. Nguyễn Thị Linh - KS. Trần In Đô

SỔ TAY
KỸ THUẬT CHUYỂN GEN THÔNG QUA
VI KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*
TRÊN GIỐNG LÚA INDICA



NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC CẦN THƠ
2021

LỜI GIỚI THIỆU

Sản lượng lương thực cung cấp luôn luôn không đáp ứng đủ nhu cầu tiêu dùng do tốc độ tăng dân số và đô thị hóa nhanh, chính vì vậy áp lực chọn tạo giống lúa cung cấp đủ sản lượng và dinh dưỡng cũng như tăng cường khả năng chống chịu stress sinh học và phi sinh học là cấp thiết. Với những nhu cầu trên, phương pháp nuôi cấy mô cùng với chuyển gene là cách tiếp cận tốt nhất bằng cách đưa gene mục tiêu vào giống muốn cải thiện thông qua nhiều phương cách khác nhau. Theo ước tính có khoảng 80% giống lúa hiện đang được canh tác trên thế giới thuộc loài phụ indica. Vì vậy, việc chuyển các gene mang đặc tính nông học mong muốn vào giống lúa này là một trong những chiến lược cần được quan tâm.

Nhằm đáp ứng nhu cầu chọn giống lúa tăng cường khả năng chống chịu stress phi sinh học, quyển sổ tay kỹ thuật chuyển gene được xây dựng dựa trên thực tế nghiên cứu của nhóm tác giả cùng với sự hỗ trợ của các học viên, nghiên cứu viên trường Đại học Cần Thơ và Viện Công nghệ Sinh học Việt Nam. Quyển sổ tay này mục đích chính làm tài liệu tham khảo cho sinh viên chuyên ngành Nông nghiệp, Công nghệ Sinh học và Sinh học ứng dụng, làm tài liệu hướng dẫn cho các Viện, Trường, Trung tâm giống dùng làm tài liệu nghiên cứu, đặc biệt là lĩnh vực ứng dụng công nghệ sinh học trong chọn giống giúp công tác chọn giống nhanh chóng, hiệu quả hơn.

Trong quyển sổ tay này được xuất bản nhằm hướng dẫn chi tiết từng bước các thao tác trong quá trình chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và phương pháp kiểm tra đánh giá sự có mặt của chuyển gen. Tập thể xin trân trọng gửi đến độc giả với hy vọng sẽ giúp cho những ai quan tâm đến kỹ thuật này trong chọn giống cây trồng, đặc biệt là trong chọn giống lúa. Trong quá trình biên soạn, mặc dù đã có nhiều cố gắng nhưng chắc chắn còn những thiếu sót nhất định, rất mong nhận được sự đóng góp chân thành của quý Thầy Cô, các bạn đồng nghiệp, sinh viên và những độc giả quan tâm có cơ hội sử dụng hoặc tham khảo quyển sách này để có cơ hội cập nhật và hoàn thiện hơn.

NHÓM TÁC GIẢ

LỜI CẢM ƠN

Chân thành cảm ơn Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ chính phủ Nhật Bản đã tài trợ kinh phí để biên soạn quyển sổ tay này.

Để biên soạn được quyển sổ tay này xin chân thành cảm ơn đến các bạn sinh viên, học viên cao học ngành Di truyền và Chọn giống Cây trồng, Trường Đại học Cần Thơ và các bạn học viên, nghiên cứu viên Viện Công nghệ Sinh học Việt Nam đã hỗ trợ các thí nghiệm để cung cấp thông tin cho quyển sách này. Ngoài ra, sự đóng góp rất quan trọng của quý đồng nghiệp giúp cho hoàn thiện tập sách này, xin chân thành cảm ơn.

MỤC LỤC

LỜI GIỚI THIỆU	i
LỜI CẢM ƠN	iii
MỤC LỤC	iv
1. NGUYÊN LIỆU, VẬT TƯ VÀ TRANG THIẾT BỊ	1
1.1 Thành phần môi trường	1
1.2 Dụng cụ, thiết bị và hóa chất	4
1.3 Chuẩn bị môi trường	8
2. QUY TRÌNH THỰC HIỆN.....	9
2.1 Lựa chọn và khử trùng hạt lúa	9
2.2 Cảm ứng mô sẹo	10
2.3 Chuẩn bị vi khuẩn cho chuyển gen	11
2.4 Chuyển gen	12
2.5 Giai đoạn chọn lọc	13
2.6 Tái sinh	14
2.7 Tạo cây hoàn chỉnh.....	15
3. KIỂM TRA CÂY LÚA CHUYỂN GEN	16
3.1 Thu thập mẫu lá, ly trích DNA và PCR	16
3.2 Điện di kiểm tra sản phẩm khuếch đại gen chuyển và phân tích.....	18
3.3 Nhân các dòng lúa đã được chuyển gen	20
TÀI LIỆU THAM KHẢO	21

NỘI DUNG

1. NGUYÊN LIỆU, VẬT TƯ VÀ TRANG THIẾT BỊ

1.1 Thành phần môi trường

Phương pháp chuyển gen thông qua qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* trải qua nhiều giai đoạn với mỗi giai đoạn là một mục đích khác nhau, do đó mỗi giai đoạn sẽ là một loại môi trường khác nhau. Do đó, điều đầu tiên để thực hiện chuyển gen cần phải nắm và hiểu rõ từng môi trường, cũng như thành phần của môi trường đó để chuẩn bị đầy đủ các loại hóa chất cần thiết trước khi thực hiện chuyển gen. Cụ thể với quy trình chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* của Nishimura *et al.* (2006) có cải biến và bổ sung, trong quy trình đã sử dụng 7 loại môi trường chính cùng với đó là các loại môi trường phụ đã được thể hiện ở Bảng 1, Bảng 2 và Bảng 3.

Bảng 1: Thành phần môi trường cơ bản dùng trong nuôi cấy và chuyển gen cây lúa

Thành phần	Nồng độ/liều lượng	Ghi chú
Môi trường N6		
Muối N6	3,98 g/l	Chuẩn pH 5.2 bằng NaOH hoặc HCl và được khử trùng ở 117°C trong 15 phút.
Sucrose	34 g/l	
Glucose	18 g/l	
KCl	1,5 g /l	
MgCl ₂	2 g/l	
Acetysingrigone (AS100)	1 mg/l	Thêm vào sau khi khử trùng

Môi trường YEP		
Yeast extract	10 g/l	Chuẩn pH 7,0 bằng NaOH hoặc HCl và được khử trùng ở 117°C trong 15 phút.
Bacto peptone	10 g/l	
NaCl	5 g/l	
Bacto agar	15 g/l	
Môi trường MS		
Muối MS 1	100 ml/l	Chuẩn pH 5,8 bằng NaOH hoặc HCl và được khử trùng ở 117°C trong 15 phút.
Muối MS 2	10 ml/l	
Muối MS 3	10 ml/l	
N6 vitamin	10 ml/l	
Sucrose	30 g/l	
Agar	7 g/l	

Bảng 2: Thành phần các công thức môi trường cho biến nạp gen vào cây lúa

Thành phần	Nồng độ/liều lượng	Ghi chú
Môi trường N6D		
Muối N6	3,98 g/l	Chuẩn pH 5,8 bằng NaOH hoặc HCl và được khử trùng ở 117°C trong 15 phút.
N6 vitamin	10 ml/l	
Myo-inositol	100 mg/l	
Casamino acid	300 mg/l	
L-proline	2,878 g/l	
Sucrose	30 g/l	
Agar	7 g/l	
2,4D	2 mg/l	Thêm vào sau khi khử trùng
Môi trường 2N6-AS		
Muối N6	3,98 g/l	Chuẩn pH 5,2 bằng NaOH hoặc HCl và
N6 vitamin	10 ml/l	
Myo-inositol	100 mg/l	

Casamino acid	300 mg/l	được khử trùng ở 117°C trong 15 phút.
Glucose	10 g/l	
Sucrose	30 g/l	
Agar	7 g/l	
2,4D	2 mg/l	Thêm vào sau khi khử trùng
AS100	1 mg/l	Thêm vào sau khi khử trùng
Môi trường MSNK		
Muối MS 1	100 ml/l	Chuẩn pH 5,8 bằng NaOH hoặc HCl và được khử trùng ở 117°C trong 15 phút.
Muối MS 2	10 ml/l	
Muối MS 3	10 ml/l	
N6 vitamin	10 ml/l	
Myo-inositol	100 mg/l	
Casamino acid	2 g/l	
Sorbitol	30 g/l	
Sucrose	30 g/l	
Agar	7 g/l	
NAA	0,2 mg/l	Thêm vào sau khi khử trùng
Kinetin	2 mg/l	Thêm vào sau khi khử trùng
Môi trường MS + 1B		
Muối MS 1	100 ml/l	Chuẩn pH 5,8 bằng NaOH hoặc HCl và được khử trùng ở 117°C trong 15 phút.
Muối MS 2	10 ml/l	
Muối MS 3	10 ml/l	
N6 vitamin	10 ml/l	
Sucrose	30 g/l	
Agar	7 g/l	
BAP	1 mg/l	Thêm vào sau khi khử trùng

Bảng 3: Các môi trường phụ

Thành phần	Nồng độ/liều lượng
Muối MS I	
NH ₄ NO ₃	16,5 g/l
KNO ₃	19,0 g/l
CaCl ₂ .H ₂ O	4,4 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,7 g/l
KH ₂ PO ₄	1,7 g/l
Muối MS II	
H ₃ BO ₃	0,62 g/l
MnSO ₄ .2H ₂ O	1,69 g/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86 g/l
KI	83 mg/l
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25 mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5 mg/l
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5 mg/l
Muối MS III	
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,8 g/l
NaEDTA	3,75 g/l
N6 Vitamin	
Glycine	200 mg/l
Nicotinic acid (B3)	50 mg/l
Pyridoxine HCl(B6)	50 mg/l
Thiamine HCl (B1)	100 mg/l

1.2 Dụng cụ, thiết bị và hóa chất

Một số dụng cụ cần thiết để thực hiện quy trình chuyển gen như: Bình duran, đĩa cấy, kẹp gấp, dao cấy, kéo, giấy thấm, bình tam giác 250 ml, đĩa petri thủy tinh