

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

V.KHCNVN
V.CNSH
V.KHCNVN
V.CNSH

V.KHCNVN
V.CNSH

SẢN PHẨM ĐỀ TÀI

NGHIÊN CỨU ÁP DỤNG CÔNG NGHỆ GEN ĐỂ TẠO
CÂY CHUYỂN GEN NÂNG CAO SỨC CHỐNG CHỊU ĐỐI
VỚI SÂU BỆNH VÀ NGOẠI CẢNH BẤT LỢI

Mã số: KC.04.13

Chủ nhiệm Đề tài: PGS. TS. LÊ TRẦN BÌNH

Cơ quan chủ trì: Viện Công nghệ Sinh học

Cơ quan chủ quản: Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Thời gian thực hiện: 10/2001 - 10/2004

Hà Nội, 2005

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

V.KHCNVN
V.CNSH
V.KHCNVN
V.CNSH

V.KHCNVN
V.CNSH

Sản phẩm Đề tài

**Nghiên cứu áp dụng công nghệ gen
để tạo cây chuyển gen nâng cao sức chống chịu
đối với sâu bệnh và ngoại cảnh bất lợi**

Mã số: **KC.04.13**

Chủ nhiệm Đề tài: **PGS. TS. LÊ TRẦN BÌNH**

Cơ quan chủ trì: Viện Công nghệ Sinh học

Cơ quan chủ quản: Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Thời gian thực hiện: 10/2001 - 10/2004

Hà Nội, 2005

Mục lục

I. DANH SÁCH CÁC DÒNG CÂY CHUYỂN GEN VÀ CÁC GEN THU ĐƯỢC TRONG ĐỀ TÀI.....	1 - 4
I.1. Danh sách các dòng cây chuyển gen.....	
I.1.1. Danh sách các dòng cây bông chuyển gen.....	1
I.1.2. Danh sách các dòng cây hồng chuyển gen.....	1
I.1.3. Danh sách các dòng cây hoa cúc chuyển gen.....	2
I.1.4. Danh sách các dòng cây lúa chuyển gen.....	3
I.2. Danh sách các gen thu được trong đề tài.....	4
I.2.1. Danh sách các gen phân lập được.....	4
I.2.2. Danh sách các gen sưu tập được.....	4
II. CÁC QUY TRÌNH TẠO ĐƯỢC.....	5 - 76
II.1. Quy trình tách dòng gen <i>vip3</i> mã hóa protein có hoạt tính diệt côn trùng.....	5
II.2. Quy trình tái sinh cây bông qua đa chồi.....	13
II.3. Quy trình tái sinh cây bông qua phôi soma.....	17
II.4. Quy trình chuyển gen trực tiếp qua ống phấn bằng vi tiêm.....	21
II.5. Quy trình chuyển gen cây hồng.....	35
II.6. Quy trình nuôi cấy mô, chuyển gen và đánh giá cây hoa cúc chuyển gen.....	46
II.7. Quy trình chuyển gen vào cây lúa nhờ súng bắn gen.....	53
II.8. Quy trình chuyển gen vào lúa thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> và chọn dòng bằng manose đảm bảo tạo ra cây chuyển gen „sạch“, không chứa gen kháng kháng sinh.....	56
II.9. Quy trình chuyển gen vào lúa thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> và chọn dòng kinh điển bằng kháng sinh hygromycin	61
II.10. Quy trình Thử nghiệm sinh học tính kháng sâu đục thân hai chấm <i>Scirpophaga incertulas</i> của các dòng lúa biến đổi gen <i>Bt</i>	65
II.11. Quy trình nhận biết và đánh giá cây lúa chuyển gen.....	69
III. NHỮNG ĐÓNG GÓP KHÁC TRONG ĐỀ TÀI	
Pocket 1: Hỏi đáp về cây chuyển gen	
Pocket 2: Sản phẩm công nghệ sinh học thực phẩm (hiện nay đang được bán trên thị trường)	
Pocket 3: An toàn cho người tiêu dùng: Các thực phẩm chuyển gen có an toàn hay không	
Pocket 4: Cây trồng chuyển gen và môi trường	
Pocket 5: Những lợi ích đã được ghi nhận của cây chuyển gen	
Pocket 6: Công nghệ BT kháng côn trùng	
Pocket 7: Dán nhãn thực phẩm GM	
Pocket 8: Nghị định thư Cartagena về an toàn sinh học	
Pocket 9: Quyền sở hữu trí tuệ và công nghệ sinh học nông nghiệp	
Pocket 10: Công nghệ kháng thuốc diệt cỏ	
Pocket 11: Đóng góp của công nghệ GM trong chăn nuôi	
Pocket 12: Công nghệ chín chậm	
Sách tham khảo: An toàn sinh học: Đánh giá và quản lý rủi ro các sinh vật biến đổi gen	

QUY TRÌNH PHÂN LẬP GEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP PCR

1. Các bước trong quy trình phân lập gen *vip3*

Bước 1. Tách chiết ADN tổng số của *Bacillus thuringiensis* AB51

Tách chiết ADN tổng số của *Bacillus thuringiensis* AB51 được tiến hành theo phương pháp của Vance Kramer và cộng sự (2002).

- Cấy chuyển một khuẩn lạc vào 10 ml LB lỏng, nuôi lắc ở 30°C, 200v/p, qua đêm.
- Ly tâm 6.000 v/p, 10 phút, 4°C, thu tủa.
- Hoà tan tủa trong 4 ml TE có chứa 8 mg lysozym.
- Ủ hỗn hợp ở 37°C trong 1 giờ, thêm protein K tới nồng độ cuối cùng 100 àg/ml rồi ủ tiếp ở 37°C trong 1 giờ.
- Thêm tiếp vào hỗn hợp các chất sau theo thứ tự: 1M urea 7M, 50mM EDTA, 1% SDS.
- Sau mỗi lần thêm các chất phải đánh đều. Ủ ở 55°C qua đêm.
- Tách chiết 1 lần với Phenol/Chloroform (tỉ lệ 1:1 so với mẫu), ly tâm 5 phút ở 4°C.
- Tách chiết lại một lần nữa với Phenol, tủa dịch chiết bằng Isopropanol (tỉ lệ 1:1 so với mẫu), để qua đêm để ADN tủa hoàn toàn. Ly tâm thu tủa ở 12.000 v/p, 15 phút, 4°C. Rửa tủa 3 lần bằng cồn 70%.
- Để khô ADN ở nhiệt độ phòng, hoà tan trong TE, bảo quản ở 4°C.

Bước 2. Phản ứng PCR

Trên cơ sở trình tự gen *vip3A* đã được công bố (kí hiệu AY295778 trong ngân hàng gen NCBI), chúng tôi đã thiết kế cặp mồi đặc hiệu V2.1 và V2.2 để nhân gen *vip3*.

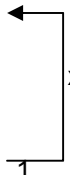
Bảng 1. Trình tự và các thông số cần thiết của hai mồi V2.1 và V2.2

STT	Trình tự mồi	Tm	% GC	Vị trí gắn
V2.1	5'-GCGGATCCATGAACAATAATACTAA-3'	61° C	32,2	1 - 20
V2.2	5'-CGGAGCTCTTACTTATATGAGACATCGTA-3'	62,5°C	41,5	2349 - 2370

Bảng 2. Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (μl)
Nước cất hai lần	29,75
Dung dịch đệm (10X)	5
dNTP	3
MgCl ₂	3
V _{2.1}	2
V _{2.2}	2
ADN mẫu	5
Taq ADN polymerase	0,25
Tổng	50

Bảng 3. Chương trình thực hiện phản ứng PCR

Bước	Phản ứng	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ
1	Biến tính	94	2 phút	1
2	Biến tính	94	30 giây	
3	Bắt cặp	61	45 giây	
4	Kéo dài	72	1 phút 30 giây	
5	Hoàn tất kéo dài	72	10 phút	
6	Kết thúc phản ứng	4	∞	

Bước 3. Gắn gen *vip3* vào vectơ tách dòng

Sau khi nhận bản gen *vip3* và kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 0,8%, chúng tôi đã tiến hành gắn trực tiếp sản phẩm PCR vào vectơ tách dòng pCR[®]2.1-TOPO của hãng Invitrogen.

Bảng 4. Thành phần hỗn hợp phản ứng nối ghép

Thành phần	Thể tích (μl)
Nước cất hai lần	3,5
Dung dịch đệm (10X)	1
Sản phẩm PCR	4
Vectơ pCRđ2.1- TOPO (25 ng/μl)	0,5
T ₄ ADN ligase	1
Tổng	10

Dịch hỗn hợp được ủ ở 16°C qua đêm (16 giờ) sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến chủng *E.coli* DH5α để tách dòng.

Bước 4. Biến nạp plasmit tái tổ hợp vào tế bào *E.coli* DH5α

Biến nạp plasmit tái tổ hợp vào tế bào *E.coli* DH5α được tiến hành theo Cohen và cộng sự (1972). Màng tế bào vi khuẩn dưới tác dụng của hoá chất hoặc điện trường trở nên xốp, mỏng hơn và tạo các lỗ cho các phân tử ADN có thể chui vào. Sau đó, các tế bào được phục hồi trong môi trường nuôi cấy và các thể biến nạp được phát hiện trên môi trường thích hợp.

+ Chuẩn bị tế bào khả biến

Chọn một khuẩn lạc *E.coli* nuôi cấy trong 10 ml LB lỏng, lắc 200 v/p, 37°C, qua đêm. Hút 0,5 ml dịch tế bào cho vào 50 ml LB lỏng, lắc 200 v/p, 37°C, trong 4 giờ. Ly tâm 4.000 v/p, 4°C, 5 phút, thu tủa. Tan tủa tế bào trong 5 ml CaCl₂ 0,1M (để lạnh sẵn ở 0°C), ly tâm thu tủa.

Tan tủa tế bào trong 0,85 ml CaCl₂ 0,1M và 0,15 ml glycerol. Chia nhỏ 200 μl vào các ống Eppendorf 1,5 ml; bỏ nhanh vào N₂ lỏng, giữ ở 80°C.

+ Biến nạp

Bổ sung trực tiếp vào ống đựng tế bào khả biến 3 μl ADN plasmit, ủ 30 phút trong đá. Sốc nhiệt ở 42°C trong 2 phút rồi chuyển ngay sang giữ trong đá 2 - 3 phút. Cho thêm 250 μl môi trường SOC, nuôi lắc 200 v/p ở 37°C trong 45-60 phút. Trải 100 μl dịch tế bào lên trên đĩa LB đặc chứa Ampicillin nồng độ cuối cùng 100 μg/ml, IPTG 100 μg/ml và X-Gal 0.4% rồi ủ ở 37°C qua đêm.

Bước 5. Tách plasmit

Tiến hành theo phương pháp của Birnboim & Doly (1979); Ish-Horowicz & Burke (1981).

- Cấy chuyển một khuẩn lạc vào ống nghiệm chứa 10 ml LB lỏng có bổ sung kháng sinh chọn lọc, lắc qua đêm ở 37°C, 200 v/p.
- Chuyển 2 ml dịch nuôi cấy vào các ống Eppendorf loại 2 ml và đem ly tâm 6.000 v/p, 5 phút, 4°C để thu tế bào. Cặn được hoà trong 200 μ l dung dịch I bằng máy vortex.
- Bổ sung ngay 400 μ l dung dịch II, đảo nhẹ nhàng, giữ trong đá 5 phút.
- Bổ sung tiếp 300 μ l dung dịch III, đảo nhẹ nhàng, giữ trong đá 3 phút.
- Ly tâm 10.000 v/p, 4°C, 10 phút. Chuyển dịch nổi sang ống Eppendorf mới. Bổ sung 900 μ l dung dịch Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol (25:24:1), trộn thật đều và đem ly tâm 10.000 v/p, 15 phút để loại protein và ADN nhiễm sắc thể.
- Hút nhẹ nhàng pha trên sang ống Eppendorf mới (tránh làm vẩn pha dưới). Rửa dung dịch thu được với 1 lần thể tích Isopropanol. Đảo nhẹ nhàng, để yên ở nhiệt độ phòng 2-5 phút. Thu ADN kết tủa trong dung dịch bằng cách ly tâm 13.000 v/p, 15 phút.
- Bổ sung thêm 1 ml cồn 70%, ly tâm 13.000 v/p, 2 phút. Làm khô tủa. Hoà tan ADN thu được trong 300 μ l TE hoặc nước cất hai lần khử trùng chứa ARNase 10 μ g/ml và ủ ở 37°C trong vòng 1 giờ. Chạy điện di kiểm tra 2-5 μ l trên gel agarose 0.8%.

+ Hóa chất

- Dung dịch I: glucose 50mM; Tris-HCl 25mM; EDTA 10mM; pH 8,0
- Dung dịch II: NaOH 0,2N; SDS 1%
- Dung dịch III: 60 ml Potassium acetat 5M; 11,5 ml axit acetic; 28,5 ml H₂O

Bước 6. Chọn plasmit mang gen *vip3*

ADN plasmit được xử lý với enzym giới hạn *E.coRI* theo phản ứng:

H ₂ O	3,7 µl
Đệm 10X riêng của enzym	1 µl
ADN	5 µl
Enzym (10U/µl)	0,3 µl
Tổng thể tích phản ứng	10 µl

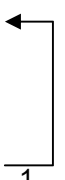
Bước 7. Đọc trình tự nucleotit gen *vip3*

Gen *vip3* được xác định trình tự trên máy tự động ABI PRIMS^d 3100 Avant Genetic Analyzer bằng cách sử dụng bộ hoá chất sinh chuẩn BigDye^d Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Do gen *vip3* có kích thước lớn nên để xác định đầy đủ và chính xác trình tự, nên chúng tôi đã sử dụng thêm một cặp mồi nằm phía bên trong gen kí hiệu là V3.1 và V3.2.

Bảng 6. Thành phần phản ứng PCR cho xác định trình tự

Thành phần	Thể tích(µl)
Dung dịch đệm(5X)	3
Mồi xuôi	1,275
ADN mẫu (~100 ng)	7,725
BigDye	3
Tổng	15

Bảng 7. Chương trình phản ứng PCR cho xác định trình tự

Bước	Phản ứng	Nhiệt độ	Thời gian	Chu kỳ
1	Biến tính	96 ^o C	1 phút	
2	Biến tính	96 ^o C	10 giây	
3	Bắt cặp	55 ^o C	5 giây	
4	Kéo dài	60 ^o C	4 phút	
5	Hoàn tất kéo dài	72 ^o C	8 phút	
6	Kết thúc phản ứng	4 ^o C	30phút	1

Sản phẩm PCR được rửa bằng cách bổ sung 5µl 125mM EDTA, 60µl 100% EtOH. ủ ở nhiệt độ phòng 15 phút. Ly tâm dịch 12000 v/p trong 15 phút, loại bỏ EtOH. Rửa rửa bằng

70 à 70% EtOH, ly tâm 12000 v/p trong 5 phút rồi để khô. Bổ sung 10 µl Hi-Di™ Formamide và biến tính ở 95°C trong 5 phút. Các mẫu được tra vào các giếng của khay đựng mẫu và điện di trong ống mao quản (80 cm x 50 µl) với polymer POP-4™ của hãng ABI, Mỹ.

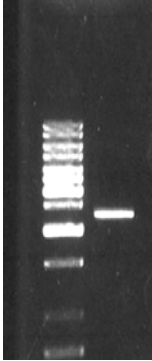
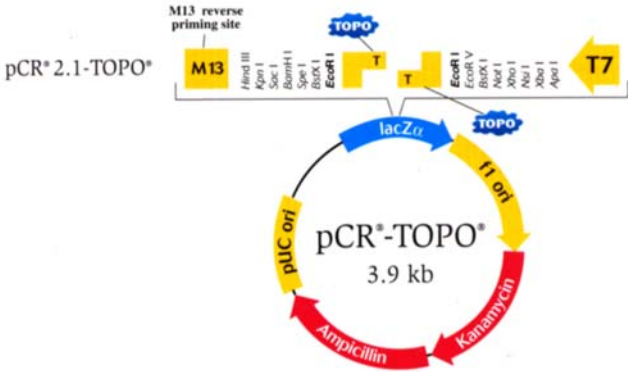
Bước 8. So sánh trình tự nucleotit

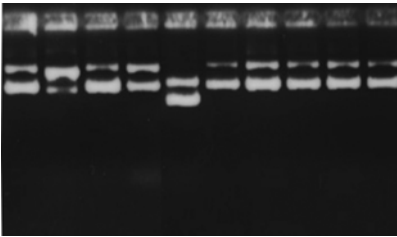
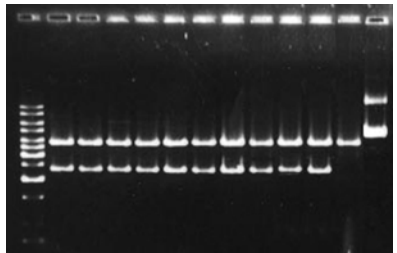
Trình tự nucleotit vừa được xác định sẽ được xử lý so sánh với trình tự nucleotit của gen *vip* đã được công bố trong ngân hàng gen quốc tế bằng phần mềm ADNStar và BioEdit.

2. Sản phẩm của quy trình

1. Plasmid pCR2.1 mang gen *vip3*.
2. Tế bào vi khuẩn *E.coli* chủng DH5α mang gen *vip3*.
3. 01 trình tự gen *vip3*

Sơ đồ 1. Quy trình phân lập gen *vip3*

Bước	Nội dung thực hiện	Ảnh minh họa
1	Tách chiết ADN tổng số của <i>Bacillus thuringiensis</i> AB51	
2	Phản ứng PCR	
3	Gắn gen <i>vip3</i> vào vectơ tách dòng	
4	Biến nạp plasmid tái tổ hợp vào tế bào <i>E.coli</i> DH5α	

5	Tách plasmid	
6	Xử lý enzym cắt chọn plasmid mang gen <i>vip3</i>	
7	Đọc trình tự nucleotit gen <i>vip3</i>	
8	So sánh trình tự nucleotit	

QUY TRÌNH TÁI SINH CÂY BÔNG QUA ĐA CHỒI PHỤC VỤ CHUYỂN GEN

1. Nguyên liệu

- Các giống bông C118, D16-2, LRA, SB1, TM1, VN36P và 254 do Viện Nghiên cứu cây Bông và cây có sợi cung cấp.
- Hóa chất cần thiết cho nuôi cấy mô bao gồm :

Môi trường sử dụng trong quy trình nhân giống in vitro cây bông được xây dựng dựa trên môi trường khoáng cơ bản của Murashige và Skoog (1962), kết hợp với tỷ lệ chất điều tiết sinh trưởng khác nhau theo từng giai đoạn nuôi cấy.

Bảng 1. Thành phần các môi trường cơ bản của Murashige và Skoog

Lượng pha 1 lít dung dịch mẹ	Lượng cần cho 1 lít môi trường (mg)
1. MS - I	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
2. MS - II	
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
3. MS - III	
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
3. MS - IV	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	27,3
4. MS - V	
Glycine	2
Axit Nicotinic	0,5
Thiamine HCl	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
myo - Inositol	100
Vitamin B5	
Axit Nicotinic	
Thiamine HCl	
Pyridoxine HCl	
Myo - Inositol	

- BAP: 6- Benzylaminopurine
- 2,4D: 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid
- NAA: α - Napthaleneacetic acid
- Hygromycine: Kháng sinh chọn lọc (của hãng Merk)
- Kanamicine: Kháng sinh chọn lọc (của hãng Merk)
- Than hoạt tính không phải là chất điều tiết sinh trưởng nhưng có tác dụng hấp thụ bớt những chất không cần thiết trong môi trường nuôi cấy, làm thuận lợi cho khả năng hình thành rễ.
- Nước dừa: Được lấy từ quả dừa bánh tẻ sử dụng làm nước uống, lọc qua giấy lọc, sau đó bảo quản trong tủ lạnh đá. Nước dừa bổ xung thêm nguồn dinh dưỡng trong giai đoạn nhân cây.
- Giá thể trấu hun: Trấu khô được hun thành than sau đó được sấy khử trùng ở 100°C trong 15 phút hoặc sử dụng hoá chất khử trùng ở nồng độ thích hợp.
- Hoá chất pha dung dịch plasmid pCAMBIA1300 là nước cất khử ion 2 lần đã khử trùng.
- Sử dụng cồn tuyệt đối và cồn 70% trong khi khử trùng

2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.1. Khử trùng và đặt phôi

Hạt bông sau khi tách sợi được lột bỏ lớp lông ngắn bằng H_2SO_4 đậm đặc, xả nước cho thật sạch, thấm khô bằng giấy thấm khử trùng, loại bỏ những hạt không đạt yêu cầu, hạt được khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 1 phút, tiếp theo lắc trong dung dịch javen 60% (Hóa chất Việt Trì) trong 20 - 25 phút và rửa nhiều lần bằng nước cất khử trùng đến khi nước trong. Cuối cùng thấm khô hạt bằng giấy thấm khử trùng. Sử dụng dao cạy, loại bỏ lớp vỏ cứng và tách lấy phôi bông. Tiếp theo, phôi được cấy trên môi trường cảm ứng tạo đa chồi **CU** gồm có: môi trường cơ bản MS với tổ hợp 0,4mg/L 2,4D, 1.5mg/L BAP và 0,1mg/L NAA.

2.2. Tạo cụm chồi

Sau 10 ngày, khi các phôi đạt chiều cao 1,5cm, đỉnh chồi được cắt với chiều dài 4-5mm, loại bỏ lá mầm còn phát triển và cấy trên môi trường tạo đa chồi **MDN** gồm có: MS với tổ hợp 1mg/L Kinetin, 2mg/L BAP và 0,1mg/L NAA để tạo cụm chồi. Trên môi trường này, chồi nách được hoạt hóa và phát triển.

2.3. Nhân chồi

Sau 5 tuần trên môi trường **MDN**, các cụm chồi đã hình thành. Để làm tăng số lượng chồi, toàn bộ cụm chồi được cấy chuyển sang môi trường nhân chồi **MBK** gồm có: MS với tổ hợp 0,5mg/Lkinetin + 0,5mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA). Các chồi nách liên tục được hoạt

hoá, phát triển thành chồi đơn đồng thời tiếp tục hoạt hoá các chồi nách của chồi đơn.

2.4. Kéo dài chồi

Sau 3 tuần, số lượng chồi đã tăng cao, các cụm chồi được chuyển sang môi trường kéo dài chồi MS không có hooc môn sinh trưởng. Trên môi trường này, cụm chồi không tiếp tục nhân, các chồi đơn kéo dài và một số đã xuất hiện rễ .

2.5. Tạo cây bông hoàn chỉnh từ chồi đơn

Các chồi đơn tách ra từ cụm chồi được cấy trên môi trường tạo rễ **MNT** gồm có: MS với tổ hợp 0,2mg/L NAA, 1g/L than hoạt tính. Trên môi trường này, các chồi đơn hình thành rễ và phát triển thành thực. Sau 4 tuần, toàn bộ các chồi đơn đã ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh.

Sơ đồ 1. Qui trình tái sinh cây bông bằng phương pháp đa chồi

Bước	Nội dung thực hiện	Ảnh minh họa
1	Khử trùng hạt	
2	Tách, đặt phôi CU	
3	Tạo cụm chồi MDN	
4	Nhân chồi MBK	
5	Kéo dài chồi MS	

6	Tạo cây hoàn chỉnh MNT	
7	Huấn luyện cây	
8	Trồng cây bông trong nhà lưới	

QUY TRÌNH TÁI SINH CÂY BÔNG QUA PHÔI SOMA PHỤC VỤ CHUYỂN GEN

1. Nguyên liệu

- Hai giống bông Cooker 310 và SSR60 do Viện Nghiên cứu cây Bông và cây có sợi cung cấp.
- Các hóa chất sử dụng trong nuôi cấy mô

Bảng 1. Thành phần các môi trường cơ bản của Murashige và Skoog

Lượng pha 1 lít dung dịch mẹ	Lượng cần cho 1 lít môi trường (mg)
1. MS - I	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
2. MS - II	
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
3. MS - III	
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
3. MS - IV	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	27,3
4. MS - V	
Glycine	2
Axit Nicotinic	0,5
Thiamine HCl	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
myo - Inositol	100
Vitamin B5	
Axit Nicotinic	
Thiamine HCl	
Pyridoxine HCl	
Myo - Inositol	

- BAP: 6- Benzylaminopurine
- 2,4D: 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid

- NAA: α - Napthaleneacetic acid
- Hygromycine: Kháng sinh chọn lọc (của hãng Merk)
- Kanamicine: Kháng sinh chọn lọc (của hãng Merk)
- Than hoạt tính không phải là chất điều tiết sinh trưởng nhưng có tác dụng hấp thụ bớt những chất không cần thiết trong môi trường nuôi cấy, làm thuận lợi cho khả năng hình thành rễ.
- Nước dừa: Được lấy từ quả dừa bánh tẻ sử dụng làm nước uống, lọc qua giấy lọc, sau đó bảo quản trong tủ lạnh đá. Nước dừa bổ xung thêm nguồn dinh dưỡng trong giai đoạn nhân cây.
- Giá thể trấu hun: Trấu khô được hun thành than sau đó được sấy khử trùng ở 100°C trong 15 phút hoặc sử dụng hoá chất khử trùng ở nồng độ thích hợp.
- Hoá chất pha dung dịch plasmid pCAMBIA1300 là nước cất để ion 2 lần đã khử trùng.
- Sử dụng cồn tuyệt đối và cồn 70% trong khi khử trùng

2. Nội dung và phương pháp

2.1. Khử trùng đặt hạt tạo cây nguyên liệu

Hạt bông sau khi tách sợi được lột bỏ lớp lông ngắn bằng H_2SO_4 đậm đặc, xả nước cho thật sạch, thấm khô bằng giấy thấm khử trùng, loại bỏ những hạt không đạt yêu cầu, hạt được khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 1 phút, tiếp theo lắc trong dung dịch javen 60% (Hoá chất Việt Trì) trong 20 - 25 phút và rửa nhiều lần bằng nước cất khử trùng đến khi nước trong. Ngâm hạt trong nước cất khử trùng từ 1 - 2 giờ sau đó gạn bỏ nước và thấm khô bằng giấy thấm khử trùng.

Dùng dao và panh tách bỏ lớp vỏ cứng, không làm tổn thương đến hạt sau đó đặt hạt trên môi trường cơ bản MS, khi thao tác đặt hạt cần cầm phần mầm rễ vào môi trường. Hạt bông được nuôi tối 2 - 3 ngày sau đó chuyển điều kiện 16h chiếu sáng, 8 giờ tối, nhiệt độ nuôi cấy $28 \pm 2^\circ C$, cường độ ánh sáng 2000lux.

2.2. Cấy mô sẹo

Sau 6 - 8 ngày gieo hạt, thân dưới lá mầm được cắt thành từng đoạn 4-5mm, loại bỏ phần thân già và đỉnh sinh trưởng. Các đoạn cắt được đặt lên môi trường cấy mô sẹo (MSM) gồm có MS + tổ hợp 0,1mg/L 2,4D và 0,1 mg/L NAA + B5 (Myo- inositol 100mg/L) + 30mg/L Glucose + 8,5g/L Agar, pH 5,8.

2.3. Nhân mô sẹo

Sau 4 tuần trên môi trường MSM, mô sẹo được chuyển lên môi trường nhân mô sẹo (MNS) gồm có: MS + B5 + 30mg/L Glucose + 8,5g/L Agar, pH 5,8. Mô sẹo được nuôi cấy

khoảng 4 - 8 tuần trên MNS và có cấy chuyển một lần. Mô sẹo phát triển mạnh và liên tục tăng về sinh khối cần theo dõi cấy chuyển kịp thời, tránh làm tổn thương trong thao tác nuôi cấy.

2.4. Cảm ứng phân hoá phôi

Sau 4 - 8 tuần, trên môi trường MNS, mô sẹo được chuyển lên môi trường cảm ứng phân hoá phôi MCP: MS + 1,9mg/l KNO₃ + B5 + 30mg/L Glucose + 8,5g/L Agar, pH 5,8. Thời gian nuôi cấy ở giai đoạn này khoảng 4 - 8 tuần trên MCP và có cấy chuyển một lần. Ở giai đoạn này, mô sẹo rất mềm và hơi xốp vì vậy phải thao tác nhẹ nhàng, tránh vỡ mô. Mô sẹo được giữ trên môi trường này tới khi xuất hiện tế bào tiền phôi soam màu trắng hồng.

2.5. Phát triển phôi

Sau thời gian nuôi cấy trên môi trường MCP, tế bào tiền phôi được cấy chuyển lên môi trường phát triển phôi MSE gồm: MS + 1,9mg/l KNO₃ + B5 + 1g/L Glutamine + 0,5g/L Asparagine + 30mg/L Glucose + 8,5g/L Agar, pH 5,8. Phôi phát triển thành thực có dạng hình đầu dục, màu xanh.

2.6. Phôi nảy mầm

Sau 3 tuần, phôi được chuyển sang môi trường nảy mầm MSN: MS + B5 + 30mg/L Glucose + 8,5g/L Agar, pH 5,8. Trên môi trường này, phôi nảy mầm, kéo dài và xuất hiện dạng lá (chưa phải là lá thật). Rễ phôi hình thành và bắt đầu phát triển.

2.7. Tạo cây hoàn chỉnh

Toàn bộ phôi đã nảy mầm được chuyển sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh MST: MS + B5 + 1g/L than hoạt tính + 30mg/L Glucose + 8,5g/L Agar, pH 5,8. Trên môi trường này, cây con từ phôi soma tiếp tục phát triển và xuất hiện các lá thật. Tuy nhiên, cây con trải qua thời gian dài trên môi trường nảy mầm và phát triển cây nên bộ rễ bị già hóa khó tái sinh. Vì vậy, toàn bộ cây con được cắt bỏ phần thân già và rễ rồi cấy chuyển một lần sang môi trường MST, tạo cây hoàn chỉnh.

3. Huấn luyện và trồng cây tái sinh

Cây bông có 5 - 6 lá thật, có bộ rễ ổn định, giữ trong ống nghiệm mở nút và đặt ra ở điều kiện phòng. Sau 3 - 4 ngày, toàn bộ cây được lấy ra, rửa sạch hết môi trường bám, chuyển vào giá thể (cát, trấu hun, đất, tỷ lệ 1:1:1) đã khử trùng. Nuôi trong tủ sinh trưởng 2 - 3 tuần với điều kiện 16h chiếu sáng, 8 giờ tối, nhiệt độ nuôi cấy 28±2°C. Những ngày đầu cần che phủ nylon cho cây để tránh mất nước, thường xuyên tưới ẩm dạng phun sương mù, tuyệt đối không để giá thể quá ẩm gây thối rễ bông. Sau 3 tuần nuôi trong tủ sinh trưởng, cây bông được đưa ra điều kiện ngoài trời để thích nghi, thường xuyên giữ ẩm cho cây và tránh ánh nắng trực tiếp. Khi cây đã sinh trưởng ổn định, xuất hiện lá mới thì chuyển ra nhà lưới trồng và chăm sóc. Cây bông được tiếp tục theo dõi chăm sóc, phòng

trừ sâu bệnh theo quy trình chung của ngành trồng bông.

Sơ đồ 1. Quy trình tái sinh cây bông bằng phương pháp tạo phôi soma

Bước	Nội dung thực hiện	Ảnh minh họa
1	Khử trùng đặt hạt	
2	Tạo cây nguyên liệu MS	
3	Cảm ứng mô sẹo MSM	
4	Cảm ứng phân hóa phôi MCP	
5	Phát triển phôi MSE	
6	Phôi nảy mầm MSN	
7	Tạo cây hoàn chỉnh MST	
8	Trồng cây bông trong nhà lưới	

QUY TRÌNH CHUYỂN GEN TRỰC TIẾP QUA ỐNG PHẤN BẰNG VI TIÊM

1. Chuyển gen bằng vi tiêm qua ống phấn

1.1. Vật liệu

- Một số giống bông do Viện Nghiên cứu cây Bông và cây có sợi cung cấp.
- *Gen chuyển*: Gen kháng sâu *cryIA(c)* được thiết kế trong vectơ pCAMBIA1300, kèm gen chỉ thị kháng kháng sinh Hygromycine. Nồng độ dung dịch sử dụng cho vi tiêm là 10µg/ml.
- Kim tiêm loại micropipet dung tích 10µl, một số dụng cụ cần thiết khác.
- Dung dịch đậu quả và dung dịch khử trùng.

1.2. Phương pháp tiến hành

1.2.1. Quy trình tách chiết và tinh sạch ADN plasmid

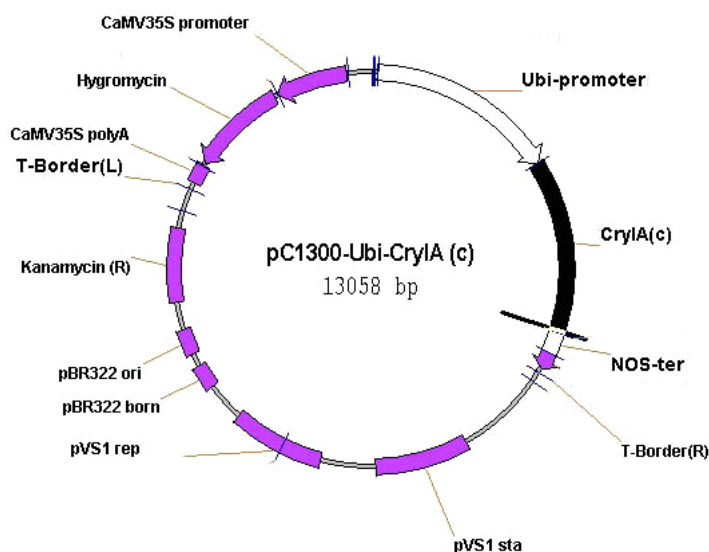
Chủng E. coli DH5α mang plasmid pCAMBIA1300-Ubi-CryIA(c) được nuôi lắc trong môi trường LB lỏng với kháng sinh kanamycin (50mg/l), nuôi qua đêm ở 37°C, 220 vòng/phút. Dịch nuôi cấy được ly tâm ở 4.500 vòng/phút để thu tủa tế bào sử dụng cho tách plasmid. Plasmid được tách theo phương pháp của Horowicz sử dụng "miniprep kit" của hãng Quiagen. Plasmid pCAMBIA1300-Ubi-CryIA(c) được mở vòng bằng cặp enzym hạn chế Hind III/BamH I. Kết quả tách plasmid và cắt mở vòng được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

1.2.2. Gieo hạt và chăm sóc cây

Hạt bông được loại bỏ lớp lông ngắn bằng H₂SO₄ đậm đặc, loại bỏ những hạt lép, hạt sâu bệnh không đủ tiêu chuẩn. Gieo hạt trên nền đất theo quy trình canh tác chung của ngành bông. Chăm sóc theo dõi và phòng trừ sâu bệnh. Khi gieo phải bố trí theo từng ô thí nghiệm để tiện cho đánh dấu và vi tiêm sau này.

1.2.3. Theo dõi đánh dấu hoa trước khi vi tiêm

Khi cây bông đã trưởng thành và xuất hiện nụ hoa, chúng ta theo dõi khả năng ra hoa của cây bông và đánh dấu những bông hoa nở để chuẩn bị cho vi tiêm ngày hôm sau, thường chọn những hoa ở vị trí đốt quả thứ 1 - 2 của cành quả.



Sơ đồ 1. Plasmid pCAM1300/cryIA(c)

1.2.4. Vi tiêm trực tiếp vào noãn

Chuẩn bị dung dịch plasmid pCAMBIA1300 mang gen *cryIA(c)* với nồng độ 10 μ g/ml, bảo quản trong hộp đá. Chuẩn bị kim tiêm, kéo khử trùng.

Chọn những bông hoa mới nở ngày hôm trước đã được đánh dấu.

Dùng kéo loại bỏ hết những cánh hoa, cắt bỏ vòi nhụy cách bầu hoa 4 - 5mm, tránh làm tổn thương tới bầu hoa.

Dùng kim tiêm loại micropipet dung tích 10 μ hút dung dịch plasmid pCAMBIA1300 *cryIA(c)* đã chuẩn bị trước, tuyệt đối không để có bọt khí trong xi lanh. Sau đó cắm sâu đầu kim theo vòi nhụy (khi cắt còn thừa lại) tới 2/3 bầu, rút ra 1/3 bầu, nhẹ nhàng thao tác kim tiêm truyền dung dịch biến nạp vào trong bầu nhụy. Sau khi rút kim tiêm ra nhỏ 1 - 2 giọt dung dịch khử trùng và giữ đậu quả. Đánh dấu và ghi số thứ tự vào hoa đã vi tiêm. Rửa kim tiêm, kéo.. bằng dung dịch khử trùng trước khi tiêm cho hoa khác.

Thời gian tiêm vào 7 - 10h sáng, nên chọn những ngày thời tiết tốt, râm mát, tránh những ngày nắng gắt hay có mưa.

1.2.5. Chăm sóc và thu hoạch



Bầu nhụy đã cắt tròng hoa và vòi nhụy



Đưa kim tiêm vào bầu nhụy



Tiêm dịch biến nạp vào bầu nhụy

Sau khi vi tiêm, toàn bộ hoa được đánh dấu, ngắt tất cả những mầm quả ở cành hoa này để tập trung dinh dưỡng, tăng tỷ lệ tạo quả cho bông hoa đã vi tiêm. Thường xuyên theo dõi phòng trừ sâu bệnh cho cây bông.

Thu hoạch: Thu hoạch riêng từng quả, tách hạt bảo quản riêng để thu nguyên liệu cho các phân tích kiểm nghiệm sau.

2. Phương pháp chọn lọc và đánh giá cây bông chuyển gen sau vi tiêm

2.1. Tạo vết cháy kháng sinh trên lá

2.1.1. Vật liệu

a) Thực vật

Hạt bông chuyển gen và đối chứng được gieo trong bầu nhỏ đường kính 10cm, kích thước khoảng 15 - 20cm. Khi cây bông non có lá thật thứ 2 (khoảng 10 - 14 ngày) thì tiến hành thử tính kháng kháng sinh.

b) Dụng cụ và hoá chất

- Pipetman, đầu côn (100, 200, 1000 μ l), ống eppendorf, cốc đong, lọ thủy tinh, phích đá, giấy bạc, chun vòng.
- Kanamycin (Sigma), Hygromycine (Merk), Tween 20, nước cất khử trùng.

2.1.2. Phương pháp tiến hành

a. Chuẩn bị kháng sinh

Hygromycine (Hyg), Kanamycine (Kn)

Pha nồng độ kháng sinh sử dụng trong nước cất vô trùng có bổ sung Tween-20 nồng độ 5%. Pha dung dịch sử dụng mỗi lần thí nghiệm và nên thường xuyên giữ trong đá.

b. Phương pháp tiến hành

Đầu tiên sử dụng chun vòng đeo vào lá dùng để thử tính kháng ở mỗi lần test

- *Test tính kháng kháng sinh lần 1:* Nhỏ 10 μ l dung dịch kháng sinh (dung dịch đã pha loãng tới nồng độ sử dụng) lên mặt lá thật thứ 2 (chú ý không làm xước lá), cần tránh chỗ gân lá. Theo dõi sau 1,2,3 ngày đối với test Hyg và sau 5, 6, 7.. ngày đối với test Kn, đánh giá kết quả.
- *Test tính kháng kháng sinh lần 2:* Sau khi đánh giá lần 1 chọn những cây có khả năng kháng (không bị đốm cháy lá nếu test Hyg và không bị đốm vàng lá nếu test Kn) để riêng ra một lô và test lần 2. Vì số cây dương tính thu được không nhiều nên test tương tự như lần 1 nhưng sẽ nhỏ lên 2 điểm trên lá thật thứ 4 như hình dưới. Theo dõi và đánh giá như lần 1.
- *Test tính kháng kháng sinh lần 3:* Tương tự như 2 lần trên nhưng sử dụng lá mới thứ 6 và tăng nồng độ kháng sinh sử dụng với những cây tiếp tục kết quả dương

tính lần 2. (Ví dụ: 100mg/L với Hyg và 1000mg/L với Kn)

c. Phương pháp đánh giá

- *Cây thử tính kháng Hyg*: Theo dõi sau 1 - 2 ngày nhận thấy chỗ nhỏ thuốc có những đám hạt li ti màu đen và tới ngày thứ 3 - 5 tại chỗ đó sẽ hình thành đốm cháy. Với cây dương tính, vết xử lý vẫn có màu sáng bóng, sau đó nhạt dần và trở lại bình thường, mô lá vẫn có màu xanh và không bị chết. Sau đó đếm tổng số lượng cây và số cây biểu hiện dương tính ở mỗi giống.
- *Cây thử tính kháng Kn*: Theo dõi sau 5 ngày nhận thấy chỗ nhỏ thuốc hình thành đốm vàng nhạt và sau đó đốm vàng đó ngày càng rõ ràng và rất dễ quan sát.
- Đếm tổng số lượng cây và số cây biểu hiện dương tính ở mỗi giống.
- Chuẩn bị chậu đất để trồng các cây kháng kháng sinh (cây dương tính) và chuẩn bị các thí nghiệm tiếp theo.

Chú ý: Chọn ngày đêm mát, không có nắng gắt hay mưa để thử kháng sinh trên lá nhằm hạn chế ảnh hưởng ngoại cảnh tới hoạt tính của kháng sinh chọn lọc

d. Chăm sóc cây dương tính và thu hạt

Toàn bộ cây có biểu hiện dương tính được đánh dấu cẩn thận, chăm sóc và thường xuyên theo dõi phòng trừ sâu bệnh.

Thu hoạch riêng từng quả, từng cây, tách hạt và bảo quản cho thí nghiệm chọn lọc tiếp theo.



Triệu trứng sau 2-3 giờ



Triệu trứng sau 3 ngày



Triệu trứng sau 4 ngày

2.2. Chọn lọc cây bông chuyển gen trên môi trường kháng sinh chọn lọc

2.2.1. Nguyên liệu

Các hạt bông T2 thu được sau vi tiêm trực tiếp qua ống phẩn và chọn lọc kháng sinh trên lá của Viện Công nghệ Sinh học Hà Nội.

Các hóa chất dùng trong nuôi cấy mô, Kháng sinh Hygromycine (của hãng Merk).

2.2.2. Nội dung và phương pháp

a. Khử trùng, tách vỏ hạt bông

Hạt bông sau khi tách sợi được lột bỏ lớp lông ngắn bằng H_2SO_4 đậm đặc, xả nước

cho thật sạch, thấm khô bằng giấy thấm khử trùng, loại bỏ những hạt không đạt yêu cầu, hạt được khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 1 phút, tiếp theo lắc trong dung dịch javen 60% (Hoá chất Việt Trì) trong 20 - 25 phút và rửa nhiều lần bằng nước cất khử trùng đến khi nước trong. Cuối cùng thấm khô hạt bằng giấy thấm khử trùng sử dụng dao cấy loại bỏ lớp vỏ cứng.

b. Chọn lọc kháng sinh lần một

Toàn bộ hạt đã được khử trùng tách vỏ được cấy lên môi trường kháng sinh chọn lọc MH (MS + với nồng độ Hygromycine thích hợp). Sau 7 ngày đánh giá tỷ lệ nảy mầm của hạt, sau 21 ngày đánh giá tỷ lệ ra rễ.

c. Chọn lọc kháng sinh lần hai

Sau 4 tuần, toàn bộ số cây có khả năng ra rễ được cắt lấy phần đỉnh sinh trưởng dài 2cm, loại bỏ hai lá mầm và cấy sang môi trường MH mới. Sau hai tuần, đỉnh sinh trưởng lại được cấy chuyển một lần.

d. Tái sinh cây hoàn chỉnh sau chọn lọc

Sau hai lần chọn lọc, toàn bộ cây có khả năng sống sót, ra rễ được chuyển sang môi trường nhân cây MN (MS + 100ml/L nước dừa). Khi cây bông phát triển tốt được tách ra và cấy chuyển đồng thời thu lá cho các thí nghiệm tiếp theo.

e. Huấn luyện và trồng cây tái sinh

Cây bông có 5 - 6 lá thật, có bộ rễ ổn định, giữ trong ống nghiệm mở nút và đặt ra điều kiện phòng. Sau 3-4 ngày, toàn bộ cây được lấy ra, rửa sạch hết môi trường bám, chuyển vào giá thể (cát, trấu hun, đất, tỷ lệ 1:1:1) đã khử trùng. Nuôi trong tủ sinh trưởng 2 - 3 tuần với điều kiện điều kiện 16h chiếu sáng, 8 giờ tối, nhiệt độ nuôi cấy $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Những ngày đầu cần che phủ nylon cho cây để tránh mất nước, thường xuyên tưới ẩm dạng phun sương mù, tuyệt đối không để giá thể quá ẩm gây thối rễ bông. Sau 3 tuần nuôi trong tủ sinh trưởng, cây bông được đưa ra điều kiện ngoài trời để thích nghi, thường xuyên giữ ẩm cho cây và tránh ánh nắng trực tiếp. Khi cây đã sinh trưởng ổn định, xuất hiện lá mới thì chuyển ra nhà lưới trồng và chăm sóc. Cây bông được tiếp tục theo dõi chăm sóc, phòng trừ sâu bệnh theo quy trình chung của ngành trồng bông.

Thu hoạch hạt riêng theo từng cây, từng quả làm nguyên liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.

3. Chọn lọc cây bông chuyển gen bằng kỹ thuật sinh học phân tử

3.1. Vật liệu

Các dòng bông dương tính thu được sau chọn lọc trên môi trường kháng sinh chọn lọc. Lá được tách từ cây dương tính bảo quản trong tủ (-84°C) làm nguyên liệu cho tách chiết ADN.

3.2. Phương pháp

a. Tách chiết ADN

Chuẩn bị các hóa chất

- Đệm chiết, đệm rửa được pha theo Bảng 3.
- Máy ổn nhiệt đặt nhiệt độ 65°C
- Phích chứa đá
- Đũa thủy tinh đặt trong tủ âm

Bảng 3. Các hoá chất sử dụng cho tách chiết ADN

Hóa chất	Nồng độ cần dùng	Nồng độ stock
Đệm rửa		
Tris- HCl	0,5M	100mM
EDTA(pH8)	0,5M	5mM
Sorbitol	2M	0.35M
Na ₂ HPO ₄	4%	0.4%
Đệm chiết		
CTAB	2%	5%
NaCl	1.4M	5M
EDTA	20mM	0,5M
Tris- HCl	100mM	1M
Hóa chất khác		
Chloroform/isoamyl alcohol(24:1)		
Isopropanol (lạnh)		
Ethanol 70%		
Phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1)		
Ethanol 100%		
Sodium acetate	3M	
R- Nase	10µg/µl	
TE buffer		
Tris- HCl	10mM	1M
NaCl	2M	5M
EDTA	1mM	0,5M

Các bước tiến hành

- Thu mẫu và giữ mẫu ở tủ lạnh sâu cho tới khi sử dụng.
 - Các bước tách chiết ADN.
1. Lấy mẫu lá vào eppendorf 2ml đổ Nitơ lỏng vào ống và nghiền thật mịn, thao tác

nhANH.

2. Bổ sung 0,8ml đệm rửa, vortex trong 40 giây, ly tâm 12000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, loại bỏ dịch nổi (lặp lại 2 - 3 lần).
3. Bổ sung 200 μ l đệm rửa vortex trong 40-60 giây
4. Bổ sung 650 μ l CTAB 2% + 0,03% β -mercaptoethanol vào ependorf chứa mẫu nghiền. Lắc đảo đều ống. Giữ ở 65°C trong 30 phút cứ 10 phút lấy ra lắc đều một lần. Tiếp tục giữ mẫu ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.
5. Bổ sung 650 μ l Chloroform/isoamyl alcohol(24:1) vào chứa mẫu và lắc đảo các trong 10 phút để trộn đều dung dịch.
6. Ly tâm mẫu với tốc độ 12000 vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ phòng và dùng Pipet chuyển dịch nổi sang ống mới.
7. Bổ sung 455 μ l Isopropanol (lạnh) vào eppendorf và lắc đảo đều, giữ ống mẫu ở trong đá.
8. Nếu có ADN nổi thì vớt sang ống eppendorf khác, nếu không có thì ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong 5 phút ta thu được các cuộn ADN nhỏ.
9. Rửa ADN bằng 350-400 μ l Ethanol 70% hai lần. Sau mỗi lần rửa, ly tâm với tốc độ 13000 vòng/phút trong 2 phút sau đó nhẹ nhàng loại bỏ Ethanol (tránh để các cuộn ADN rơi ra ngoài).
10. Làm khô ADN bằng máy hút chân không.
11. Giữ ADN trong 200 μ l TE ở nhiệt độ phòng trong 10 - 30 phút và bổ sung vào 5 μ l RNase(10mg/ml). Giữ sản phẩm ở nhiệt độ 37°C trong 1 - 2 giờ (có thể để qua đêm).
12. Cho vào 200 μ l hỗn hợp Phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) (trước khi sử dụng phải lắc đều hỗn hợp). Sau đó lắc mạnh hỗn hợp để trộn đều các sản phẩm. Ly tâm với tốc độ 10.000 - 13.000vòng/phút trong 5 phút ở 4°C (lắc đảo đều hỗn hợp thấy xuất hiện hai lớp , phần dịch nổi bên trên có chứa ADN).
13. Chuyển phần dịch nổi (pha trên) sang ống eppendorf mới và bổ sung 20 μ l Sodium acetate 3M, cho tiếp 450 μ l Ethanol lạnh (100%) vào lắc đảo nhẹ.
14. Giữ sản phẩm ở -20°C trong 30 phút. Ly tâm ở 12000vòng/phút trong 15 phút thu cặn
15. Rửa ADN bằng 150 - 200 μ l Ethanol 70% hai lần. Sau mỗi lần rửa, ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 2 phút sau đó nhẹ nhàng loại bỏ Ethanol (tránh để các cuộn ADN rơi ra ngoài)
16. Bổ sung 100 μ l TE vào sản phẩm và giữ trong tủ lạnh 4°C qua đêm (Để bảo quản trong tủ lạnh -20°C)

17. Điện di ADN tổng số và đo OD.
18. Pha loãng ra nồng độ 10ng/μl để phục vụ cho chạy PCR.

b. Phản ứng PCR

Thành phần, nồng độ các hợp chất và chu kì nhiệt PCR

Thành phần, nồng độ các chất tham gia 25μl phản ứng PCR mà chúng tôi tiến hành để nhân gen *cryIA* được nêu trong bảng 4.

Bảng 4. Thành phần và nồng độ các hoá chất trong phản ứng PCR (25μl)

STT	Thành phần phản ứng	Nồng độ cuối cùng	Thể tích
1	H ₂ O	-	
2	Đệm PCR (Buffer)	1 X	2,5 μl
3	25mM MgCl ₂	2,5 mM	2,5 μl
4	2,5mM dNTPs	200 nM	2 μl
5	10 pM Primer	0.4pM	0,5 μl
6	5u/μl <i>Taq</i> pol	0,1 u	0,2 μl
7	ADN	25 ng	
		Tổng thể tích	25μl

Nồng độ AND của mẫu pha để làm sao lấy 2μl

Để nhân gen *CryIA(b)* và *CryIA(c)* chúng tôi sử dụng cặp mồi T1, T2 có trình tự như sau:

- T1: 5'-AGGTGCTGGGTTCTGTTCTCG-3'.
- T2: 5'-CATTGTTGTTCTGTGGTGGGATTT-3'.

Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR là

- 95 °C , 3 phút.
- 94 °C , 30 giây.
- 56 °C , 35 giây.
- 72 °C , 1,5 phút.
- 72 °C , 8 phút.
- lưu giữ ở 4 °C.

Từ bước 2 đến bước 4 tiến hành lặp lại 30 chu kỳ.

Thiết bị: Máy PCR (Gene Amp* PCR System 9700 - Appied Biosystems); máy điện di (Biorad); máy soi gel (Gel Doc-Pharmacia), máy chụp ảnh (Poloriod).

c. Kỹ thuật lai Southern

+ *Hoá chất, dung dịch và thiết bị*

Hoá chất: NaCl; NaOH; Na-Citrat; Tris-HCl; SDS; axit maleic; N-lauroylsarcosine; Tween 20; bộ kit lai DIG (DIG-High Prime DNA labeling and Detection Starter Kit II- Roche); nước cất 2 lần và khử trùng; thuốc hiện phim X-quang.

Dung dịch:

- Dung dịch biến tính ADN: 0,4M NaOH, 0,6M NaCl, tiệt trùng.
- 20X SSC: 3M NaCl, 300 mM Na-Citrat, 5X SSC, 2X SSC và 0.5X SSC, tiệt trùng.
- Đệm axit maleic: 0,1M axit maleic, 0,15M NaCl, pH7,5 (chỉnh pH bằng tinh thể NaOH), tiệt trùng.
- N-lauroylsarcosine 10%, SDS 10% lọc qua màng lọc vô trùng.
- Dung dịch cản 10% (10X): nấu 10 g bột gây cản trong 100ml đệm axit maleic, tiệt trùng. Dung dịch này có thể có sẵn trong bộ kit.
- Dung dịch cản 1X: Pha loãng dd cản 10X (10%) trong đệm axit maleic, chuẩn bị trước khi dùng.
- Dung dịch tiền lai: 5X SSC, 0,1% N-lauroylsarcosine, 0,02% SDS, 1% dung dịch cản, chuẩn bị trước khi dùng.
- Dung dịch lai: Dùng 64ml nước cất hai lần tiệt trùng để hoà tan bột lai chứa trong mỗi lọ trong bộ kit.
- Đệm rửa: 0,3% thể tích tween 20 trong dung dịch đệm axit maleic.
- Đệm dò: 0,1M Tris-HCl, 0,1M NaCl, pH 9,5, tiệt trùng.
- Dung dịch rửa: 2X SSC, 0,1% SDS và 0,5X SSC, 0,1% SDS.
- Dung dịch kháng thể: Li tâm ống kháng thể anti-DIG-AP trong bộ kit ở 10.000v/p trong 5 phút. Pha loãng 1:10 000 (75 mU/ml) trong dung dịch cản, chuẩn bị trước khi dùng.
- Chất nền phát quang: CSPD là dung dịch nền phát quang có sẵn trong bộ kit.
- *Dụng cụ và thiết bị:* Giấy thấm (Whatman); màng nylon (Positive charges 1417240 - Roche Diagnostics GmbH); bể thấm chuyển (khay nhựa hoặc thủy tinh); tủ ấm; ống lai; lò phản ứng lai (Bio-labo), hộp chụp phim X-quang (Kodak X-OMATIC Cassette); phim X-quang và nước hiện.

+ Quy trình thấm chuyển và lai Southern

Cắt ADN genom bằng enzym giới hạn và phân giải trên gel

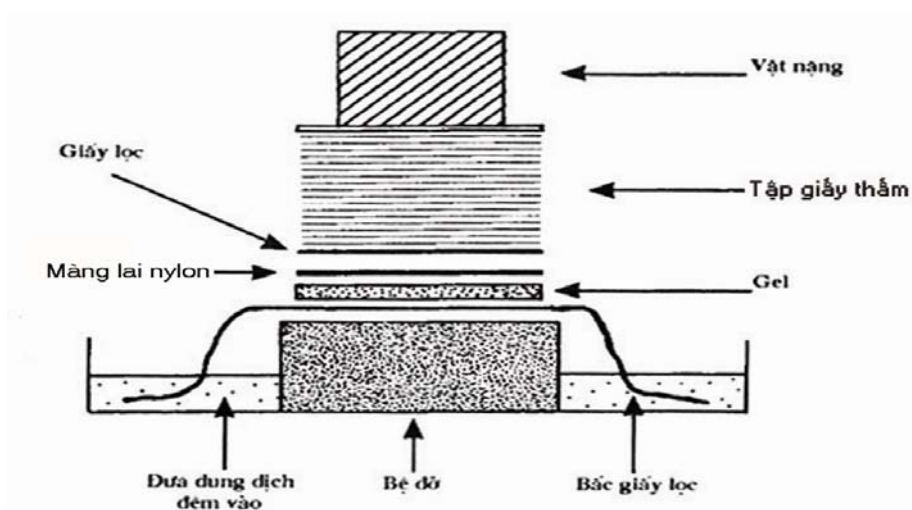
- Cho 5µg ADN genom vào ống eppendorf, bổ sung dung dịch đệm, enzym (40-50u) và nước tới thể tích 35µl. Ủ ở 37°C, trong 16 -18 giờ.

- Chạy điện di ADN cắt giới hạn trên gel agarose 0,8%, điện thế 40 - 50V, 12 - 14 giờ.

Thấm chuyển ADN lên màng nylon

ADN ở dạng sợi đơn được chuyển lên màng nylon theo phương pháp thấm ngược (Hình 7). Các bước tiến hành như sau:

- Xử lý bản gel điện di ADN trong dung dịch biến tính, lắc nhẹ 20 phút.
- Đổ dung dịch thấm chuyển (0,4M NaOH và 0,6M NaCl) vào bể.
- Thấm ướt 3 lớp giấy thấm trong bể thấm chuyển, đặt lên vật đỡ là tấm kính hay một vật cứng khác tạo thành cầu giấy có chiều dài đủ ngập trong dung dịch và rộng khít với chiều rộng của bản gel.
- Đặt úp mặt bản gel lên cầu giấy.
- Thấm ướt màng nylon có kích thước như bản gel. Đặt màng nylon lên bản gel.
- Đặt 3 lớp giấy thấm có kích thước bằng bản gel lên màng nylon.



Hình 3. Bể thấm chuyển Southern

- Đặt một lớp dày các giấy thấm mỏng có khả năng thấm nhanh các dung dịch thấm ngược từ dưới lên;
- Đặt vật nặng khoảng 300 - 500g ở trên cùng, bên dưới vật nặng nên đặt một tấm kính mỏng để phân bố đều trọng lực của vật nặng lên các lớp giấy thấm.
- Cho thấm chuyển 10 - 12 giờ.
- Rửa màng nylon trong dung dịch 2X SSC. Để màng khô trong nhiệt độ phòng, sau đó xử lý ở nhiệt độ 65°C, trong 2 giờ. Bảo quản màng nylon ở nhiệt độ phòng cho đến khi tiến hành lai với mẫu dò.

Đánh dấu mẫu dò và thang ADN chuẩn bằng lai với mẫu ngẫu nhiên

Đánh dấu mẫu dò lai Southern với DIG được tiến hành theo các bước sau đây:

- Biến tính ADN: Bổ sung H₂O vào 30ng ADN (sản phẩm PCR nhân gen *CryIA(b)*, 1,1kb) thành thể tích 15 μ l trong eppendorf. Đặt eppendorf vào nước sôi, ủ trong 10 phút. Lấy ống ra và đặt ngay vào đá.
- Gây phản ứng: Bổ sung hỗn hợp 10X Hexanucleotide; 2 μ l 10X dNTPs và 1 μ l enzym Klenow (nồng độ cuối cùng là 100u/ml). Nếu các thành phần trên có sẵn trong kit với nồng độ 5X thì lấy 4 μ l bổ xung vào 16 μ l ADN đã biến tính.
- Trộn đều hỗn hợp, ủ ở 37°C qua đêm thì có thể thu được khoảng 1050ng ADN đánh dấu. Dừng phản ứng bằng xử lý ở 65°C, 10 phút. Bảo quản ở -20°C.
- Thang ADN chuẩn được đánh dấu như trên. Chỉ cần gây phản ứng trong 1 giờ, thu hoạch 130ng ADN đánh dấu là đủ cho nhiều thí nghiệm lai.

Tiến hành lai Southern

Lai Southern có thể được tiến hành trong ống thủy tinh hay hộp nhựa. Nếu dùng ống thủy tinh thì cần phải có trục quay để quay đều ống trong suốt quá trình lai. Nếu dùng hộp lai thì dùng máy lắc. Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng ống thủy tinh để lai và lò lai. Qui trình lai mẫu dò trên màng Southern được tiến hành theo các bước như sau:

- Rửa màng trong dung dịch 2X SSC, 5 phút.
- Đặt màng vào ống lai. Đổ 50ml dung dịch tiền lai đã được làm nóng trước vào ống. Quay ống lai 12 vòng/phút ở nhiệt độ 67°C, 2 - 3 giờ.
- Chuẩn bị dung dịch lai: Đun sôi 10 phút mẫu dò và thang ADN chuẩn đã đánh dấu, đặt nhanh lên đá và dùng pipet cho vào dung dịch lai đã đun nóng ở 67°C. Thể tích dung dịch lai trung bình 3 - 4ml/100 cm² màng. Để lai dò một bản gen chuyển thường dùng mẫu dò 20 - 50ng/ml. Còn đối với thang ADN chuẩn chỉ cần 2 - 3ng cho một màng.
- Đổ dung dịch tiền lai đi. Thay thế nhanh bằng dung dịch lai. Quay ống lai ở nhiệt độ và tốc độ như ở tiền lai. Lai 10 - 20 giờ. Chú ý: nhiệt độ lai luôn được giữ ổn định trong suốt quá trình lai.
- Đổ dung dịch lai vào ống, bọc bằng giấy bạc và cất giữ tủ lạnh sâu để có thể dùng lại.
- Rửa màng lai trong 200ml dung dịch rửa 2X đã được làm nóng ở 67°C, 5 phút, 2 lần và rửa bằng cách cho ống quay liên tục trong lò lai.
- Rửa tiếp màng lai trong 200ml dung dịch rửa 0.5X đã được làm nóng ở 67°C, 15 phút, 2 lần.

Phản ứng dò tìm ADN

Việc dò định vị các điểm lai giữa mẫu dò và ADN genom được tiến hành dựa trên cơ sở phản ứng liên hợp phosphatase kiềm giữa kháng thể của DIG và chất nền phát quang.

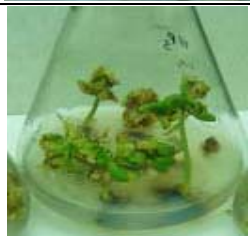
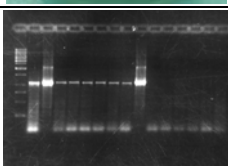
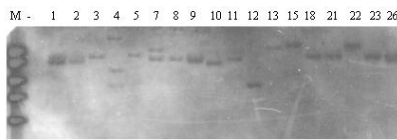
- Đổ đệm rửa (100ml/100 cm² màng) vào khay hay hộp nhựa và rửa màng lại 2 phút, bỏ đệm rửa đi.
- Bỏ sung dung dịch cản (100ml/100cm²), ủ trên máy lắc 30 phút (có thể tới 3 giờ), bỏ dung dịch cản đi.
- Bỏ xung dung dịch kháng thể (20ml/100 cm²), ủ trên máy lắc 30 phút, bỏ dung dịch kháng thể đi.
- Rửa màng trong đệm rửa (100ml/100 cm²), 15 phút, 2 lần.
- Cân bằng màng trong đệm dò (20ml/100 cm²).
- Nhỏ chất nền phát quang CSPD (1 ml/100cm²) lên đáy một khay thủy tinh hoặc nhựa sạch, đặt úp mặt màng lên giọt chất nền đó. Chú ý: không được để màng bị khô, nếu bị khô sẽ có phông nền đen khi hiện phim; dùng cặp mỏng di chuyển nhẹ màng sao cho không để có bọt khí giữa chất nền và màng nhằm mục đích phân bố đều chất nền trên bề mặt của màng.
- Ủ màng 5 phút. Dùng kẹp gấp màng lên và để chảy bớt chất nền. Đặt nhanh màng vào túi ni lông và dán kín lại.
- Ủ màng ở nhiệt độ phòng, 5 phút. Có thể ủ màng tiếp sau đó ở 37°C, 10 phút để tăng cường phản ứng phát quang.

Hiện phim X-quang

- Đặt phim X-quang vào hộp chụp phim và đặt màng trong túi nylon lên trên. Cài chặt hộp chụp phim và bọc kín trong vải đen.
- Sau 1 giờ đem rửa phim trong phòng tối. Nếu tín hiệu phát quang yếu thì kéo dài thời gian chụp phim (có thể để qua đêm).

Sơ đồ 1. Quy trình chuyển gen trực tiếp qua ống phấn bằng vi tiêm

Bước	Nội dung thực hiện		Ảnh minh họa
1	Chuyển gen qua ống phấn bằng vi tiêm	Gieo hạt và chăm sóc bông	
		Theo dõi, đánh dấu hoa trước khi tiêm	
		Vi tiêm trực tiếp vào noãn	
		Chăm sóc, thu hoạch và bảo quản hạt	
2	Tạo vết cháy kháng sinh trên lá	Gieo hạt To và chăm sóc cây bông	
		Thử kháng sinh trên lá 3 lần (với các lá thứ tự 2, 4, 6)	
		Chăm sóc cây dương tính, thu hoạch hạt và bảo quản	

3	Chọn lọc cây bông chuyển gen trên môi trường kháng sinh chọn lọc	Khử trùng, tách vỏ và đặt hạt	
		Chọn lọc kháng sinh lần 1 (MS + Hygromycine)	
		Chọn lọc kháng sinh lần 2 (MS + Hygromycine)	
4	Chọn lọc cây bông chuyển gen bằng kỹ thuật sinh học phân tử	Tái sinh cây hoàn chỉnh sau chọn lọc MN	
		Thu lá bảo quản ở tủ -84°C Tách chiết ADN Kiểm tra bằng phản ứng PCR	
		Lai southern	
		Huấn luyện và chuyển cây ra nhà lưới	
		Chăm sóc, thu hạt và bảo quản	

QUY TRÌNH CHUYỂN GEN CÂY HỒNG (*PAULOWNIA FORTUNED*)

1. Nguyên liệu và phương pháp

1.1. Nguyên liệu

Sử dụng giống cây hồng (*Paulownia fortunei*). Cây trong ống nghiệm được dùng làm nguyên liệu cho việc xây dựng hệ thống tái sinh cây hồng.

1.2. Phương pháp

Tái sinh từ mảnh lá: để tái sinh chồi từ mảnh lá, các cây con trong ống nghiệm cao khoảng 5 - 6cm với 3 - 5 cặp lá được sử dụng. Các mảnh lá được cắt với kích thước khoảng 1 - 2cm² được đặt trong môi trường tái sinh. Theo dõi và đánh giá khả năng tái sinh chồi sau 5 tuần.

Tái sinh từ cuống: các cuống lá được cắt với chiều dài khoảng 5 - 10mm được đặt trong môi trường tái sinh. Theo dõi và đánh giá khả năng tái sinh chồi sau 5 tuần.

Tái sinh từ thân cây: các đoạn thân cây với chiều dài khoảng 3 - 5mm được đặt trong môi trường tái sinh. Theo dõi và đánh giá khả năng tái sinh chồi sau 5 tuần.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy: Môi trường nuôi cấy MS (3) chứa 30g/l đường, 9g/l Agar với sự hiện diện của các chất kích thích sinh trưởng theo tổ hợp là BA (1, 5, 10 mg/l) và NAA (0,1- 0,5- 1mg/l). Mỗi bình tam giác chứa khoảng 6 - 8 mẫu và mỗi nghiệm thức trung bình khoảng 30 mẫu. Các mẫu được đặt trong điều kiện 9 giờ chiếu sáng/ngày, nhiệt độ 27- 28 °C. Sau 3 tuần cấy truyền một lần.

Tái sinh từ phương pháp cắt lớp mỏng tế bào: Lớp mỏng tế bào được cắt ở những vị trí khác nhau của cây, gồm lát cắt ngang (dày khoảng 0,5 - 2mm) và lát cắt dọc (dày khoảng 0,5 - 2mm, dài khoảng 2 - 5mm).

- Vị trí cắt mẫu: cuống lá, phiến lá, gân lá, đốt thân.
- Dùng dao cắt qua các vị trí khác nhau của cây với lát cắt ngang và dọc, dao lam được vô trùng với Hypochlorit calci và rửa nhiều lần bằng nước cất vô trùng.
- Dùng đĩa petri nhựa vô trùng, cấy mẫu vào petri 60mm, petri được dán kín bằng một lớp parafilm.
- Mẫu invitro dùng để thí nghiệm được nhân giống bằng cách cắt đoạn có đỉnh sinh trưởng hoặc chồi nách, các mẫu này được cấy trong bình tam giác 250ml, đầy bằng giấy trong điều kiện chiếu sáng 10 giờ/ngày. Sau 30 ngày cấy, mẫu được dùng để thực hiện lát cắt mỏng. Mỗi đĩa petri được đặt 7 mẫu và các mẫu cắt không có đỉnh

sinh trưởng. Đối với đốt cuống lá được cắt ở vị trí giữa chồi nách và lá.

2. Quy trình chuyển gen vào cây hồng

2.1. Nguyên liệu

2.1.1. Môi trường và điều kiện nuôi cấy cây Hồng

Môi trường nuôi cấy MS (3) chứa 30g/l đường, 9g/l Agar với sự hiện diện của các chất kích thích sinh trưởng theo tổ hợp là BA (1, 5, 10 mg/l) và NAA (0,1- 0,5- 1mg/l). Mỗi bình tam giác chứa khoảng 6 - 8 mẫu và mỗi nghiệm thức trung bình khoảng 30 mẫu. Các mẫu được đặt trong điều kiện 9 giờ chiếu sáng/ngày, nhiệt độ 27- 28 °C. Sau 3 tuần cấy truyền một lần.

2.1.2. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Môi trường giữ giống là LB có kháng sinh Kanamycin 50 mg/l. Để nhân giống phục vụ nghiên cứu chuyển gen, vi khuẩn được nuôi cấy lắc qua đêm trong môi trường AB (Chilton và cộng sự, 1974).

2.1.3. Chủng vi khuẩn và plasmid

Sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 chứa plasmid ITB mang gen *cryIA(c)* (gen kháng sâu), gen *bar* (gen kháng thuốc trừ cỏ Basta) và gen *gusA* (gen chỉ thị).

- *Gen chỉ thị gusA*: Được phân lập từ vi khuẩn E. coli, gen *gusA* mã hóa cho việc tổng hợp e.
- *Gen kháng PPT (bar)*: có nguồn gốc từ loài nấm *Streptomyces hygroscopicus*. Gen này mã hóa cho enzym phosphinothricin acetyl transferase (PAT), giúp biến đổi PPT từ dạng ức chế sinh tổng hợp glutamine gây chết cây trồng sang dạng bị acetyl hóa không còn gây độc cho cây.
- *Gen cryIA(c)*: mã hóa cho một loại độc tố delta-endotoxin có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*. Loại protein này theo thức ăn xâm nhập vào cơ thể côn trùng làm sâu ngừng ăn và chết.

2.1.4. Thực vật

Sử dụng giống cây hồng (*Paulownia fortunei*). Lá cây trong bình nuôi cấy kích thước khoảng 1 - 2cm² được dùng làm nguyên liệu chuyển gen.

2.2. Phương pháp chuyển gen

Sử dụng vi khuẩn đã nuôi lắc qua đêm để gây nhiễm mảnh lá, sau đó các mảnh lá được nuôi cấy trên môi trường tái sinh tạo chồi (môi trường MS có 0,1 mg/l NAA và 10 mg/l BA) có bổ sung chất acetosyringone nồng độ 100µM. Sau đó rửa và diệt vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* bằng dung dịch kháng sinh Cefotaxim 500 mg/l trong thời gian 30 phút, chuyển các mảnh lá sang môi trường tái sinh tạo chồi có chứa chất chọn lọc là Phosphinothricin (PPT) và Cefotaxim 500 mg/l. Cấy truyền 2 tuần/lần trên cùng loại môi

trường. Sau 6 tuần, mẫu lá có chồi tái sinh được cấy truyền sang môi trường ra rễ có chứa PPT. Một số cây ra rễ tốt được đưa ra trồng ở vườn ươm.

2.2.1. Kiểm tra gen chỉ thị *gusA* bằng dung dịch X-Gluc

Gen *gusA* được xem là gen chỉ thị giúp chúng ta phát hiện nhanh nhất mô hay cây chuyển gen, nên gen *gusA* hiện được sử dụng rất phổ biến trong các kỹ thuật chuyển gen ở cây trồng. Bằng cách ngâm các mảnh lá và chồi nhỏ với dung dịch X-Gluc khoảng 15 giờ ở nhiệt độ 37°C, mẫu chuyển gen sẽ có màu xanh chàm đặc trưng, còn mẫu đối chứng sẽ không chuyển màu.

2.2.2. Kiểm tra gen sự hiện diện của gen *cryIA(c)* bằng phản ứng PCR

Các kỹ thuật sinh học chuẩn bị cho phản ứng PCR:

a) Quy trình tách nhiễm sắc thể ADN thực vật cho phân tích PCR được tiến hành theo phương pháp của Dellaporta (1983) như sau:

- Cắt một mảnh nhỏ lá và nghiền trong tuýp eppendorf 1,5ml bằng dụng cụ nghiền.
- Thêm 400 μ l dung dịch tách chiết và nghiền thêm vài phút cho lá bị nghiền nát.
- Thêm 30 μ l của dung dịch SDS 20% và ủ ở nhiệt độ 65°C trong 10 phút.
- Cho thêm 400 μ l hỗn hợp phenol-chloroform, trộn đều và ly tâm trong 5 phút.
- Thu nhận phần dịch trên vào tuýp eppendorf mới. Có thể lặp lại bước 4 và 5.
- Cho 300 μ l iso-propanol và giữ trong đá khoảng 10 phút.
- Ly tâm ở 3000 vòng trong 5 phút và cẩn thận loại bỏ dịch phía trên.
- Thêm 100 μ l cồn 70%, ly tâm trong 5 phút và cẩn thận loại bỏ cồn.
- Để khô mẫu khoảng 20 - 30 phút và hòa tan kết tủa trong 40 μ l của TE.
- Thêm 2 μ l enzym RNase (2mg/ml) và ủ ở 37°C trong 30 phút.

ADN có thể sử dụng ngay hoặc bảo quản trong -20°.

b) Chuẩn bị phản ứng PCR

- *Hóa chất:* Lấy ADN ra khỏi tủ -20°, 10X PCR buffer, dNTPs, primers trong bình đá vụn (các hóa chất này luôn được giữ lạnh, khi dùng xong chuyển ngay vào tủ -20°.

- Với cặp mồi chuyên biệt có trình tự mồi như sau:

Mồi 1: ACAGAAGACCCTTCAATATC

Mồi 2: GTTACCGAGTGAAGATGTAA

- Đánh số lên ống eppendorf rồi cho hóa chất vào ống theo thứ tự:

dNTPs: 5 μ l (nồng độ đạt 2mM cho mỗi loại NTP)

10X buffer PCR: 5 μ l

Primer 1: 2 μ l (nồng độ từ 50 - 100ng)

Primer2 : 2 μ l (nồng độ từ 50 - 100ng)

Mẫu ADN : 5 μ l (thay đổi tùy theo nồng độ ADN từ 50 - 500ng ADN thực vật)

H₂O : 30,5 μ l (có thể thay đổi tùy theo thể tích cuối cùng là 50 μ l)

Tag Polymerase : 0,5 μ l

Thể tích của mỗi ống phải là 50 μ l .

Nếu mẫu ADN là plasmid chỉ khoảng 0,1ng là đủ chạy mẫu dương tính.

Đặt ống PCR. Cho máy chạy theo chương trình đã định

Chương trình cho hoạt động của phản ứng PCR như sau:

- | | | | |
|--------------------------------------|------|---------|----------------|
| - Bắt đầu tách chuỗi ADN | 95°C | 5 phút | 1 cycles |
| - Tách chuỗi ADN | 95°C | 30 giây | |
| - Primer cặp vào ADN | 54°C | 1 phút | 25 - 30 cycles |
| - Kéo dài sợi ADN mới | 72°C | 1 phút | |
| - Hoàn thành đoạn ADN mới | 72°C | 7 phút | |
| - Giữ mẫu ở 4°C cho đến khi lấy mẫu. | | | |

Sau khi phản ứng xong, dùng dung dịch phía dưới để chạy điện di với điện thế khoảng từ 65 - 80V, chạy từ 90 - 120 phút.

Xem kết quả trên đèn cực tím. Kích thước đoạn ADN của gen cryIA(c) ở cây chuyển gen và đối chứng dương tính (plasmid) được khuếch đại là 0,65kb.

2.2.3. Phương pháp thực hiện kỹ thuật Southern Blot

Sử dụng bộ Kit AlkPhos Direct Labelling and Detection Systems của Công ty Amersham Pharmacia Biotech.

+ Tách chiết AND của nhiễm sắc thể cây chuyển gen

Nhiễm sắc thể từ lá cây Hồng trồng ngoài vườn ươm được tách chiết bằng phương pháp CTAB (cetyltrimethylammonium bromide). Khoảng 5 gam lá được làm đông cứng bằng nitơ lỏng và nghiền trong dung dịch đệm CTAB (nóng 65°C) gồm 2% CTAB, 0.1M Tris-HCl, 0,02M Na₂-EDTA, 1.4M NaCl, 1%PVP. Hỗn hợp được ủ ở 60°C trong 1 giờ. Hỗn hợp với 10 ml chloroform/isoamyl alcohol được trộn đều, xong ly tâm ở 3000vòng trong 10 phút. Phần dịch trong trên được lấy cho vào ống nhựa mới. Thêm 1 phần thể tích iso-propanol. Giữ lạnh 4°C trong 1 giờ đem ly tâm ở 3000 vòng trong 20 phút. Loại bỏ dịch trên, rửa kết tủa trắng bằng cồn 70% tiếp ly tâm ở 3000 vòng trong 5 phút, loại bỏ cồn để

khô kết tủa trong nhiệt độ phòng và hoà tan bằng dung dịch đệm TE, có thể xử lý mRNA bằng enzym RNase, ủ trong 37°C trong vài giờ để ADN của nhiễm sắc thể cây tan hoàn toàn. Sau đó đo lượng ADN.

+ Sử dụng enzyme giới hạn để cắt ADN của nhiễm sắc thể cây chuyển gen

Sử dụng enzym giới hạn Hind III để cắt ADN, thiết lập phản ứng cắt như sau:

- Nhiễm sắc thể (ADN) cây:	(10 μ g)	40 μ l
- Buffer (10x) :		4 μ l
- Hind III :		2 μ l
- H ₂ O :		14 μ l
Tổng cộng :		60 μ l

Giữ hỗn hợp phản ứng ở 37°C qua đêm.

+ Chạy điện di ADN của nhiễm sắc thể cây chuyển gen sau khi cắt bởi enzym Hind III

1. Cân 3,5 g Agarose hòa tan trong 350ml dung dịch đệm 1x TAE bằng lò vi ba.
2. Để nguội dung dịch khoảng 55°C cho vào 14 ml EB, đổ vào khung bộ điện di.
3. Cho ADN đã cắt cùng với thuốc nhuộm vào các giếng của gel. Theo thứ tự : thang chuẩn (Lambda DNA cắt bởi Hind III), PC: gen *cryIA(c)*, NC: ADN cây không chuyển gen, ADN cây chuyển gen.
4. Chạy điện di ở 20 V cho đến khi mẫu đã đi được 3/4 gel.

Pha hoá chất:

- Dung dịch x50 TAE: 242g Trizma base + 18,6g EDTA hòa tan trong 8000ml nước cất, chỉnh pH = 8 bằng acid acetic. Lên thể tích 1000ml. Bảo quản nhiệt độ phòng trong 3 tháng.

+ Chuyển ADN của nhiễm sắc thể cây từ gel vào màng Hybond-N

- Đặt gel vào khay đựng 300 ml HCl 0,25N (Depurinating solution). Lắc nhẹ khay trong 10 phút, rồi đổ bỏ dung dịch acid và tráng bằng nước cất.
- Làm biến tính ADN với dung dịch 0,4N NaOH (Denaturing solution). Lắc nhẹ khay trong 30 phút. Loại bỏ dung dịch NaOH và tráng bằng nước cất.
- Trung hòa gel bằng cách lắc nhẹ khay với dung dịch trung tính (Neutralizing solution) khoảng 30 phút.
- Rửa gel bằng nước cất vô trùng và chuẩn bị cho gel tiếp xúc với màng Hybond-N.
- Đổ dung dịch 20xSSC vào khay có miếng kính thủy tinh đặt trên thành khay. Sử dụng 3 tấm giấy thấm 3MM (đã thấm ướt trước với dung dịch 20xSSC) phủ trên

miếng kiếng cho giấy nhúng vào dung dịch 20x SSC.

- Để gel vào trên giấy 3MM, phủ màng Hybond-N trên gel không để có bột khí. Đặt tiếp 3 miếng giấy 3MM trên màng Hybond-N (đã thấm ướt trước với dung dịch 20xSSC), phủ một chồng giấy thấm lên phía trên, xong đặt một vật nặng để đè trên các tấm giấy. Để quá trình chuyển ADN vào màng Hybond-N qua đêm.
- Gỡ bỏ tất cả giấy một cách nhẹ nhàng, rửa màng Hybond-N bằng dung dịch 20x SSC, rồi đặt vào buồng lai.

Pha hoá chất:

- **Dung dịch 20x SSC:** 88,23 g Tri-sodium citrate + 175,32 g NaCl hòa tan trong 800ml nước cất chỉnh pH = 7 - 8. Lên thể tích 1000ml. Bảo quản nhiệt độ phòng trong 3 tháng.

- **Dung dịch lọc trong (Depurinating solution)** :11 ml HCl + 989 ml nước cất. Bảo quản nhiệt độ phòng trong 1 tháng.

- **Dung dịch biến tính (Denaturing solution):** 87,66g NaCl + 20g NaOH hòa tan trong 1000 ml nước cất. Bảo quản nhiệt độ phòng trong 1 tháng.

- **Dung dịch trung tính (Neutralizing solution):** 87,66 g NaCl + 60,5g Trizma hòa tan trong 800ml nước cất chỉnh pH = 7,5 bằng HCl . Lên thể tích 1000ml. Bảo quản nhiệt độ phòng trong 3 tháng.

+ Chuẩn bị probe đánh dấu

1. Pha loãng 20 μ l dung dịch cross linker (**có sẵn trong bộ Kit**) với 80 μ l nước thành dung dịch có nồng độ sử dụng (dung dịch phản ứng cross linker). (Có thể bảo quản lạnh 2 - 8°C trong 1 tuần)
2. Pha loãng DNA(gen *cryIA*) với nước tới nồng độ 10ng/ μ l dùng để đánh dấu (Nồng độ muối trong mẫu DNA nên được giữ ở mức thấp nhất, không quá 50mM)
3. Cho 10 μ l DNA đã pha loãng vào trong ống nhựa ly tâm và làm biến tính bởi nhiệt độ bằng cách đun 5 phút trong nước đang sôi mạnh. (Phản ứng đánh dấu có thể gia tăng với tỉ lệ các thành phần gia tăng đồng đều)
4. Làm lạnh ngay trên đá trong 5 phút. Ly tâm nhanh để dồn dung dịch xuống đáy ống.
5. Thêm 10 μ l dung dịch đệm phản ứng Reaction buffer (**có sẵn trong bộ Kit**) vào DNA đã được làm lạnh. Đảo trộn nhẹ cho đều (Phản ứng nên giữ trên đá)
6. Thêm 2 μ l chất đánh dấu Labelling reagent (**có sẵn trong bộ Kit**). Trộn nhẹ, đều.
7. Thêm 10 μ l dung dịch phản ứng cross linker. Trộn đều. Ly tâm nhanh để dồn hỗn hợp xuống đáy ống.

8. Ủ 30 phút ở 37°C cho phản ứng xảy ra.
9. Probe có thể được dùng ngay hoặc giữ trên đá đến 2 giờ. Trong trường hợp muốn bảo quản lâu hơn Probe đã đánh dấu được giữ trong 50% glycerol ở -15°C đến -30°C cho đến 6 tháng (Không cần xử lý gì thêm dung dịch probe này sau khi bảo quản)

+ *Lai*

- Đun trước (khoảng 50ml) dung dịch đệm lai AlkPho Direct đến 55°C. Dung dịch đệm AlkPhos Direct cần dùng phải được chuẩn bị trước khi đem lai bằng cách thêm NaCl để đạt nồng độ 0.5M (1,45 gNaCl) và chất kết gán (Blocking reagent) 2g để đạt nồng độ 4% (w/v). Có thể thay thế tích dung dịch đệm tùy thuộc vào thể tích vật chứa và số lượng của màng đem lai.
- Đặt màng vào trong dung dịch lai và giữ ít nhất 15 phút ở 55°C trong buồng lai.
- Cho dung dịch probe đã được đánh dấu vào dung dịch lai trong buồng lai. Nên lấy một phần dung dịch buffer đang dùng ra và trộn đều với probe rồi đổ vào lại phần dịch trong dung dịch lai.
- Lai ở 55°C qua đêm trong buồng lai.
- Pha hoá chất: 50ml dung dịch đệm lai AlkPho Direct phải được chuẩn bị trước khi đem lai bằng cách thêm 1,45g NaCl để đạt nồng độ 0.5M và 2g chất kết gán (Blocking reagent) để đạt nồng độ 4% (w/v). Hòa tan bằng khuấy đều trong 1 giờ sử dụng ngay hay trữ ở -20°C.

+ *Rửa màng sau khi lai*

- Đun dung dịch rửa 1 - 55°C. Lượng dung dịch rửa 1 ước lượng 2 - 5ml/cm² màng hoặc nhiều hơn.
- Chuyển cẩn thận màng vào dung dịch này và lắc nhẹ trong 10 phút ở 55°C.
- Rửa lại lần thứ hai trong dung dịch rửa 1 mới trong 10 phút ở 55°C.
- Đặt màng trong hộp sạch và cho vào một lượng buffer rửa 2. Lắc nhẹ 5 phút ở nhiệt độ phòng.
- Rửa lại lần thứ hai trong dung dịch rửa 2 mới trong 5 phút ở nhiệt độ phòng (Có thể lấy màng ra khỏi dung dịch rửa 2 khoảng 30 phút trước khi thực hiện phản ứng phát hiện).

Pha hoá chất:

Dung dịch rửa 1: pha 1000 ml

- Urê: 120g
- SDS: 1g
- Na phosphate 0,5 M pH 7 : 100ml

- NaCl: 8,7g
- $MgCl_2$ 1M: 1ml
- Blocking reagent: 2g
- Dung dịch rửa 1 giữ được 1 tuần trong 4°C.

Dung dịch rửa 2 (Stock 20x): pha 100ml

- Tris Base : 12,1g
- NaCl : 11,2g
- Chỉnh pH=10 , dung dịch này giữ trong 4°C đến 4 tháng.

Dung dịch rửa 2: Pha loãng 20 lần (20ml stock + 180ml nước cất) với 500 μ l dung dịch $MgCl_2$ 1M . Dung dịch rửa 2 pha xong sử dụng ngay.

+ *Phát sinh tín hiệu quang hoá và phản ứng phát hiện với CDP-Star*

1. Đổ dung dịch rửa 2 đi (bằng cách giữ một góc của màng vào thành hộp trong khi đổ dịch đi), rồi đặt màng lên một mặt phẳng không thấm. Không để màng bị khô (Dùng Saran Wrap).
2. Dùng pipet hút 3ml chất phát hiện cho đều lên màng và để 2 - 5 phút rồi đổ bỏ phần dịch dư thừa trên bề mặt.
3. Bao màng trong Saran Wrap. Đặt màng lên cassette sao cho phía có DNA ở trên tiếp xúc với mặt phim.
4. Trong phòng tối, đặt phim lên màng. Đậy cassette lại. Để qua đêm.
5. Rửa phim.

2.2.4. Phương pháp thực hiện kỹ thuật Western blot

Thu thập mẫu và tạo dịch chứa protein

- Cắt nhỏ khoảng 0,5g lá cây hồng chuyển gen cho vào tuýp nhựa.
- Cho vào 1ml dung dịch tách chiết mẫu (PBS), nghiền mẫu xong ly tâm ở 3000 vòng trong 10 phút nhiệt độ 4°C.
- Lấy dịch phía trên cho vào tuýp mới.
- Tạo hỗn hợp như sau: 40 μ l dung dịch chiết protein+ 40 μ l dung dịch đệm mẫu 2X SDS (2X SDS sample buffer)+ 4 μ l b-mercaptoethanol.
- Đun sôi dung dịch trên ở 100°C trong 10 phút.

Pha hóa chất:

- Dung dịch tách chiết mẫu (PBS): cho 1000ml (1X): NaCl 8g, KCl 0, 2 g, Na_2HPO_4 1,44g, KH_2PO_4 0,24g. Hòa tan trong nước cất và lọc qua phin vô trùng 0.45 μ m.

- Dung dịch đệm mẫu 2X SDS (2X SDS sample buffer): cho 10ml: glycerol 2ml, SDS 0,4g, Bromophenol blue: 4mg, Tris 0,152g, DTT 60mg.

+ Đo hàm lượng protein trong dịch chiết bằng phương pháp Bradford: cần khoảng 25 - 30 μ g protein/ mẫu cho một giếng chạy điện di đứng.

Chạy điện di protein

- Thiết lập bộ điện di và cho vào dung dịch đệm 1X SDS (Tris 3g, Glycin 19g, SDS 1g).
- Nhỏ của dịch đã xử lý trên (khoảng 30 μ g protein/mẫu) vào mỗi giếng. Chạy ở 150 volt trong 2 giờ.

Chuyển protein từ gel vào màng Nitrocellulose

- Sau khi chạy điện di xong lấy gel ra khỏi bộ điện di.
- Ngâm gel trong dung dịch chuyển khoảng 15 phút.
- Đặt gel trong xô chuyển theo thứ tự: 2 miếng giấy thấm Whatman, gel protein, màng Nitrocellulose và 2 miếng giấy thấm Whatman.
- Chạy ở 100 volt trong 1 giờ.

Rửa màng và kết dính

- Rửa màng trong dung dịch tách chiết mẫu (PBS) trong 5 phút.

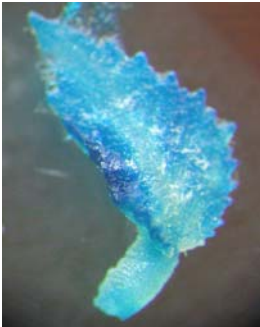
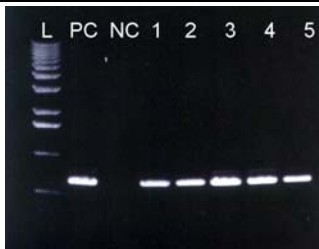
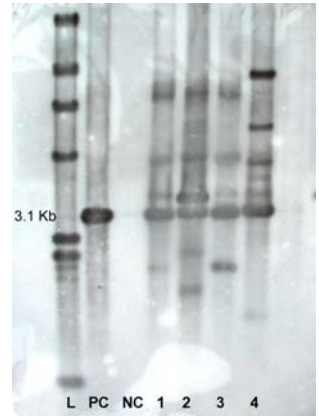
Kết dính với kháng thể

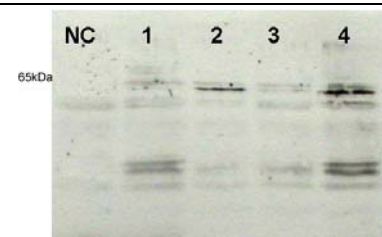
- Ngâm màng dung dịch kết dính PBS chứa bột sữa và Tween 20 trong điều kiện lắc nhẹ khoảng 1 giờ.
- Tiếp tục ngâm lắc nhẹ màng trong dung dịch kết dính PBS chứa kháng thể thứ nhất gen *Bt* khoảng 1 giờ.
- Rửa màng trong dung dịch kết dính PBST (PBD chứa bột sữa và Tween) 3 lần trong điều kiện lắc nhẹ khoảng 10 phút/lần.
- Ngâm lắc nhẹ màng trong dung dịch kết dính PBS chứa kháng thể thứ hai (alkaline phosphatase) khoảng 1 giờ.
- Rửa màng trong dung dịch kết dính PBST (PBD chứa bột sữa và Tween) 3 lần trong điều kiện lắc nhẹ khoảng 10 phút/lần.

Hiện màu

- Ngâm màng vào dung dịch alkaline phosphatase. Khi xuất hiện màu xong thì dừng phản ứng bằng cho màng vào dung dịch kết dính PBS chứa EDTA.
- Rửa màng bằng nước cất và chụp ảnh ngay.

Sơ đồ 1. Quy trình chuyển gen cây Hồng (*Paulownia fortunei*)

Bước	Nội dung thực hiện	Ảnh minh họa
1	Tạo cây nguyên liệu in vitro	
2	Biến nạp gen thông qua <i>Agrobacterium</i>	
3	Chọn lọc cây chuyển gen trên môi trường kháng sinh	
4	Kiểm tra gen chỉ thị <i>gusA</i> bằng dung dịch X-Gluc	
5	Kiểm tra gen sự hiện diện của gen <i>cryIA(c)</i> bằng phản ứng PCR	
6	Phương pháp thực hiện kỹ thuật Southern Blot	

7	Phương pháp thực hiện kỹ thuật Western blot	
8	Thử tính kháng sâu trên đĩa petri	
9	Ra cây chăm sóc ngoài nhà lưới	

QUY TRÌNH VÀ PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ, CHUYỂN GEN VÀ ĐÁNH GIÁ CÂY HOA CÚC CHUYỂN GEN

1. Quy trình nuôi cấy mô, tái sinh và đưa cây hoa cúc hoàn chỉnh ra đất

1.1. Khử trùng và xử lý mẫu cấy

1. Mẫu lá hoa cúc được chọn làm vật liệu nghiên cứu trong thí nghiệm tái sinh và tạo cây hoa cúc hoàn chỉnh.
2. Những mẫu lá bánh tẻ, có độ tuổi trung bình, có sức sống cao, không bị sâu bệnh, được tuyển lựa dùng trong thí nghiệm.
3. Rửa sạch những mẫu lá đã thu được bằng nước máy. Rửa bằng xà phòng loãng để loại bỏ các thành phần bám bẩn. Cuối cùng tráng sạch để loại bỏ hết chất bẩn và xà phòng.

Các bước sau đây được thực hiện trong điều kiện vô trùng của các box cây vô trùng:

4. Tráng qua mẫu lá hoa cúc trong cồn 70% trong 30".
5. Tráng lại một lần nữa bằng cồn 70% trong 10", sau đó loại bỏ hết cồn.
6. Khử trùng các mẫu lá bằng H_2O_2 12% trong thời gian 15', lắc nhẹ để tăng bề mặt tiếp xúc với H_2O_2 , tăng hiệu quả của quá trình khử trùng mà không làm tổn hại đến mẫu thí nghiệm.
7. Tráng sạch bằng nước cất khử trùng 3 lần để loại bỏ hết H_2O_2 còn đọng lại trên mẫu nhằm tránh cho mẫu bị tổn thương sau này khi tiếp xúc quá lâu với H_2O_2 .
8. Cắt bỏ phần tiếp xúc trực tiếp với H_2O_2 để loại bỏ phần bị tổn hại, tránh khả năng bị hoại tử về sau này.
9. Xử lý các mẫu thí nghiệm thành các mảnh cắt có kích thước 0,8x0,8cm.

1.2. Nuôi cấy và tái sinh cây

Các mẫu cấy ở trên được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung các chất kích thích sinh trưởng thích hợp để tái sinh trực tiếp từ mẫu lá:

Với giống HCT1 - R1: Môi trường MS + 1,5mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA

Với giống HCV1 - R2: Môi trường MS + 2,0mg/l BAP + 1,0mg/l NAA

1. Các mẫu cấy được nuôi trong điều kiện nhân tạo với nhiệt độ ổn định là 25°C, thời gian chiếu sáng/ tối là 16h/8h với cường độ ánh sáng (3000lux).
2. Sau 3 tuần, xuất hiện các chồi tái sinh từ mép lá, đến tuần thứ 5 thì tách các chồi ra khỏi mẫu lá và chuyển sang môi trường kéo dài chồi và tạo rễ MS bổ sung 0,1mg/Lnaa.
3. Sau 4 tuần khi bộ rễ đã hoàn chỉnh thì đưa cây ra ngoài điều kiện phòng thí nghiệm. Giá thể được chọn để ra cây là cát đen đã qua xử lý loại bỏ các yếu tố lây nhiễm có thể ảnh hưởng đến khả năng sống sót của cây như vi khuẩn và vi nấm.

1.3. Quy trình đưa cây ra giá thể trồng

1. Các cây hoàn chỉnh có đủ bộ rễ khỏe được đưa ra giá thể ở điều kiện tự nhiên.
2. Đưa cây ra khỏi bình, để tránh cho rễ không bị tổn thương nhiều, ta có thể cho nước để làm mềm giá thể cũ.
3. Loại bỏ các phần còn sót lại của giá thể cũ để tránh khả năng lây nhiễm vi khuẩn, nấm sau này. Có thể dùng dòng nước nhẹ sôi qua để loại bỏ phần thạch dính bám. Cần chú ý hạn chế khả năng gây tổn thương đến rễ, ảnh hưởng đến sức sống của cây.
4. Để phần rễ của cây thẳng tự nhiên, không được xoắn, giảm nguy cơ gãy.
5. Cần tránh cho cây bị mất nước, không tiến hành công việc ở nơi khô và nhiều gió.
6. Đưa cây vào giá thể cát, để rễ của cây thẳng tự nhiên, tránh khả năng nghẹt rễ, với mật độ khoảng 400 cây/m².
7. Trong thời gian đầu cần chú ý đến độ ẩm của môi trường khi cây chưa kịp thích nghi với điều kiện tự nhiên, sức sống của cây chưa cao do bộ rễ bị tổn thương.
8. Sau 3 tuần, cây được chuyển ra giá thể đất trong điều kiện nhà lưới. Giá thể được sử dụng ở đây là đất vườn thí nghiệm được làm kỹ, tơi xốp, khả năng thoát nước và giữ độ ẩm tốt, được bón lót phân chuồng oai.
9. Thời gian đầu che cây bằng lưới đen, tránh bị tác động của cường độ chiếu sáng mạnh của mặt trời.
10. Chế độ chăm sóc cây hoa cúc trong điều kiện nhà lưới: 1,5kg Phân đạm: 1,3kg phân lân: 1,1kg phân kali Phân đạm dùng để bón thúc 3/4 lượng phân lân dùng để bón lót: 1/4 dùng để bón thúc 2/3 lượng phân lân dùng để bón lót: 1/3 dùng để bón thúc.

Phân hữu cơ: sử dụng phân chuồng được ủ kỹ bón lót cho cây nhằm mục đích cải tạo đặc tính cơ lý và độ thông thoáng của đất.

Phân vi lượng: Sử dụng phân vi lượng với nồng độ 0,01% bón trực tiếp qua lá và thời kỳ

cây con.

1.4. Thời vụ gieo trồng và thời gian sinh trưởng

Cả 2 giống HCT1 và HCV1 đều sinh trưởng tốt vào vụ thu đông, trồng vào tháng 8, 9, thời gian sinh trưởng của giống cúc HCT1 là 3 tháng, với giống cúc HCV1 thì gian sinh trưởng là ngắn hơn một chút cỡ 2,7 tháng.

Ngoài ra 2 giống cúc trên cũng có thể trồng vào các vụ khác như đông xuân và xuân hè.

2. Quy trình chuyển gen và xác định cây chuyển gen

2.1. Quy trình chuyển gen

2.1.1. Tiềm nuôi cấy mẫu lá chuyển gen

- Các mẫu lá có kích thước 0,8 x 0,8cm được đặt trên môi trường tiềm nuôi cấy.
- Môi trường R1 với giống HCT1 và môi trường R2 đối với giống HCV1.
- Đặt những mẫu tiềm nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy 25°C, thời gian chiếu sáng/tối là 16h/8h, cường độ chiếu sáng là 3000lux, trong 2 đến 3 ngày.
- Những mẫu lá này được sử dụng cho thí nghiệm biến nạp.

2.1.2. Nuôi cấy vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* được nuôi cấy trong môi trường LB theo những trình tự như sau:

- Nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường LB đặc có bổ sung các kháng sinh thích hợp, trên đĩa Petri, ở 28°C, trong 48h.
- Nuôi cấy 1 khuẩn lạc thu được trong 10ml môi trường LB lỏng có chứa kháng sinh thích hợp ở 28°C lắc 200 vòng/phút, trong 24 giờ.
- Hút chuyển 500µl dịch nuôi cấy sang nuôi ở 0°C lắc 200 vòng/phút, trong 16h.
- Ly tâm thu sinh khối vi khuẩn ở điều kiện 3000vòng/phút, trong 30 phút, ở 4°C.
- Kết tủa vi khuẩn được rửa sạch bằng MgSO₄ 10mM sau đó được hoà tan trong môi trường biến nạp theo tỷ lệ 1:1. sẵn sàng dùng cho biến nạp.

2.1.3. Xử lý biến nạp và đồng nuôi cấy.

- Các mẫu lá tiềm nuôi cấy được xử lý cắt rìa của mép lá, và có thể cắt những vết cắt sâu vào trong phiến lá để tăng phần tiếp xúc với vi khuẩn ở những chỗ bị thương.
- Ngâm những mẫu lá đã được xử lý trong dịch biến nạp, ở điều kiện 28°C, lắc nhẹ để tăng khả năng tiếp xúc và kết bám của vi khuẩn trong thời gian 30'.

- Lấy những mẫu lá đã được xử lý biến nạp ra, thấm khô cho bớt dịch, đặt trên môi trường đồng biến nạp.
- Môi trường R1 cho giống HCT1; Môi trường R2 cho giống HCV1.
- Nuôi cấy trong tối ở 28°C, trong thời gian 2 ngày

2.1.4. Chọn lọc và tái sinh cây

- Những mẫu lá xử lý đồng biến nạp được rửa sạch bằng MS lỏng có chứa kháng sinh Claforan để loại bỏ vi khuẩn.
- Cấy những mẫu lá đã được rửa sạch đó lên môi trường tái sinh và chọn lọc các mẫu lá chuyển gen và có khả năng tái sinh.
- Môi trường chọn lọc và tái sinh: R1, R2 có bổ sung 50mg/l Kanamycin, 300mg/l Claforan cho giống HCT1 và HCV1 tương ứng.
- Sau thời gian là 5 tuần, với chu trình cấy chuyển 1 lần/ tuần, những mẫu lá sống sót trên môi trường chọn lọc cho ra chồi.
- Những chồi sống sót 18 ngày tuổi tiếp tục được chọn lọc bởi môi trường có chứa kháng sinh.
- Sau 35 ngày những chồi sống sót được đưa ra rễ. Sau 4 tuần khi bộ rễ hoàn chỉnh cây được đưa ra đất theo quy trình C đã nêu ở trên. Những cây trồng chuyển gen sẽ được theo dõi đánh giá cùng với các cây trồng đối chứng không chuyển gen

2.2. Xác định các cây chuyển gen

2.2.1. Sử dụng phương pháp PCR để xác định sự có mặt của các gen cần chuyển

Bằng kỹ thuật PCR áp dụng cho những đoạn mã đặc hiệu, chúng tôi đã tiến hành xác định sự có mặt của Promoter 35S trong các cây hoa cúc chuyển gen sử dụng cặp mồi 35S1/S2. Đây là một promoter đặc trưng được sử dụng trong các vector biến nạp và dựa vào sự có mặt của promoter này ta có thể khẳng định sự có mặt của gen quan tâm.

- Các mẫu lá thu được từ các cây trồng trong điều kiện nhà lưới (được cho là các cây trồng chuyển gen) và các mẫu lá cúc đối chứng không chuyển gen được tách chiết lấy ADN theo phương pháp DNA miniscale extraction cho phép có đủ lượng ADN tinh sạch dùng cho phản ứng PCR.
- Hòa loãng các mẫu ADN thu được đến nồng độ 25ng/μl.
- Thành phần và chương trình chạy PCR:
- Sản phẩm PCR được điện di trên gel Agarose và được xác định bằng cách so sánh với băng chuẩn

Bảng 1.

Thành phần	Thể tích
*ADN khuôn	1,0 μ l
*Mỗi 35S1/35S2	2,0 μ l
• dNTPs	2,0 μ l
• MgCl ₂	2,5 μ l
• Buffer PCR	2,5 μ l
* Taq ADN polymerase	1,0 μ l
* H ₂ O	14,0 μ l
V tổng	25μl

Bảng 2.

Các bước	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ
Biến tính	94	9 phút	4 chu kỳ
1. Biến tính	94	30"	
2. Gắn mồi	55	30"	
3. Tổng hợp	72	30"	
Tổng hợp nốt	72	5'	
Bảo quản	4	∞	

2.2.2. Xác định sự có mặt của các gen được chuyển bằng phương pháp lai Southern

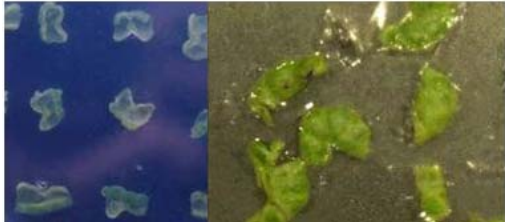
- ADN của các mẫu lá trên được tách chiết lấy lượng lớn dùng phương pháp CTAB.
- Xử lý bằng Enzyme giới hạn thích hợp
- Enzyme Not I cho đoạn mang gen *cryIAc*, và enzyme *SacI* và *XbaI* cho đoạn mang gen Anti - ACO.
- Chạy trên gel Agarose để xác định kết quả của quá trình phân cắt giới hạn bằng enzyme.
- Chuyển sang màng lai nylon bằng phương pháp thấm chuyển.
- Phương pháp lai và biểu hiện kết quả được tiến hành có sử dụng bộ kit ECL.

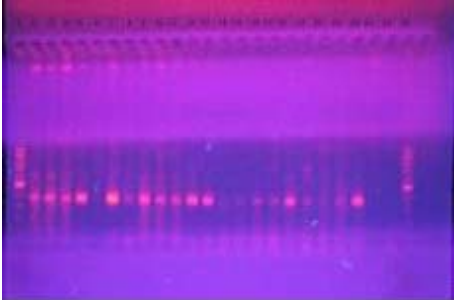
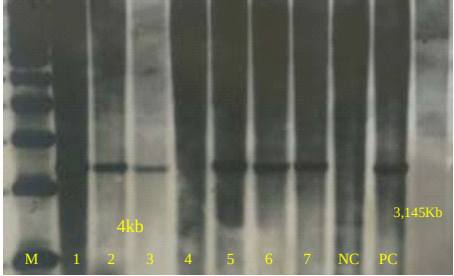
- Xác định các băng của các gen được chuyển trên màng lai sau khi hiện phim so sánh với ADN chuẩn được tách ra từ vi khuẩn được xử lý Enzyme giới hạn
- Enzyme NotI cho plasmid ART27 mang gen *cryIAc*, và enzyme *SacI* và *XbaI* cho plasmid p2300 - Anti ACO mang gen Anti - ACO

2.3. Đánh giá tính kháng sâu và độ tươi lâu của cây

Những quy trình đánh giá đang được chúng tôi tiến hành và những kết quả đang được đánh giá và so sánh để rút ra kết luận

Sơ đồ 1. Quy trình nuôi cấy mô, chuyển gen và xác định cây chuyển gen ở Hoa Cúc

Bước	Nội dung thực hiện	Ảnh minh họa
1	Xử lý và tạo các mẫu tiền nuôi cấy	
2	Nuôi cấy và tạo dịch huyền phù vi khuẩn	
3	Biến nạp và đồng nuôi cấy (28°C, 2 - 3 ngày, trong tối)	
4	Rửa mẫu biến nạp, nuôi cấy trên môi trường chọn lọc (có kháng sinh thích hợp)	
5	Tái sinh và chọn lọc các chồi biến nạp	
6	Ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh	

7	Đưa ra cát và huấn luyện cây	
8	Đưa ra đất, trồng, thu nhận mẫu lá, hoa và đánh giá với cây trồng đối chứng không chuyển gen	
9	Phân tích sinh học phân tử cây chuyển gen	 
10	Tái khẳng định cây hoa cúc chuyển gen, tiếp tục trồng lưu giữ và so sánh	

QUI TRÌNH CHUYỂN GEN VÀO CÂY LÚA NHỜ SÚNG BẮN GEN

1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

1.1. Vật liệu

Hạt gạo của các giống lúa KDML105, IR 64, Taipei 309 được dùng cho các thí nghiệm nuôi cấy mô và chuyển nạp gen.

1.2. Phương pháp tiến hành

1.2.1. Chuẩn bị mô sẹo

Hạt gạo được khử trùng như bước trên. Hạt gạo được cấy trên môi trường tạo mô sẹo MSCI và nuôi trong tối ở 28°C. Theo dõi sự phát triển của mô sẹo trong 3 tuần. Các mô sẹo có dạng sinh phôi được chọn và tách nhỏ (3mm) trên môi trường N60.5 trước khi bắn gen ít nhất 4 giờ. Các thành phần môi trường nuôi cấy xem Bảng 1.

1.2.2. Quy trình chuyển nạp

Dòng *E. coli* mang plasmid pWG1515-GUSA-hpt mang gen *hpt* kháng hygromycin và gen GUS, pUbi-cryIA(c), pUbi-GNA được dùng để chuyển vào các giống lúa.

Dòng vi khuẩn chứa các plasmid được bảo quản, tồn trữ trong glycerol 50% (v/v) và nuôi cấy trên môi trường LB. Từng khuẩn lạc đơn của *E. coli* được nuôi trong môi trường TB chứa Ampicilline 100mg/l⁻¹ và nuôi từ 15 - 18 giờ ở nhiệt độ 37°C. Dung dịch vi khuẩn này được dùng cho ly trích plasmid-DNA. DNA của plasmid được ly trích theo bộ Kit (Concert Rapid Plasmid Purification Systems, hãng Life Technologies) theo phương pháp của Birnboim và Doly (1979). DNA được pha loãng trong TE ở nồng độ 1µg/µl. DNA của dòng pWG1515-GUSA-hpt được bắn riêng lẻ hoặc cùng kết hợp với các gen hữu dụng khác. DNA này được dùng cho qui trình bắn gen.

DNA được tẩm trên các hạt vi đạn bằng vàng (Au) có kích thước 1µ, các vi đạn mang DNA được bắn vào mô sẹo đã nuôi 4 giờ trên môi trường N6 nhờ máy bắn gen Biolistic PDS-1000 He với các khoảng cách và áp lực bắn khác nhau.

1.2.3. Chọn lọc và tái sinh cây chuyển gen

Sau khi bắn 20 - 24 giờ, các mô sẹo được chuyển sang môi trường phục hồi MSCI để nhân mô sẹo. Sau 2 tuần, các mô sẹo được tách nhỏ 1 - 2mm và chuyển sang môi trường thanh lọc MSSe có hygromycin 30 mg/l. Sau 3 tuần, các mô sẹo sống sót được tách nhỏ và chuyển sang môi trường thanh lọc lần thứ 2 có hygromycin 50 mg/l.

Các dòng kháng hygromycin và phát triển qua 2 lần thanh lọc được chuyển qua môi trường N6P (nhân nhanh mô sẹo) và theo dõi sự phát triển của mô sẹo từ 2 - 3 tuần. Các

mô sẹo phát triển tốt được chuyển sang môi trường tái sinh MSRe và nuôi ở 28°C trong tối 1 tuần trước khi được chuyển đến phòng sáng có ẩm độ 70%, nhiệt độ 28°C và thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày. Cây tái sinh được chuyển sang môi trường tạo rễ MSR. Sau khi rễ đã phát triển đầy đủ cây con chuyển vào chậu đất và trồng ở nhà kính.

1.2.4. Trắc nghiệm sự biểu hiện gen *GUS*

Trắc nghiệm sự biểu hiện tạm thời (transient assay) gen *GUS* trong tế bào được chuyển nạp được thực hiện ở các mô sẹo vào ngày thứ 3 sau khi chủng hoặc bắn, trắc nghiệm sự biểu hiện ổn định (stable assay) ở các mô sẹo phát triển tốt qua thanh lọc trước khi tái sinh và ở cây tái sinh (Jefferson, 1987).

Các vật liệu gồm mô sẹo được chủng *A. tumefaciens* hoặc bắn gen sau 3 ngày và đoạn phiến lá dài 5 - 10mm của các cây tái sinh được chuyển vào lỗ của đĩa nhiều giếng có chứa dung dịch X-Gluc. Quan sát sự biểu hiện gen *GUS*, sau 24 giờ ủ ở các mẫu có những điểm màu xanh. Diệt lục tố trong lá được tẩy bằng hỗn hợp acetone: methanol (1:3).

Bảng 1. Thành phần các dung dịch nhuộm X-gluc

Thành phần	Cho 10 ml	Nồng độ cuối
Phosphat Buffer (pH7.0)	500 µl	0,05 M
Triton X-100	10 µl	1%
<i>Beta</i> -mercapethanol	10 µl	10 mM
X-Gluc	500 µl	1 mM
H ₂ O cất	9,9 ml	

X-Gluc: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-glucuronic acid

Bảng 2. Thành phần các môi trường nuôi cấy

Môi trường	Thành phần
AB (Chilton và ctv. 1974)	3 g.l ⁻¹ K ₂ HPO ₄ , 1g.l ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ , 1g.l ⁻¹ NH ₄ Cl, 0,3g.l ⁻¹ MgSO ₄ .7H ₂ O, 0,15g.l ⁻¹ KCl, 0,01g.l ⁻¹ CaCl ₂ , 0,0025 g.l ⁻¹ FeSO ₄ .7H ₂ O, 5g.l ⁻¹ glucose, 15 g.l ⁻¹ agar, pH7,2.
LB	10 g.l ⁻¹ trypton, 10 g.l ⁻¹ yeast extract, 5 g.l ⁻¹ NaCl, pH7,0
YEP (An 1988)	10g.l ⁻¹ trypton, 5g.l ⁻¹ yeast extract, 10 g.l ⁻¹ NaCl, 18 g.l ⁻¹ agar, pH7,0
PIM2	1 g.l ⁻¹ NH ₄ Cl, 0,3 g.l ⁻¹ MgSO ₄ .7H ₂ O, 0,15 g.l ⁻¹ KCl, 0,01 g.l ⁻¹ CaCl ₂ , 0,0025 g.l ⁻¹ FeSO ₄ .7H ₂ O, 10 g.l ⁻¹ glucose, 14,64 g.l ⁻¹ MES, 0,28 g.l ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ , 0,27 g.l ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ , 20 mg.l ⁻¹ acetosyringon, pH5,6.
N6Cl	Muối và vitamin N6, 30 g.l ⁻¹ sucrose, 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D, 1 g.l ⁻¹ casein hydrolysate, 6 g.l ⁻¹ agar, pH 5,8.
MSCI	Muối và vitamin MS, 30 g.l ⁻¹ sucrose, 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D, 50 mg.l ⁻¹ tryptophane, 6 g.l ⁻¹ agar, pH 5,8.
N6Gas	Muối và vitamin N6, 20 g.l ⁻¹ sucrose, 2mg.l ⁻¹ 2,4-D, 1 g.l ⁻¹ casemino acid, 10 g.l ⁻¹ glucose, 3 g.l ⁻¹ gelrite, 20 mg.l ⁻¹ acetosyringon, pH 5,8.
MSGAs	Muối và vitamin MS, 20 g.l ⁻¹ sucrose, 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D, 1 g.l ⁻¹ casemino acid, 10 g.l ⁻¹ glucose, 3 g.l ⁻¹ gelrite, 20 mg.l ⁻¹ acetosyringon, pH 5,8.
N60.5	Muối và vitamin N6, 10 g.l ⁻¹ glucose, 60 g.l ⁻¹ maltose, 0,1 g.l ⁻¹ myo-inositol, 0,5 mg.l ⁻¹ BAP, 1 mg.l ⁻¹ NAA, 0,5 mg.l ⁻¹ 2,4-D, 6 g.l ⁻¹ agar, pH 5,8.

N6P	Muối và vitamin N6, 30 g.l ⁻¹ sucrose, 30 g.l ⁻¹ sorbitol, 1,0 g.l ⁻¹ myo-inositol, 0,5 mg.l ⁻¹ BAP, 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D, 3 g.l ⁻¹ gelrite, pH 5,8.
N6Se	Muối và vitamin N6, 30 g.l ⁻¹ sucrose, 1 g.l ⁻¹ casamino acid, 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D, 1 mg.l ⁻¹ Kin, 3 g.l ⁻¹ gelrite, pH 5,8.
MSSe	Muối và vitamin MS, 30 g.l ⁻¹ sucrose, 1 g.l ⁻¹ casamino acid, 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D, 1 mg.l ⁻¹ Kin, 3 g.l ⁻¹ gelrite, pH 5,8.
N6Re	Muối và vitamin N6, 20 g.l ⁻¹ sucrose, 2,5 mg.l ⁻¹ Kinetin, 0,5 mg.l ⁻¹ NAA, 6 g.l ⁻¹ agarose, pH5,8
MSRe	Muối và vitamin MS, 20 g.l ⁻¹ sucrose, 30 g.l ⁻¹ sorbitol, 2 mg.l ⁻¹ BAP, 0,5 mg.l ⁻¹ NAA, 6 g.l ⁻¹ agarose, pH5,8
MSR	Muối và vitamin MS, 30 g.l ⁻¹ sucrose, 50 mg.l ⁻¹ tryptophane, 6 g.l ⁻¹ agar, pH 5,8.

Sơ đồ 1. Quy trình chuyển gen vào cây lúa nhờ súng bắn gen

Bước	Nội dung thực hiện	Ảnh minh họa
1	Chuẩn bị mô sẹ	
2	Tách chiết ADN plasmid pWG1515-GUSA-hpt	
3	DNA được tẩm trên các hạt vi đạn bằng vàng (Au)	
4	Bắn gen bằng Biolistic PDS-1000 He	
5	Chọn lọc và tái sinh cây chuyển gen	
6	Trắc nghiệm sự biểu hiện của gen <i>gus</i>	
7	Các dòng cây chuyển gen được chuyển ra nhà kính	

QUY TRÌNH CHUYỂN GEN VÀO LÚA THÔNG QUA VI KHUẨN *AGROBACTERIUM* VÀ CHỌN DÒNG BẰNG MANOSE ĐẢM BẢO TẠO RA CÂY CHUYỂN GEN „SẠCH“, KHÔNG CHỨA GEN KHÁNG KHÁNG SINH

1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

1.1. Vật liệu

1.1.1. Thực vật

Phôi non của giống lúa IR64 và phôi già từ hạt gạo KDML105, Một Bụi được trích và nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo.

1.1.2. Vi khuẩn

Dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 mang vector pUBB-Man và pUBC-Man được dùng để chuyển nạp gen.

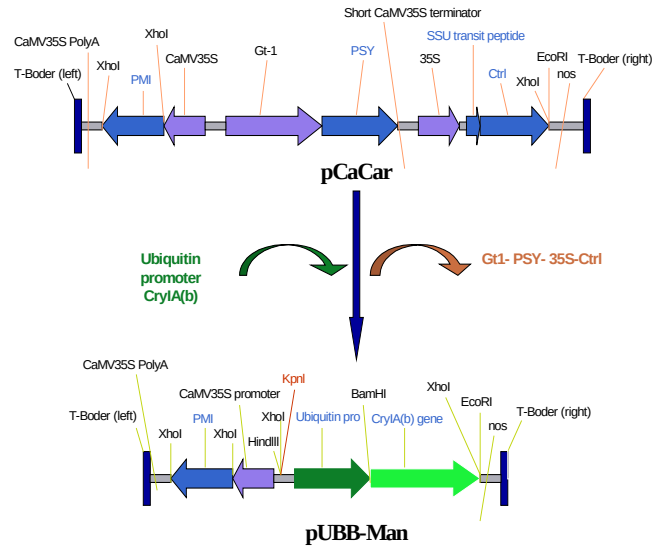
1.2. Phương pháp nghiên cứu

1.2.1. Thiết kế vector chứa gen kháng sâu *cry1Ab* và *cry1Ac* với gen chọn lọc là *pmi*

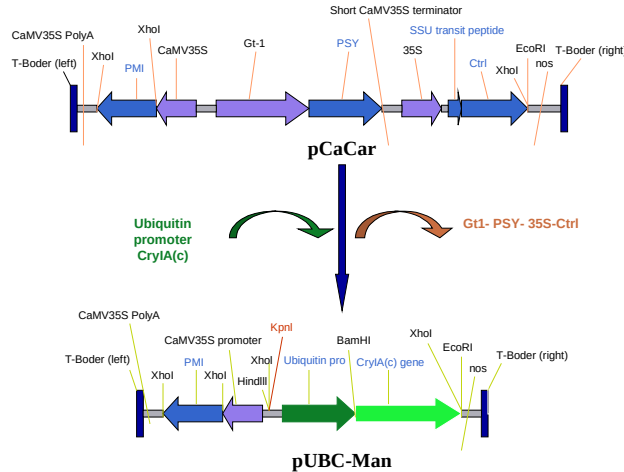
Để tạo ra các dòng lúa biến đổi gen kháng sâu bằng hệ thống chọn lọc mannose, chúng tôi đã thiết kế hai vector mới:

Vector *pUBB-Man* (Hình 1): được thiết kế bằng cách dùng vector pCaCar (Hoa và CS, 2003) nhưng gen *crtI* và *psy* trên vắctơ này được lấy ra bằng enzyme giới hạn *Hind* III + *Bam*HI và thay vào đó là ubiquitin promoter-*cry1Ab*. Để thực hiện mục tiêu này, ubiquitin-*cry1Ab* từ vector pUBB (do Dr. Altosaar cung cấp) được tách ra bằng enzyme giới hạn *Hind* III+ *Spe* I và đoạn DNA gần 2,2kb có mang ubiquitin promoter được chọn. Vector pUBB cũng được cắt với *Spe* I+ *Bam*H I để chọn đoạn DNA khoảng 1,9kb có mang gen *cry1Ab*. Hai đoạn DNA 2,2kb và 1,9kb được gắn đồng thời vào vị trí tương ứng *Hind* III và *Bam* HI trên vector pCaCar. Vắctơ pUBB-Man chuyển vào tế bào có khả năng tiếp nhận DNA ngoại nhập (competent cell) của *A. tumefaciens* chủng LBA 4404 (Hoekema và CS.1984).

Vector *pUBC-Man* (Hình 2): được thiết kế bằng cách dùng vector pCaCar (Hoa và CS, 2003) nhưng gen *crtI* và *psy* trên vector này được lấy ra bằng enzyme giới hạn *Hind* III + *Bam*HI và thay vào đó là ubiquitin-*cry1Ac* được cắt từ vector pUBC (do Dr. Altosaar cung cấp). Các công đoạn cắt, ghép được thực hiện như trên để tạo ra vector pUBC-Man và được chuyển vào *A. tumefaciens* chủng LBA 4404 (Hoekema và CS.1984).



Hình 1. Sơ đồ vector pUBB-Man



Hình 2. Sơ đồ vector pUBC-Man

1.2.2. Chuẩn bị vi khuẩn

Vi khuẩn *A. tumefaciens*, từ ống tồn trữ trong glycerol 50%, được nuôi cấy trên môi trường AB (Chilton và CS. 1974). Từng khuẩn lạc một của vi khuẩn được chuyển nuôi trong môi trường YEP (An và CS. 1988) có hygromycin 50mg/l và nuôi 28 - 30 giờ, ở 28°C. Dung dịch vi khuẩn này được li tâm trong 15 phút (2800 vòng/phút). Vi khuẩn thu được pha loãng trong 10ml dung dịch PIM2 chứa 100mM acetosyringone và ủ ở 29°C trong 14 -16 giờ với tốc độ lắc 200rpm (đạt mật số OD₆₀₀ : 1,6-1,9), bổ sung 200mM acetosyringon trước khi chủng lên mô sẹo và phôi non.

1.2.3. Nuôi cấy

Phôi non: Phôi non của hạt lúa được tách dưới kính soi nổi, đặt lên môi trường lây nhiễm *Agrobacterium tumefaciens* (cocultivation medium) MSGAs với bề mặt của thuận (scutellum) hướng lên trên.

Hạt gạo: Các hạt gạo sau khi bóc vỏ và hạt lúa từ bông lúa 2 tuần sau trổ được khử trùng bằng dung dịch Sodium hypochloride 2% trong 30 phút (2 lần), sau đó rửa lại nhiều

lần với nước cất vô trùng. Các hạt gạo sau khi khử trùng được nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo MSCl. Sau 3 tuần, các mô sẹo có khả năng sinh phôi được tách nhỏ khoảng 1 - 2mm và chuyển sang môi trường tiền lầy nhiễm MSCl và giữ ở 28°C khoảng 4 - 5 ngày rồi chuyển sang môi trường MSGAs.

Mỗi phôi non và mô sẹo trên môi trường MSGAs được chủng với 10 μ l dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens*, ủ 2 - 3 ngày trong tối ở 24 - 25°C. Sau 3 ngày, các phôi non và mô sẹo được chuyển sang môi trường chọn lọc.

Các công thức môi trường nuôi cấy như ở Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần các môi trường nuôi cấy

Môi trường	Thành phần
AB (Chilton và ctv. 1974)	3 g.l ⁻¹ K ₂ HPO ₄ , 1g.l ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ , 1g.l ⁻¹ NH ₄ Cl, 0,3g.l ⁻¹ MgSO ₄ .7H ₂ O, 0,15g.l ⁻¹ KCl, 0,01g.l ⁻¹ CaCl ₂ , 0,0025 g.l ⁻¹ FeSO ₄ .7H ₂ O, 5g.l ⁻¹ glucose, 15 g.l ⁻¹ agar, pH7,2.
LB	10 g.l ⁻¹ trypton, 10 g.l ⁻¹ yeast extract, 5 g.l ⁻¹ NaCl, pH7,0
YEP (An 1988)	10g.l ⁻¹ trypton, 5g.l ⁻¹ yeast extract, 10 g.l ⁻¹ NaCl, 18 g.l ⁻¹ agar, pH7,0
PIM2	1 g.l ⁻¹ NH ₄ Cl, 0,3 g.l ⁻¹ MgSO ₄ .7H ₂ O, 0,15 g.l ⁻¹ KCl, 0,01 g.l ⁻¹ CaCl ₂ , 0,0025 g.l ⁻¹ FeSO ₄ .7H ₂ O, 10 g.l ⁻¹ glucose, 14,64 g.l ⁻¹ MES, 0,28 g.l ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ , 0,27 g.l ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ , 20 mg.l ⁻¹ acetosyringon, pH5,6.
N6Cl	Muối và vitamin N6, 30 g.l ⁻¹ sucrose, 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D, 1 g.l ⁻¹ casein hydrolysate, 6 g.l ⁻¹ agar, pH 5,8.
MSCl	Muối và vitamin MS, 30 g.l ⁻¹ sucrose, 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D, 50 mg.l ⁻¹ tryptophane, 6 g.l ⁻¹ agar, pH 5,8.
N6Gas	Muối và vitamin N6, 20 g.l ⁻¹ sucrose, 2mg.l ⁻¹ 2,4-D, 1 g.l ⁻¹ casemino acid, 10 g.l ⁻¹ glucose, 3 g.l ⁻¹ gelrite, 20 mg.l ⁻¹ acetosyringon, pH 5,8.
MSGAs	Muối và vitamin MS, 20 g.l ⁻¹ sucrose, 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D, 1 g.l ⁻¹ casemino acid, 10 g.l ⁻¹ glucose, 3 g.l ⁻¹ gelrite, 20 mg.l ⁻¹ acetosyringon, pH 5,8.
N60.5	Muối và vitamin N6, 10 g.l ⁻¹ glucose, 60 g.l ⁻¹ maltose, 0,1 g.l ⁻¹ myo-inositol, 0,5 mg.l ⁻¹ BAP, 1 mg.l ⁻¹ NAA, 0,5 mg.l ⁻¹ 2,4-D, 6 g.l ⁻¹ agar, pH 5,8.
N6P	Muối và vitamin N6, 30 g.l ⁻¹ sucrose, 30 g.l ⁻¹ sorbitol, 1,0 g.l ⁻¹ myo-inositol, 0,5 mg.l ⁻¹ BAP, 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D, 3 g.l ⁻¹ gelrite, pH 5,8.
N6Se	Muối và vitamin N6, 30 g.l ⁻¹ sucrose, 1 g.l ⁻¹ casamino acid, 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D, 1 mg.l ⁻¹ Kin, 3 g.l ⁻¹ gelrite, pH 5,8.
MSSe	Muối và vitamin MS, 30 g.l ⁻¹ sucrose, 1 g.l ⁻¹ casamino acid, 2 mg.l ⁻¹ 2,4-D, 1 mg.l ⁻¹ Kin, 3 g.l ⁻¹ gelrite, pH 5,8.
N6Re	Muối và vitamin N6, 20 g.l ⁻¹ sucrose, 2,5 mg.l ⁻¹ Kinetin, 0,5 mg.l ⁻¹ NAA, 6 g.l ⁻¹ agarose, pH5,8
MSRe	Muối và vitamin MS, 20 g.l ⁻¹ sucrose, 30 g.l ⁻¹ sorbitol, 2 mg.l ⁻¹ BAP, 0.5 mg.l ⁻¹ NAA, 6 g.l ⁻¹ agarose, pH5,8
MSR	Muối và vitamin MS, 30 g.l ⁻¹ sucrose, 50 mg.l ⁻¹ tryptophane, 6 g.l ⁻¹ agar, pH 5,8.

1.2.4. Chọn lọc và tái sinh cây chuyển gen

Chọn lọc được tiến hành cách nhau mỗi hai tuần trên môi trường MS (Murashige và

Skoog, 1962) có chứa 30g/l sucrose và 25g/l mannose (D(+)-mannose 99+%, Heros Organics, Geel, Belgium) ở vòng chọn lọc thứ nhất, 15g/l sucrose và 25g/l mannose ở vòng chọn lọc thứ hai và 5g/l sucrose cộng với 35g/l mannose ở vòng chọn lọc thứ ba. Các dòng kháng này được giữ trong phòng nuôi cây có cường độ ánh sáng 2500 lux, độ ẩm 70%, nhiệt độ 28°C, 16 giờ chiếu sáng/ngày. Cây tái sinh được chuyển sang môi trường tạo rễ MSR. Các cây kháng mannose được kiểm tra lại bằng xét nghiệm chlorophenol red (CR) (Hoa và Bong, 2003) trước khi chuyển trồng ra đất. Cây con sau đó được chuyển trồng nhà kính cho các phân tích tiếp theo.

1.2.5. Trích DNA và phân tích Southern

DNA được trích từ lá theo phương pháp của McCouch và CS (1988). 10 micrograms DNA được cắt đoạn với *EcoRI* và *BamHI* (hai điểm cắt) để xác định sự hiện diện của gen *cry1Ab* đối với dòng lúa chuyển nạp bằng vector pUBB-Man và cắt đoạn với *KpnI* (1 điểm cắt) để xác định số copy. Tương tự DNA của các dòng lúa chuyển nạp bằng vector pUBC-Man được cắt đoạn với *EcoRI* và *BamHI* hoặc *XhoI* (2 điểm cắt) để xác định sự hiện diện của gen *cry1Ac* và cắt với *KpnI* (1 điểm cắt) để xác định số copy. DNA cắt đoạn được chạy điện di qua 0.8% agarose gel trước khi chuyển bằng mao dẫn và cố định trên màng nylon (Hybond-N+, Amersham). Gen *cry1Ab* và *cry1Ac* được đánh dấu bằng DIG (Boehringer, Rotkreuz, Switzerl) được dùng làm mẫu dò lai (probe). Lai, rửa, phát hiện và xác định gen được thực hiện theo phương pháp của Wiinn và CS (1996).

1.2.6. Phân tích sự phân ly của các dòng lúa biến đổi gen

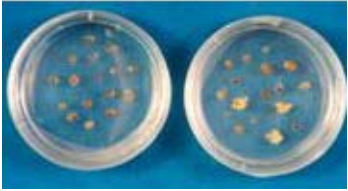
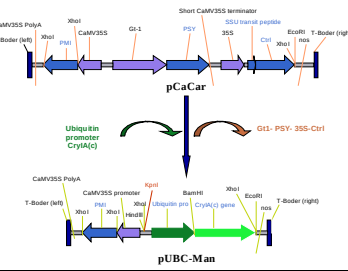
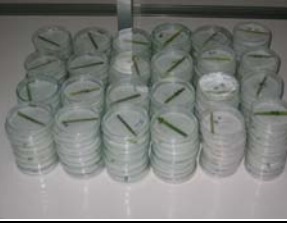
Hạt tự thụ T1 từ các cây lúa biến đổi gen T0 được nuôi cấy trên môi trường 1/2 MS + 20g/l mannose. Các cây kháng phát triển trên môi trường sau 2 tuần được chuyển trồng trên đất trong nhà lưới. Mẫu lá được lấy để phân tích Southern.

Bảng 2. Thành phần các dung dịch ly trích DNA

Tên nhóm	Thành phần	Nồng độ
G1	Tris-HCl pH8,0 EDTA	50mM 10mM
RNase	Rnase trong nước	20mg/ml
G2	NaOH SDS	200mM 1%
G3	Potassiumacetate, pH5,5 với acetic ac.	3M
G4	NaCl, EDTA và Tris-HCl pH8,0	Tùy công thức
GX	Acetat, guadinine-HCl, EDTA, ethanol	Tùy công thức
TE	Tris-HCl pH8,0 EDTA	10mM 0,1mM

1.2.7. Thử nghiệm sinh học tính kháng sâu đục thân hai chấm *Scirpophaga incertulas* của các dòng lúa biến đổi gen Bt

Sơ đồ 1. Quy trình chuyển gen vào lúa thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* và chọn dòng bằng manose

Bước	Nội dung thực hiện	Ảnh minh họa
1	Chuẩn bị mô sẹo lúa	
2	Thiết kế vector chuyển gen pUBB-Man và pUBC-Man có mang gen pmi (phục vụ cho chọn dòng bằng manose)	
3	Chuẩn bị vi khuẩn	
4	Đồng nuôi cấy mô sẹo lúa với vi khuẩn 3 ngày	
5	Chọn lọc và tái sinh cây chuyển gen	
6	Phân tích sự phân ly của các dòng cây biến đổi gen bằng cách cho hạt nảy mầm trên môi trường có kháng sinh chọn lọc	
7	Lai Southern	
8	Cây chuyển gen được trồng trong nhà kính	
9	Thử nghiệm sinh học tính kháng sâu đục thân hai chấm <i>Scirpophaga incertulas</i> của các dòng lúa biến đổi gen Bt	

QUY TRÌNH CHUYỂN GEN VÀO LÚA THÔNG QUA VI KHUẨN *AGROBACTERIUM* VÀ CHỌN DÒNG KINH ĐIỂN BẰNG KHÁNG SINH HYGROMYCIN

1. Vật liệu nghiên cứu

Thực vật: Mô sẹo 15- 25 ngày tuổi từ hạt của giống lúa C71 do (Viện Bảo vệ Thực vật cung cấp), được dùng làm vật liệu để chuyển gen.

Vi khuẩn: Chủng/vector LBA4404/pC1300, LBA4404/pC1301 do Viện Nghiên cứu Thuốc lá, Nhật Bản cung cấp mang gen *Xa21* kháng bệnh bạc lá và gen *CryIA(b)* kháng sâu đục thân do phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ Sinh học thiết kế. Vector EHA105/pC1300 do Trung tâm CAMBIA, Australia cung cấp do phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ Sinh học thiết kế mang gen *CryIA(c)* kháng sâu đục thân. Các vector này đều mang gen chọn lọc kháng hygromycin *hpt*.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Tạo cây chuyển gen

2.1.1. Tạo mô sẹo

Hạt lúa C71 bóc vỏ, khử trùng bằng cồn 70° trong 1 phút, nước giaven 60% trong 25 phút, rửa kỹ bằng nước cất tiệt trùng 3 lần. Hạt đã khử trùng được thấm khô trên giấy thấm tiệt trùng và cấy lên môi trường tạo mô sẹo, nuôi trong tối, ở nhiệt độ 25±2°C.

Bảng 1. Thành phần các môi trường nuôi cấy được sử dụng trong nghiên cứu chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* ở lúa

Môi trường	Thành phần
Tạo mô sẹo từ phôi hạt (C)	MS*; 30 g/l saccharose; 10g/l agar; 2,0 mg/l 2,4-D
Tiền tái sinh (PR)	MS*; 30 g/l saccharose; 10 g/l agar; 0.1 mg/l NAA; 0.2 mg/l BAP
Tái sinh cây lúa (R)	MS*; 30 g/l saccharose; 10 g/l agar; 0.5 mg/l NAA; 2,0 mg/l BAP
Nuôi cấy vi khuẩn (LB)	5 g/l yeast extract; 10 g/l trypton; 10 g/l NaCl; pH 7.0; 16 g/l agar
Tạo huyền phù vi khuẩn (MS, MSA)	MS*; 30 g/l saccharose MS*; 30 g/l saccharose; 100 µM acetosyringone
Môi trường cộng sinh (CA)	MS* ; 30 g/l saccharose; 10 g/l agar; 2,0 mg/l 2,4-D; 50 µM acetosyringone
Môi trường chọn lọc (CH)	MS* ; 30 g/l saccharose; 10 g/l agar; 2,0 mg/l 2,4-D; 50 mg/l hygromycin, 250 mg/l cefotaxime

MS*: Các muối khoáng theo Murashige & Skoog (1962) (Murashige T + et al., 1962)

2.1.2. Tạo dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens*, nhiễm mô sẹo và nuôi cộng sinh

Khuẩn được lấy từ glycerol nuôi trong môi trường LB lỏng (Bảng 1), lắc 220v/p ở 28°C trong 12 - 14 giờ.

Cấy quệt trên môi trường LB thạch có bổ sung kanamycin 50mg/l, nuôi ở 29°C trong 3 ngày. Lấy một khuẩn lạc vi khuẩn lắc 220v/p, 28°C qua đêm trong 100ml môi trường LB lỏng có bổ sung kanamycin 50mg/l. Lấy ra 4ml cho vào môi trường LB lỏng mới, nuôi lắc tiếp 4 giờ trong cùng điều kiện. Ly tâm thu sinh khối tế bào rồi hoà tan vào môi trường MS lỏng có bổ sung acetosyringone để tăng hiệu quả chuyển gen (Hood E.E. + et al., 1993; Ian Godwin + et al., 1990).

Mô sẹo lúa 15 - 18 ngày tuổi, được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn có mật độ $OD_{660} = 0.2 - 0.4$ ($1.0 OD_{660} = 3.10^9$ tế bào) trong 15 phút. Sau khi thấm khô dịch môi trường trên giấy lọc khử trùng, mô sẹo được nuôi cộng sinh với vi khuẩn trong 3 ngày trên môi trường cộng sinh, ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ C$, trong tối.

2.1.3. Chọn lọc mô sẹo, chuyển gen và tái sinh cây

Sau ba ngày, mô sẹo được ngâm và rửa vi khuẩn trong môi trường lỏng nuôi mô sẹo có bổ sung 300mg/l cefotaxime. Sau khi thấm khô trên giấy thấm, mô sẹo được cấy lên môi trường chọn lọc có chứa 50mg/l hygromycin và 250mg/l cefotaxime trong 3 - 4 tuần. Những mô sẹo sống sót được cấy chuyển lên môi trường tái sinh, đặt dưới giàn đèn 2000 lux, 8/16 h, ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ C$.

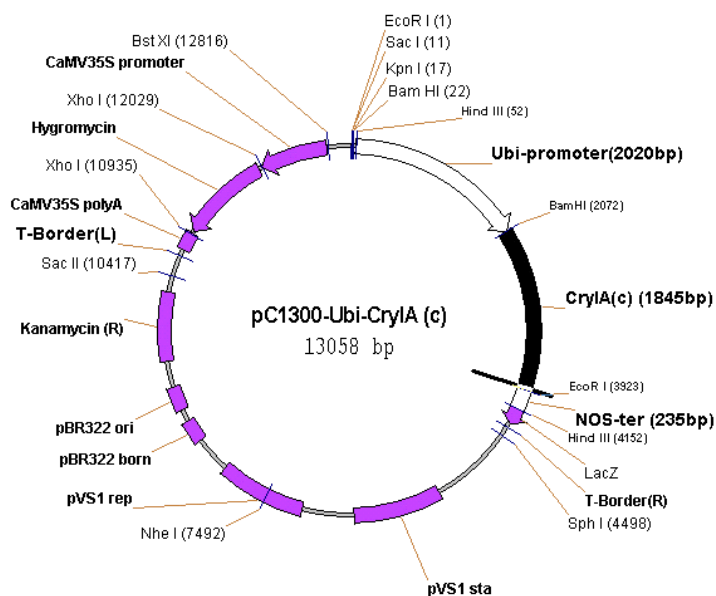
2.2. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển

ADN được tách nhanh theo phương pháp của Egnin và CS : 1, 2 g lá được nghiền kỹ trong nitor lỏng thành dạng bột mịn. Dịch nghiền được bổ sung 1ml Bufer A (50mM TrisHCl pH8; 300mM NaCl; 20mM EDTA; 2% PVP; 0,1% Sodium Ascorbate; 1,5% Sarkosine; 1g/100ml Bufer A) và giữ lạnh 2 phút rồi thêm 1ml Phenol: Chloroform, lắc kỹ sau đó để lạnh trong đá 5 phút rồi ly tâm ở nhiệt độ 4°C, tốc độ 10 000 vòng/phút trong 15 phút. Phần dịch nổi được chuyển sang ống khác có sẵn 1 ml isopropanol, lắc nhẹ và giữ lạnh ở -20°C trong 30 phút sau đó ly tâm 10 000 vòng/phút ở 4°C trong 5 phút, loại bỏ phần dịch nổi, rửa cồn và làm khô ADN bằng máy Speed - vac.

ADN được hoà tan trong TE và dùng làm mẫu để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng kỹ thuật PCR.

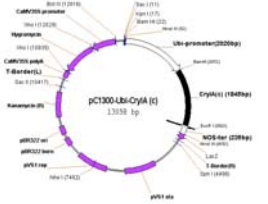
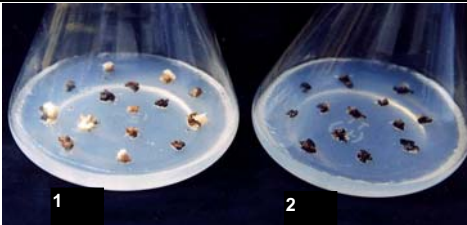
Kỹ thuật PCR được dùng để kiểm tra sự có mặt của gen *CryIA(c)* với 30 chu trình nhiệt: 95°C trong 3 phút, 95°C 1 phút, 55°C 1 phút, 72°C 1 phút, 72°C 10 phút lưu giữ 4°C; sử dụng cặp mồi có trình tự:

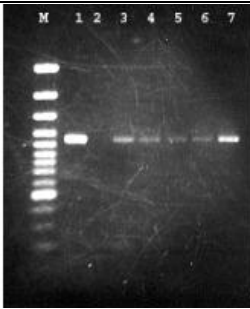
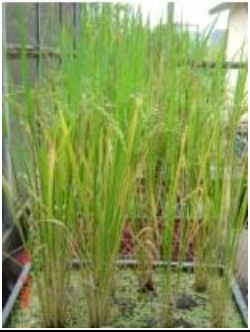
5' -AGGTGCTGGGTTCTGTTCTCG- 3' và 5' -CATTGTTGTTCTGTGGTGGGATTT- 3'.



Hình 1. Sơ đồ vector 1300/cryIA(c)

2.3. Thử nghiệm sinh học tính kháng sâu đục thân các dòng chuyển gen

Bước	Nội dung thực hiện	Ảnh minh họa
1	Chuẩn bị mô sẹo	
2	Chuẩn bị vi khuẩn	
3	Đồng nuôi cấy mô sẹo lúa với vi khuẩn 3 ngày	
4	Chọn lọc và tái sinh cây chuyển gen	

5	Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển (PCR)	
6	Cây chuyển gen được trồng ngoài nhà lưới	
7	Thử nghiệm sinh học tính kháng sâu đục thân các dòng chuyển gen	  

QUY TRÌNH THỬ NGHIỆM SINH HỌC TÍNH KHÁNG SÂU ĐỤC THÂN HAI CHẤM *SCIRPOPHAGA* *INCERTULAS* CỦA CÁC DÒNG LÚA BIẾN ĐỔI GEN *Bt*

1. Vật liệu

- Giống chuẩn kháng W1263, IR 62 và chuẩn nhiễm IR29.
- Các dòng lúa chuyển nạp gen Bt ở thế hệ T1 và T3
- Vợt bắt bướm hoặc ống nghiệm, bóng đèn điện,
- Lồng nhựa lớn để nuôi bướm lấy trứng. Ống nhựa nhỏ dùng từng chậu lúa
- Khay to lớn. Lồng nhựa nhỏ dùng trong thử nghiệm.
- Hộp nhựa (= 6cm) để ủ trứng nở, cọ nhỏ dùng bắt sâu non.
- Chậu sành (= 15cm) trồng các dòng giống lúa cần thử nghiệm.
- Cọ nhỏ dùng bắt sâu non
- Kim mũi giáo để tách chẻ thân lúa đếm sâu
- Phân bón cho lúa thử nghiệm .

2. Phương pháp trồng lúa và nuôi sâu

Các dòng lúa thử nghiệm được trồng trong chậu nhựa nhỏ đường kính 15cm, 3 chậu/dòng, cấy ở tuổi mạ 15 ngày và thử nghiệm ở giai đoạn 30 ngày sau khi cấy. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại trong 3 khay tôn kích thước 1.2 x 2.4 x 0.2m. Theo dõi không để các loài sâu, rầy gây hại và không sử dụng thuốc trừ sâu trong vòng 20 ngày trước khi thử nghiệm.

Bướm sâu đục thân được bắt vào buổi tối dưới bóng đèn điện bằng ống nghiệm. Bướm được nuôi cho đẻ trứng trong lồng nhựa có đặt sẵn lúa 30 ngày tuổi. Bướm đẻ trứng sau 1 - 2 ngày và nở sau 5 - 7 ngày. Lá có ổ trứng được thu cho vào hộp nhựa có lót giấy thấm ủ 2 ngày trước khi trứng nở. Hộp đựng ổ trứng được giữ ở nhiệt độ phòng bình thường.

3. Phương pháp thử nghiệm đĩa petri

- Cắt đoạn thân (7cm) cho vào đĩa petri có lót giấy lọc ẩm (3 lần lặp lại cho mỗi dòng).
- Thả 5 sâu mới nở vào mỗi đĩa, dán kín bằng parafilm để tránh sự thất thoát sâu.

- Cho đĩa petri vào phòng có nhiệt độ $\pm 25^{\circ}\text{C}$.
- Tách thân lúa để quan số sâu sống, chết hoặc thất thoát sau 4 ngày lây nhiễm.

4. Phương pháp thử nghiệm toàn cây

Làm sạch các chậu lúa bằng cách tác bỏ các lá già, héo, bẹ lá có vết bệnh hoặc vết rầy đục.

Duy trì đồng đều 10 chồi/chậu, 3 lần lặp lại cho mỗi dòng.

Mỗi chậu được chủng với 10 con sâu non mới nở, 1 con/chồi và chụp kín lại bằng ống nhựa nhỏ để tránh sự di chuyển của sâu.

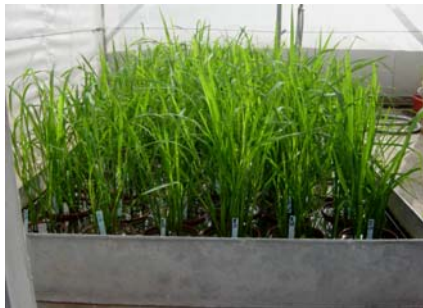
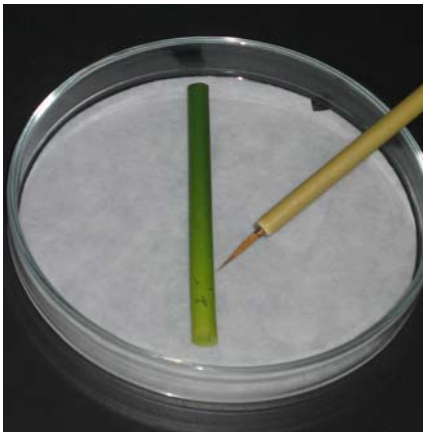
Chỉ tiêu theo dõi gồm:

- Đếm số chồi héo do sâu đục vào các ngày : 5,10,15 và 20 sau khi thả sâu. Tính tỷ lệ héo đột.
- Tính tỷ lệ sâu sống trên mỗi dòng vào ngày thứ 25 sau chủng sâu bằng cách: Cắt sát gốc cây lúa thử nghiệm để dễ tách đếm sâu sống hay nhộng trên mỗi dòng giống. Tìm sâu theo vết đục ở thân và sâu thường ở trong lòng thân gần đốt, thậm chí lóng đốt ở gốc rễ.
- Cân trọng lượng sâu ngay sau khi đếm sâu sống của từng dòng với 3 lần nhắc lại (3 chậu).
- Cấp hại của sâu đục thân trên các dòng thử nghiệm được đánh giá theo thang điểm (IRRI) dựa trên tỷ lệ chồi chết như sau:

Bảng 1. Thang điểm (IRRI) đánh giá cấp hại của sâu đục thân

Tỷ lệ chết đột	Cấp	Phản ứng
0%	0	Rất kháng (RK)
1 - 10%	1	Kháng (K)
11 - 20%	3	Hơi kháng (HK)
21 - 30%	5	Hơi nhiễm (HN)
31 - 60%	7	Nhiễm (N)
> 60%	9	Rất nhiễm (RN)

Sơ đồ 1A. Quy trình thử nghiệm sinh học tính kháng sâu đục thân hai chấm *Scipophaga incertulas* của các dòng biến đổi gen *Bt* trong đĩa petri

Bước	Nội dung thực hiện	Ảnh minh họa
1	Chuẩn bị lúa: lúa 30 ngày tuổi (Cấy mạ 15 ngày tuổi vào chậu ϕ 15cm, 3 chậu/dòng)	
2	Chuẩn bị sâu: bắt bướm vào ban đêm gần bóng đèn điện, cho bướm đẻ trứng trên lúa 30 ngày tuổi trong lồng nhựa, sâu nở sau 5 - 7 ngày. Thu lá có ổ trứng cho vào hộp nhựa có lót giấy thấm ẩm 2 ngày trước khi trứng nở.	
3	Nhiễm sâu: Cắt đoạn thân lúa dài 7cm cho vào đĩa petri có lót giấy thấm ẩm. Thả 5 con sâu mới nở, hàn kín bằng parafilm	
4	Nuôi sâu: ở nhiệt độ $\pm 25^{\circ}\text{C}$ trong 4 ngày	
5	Lấy kết quả: Đếm số sâu sống, chết hoặc thất thoát, giai đoạn phát triển của sâu	

Sơ đồ 1B. Quy trình thử nghiệm sinh học tính kháng sâu đục thân hai chấm *Scipophaga incertulas* của các dòng biến đổi gen *Bt* trên toàn thân cây lúa

Bước	Nội dung thực hiện	Ảnh minh họa
1	Chuẩn bị lúa: lúa 30 ngày tuổi (Cấy mạ 15 ngày tuổi vào chậu ϕ 15cm, 3 chậu/dòng)	
2	Chuẩn bị sâu: bắt bướm vào ban đêm gần bóng đèn điện, cho bướm đẻ trứng trên lúa 30 ngày tuổi trong lồng nhựa, sâu nở sau 5 - 7 ngày. Thu lá có ổ trứng cho vào hộp nhựa có lót giấy thấm ẩm 2 ngày trước khi trứng nở.	
3	Nhiễm sâu: duy trì 10 chồi trên mỗi chậu, 3 lần lặp lại/dòng. Thả 1 sâu mới nở/chồi, chụp kín cây bằng lồng nhựa để tránh sự di chuyển của sâu	
4	Nuôi sâu: theo dõi số chồi héo sau 5, 10, 15 và 20 ngày thả sâu	
5	Lấy kết quả: tách thân lúa đếm số sâu sống hay nhộng/dòng vào ngày thứ 21, cân trọng lượng sâu. Đánh giá cấp hại theo thang điểm chuẩn của IRRI	

QUY TRÌNH NHẬN BIẾT VÀ ĐÁNH GIÁ CÂY LÚA CHUYỂN GEN

1. Phương pháp nhận biết và đánh giá cây lúa chuyển gen kháng sâu đục thân

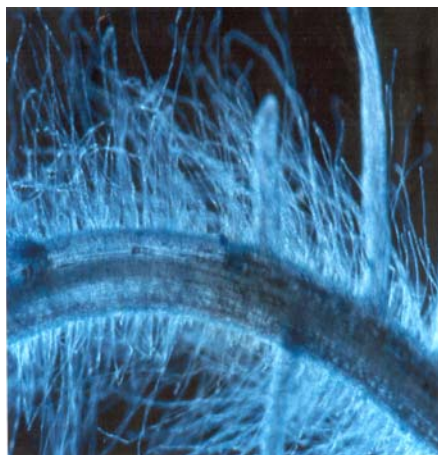
1.1. Phương pháp đánh giá cây chuyển gen ở phòng thí nghiệm

1.1.1. Phương pháp sinh lí thử tính kháng kháng sinh

Các dòng cây tái sinh sau khi chuyển gen được nuôi giữ lên môi trường chọn lọc có chứa kháng sinh chọn lọc trong vòng 4 – 8 tuần. Những cây sống sót trên môi trường chọn lọc được đưa ra ngoài nhà kính để theo dõi khả năng sinh trưởng và phát triển của cây và tạo nguồn nguyên liệu cho các phương pháp phân tích tiếp theo

1.1.2. Phương pháp hoá sinh để xác định gen *Gus*

Cơ chất sinh màu được sử dụng là *X-gluc* (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β ,D-gluconidase) là một chất không màu. Dùng các bộ phận cây lúa non (lá, thân, rễ) cắt nhỏ thành từng đoạn và ngâm trong dung dịch 50mM *X-gluc* rồi ủ ở 37°C trong 24h. Khi có mặt gen *gus* thì các tế bào biến nạp sẽ có màu xanh đặc trưng, còn các tế bào không có mang gen *gus* thì sẽ không chuyển màu. Do đó mô của các đoạn cắt ở cây chuyển gen đều chuyển sang màu xanh cô ban đặc trưng. Ngược lại mô của các đoạn cắt ở cây không chuyển gen sẽ không chuyển màu (Hình 1)



Hình 1. Sự thể hiện của gen *Gus* của rễ cây lúa chuyển nạp gen kháng sâu trong dung dịch X-gluc

1.1.3. Phương pháp sinh học phân tử

- Tách chiết ADN tổng số

Lúa non (5 gram) của cây chuyển gen và cây chưa chuyển gen được nghiền trong ni tơ lỏng. Bột lá được chuyển đến ống ependoff 50ml. Thêm vào ống 15ml đệm chiết và 1ml 20% SDS. Trộn đều rồi ủ ở nhiệt độ 65°C trong bể ổn nhiệt. Thêm 5ml 5M potassium acetate và trộn đều, rồi ủ khoảng 20 phút ở nhiệt độ 0°C. Ly tâm 30 phút với vận tốc 3500

v/p. Lấy phần dịch trong phía trên ống rồi thêm vào đó 10ml isopropanol. Trộn đều và tiếp tục ủ ở nhiệt độ -20°C trong 30 phút. Ly tâm với vận tốc 3500v/p trong 30 giây. Phần kết tủa sau khi khô được hoà tan trong 70ml nước cất. Thêm vào đó 1ml RNase và ủ ở nhiệt độ trong 10 giây. Ly tâm lần 3 trong 10 phút. Lấy phần dịch ở trên ống rồi thêm vào đó 75 μl 3M sodium acetate và 500 μl isopropanol. Ly tâm khoảng 1 phút, lấy phần kết tủa. Rửa kết tủa bằng ethanol 70%. Làm khô kết tủa rồi lại hoà tan trong nước cất. Kiểm tra nồng độ ADN bằng cách nhuộm với Ethidium bromine và điện di trên gel 0,7% agarose

- Tách chiết protein tổng số

Lá lúa của cây chuyển gen và cây không chuyển gen được nghiền trong nitơ lỏng. Chuyển bột lá vào ống ependorf sau đó thêm 300 - 400 μl dung dịch đệm chiết. Ly tâm hai lần (lần 1: 10 phút; lần 2: 5 phút). Sau mỗi một lần ly tâm lấy phần dịch nổi ở trên chuyển sang ống mới. Hàm lượng protein tổng số trong dịch chiết được xác định bằng cách sử dụng protein bicichoninic acid (BCA) với bovine serum albumin. Hỗn hợp hoà tan được đo ở bước sóng 550nm.

- Tách chiết ARN tổng số

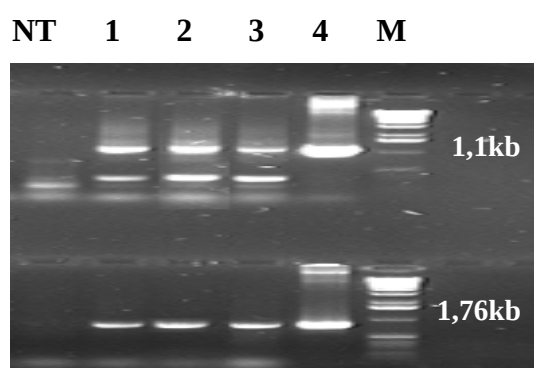
Nghiền 3 gram lá trong nitơ lỏng. Chuyển bột lá sang ống Corex 15ml. Thêm 5ml dịch chiết (200mM Tris, pH9,0+ 100nM Na_2EDTA + 0,5 SDS+ 14mM BME). Loại bỏ Protein bằng hỗn hợp phenol: chloroform: isomylalcohol (24:4:1). Ly tâm lần 1 (5 phút, 10000 v/p, 4°C). Dùng pipet hút một lượng bỏ một phần dung dịch trong ở phần trên và cho thêm 1ml dung dịch đệm chiết. Ly tâm (5 phút, 10000 v/p, 4°C) ly tâm lần 2, chuyển phần dịch trong ở trên sang ống khác rồi cho thêm 4ml dung dịch phenol: chloroform: isoamylalcohol (PCL). Ly tâm (5 phút, 10000 v/p, 4°C) lần 3 và chuyển phần dịch trong phía trên sang ống khác. Thêm 400 μl dung dịch LiCl (4M LiCl với nước 0.1% DEPC) và 8ml Ethanol 100%. Trộn đều rồi ủ 30 phút ở nhiệt độ -70°C . Ly tâm (5 phút, 10000 v/p, 4°C) lấy phần kết tủa. Hoà tan kết tủa với 2ml nước DEPC (gồm 0.1% diethylpyrocarbanate) và 2ml dung dịch LiCL. Ủ qua đêm ở 4°C . Ly tâm (5 phút, 10000 v/p, 4°C). Rửa sạch kết tủa bằng 70% Ethanol và làm khô. Hoà tan kết tủa với 100 μl nước DEPC và bảo quản ở -70°C .

Kết quả

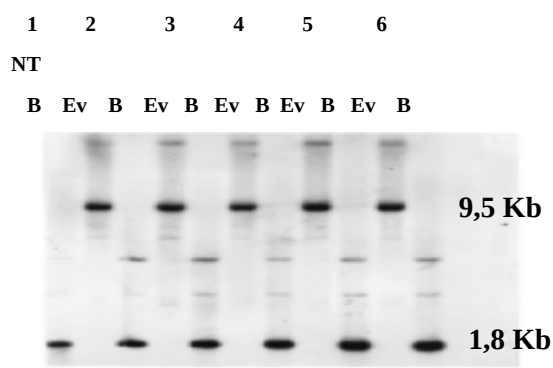
- Kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction)

10ng ADN mẫu, 5ng cho một primer, 0.16mM dNTPs, 1 PCR Bufer (10mM Tris, pH=8.4, 50 mM KCl và 15mM MgCl_2), 1 đơn vị *Taq* polymerase. Chương trình PCR được thiết kế với bước 1 ở 94°C trong 5 phút; bước 2: 94°C 30 giây; bước 3: 55°C 30 giây; bước 4: 72°C trong 1 phút. Chu kỳ lặp lại 35 vòng.

Kết quả phân tích bằng PCR sẽ cho ta biết sự có mặt của gen chọn lọc kháng hygromicine(*hph*) ở vị trí 0,76kb, gen thông báo *gus* ở vị trí 1,1kb.



Hình 2. kết quả PCR: (1-4) sự thể hiện của gen Gus (1,1kb) và gen *hph* (0,76kb) trong cây chuyển gen; NT: cây chưa chuyển gen M: Thang chuẩn



Hình 3. Kết quả lai Southern. Biểu hiện của *CryIA/c* qua lai 1-6: cây chuyển nạp gen; NT: Đối chứng B: BamHI; Ev: EcoRV

- Phép lai Southern (Southern blotting)

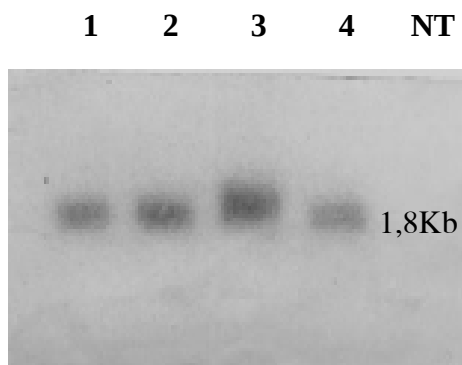
10 μ l ADN, ủ qua đêm với Enzyme cắt hạn chế *Bam*HI và *Eco*RV ở 37°C. Sau khi điện di trên gen agarose 0,8%, ADN được chuyển lên màng Hybond-N⁺ (Amersham) và được lai với mẫu dò (đoạn ADN 660 bp có chứa phân tử phóng xạ [³²P] dCTP) với thời gian là 12 giờ ở nhiệt độ 65°C trong 5x Sanline Sodium phosphate EDTA (SSPE), 5x dung dịch Denhardt và 0,5 SDS. Màng sau khi lai được rửa 2 lần với 2xSSPE, 0,1% SDS ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Màng lai được bao bằng tấm nilon mỏng và đặt trong hộp tối với phim Kodak X-Omat phim ở nhiệt độ -70°C trong 48 giờ. Kết quả lai sẽ hiện ở trên phim sau khi rửa. Bằng phản ứng này có thể nhận biết được sự có mặt của gen chuyển *cry*IAc thông qua sự thể hiện của các đoạn DNA tại các vị trí cắt đặc trưng bởi enzyme giới hạn 1.8kb (với *Bam*HI) và tại 9.4kb (với *Eco*RV), trong khi đó ở băng đối chứng hoàn toàn không có sự xuất hiện của các đoạn ADN đặc trưng này (Hình 4).

- Phép lai Northern (Northern blotting)

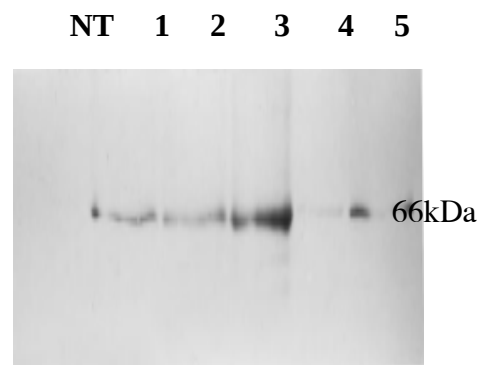
ARN sau khi điện di trên gel chứa fomaldehyd được chuyển màng Hybond-N⁺ (Amersham) và được lai với mẫu dò nhuộm nhẵn nhiên có chứa phân tử phóng xạ [³²P] dCTP) với thời gian là 12 giờ ở nhiệt độ 56°C trong 50% formamid+ 5x Sanline Sodium phosphate EDTA (SSPE)+ 5x dung dịch Denhardt + 0,5 SDS. Màng sau khi lai được rửa với 1xSSC ở nhiệt độ phòng trong 20 phút, sau đó rửa với 0,2xSSC ở nhiệt độ 68°C. Màng lai được bao bằng tấm nilon mỏng và đặt trong hộp tối chứa phim X-quang để làm bản phóng xạ tự chụp. Kết quả lai sẽ hiện ở trên phim sau khi rửa.

Sản phẩm phiên mã mARN của gen *Cry*IA/c đều thể hiện ở mức cao với kích thước phân tử tương ứng với là 1.8kb.

Các cây được chuyển nạp với *cry*IA/c thể hiện của protein đặc trưng với trọng lượng phân tử 66kDa



Hình 4. Biểu hiện của *CryIA/c* qua kết quả Northern blot 1-4: Cây chuyển nạp gen, NT: Đối chứng chưa chuyển nạp



Hình 5. sản phẩm protein của *CryIA/c* qua kết quả Western blot 1-5: cây chuyển nạp gen; NT: đối chứng chưa chuyển nạp

- Phép lai Western (Western blotting)

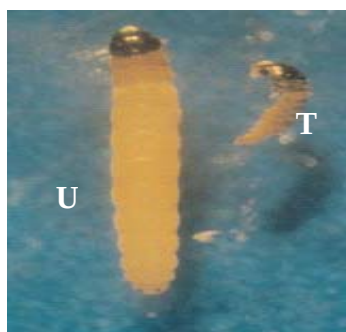
Protein tổng số (50 μ g) sau khi điện di trên gel 10%polyacrylamide có chứa sodium doecylsufate (SDS-PAGE) được chuyển lên màng nitrocellulose (Hybond C, Amersham). Màng lai được cố định trong 3 giờ với 30ml dung dịch tris Bufferes có chứa 3% Bovine Serum Albumin (BSA), Tween 20% và 5% sữa. Rửa màng lai với TBST)Tris buffered salinetrong 5 phút, sau đó ngâm màng lai vào kháng thể của thỏ – *Bt* qua đêm ở nhiệt độ phòng. Rửa màng lai với TBST trong 5 phút và 2 lần với TBS. Màng lai được rửa trong dung dịch gồm: 10ml TBS với 2ml methanol, 0.6mg Horse radish peroxidase và 6 μ l 30% H₂O₂.

Các cây được chuyển nạp với *cryIA/c* thể hiện của protein đặc trưng với trọng lượng phân tử 66kDa.

1.2. Thử cây chuyển gen trong nhà kính

1.2.1. Thử tính kháng sâu

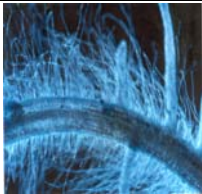
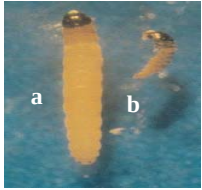
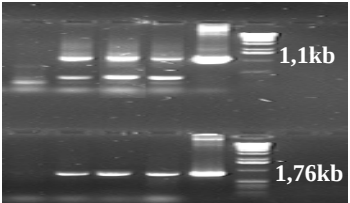
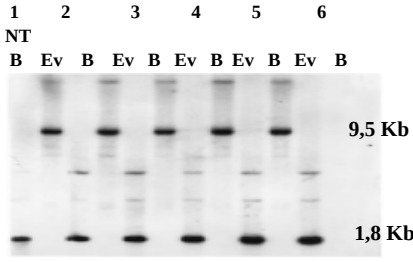
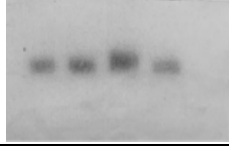
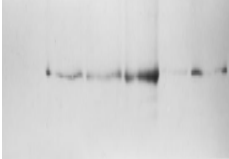
Đặt 5 con sâu non vào trong mỗi đĩa có chứa các mẫu thân, lá của cây lúa đã được chuyển gen hoặc có chứa thức ăn (16g agar, 53g yeast, 1.7g sorbic acid, 3.3g methyl parabenzoate, 5.3g ascorbicacid, 0.25g streptomycinva 1.35 ml formaldehyde 10% trong 800ml nước cất) có bổ sung thêm một lượng protein (hàm lượng độc 0,011 - 0,02%) được chiết xuất từ thân lá cây lúa được chuyển gen.



Hình 6. Kết quả phép thử sinh học đối với cây chuyển gen *CryIA(c)*. T. Sâu non ăn lá cây chuyển nạp gen; U. Sâu ăn lá cây chưa chuyển nạp gen.

Sau 5 ngày ăn thân lá hoặc thức ăn có chứa protein độc từ cây lúa đã được chuyển gen thì sâu non sẽ chết. Sâu non biểu hiện màu nâu trước khi chết. Số sâu non còn sống cũng có trọng lượng cơ thể giảm khoảng 70% không thể kết nhộng. Ngược lại sâu non ăn thân lá cây chưa chuyển gen vẫn sống và phát triển bình thường (Hình 6).

Sơ đồ 1. Phương pháp nhận biết cây lúa chuyển gen kháng sâu đục thân

Bước	Nội dung thực hiện		Ảnh minh họa
	Cây lúa ban đầu		
1	Thử tính kháng kháng sinh	<i>Chuyển cây tái sinh sang môi trường có kháng sinh chọn lọc</i>	
2	Thử hóa sinh	<i>Bộ phận của cây lúa chuyển màu xanh trong dung dịch X-gluc</i>	
3	Chuyển cây ra bầu đất	<i>Theo dõi sự sinh trưởng và phát triển bình thường của cây</i>	
4	Thử tính kháng kháng sâu	<i>Cho sâu non ăn thân lá cây lúa trực tiếp (a) Sâu non ăn thức ăn có bổ sung protein chiết từ lá (b)</i>	
5	Kỹ thuật phân tích sinh học phân tử	<i>PCR nhận biết ADN (gus, hph, cry)</i>	
		<i>Lai Southern nhận biết ADN (gus, hph, cry)</i>	
		<i>Lai Northern</i>	
		<i>Lai Western nhận biết protein chuyển</i>	

2. Phương pháp nhận biết và đánh giá cây lúa chuyển gen tổng hợp beta-caroten

2.1. Phương pháp đánh giá cây chuyển gen ở phòng thí nghiệm

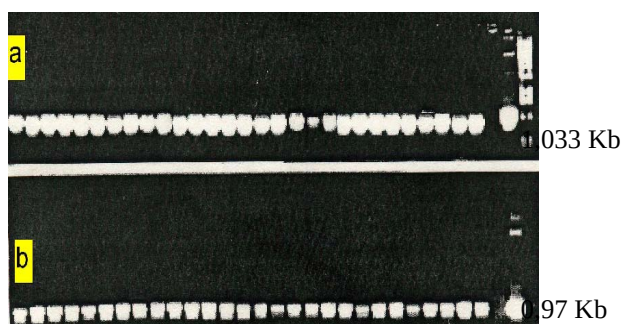
2.1.1. Phương pháp sinh lí thử tính kháng kháng sinh

Các dòng cây tái sinh sau khi chuyển gen được nuôi giữ lên môi trường chọn lọc có chứa kháng sinh chọn lọc trong vòng 4 – 8 tuần. Những cây sống sót trên môi trường chọn lọc được đưa ra ngoài nhà kính để theo dõi khả năng sinh trưởng và phát triển của cây và tạo nguồn nguyên liệu cho các phương pháp phân tích tiếp theo

2.1.2. Phương pháp sinh học phân tử

Kết quả PCR: có thể nhận biết các gen *psy* (1,033kb), *lcy* ở vị trí 0,97kb

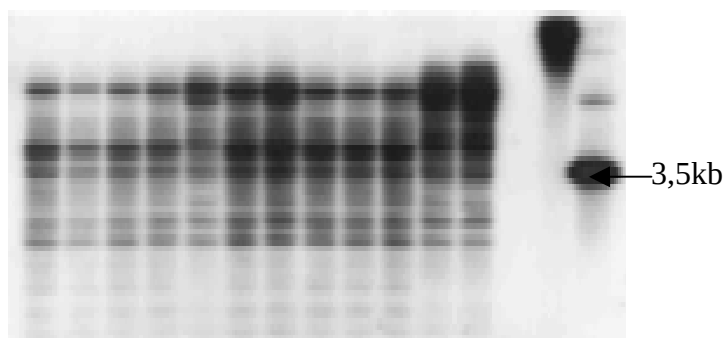
NT PC



Hình 7. Kết quả PCR với sự thể hiện của gen *Psy* (a) tại 1,033 kb và *Lcy* (b) tại 0.97 kb trong quần thể cây chuyển gen

Kết quả lai Shouthern nhận biết gen *crt1* trong các cây chuyển gen ở vị trí 3,5kb

NT PC



Hình 8. Kết quả lai Southern với sự thể hiện của *crt1*

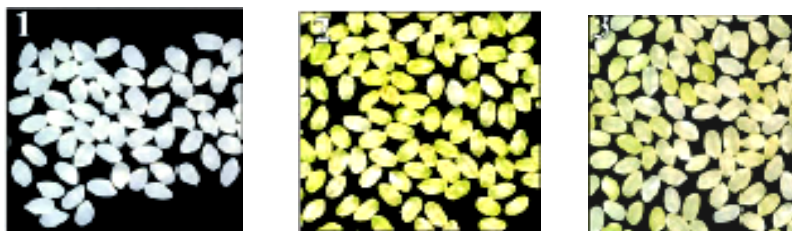
NT: cây chưa chuyển nạp gen (Đ/c). 1-12 : ADN của cây chuyển gen. PC: vạch chuẩn

2.2. Phương pháp đánh giá cây chuyển gen ở quy mô nhà lưới

2.2.1. Nhận biết bằng mắt thường

Quá trình tổng hợp beta - caroten trong hạt lúa được qui định bởi 3 gen là *psy* (phytoene synthase), *crt1* (phytoene desaturase), và *lcy* (lycopene cyclase).

Nội nhũ của cây lúa thường có màu trắng trong (1), trong khi hạt của cây lúa đã được chuyển gen có màu vàng ngà. (Hình 9, 10).



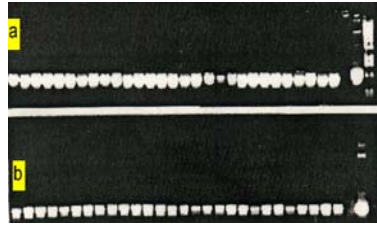
Hình 9. Phân biệt nội nhũ hạt lúa của cây chuyển gen và cây lúa bình thường

1: Hạt lúa bình thường; 2,3: Hạt lúa chuyển gen tổng hợp beta-caroten



Hình 10. Giống lúa Nàng Hồng chợ đào (Việt nam) được chuyển gen tổng hợp beta- caroten

Sơ đồ 2. Quy trình nhận biết cây lúa chuyển gen beta-ceroten

Bước	Nội dung thực hiện		Ảnh minh họa
	Cây lúa ban đầu		
1	Thử tính kháng sinh	Đặt cây trên môi trường có chứa Hygromicine	
2	Chuyển cây ra bầu đất	Theo dõi sự sinh trưởng và phát triển bình thường của cây	
3	Nhận biết bằng mắt thường	Nội nhũ hạt lúa có màu vàng đặc trưng của Vitamin A	
4	Kỹ thuật phân tích phân tử	PCR nhận biết ADN (<i>gus</i> , <i>hph</i> , <i>psy</i> , <i>lcy</i> , <i>ctrl</i>)	
		Lai Southern nhận biết ADN (<i>gus</i> , <i>hph</i> , <i>psy</i> , <i>lcy</i> , <i>ctrl</i>)	