

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

000



ĐỖ THỊ NGỌC HÂN

**CHUYỂN GEN *gfp* (GREEN FLUORESCENT PROTEIN)
VÀO TẾ BÀO VI KHUẨN *Pseudomonas fluorescens*
BẰNG PHƯƠNG PHÁP TIẾP HỢP BA THÀNH PHẦN**

Luận văn kỹ sư

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Thành phố Hồ Chí Minh

Tháng 09 / 2006

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
000

CHUYỂN GEN *gfp* (GREEN FLUORESCENT PROTEIN)
VÀO TẾ BÀO VI KHUẨN *Pseudomonas fluorescens*
BẰNG PHƯƠNG PHÁP TIẾP HỢP BA THÀNH PHẦN

Luận văn kỹ sư
Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Giáo viên hướng dẫn:
LÊ ĐÌNH ĐÔN

Sinh viên thực hiện:
ĐỖ THỊ NGỌC HÂN
Khóa: 2002 - 2006

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 09 / 2006

**MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING
NONG LAM UNIVERSITY, HCMC
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY**

**TRANSFER *gfp* (GREEN FLUORESCENT PROEIN) GENE
INTO *Pseudomonas fluorescens* BACTERIAL CELL
BY TRIPARENTAL MATING MENTHOD**

Graduation thesis

Major: Biotechnology

Professor

LE DINH DON

Student

DO THI NGOC HAN

Term: 2002 - 2006

Ho Chi Minh City

09 / 2006

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn:

Gia đình là chỗ dựa về vật chất và tinh thần cho tôi trong suốt thời gian học tập và làm khóa luận.

Ban giám hiệu Trường Đại Học Nông Lâm Thành Phố Hồ Chí Minh.

Ban chủ nhiệm cùng thầy cô Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học đã truyền đạt mọi kiến thức, giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong thời gian học tập ở trường.

Thầy Lê Đình Đôn đã tận tình hướng dẫn tôi trong suốt quá trình thực tập và hoàn tất khóa luận tốt nghiệp này.

Thầy Zhang Liqun ở Đại Học Nông Nghiệp Trung Quốc đã cung cấp mẫu vi khuẩn *E.coli* DH5 α (λ -pir) chứa plasmid pUT-gfp, vi khuẩn *E.coli* DH5 α (λ -pir) chứa plasmid pRK600 và các tài liệu phục vụ cho thí nghiệm.

Ban giám đốc cùng các anh chị trực thuộc Trung Tâm Phân Tích – Thí Nghiệm Hóa Sinh Trường Đại Học Nông Lâm Thành Phố Hồ Chí Minh đã hướng dẫn và chia sẻ cùng tôi những khó khăn trong thời gian thực hiện khóa luận.

Anh Nguyễn Văn Lãm đã nhiệt tình giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn này.

Tất cả các anh chị thuộc Bộ Môn Bảo Vệ Thực Vật Khoa Nông Học đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Các bạn bè lớp Công Nghệ Sinh Học 28 đã giúp đỡ và động viên tôi trong suốt những năm học cũng như thời gian thực hiện khóa luận.

Thành phố Hồ Chí Minh, tháng 8 năm 2006

Sinh viên

Đỗ Thị Ngọc Hân

TÓM TẮT

Đỗ Thị Ngọc Hân, Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, “**CHUYỂN GEN *gfp* (GREEN FLUORESCENT PROTEIN) VÀO TẾ BÀO VI KHUẨN *Pseudomonas fluorescens*” BẰNG PHƯƠNG PHÁP TIẾP HỢP BA THÀNH PHẦN**. Đề tài được thực hiện ở Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh, thời gian từ tháng 02/2006 đến tháng 08/2006, dưới sự hướng dẫn của Thầy Lê Đình Đôn.

Nội dung nghiên cứu

Chọn lọc vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* trên môi trường chọn lọc.

Xây dựng quy trình tiếp hợp plasmid pUT- *gfp* vào vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* bằng phương pháp tiếp hợp ba thành phần (triparental mating).

Tách chiết DNA plasmid pUT-*gfp* để làm mẫu dò.

Tiến hành phương pháp Dot Blot để kiểm tra gen đã chuyển.

Xem biểu hiện gen phát sáng trên kính hiển vi có phát huỳnh quang.

Kết quả đạt được

Thiết lập được quy trình tiếp hợp Plasmid pUT- *gfp* vào vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* bằng phương pháp tiếp hợp ba thành phần (triparental mating).

Hoàn thiện quy trình kiểm tra gen đã chuyển bằng phương pháp Dot Blot và xem lại trên kính hiển vi phát huỳnh quang.

MỤC LỤC

Nội dung	Trang
LỜI CẢM ƠN.....	iii
TÓM TẮT	iv
MỤC LỤC	v
DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT	ix
DANH SÁCH CÁC HÌNH.....	x
DANH SÁCH BẢNG.....	xi
Phần 1. MỞ ĐẦU	1
1.1 Đặt vấn đề.....	1
1.2 Mục tiêu đề tài	1
1.3 Đối tượng nghiên cứu	1
1.4 Nội dung thực hiện	2
Phần 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
2.1 Sự di chuyển gen và tái tổ hợp gen ở vi khuẩn	3
2.1.1 Hiện tượng biến nạp (Transformation)	3
2.1.1.1 Định nghĩa	3
2.1.1.2 Cơ chế hiện tượng biến nạp.....	3
2.1.2 Hiện tượng tải nạp (Transduction).....	4
2.1.2.1 Định nghĩa	4
2.1.2.2 Cơ chế hiện tượng tải nạp.....	4
2.1.3 Hiện tượng tiếp hợp ở vi khuẩn (Conjugation).....	5
2.1.3.1 Định nghĩa	5
2.1.3.2 Thí nghiệm Lederberg và Tatum (1946)	5
2.1.3.3 Yếu tố giới tính F.....	7
2.1.3.4 Các loại vi khuẩn đực mang yếu tố F	8
2.1.3.5 Cơ chế quá trình tiếp hợp	11
2.1.3.6 Lập bản đồ bằng tiếp hợp	11
2.2 Vách tế bào của vi khuẩn	12
2.2.1 Cấu tạo vách tế bào Gram (+).....	13

2.2.2 Cấu tạo vách tế bào Gram (-).....	13
2.3 Vi khuẩn – tác nhân phòng trừ sinh học	14
2.4 Vi khuẩn <i>Pseudomonas fluorescens</i>	15
2.4.1 Phân loại vi khuẩn <i>Pseudomonas fluorescens</i>	15
2.4.2 Các nghiên cứu về vi khuẩn <i>Pseudomonas fluorescens</i>	15
2.5 Plasmid	18
2.6 Transposon	24
2.6.1 Transposon vi khuẩn	25
2.6.2 Phân loại transposon	25
2.6.3 Cơ chế chuyển vị	26
2.6.4 Ứng dụng của transposon	27
2.7 Protein GFP	28
2.7.1 Cấu trúc và đặc điểm	28
2.7.2 Tình hình nghiên cứu về gen <i>gfp</i>	29
2.8 Phương pháp đánh dấu	31
2.8.1 Phương pháp nick – translation	32
2.8.2 Phương pháp random priming	32
2.8.3 Phương pháp đánh dấu End labelling	32
2.8.4 Phương pháp photobiotin	33
2.9 Lai phân tử.....	33
2.9.1 Khái niệm về lai phân tử	33
2.9.2 Các yếu tố ảnh hưởng đến sự lai phân tử	33
2.9.3 Các kiểu lai phân tử	34

2.9.3.1 Lai trong pha lỏng	34
2.9.3.2 Lai trên pha rắn	34
Phần 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	36
3.1 Thời gian và địa điểm thực hiện khóa luận	36
3.2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu	36
3.2.1 Vật liệu thí nghiệm	36
3.2.1.1 Vi khuẩn <i>E.coli</i> DH5 α (λ -pir) chứa plasmid pUT-gfp	36
3.2.1.2 Vi khuẩn <i>E.coli</i> DH5 α (λ -pir) chứa plasmid pRK600.....	37
3.2.1.3 Vi khuẩn <i>Pseudomonas fluorescens</i>	37
3.2.2 Các thiết bị, dụng cụ thường sử dụng	39
3.3 Phương pháp nghiên cứu	39
3.3.1 Phương pháp triparental mating tiếp hợp đoạn gen <i>gfp</i> vào vi khuẩn <i>Pseudomonas fluorescens</i>	39
3.3.2 Ly trích genomic DNA từ các dòng vi khuẩn <i>Pseudomonas fluorescens</i> đã tiếp hợp.....	40
3.3.3 Phương pháp Dot Blot	41
3.3.3.1 Chuyển DNA lên màng	41
3.3.3.2 Phương pháp ly trích DNA plasmid sử dụng SDS_kiểm.....	42
3.3.3.3 Thực hiện đánh dấu đoạn DNA plasmid pUT-gfp	43
3.3.3.4 Thực hiện phản ứng lai	44
3.3.3.5 Phát hiện kết quả trên phim X - ray	45
3.3.4 Quan sát vi khuẩn trên kính hiển vi.....	46
Phần 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	47
4.1 Kết quả.....	47
4.1.1 Kết quả tiếp hợp đoạn gen <i>gfp</i> vào vi khuẩn <i>Pseudomonas fluorescens</i>	47
4.1.1.1 Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường LB	47
4.1.1.2 Nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường KB	47

4.1.1.3 Nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường M9	48
4.1.1.4 Kết quả làm đối chứng.....	49
4.1.2 Kết quả ly trích genomic DNA từ các dòng vi khuẩn <i>Pseudomonas fluorescens</i> đã tiếp hợp.....	50
4.1.3 Kết quả thực hiện phản ứng lai	51
4.1.4 Kết quả xem trên kính hiển vi phát huỳnh quang Olympus BX51	53
4.2 Thảo luận	55
Phần 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	61
5.1 Kết luận	61
5.2 Đề nghị	61
TÀI LIỆU THAM KHẢO	62
PHỤ LỤC	65

DANH SÁCH CÁC TỪ VIẾT TẮT

aa	acid amin
bp	base pair
CTAB	Cethyltrimethylammonium bromide
DNA	Deoxyribonucleic acid
2,4 – DAPG:	2,4 – Diacetylphloroglucinol
DIG	Digoxigenin
ETDA	Ethylenediamine tetraacetic acid
F	Fertility
GFP	Green Fluorescent Protein
Hfr	High frequency recombination
HRP	Horseradish peroxydase
IS	Insert sequence
kb	Kilo base
kDa	Kilo dalton
MCS	Multi cloning site
Nm	Nano metre
OD	Optical density
PCR	Polymerase Chain Reaction
RBS	Ribosome binding site
RNA	Ribonucleic acid
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSC	Saline sodium citrate
TAE	Tris Acetate EDTA
Tn	Tranposon
UV	Ultraviolet (light)
w/v	Weight for volume

DANH SÁCH CÁC HÌNH

Hình 2.1 Quá trình biến nạp.	4
Hình 2.2 Quá trình tải nạp	5
Hình 2.3 Thí nghiệm Lederberg và Tatum	6
Hình 2.4 Quá trình tiếp hợp giữa vi khuẩn F ⁺ và vi khuẩn F ⁻	8
Hình 2.5 Quá trình tiếp hợp giữa vi khuẩn Hfr và vi khuẩn F ⁻	9
Hình 2.6 Quá trình tiếp hợp giữa vi khuẩn F' và vi khuẩn F ⁻	10
Hình 2.7 Vách tế bào vi khuẩn Gram (+)	13
Hình 2.8 Vách tế bào vi khuẩn Gram (-)	14
Hình 2.9 Tính kháng nấm của vi khuẩn <i>Pseudomonas fluorescens</i>	18
Hình 2.10 Cấu trúc Transposon vi khuẩn	25
Hình 2.11 Cấu trúc Protein GFP	28
Hình 3.1 Cấu trúc plasmid pUT-gfp	37
Hình 3.2 Vi khuẩn <i>Pseudomonas fluorescens</i> nuôi trên môi trường KB sau 24 giờ	37
Hình 3.3 Màng Hybon-N sau khi chuyển DNA lên màng	42
Hình 4.1 Kết quả cấy vi khuẩn trên môi trường KB sau 24 giờ	47
Hình 4.2 Kết quả cấy trên môi trường M9	48
Hình 4.3 Kết quả đối chứng trên môi trường M9	49
Hình 4.4 Kết quả ly trích DNA tổng số đã pha loãng từ các dòng vi khuẩn <i>Pseudomonas fluorescens</i> đã tiếp hợp	50
Hình 4.5 Kết quả lai	51
Hình 4.6 Vi khuẩn <i>Pseudomonas</i> chụp qua màn hình ti vi	53
Hình 4.7 Vi khuẩn phát sáng dưới tia UV được chụp qua thị kính	56

DANH SÁCH CÁC BẢNG VÀ SƠ ĐỒ

Bảng 3.1 Đặc tính và nguồn gốc một số dòng vi khuẩn và plasmid liên quan trong thí nghiệm	38
Sơ đồ 4.1 Cơ chế tiếp hợp ba thành phần (triparental maing).....	58

Phần 1. MỞ ĐẦU

1.1 Đặt vấn đề

Hiện nay, các tác nhân gây bệnh đang trải rộng trên nhiều loại cây trồng, trong khi đó các biện pháp phòng trừ hóa học ngày càng gây ô nhiễm môi trường. Do đó việc sử dụng biện pháp sinh học nhằm bảo vệ thực vật là yêu cầu ngày càng cấp thiết.

Trong bản thân đất và trên cây trồng, vi khuẩn, virus, nấm chúng đã tồn tại sẵn và có tính đối kháng, có khả năng ức chế lẫn nhau. Tuy nhiên, thường do điều kiện sống, các tác nhân gây bệnh phát triển mạnh mẽ, số lượng cá thể tăng nhanh, khả năng chống chịu tốt, lấn lướt các tác nhân đối kháng làm cho tính đối kháng mất cân bằng và kết quả là bệnh bộc phát trên cây trồng. Để khắc phục điều này, việc chọn lọc, nhân nhanh số lượng, tăng cường sức sống cho các tác nhân đối kháng và đưa vào lại môi trường tự nhiên là hết sức cần thiết. Vì vậy, việc xây dựng một hệ thống nhằm kiểm soát sự định cư của vi khuẩn là cần thiết.

Gen *gfp* quy định tổng hợp protein phát huỳnh quang (Green Fluorescent Protein) – aequorin – có ở loài sứa jellyish *Aequorea victoria* sống ở vùng nước lạnh biển bắc Thái Bình Dương. Protein này dễ dàng quan sát nếu được kích thích ở bước sóng thích hợp, đáp ứng đầy đủ tính chất cho một hệ thống “marker gen”, “reporter gen” nhằm kiểm soát khả năng định cư của vi khuẩn đối kháng trên đất hay cây trồng.

Xuất phát từ những vấn đề trên chúng tôi thực hiện đề tài “Chuyển gen *gfp* (Green Fluorescent Protein) vào vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* bằng phương pháp tiếp hợp ba thành phần”.

1.2 Mục tiêu đề tài

Thiết lập quy trình tiếp hợp plasmid pUT-gfp trong vi khuẩn *E.coli* DH5 α (λ -pir) vào vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* bằng phương pháp tiếp hợp ba thành phần.

1.3 Đối tượng nghiên cứu

Các dòng vi khuẩn nhận *Pseudomonas fluorescens*.

Dòng vi khuẩn cho *E.coli* DH5 α (λ -pir) chứa plasmid pUT-gfp.

Dòng vi khuẩn hỗ trợ *E.coli* DH5 α (λ -pir) chứa plasmid pRK600.

1.4 Nội dung thực hiện

Chọn lọc vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* có đặc tính đối kháng mạnh với nấm, có khả năng định cư trên rễ cây cà chua.

Tiến hành quy trình tiếp hợp ba thành phần (triparental mating) nhằm chuyển gen *gfp* vào vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens*.

Ly trích DNA plasmid pUT-gfp để làm mẫu dò.

Ly trích DNA tổng số của vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* đã chuyển gen *gfp* để làm mẫu lai.

Tiến hành phương pháp Dot Blot để kiểm tra sự tồn tại của gen *gfp* trong vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens*.

Quan sát vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* đã chuyển gen *gfp* dưới kính hiển vi phát huỳnh quang để quan sát độ phát sáng.

Phần 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1 Sự di chuyển gen và tái tổ hợp gen ở vi khuẩn

Hiện nay người ta phát hiện có 3 cách truyền thông tin di truyền ở vi khuẩn, đó là: biến nạp, tải nạp và tiếp hợp. Thông tin di truyền của vi khuẩn được truyền từ thể cho sang thể nhận, ở đây có hiện tượng tái tổ hợp (sự kết hợp) giữa hệ gen của tế bào cho và hệ gen của tế bào nhận.

2.1.1 Hiện tượng biến nạp (Transformation)

2.1.1.1 Định nghĩa

Biến nạp là sự biến đổi tính trạng của vi khuẩn dưới ảnh hưởng của sự xâm nhập một đoạn DNA lạ từ môi trường bên ngoài. Đoạn DNA lạ này được phóng thích từ một tế bào vi khuẩn khác. Ở đây sự biến nạp không cần tiếp xúc giữa hai tế bào. Cơ chế này rất nhạy với enzyme Deoxyribonuclease vì enzyme này có thể thủy phân các phân tử DNA hòa tan. Hiện tượng biến nạp được biết lần đầu tiên từ thí nghiệm của Griffith thực hiện trên chuột với phé cầu khuẩn *Pneumococcus*.

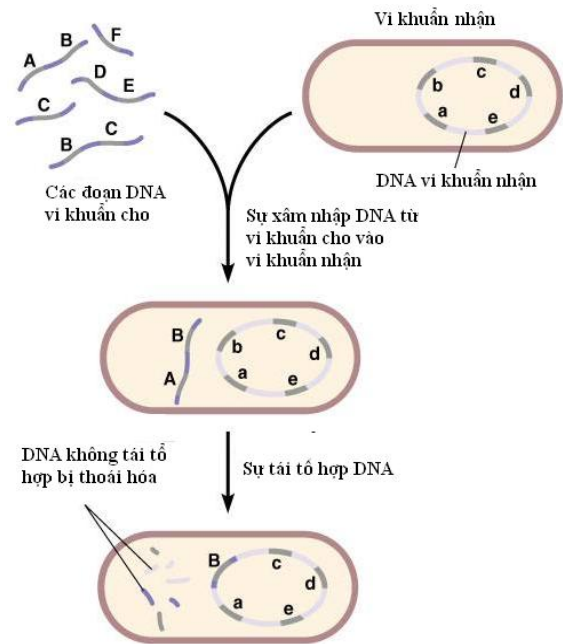
2.1.1.2 Cơ chế hiện tượng biến nạp

Tế bào vi khuẩn có thể cho DNA xâm nhập vào là do trong một giai đoạn tăng trưởng nào đó của tế bào, trên bề mặt của tế bào có hiện diện những điểm tiếp nhận đặc biệt gọi là yếu tố khả nạp. Yếu tố này có khả năng tiếp nhận đoạn ngắn DNA từ môi trường bên ngoài để đưa vào môi trường bên trong vi khuẩn, nhờ đó xảy ra sự tái tổ hợp.

Muốn thực hiện sự biến nạp cần có 2 điều kiện: (1) Phải có môi trường chứa các đoạn DNA; (2) Khả năng dung nạp DNA của vi khuẩn nhận. Không phải tất cả các vi khuẩn đều nhận DNA như nhau, mà cần phải sử dụng một số chất tạo lỗ trên vách tế bào, giúp sự xâm nhập dễ dàng của DNA như: CaCl_2 50mM, LiCl...

Quá trình biến nạp gồm các giai đoạn:

- Sự tiếp xúc DNA lạ với tế bào nhận.
- Sự xâm nhập của DNA vào tế bào nhận.
- Sự liên kết của DNA lạ với đoạn DNA tương đồng của nhiễm sắc thể tế bào nhận.
- Sự đồng hóa phân tử DNA lạ vào DNA của tế bào nhận nhờ tái tổ hợp.
- Sự nhân lên nhiễm sắc thể của DNA biến nạp.



Hình 2.1 Quá trình biến nạp.

2.1.2 Hiện tượng tải nạp (Transduction)

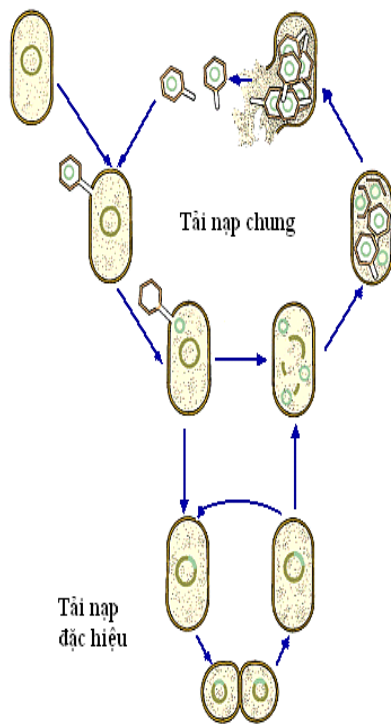
2.1.2.1 Định nghĩa

Đó là sự truyền chất liệu di truyền từ tế bào vi khuẩn cho sang tế bào vi khuẩn nhận qua trung gian của thực khuẩn thể (Bacteriophage hoặc phage) trong trường hợp này phage đóng vai trò là một phage tải nạp. Phage tải nạp là một phage ôn hòa chỉ chiếm một phần nhỏ ($10^{-5} - 10^{-8}$) trong quần thể. Hiện tượng tải nạp đã được Zinder và Lederberg phát hiện năm 1952 trong khi nghiên cứu lai các loài *Salmonella*.

2.1.2.2 Cơ chế hiện tượng tải nạp

Tải nạp là quá trình truyền những DNA từ vi khuẩn cho sang một vi khuẩn nhận nhờ một Prophage. Prophage xâm nhập vào hệ gen của vi khuẩn cho. Sau đó xảy ra sự tách bất bình thường ra khỏi hệ gen của vi khuẩn, chúng mang theo một phần hệ gen của tế bào chủ, sinh sản nhanh chóng và phá vỡ tế bào chủ để chui ra ngoài và trở thành yếu tố tải nạp. Yếu tố này sẽ mang DNA của vi khuẩn cho truyền sang vi khuẩn nhận. Tiếp theo là hiện tượng tái tổ hợp để gắn đoạn DNA tải nạp của thực khuẩn thể vào hệ gen của vi khuẩn nhận.

Các kiểu tải nạp: Tùy thuộc vào cấu trúc của phân tử tải nạp mà ta có hai loại tải nạp.



Hình 2.2 Quá trình tải nạp.

- Tải nạp chung: Là trường hợp virus tải một đoạn nhỏ DNA bất kỳ của vi khuẩn cho vào vi khuẩn nhận và sau đó thực hiện sự tái tổ hợp để gắn DNA này vào bộ gen của vi khuẩn nhận.

- Tải nạp đặc hiệu: Việc tải nạp chỉ thực hiện đối với những gen nhất định. Thí dụ: với Prophage khi tiếp hợp vào một vị trí nhất định trên DNA của vi khuẩn (vị trí giữa gen A và Z). Khi Prophage tách ra khỏi hệ gen của vi khuẩn nó sẽ để lại một đoạn gen của mình và mang theo một đoạn gen A hay Z của nhiễm sắc thể.

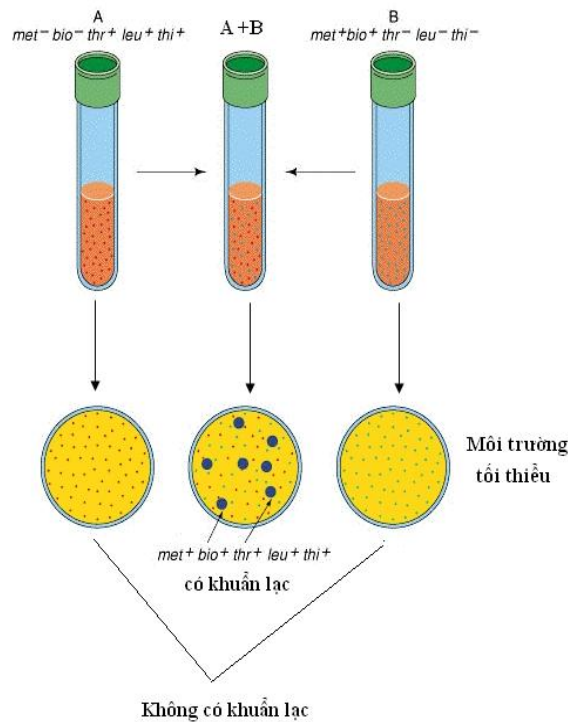
2.1.3 Hiện tượng tiếp hợp ở vi khuẩn (Conjugation)

2.1.3.1 Định nghĩa

Tiếp hợp là hiện tượng truyền vật liệu di truyền DNA theo một chiều từ vi khuẩn cho (vi khuẩn đực) sang vi khuẩn nhận (vi khuẩn cái) bằng sự tiếp xúc trực tiếp giữa hai vi khuẩn, để tạo ra một nòi lai mang đặc tính của vi khuẩn nhận và một phần đặc tính của vi khuẩn cho. Sự tiếp hợp giữa hai vi khuẩn dẫn đến sự hình thành một hợp tử chứa hệ gen của vi khuẩn nhận và một đoạn gen của vi khuẩn cho. Hai phần này kết hợp lại ngay thành một nhiễm sắc thể duy nhất. Những vi khuẩn sinh ra do tiếp hợp được gọi là tái tổ hợp.

2.1.3.2 Thí nghiệm Lederberg và Tatum (1946)

Thí nghiệm được thực hiện trên hai thể đột biến dị dưỡng của vi khuẩn *E.coli* K₁₂ để chứng minh có hiện tượng lai ở vi khuẩn:



Hình 2.3 Thí nghiệm Lederberg và Tatum.

nhận thấy xuất hiện các khuẩn lạc. Những tế bào mọc được trên môi trường tối thiểu tất nhiên phải kết hợp được các tính chất của cả hai cha và mẹ mang ký hiệu $met^+ bio^+ thr^+ leu^+ thi^+$, nghĩa là có khả năng tổng hợp cả 5 nhân tố.

Còn nhiều ý kiến nghi ngờ rằng, những khuẩn lạc mọc được trên môi trường tối thiểu có phải là những tế bào lai do quá trình tiếp hợp trực tiếp giữa hai nòi vi khuẩn. Giả thiết 1: Người ta cho rằng những khuẩn lạc mọc trên môi trường tối thiểu gồm hai dòng tế bào cha và mẹ sống hỗ sinh với nhau, nghĩa là chúng nuôi lẫn nhau. Giả thiết này đã bị loại bỏ sau khi người ta tách riêng một tế bào từ khuẩn lạc cấy riêng trên môi trường tối thiểu thì nó vẫn mọc tốt. Giả thiết 2: Cho rằng cơ chế của hiện tượng này là biến nạp, điều đó cũng không đúng vì người ta đã loại bỏ những đoạn DNA trong môi trường. Hiện tượng này cũng không phải là tải nạp vì người ta đã loại bỏ thực khuẩn thể trong môi trường. Đặc biệt là khi phân cách hai nòi vi khuẩn bằng màng lọc vi khuẩn trong ống chữ U thì không thấy xuất hiện dòng thứ 3. Như vậy nòi lai chỉ có thể xuất hiện khi có sự tiếp xúc trực tiếp giữa hai vi khuẩn cha và mẹ. Thực

Vi khuẩn A mang ký hiệu $met^- bio^- thr^+ leu^+ thi^+$ thể đột biến khuyết dưỡng đòi hỏi trong môi trường phải có methionine và biotine, không đòi hỏi leucine, threonin, thiomine. Nòi này nếu cấy trong môi trường tối thiểu thì không mọc được.

Vi khuẩn B mang ký hiệu $met^+ bio^+ thr^- leu^- thi^-$ cũng là thể đột biến khuyết dưỡng đòi hỏi trong môi trường phải có leucine, threonin, thiomine vì khuẩn này nếu cấy trong môi trường tối thiểu thì cũng không mọc được.

Trộn hai nòi vi khuẩn lại, và nuôi chung trong môi trường dinh dưỡng đầy đủ (nghĩa là có đủ 5 nhân tố tăng trưởng) trong 24 giờ. Sau đó cấy trên môi trường tối thiểu

vậy, dưới kính hiển vi điện tử người ta thấy rằng hai nòi cha mẹ tiếp xúc nhau trong một thời gian rồi tách ra khi đó từ nòi cha mẹ sản sinh ra nòi lai.

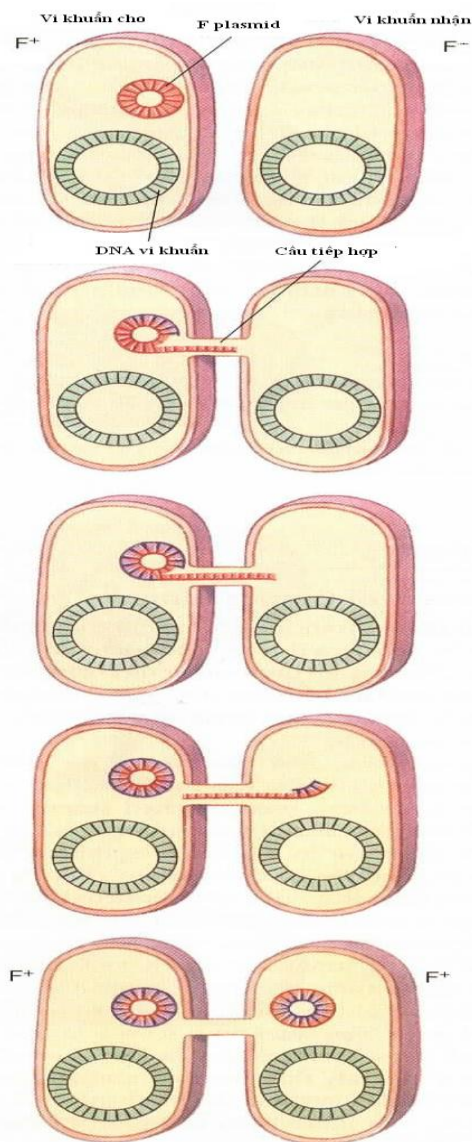
2.1.3.3 Yếu tố giới tính F

Khả năng truyền DNA của vi khuẩn cho có liên quan đến sự có mặt trong tế bào một plasmid được gọi là yếu tố giới tính F (Fertility - hữu thụ). Yếu tố F là một plasmid cấu tạo bởi một DNA vòng, xoắn kép có kích thước trung bình dài bằng 2% chiều dài nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Yếu tố F mang các gen mã hóa cho đặc tính “đực” của tế bào F^+ , bao gồm khả năng tạo cầu tiếp hợp giữa các tế bào cho với tế bào nhận, cũng như khả năng tạo pili sinh dục và các lực kích động đằng sau sự truyền gen

Yếu tố F có thể tồn tại trong tế bào dưới hai trạng thái khác nhau : Hoặc ở trạng thái độc lập trong tế bào chất của vi khuẩn, nó có khả năng nhân lên một cách độc lập. Hoặc ghép vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn như một Prophage và chỉ được nhân lên đồng thời với nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Lúc đó yếu tố F được gọi là episome và vi khuẩn được gọi là yếu tố vi khuẩn có tần số tái tổ hợp cao (Hfr – High frequency recombination).

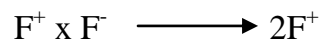
Yếu tố F có thể được truyền từ tế bào này sang tế bào khác. Các vi khuẩn không mang yếu tố F là vi khuẩn cái, chỉ có khả năng nhận DNA, còn các vi khuẩn mang yếu tố F là vi khuẩn đực có khả năng cho DNA. Trong quá trình tiếp hợp, yếu tố F có khả năng tự tái tạo trong tế bào F^+ , nghĩa là sau khi truyền yếu tố F qua tế bào nhận F^- , trong tế bào F^+ vẫn còn tồn tại yếu tố F.

2.1.3.4 Các loại vi khuẩn đực mang yếu tố F



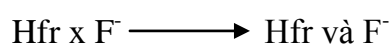
Hình 2.4 Quá trình tiếp hợp giữa vi khuẩn F^+ và vi khuẩn F^- .

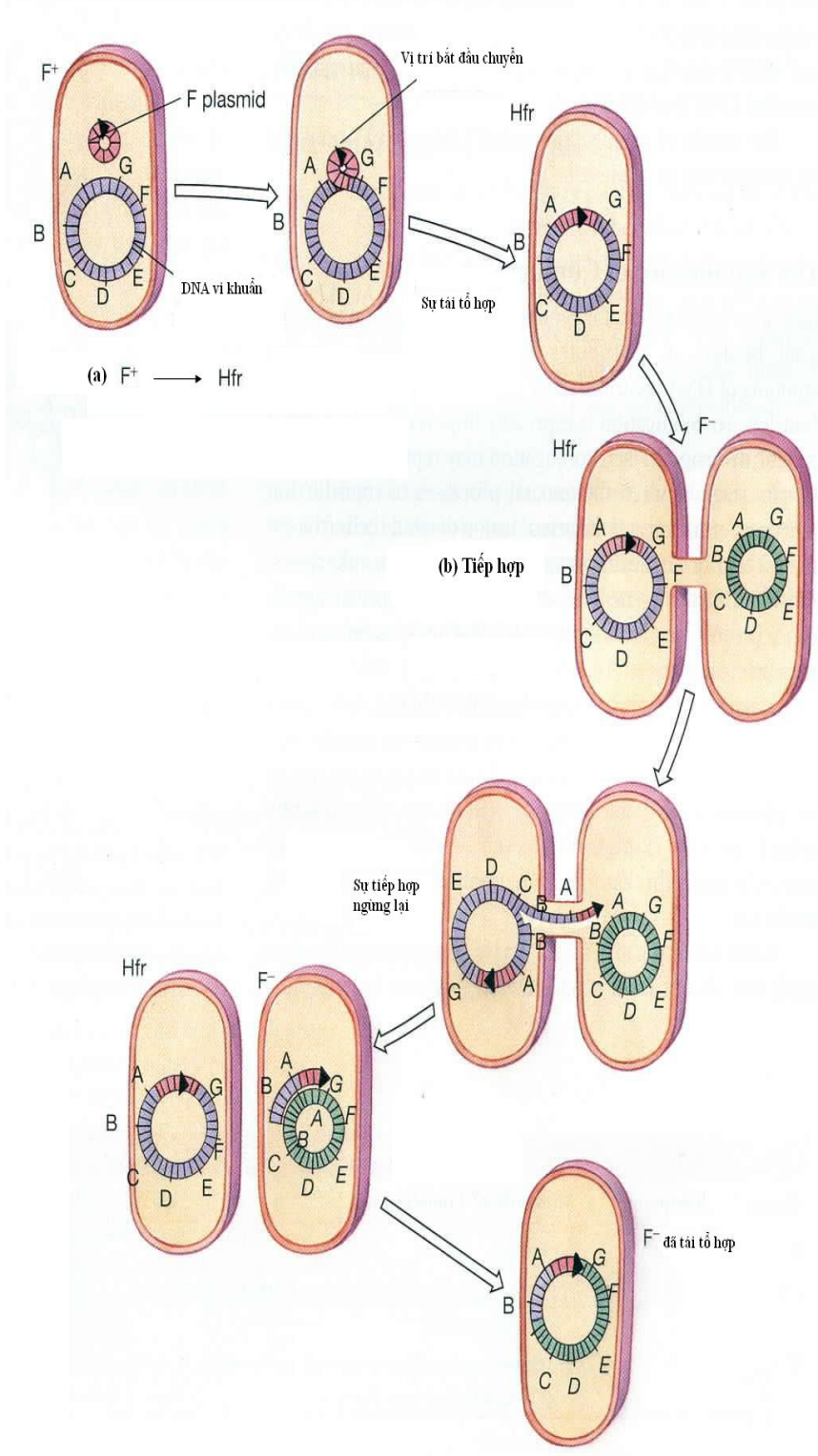
Vi khuẩn F^+ : có yếu tố F nằm tự do trong tế bào chất và chúng được sao chép một cách độc lập. Khi lai $F^+ \times F^-$, yếu tố F được truyền cho tế bào nhận F^- và biến các tế bào F^- thành tế bào F^+ . Tế bào F^+ sau khi truyền yếu tố F cho tế bào F^- vẫn còn là tế bào F^+ . Hiện tượng tiếp hợp xảy ra ở tần số thấp.



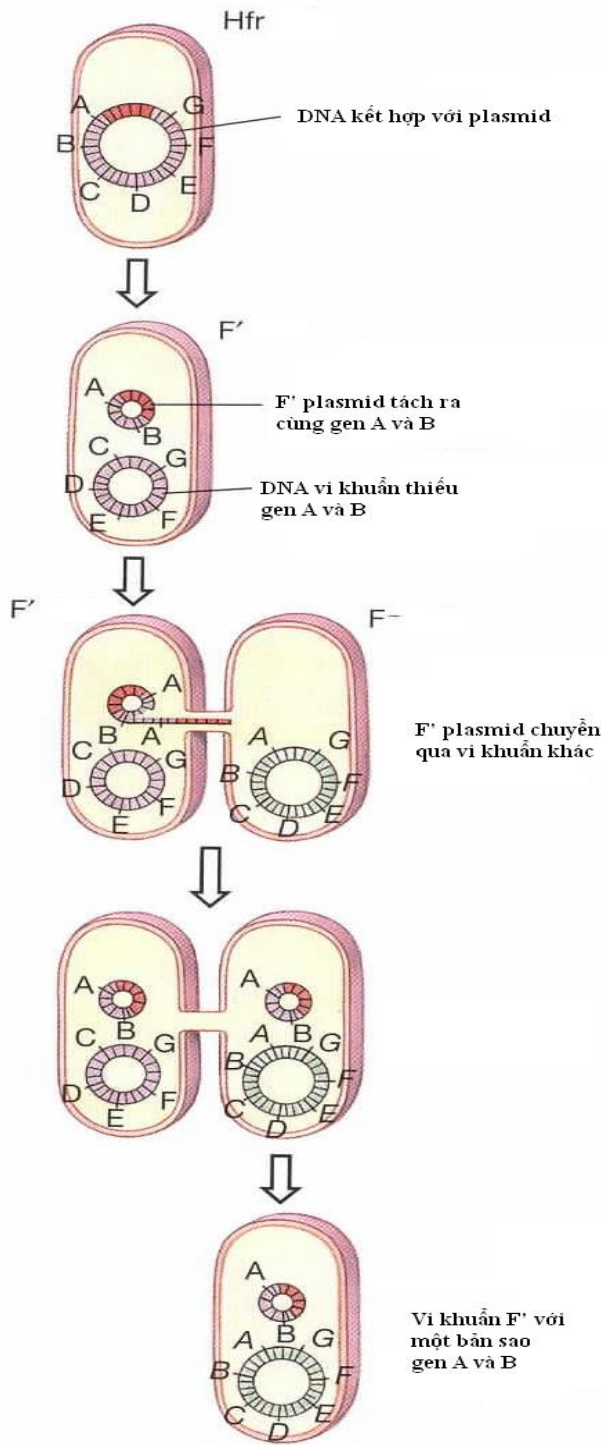
Vi khuẩn Hfr (High frequency recombinant): là vi khuẩn có tần số tái tổ hợp cao, có yếu tố giới tính F được gắn vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn tại một vị trí nhất định. Khi kết hợp vào nhiễm sắc thể, yếu tố F sẽ được nhân lên cùng một lúc với nhiễm sắc thể (giống như trường hợp của Prophage). Khi lai $Hfr \times F^-$, yếu tố F không được truyền đi một cách độc lập mà được truyền đi cùng với đoạn nhiễm sắc thể mang nó. Trong trường hợp này DNA vòng của vi khuẩn sẽ bị đứt ngay vị trí gắn của yếu tố F và trở thành đoạn thẳng. Trong khi di chuyển, yếu tố F nằm ở đầu cuối của nhiễm

sắc thể, nên được truyền đi sau cùng. Do nhiễm sắc thể rất mỏng manh, rất dễ bị đứt trong quá trình di chuyển (quá trình này cần 100 đến 120 phút cho một sự truyền dẫn hoàn toàn), cho nên sự tiếp hợp rất ít khi xảy ra hoàn toàn. Kết quả là nhiễm sắc thể chỉ được truyền đi một phần, và yếu tố F thường không được di chuyển sang vi khuẩn F^- , tế bào F^- không biến thành tế bào F^+ . Hiện tượng tiếp hợp xảy ra với tần số cao.

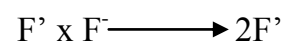




Hình 2.5 Quá trình tiếp hợp giữa vi khuẩn Hfr và vi khuẩn F^- .



Vi khuẩn F': trong vi khuẩn Hfr yếu tố F có thể tách ra khỏi hệ gen của nhiễm sắc thể và trở thành yếu tố F⁺. Trường hợp trong khi tách, yếu tố F lại mang theo một đoạn DNA của nhiễm sắc thể tại vị trí gắn nó vào, khi đó được gọi là yếu tố F' và vi khuẩn có yếu tố F' gọi là vi khuẩn F'. Khi lai F' x F⁻, vi khuẩn F' có khả năng vừa truyền được một phần DNA của nhiễm sắc thể, vừa truyền được yếu tố giới tính F cho vi khuẩn F⁻ và biến vi khuẩn F⁻ thành F'. Hiện tượng này giống như hiện tượng tải nạp do virus nên còn được gọi là hiện tượng giới nạp.



Hình 2.6 Quá trình tiếp hợp giữa vi khuẩn F' vi khuẩn F⁻.

2.1.3.5 Cơ chế quá trình tiếp hợp

Việc truyền yếu tố F từ một vi khuẩn F^+ sang một vi khuẩn F^- đòi hỏi một sự tiếp xúc trực tiếp giữa hai tế bào. Khi nuôi chung với vi khuẩn F^- các vi khuẩn F^+ sẽ có phản ứng của giới tính đực và kéo dài pili sinh dục của mình và sẽ bám vào một điểm nhận của tế bào vi khuẩn nhận, sau đó sẽ co lại để kéo tế bào nhận lại gần. Giai đoạn tiếp theo là làm tan các tế bào của vi khuẩn nhận và truyền DNA của mình vào tế bào nhận. Hiện tượng tái tổ hợp sẽ diễn ra sau đó.

Cách truyền vật chất di truyền từ vi khuẩn đực sang vi khuẩn cái được làm sáng tỏ do những công trình của F. Jacob và E. Wollman (1958 – 1960). Quá trình truyền vật chất di truyền trong tiếp hợp xảy ra theo các giai đoạn sau:

Giai đoạn 1: sự tiếp xúc ngẫu nhiên xuất hiện vài phút sau khi trộn vi khuẩn với nhau. Xác suất của sự tiếp xúc phụ thuộc vào nồng độ của hai nòi vi khuẩn.

Giai đoạn 2: là sự bắt cặp giữa tế bào nhận và tế bào cho. Tế bào nhận đóng vai trò thụ động, màng tế bào của nó bị hòa tan tại chỗ tiếp xúc với pili sinh dục của vi khuẩn đực, tạo thành những cầu nguyên sinh chất có đường kính từ 10 – 30 μm . Quá trình này phụ thuộc vào pH, điều kiện dinh dưỡng trong môi trường.

Giai đoạn 3: là giai đoạn mà các DNA của tế bào cho chuyển sang tế bào nhận theo cấu trúc thẳng. Số lượng gen chuyển sang phụ thuộc vào thời gian tiếp hợp.

Giai đoạn 4: là quá trình tái tổ hợp giữa các nhiễm sắc thể của thể nhận và đoạn chất di truyền của thể cho.

Cuối cùng là sự tái tạo nhiễm sắc thể trong những thế hệ sau, thể lai được hình thành.

2.1.3.6 Lập bản đồ bằng tiếp hợp:

F. Jacob và E. Wollman nhận thấy rằng có thể sử dụng sự đứt gãy ngẫu nhiên của cầu tiếp hợp để làm cho phương tiện lập bản đồ trình tự các gen bằng cách xác định thời gian chui vào tế bào thể nhận đối với những gen khác nhau. Thí nghiệm cổ điển lai ngắt quãng tiến hành bằng cách lấy trong từng khoảng cách đều (1 phút) những lượng canh khuẩn giống nhau (0.5ml) trong những hỗn hợp vi khuẩn đực Hfr và vi

khuẩn cái F^- đang tiếp hợp sau khi pha loãng (1/4) trong nước sinh lý, tách ngay những tế bào đang giao phối bằng cách lắc mạnh trong một máy lắc quay hoặc một máy chấn động (trong 10 phút).

Sau khi cấy và pha loãng canh khuẩn được cấy trang ra môi trường đĩa, sau khi ủ người ta phân lập những khuẩn lạc của thể tái tổ hợp và nghiên cứu các tính chất của chúng để phát hiện những gen di truyền của những vi khuẩn đực. Người ta thấy rằng: Mỗi gen của nòi đực truyền đi sau một thời gian đặc trưng. Thứ tự truyền các gen theo thời gian tương ứng với thứ tự sắp xếp của các gen trên nhiễm sắc thể. Gen càng nằm xa điểm khởi đầu bao nhiêu thì có tần số truyền đi thấp bấy nhiêu. Các tế bào Hfr khác nhau có điểm khởi đầu khác nhau, thứ tự truyền gen cũng khác nhau. Ví dụ: nòi Hfr 1 có thể truyền hệ gen theo thứ tự $A^+ B^+ C^+ D^+ E^+ F^+$ (với điểm khởi đầu là A^+), trong khi đó nòi Hfr 2 có thể truyền gen theo thứ tự $D^+ E^+ F^+ A^+ B^+ C^+$ (điểm khởi đầu là D^+). Điều này đã chứng minh được nhiễm sắc thể vi khuẩn là dạng vòng, và chúng tố yếu tố F có thể xen vào các locus khác nhau trong hệ gen, và nó luôn luôn được truyền đi sau cùng.

Trong thời gian tiếp hợp, nhiễm sắc thể của vi khuẩn Hfr được mở ra tại vị trí sáp nhập của yếu tố F và truyền đi theo một cấu trúc thẳng có định hướng: gen di chuyển đầu tiên là điểm gốc (0) ngay vị trí bị cắt; yếu tố F nằm ở đầu cuối của nhiễm sắc thể. Như thế yếu tố F đại diện cho đặc tính cuối cùng có thể truyền đi được. Người ta giả định rằng sự sao DNA trong tế bào là một quá trình điều chỉnh tốt với điểm khởi đầu nằm trong hệ gen gắn trên màng tế bào. Yếu tố F nằm trên hệ gen cũng có thể gắn với màng tế bào và từ một điểm khởi đầu của nhân tố F sẽ đọc mã cho việc tổng hợp cầu tiếp hợp (pili sinh dục). Khi sao DNA, một sợi xoắn đơn của hệ gen sẽ đi qua cầu tiếp hợp để vào tế bào F^- , còn sợi xoắn kia vẫn được giữ nguyên trong tế bào Hfr. Enzyme DNA polymerase sẽ đồng thời tạo các sợi bổ sung trên mỗi sợi đơn, để tái tổ hợp lại DNA xoắn kép như cũ. Nhờ vậy tế bào cho, sau khi truyền DNA cho tế bào nhận, vẫn không thay đổi bản chất hệ gen của nó.

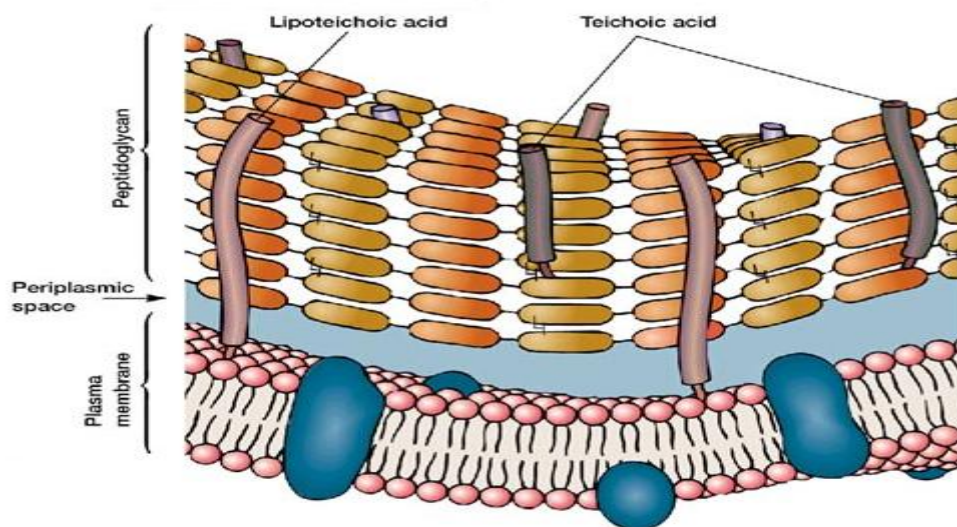
2.2 Vách tế bào của vi khuẩn

Vách tế bào là thành phần quan trọng của tế bào, phần lớn các vi khuẩn đều có một vách kín, nó giúp cho tế bào giữ được hình dạng ổn định và bảo vệ tế bào tránh được tác động ly giải của áp suất thẩm thấu. Vách có thể bảo vệ cho tế bào chống lại các cơ

chất độc, nó cũng là nơi chịu tác động của nhiều chất kháng sinh. Trên cơ sở của kỹ thuật nhuộm màu được đề ra bởi Christian Gram vào năm 1884, đã cho thấy vi khuẩn được chia thành hai nhóm chính: Vi khuẩn Gram (+) được nhuộm màu tím. Vi khuẩn Gram (-) được nhuộm màu hồng hay đỏ.

2.2.1 Cấu tạo vách tế bào Gram (+)

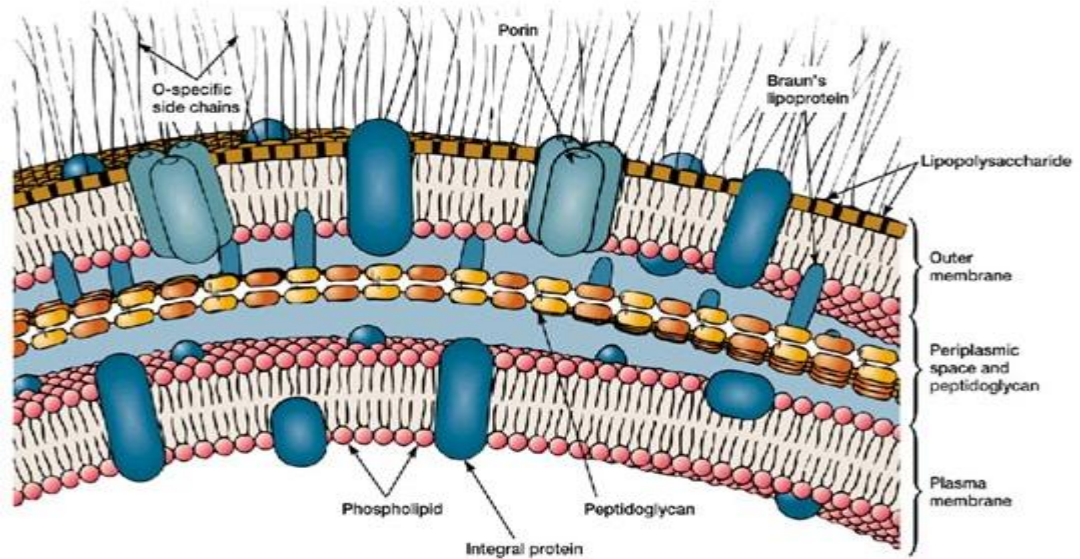
Vách tế bào đồng nhất và dày được cấu tạo chủ yếu bởi peptidoglycan và acid teichoic. Các chuỗi peptidoglycan được nối với nhau nhờ các cầu nối interpeptidic. Nhờ có các cầu nối này, một đại phân tử peptidoglycan khổng lồ hình thành và tạo thành một mạng lưới dày, và như thế vách tế bào được hình thành. Acid teichoic là một hợp chất cao phân tử của glycerol hay ribitol nối với nhóm phosphat. Acid teichoic vừa được nối với peptidoglycan, vừa được nối với lipid của màng tế bào chất, trong trường hợp này được gọi là acid lipoteichoic. Do tích điện âm acid teichoic có thể giúp vận chuyển các ion dương vào tế bào cho việc dự trữ phospho.



Hình 2.7 Vách tế bào vi khuẩn Gram (+).

2.2.2 Cấu tạo vách tế bào Gram (-)

So với tế bào Gram (+) vách tế bào Gram (-) phức tạp hơn nhiều. Thành phần gồm: màng ngoài và một khoang chu chất (periplasmic space) chứa 1 - 2 lớp PG chiếm 5 - 10% trọng lượng khô của vách, giữa lớp PG và màng ngoài có cầu nối lipoprotein. Vách tế bào Gram (-) không có acid teichoic



Hình 2.8 Vách tế bào vi khuẩn Gram (-).

Trên cơ sở sự khác nhau giữa vách tế bào vi khuẩn Gram (+) và vi khuẩn Gram (-) cũng giải thích một phần tại sao đa số sự tiếp hợp được thực hiện trên những loài vi khuẩn Gram (-). Do cấu trúc vách tế bào Gram (-) thường có những pili sinh dục (số lượng thay đổi từ 1 – 10 trên mỗi tế bào).

2.3 Vi khuẩn – tác nhân phòng trừ sinh học

Nhiều công trình nghiên cứu về các tác nhân phòng trừ sinh học đã công bố vào đầu thế kỉ 20 trong đó có vi khuẩn. Đây là nhóm vi khuẩn hoại sinh mà phổ biến nhất là *Pseudomonas* spp., kể đến là *Bacillus* spp. và *Streptomyces* (Burr và cộng sự, 1978; Weller và Cook, 1983).

Những nghiên cứu về vi khuẩn vùng rễ và vi khuẩn trên thân lá cây đã dẫn đến việc chia chúng thành ba loại: loại có hại cho cây, loại trung tính và loại có hại cho cây hay còn gọi vi khuẩn thúc đẩy sự tăng trưởng cây. Ảnh hưởng có ích của nhóm vi khuẩn này là do chúng sản sinh ra các chất kích thích tăng trưởng cây, các chất ức chế hoặc làm suy yếu các tác nhân gây bệnh hoặc cả hai (Baker, 1986). Cơ chế ban đầu ức chế tác nhân gây bệnh là sự tiết ra các chất kháng sinh (Fravel, 1988). Tuy nhiên những yếu tố khác như việc tiết ra chất sidrophose, HCN, sự cạnh tranh dinh dưỡng cũng có vai trò quan trọng trong việc ức chế tác nhân gây bệnh (Cook và Baker, 1983). Sự khám phá ra nhóm vi khuẩn thúc đẩy sự tăng trưởng cây đã làm tăng thêm hi vọng cho

những chiến lược phòng trừ sinh học có hiệu quả các cây gây hại ở bộ rễ và trên lá, điển hình là các bệnh chết cây con trên cây bông vải, bệnh thối đen rễ trên cây thuốc lá và bệnh héo rũ trên cây hoa kiểng (Defago và cộng sự, 1990).

2.4 Vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens*

Là loại trực khuẩn, hình gậy, dài, hơi tròn hai đầu, nhuộm màu gram (-), sống hiếu khí dị dưỡng, không sinh nha bào, có đơn hoặc từng mao, sinh sắc tố, kí sinh trên cây, đối kháng nấm (*Sclerotium rolfsii* gây bệnh trên cây cà chua, *Rhizoctonia solani* gây hại trên cây bông vải) do mang gen tổng hợp chất kháng sinh 2,4-DAPG, phát sáng trên môi trường KB dưới tác dụng của tia UV.

2.4.1 Phân loại vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens*

Phân loại theo hệ thống phân loại vi khuẩn của Bergey

Lớp: Shizomycetes

Bộ: Pseudomonadaceae

Họ: Pseudomonadaceae

Giống: *Pseudomonas*

2.4.2 Các nghiên cứu về vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens*

Những chủng vi khuẩn ở vùng rễ trong đó có loài *Pseudomonas fluorescens* đối kháng mạnh với *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectium*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium (corticium) rolfsii*, *Sarocladium oryzae* và *Aspergillus flavus* và vi khuẩn *Xanthomonas campestris* pv. *Citri* và *Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae*. Các thí nghiệm tiếp theo cũng sử dụng nguồn vi khuẩn này trong phòng trừ sinh học hiệu quả đối với bệnh thối bẹ lá, bệnh thối thân đậu phộng, nâng cao sự phát triển cây trồng và tăng năng suất (Sakthivel, 1986). Còn vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* dòng HV37a được chứng minh rằng sinh ra ít nhất ba loại kháng sinh ức chế phát triển của nấm *Pythium ulimum*, được dùng phòng trừ bệnh héo cây con trên cây bông vải do nấm *Pythium ulimum* gây ra (Gutter Son, 1986).

Theo Sivamani và cộng sự, 1987 cho rằng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* có thể được dùng như biện pháp sinh học, là tác nhân chống lại *Pseudomonas solanense* gây bệnh héo moko và vi khuẩn *Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae* gây bệnh cháy lá

lúa. Cũng trong năm 1987, Lamber và cộng sự đã phân lập *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Serratia liquefacien* và *Bacillus* sp. có hoạt tính chống nấm phổ rộng từ cây bắp, lúa mạch và xà lách xoong. Còn Jee và Kim thì nghiên cứu sự đối kháng giữa vi khuẩn và nấm đối với mầm bệnh héo rũ dưa leo. Những chủng chính đã được chọn lọc là *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* và *Serratia* sp. và *Giocladium* sp., *Trichoderma harzianum* và *Trichoderma viride*. Trong môi trường agar lỏng, vi khuẩn đối kháng đã ức chế sự nảy mầm của bào tử *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* từ 26% - 45%, *Pseudomonas fluorescens* là vi khuẩn có tính kìm hãm mạnh nhất. Tiếp theo năm 1988, Sivamani và Gnanamanickam đã xử lý cây chuối con *Musabalbisiana* bằng vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas fluorescens* trên bệnh héo rũ do nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Kết quả bệnh ít hơn, rễ phát triển tốt hơn và tăng thêm chiều cao.

Voisard và cộng sự, 1989 còn cho biết cyanide sản xuất bởi *Pseudomonas fluorescens* giúp ngăn chặn bệnh thối đen rễ thuốc lá (*Thielaviopsis basicola*). Kết luận này đã xác định rằng cyanide từ vi khuẩn là quan trọng nhưng là yếu tố phức tạp trong sự ngăn chặn bệnh thối đen rễ thuốc lá. Còn Alstrom và Burn, 1989 chỉ ra rằng cyanide sản xuất bởi vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* có thể kìm hãm sự phát triển cây trồng, ngăn cản sự phát triển rễ rau diếp (*Latuca sativa*). Cùng năm đó, Devi và cộng sự nghiên cứu về vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas flurescens* có huỳnh quang và không có huỳnh quang được phân lập ở vùng rễ lúa ở miền nam Ấn Độ đối kháng tốt với nấm *Rhizoctonia solani* được đánh giá là biện pháp sinh học dùng để đối phó với bệnh đốm vằn. Còn Gnanamanickam và cộng sự, 1992 cho rằng những nhóm vi khuẩn đối kháng huỳnh quang và không huỳnh quang được quan sát ở Ấn Độ trong ống nghiệm đã kìm hãm nấm *Rhizoctonia solani* vì chúng mang gen chitinase đã mã hóa làm chitin hóa vách tế bào sợi nấm. Nhiều dòng của vi khuẩn có hiệu quả kìm hãm sự phát triển của khuẩn ty, làm ảnh hưởng đến sự sống sót của hạch nấm bảo vệ cây trồng tránh sự xâm nhiễm của nấm bệnh Trong số các loài *Pseudomonas* spp, *Pseudomonas flurescens* là được nghiên cứu hơn hết, vì ngoài khả năng đối kháng với 10 loài nấm bệnh phát sinh từ đất, nó còn có khả năng kích thích sự phát triển của cây trồng.

Smilanick và cộng sự, 1992 cho rằng sử dụng *Pseudomonas cepacia* làm giảm bệnh mốc xanh sau thu hoạch do *Penicillium digitatum* trên trái chanh, làm giảm 80% so với không chủng. Hiệu quả thấy rõ sau khi chủng khoảng 12 giờ. Tác động đối kháng của vi khuẩn được xác nhận do chất kháng khuẩn *pyrrolnitrin*. Bên cạnh, *Pseudomonas fluorescens* không cản trở sự phát triển của *Penicillium digitatum* trong thí nghiệm in vitro nhưng đã hạn chế tới 70% trái hư mốc. Như vậy khả năng đối kháng của vi khuẩn còn có sự tham gia của cơ chế khác.

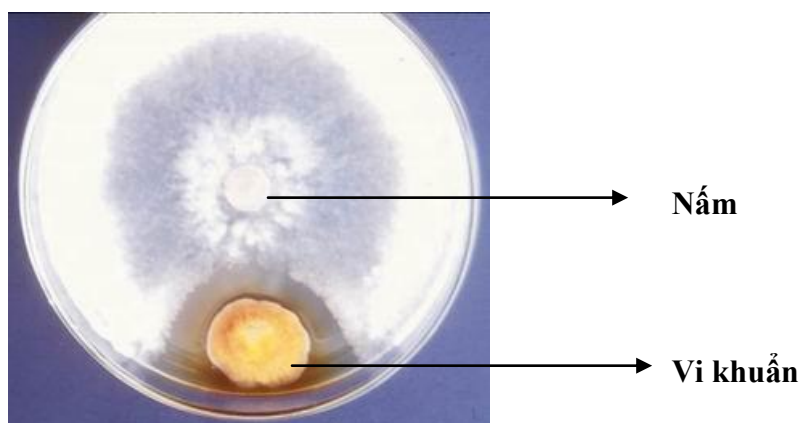
Gogoi và Roy, 1996 những dòng vi khuẩn phát huỳnh quang và không phát huỳnh quang được phân lập ở Philippine được đánh giá kháng với nấm *Rhizoctonia solani*. Giữa 9 dòng có hiệu quả thì 5 dòng được biết là *Pseudomonas fluorescens* và 1 dòng *Enterobacter*. Những thí nghiệm nhà lưới, ở đất thấp với pH 5,5 – 6,5 và pH acid 5,0 là thích hợp cho phòng trừ bệnh đốm vòng hơn là đất kiềm pH 6,9 và đất thiếu Zn. Những nghiệm thức xử lý vi khuẩn có khả năng giảm ảnh hưởng bệnh nhưng không có ý nghĩa là gia tăng năng suất. Còn Rindran và Vidhyaekaran cho rằng những nòi vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens*, được phân lập từ vùng rễ, có sắc tố phát huỳnh quang vàng – xanh lục cũng kìm hãm sự phát triển của *Rhizoctonia solani*. Một trong những dòng có hiệu quả nhất là PfAIR2, phân lập trên than bùn được dùng để xử lý hạt, xử lý rễ, rải vào đất và phun lên lá. Từng nghiệm thức riêng lẻ đã kiểm soát bệnh có hiệu quả. Tuy nhiên, sự kết hợp của 4 cách dẫn đến hiệu quả phòng trừ tốt nhất trong nhà lưới. Trên đồng ruộng, sử dụng PfAIR2 phòng trừ bệnh có hiệu quả, gia tăng năng suất và có thể so sánh với các loại thuốc trừ nấm thông dụng như Carbendazim.

Abdelzاهر và Elnaghy, 1998 cho biết bệnh thối rễ cây bông vải do nấm *Pythium carolinianum* ở Ai Cập đã được kiểm soát bởi sử dụng vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas fluorescens*. Vi khuẩn đối kháng với nấm cao trong thí nghiệm trên đĩa petri và hạn chế được bệnh khi áp dụng trong đất. Hiệu quả kiểm soát cao khi trộn vi khuẩn vào đất hơn là chủng vi khuẩn vào vùng rễ cây con trước trồng. Tác động đối kháng do sự cạnh tranh về dinh dưỡng, siderophores, những chất có đặc tính kháng khuẩn – HCN.

Mavrodi và cộng sự, 2000 nói rằng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* tạo ra DAPG chống lại bệnh chết cây con do nấm nhiễm trong đất gây ra, và đóng vai trò quan trọng trong việc hạn chế bệnh chết cây do nấm *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. Hợp chất này được kiểm soát bởi gen PhlD, một gen rất biến đổi về hóa cấu

trúc. Những nghiên cứu ở mức độ phân tử chỉ ra rằng PhlD là một marker phân tử quan trọng dùng nghiên cứu cấu trúc quần thể vi khuẩn tạo ra DAPG. Hợp chất DAPG đóng vai trò quan trọng trong kiểm soát bệnh chết cây con và bệnh hại rễ của nhiều loại cây trồng. Ví dụ dòng CHAO hạn chế bệnh thối đen rễ thuốc lá, chết cây lúa mì, thối rễ cà chua, dòng f113 hạn chế bệnh chết cây con củ cải đường. Còn Gardener và cộng sự thì nói rằng gen PhlD mã hóa polyketidesynthase từ đó tạo ra monacetylphloroglucinol và chuyển hóa tiếp 2,4 – DAPG. Một phần lớn vùng ORF của gen này được phân lập và phân tích cấu trúc. Sử dụng primer B2BF và BPR4 có thể xác định chính xác vi khuẩn đối kháng sản sinh ra hợp chất DAPG.

Các hình thức xử lý vi khuẩn đối kháng bằng cách khử hạt giống, ngâm rễ cây con bằng dịch vi khuẩn hoặc tưới dịch vi khuẩn vào đất cần được chú ý. Kết hợp nhiều dòng vi khuẩn với nhau kết quả sẽ tốt hơn là sử dụng một dòng vi khuẩn, đề nghị này được quan tâm và có hiệu quả trong phòng trừ sinh học (Mew và cộng sự, 1998).



Hình 2.9 Tính kháng nấm của vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens*.

Hình 2.9 Cho thấy khi vi khuẩn hình thành khuẩn lạc đã đẩy lùi sự phát triển của nấm, thể hiện tính kháng nấm của vi khuẩn.

2.5 Plasmid

Những phần tử di truyền ổn định ở bên ngoài nhiễm sắc thể - các plasmid là thành phần thông thường của các tế bào vi khuẩn. Những năm gần đây, người ta còn thấy chúng ở các eucaryote bậc thấp. Trong phần lớn trường hợp plasmid là các phân tử DNA vòng siêu xoắn dài từ 2.000 – 600.000 bp. Nhờ cấu trúc như vậy mà chúng

không bị các nuclease tấn công. Còn có cả các plasmid thẳng mà nuclease cũng không tác động vì các sợi ở đầu DNA của chúng được bảo vệ bởi các protein liên kết với chúng một cách đồng hóa trị. Các tế bào chứa plasmid có những tính trạng mới. Các tính trạng này chính là cơ sở để gọi tên các plasmid được phát hiện đầu tiên, đó là F-plasmid (yếu tố hữu thụ) tạo cho tế bào những đặc tính cho, col-plasmid có khả năng tổng hợp colicin, và R-plasmid xác định tính kháng kháng sinh cho tế bào.

Đặc tính cơ bản của plasmid là khả năng tự tái bản. Các phân tử DNA có khả năng này khi trên nó có điểm bắt đầu tái bản và tập hợp các gen cần thiết cho việc tái bản. Những phân tử như thế gọi là replicon. Nhiễm sắc thể prokaryote thường chỉ có một đoạn ori (ori-site). Bởi vậy chúng thuộc hệ các monoreplicon. Các replicon chỉ hoạt động khi trong tế bào có đầy đủ tất cả các enzyme cần thiết. Nhiễm sắc thể tế bào có đầy đủ các gen, mã hóa các protein của phức hệ tái bản. Còn các phân tử di truyền ngoài nhiễm sắc thể thì không có đủ các gen cần thiết cho nên các enzyme tế bào cũng tham gia vào sự tái bản chúng.

Người ta phân biệt các plasmid có sự kiểm tra chặt chẽ và không có sự kiểm tra chặt chẽ quá trình tái bản. Kiểm tra chặt chẽ tái bản plasmid là sự nhân đôi plasmid xảy ra cùng lúc với sự nhân đôi nhiễm sắc thể vi khuẩn và chắc rằng bởi cùng các phức hệ tái bản mà ở đó DNA-polymerase III đóng vai trò chính. Trong tế bào vi khuẩn có từ 1 – 3 bản sao plasmid như vậy. Kích thước tối thiểu của nó 20 – 30 kb, còn tối đa thì lớn hơn một bậc. Plasmid có sự kiểm tra tái bản không chặt chẽ thì thay cho DNA-polymerase III lại dùng DNA-polymerase I. Trong mỗi tế bào vi khuẩn có khoảng 40 – 50 bản sao plasmid, do đó người ta còn gọi chúng là các plasmid nhiều bản sao. Thường chúng không lớn – không quá 15 – 30 kb. Sự khác biệt giữa kiểm tra chặt chẽ và không chặt chẽ tái bản của plasmid thấy rõ khi tế bào chuyển từ pha log phát triển sang pha ổn định. Khi này các plasmid có sự kiểm tra chặt chẽ vẫn tiếp tục sự nhân đôi, và trọng lượng của chúng trong tế bào có thể đạt tới trọng lượng DNA vi khuẩn. Bức tranh tương tự cũng quan sát thấy ngay trong cả trường hợp ngừng tổng hợp protein. Điều này xảy ra khi tiêm chloramphenicol vào môi trường. Chloramphenicol làm ngừng tổng hợp protein, bắt đầu sự tái bản DNA vi khuẩn và plasmid có sự kiểm tra chặt chẽ. Còn các plasmid có sự kiểm tra không chặt chẽ trong các trường hợp này vẫn có khả năng bắt đầu hàng loạt các tái bản, vì vậy con số plasmid có thể lên đến vài

ngàn trên tế bào. Việc tái bản plasmid cả hai đoạn này được thực hiện cơ bản là nhờ các protein vi khuẩn. Vì các protein này trong tế bào các loài vi khuẩn khác nhau thì rất khác nhau, cho nên khi chuyển từ loài này sang loài khác plasmid có thể dần dần mất đi do không có các điều kiện tương ứng cho việc tái bản plasmid trong các tế bào mới.

Đặc tính quan trọng nhất của plasmid là khả năng di chuyển từ tế bào này sang tế bào khác khi tiếp hợp (conjugation). Các plasmid có hệ thống riêng của việc di chuyển (operon tra) gọi là các hệ tiếp hợp. Chúng tạo cho tế bào các sợi có khả năng hấp thụ các phage đặc hiệu. Các plasmid tiếp hợp rất đặc trưng với vi khuẩn gram (-). Thực ra, chúng có rất ít tế bào chủ để có thể chuyển DNA của mình đến và tái bản nó. Nhưng có các plasmid có nhiều tế bào chủ, thí dụ vi khuẩn RP4 tách từ *Pseudomonas*, dễ dàng chuyển khi tiếp hợp với các tế bào gram (-) *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* ... Cần thấy rằng, cầu nối chuyển gen giữa các loài và họ vi khuẩn khác nhau đã tạo điều kiện cho chúng thích nghi với các hoàn cảnh thay đổi.

Nhiều plasmid có khả năng nhập vào thể nhiễm sắc vi khuẩn qua các phần tử IS hoặc Tn chứa trong genome chúng. Các plasmid có sự kiểm tra chặt chẽ tái bản lúc này chịu sự chỉ đạo của bộ máy tái bản của thể nhiễm sắc vi khuẩn và có thể tồn tại rất lâu trong thành phần của nó. Các plasmid với “kiểu sống hai mặt” này gọi là episome (F-plasmid). Sự có mặt các Transposon trong plasmid tạo điều kiện nối chúng với nhau hoặc với DNA phage; nghĩa là hình thành các cointegrat. Trong khi đó các plasmid không tiếp hợp có thể được chuyển vào các tế bào khác nhờ các plasmid tiếp hợp hoặc các phage. Dạng chuyển thụ động này gọi là sự điều động (mobilisation) plasmid. Các cointegrat trong tế bào nhận và tách rời ra thành các replicon để tiếp tục tồn tại tự lập.

Nếu các plasmid không thể tồn tại lâu trong tế bào thì người ta gọi chúng là plasmid không phù hợp. Tính không phù hợp của plasmid là do sự tái bản và sự phân bố các phân tử DNA con cho các tế bào bị bao vây. Tính không phù hợp do sự tái bản bị bao vây gây nên thấy ở các plasmid có sự kiểm tra hay kiểm tra yếu sự tái bản. Nó dẫn đến là chỉ có một trong hai tế bào (hoặc một trong số hai loại) là còn giữ được khả năng nhân đôi. Tính không phù hợp do bao vây sự phân bố các phân tử DNA còn là đặc trưng cho các plasmid tái bản yếu. nguyên nhân của nó là do DNA plasmid bị gắn

với đoạn đặc hiệu trên màng tế bào bởi protein *par* (partion) nơi xảy ra sự tái bản DNA, cũng như sự phân bố nó cho các tế bào khi chúng phân chia. Người ta cho rằng, protein *par* của mỗi plasmid chỉ có một chỗ (site) như vậy cho nên chỉ có một phân tử gắn được với nó thôi. Do đó, các plasmid có các gen *par* cùng nhau hoặc giống nhau thì không thể phù hợp được.

Kiểm tra tính phù hợp cho phép chia plasmid thành các nhóm không phù hợp. Chúng có đến hàng chục nhóm. Các plasmid cùng trong một nhóm thì không phù hợp với nhau nghĩa là loại trừ lẫn nhau. Các plasmid có các kiểu hình khác nhau thì cũng có thể là không phù hợp. Thí dụ, trong nhóm FI có loại plasmid F (yếu tố sinh dục), col (sinh colicin) và R (kháng kháng sinh). Trên thực tế, việc xác định nhóm không phù hợp còn phức tạp hơn vì hiện tượng loại trừ bề mặt (surface exclusion) đặc trưng cho các plasmid tiếp hợp. Vấn đề là ở chỗ nếu trong tế bào có plasmid với dominant tương ứng, thì khi tiếp hợp DNA plasmid lọt qua vỏ tế bào rất khó khăn. Tần số vận chuyển plasmid ở đây thấp xuống 10 – 100 lần so với tần số chuyển vào các tế bào không chứa plasmid. Các plasmid vượt qua được chướng ngại này thì có thể cùng tồn tại vững bền với plasmid-resident (có ở sẵn), tất nhiên nếu chúng là phù hợp.

Plasmid tạo cho tế bào nhiều tính trạng kiểu hình khác nhau: tính kháng kháng sinh (tetracyclin, penicillin, chloramphenicol) bền với cation (bismut, cadimi, coban, thủy ngân, chì, acsen), anion (acsenate, acsenite) các chất gây đột biến (acridin, ethyldium bromide, tia tử ngoại), các bacterioxin. Tế bào có plasmid có khả năng phân rã sinh học campho, xylol, napalia, nicotin – nicotiat, n-alkan, salixilat, tolyol; tổng hợp các kháng sinh, bacterioxin, hemolyzin, thuốc diệt sâu, sắc tố, các kháng nguyên bề mặt, H₂S, toxin, fibrinolyzim; sử dụng như nguồn cacbon nhiều loại đường khác nhau và các amino acid đặc biệt; tiếp hợp với các chủng vi khuẩn nhận; gây u bướu ở cây; thực hiện cắt và cải biên DNA.

Tóm lại, các đặc tính sinh học cơ bản của plasmid là khả năng tái bản, tính tiếp hợp, xâm nhập và không phù hợp, loại trừ bề mặt và các tính trạng kiểu hình tạo ra cho vi khuẩn.

* Di truyền F-Plasmid và thiết kế F'-Plasmid

Plasmid F là episome tiếp hợp của tế bào *E.coli* K₁₂ có sự kiểm tra chặt chẽ tái bản. Kích thước DNA vòng của nó khoảng 94.500 cặp nucleotide. Lọt vào tế bào, plasmid này thay đổi đặc điểm kiểu hình của chúng. Tế bào hình thành lông, cũng như tính nhạy cảm với phage MS2, f1 và f2, trở nên các vật cho DNA, ngừng đảm bảo sự phát triển phage T3 và T7. Khi các tế bào này tiếp hợp thì sự xâm nhập DNA cho (donor) vào chúng bị bao vây.

Operon tra chịu trách nhiệm về tính tiếp hợp của F-plasmid. Các gen từ *tra A* đến *tra G* đảm bảo sự hình thành lông F, nhờ chúng mà có sự tiếp xúc sơ cấp của tế bào cho và tế bào nhận. Gen từ *tra T* và *tra S* chịu trách nhiệm cho sự loại trừ bề mặt, còn *tra MDIZ* - cho sự chuyển DNA vào tế bào nhận. Việc này thực hiện bằng cách đưa đoạn đứt một sợi ở site oriT vào và chuyển sợi từ đầu E' vào tế bào nhận sao cho operon tra chuyển vào sau cùng. DNA đã chuyển và phần còn lại lập tức biến thành hai sợi.

Ở các plasmid việc thể hiện operon tra được kiểm tra một cách dương tính bởi gen *tra J*. Còn ở nhiều plasmid tương tự F nó bị ức chế bởi repressor có hai tiểu đơn vị mã hóa bởi gen *Fin O* (protein không đặc trưng cho loại plasmid này) và gen *Fin P* (protein đặc trưng). Repressor tác động lên operater tra O của gen *tra J* và ngăn chặn việc tổng hợp sản phẩm của nó, nhờ vậy mà đồng thời bao vây việc thể hiện của toàn bộ operon tra. Operon tra của F-plasmid không bị ức chế, bởi vì nó không có gen *Fin O*. Nếu trong tế bào đồng thời có các F-plasmid và các plasmid tương tự F thì sản phẩm của gen *Fin O* loại plasmid tương tự F này tạo nên repressor với sản phẩm của gen *Fin P* của F-plasmid và operon tra của nó bị ức chế.

Tại vùng genom F-plasmid với tọa độ 40.000-50.000 cặp nucleotit có các gen và các vị trí chịu trách nhiệm cho việc tái bản sinh dưỡng và phân bố các phân tử DNA plasmid cho các tế bào con. Vùng này, tách khỏi DNA quy định yếu tố F, vẫn giữ nguyên các đặc tính tái bản và đặc tính không phù hợp của plasmid ban đầu. Bởi vậy người ta gọi nó là mini F-plasmid. Trong đó có hai điểm khởi đầu (ori – site) còn có gen *rep*, sản phẩm của nó rất cần cho việc tái bản, cũng như các locus *inc B* và *inc C* kiểm tra việc tái bản.

Các sản phẩm do vùng par mã hóa làm nhiệm vụ phân bố DNA cho các tế bào con. Nó mở hai gen *sop* và locus *inc D*. Có lẽ, qua locus này, DNA plasmid gắn với màng sinh chất. Hiện tượng không phù hợp ở F-plasmid là do locus *inc B* và *inc C* quyết định. Chúng tiến hành bao vây việc tái bản DNA plasmid, còn locus *inc D* bao vây quá trình phân bố nó. Hai quá trình tạo nên tính không phù hợp của plasmid này hoạt động hoàn toàn độc lập với nhau.

Trong F-plasmid bên cạnh vùng par có gen *pif*, sản phẩm của nó làm cho ngừng việc phát triển phage T3 và T7 trong tế bào. Các phân tử IS2, IS3 và Tn 1000 có trong DNA plasmid là các thành phần cấu trúc đảm bảo việc xâm nhập của F-plasmid vào nhiễm sắc thể của vi khuẩn. Chúng tác động tương hỗ với các phân tử của DNA plasmid qua site tái tổ hợp đặc trưng hay tái tổ hợp phụ thuộc RecA và gắn vào nó ở các chỗ khác nhau, theo các hướng khác nhau phụ thuộc vào vị trí và nhiều hướng của các phân tử vi khuẩn.

Sau khi DNA F-plasmid xâm nhập vào, tế bào trở thành tế bào Hfr, nghĩa là có khả năng với tần số cao chuyển các gen của mình một cách định hướng sang tế bào nhận. Đây là thí dụ về kỹ thuật gen in vivo tiến hành trong tự nhiên nhờ plasmid. Một thí dụ khác có thể là sự hình thành F'-plasmid, nghĩa là các F-plasmid chứa các gen vi khuẩn. Các plasmid này khi sinh ra F-plasmid xâm nhiễm bị tách một cách ngẫu nhiên ra khỏi nhiễm sắc thể vi khuẩn. Vì vậy plasmid này không bị hư hỏng và như thế nó giữ nguyên các đặc tính tiếp hợp. Trên các F'-plasmid này DNA vi khuẩn và plasmid cách nhau bởi các đoạn lặp lại xuôi chiều của các phân tử IS. Nếu khi tách F'-plasmid khỏi các nhiễm sắc thể vi khuẩn mà operon tra bị mất đoạn (dù chỉ một phần) thì F'-plasmid hình thành cũng sẽ không còn khả năng tiếp hợp nữa. Trong mọi trường hợp, để giữ được khả năng tái bản, F'-plasmid phải còn nguyên vùng rep.

Tần số hình thành tức thời các F'-plasmid từ tế bào Hfr không quá 10^{-5} . Vì vậy, người ta đã hoàn thiện một số phương pháp để tách chúng một cách chọn lọc. Một trong những phương pháp đó là phương pháp Loy. Nội dung của nó là tiến hành tiếp hợp các tế bào Hfr có F-plasmid cư trú tại các gen cần thiết, với các tế bào F⁻-recA⁻ chứa các biến dị cần cho việc chọn lọc các F'-plasmid. Ở đây trong một số tế bào nhận xảy ra việc tái bản đoạn cho của nhiễm sắc thể, nghĩa là nó thành replicon tự lập nhờ có chứa các gen F-plasmid. Các tế bào có các replicon cần thiết (F'-plasmid) được

phát hiện trên môi trường chọn lọc, ở đây biến dị *recA* loại trừ sự lựa chọn các thể tái tổ hợp. Bằng cách này đã tạo nên tập hợp các F'-plasmid bao trùm toàn bộ nhiễm sắc thể tế bào *E. coli*.

Người ta hoàn thiện một phương pháp thuận lợi hơn để thu nhận plasmid chứa cá gen vi khuẩn. Phương pháp này sử dụng phage Mu. Khi sinh sản sinh dưỡng trong tế bào các phage này tạo nên các phân tử dị gen (heterogen) vòng. Chúng dài 150 ngàn đôi nucleotit chứa các đoạn DNA vi khuẩn và nhiễm sắc thể phage. Nếu trong tế bào vào lúc xâm nhiễm bởi phage hoặc cảm ứng (induction) prophage có mặt plasmid tiếp hợp ở trạng thái độc lập hoặc gắn đoạn, thì nó sẽ tạo nên cointegrate với phân tử DNA dị gen vòng như F'-plasmid. Người ta giữ plasmid này bằng cách tiếp hợp các tế bào đã chết với các tế bào F⁻-*recA*⁻. Nhờ cách này người ta thu nhận các plasmid-F' chứa bất kỳ phức hợp nào các gen vi khuẩn, vì cointegrate có thể gồm một vài phân tử DNA dị gen vòng.

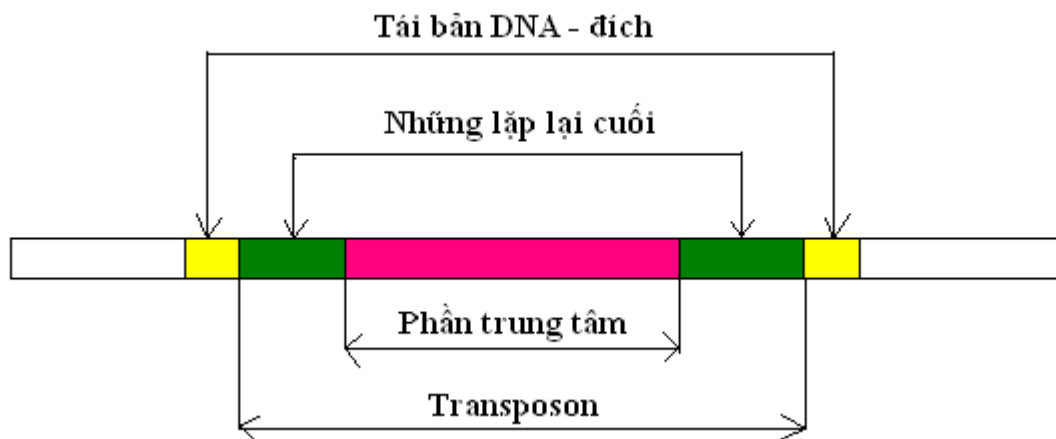
Việc chuyển đoạn DNA vi khuẩn nhờ plasmid tiếp hợp có thể thành công ngay cả trong trường hợp giữa chúng không có mối quan hệ bền. Thí dụ, F-plasmid khi tiếp hợp chuyển bất kỳ gen vi khuẩn nào với tần số khoảng 10^{-5} vào tế bào nhận, ở đây nó gắn nhờ DNA nhận, nhờ tái tổ hợp phụ thuộc *recA* không có trong plasmid. Hiện tượng này được gọi là sự điều động (mobilisation) nhiễm sắc thể tiến hành nhờ tái tổ hợp phụ thuộc *recF*.

2.6 Transposon

Những năm gần đây đã hình thành khái niệm tính không ổn định của bộ gen do các phân tử di truyền di động gây nên. Chúng là những đoạn DNA có khả năng di chuyển ngay bên trong và giữa các nhiễm sắc thể. Ở phần trung tâm các đoạn này thường là những lặp lại xuôi chiều hoặc ngược chiều. Cấu trúc như vậy có tên gọi là transposon. Transposon có nhiều đặc tính đặc hiệu, chúng có thể chuyển các đoạn DNA nằm giữa hai transposon và tạo nên trên DNA những đột biến phân cực, mất đoạn và đảo đoạn, chúng cũng có khả năng “bật” và “tắt” các gen bên cạnh chúng vì trên transposon có promoter và terminator phiên mã. Nhờ các đặc tính này mà transposon tiến hành việc điều hòa hoạt tính gen và phân hóa tế bào, đồng thời chúng đóng vai trò quan trọng trong tiến hóa của bộ gen.

2.6.1 Transposon vi khuẩn

Transposon vi khuẩn có khả năng chuyển vị nhờ cơ chế tái tổ hợp đặc hiệu. Cơ chế này đảm bảo việc gắn transposon vào DNA thể nhận và tạo nên sự mất đoạn, đảo đoạn và lặp đoạn, cũng như loại trừ chúng ra khỏi DNA. Mọi việc này đều do các enzyme có gen transposon mã hóa, thông qua các đoạn lặp lại xuôi hoặc ngược nằm ở đầu các transposon vi khuẩn. Độ dài và thành phần các đoạn lặp lại có thể khác nhau ở các transposon khác nhau, nhưng ở mỗi phân tử thì chúng gần như ổn định theo kiểu của mình, nghĩa là không thay đổi khi gắn phần tử này vào chỗ khác nhau. Đặc tính quan trọng của transposon vi khuẩn là ở cả hai đầu đều có bản sao xuôi của DNA nhận. Độ dài các bản sao này thường là 5 hoặc 9 cặp nucleotide và thường không đổi với mỗi phân tử cụ thể. Ở chỗ gắn từ bất kỳ nguồn nào, transposon được kéo thẳng ra bằng các bản sao với thành phần khác nhau.



Hình 2.10 Cấu trúc transposon vi khuẩn.

2.6.2 Phân loại transposon

Theo mức độ phức tạp của cấu trúc người ta phân làm ba loại transposon:

Phần tử IS (Insertion sequences): Có cấu trúc đơn giản nhất, ít hơn 2.000 cặp nucleotide. Chúng chỉ chứa các gen có khả năng di chuyển chúng vì vậy không đem lại cho tế bào kiểu hình nào dễ nhận thấy cả. Tất nhiên các phần tử IS, cũng như các transposon khác, có thể xâm nhập vào trong gen thực hiện các chức năng nhất định. Khi ấy có thể nhận biết sự hiện diện của chúng qua sự phá hủy chức năng.

Phần tử Tn (Transposon): Có cấu trúc phức tạp hơn trong thành phần của nó có hơn 2.000 cặp nucleotide. Chúng tạo tính kháng kháng sinh và muối kim loại nặng cho tế bào, chứa thông tin về việc tổng hợp enterotoxin, hemolysine, sự lên men lactosae về nguyên tắc là có thể mang bất kì gen nào.

Phage ôn hòa Mu: Là loại transposon phức tạp nhất. Khi làm tan vỡ tế bào có thể phát hiện chúng ở những điểm khác nhau của nhiễm sắc thể vi khuẩn, ở đây sự cư trú của prophage không thay đổi trong các dòng riêng. Trong trường hợp phát triển sinh dưỡng phage Mu, DNA của nó tái bản trong nhiễm sắc thể vi khuẩn và dần dần cách đoạn nó. Lúc này các bản sao DNA phage Mu còn có các gen quyết định sự phát triển sinh dưỡng và sự chín của nó. Như vậy phage Mu là loại transposon đặc biệt, vì nó ở dạng tồn tại ngoài tế bào.

Các transposon vi khuẩn phân biệt với nhau bằng mức độ hội nhập (intergration). Các phần tử Tn7, Tn9, IS4, IS5 có mức độ hội nhập cao. Các phần tử Tn10, IS1, IS2 có mức độ hội nhập trung bình. Các phần tử Tn2, Tn4, Tn5 và DNA phage Mu nói chung gắn vào các chỗ ngẫu nhiên của bộ gen. Tần số chuyển vị của các transposon vi khuẩn cũng biến đổi trong phạm vi rộng từ 10^{-7} – 10^{-4} . ở các điều kiện khác nhau thì nó phụ thuộc vào độ dài của transposon.

2.6.3 Cơ chế chuyển vị

Giữ nguyên bản sao transposon ở locus ban đầu, nhân đôi đoạn DNA thể nhận ở chỗ gắn transposon. Theo mô hình này, các transposon trong quá trình chuyển vị có khả năng tái bản (không tái bản các vùng DNA lân cận) và chuyển bản sao này xảy ra như sau: Ở đoạn tương ứng enzyme endonuclease đặc hiệu cắt các sợi DNA bổ sung ở chỗ cách nhau khoảng vài nucleotide, transposon xen vào giữa các đầu vừa hình thành, các đoạn một sợi sát cạnh nó nhờ DNA-polymerase sẽ xây dựng tiếp hai sợi và biến thành bản sao DNA đích. Các đầu lặp lại của transposon là các thành phần cấu trúc cần thiết cho sự chuyển vị (chỉ cần mất đoạn một phần các lặp lại hai đầu làm cho các phần tử IS và Tn mất khả năng chuyển vị). Còn cấu trúc của các bản sao đích không quan trọng đối với chuyển vị (thay một trong các sợi sao bằng thứ tự nucleotide bất kì nào đó không ảnh hưởng đáng kể đến đặc tính của transposon).

Các transposon vi khuẩn có 5 kiểu cải tổ: (1) Trước hết, các transposon khi chuyển sang phần bên cạnh của gen nhập vào DNA theo hướng xuôi chiều hoặc ngược chiều so với transposon ban đầu. Lúc này các transposon lân cận có hướng xuôi chiều tác động việc mất đoạn của vùng DNA nằm giữa chúng. (2) Sự đổi hướng dẫn đến sự nghịch chiều. (3) Ngoài ra còn thấy sự cùng xen đoạn ghép nối hai điểm tái bản. (4) Nó thường hoàn tất bằng việc phân hủy phần cùng xen đoạn và chuyển transposon đến điểm tái bản mới. (5) Cũng có thể xảy ra việc chuyển đoạn DNA nằm giữa hai transposon đến vùng khác của gen.

Bản chất của cơ chế chuyển vị là sự tái tổ hợp đặc hiệu, không phụ thuộc vào hệ tái bản của tế bào. Theo A. Campbell, 1980 tất cả các hệ tái tổ hợp đặc hiệu có thể chia thành hai kiểu: tái bản (replicative) và bảo thủ. Tái tổ hợp đặc hiệu đòi hỏi sự nhân đôi bắt buộc phân tử chuyển vị và thực hiện qua các đoạn đầu của chúng. Đối với sự tái tổ hợp đặc hiệu bảo thủ thì việc nhân bản gen tác động tương hỗ là không bắt buộc.

2.6.4 Ứng dụng của transposon

Transposon có ứng dụng rộng rãi trong di truyền phân tử, chúng đóng vai trò các vật gây đột biến (mutagene). Người ta thường dùng transposon Tn5 cho việc này. Nó không đặc hiệu lắm và vì vậy dễ chuyển đến nhiễm sắc thể, cũng như đến các yếu tố ngoài nhiễm sắc thể. Thông thường các transposon Tn1 và Tn3 chuyển vào các plasmid. Nếu chuyển đến các plasmid không lớn thì không có hậu quả phụ nào cả, nhưng nếu gắn vào plasmid lớn thường kèm theo sự mất đoạn các vùng lân cận của DNA plasmid.

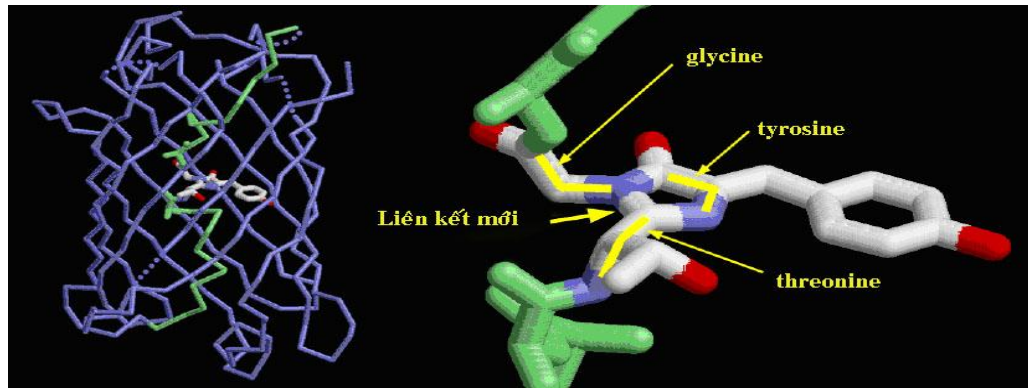
Điểm gắn transposon dễ phát hiện nhờ kính hiển vi điện tử DNA dị hợp (heteroduplex) hoặc sự phân tích cắt giới hạn và có thể dùng làm các điểm mốc để đo khoảng cách vật lý giữa các gen. Nhờ các transposon người ta tạo nên ở các chỗ cần thiết trên DNA các vùng đồng nhất (homology) cho sự tái tổ hợp phụ thuộc Rec A và các điểm cắt giới hạn phù hợp cho mục đích kỹ thuật di truyền.

Tính chất của DNA Mu tạo nên các đồng xâm nhập (cointegrate) được sử dụng để chuyển gen và thiết kế các plasmid tái tổ hợp đó là các mini-MU phage đã cắt bỏ in vivo hoặc in vitro chức năng ly giải.

2.7 Protein GFP

2.7.1 Cấu trúc và đặc điểm

GFP (Green Fluorescent Protein): là loại protein lần đầu tiên được tìm thấy vào năm 1974 như một hợp chất phát sáng – aequorin – có ở loài sứa jellyfish *Aequorea victoria* sống ở vùng nước lạnh biển bắc Thái Bình Dương .



Hình 2.11 Cấu trúc Protein GFP.

Là một hexapeptide có trọng lượng phân tử 27 kDa, cấu tạo từ 238 aa, với đặc tính đặc biệt là tại trung tâm hoạt động của nó có sự tự động đóng vòng của 3 aa Serine⁶⁵ – Tyrosine⁶⁶ – Glycine⁶⁷ (Serine có thể thay thế bằng Threonine). Khi chuỗi protein gấp lại đoạn nhỏ Ser – Tyr – Gly này được chôn sâu vào bên trong lúc này có nhiều phản ứng hóa học xảy ra. Glycine hình thành liên kết với Serine xảy ra phản ứng khử hydro tạo liên kết đôi hình thành một vòng mới với Tyrosine, nhưng tại sao Glycine lại hình thành liên kết với Serine tạo vòng 5 cạnh là điều mà chưa ai biết. Hydro được phóng thích kết hợp với oxy trong môi trường tạo phân tử nước (do đó vi sinh vật chuyển gen *gfp* phải nuôi cấy trong môi trường hiếu khí). Chính sự chen lấn của phân tử nước đã hấp thụ năng lượng của protein ngay khi nó hấp thụ photon ánh sáng, do đó phát lại cũng dưới dạng ánh sáng ở mức năng lượng thấp hơn. Chuỗi protein có cấu trúc hình trụ mà bộ 3 Ser – Tyr – Gly nằm ở phần lõi bên trong làm cho đặc tính này của protein rất bền.

Với đặc tính nổi bật như trên, gần đây gen *gfp* rất được quan tâm sử dụng như hệ thống marker gen, reporter gen cho những vi sinh vật biến đổi gen. Vì tính dễ phát hiện chỉ cần quan sát dưới kính hiển vi phát huỳnh quang (epifluorescence

microscopy), kính hiển vi tiêu cự laze (laser confocal microscopy), máy đếm tế bào (flow cytometry) và máy quang phổ đo huỳnh quang (spectrofluorimetry); tính ổn định cao, tồn tại lâu trong vi sinh vật không dễ mất đi như gen kháng kháng sinh; không cần co-enzyme như các hệ thống phát màu, phát ánh sáng hay phát huỳnh quang khác (Thí dụ như gen *lux* ở prokaryote hay gen *luc* ở eukaryote mã hóa cho sự hoạt động của enzyme luciferase cần các co-enzyme NADH cho *luc* hoặc FMNH₂ cho *lux* mà các co-enzyme này thì phụ thuộc nhiều vào năng lượng dự trữ của tế bào vi sinh vật), gen *gfp* xuất phát từ loài cá nên không có sẵn trong hệ thống gen của vi sinh vật như gen kháng kháng sinh, hay gen *lux* ... nên không xảy ra phản ứng dương tính giả khi kiểm tra. Ngoài ra với đặc tính dễ quan sát, độ chính xác cao, không phá hủy tế bào, không gây độc cho tế bào và có thể kiểm tra từng tế bào chỉ có 1 bản sao người ta dùng quan sát quá trình hoạt động bên trong khi vi sinh vật xâm nhập vào kí chủ (Thí dụ như quan sát *Agrobacterium*, *Rhizobium* khi nó kí sinh vào rễ cây), quan sát sự hình thành khuẩn lạc, mật độ tế bào qua các phase cũng tương đương cường độ phát sáng.

2.7.2 Tình hình nghiên cứu về gen *gfp*

Sử dụng gen *gfp* như một loại marker dùng kiểm tra sự sống sót của vi khuẩn *Pseudomonas* sp. UG14Gr có khả năng khoáng hóa phenanthrene trong đất nhiễm creosote (Deena Errampalli, 1998), gen *gfp* như một loại marker để nhìn thấy để kiểm soát vi khuẩn tổng hợp acid lactic trong hệ sinh thái phức tạp (Karen P. Scott, 1998), gen *gfp* như hệ thống marker và reporter trong vi khuẩn *Helicobacter* sp. (Christine Josenhans, 1998), gen *gfp* như một reporter biểu hiện gen, một marker sống nghiên cứu nấm *Phytophthora parasitica* kháng *nicotiana* gây bệnh trên cây thuốc lá (Arnaud Bottin, 1998)

Yeoung-Seuk Bae và Guy R. Knudsen, 1999 sử dụng Polyethylene-glycol đồng biến nạp gen tổng hợp β -Glucuronidase (GUS) và gen tổng hợp GFP (Fluorescent Protein Genes) vào nấm *Trichoderma harzianum* để kiểm soát sự tăng trưởng và hoạt động của nấm trong đất. Còn Pieter van West và cộng sự, 1999 sử dụng phương pháp biến nạp dựa trên CaCl₂ và PEG (Polyethylene-glycol) chuyển gen *gfp* và gen *gus* như một reporter gen nghiên cứu nấm *Phytophthora palmivora* gây bệnh trên thực vật.

M. Lowder và cộng sự, 2000 nghiên cứu tình trạng thiếu dinh dưỡng (Starvation), tình trạng sống nhưng không có khả năng tăng sinh (Viable-but-Nonculturable State)

có ảnh hưởng như thế nào đến khả năng phát sáng của vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* A506 đã được đánh dấu gen *gfp*

Janus A.J. và cộng sự, 2002 kiểm tra tại chỗ (In situ detection) việc chuyển gen theo chiều ngang của các yếu tố di truyền di động bằng cách xây dựng tổ hợp gen reporter *gfp* và promoter *lac* chuyển vào vi khuẩn. GFP phát ra những bước sóng màu khác nhau cho phép xác định hoạt động tăng trưởng, vị trí tế bào cho, tế bào nhận. Còn R. Bhatia, 2002 thì xây dựng marker *gfp* vào vi khuẩn *Bradyrhizobium* cho những nghiên cứu sinh thái về sự cạnh tranh, sống sót trên đất, trên môi trường chứa than đá. Trong năm 2003 thì Johan Goris đã nghiên cứu sự đa dạng của những vi khuẩn hoạt động công rãnh dựa trên plasmid pC1-gfp làm giảm khả năng sản xuất 3-chloroaniline.

Tina S. Boldt, 2004 đã nghiên cứu nhiều hệ thống reporter *gfp* khác nhau để kiểm soát hoạt động vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* F113 định cư trên rễ cây linh lăng phát triển qua nhiều giai đoạn tăng trưởng không phụ thuộc vào sự suy thoái 3-chlorobiphenyl. Trong năm đó Gejiao Wang và cộng sự sử dụng Real-time PCR để định lượng dòng *Pseudomonas putida* đánh dấu *gfp* trong quá trình suy giảm 2-chlorobenzoate trong đất. Đến Ninwe Maraha và cộng sự thì kiểm soát tình trạng sinh lý của vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* SBW25 đánh dấu *gfp* ở những điều kiện dinh dưỡng khác nhau trong đất bằng máy đếm tế bào (flow cytometry).

Chong Zhang và cộng sự, 2005 kiểm tra nhanh vi khuẩn *Enterobacter aerogenes* đánh dấu *gfp* trong điều kiện kỵ khí bằng phương pháp AFR (Aerobic fluorescence recovery)

Sơ qua tình hình nghiên cứu trên thế giới, chúng ta thấy gen *gfp* được sử dụng rộng rãi như hệ thống marker gen, reporter gen nhằm kiểm soát hoạt động của vi khuẩn trong nhiều môi trường khác nhau (đất, nước, không khí). Sau đây tôi xin nói sơ qua về hệ thống reporter gen và marker gen.

Hệ thống reporter gen:

Bất cứ một gen lạ nào được chuyển nạp, nó chỉ có thể được thể hiện khi có một chuỗi promoter thích hợp kèm theo nó. Việc chọn lọc promoter như vậy phải tuân theo trình tự: ở đâu, khi nào, bao nhiêu và trong điều kiện thể hiện như thế nào, việc sử dụng promoter như vậy cũng đòi hỏi cần có những vector tương ứng.

Một số promoter thông dụng:

35S	promoter của virus gây bệnh khảm rên cây cải bông.
Ubi	promoter “ubiquitin” của cây bắp.
RYMV	gen <i>RdRp</i> của virus gây bệnh vàng lá lúa ở Châu Phi.
Nos	promoter “nopaline Synthase” của <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
<i>hpr</i>	gen kháng hydromycine của <i>Streptomyces hygroscopicus</i> .
<i>uidA</i>	gen “ β -glucuronidase” của <i>Escherichia coli</i> .

Reporter gen có thể được sử dụng để xác định một chuỗi promoter đã được phân lập. Những gen có tính chất reporer như vậy đều mang trong nó chuỗi mã protein, rất dễ được phát hiện. Thí dụ: GFP của *Aequorea victoria* được xem qua kính hiển vi phát huỳnh quang; β -glucuronidase (GUS), một enzyme của *E. coli* có tính chất giống như β -galactosidase, phân giải hợp chất X-glucuronide cho sản phẩm thủy phân có màu xanh dương đậm.

Reporter gen có tính chất độc lập không phải gen hợp nhất vào bộ gen của cơ thể mới. Sự thể hiện ra “transient” của reporter gen có thể được sử dụng để khẳng định bằng phương pháp mô học (hisochemical) hoặc huỳnh quang (fluorimetric) như *uidA* của vi khuẩn mã hóa β -glucuronidase, phương pháp hóa xạ học (radiochemical) như CAT, chloramphenicol acetyltransferase, phương pháp quang hóa học (chemiluminescence) như *lux* của vi khuẩn hoặc *luc*, lucciferase của đom đóm.

Hệ thống marker gen

Marker gen là những gen dùng để chọn lọc. Các plasmid được sử dụng trong chuyển nạp gen chứa đựng bên trong nó: reporer gen và những marker gen mang tính chọn lọc. Điều này giúp chúng ta xác định những tế bào nào đã được chuyển nạp trên cơ sở tăng trưởng của chúng trong môi trường chọn lọc, tạo ra kết quả bất hoạt, hoặc không gây độc tính của hợp ngăn cản. Những marker chọn lọc có tính thông dụng nhất là gen kháng kháng sinh.

2.8 Phương pháp đánh dấu mẫu dò

Cơ sở của mẫu dò chính là đặc tính bắt cặp bổ sung của nucleic acid. Để phát hiện một trình tự xác định, ban đầu ta chỉ cần một bản sao trung thực của trình tự ấy, bản sao này được đánh dấu để dễ nhận biết và được gọi là mẫu dò. Qua sự lai của mẫu dò với trình tự bổ sung, ta có thể phát hiện, định vị được trình tự ấy trong bất kỳ hỗn hợp

nucleic acid nào. Tóm lại, mẫu dò có các đặc tính sau đây: (1) Tính chuyên biệt: Mẫu dò là một bản sao của một gen nhất định nên chỉ lai với gen đó. (2) Tính nhạy: Mẫu dò là một phân tử được đánh dấu nên dễ phát hiện và định lượng. Do các yêu cầu có tính kỹ thuật, người ta không dùng bản sao nguyên vẹn của một gen để tạo mẫu dò mà chỉ sử dụng một đoạn nhỏ của gen (Nguyễn Đình Huyền, 1998).

2.8.1 Phương pháp nick – translation

Nguyên tắc của phương pháp này như sau: DNase I sẽ cắt phân tử DNA ở nhiều vị trí tạo những lỗ thủng phân bố một cách ngẫu nhiên trên cả hai mạch. Từ những lỗ thủng này, DNA polymerase I một mặt “găm” dần mạch bị cắt theo chiều 5’ – 3’ (nhờ hoạt tính của enzyme exonuclease 5’ – 3’), mặt khác tổng hợp bù đoạn bị thiếu (nhờ hoạt tính polymerase). Do trong phản ứng có sự hiện diện của một loại nucleotide đánh dấu (thường là dATP) nên đoạn tổng hợp mới sẽ mang nhiều nucleotide đánh dấu. Kết quả cuối cùng DNA được đánh dấu trên khắp chiều dài phân tử (Kurt Weising và cộng sự, 1995; Hame và cộng sự, 1995; Lê Đình Lương, 2001).

2.8.2 Phương pháp random priming (thiết lập môi ngẫu nhiên)

Đầu tiên, mẫu dò được biến tính bằng nhiệt rồi làm lạnh đột ngột. Người ta thêm vào phản ứng một hỗn hợp các oligonucleotide tổng hợp (thường là hexa hoặc octanucleotide). Các hexanucleotide này tương ứng với tất cả các trình tự tổ hợp có thể có trên lý thuyết. Như vậy, chắc chắn một vài hexanucleotide trong số đó sẽ bắt cặp được với hai mạch đơn của mẫu dò. Lúc đó, chúng trở thành primer cho DNA polymerase hoạt động tổng hợp mạch bổ sung. Vì một trong bốn loại nucleotide thêm vào phản ứng được đánh dấu nên mạch mới tổng hợp cũng sẽ được đánh dấu. DNA polymerase thường sử dụng là đoạn Klenow của DNA polymerase I hoặc T7 DNA polymerase (Kurt Weising và ctv, 1995; Hame và ctv, 1995; Lê Đình Lương, 2001).

2.8.3 Phương pháp đánh dấu End labelling (đánh dấu ở đuôi)

Dùng cho hệ thống đánh dấu phóng xạ, trong kỹ thuật này enzyme polynucleotide kinase được sử dụng để chuyển nhóm phosphate nằm ở cuối ATP sang đầu 5’-hydroxyl của các phân tử nucleic acid. Nếu như ATP được đánh dấu phóng xạ, thì nó sẽ sản sinh ra nucleic acid được đánh dấu với hoạt tính đặc hiệu tương đối thấp, bởi vì

chỉ có đuôi của mỗi phân tử được đánh dấu phóng xạ (Kurt Weising và cộng sự, 1995; Hame và cộng sự, 1995; Lê Đình Lương, 2001).

2.8.4 Phương pháp photobiotin

Photobiotin có tên khoa học *N*- (4- azido- 2- nitrophenyl)- *N'*- (N- d- biotynyl- 3- aminopropyl)- *N''*- methyl- 1,3- propanediamine. Nó là một đồng phân của biotin miễn cảm với ánh sáng. Gốc có hoạt tính với ánh sáng “aryl azide” được gắn vào biotin thông qua một nhánh đã nạp năng lượng gọi là “linker”. Khi photobiotin phát quang với ánh sáng thấy được rất rõ, sự hiện diện của nucleotide đã được đánh dấu (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 2000). Phương pháp đánh dấu photobiotin là một phản ứng hóa học, không phải là một phản ứng enzyme. Vật liệu trong đánh dấu photobiotin bền hơn và rẻ hơn so với phản ứng enzyme. Đây là một phương pháp nên được áp dụng trong trường hợp sử dụng một số lượng lớn thể mẫu dò (mẫu dò) mà không cần phải quá nhạy cảm (Karcher, 1996).

2.9 Lai phân tử

2.9.1 Khái niệm về lai phân tử

Sau khi hai mạch của phân tử DNA tách rời nhau dưới tác động của nhiệt độ tại nhiệt độ biến tính (T_m), sự bắt cặp trở lại sẽ không xảy ra nếu nhiệt độ phản ứng hạ xuống đột ngột; lúc đó phân tử DNA sẽ tồn tại trong môi trường ở dạng mạch đơn dưới một cấu hình không gian vô trật tự. Ngược lại, nếu sau khi hai mạch tách rời, nhiệt độ được làm giảm từ từ cộng với điều kiện thí nghiệm thích hợp, hai mạch sẽ bắt cặp trở lại. Hiện tượng này gọi là sự lai phân tử (molecular hybridization), với hai đặc điểm sau: (1) Đặc hiệu tuyệt đối: Sự tái bắt cặp chỉ xảy ra giữa hai trình tự hoàn toàn bổ sung dẫn chứng chỉ có hai bản sao nằm lẫn giữa hàng triệu trình tự khác. (2) Các trình tự bổ sung có thể là DNA hay RNA, dẫn đến sự hình thành các phân tử DNA-DNA, RNA-RNA, hay các phân tử lai DNA-RNA.

2.9.2 Các yếu tố ảnh hưởng đến sự lai phân tử

- **Nồng độ DNA và thời gian phản ứng:** Để sự bắt cặp giữa hai mạch đơn xảy ra, các trình tự bổ sung phải tiến đến gần và ở vị trí đối diện nhau. Như vậy tần số bắt gặp giữa hai trình tự bổ sung sẽ quyết định quá trình tái bắt cặp. Ở một nhiệt độ xác định, hai chỉ tiêu ảnh hưởng đến tần số gặp gỡ là nồng độ DNA và thời gian phản ứng. Nồng

độ DNA, nghĩa là số lượng các trình tự bổ sung, càng cao thì xác suất chúng tiếp xúc với nhau càng tăng; kết quả là phản ứng lai phân tử tăng lên. Tương tự, thời gian phản ứng càng dài thì xác suất nói trên càng lớn hơn và số lượng phân tử lai tăng dần cho đến khi toàn bộ các trình tự bổ sung đều tái bắt cặp.

- Nhiệt độ: Tốc độ phản ứng lai phụ thuộc nhiệt độ. Thông thường tốc độ phản ứng lai cực đại ở nhiệt độ thấp hơn T_m của chính nucleic acid đó độ 25 %.
- Độ dài của các trình tự: Tốc độ lai tăng tỉ lệ thuận với căn bình phương của độ dài các trình tự bổ sung.
- Lực ion: Nồng độ NaCl 1M làm tăng tốc độ phản ứng lên từ 5 đến 10 lần. Nồng độ NaCl vượt quá 1,2 M phản ứng lai hoàn toàn không còn tác dụng.

2.9.3 Các kiểu lai phân tử

2.9.3.1 Lai trong pha lỏng

Các trình tự bổ sung (các mạch đơn) nằm trong môi trường lỏng là một dung dịch đậm. Sự lai phân tử xảy ra khi các trình tự này gặp nhau do chuyển động nhiệt và khi nhiệt độ môi trường thấp hơn T_m ít nhất vài độ. Trong thực tế, nhiệt độ lai được chọn thấp hơn T_m khoảng 15°C ; hơn nữa, người ta còn thêm formamide để làm giảm nhiệt độ lai. Đối với những trình tự ngắn, nhiệt độ lai được tính theo công thức đã nêu ở phần trên. Đối với các trình tự dài, nhiệt độ lai thông dụng là 42°C .

2.9.3.2 Lai trên pha rắn

Lai trên pha rắn có cùng nguyên tắc với lai trên pha lỏng. Điểm khác biệt ở đây là một trong hai trình tự bổ sung (thường là trình tự đích hay trình tự cần tìm) được cố định trên một giá thể rắn. Thuận lợi của việc sử dụng giá thể rắn là tạo dễ dàng trong thao tác và trong việc tách các trình tự không lai ra khỏi các phân tử lai. Mặt khác còn ngăn sự tái bắt cặp giữa hai mạch của cùng một phân tử. Bù lại việc phân tích định lượng các phân tử lai sau đó kém chính xác và hiệu quả lai thấp. Thật vậy, vận tốc lai trên pha rắn thấp hơn 10 lần so với vận tốc lai trong pha lỏng do một phần các nucleic acid được cố định trên giá thể bị che khuất, không tiếp xúc được với các trình tự bổ sung.

Trong rất nhiều ứng dụng của các phương pháp lai trên pha rắn, nổi bật lên ba phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất là: phương pháp Southern blot, Northern blot và dot blot. Trong đó phương pháp này cho phép định lượng tương đối một DNA đặc trưng trong một hỗn hợp DNA mà không cần phải phân tách chúng ra. Phương pháp này có thể được sử dụng cho RNA. Trong phương pháp này người ta không chuyển nucleic acid từ gel lên màng như phương pháp Southern blot hay Northern blot mà đặt trực tiếp một lượng mẫu nhỏ lên màng lai thành một điểm – dot. Quá trình lai và phát hiện phân tử lai giống như đề cập ở trên.

Phần 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1 Thời gian và địa điểm thực hiện khóa luận

Thời gian: Khóa luận được tiến hành từ tháng 02 năm 2006 đến tháng 08 năm 2006.

Địa điểm: Trung tâm Phân Tích Thí Nghiệm Hóa Sinh Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh và phòng 118, 105 Bộ Môn Bảo Vệ Thực Vật, Khoa Nông Học, Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh.

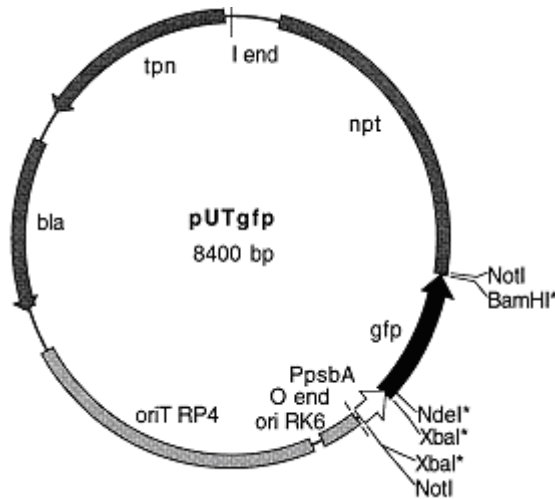
3.2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

3.2.1 Vật liệu thí nghiệm

3.2.1.1 Vi khuẩn *E.coli* DH5 α (λ -pir) chứa plasmid pUT-gfp

Trong thí nghiệm này sử dụng một biến thể của GFP, đó là thể đột biến P11 có sự thay đổi ở vị trí 167 aa Isoleucine thành aa Threonine làm thay đổi bước sóng kích thích lên mức tối đa từ 396 nm thành 471 nm trong khi không có sự thay đổi bước sóng phát ra 502 nm so với 508 nm của GFP bình thường.

Đoạn PpsbA – RBS – gfp được thiết kế như sau: Đoạn gfp (P11) được cắt ra từ plasmid pGEMEX-2(P11) sử dụng cặp enzyme cắt *NedI* – *BamHI*, sau đó được chèn vào sau vùng RBS (T7 gen 10) dài 35 bp của plasmid pET22b, lại tiếp tục được cắt ra bằng cặp enzyme *XbaI* – *BamHI*, đoạn này được chèn tiếp vào vùng MCS của plasmid pIC19H nhằm sử dụng những vị trí chèn này cho quá trình subclone. Promoter psbA là promoter cấu trúc, mạnh, phổ kí chủ rộng phân lập từ *Amaranthus hybridus*, cắt ra từ plasmid pRL427 bằng enzyme *XbaI*, đoạn 170 bp này được chèn vào vùng MCS nằm trước vùng RBS – gfp, lại được cắt ra bằng cặp enzyme *BglIII* – *BamHI* chèn vào plasmid pUC18Not, tiếp tục cắt ra bằng enzyme *NotI* và chèn vào plasmid pUT mini-Tn5 hình thành plasmid pUT-gfp.



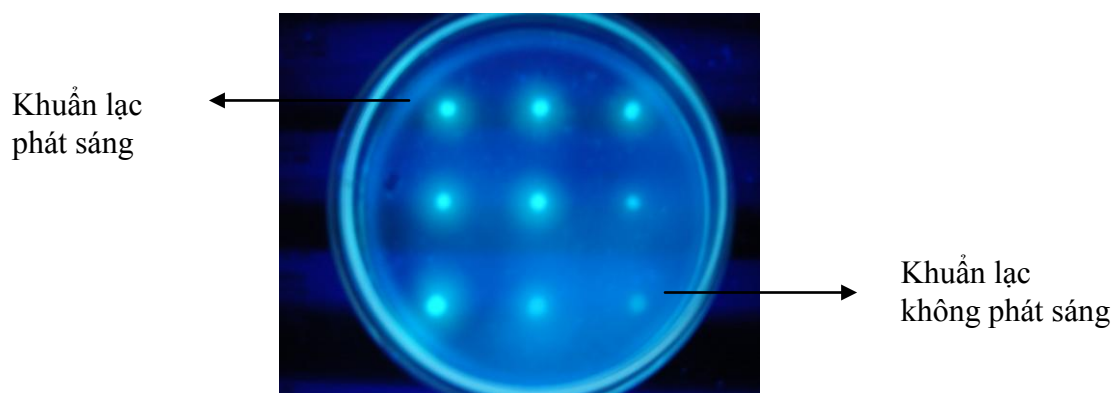
Hình 3.1 Cấu trúc plasmid pUT-gfp.

3.2.1.2 Vi khuẩn *E.coli* DH5 α (λ -pir) chứa plasmid pRK600

Plasmid pRK600 là một helper plasmid được sử dụng để huy động những plasmid lớn thông qua oriT, nó không tái bản lên, nhưng sau một thời gian cho phép biểu hiện gen vận chuyển RK2 (S.Klein) chứa các yếu tố *mob*⁺ và *tra*⁺.

3.2.1.3 Vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens*

Bộ mẫu *Pseudomonas fluorescens* được giữ - 70°C, do các anh chị trước đã phân lập và giữ nguồn. Các dòng được chọn từ bộ mẫu này được đem ra rã đông và tăng sinh trên môi trường LB. Các dòng được chọn dựa trên đặc tính: phát sáng mạnh trên môi trường KB, có tính đối kháng cao, có khả năng kí sinh trên rễ cây cà chua. Sau quá trình chọn lọc thấy dòng *Pseudomonas fluorescens* 73 tương đối tốt hơn những dòng *Pseudomonas fluorescens* khác.



Hình 3.2 Vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* nuôi trên môi trường KB sau 24 giờ.

Bảng 3.1 Đặc tính và nguồn gốc một số dòng vi khuẩn và plasmid liên quan trong thí nghiệm

Dòng và plasmid	Đặc tính	Nguồn
<i>E.coli</i> DH5 α (λ -pir)	Thi pro hsdR recA; chromosomal RP4; tra ⁺ ; Sm/Sp ^R	Simon và cộng sự, 1983
pRK2013	Km ^R ; ColE1 ori; RK2-mob; RK2-tra	Figurski, D. and Helinski, D.,1979
pRK600	ColE1 replicon with RK2 transfer region, helper plasmid; Cm ^R	Finan và cộng sự, 1986
pUTmini-Tn5	Ap ^R ; Km ^R ; delivery plasmid for mini-Tn5	Herrero và cộng sự ,1990
pUC18Not	Ap ^R ; lacZ; oriColE1; MCS flanked by NotI sites	Herrero và cộng sự ,1990
pGEMEX-2 (P11)	Ap ^R ; T7 promoter; contains P11	Heim và cộng sự, 1994
pET22B	Ap ^R ; lacI; f1 ori	Novagen, Madison, WI
pIC19H	Ap ^R ; lacZ	Marsh, J.L., Erfle, M. and Wykes, E.J. (1984)
pRL427	Ap ^R ; psbA promoter	J. Elhai and C.P. Wolk, unpublished
pUTgfp	Delivery plasmid for mini-Tn5::gfp; Ap ^R ; Km ^R ; oriT(PR4); oriRK6	Tombolini và cộng sự, 1997

Ap^R gen kháng Ampicillin

Km^R gen kháng Kanamycin

Sm^R gen kháng Streptomycin

Sp^R gen kháng Spectinomycin

3.2.2 Các thiết bị, dụng cụ

Máy điện di	Máy chụp gel
Máy lắc định ôn	Máy vortex
Máy chiếu tia UV	Kính hiển vi có chiếu huỳnh quang
Bồn nước ổn nhiệt (water bath)	Tủ cấy vô trùng (micro flow)
Tủ - 20°C, - 70°C	Tủ sấy dụng cụ
Nồi hấp (Autoclave)	Máy ly tâm
Máy đo Ph	Cân kỹ thuật
Ống nghiệm, đĩa petri	Eppendorf 1,5 ml, 200 µl
Micropipette (0.5-10 µl ; 10 - 100 µl; 100 - 1000 µl)	Pipet và đầu tip các loại

3.3 Phương pháp nghiên cứu

3.3.1 Phương pháp triparental mating tiếp hợp đoạn gen *gfp* vào vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* (có tham khảo từ bài báo của Paul D. Shaw tháng 1 năm 1997 trên tạp chí *Journal of bacteriology*)

Bước 1: Nuôi riêng 3 dòng vi khuẩn trong tủ lắc định ôn ở 28oC, tốc độ lắc 150 vòng/phút, để qua đêm.

- Vi khuẩn cho: Vi khuẩn *E.coli* DH5α (λ -pir) chứa plasmid pUT-gfp trong 5ml môi trường LB chứa Ampicillin (50 µg/ml) và Kanamycin (50 µg/ml)
- Vi khuẩn hỗ trợ: Vi khuẩn *E.coli* DH5α (λ -pir) chứa plasmid pRK600 trong 5 ml môi trường LB chứa Chloramphenicol (20 µg/ml)
- Vi khuẩn nhận: Vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* trong 5ml LB, tùy dòng mà có chứa loại và nồng độ kháng sinh thích hợp.

Bước 2: Hút lần lượt 3 dòng với tỉ lệ vi khuẩn cho: vi khuẩn hỗ trợ: vi khuẩn nhận = 1 : 1: 3 cho vào ependorf 1,5 ml, vortex kỹ, ly tâm 12.000 vòng/phút, 1 phút, 20oC. Thu sinh khối, rửa lại với 1 ml nước hấp vô trùng. Cho thêm vào eppendorf 100 - 200 µl nước hấp vô trùng hòa tan sinh khối, đem vortex kỹ.

Bước 3: Cấy dịch vi khuẩn lên đĩa môi trường KB, bằng cách sử dụng pipette nhỏ từng giọt (khoảng 1µl) lên môi trường ủ 6 – 24 giờ ở 28oC.

Bước 4: Sau khi khuẩn lạc hình thành, cho tiếp 1ml nước hấp vô trùng vào đĩa petri hòa tan các khuẩn lạc. Tiếp tục hút khoảng 100 µl dịch vi khuẩn sang đĩa môi

trường M9 (chứa Kanamycin 50 $\mu\text{g/ml}$) tráng đều trên bề mặt môi trường, ủ 12 – 48 giờ ở 28°C.

Chọn những khuẩn lạc thuần bằng cách sử dụng que tâm đã hấp, sấy.

- Cấy điểm sang đĩa môi trường M9 (chứa Kanamycin 50 $\mu\text{g/ml}$) để giữ mẫu dành cho xem kính hiển vi.

- Cấy sang 5ml môi trường LB (chứa Kanamycin 50 $\mu\text{g/ml}$) cho vào tủ lắc định ôn, nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút. Sau 48 giờ tăng sinh, dịch khuẩn thu được đem đi ly tâm để thu sinh khối.

3.3.2 Ly trích DNA tổng số từ các dòng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* đã tiếp hợp

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng phương pháp tách chiết DNA theo phương pháp sử dụng CTAB/NaCl đã có cải tiến, qui trình thực hiện như sau:

Bước 1: Sử dụng sinh khối vi khuẩn đã được tăng sinh ở trên để tiến hành ly trích genomic DNA.

Bước 2: Thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm 10000 vòng/phút, 5 phút, 4°C. Rửa sinh khối thu được với 1 ml nước cất hai lần vô trùng và đánh tan bằng vortex (3 lần).

Bước 3: Hoà tan sinh khối vi khuẩn thu được trong 567 μl dung dịch TE và đánh tan bằng vortex, thêm 30 μl dung dịch SDS 10% và đánh tan bằng vortex. Sau đó ủ ở 37°C khoảng 1 - 2 giờ.

Bước 4: Cho thêm vào 100 μl dung dịch NaCl 5M, hòa tan thật kỹ bằng vortex.

Bước 5: Thêm vào 80 μl dung dịch CTAB/NaCl (khoảng 1/10 thể tích). Pha trộn (đánh tan bằng vortex), ủ ở 65°C trong 10 phút.

Bước 6: Thêm 500 μl dung dịch hỗn hợp phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1; v/v) . Hòa lẫn đều bằng lắc tay, ly tâm ở 14.000 vòng/phút 10 phút 4°C.

Bước 7: Thu hết dung dịch bên trên (dung dịch DNA) cho vào ống ly tâm mới (nếu không thể phân biệt mặt phân cách chung giữa các dung dịch, có thể ly tâm lần nữa ở tốc độ lớn hơn).

Bước 8: Thêm 780 μl dung dịch hỗn hợp chloroform/isoamyl alcohol (24 : 1 ; v/v). Hòa lẫn đều bằng cách lắc tay, ly tâm 12.000 vòng/phút, 10 phút, 4°C.

Bước 9: Thu lấy dung dịch bên trên cho vào ống ly tâm mới (khoảng 500 μ l). Kết tủa DNA với isopropanol, dùng khoảng 0,6 thể tích của dung dịch (khoảng 300 μ l) và ủ ở tủ - 20°C, 30 phút. Sau đó ly tâm 12.000 vòng/phút, 10 phút, 4°C, lấy kết tủa sau khi ly tâm.

Bước 10: Rửa kết tủa bằng cồn 70% (khoảng 500 μ l). Tốt hơn có thể dùng ethanol 70% được làm lạnh ở - 20 °C, nghiêng nhẹ qua lại, ly tâm 13.000 vòng/phút, 10 phút, 4°C. Đổ cồn ra hết và làm khô bằng cách cho cồn bay hơi.

Bước 11: Hòa tan kết tủa trong 40 μ l dung dịch TE 1X, đem mẫu giữ ở tủ 4°C trong suốt thời gian thử nghiệm.

Kiểm tra kết quả ly trích genomic DNA

Chuẩn bị gel agarose 0,8%: Cân 0,1g agarose cho vào 12,5 ml TAE 0,5X, lắc nhẹ cho agarose phân tán đều, đem đun trong lò viba ở 650 W, 2 phút. Để nguội, đổ vào khuôn có gắn lược với số giếng mong muốn. Chờ gel đông (thường 30 phút), rút lược ra và bắt đầu tiến hành nạp mẫu.

Nạp mẫu, xác lập các thông số điện di và đọc kết quả: Hút 2 μ l genomic DNA đã ly trích ở trên, trộn đều với 2 μ l đệm tải mẫu (loading buffer) 6X, sau đó hút hỗn hợp dung dịch bơm vào giếng tương ứng với số mẫu đã xác lập trước của gel agarose 0,8%. Gel được đặt trong đệm TAE 0,5 X, hiệu điện thế 100 V, 250 mA và thời gian chạy là 15 phút. Sau đó, gel được lấy ra và nhuộm trong ethidium bromide 20 phút, rửa sạch và xem kết quả ly trích bằng máy Gel Doc 2.000, sử dụng phần mềm Quantity One 2.000 (Bio - Rad).

3.3.3 Phương pháp Dot Blot

3.3.3.1 Chuyển DNA lên màng

Bước 1: Chuẩn bị màng Hybond N kích thước 20 cm x 12 cm, dùng viết chì kẻ từng ô vuông 2 cm x 2 cm qua một lớp giấy mỏng chì để lại nét mờ, chừa 2 biên khoảng 2 cm để dễ thao tác.

Bước 2: Làm biến tính DNA: Cho 40 μ l DNA đã được pha loãng vào eppendorf 200 μ l, đun sôi mạnh trong 7 phút, chuyển nhanh lên đá giữ trong 2 phút. Cho tiếp

40 µl dung dịch đệm biến tính (NaOH 0,5M; NaCl 0,15M), vào eppendorf để 40 phút ở nhiệt độ phòng.

Bước 3: Chuyển lên màng. Hút 4 µl dung dịch DNA đã biến tính của từng mẫu lên từng ô, dùng máy sấy sấy khô ô này rồi mới làm ô tiếp theo, tránh để các mẫu tiếp xúc nhau.

Bước 4: Làm khô màng. Dùng kẹp giữ một góc màng và làm dấu bề mặt chứa DNA của màng. Đặt màng vào trong tủ sấy, màng được ủ ở 65°C trong khoảng 1 giờ cho đến khi các góc màng co lại.

Bước 5: Cố định DNA trên màng. Màng sau khi được làm khô, được đem xử lý dưới UV trong tủ GS GENE LINKER™ UV CHAMBER (Bio - Rad) trong 50 giây (chú ý bề mặt DNA của màng hướng lên).

Bước 6: Đổ vào khoảng 150 ml dung dịch đệm trung tính (Tris – HCl 0,5M; NaCl 0,15M; pH 7,0) vào một cái khay, cho màng vào lắc nhẹ trong 1 phút, có thể lặp lại. Màng được ủ ở 65 °C trong khoảng 1 giờ cho đến khi các góc màng co lại là được. Sau đó màng được đem ra để chuẩn bị lại (hoặc cũng có thể giữ lại trong hộp kín cho đến khi tiến hành lại).



Hình 3.3 Màng Hybon-N sau khi chuyển DNA lên màng.

3.3.3.2 Phương pháp ly trích DNA plasmid sử dụng SDS_kiểm (theo quy trình của Sambrook và cộng sự, 1989 có sửa đổi)

Bước 1: Hút dịch vi khuẩn cho vào eppendorf 1,5ml, ly tâm để thu sinh khối ở 10.000 vòng/phút, 5 phút, 20°C, lặp lại nhiều lần để thu hết dịch vi khuẩn. Rửa sinh khối bằng 1ml nước cất vô trùng .

Bước 2: Cho 150 ml dung dịch 1 vào eppendorf chứa sinh khối, vortex cho đến khi sinh khối vi khuẩn tan hết. Cho tiếp 150 ml dung dịch 2, đảo nhẹ. Sau đó thêm 150 ml dung dịch 3, đảo nhẹ. Ly tâm 12.000 vòng /phút, 10 phút, 20°C, thu dịch nổi cho vào eppendorf mới tương ứng.

Bước 3: Cho vào mỗi eppendorf 300µl phenol/Chloroform/isoamylalcohol (25:24:1), vortex đều, ly tâm 10.000vòng/phút, 5 phút, 20°C, thu dịch nổi cho vào các eppendorf mới tương ứng.

Bước 4: Cho vào mỗi eppendorf 300µl Chloroform/isoamylalcohol, lắc đều ly tâm 10.000 vòng/phút, 5 phút 20°C, thu dịch nổi cho vào eppendorf mới tương ứng.

Bước 5: Thêm vào mỗi eppendorf 300.µl Isopropanol, ủ ở -20°C trong 30 phút, sau đó ly tâm 13.000vòng/phút, 20 phút 4°C. Hút bỏ dịch nổi thu kết tủa.

Bước 6: Rửa tủa bằng cách cho 500 µl ethanol 70 % lạnh vào mỗi eppendorf ly tâm 13.000 vòng/phút, 10 phút 4°C. Hút bỏ dịch nổi thu kết tủa và làm khô bằng cách úp ngược trên giấy thấm.

Bước 7: Cho 40 µl TE vào mỗi eppendorf để hòa tan kết tủa.

Bước 8: Hút 2 µl DNA trộn đều với 2 µl loading dye chạy điện di trên agarose nồng độ 0,8 % trong 30 phút để xem kết quả tách chiết

3.3.3.3 Thực hiện đánh dấu đoạn DNA plasmid pUT-gfp

Sử dụng DNA plasmid pUT-gfp được ly trích từ vi khuẩn *E.coli* DH5α (λ -pir) chứa plasmid pUT-gfp có kích thước 8,4 kb để làm mẫu dò. Trước khi thực hiện phản ứng đánh dấu cần phải pha loãng dung dịch cross - linker thành dung dịch có nồng độ sử dụng, dung dịch này có thể bảo quản lạnh 2 – 8°C trong một tuần. Bên cạnh đó, DNA cũng cần phải được pha loãng với nước tới nồng độ 10 ng/µl dùng để đánh dấu (nồng độ muối trong mẫu DNA nên được giữ ở mức thấp nhất, không quá 50 mM). Thực hiện phản ứng đánh dấu theo kit của Amersham gồm các bước như sau:

Bước 1: Cho 10 µl DNA đã pha loãng vào eppendorf 200 µl và làm biến tính hoàn toàn bởi nhiệt độ bằng cách đun 5 – 7 phút trong nước đang sôi mạnh.

- Bước 2: Làm lạnh nhanh trên đá trong 5 phút, đem ly tâm nhanh ở tốc độ 4.000 vòng/phút, 30 giây để dồn dung dịch xuống đáy ống.
- Bước 3: 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.
- Bước 4: Thêm 2 μ l chất đánh dấu labelling reagent (có sẵn trong bộ kit), trộn nhẹ, đều.
- Bước 5: Thêm 10 μ l dung dịch phản ứng cross - linker. Trộn đều, ly tâm nhanh 4.000 vòng/phút, 30 giây để dồn hỗn hợp xuống đáy.
- Bước 6: Ủ 30 phút ở 37°C cho phản ứng xảy ra.
- Bước 7: Mẫu dò (mẫu dò) có thể được dùng ngay hoặc giữ trên đá đến 2 giờ. Trong trường hợp muốn bảo quản lâu hơn, mẫu dò đã đánh dấu được giữ trong 50 % glycerol ở - 15°C đến - 30°C trong 6 tháng (không cần xử lý gì thêm dung dịch mẫu dò này sau khi bảo quản).

3.3.3.4 Thực hiện phản ứng lai

Trước khi thực hiện phản ứng lai, xác lập nhiệt độ của buồng lai là 55°C, đồng thời làm nóng dung dịch đệm lai ở 55°C. Song song đó, chúng tôi tính toán các thông số sau:

Diện tích màng: $12 \times 16 = 192 \text{ (cm}^2 \text{)}$

Thể tích đệm lai: $0,25 \times 192 = 48 \text{ (ml)}$

Nồng độ mẫu dò cần: $10 \times 48 = 480 \text{ (ng)}$

Thể tích mẫu dò: $480 / 10 = 48 \text{ (}\mu\text{l)}$

Qui trình thực hiện phản ứng lai

Bước 1: Tiền lai. Khi nhiệt độ của buồng lai đạt ổn định ở 55°C và dung dịch đệm lai cũng đã được làm nóng đến 55°C, tiến hành rửa ống lai bằng nước cất vô trùng, sau đó bơm vào ống lai 40 ml dung dịch đệm lai. Dùng kẹp đặt màng vào ống lai sao cho bề không có DNA tiếp xúc với thành ống lai. Bên cạnh đó, dùng một ống lai khác cũng bơm vào đó 40 ml nước. Đặt hai ống lai vào buồng lai theo cách đối song, đẩy cửa buồng lai lại và điều chỉnh số vòng quay ở mức trung bình. Thời gian cho bước này là 15 phút.

Bước 2: Lai. Trộn 8 ml dung dịch đệm lai với 48 μ l mẫu dò, bơm hỗn hợp vào giữa ống lai (tránh nhỏ trực tiếp lên màng). Để phản ứng qua đêm (16 giờ).

Rửa màng sau khi lai

Trước khi rửa màng cần làm nóng dung dịch rửa 1 (primary wash buffer) đến 55°C.

Thực hiện rửa màng theo các bước sau:

Bước 1: Loại bỏ dung dịch đệm lai, thêm vào ống lai khoảng 20 ml dung dịch rửa

1. Nhiệt độ và số vòng quay của buồng lai giống như khi lai, thời gian rửa là 10 phút.

Bước 2: Lặp lại bước trên cũng trong 10 phút.

Bước 3: Loại bỏ dung dịch rửa 1, dùng kẹp gấp màng ra và cho vào hộp nhựa sạch với bề có DNA nằm trên. Cho vào đó dung dịch rửa 2 (secondary wash buffer) khoảng 50 ml, lắc nhẹ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.

Bước 4: Lặp lại bước trên trong 10 phút. Lúc này màng có thể được giữ trong dung dịch rửa 2 trong 30 phút để chuẩn bị cho bước phát hiện.

3.3.3.5 Phát hiện kết quả trên phim X - ray

Chuẩn bị màng với chất phát hiện CDP - Star

Màng sau khi được rửa lần 2, sẽ được phủ lên trên một lớp dịch của chất phát hiện, chất này làm cho các phân tử mẫu dò phát sáng. Các bước thực hiện như sau:

Bước 1: Dùng saran wrap trải trên một mặt phẳng nằm ngang, phẳng, có phủ một lớp khăn giấy.

Bước 2: Lấy màng từ trong dung dịch rửa 2 ra, phải ráo và đặt lên trên miếng saran wrap với bề có DNA hướng lên trên.

Bước 3: Hút 1 ml chất phát hiện CDP- Star nhỏ lên trên màng.

Bước 4: Dùng một tấm saran wrap khác phủ bề mặt màng, trải đều chất phát hiện bằng que thủy tinh, tránh để lại bọt khí.

Bước 5: Sau đó màng lai được lấy ra, và đặt ở giữa hai miếng saran wrap mới với kích thước phù hợp (chú ý trong quá trình thao tác với màng không để màng bị khô).

Ủ màng với phim trong cassette: Màng được đặt giữa Cassette 30 x 40 Konica, sau đó đặt một tấm phim Konica 30 x 40 cm lên trên màng tránh sự dịch chuyển của màng. Đặt cassette lại và tính thời gian ủ 30 phút hoặc 1 giờ (thường phản ứng sẽ có tín hiệu sáng tốt nhất sau 1 giờ từ khi cho chất phát hiện vào). Tùy theo tính chất mẫu

dò mà thời gian ủ phản ứng phát hiện khác nhau. Các thao tác trên được thực hiện trong buồng tối.

Rửa phim và làm khô: Khi đã hoàn thành giai đoạn ủ phim với màng, phim sẽ được đem ra khỏi cassette và ngâm trong dung dịch developer trong 5 phút. Sau đó, lấy phim ra và ngâm trong dung dịch fixer khoảng 3 phút. Cuối cùng đem phim ra rửa dưới vòi nước sạch và dùng kẹp treo lên giá làm khô ở nhiệt độ phòng. Chú ý các thao tác trên đều được thực hiện trong buồng tối, khi phim đã ngâm xong trong dung dịch fixer có thể đem phim ra ngoài sáng để rửa dưới vòi nước.

3.3.4 Quan sát vi khuẩn trên kính hiển vi

Nhỏ một giọt nước hấp vô trùng lên lam, dùng que tâm chấm vào khuẩn lạc rồi hòa đều vào giọt nước đây lame nghiêng 45° quan sát dưới vật kính 10X, 20X, 40X, 100X (có giọt dầu). Chiếu dưới tia có bước sóng lam (BW – Blue Wavelength).

Phần 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Kết quả

4.1.1 Kết quả tiếp hợp đoạn gen *gfp* vào vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens*

4.1.1.1 Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường LB

Môi trường LB là môi trường dinh dưỡng dùng để tăng sinh vi khuẩn.

Kết quả nuôi cấy ở các thời gian khác nhau 16 giờ, 20 giờ, 24 giờ. Cho thấy kết quả nuôi cấy sau 16 giờ thì khả năng tiếp hợp cao nhất.

Cho thấy các dòng vi khuẩn này có chu kỳ tương đương nhau. Khi Các dòng vi khuẩn cùng bước vào pha cấp số thì trên vách tế bào hình thành những đặc điểm thích hợp cho tiếp hợp (như hình thành cầu tiếp hợp từ vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận).

4.1.1.2 Nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường KB

Môi trường KB là môi trường dinh dưỡng cho các dòng vi khuẩn tiếp hợp.

Hút dịch vi khuẩn cho: vi khuẩn hỗ trợ: vi khuẩn nhận ở các tỷ lệ:

1: 1: 1 = 500 μ l: 500 μ l: 500 μ l

1: 1: 2 = 400 μ l: 400 μ l: 800 μ l

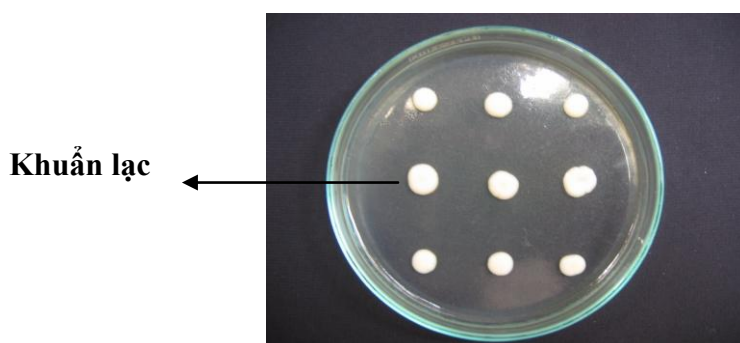
1: 1: 3 = 300 μ l: 300 μ l: 900 μ l

1: 1: 4 = 200 μ l: 200 μ l: 800 μ l

1: 1: 5 = 200 μ l: 200 μ l: 1000 μ l

Kết quả hút dịch vi khuẩn ở tỷ lệ 1: 1: 3 cho thấy khả năng tiếp hợp cao nhất. Trong khi theo quy trình đề nghị thì ở tỷ lệ 1: 1: 1 cho kết quả cao nhất điều này rút ra tùy vào dòng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* khác nhau, điều kiện môi trường khác nhau mật độ vi khuẩn phát triển cũng khác nhau, vì không thực hiện thí nghiệm đo OD mật độ từng dòng vi khuẩn nên ta không thể biết chính xác mật độ vi khuẩn.

Thời gian nuôi cấy trên môi trường KB từ 6 – 24 giờ, thời gian nuôi chung này càng lâu cho thấy khả năng tiếp hợp càng cao.

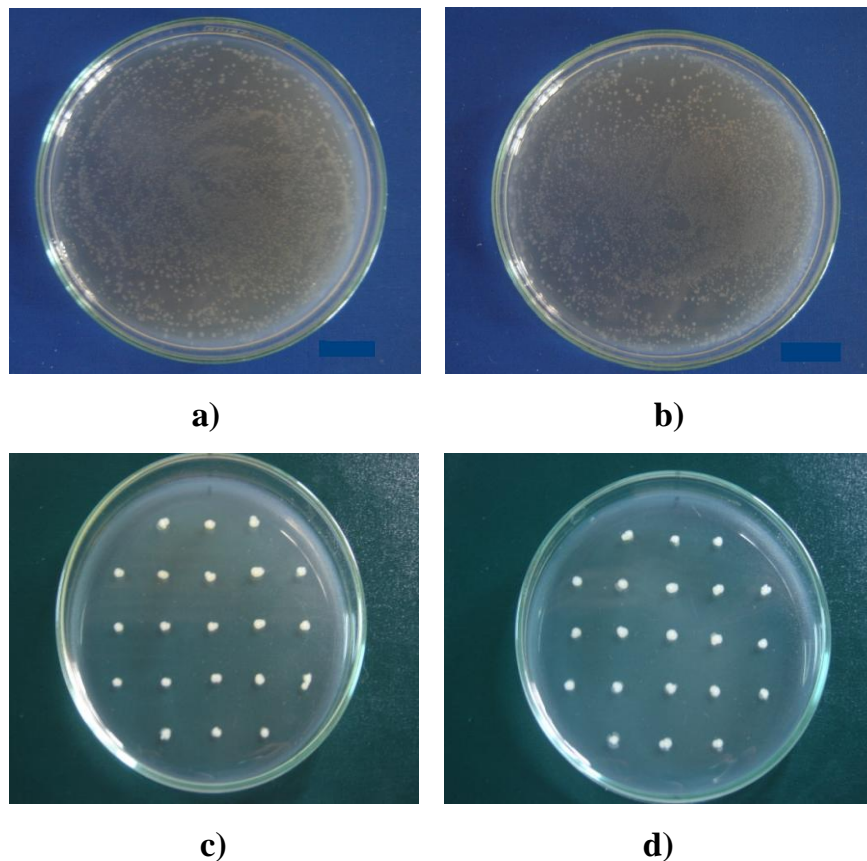


Hình 4.1 Kết quả cấy vi khuẩn trên môi trường KB sau 24 giờ.

4.1.1.3 Nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường M9

Môi trường M9 là môi trường tối thiểu dùng để chọn lọc riêng từng dòng vi khuẩn. Mật độ dịch vi khuẩn cấy từ môi trường KB sang môi trường M9 càng loãng thì khuẩn lạc mọc càng rời rạc thuận lợi cho việc chọn lọc. Do đó ta có thể tiến hành pha loãng nhiều lần hoặc cấy riêng từng khuẩn lạc bằng phương pháp cấy điểm để được mật độ vi khuẩn thích hợp.

Thường khoảng sau 12 giờ xuất hiện những khuẩn lạc li ti là có thể cấy chuyển tiếp.



Hình 4.2 Kết quả cấy trên môi trường M9.

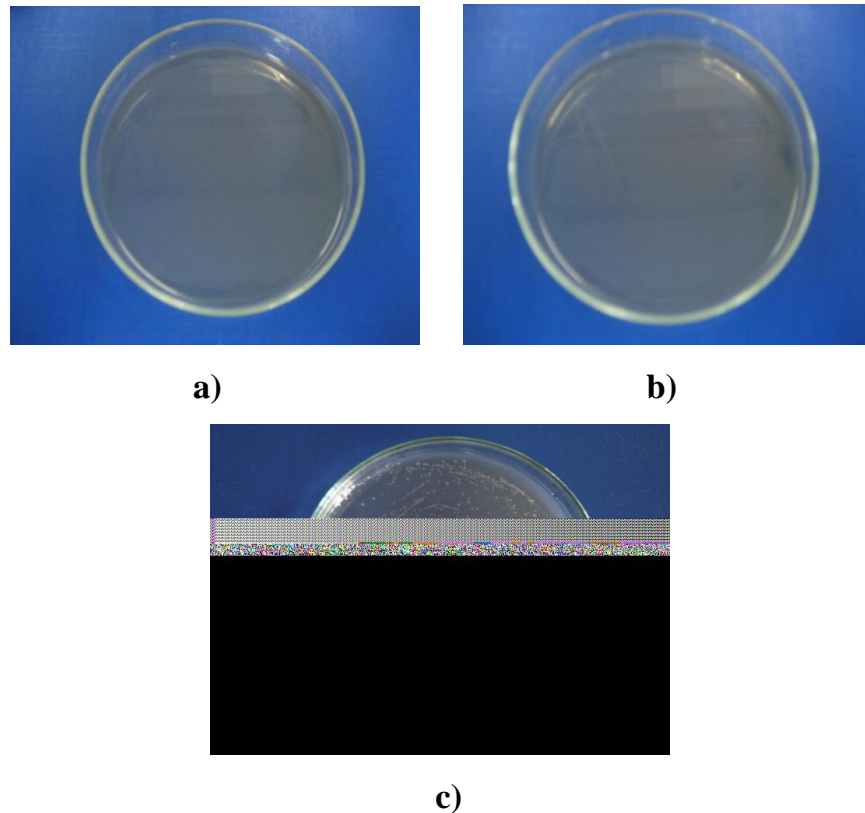
*(a), (b) Kết cấy vi khuẩn trên môi trường M9 sau 12 giờ;
 (c), (d) Kết quả cấy chuyển bằng phương pháp cấy điểm để
 được khuẩn lạc tách rời trên môi trường M9.*

Hình (a), (b) cho thấy khuẩn lạc mọc li ti dày đặc rất khó cho việc chọn lọc để tách riêng từng dòng đem kiểm tra gen *gfp* đã chuyển bằng phương pháp Dot Blot rồi xem lại trên kính hiển vi.

4.1.1.4 Kết quả làm đối chứng:

Đối chứng tiến hành đồng thời và tương tự theo các bước của quy trình tiếp hợp, nhưng 3 dòng vi khuẩn cho, vi khuẩn hỗ trợ, vi khuẩn nhận được nuôi riêng qua 3 môi trường LB, KB, M9.

Kết quả không có sự khác biệt đến môi trường M9, thì trên đĩa môi trường chỉ có vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* hình thành khuẩn lạc. Điều này cho thấy môi trường M9 với kháng sinh Km, không phải là môi trường chọn lọc thích hợp nhất cho dòng *Pseudomonas fluorescens* đã được tiếp hợp vì sau khi tiếp hợp trên đĩa môi trường M9 sẽ có 2 dòng *Pseudomonas fluorescens* đã được tiếp hợp và dòng *Pseudomonas fluorescens* không tiếp hợp, không có khả năng tách riêng dòng *Pseudomonas fluorescens* đã được tiếp hợp.

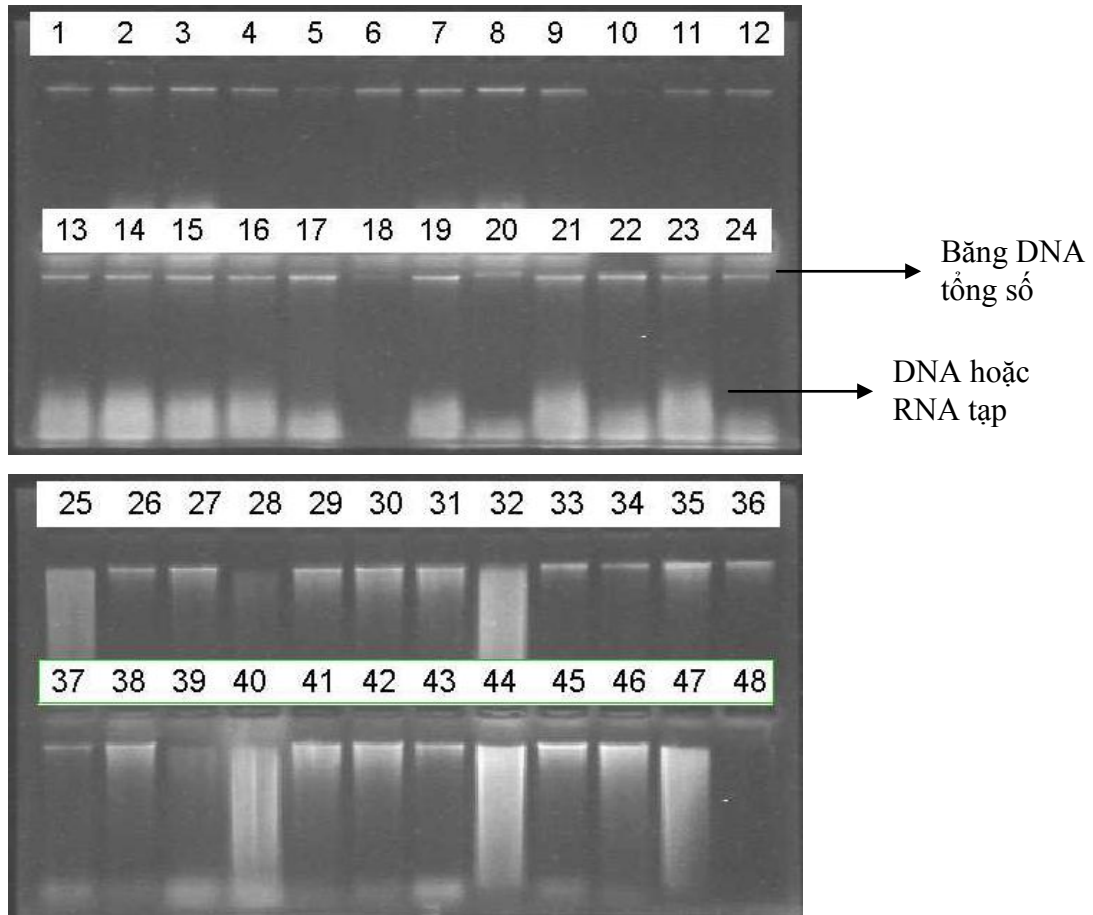


Hình 4.3 Kết quả đối chứng trên môi trường M9.

- (a) Dòng vi khuẩn *E.coli* DH5 α (λ -pir) chứa plasmid pUT-gfp;
 (b) Dòng vi khuẩn *E.coli* DH5 α (λ -pir) chứa plasmid pRK600;
 (c) Dòng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* .

4.1.2 Kết quả ly trích DNA tổng số từ các dòng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* đã tiếp hợp

Các dòng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* được tăng sinh trên môi trường LB 48 giờ ở 27°C. Sau 48 giờ nuôi cấy, các dòng đều cho sinh khối. Chúng tôi đã ly trích được 48 dòng



Hình 4.4 Kết quả ly trích genomic DNA đã pha loãng từ các dòng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* đã tiếp hợp.

Kết quả pha loãng của mẫu 5,10,18, 28, 39 cần tăng nồng độ DNA trong mẫu pha loãng lên gấp đôi. Mẫu 48 khi ly trích thì có băng nhưng pha loãng lại không có băng sáng cần pha loãng lại để được nồng độ tương đương với các mẫu khác

Các vệt sáng kéo dài phía dưới DNA tổng số có thể là RNA hoặc DNA bị đứt gãy. Lỗi này có thể do thao tác, khi thu phần dịch nổi chứa DNA, tôi đã hút lẫn phần cặn bên dưới, hoặc do thao tác quá mạnh nên làm đứt gãy DNA. Mặt khác, trong qui trình

này tôi không sử dụng men RNase và protein K để loại bỏ các phân tử RNA và protein còn lẫn tạp trong mẫu. Tuy nhiên, do yêu cầu sử dụng mẫu DNA ly trích không cần đạt độ tinh khiết cao, không cần hiệu chỉnh chính xác nồng độ DNA nên không cần đo OD hoặc sử dụng phân tử Mass, chỉ cần lượng DNA trong các mẫu đều nhau, vì thế với kết quả có được vẫn đảm bảo điều kiện để tôi thiết lập qui trình. Từ thực nghiệm, tôi rút ra được những điểm cần lưu ý trong quá trình ly trích:

- Dụng cụ ly trích cần khử trùng cẩn thận để phòng ngừa sự tạp nhiễm.
- Mang bao tay, khử trùng tay cẩn thận bằng cồn 70 % trước khi tiến hành ly trích.
- Bước thu sinh khối vi khuẩn rất dễ xảy ra sự tạp nhiễm giữa các mẫu với nhau, nên khử trùng tay cẩn thận khi thực hiện với những mẫu khác nhau.
- Thao tác nhẹ nhàng trong khi ly trích, thao tác mạnh có thể làm đứt gãy DNA.
- Thu dung dịch DNA chỉ hút phần dịch nổi, không nên hút lẫn phần cặn phía dưới.
- DNA phải được làm khô hoàn toàn trước khi hòa tan với TE.
- Eppendorf chứa mẫu DNA phải sạch.
- Hóa chất ly trích như: phenol / chloroform / isoamyl alcohol; CTAB có khả năng gây độc cho người sử dụng, khi sử dụng và pha chế phải thực hiện trong buồng hút.
- Khi nhuộm gel và đọc kết quả ly trích, không được tiếp xúc trực tiếp ethidium bromide và tia UV.

Kết quả điện di các mẫu có lượng DNA tương đối đều nhau, được sử dụng làm mẫu DNA để tiến hành chuyển lên màng lai thực hiện phương pháp Dot Blot

4.1.3 Kết quả thực hiện phản ứng lai Dot Blot



Hình 4.5 Kết quả lai.

Kết quả lai 48 mẫu DNA cho thấy có 13 mẫu cho kết quả dương tính, đó là các mẫu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 17, 20, 27, 31, 44. Trong đó các mẫu 3, 4, 6, 7 mờ hơn các mẫu khác cho thấy sự bất cập giữa mẫu dò và DNA ít hơn các mẫu khác. Có thể là số bản sao *gfp* được chuyển trong 4 mẫu này ít hơn, mà chỉ dựa vào phương pháp Dot Blot ta không thể biết chính xác số bản sao đã chuyển, đây cũng là khuyết điểm của phương pháp này. Có thể tiến hành thêm phương pháp Southern Blot sử dụng đoạn gen *gfp* là mẫu dò để biết chính xác số bản sao đã chuyển.

Những điều cần lưu ý khi thực hiện chuyển DNA đến màng lai

1. Mang bao tay không phấn, sử dụng kẹp không răng khi thao tác với màng lai.
2. Cắt một góc màng để đánh dấu mặt có DNA.
3. Làm khô màng hoàn toàn trước khi chiếu dưới tia UV, màng có thể được làm khô ở nhiệt độ 80°C hoặc có thể làm khô ở nhiệt độ phòng qua đêm.

Những lưu ý trong quá trình lai

1. Dung dịch lai phải được làm nóng đến nhiệt độ lai trước khi tiến lai.
2. Khi đặt màng vào dung dịch lai, màng phải được thấm ướt hoàn toàn, giữa màng lai và thành ống lai không được có bọt khí.
3. Không nên cho mẫu dò trực tiếp lên màng lai. Không được biến tính mẫu dò trước khi sử dụng.
4. Nhiệt độ lai có thể dao động trong khoảng 50°C - 70°C. Nhiệt độ lai dưới 50°C chỉ thích hợp cho những mẫu dò ngắn. Không nên lai ở nhiệt độ trên 85°C.

Lưu ý khi rửa màng lai

1. Dung dịch rửa 1 phải làm nóng đến nhiệt độ lai.
2. Sau khi rửa bằng dung dịch rửa 2, màng có thể để ở nhiệt độ phòng khoảng 30 phút trước khi phát hiện.

Lưu ý trong khi phát hiện

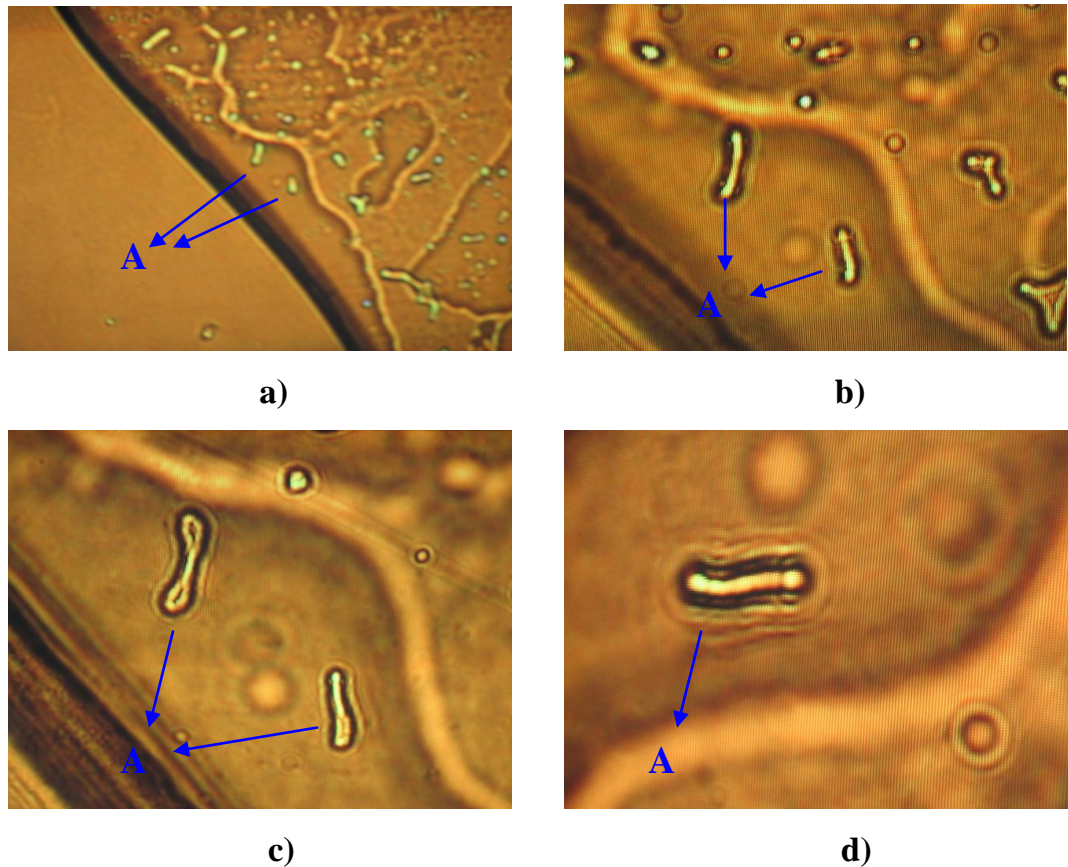
1. Tác nhân phát hiện nên được chuyển qua một tip sạch với lượng thích hợp cho mỗi lần sử dụng. Không được làm bẩn tác nhân phát hiện.
2. Màng đặt trong saran wrap không được có bọt khí. Nếu có bọt khí, cần loại bỏ bằng cách dùng que thủy tinh gạt nhẹ nhàng trên bề mặt màng, tác nhân phát hiện còn dư cũng được loại bỏ.

3. Không được dịch chuyển phim khi đặt phim lên trên màng. Kéo dài thời gian tiếp xúc phim với màng lai sẽ làm cho phần nền của phim bị đậm màu hoặc có thể làm phim bị đen hoàn toàn.

Chú ý khi rửa phim phát hiện

1. Khi lấy phim ra khỏi màng lai, phải thực hiện trong buồng tối, không được cho phim tiếp xúc với ánh sáng.
2. Vì phim rất nhạy với ánh sáng nên buồng tối rửa phim phải đảm bảo tối hoàn toàn. Dung dịch rửa phim phải pha đúng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Khi thực hiện rửa phim không nên để phim tiếp xúc với thành chứa dung dịch.

4.1.4 Kết quả xem trên kính hiển vi phát huỳnh quang Olympus BX51

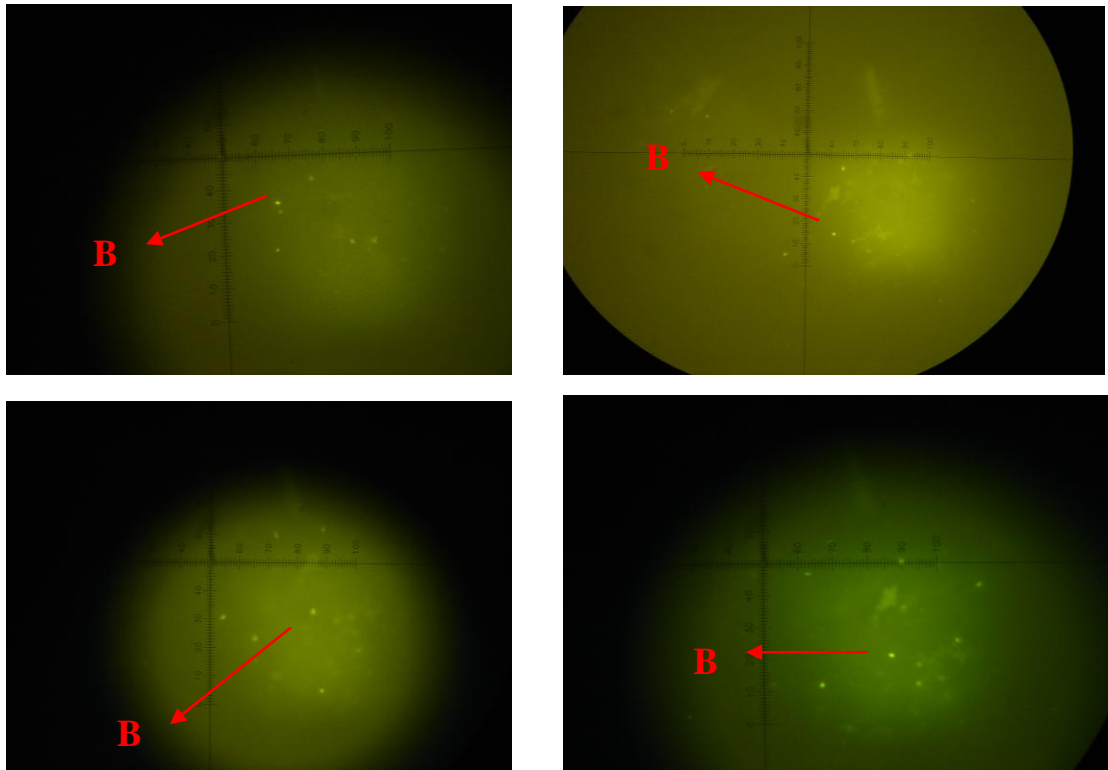


Hình 4.6 Vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* chụp qua màn hình monitor.

(a) Chụp ở vật kính 10X; (b) Chụp ở vật kính 20X;

(c) Chụp ở vật kính 40X; (d) Chụp ở vật kính 100X

A: Vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* dưới các độ phóng đại khác nhau.



Hình 4.7 Vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* phát sáng dưới tia UV được chụp qua thị kính.

B :Vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* chứa gen *gfp* phát sáng dưới tia UV.

Trong 13 mẫu có kết quả lai dương tính thì chỉ có 4 mẫu phát sáng dưới tia UV, còn 9 mẫu là không phát sáng. Điều này có thể do nhiều nguyên nhân, có thể chia ra hai trường hợp:

- Trong 9 mẫu lai cho kết quả dương tính đó vốn cũng không có gen *gfp*. Do khi thực hiện phản ứng Dot Blot, chúng tôi đã sử dụng toàn bộ plasmid pUT-gfp để làm mẫu dò mà plasmid pUT-gfp là một loại plasmid lớn (8,4 kb) và có thể trong quá trình tiếp hợp những đoạn được chuyển từ vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận chỉ là một phần của plasmid pUT-gfp mà lại không chứa đoạn gen *gfp* thì vẫn xảy ra sự bắt cặp giữa mẫu DNA và mẫu dò (phản ứng dương tính giả).
- Trong 9 mẫu lai cho kết quả dương tính đó vốn có gen *gfp* nhưng lai không biểu hiện ra kiểu hình điều này phụ thuộc vào promoter (hoặc xảy ra sự im lặng gen – giải thích ở phần phụ lục), có thể do trong quá trình tiếp hợp promoter đã không được

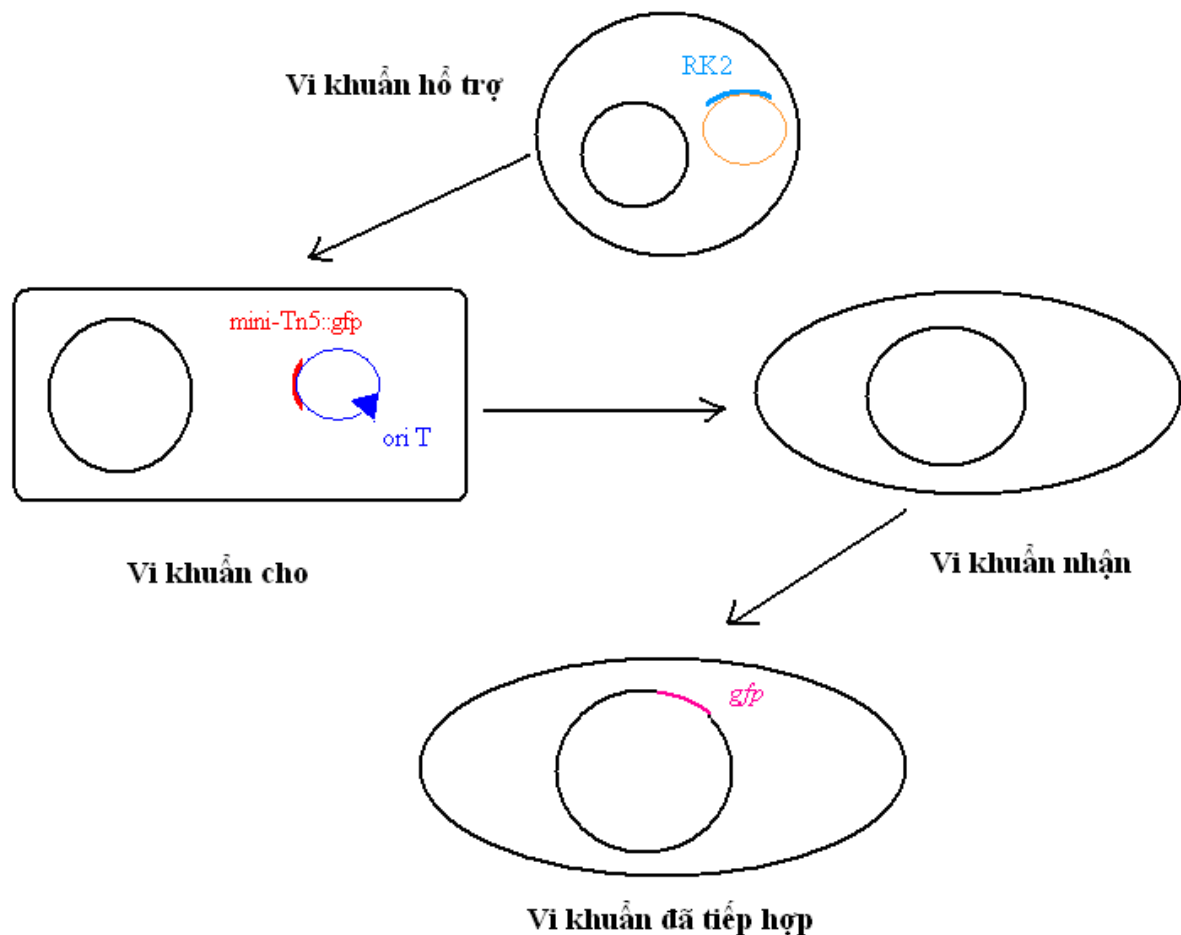
chuyên, hoặc chỉ chuyên một phần nên mất đi hoạt tính, hoặc được chuyển toàn bộ nhưng lại gặp một yếu tố ức chế rong vi khuẩn nhận làm promoter bất hoạt.

4.2 Thảo luận

Cơ chế quá trình tiếp hợp ba thành phần

Vi khuẩn hỗ trợ có plasmid pRK600 chứa vùng hỗ trợ chuyển gen RK2 chứa các yếu tố tra^+ mob^+ giúp vi khuẩn cho hình thành cầu tiếp hợp và chuyển gen vào vi khuẩn nhận.

Vi khuẩn cho sử dụng hệ thống transposon mini-Tn5 đột biến hai lần mang gen *gfp* để chuyển gen. Đây không phải hệ thống chuyển gen đặc hiệu nó có thể xâm nhập bất kì vị trí nào trong bộ gen vi khuẩn nhận, cũng có thể tồn tại ngoài bộ gen (nhưng trường hợp này vi khuẩn thường chết do sự nhân lên quá nhiều của gen lạ)



Sơ đồ 4.1 Cơ chế quá trình tiếp hợp ba thành phần.

Phương pháp tiếp hợp ba thành phần (triparental mating)

1. Nuôi riêng 3 dòng vi khuẩn trong tủ lắc định ôn ở 28°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, trong 16 giờ.

- Vi khuẩn cho: Vi khuẩn *E.coli* DH5 α (λ -pir) chứa plasmid pUT-gfp trong 5ml môi trường LB chứa Ampicillin (50 μ g/ml) và Kanamycin (50 μ g/ml)

- Vi khuẩn hỗ trợ: Vi khuẩn *E.coli* DH5 α (λ -pir) chứa plasmid pRK600 trong 5 ml môi trường LB chứa Chloramphenicol (20 μ g/ml)

- Vi khuẩn nhận: Vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* trong 5ml LB, tùy dòng mà có chứa loại và nồng độ kháng sinh thích hợp

2. Hút lần lượt 3 dòng với tỉ lệ vi khuẩn cho: vi khuẩn hỗ trợ: vi khuẩn nhận = 1 : 1 : 3 = 300 μ l: 300 μ l: 900 μ l cho vào ependorf 1.5 ml, vortex kỹ, ly tâm 12.000 vòng/phút, 1 phút, 20°C. Thu sinh khối, rửa lại với 1 ml nước hấp vô trùng. Cho thêm vào ependorf 100 - 200 μ l nước hấp vô trùng hòa tan sinh khối, đem vortex kỹ.

3. Cấy dịch vi khuẩn lên đĩa môi trường KB, bằng cách sử dụng pipet nhỏ từng giọt (khoảng 1 μ l) lên môi trường ủ 24 giờ ở 28°C.

4. Sau khi khuẩn lạc hình thành, cho tiếp 1ml nước hấp vô trùng vào đĩa petri hòa tan các khuẩn lạc. Tiếp tục hút khoảng 100 μ l dịch vi khuẩn sang đĩa môi trường M9 (chứa Kanamycin 50 μ g/ml) trang đều trên mặt đĩa, ủ 12 giờ ở 28°C.

Chọn những khuẩn lạc riêng biệt, sử dụng que tâm đã hấp, sấy

- Cấy điểm sang đĩa môi trường M9 (chứa Kanamycin 50 μ g/ml) để giữ mẫu dành cho xem kính hiển vi.

- Cấy sang 5ml môi trường LB (chứa Kanamycin 50 μ g/ml) cho vào tủ lắc định ôn, nhiệt độ 28°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút. Sau 48 giờ tăng sinh, dịch khuẩn thu được đem đi ly tâm để thu sinh khối.

Ly trích DNA plasmid

1. Hút dịch vi khuẩn cho vào ependorf 1,5 ml, ly tâm để thu sinh khối ở 10.000 vòng/phút trong 5 phút ở 20°C, lặp lại nhiều lần để thu hết dịch vi khuẩn. Rửa sinh khối bằng 1 ml nước cất vô trùng .

2. Cho 150 ml dung dịch 1 vào eppendorf chứa sinh khối, vortex cho đến khi sinh khối vi khuẩn tan hết. Cho tiếp 150 ml dung dịch 2, đảo nhẹ. Sau đó thêm 150 ml dung dịch 3, đảo nhẹ. Ly tâm 12.000 vòng /phút trong 10 phút ở 20°C, thu dịch nổi cho vào eppendorf mới tương ứng.
3. Cho vào mỗi eppendorf 300µl phenol/Chloroform/isoamylalcohol (25:24:1), vortex đều, ly tâm 10.000vòng/phút trong 5 phút ở 20°C, thu dịch nổi cho vào các eppendorf mới tương ứng.
4. Cho vào mỗi eppendorf 300µl Chloroform/isoamylalcohol, lắc đều ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút ở 20° C, thu dịch nổi cho vào eppendorf mới tương ứng.
5. Thêm vào mỗi eppendorf 300µl Isopropanol, ủ ở -20°C trong 30 phút, sau đó ly tâm 13.000vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Hút bỏ dịch nổi thu kết tủa.
6. Rửa tủa bằng cách cho 500 µl ethanol 70% lạnh vào mỗi eppendorf ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Hút bỏ dịch nổi thu kết tủa và làm khô bằng cách úp ngược trên giấy thấm.
7. Cho 40 µl TE vào mỗi eppendorf để hòa tan kết tủa.
8. Hút 2 µl DNA + 2 µl loading dye chạy điện di trên agaose nồng độ 0,8% trong 30 phút để xem kết quả tách chiết.

Tạo mẫu dò đánh dấu từ sản phẩm DNA plasmid

1. Cho 10 µl DNA đã pha loãng vào eppendorf 200 µl và làm biến tính hoàn toàn bởi nhiệt độ bằng cách đun 5 – 7 phút trong nước đang sôi mạnh.
2. Làm lạnh nhanh trên đá trong 5 phút, đem ly tâm nhanh ở tốc độ 4.000 vòng / 30 giây để dồn dung dịch xuống đáy ống.
3. Thêm 10 µl 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.
4. Thêm 2 µl chất đánh dấu labelling reagent (có sẵn trong bộ kit), trộn nhẹ, đều.
5. Thêm 10 µl dung dịch phản ứng cross-linker. Trộn đều, ly tâm nhanh 4.000 vòng trong 30 giây để dồn hỗn hợp xuống đáy.
6. Ủ 30 phút ở 37°C cho phản ứng xảy ra.

Ly trích DNA tổng số

1. Thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm 10.000 vòng / 5 phút / 4°C. Rửa sinh khối thu được với 1 ml nước cất hai lần vô trùng và đánh tan bằng vortex (2 – 3 lần).
2. Hoà tan sinh khối vi khuẩn thu được trong 567 µl dung dịch TE, đánh tan bằng vortex, thêm 30 µl dung dịch SDS 10% , đánh tan bằng vortex. Sau đó ủ ở 37°C khoảng 1 - 2 giờ.
3. Cho thêm vào 100 µl dung dịch NaCl, hòa tan thật kỹ bằng vortex.
4. Thêm vào 80 µl dung dịch CTAB / NaCl (khoảng 1/10 thể tích). Pha trộn (đánh tan bằng vortex), ủ ở 65°C trong 10 phút.
5. Thêm 500 µl dung dịch hỗn hợp phenol / chloroform / isoamyl alcohol (25: 24: 1; v/v). Hoà lẫn đều (lắc tay), ly tâm 10 phút ở 14.000 vòng, 4°C (hoặc 13500 vòng).
6. Thu dung dịch bên trên (dung dịch DNA) cho vào ống ly tâm mới (nếu không thể phân biệt bề mặt chung giữa các dung dịch, ly tâm lại lần nữa ở tốc độ lớn hơn).
7. Thêm 780 µl dung dịch hỗn hợp chloroform / isoamyl alcohol (24: 1; v/v). Hoà lẫn đều bằng cách lắc tay, ly tâm 12.000 vòng / phút 10 phút, 4°C.
8. Thu lấy dung dịch bên trên cho vào ống ly tâm mới (khoảng 500 µl). Kết tủa DNA với isopropanol, dùng khoảng 0,6 thể tích của dung dịch (khoảng 300µl) và ủ ở - 20°C / 30 phút. Sau đó ly tâm 12000 vòng / phút, 10 phút, 4°C, lấy kết tủa sau khi ly tâm.
9. Rửa kết tủa bằng ethanol 70 % (khoảng 500 µl) lạnh, nghiêng nhẹ qua lại, ly tâm 13.000 vòng / phút, 10 phút, 4°C. Đổ ethanol ra hết và làm khô bằng cách cho cồn bay hơi.
10. Hoà tan kết tủa trong 40 µl dung dịch TE, đem mẫu giữ ở tủ mát 4°C.
11. Hút 2 µl DNA + 2 µl loading dye chạy điện di trên agaose nồng độ 0.8% trong 30 phút để xem kết quả tách chiết.

Chuyển DNA lên màng

1. Chuẩn bị màng Hybond N kích thước 20cm x 12cm, dùng viết chì kẻ từng ô vuông 2cm x 2cm qua một lớp giấy mỏng chỉ để lại nét mờ, chừa 2 biên khoảng 2cm để dễ thao tác.

2. Làm biến tính DNA

Cho 40 μ l DNA đã được pha loãng vào eppendorf 200 μ l, đun sôi mạnh trong 7 phút, chuyển nhanh lên đá giữ trong 2 phút.

Cho tiếp 40 μ l dung dịch đệm biến tính (NaOH 0,5 M; NaCl 0,15 M), vào eppendorf để 40 phút ở nhiệt độ phòng.

3. Chuyển lên màng

Hút 4 μ l dung dịch DNA đã biến tính của từng mẫu lên từng ô, dùng máy sấy sấy khô ô này rồi mới làm ô tiếp theo, tránh để các mẫu tiếp xúc nhau.

4. Làm khô màng

Dùng kẹp giữ một góc màng và làm dấu bề mặt chứa DNA của màng. Đặt màng vào trong tủ sấy, màng được ủ ở 65 °C trong khoảng 1 giờ cho đến khi các góc màng co lại là được.

5. Cố định DNA trên màng. Cắt một góc màng để đánh dấu mặt có DNA trên màng nylon

Màng sau khi được làm khô, được đem xử lý dưới UV trong tủ GS GENE LINKER™ UV CHAMBER (Bio - Rad) trong 50 giây (chú ý bề mặt DNA của màng hướng lên

6. Đổ vào khoảng 150 ml dung dịch đệm trung tính (Tris – HCl 0,5 M; NaCl 0,15 M; pH 7,0) vào một cái khay, cho màng vào lắc nhẹ trong 1 phút, có thể lặp lại .

Màng được ủ ở 65 °C trong khoảng 1 giờ cho đến khi các góc màng co lại là được. Sau đó màng được đem ra để chuẩn bị lại (hoặc cũng có thể giữ lại trong hộp kín cho đến khi tiến hành lại).

Thực hiện phản ứng lai

1. Cho 48 ml dung dịch lai vào ống lai và làm nóng đến 55°C trong tủ lai.

2. Đặt màng lai vào dung dịch lai đã làm nóng và tiền lai 15 phút trong ống lai.
3. Cho 48 μ l mẫu dò đã đánh dấu vào ống lai.
4. Quá trình lai được thực hiện 16 giờ trong tủ lai.

Rửa màng sau khi lai

1. Cho 40 ml dung dịch rửa 1 vào bình tam giác sạch và làm nóng đến 55°C.
2. Đổ hết dung dịch lai trong ống lai ra, cho 40 ml dung dịch rửa 1 vào ống lai. Rửa màng lai bằng dung dịch rửa 1 khoảng 10 phút ở 55°C trong tủ lai.
3. Lấy hết dung dịch rửa 1 trong ống lai ra. Rửa màng lai lần thứ 2 bằng dung dịch rửa 1 mới với thời gian và nhiệt độ như trên.
4. Cho dung dịch rửa 2 vào khay sạch, chuyển màng lai vào dung dịch rửa 2, lắc nhẹ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.
5. Đổ hết dung dịch rửa 2, cho vào khay dung dịch rửa 2 mới, tiếp tục rửa màng trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.

Phát hiện sản phẩm lai trên phim

Mang bao tay không phấn trước khi tiến hành.

1. Đổ bỏ dung dịch rửa 2 đi và đặt màng lên tấm Saran wrap (mặt có DNA hướng lên trên)
2. Hút 2ml tác nhân phát hiện cho lên màng. Sau đó phủ tấm Saran wrap lên trên màng. Dùng que thủy tinh gạt nhẹ trên bề mặt màng sao cho tác nhân phát hiện trải đều trên màng trong 5 phút.
3. Bao kín màng bằng tấm saran wrap khác. Đặt màng vào cassette (mặt có DNA hướng lên trên).
4. Trong phòng tối, đặt phim lên trên màng và đậy cassette lại. Thời gian để phim tiếp xúc với màng là 30 phút ở nhiệt độ phòng.
5. Rửa phim, ngâm phim trong dung dịch developer 5 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó chuyển phim sang dung dịch fixer, ngâm 3 phút ở nhiệt độ phòng.
6. Lấy phim ra và phân tích kết quả.

Phần 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1 Kết luận

Chúng tôi đã bước đầu xây dựng được quy trình tiếp hợp đoạn gen *gfp* vào dòng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* bằng phương pháp tiếp hợp ba thành phần và kiểm tra lại bằng phương pháp Dot Blot rồi quan sát dòng vi khuẩn đã chuyển gen *gfp* trên kính hiển vi phát huỳnh quang.

5.2 Đề nghị

Một số hướng phát triển của đề tài

Trong đề tài tuy đã thiết lập được quy trình tiếp hợp bằng phương pháp triparental mating nhưng tần số tiếp hợp vẫn chưa cao, cần khảo sát về các yếu tố nhiệt độ môi trường, pH, thời gian nuôi cấy, tốc độ lắc, nhiệt độ, mật độ vi khuẩn ... có ảnh hưởng như thế nào đến quá trình tiếp hợp và loại môi trường chọn lọc riêng biệt cho vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* sau khi tiếp hợp.

Có thể tiến lên phương pháp Southern Blot sử dụng đoạn gen *gfp* làm mẫu dò để kiểm tra chính xác số bản sao gen *gfp* đã chuyển.

Khảo sát đặc tính kháng nấm, kí sinh trên rễ của vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens* sau khi tiếp hợp có bị ảnh hưởng hay không bằng cách chạy PCR đoạn 2,4-DAPG kết hợp chạy sắc kí, chủng lại lên rễ quan sát trên kính hiển vi phát huỳnh quang.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang, 1999. *Di truyền phân tử những nguyên tắc cơ bản trong chọn giống cây trồng*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp Thành Phố Hồ Chí Minh.
2. Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang, 2000. *Di truyền phân tử những nguyên tắc cơ bản trong chọn giống cây trồng (Quyển II: Chuyển nạp gen)*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp Thành Phố Hồ Chí Minh.
3. Bùi Chí Bửu, Nguyễn Thị Lang, 2005. *Sinh học phân tử giới thiệu phương pháp và ứng dụng*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp Thành Phố Hồ Chí Minh.
4. Khuất Hữu Thanh, 2003. *Cơ sở di truyền phân tử kỹ thuật gen*. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật.
5. Lê Minh Kha, Nguyễn Văn Lắm, 2005. *Thiết lập quy trình Southern Blot*. Khóa luận tốt nghiệp Kỹ sư Công Nghệ Sinh Học. Đại học Nông Lâm Thành Phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.
6. Nguyễn Duy Bình, 2004. *Chọn lọc và đánh giá dòng vi khuẩn Pseudomonas fluorescens đối kháng với nấm Rhizoctonia solani gây hại trên cây bông vải*. Khóa luận tốt nghiệp Kỹ sư Nông Học. Đại học Nông Lâm Thành Phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.
7. Nguyễn Đình Huyền, 1999. *Những điều cơ bản của kỹ thuật di truyền*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp Thành Phố Hồ Chí Minh.
8. Phạm Duy, Huỳnh Văn Thái, 2005. *Xây dựng quy trình biến nạp đoạn DNA vào tế bào vi khuẩn E. coli DH5 α* . Khóa luận tốt nghiệp Kỹ sư Công Nghệ Sinh Học. Đại học Nông Lâm Thành Phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.
9. Phạm Mỹ Liên, 2004. *Chọn lọc và đánh giá dòng vi khuẩn Pseudomonas fluorescens đối kháng với nấm Sclerotium rolfisii gây bệnh trên cây cà chua*. Khóa luận tốt nghiệp Kỹ sư Nông Học. Đại học Nông Lâm Thành Phố Hồ Chí Minh, Việt Nam.

10. Tô Minh Châu, Vương Thị Việt Hoa, Vũ Thị Lâm An, Lâm Thanh Hiền, Nguyễn Thị Ngọc Diệp, Nguyễn Thúy Hương, 2000. *Bài giảng vi sinh vật học đại cương*. Trường Đại học Nông Lâm Thành Phố Hồ Chí Minh

Tài liệu tiếng nước ngoài

11. Christine Josenhans, Susanne Friedrich and Sebastian Suerbaum, 1998. Green fluorescent protein as a novel marker and reporter system in *Helicobacter* sp. *FEMS Microbiology Ecology* 161: 263 – 273.
12. Lixia Liu and Paul D. Shaw, 1997. Characterization of *dapB*, a gene required by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* BR2.024 for lysine and tabtoxinine- β -lactam biosynthesis. *Journal of Bacteriology* vol. 179: 507 – 513.
13. Marta Herroero, Victor de Lorenzo and Kenneth N. Timmis, 1990. Transposon vector containing non-antibiotic resistance selection marker for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 72: 57 – 6567.
14. Riccardo Tombolini, Arnika Unge, Marry Ellen Davey, Frans J. de Bruijn and Janet K. Janson, 1997. Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 22: 17 – 28.
15. Sambrook Joseph and Rusell W. David, 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Volume 1. 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
16. Turlough M. Finan, Barbara Kunkel, Guido F. de Vos and Ethan R. Signer, 1986. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *Journal of Bacteriology* 167: 66 - 72.
17. Zhang Liqun, 2001. Studies on biological control mechanism with *Pseudomonas fluorescens* FPT9601. Ph. D. Thesis, The Graduate school of Science and Technology Kobe University.

18. Zhou Hengyou, Wei Hailei, Liu Xili, Wang Ye, Zhang Liqun and Tang Wenhua, 2005. Improving biocontrol activity of *Pseudomonas fluorescens* through chromosomal integration of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis genes. *Chinese Science Bulletin* 50: 775 – 781.

Các Website

1. <http://www.emunix.emich.edu/~rwinning/genetics/glossary.htm>
2. http://www.rcsb.org/pdb/molecules/pdb42_2.html
3. <http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/>
4. <http://spot.colorado.edu/~klym/Methods/CS2.word>
5. [http://www.patentstorm.us/examiners/Kenneth R Horlick-1483241.html](http://www.patentstorm.us/examiners/Kenneth_R_Horlick-1483241.html)

PHỤ LỤC

Công thức pha một số môi trường dùng trong thí nghiệm

Môi trường LB (Luria – Bertain) lỏng

Tryptone	10g
Bacto yeast extract	5g
NaCl	10g

Thêm nước cho tới 1000ml

Chuẩn độ pH=7.0 bằng NaOH 1N

Hấp khử trùng ở 121⁰C trong 20 phút

Môi trường KB (King's B) agar

Proteose peptone	20g
Glycerol	15ml
K ₂ HPO ₄	1.5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.5g

Thêm nước cho tới 1000ml

Chuẩn độ pH=7.2 bằng NaOH 1N

Agar 15g

Hấp khử trùng ở 121⁰C trong 20 phút

Môi trường M9

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	6g
KH ₂ PO ₄	3g
NaCl	0.5g
NH ₄ Cl	1g

Thêm 950ml nước

Chuẩn độ pH=7.4 bằng NaOH 1N

Bacto agar 15g

Hấp khử trùng 121⁰C trong 20 phút, để nhiệt độ hạ xuống 60⁰C thêm

10ml Glucose 20% đã được lọc

1ml CaCl₂ 0.1M đã hấp khử trùng
 1ml MgSO₄ 1M đã hấp khử trùng
 50 µl Thiamine 100 µg/ml đã được lọc
 Thêm nước tới 1000ml

• **Các dung dịch stock kháng sinh**

Pha các dung dịch stock có nồng độ 100µg/µl

Cân 100 mg kháng sinh Ampicillin cho vào 1ml nước hấp vô trùng trong eppendorf 1,5 ml, trộn đều rồi lọc qua đầu lọc 0.22 µm. Dung dịch kháng sinh được chiết ra các eppendorf 200µl. Cất ống eppendorf dùng thường vào tủ mát 5⁰C, các ống còn lại bảo quản trong tủ -20⁰C, tất cả các ống đều được bọc giấy bạc và bảo quản trong tối.

Pha tương tự cho Kanamycin. Còn Chloramphenicol cũng được pha tương tự nhưng thay nước bằng ethanol nguyên chất.

• **Các dung dịch dùng cho ly trích DNA plasmid**

Dung dịch 1

Tris – HCl (pH=8)	25mM
Glucose	50mM
EDTA	10mM

Dung dịch 2 (nên pha trước khi dùng)

Sodium dodecyl sulfat (SDS) 10%	100 µl
NaOH 5N	40 µl
Nước cất 2 lần	860 µl

Dung dịch 3

Glacial acetic	0.2M
Potassium acetat	0.2M

Dung dịch TE (pH=8)

Tris – HCl (pH=8)	10mM
EDTA (pH=8)	1mM

Loading dye

Bromophenol blue	0.25%
Glycerol trong TAE 1X	40%

• Các hóa chất ly trích DNA tổng số

SDS 10 %

NaCl 5 M

CTAB / NaCl

Chloroform / isoamyl alcohol (24 :1)

Phenol / chloroform / isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)

Isopropanol

Ethanol 70 %

TE1X (pH 8.0)

• Vật liệu để tiến hành phương pháp Dot Blot**Vật liệu cần để chuyển DNA lên màng**

Màng Hybond - N

Đệm biến tính: NaOH 0,5 M; NaCl 0,15 M

Đệm trung tính: Tris – HCl 0,5 M; NaCl 0,15 M; pH 7,0

Đệm chuyển (transfer buffer): SSC 20X, SSC 6X, SSC 2X

Máy sấy

Máy cross - linker: GS GENE LINKER™ UV CHAMBER (Bio - Rad)

Vật liệu cần để tạo mẫu dò

Sản phẩm PCR đã được tinh sạch

Reaction buffer

Labelling reagent

Cross – linker working

Vật liệu cần để lai

Buồng lai: HB – 1000 Hybridizer

Dung dịch đệm lai: Alkphos Direct hybridization buffer (Amersham)

Dung dịch rửa 1 (Primary wash buffer): Urea 2 M; SDS 0,1%; natri phosphate 50 mM (pH 7,0); NaCl 50 mM; $MgCl_2$ 1 mM; blocking reagent 0,2% (w/v)

Dung dịch rửa 2 (Secondary wash buffer): Tris - base 1 M; NaCl 2 M, pH 10,0.

Vật liệu cần để phát hiện kết quả lai

Saran Wrap

Chất phát hiện: detection reagent with CDP – star (Amersham)

Phim Konica 30 x 40 cm (100 tấm / hộp)

Bộ thuốc rửa phim Konica (developer + fixer)

Cassette 30 x 40 Konica

Buồng tối để rửa phim

• Vật liệu dùng để xem kính hiển vi

Lam

Lame

Dầu soi kính

Giấy lau kính

• Chú thích một số thuật ngữ tiếng anh

Genome: toàn bộ gen vi khuẩn

Ori (origin): là một đoạn mã hóa của DNA, tại đó sự tái bản được bắt đầu.

P (promoter): là một vùng DNA tại đó có sự gắn kết RNA polymerase để bắt đầu sự giải mã.

Reporter gene: là một đơn vị mã hóa mà sản phẩm của nó được trắc nghiệm dễ dàng (ví dụ như Chloramphenicol transacetylase); nó có thể gắn với bất kì một promoter nào sao cho sự thể hiện của gen này được dùng để thử nghiệm chức năng của promoter.

Saran wrap: là loại giấy kính trong dùng bọc hoa quả.

Tn (transposon): là một đoạn mã hóa DNA có thể tự nó gắn vào ở một vị trí mới trong genome mà không cần bất kì sự liên quan nào về mã di truyền.

Hiện tượng im lặng gen (Gene silencing)

Chúng ta biết rằng DNA vi khuẩn sử dụng hệ thống R – M (restriction - modification) với R biểu thị tính chất giới hạn, M biểu thị tính chất cải tiến. Hệ thống R – M trong vi khuẩn giúp nó chống lại sự xâm nhập của những nhân tố lạ về di truyền.

Trong hệ thống này, DNA của tế bào sẽ bị methyl hóa tại các chuỗi mã xác định 4 – 8 bp, do một phản ứng xúc tác của methyl transferase. DNA lạ thuộc nhóm “non-self” không bị methyl hóa, chứa những chuỗi mã bị phân hóa thông qua hoạt động của enzyme “endonuclease”. Chính sự methyl hóa là yếu tố vô cùng quan trọng của hiện tượng im lặng gen. Người ta đặt giả thiết có ba yếu tố chính xảy ra trong phản ứng đối với sự xâm nhập DNA là: phát hiện, làm bất hoạt và loại trừ.

Hầu hết các sự kiện chuyển đổi vị trí đều có thể trở thành mục tiêu mỗi đối với hệ enzyme DNA methyltransferase. Phân tử DNA xâm nhập vào có thể làm thay đổi những cấu trúc vùng (domain), gây bất hoạt nội phân bìa của locus nào đó, làm cho vùng dị nhiễm sắc đậm đặc hơn và làm cho gen trở nên im lặng.

Nghiên cứu vùng không gian của gen cho thấy cấu trúc của bộ gen có khả năng xác định và làm bất hoạt những chuỗi mã lạ ở những vùng cụ thể. Phân tử DNA lạ xâm nhập vào vùng không gian giàu GC, nếu phân tử DNA này cũng giàu GC nó có thể tiếp hợp và được cài đặt ở đây một cách ổn định và được chuyển mã, nếu phân tử này giàu AT hiện tượng im lặng sẽ xảy ra. Trường hợp nó xâm nhập vào vùng không gian giàu AT, nó sẽ im lặng hoàn toàn cho dù nó chứa chuỗi mã giàu AT hay GC.